UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**EXPRESSÃO EM LEVEDURA E PURIFICAÇÃO DA Ca^{2+} -ATPase
DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO DE COELHO**

EDUARDO MORAES REGO REIS

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR:

DR. SERGIO VERJOVSKI-ALMEIDA

SÃO PAULO

06/08/2000

*“Expressão em Levedura e Purificação da Ca^{2+} -
ATPASE do Retículo Sarcoplasmático de Coelho”.*

EDUARDO MORAES REGO REIS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. SÉRGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA

IQ - USP

(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. FERNANDO DE CASTRO REINACH

IQ - USP

Prof. Dr. ANGELO GERALDO GAMBARINI

IQ - USP

Prof. Dr. CARLOS EDUARDO WINTER

ICB - USP

Prof. Dr. SÉRGIO TEIXEIRA FERREIRA

UFRJ

SÃO PAULO
12 DE SETEMBRO DE 2000.

AGRADECIMENTOS

Ao Sergio, pela orientação, estímulo e amizade contínuos.

Ao Rodrigo, Paolo, Valéria, Nilva, Renata, Sergio "Natal", pela colaboração.

Ao Jefferson, Ivone, Ana Paula e Célia, pelo apoio.

Aos colegas de laboratório ao longo desses anos, Eveline, Vitor, Ivan, Paulinho, Juliana, Ricardo, Alessandra, Gilson, Adriana, Renato, pelo incentivo e ajuda em vários momentos.

Ao pessoal do IQ, e aos que por aqui passaram ao longo desses anos, pela contribuição com idéias e sugestões.

Ao CNPq e a FAPESP, pelas bolsas e auxílios concedidos, que viabilizaram a realização desse trabalho.

A minha família, pelo apoio durante todos os anos de formação.

A Gabi, pelo companheirismo e compreensão.

Ao João e a Marina, pelo foco.

Parte dos dados apresentados nessa Tese foram objeto de duas publicações:

Reis, E. M. R., Slayman, C. W. and Verjovski-Almeida, S. (1996). Heterologous expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Bioscience Rep.* **16**, 107-113

Reis, E. M. R., Kurtenbach, E., Ferreira, A. R., Biselli, P. J. C., Slayman, C. W. and Verjovski-Almeida, S (1999). N-terminal chimeric constructs improve the expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 83-95

ÍNDICE

	Pag.
RESUMO	vii
SUMMARY	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
ABREVIACÕES	xii
INTRODUÇÃO	1
1. A Ca^{2+} -ATPase do Retículo Sarcoplasmático	1
2. Perspectiva histórica	1
3. Mecanismo de reação	3
4. Inibidores	7
5. Purificação da Ca^{2+} -ATPase	7
6. Interações proteína-lipídeo	9
7. Mapeamento dos domínios funcionais	10
8. Estrutura tri-dimensional	14
OBJETIVOS	17
MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. Cepas de levedura, transformação e meios de cultura	19
2. Indução e preparação de extrato total de levedura	19
3. Solubilização e imunoprecipitação da SR Ca^{2+} -ATPase recombinante	20
4. Fosforilação da SR Ca^{2+} -ATPase recombinante por ^{32}P - γ -ATP	21
5. Fosforilação da SR Ca^{2+} -ATPase recombinante por ^{32}Pi	21
6. Fracionamento por centrifugação diferencial	22
7. "Immunoblots" para detecção de SR Ca^{2+} -ATPase recombinante	22
8. Fracionamento em gradiente de sacarose	23
9. Ensaio enzimáticos nas frações do gradiente de sacarose	23
10. Purificação de vesículas secretoras	24
11. Purificação de anticorpos em coluna de proteína A- sepharose	24
12. Microscopia de imunofluorescência confocal	24
13. Purificação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase por cromatografia de afinidade em coluna de níquel	26
14. SDS-PAGE e "Western blot"	27

15. Construção de mutantes pontuais pela técnica de "Mega Primer"	28
16. Preparação de RNA total de levedura	30
17. "Northern blot"	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
1. Construções e vetores de expressão	32
1.1. SR Ca ²⁺ -ATPase nativa	32
1.2. Quimeras N-terminais da SR Ca ²⁺ -ATPase	33
1.2.1. 6xHis Ca ²⁺ -ATPase	33
1.2.2. Fusões H ⁺ -ATPase/Ca ²⁺ -ATPase	33
2. Expressão de SR Ca ²⁺ -ATPase em levedura	34
3. Expressão em levedura de SR Ca ²⁺ -ATPase contendo modificações na região N-terminal	41
4. Localização sub-celular da SR Ca ²⁺ -ATPase nativa e quimeras N-terminais	45
4.1. Fracionamento em gradiente de sacarose	45
4.2. Imunolocalização utilizando microscopia confocal	47
4.3. Expressão de SR Ca ²⁺ -ATPase em leveduras deficientes na via de secreção	48
5. Fosforilação e "turnover" nas quimeras N-terminais da SR Ca ²⁺ -ATPase	53
6. Purificação da 6xHis Ca ²⁺ -ATPase expressa em levedura	55
6.1. Otimização da solubilização	55
6.2. Cromatografia de afinidade	57
6.3. Otimização da cromatografia de afinidade para aumento do rendimento	60
6.4. Estabilização da 6xHis-Ca ²⁺ -ATPase pela introdução de cálcio e lipídio durante as etapas de purificação	66
7. Caracterização cinética da hexaHis-Ca ²⁺ -ATPase purificada.	69
8. Construção e expressão de mutantes de fluorescência da Ca ²⁺ -ATPase	72
9. Caracterização da hexaHis Ca ²⁺ -ATPase por espectroscopia de fluorescência	79
10. Expressão de mutantes do sítio de fosforilação da SR Ca ²⁺ -ATPase	85
10.1. Mutante W794A	85
10.2. Mutante W552F	86
11. Expressão de mutantes do sítio de fosforilação da Ca ²⁺ -ATPase	90

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	100
BIBLIOGRAFIA	106
CURRICULUM VITAE	118
ANEXOS	120

RESUMO

Este estudo descreve um novo método para a produção da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de coelho em levedura utilizando um vetor de expressão regulado por choque térmico. Após solubilização das membranas de levedura com lisofosfatidilcolina, a introdução de um "tag" de 6 histidinas na extremidade amino-terminal da Ca^{2+} -ATPase permitiu a sua purificação por cromatografia de afinidade utilizando uma resina carregada com níquel. Utilizando essa estratégia, foi possível obter frações enriquecidas em até 75% de Ca^{2+} -ATPase recombinante, algo não descrito ainda na literatura. A 6xHis Ca^{2+} -ATPase solubilizada em LPC e purificada em coluna de níquel se mantém estável desde que seja introduzido DOPC juntamente com o detergente nas etapas de lavagem e eluição. Nessas condições, a enzima purificada possui elevada atividade ATPásica cálcio-dependente ($1.5\text{-}2.0\ \mu\text{mol/mg proteína}\cdot\text{min}$) durante vários minutos de reação. A titulação da atividade ATPásica em função do cálcio livre demonstrou que a 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada possui alta afinidade para o íon ($K_{0.5} = 0.15\ \mu\text{M}$) e manteve uma forte cooperatividade na ativação por cálcio ($n_H = 2.07$). A quantidade e o grau de pureza obtidos são suficientes para permitir a caracterização bioquímica e espectroscópica de mutantes pontuais da Ca^{2+} -ATPase já construídos e expressos em levedura.

A conversão da energia presente em ligações químicas em gradiente eletroquímico é um tema central da bioenergética. Espera-se que o estudo dos mutantes pontuais de triptofano da Ca^{2+} -ATPase gerados nesse trabalho contribua para uma melhor compreensão do mecanismo de acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte vetorial de íons nesse modelo de estudo de proteínas de transporte.

SUMMARY

We describe in this work a new method for the production of SERCA-1 Ca^{2+} -ATPase in yeast using a heat-shock regulated expression vector. Following solubilization of yeast membranes with lysophospholipids, the presence of an hexahistidine tag introduced at the N-terminal end of the Ca^{2+} -ATPase allowed its purification by metal chelating affinity chromatography using a nickel-NTA resin. Using this procedure highly enriched fractions (75% of total protein in the fraction) of yeast-expressed rabbit Ca^{2+} -ATPase were obtained. Detergent-solubilized 6xHis- Ca^{2+} -ATPase retained highly active (1.5 - 2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein .min) calcium-dependent, vanadate inhibitable ATPase activity as determined by ^{32}P - γ -ATP hydrolysis. Titration of ATPase activity as a function of free calcium revealed high Ca^{2+} affinity ($K_{0.5} \cong 0.15 \mu\text{M}$) and the persistence of a strong cooperative pattern of calcium activation (Hill number of 2.07). The yield and purity of 6xHis Ca^{2+} -ATPase fractions produced with this method allows the biochemical and spectroscopic characterization of Ca^{2+} -ATPase mutants produced in the course of this work.

Conversion of the energy present in chemical bonds to electrochemical gradient is a central theme of bioenergetics. It is hoped that the study of the Ca^{2+} -ATPase tryptophan mutants generated in this work will contribute to a better understanding of the coupling mechanism between ATP hydrolysis and the vectorial transport of ions across membranes that occur in this model system.

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase.	4
Figura 2. Cooperatividade da ligação de cálcio.	5
Figura 3. Predição da estrutura secundária da Ca^{2+} -ATPase.	11
Figura 4. Mutagênese-sítio dirigida da Ca^{2+} -ATPase.	12
Figura 5. Motivos conservados nas ATPases transportadoras do tipo P.	13
Figura 6. Modelo estrutural da Ca^{2+} -ATPase com 2.6 Å de resolução.	15
Figura 7. Vetores para expressão de SR Ca^{2+} -ATPase em levedura.	32
Figura 8. Expressão de SR Ca^{2+} -ATPase em levedura induzida por choque térmico.	35
Figura 9. Expressão temporal de SR Ca^{2+} -ATPase durante indução a 37°C.	36
Figura 10. Fosforilação da SR Ca^{2+} -ATPase recombinante por ^{32}P - γ -ATP.	39
Figura 11. Decaimento do intermediário E_iP da SR Ca^{2+} -ATPase nativa expressa em levedura.	40
Figura 12. Fosforilação da SR Ca^{2+} -ATPase recombinante por ^{32}Pi .	40
Figura 13. Expressão de SR Ca^{2+} -ATPase contendo modificações na porção N-terminal.	43
Figura 14. Fracionamento em gradiente de sacarose de membranas contendo SR Ca^{2+} -ATPase.	46
Figura 15. Imunolocalização da SR Ca^{2+} -ATPase por microscopia confocal.	47
Figura 16. Expressão de H^{+} -ATPase em cepas selvagens ou cepas deficientes na via de secreção.	49
Figura 17. Atividade ATPásica em vesículas secretoras de leveduras expressando SR Ca^{2+} -ATPase.	51
Figura 18. Fosforilação e decaimento da fosfoenzima nas Ca^{2+} -ATPase quiméricas.	54
Figura 19. Otimização da solubilização da 6xHis Ca^{2+} -ATPase com lisofosfolipídeos.	56
Figura 20. Purificação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase solubilizada com LPC em coluna NTA- Ni^{2+} .	59
Figura 21. Purificação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase solubilizada com LPC em coluna NTA- Ni^{2+} – condição otimizada.	60
Figura 22. Captação de cálcio pela SR Ca^{2+} -ATPase extraída de músculo, solubilizada em LPC e reconstituída em vesículas de PC/PA.	65
Figura 23. Purificação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase em na presença de 0.5 mM CaCl_2 e 0.05% DOPC.	68

Figura 24. Atividade ATPásica Ca^{2+} -dependente. Inibição da 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada por EGTA e ortovanadato.	69
Figura 25. Ativação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada por cálcio.	71
Figura 26. Construção de mutantes de fluorescência utilizando técnica de "megaprimer PCR".	74
Figura 27. Construção de mutantes de fluorescência da Ca^{2+} -ATPase utilizando fragmentos de PCR com sobreposição na região da mutação.	75
Figura 28. Expressão em levedura dos mutantes de fluorescência W107F, W272F, W288F, W552F, W794A, W832F, W854F e W855F.	77
Figura 29. Expressão em levedura dos mutantes de fluorescência W50F, W77F, W928F, W932F e W967F.	78
Figura 30. Espectro de emissão da 6xHis- Ca^{2+} -ATPase purificada.	80
Figura 31. Variação da fluorescência intrínseca em vesículas do retículo sarcoplasmático extraídas de músculo durante a ligação reversível de cálcio.	81
Figura 32. Sensibilidade da fluorescência intrínseca da Ca^{2+} -ATPase em diferentes concentrações de detergente.	82
Figura 33. Insensibilidade da fluorescência intrínseca da 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada a ligação de cálcio.	83
Figura 34. Ativação por cálcio da W794A Ca^{2+} -ATPase.	85
Figura 35. Ativação por cálcio da W552F Ca^{2+} -ATPase.	86
Figura 36. Papel do resíduo W552 na estabilização do domínio de ligação de nucleotídeo.	87
Figura 37. Expressão temporal de mutantes do sítio de fosforilação da SR Ca^{2+} -ATPase em levedura.	91
Figura 38. Abundância do mRNA codificante para os mutantes do sítio de fosforilação.	92
Figura 39. Acumulação transiente do D351E Ca^{2+} -ATPase mRNA durante indução por choque térmico.	93
Figura 40. Acumulação transiente do mRNA da quimera $\text{H}^+ \Delta \text{Ca}^{2+}$ -ATPase.	95
Figura 41. Taxa de crescimento a 37°C de leveduras expressando Ca^{2+} -ATPase nativa ou o mutante D351E.	96
Figura 42. Efeito da indução por choque térmico sobre o perfil de restrição do vetor contendo a sequência codificante para o mutante D351E.	97

Figura 43. Expressão temporal do mutante D351E em “Western blot” revelado com anticorpo policlonal contra a SR Ca ²⁺ -ATPase.	98
Figura 44. Expressão temporal do mutante D351E da SR Ca ²⁺ -ATPase em uma cepa deficiente em proteases.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação da SR Ca ²⁺ -ATPase recombinante nos lisados totais.	37
Tabela 2. Recuperação de Ca ²⁺ -ATPase recombinante em frações de membrana de levedura.	44
Tabela 3. Recuperação de SR Ca ²⁺ -ATPase em vesículas secretoras.	50
Tabela 4. Reconstituição da Ca ²⁺ -ATPase de músculo solubilizada em LPC em lipossomos de PC/PA.	62
Tabela 5. Quadro-resumo da purificação da 6xHis Ca ²⁺ -ATPase em coluna NTA-Ni ²⁺ .	67
Tabela 6. Nível de expressão dos mutantes de fluorescência da Ca ²⁺ -ATPase.	78

ABREVIACÕES

C ₁₂ E ₈	Polioxietileno 8-lauril eter
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPC	Dioleoil fosfatidilcolina
FITC	Fluoresceína isotiocianato
LCD	“Large Cytoplasmic Domain”
LEU2	3-isopropilmalato desidratase
LPC	lisofosfatidilcolina
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
RE	Retículo endoplasmático
SCD	“Small Cytoplasmic Domain”
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarco(endo)plasmático
SR	Retículo sarco(endo)plasmático
TRITC	Tetrametil rodamina isotiocianato
URA3	Orotidina-5'fosfato descarboxilase

INTRODUÇÃO

1. A Ca^{2+} -ATPASE DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO

Todas as células regulam a composição iônica no seu citoplasma. Para atingir esse objetivo, a célula conta com um conjunto de proteínas capazes de realizar o movimento seletivo de íons através de compartimentos isolados por sistemas de membranas biológicas. A participação do íon cálcio como mensageiro intracelular em várias vias de transdução de sinal, tais como na regulação da contração muscular ou na ativação da cascata da fosfolipase C, implica na existência de um mecanismo refinado de regulação da concentração de cálcio no interior da célula. As Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco(endo)-plasmático (SERCA), juntamente com as Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA), desempenham um papel central na manutenção dos níveis basais de cálcio no citoplasma. Durante a estimulação nervosa ou hormonal, canais liberadores de cálcio presentes na membrana de reservatórios intracelulares se abrem, e o nível citosólico do íon aumenta de $0.1\mu\text{M}$ para até $10\mu\text{M}$. Nas células do músculo esquelético, a liberação do cálcio acumulado no retículo sarcoplasmático (SR) através dos canais de Rianodina ativa o sistema contrátil da actomiosina. A captação subsequente do cálcio citoplasmático para o lumen do retículo realizado pela Ca^{2+} -ATPase restabelece o relaxamento muscular.

2. PERSPECTIVA HISTÓRICA

A presença de uma atividade ATPásica acoplada ao transporte de cálcio em vesículas do retículo sarcoplasmático foi identificada pela primeira vez em 1955, quando foi observado que frações membranares extraídas de músculo continham um "fator de relaxamento vesicular" capaz de induzir o relaxamento da contração muscular em preparações de músculo esquelético (Kumagai *et al.*, 1955). Em 1960, Ebashi e Lipmann demonstraram que esse "fator de relaxamento" ligava fortemente cálcio na presença de ATP (Ebashi e Lipmann, 1960). No ano seguinte, Ebashi (Ebashi, 1961) e Hasselbach e Makinose (Hasselbach e Makinose, 1961) realizaram experimentos cruciais para a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da contração muscular por cálcio. O trabalho realizado por Ebashi demonstrou que i) a adição de pequenas quantidades de cálcio provocavam a agregação de actomiosina de músculo; ii) agentes quelantes de cálcio (ex. EGTA) revertiam o efeito do íon, promovendo o "relaxamento" da actomiosina; iii) a ligação ATP-dependente de cálcio ao "fator de relaxamento" promovia um relaxamento semelhante ao observado após a adição de

EDTA à actomiosina agregada. Com base nesses resultados, e nos trabalhos de Huxley e Taylor, sugerindo que o retículo endoplasmático representava o meio pelo qual a excitação nervosa do sarcolema era conduzida ao interior da fibra muscular (Huxley e Taylor, 1957; Huxley e Taylor, 1958), Ebashi propôs um mecanismo para explicar a contração/relaxamento muscular. Nesse modelo, conhecido com a "Teoria do cálcio", o cálcio ficaria armazenado no retículo sarcoplasmático durante o repouso, mantendo as concentrações citoplasmáticas do íon em níveis baixos. Quando excitada, a despolarização da membrana da célula muscular promoveria a liberação de cálcio para o citoplasma e a ativação do sistema contrátil da actomiosina. Ao término da excitação nervosa, a remoção do cálcio citoplasmático pelo "fator de relaxamento" presente no retículo sarcoplasmático restauraria o estado de repouso das proteínas contráteis. A "Teoria do cálcio" proposta por Ebashi foi reforçada pelos dados cinéticos obtidos no mesmo ano por Hasselbach e Makinose, demonstrando que i) os "grânulos de relaxamento" isolados do retículo endoplasmático de músculo esquelético hidrolizam ATP e acumulam cálcio no seu interior; e ii) a velocidade de hidrólise de ATP é dependente da concentração de cálcio (Hasselbach e Makinose, 1961). Em 1962, Hasselbach e Makinose propuseram a existência de um mecanismo de transporte ativo de cálcio para o interior dos "grânulos de relaxamento", envolvendo a existência de um intermediário fosforilado desconhecido (Hasselbach e Makinose, 1962).

A fração enriquecida em membranas derivadas do retículo sarcoplasmático obtida a partir de músculo é constituída por vesículas seladas com diâmetro aproximado de 100 nm. O estudo da composição protéica das vesículas revelou a presença de 5 proteínas diferentes (ver de Meis, 1981). A Ca^{2+} -ATPase, constituída de uma única cadeia polipeptídica com um peso molecular de 110.000 Daltons, é o componente majoritário e representa invariavelmente 70-80% do conteúdo protéico total das vesículas (Eletr e Inesi, 1972; Meissner *et al.*, 1973; ver de Meis, 1981). Os demais componentes das vesículas são: calsequestrina (44 kDa), uma proteína ligadora de cálcio com 55kDa, uma glicoproteína com 30 kDa, e um proteolípídeo de 12 kDa. A calsequestrina e a proteína ligadora de cálcio constituem 5-30% da proteína presente na vesícula, dependendo do método de isolamento utilizado (Meissner *et al.*, 1973; ver de Meis, 1981). Essas 2 proteínas são periféricas, interagindo fracamente com a membrana, e localizam-se no lúmen do retículo endoplasmático. A calsequestrina é capaz de ligar 40 íons cálcio por monômero, atuando como um importante quelante de cálcio responsável por abaixar a concentração de cálcio livre no lumen do retículo, facilitando a acumulação de maiores quantidades do íon (Campbell, 1986).

3. MECANISMO DE REAÇÃO

O mecanismo através do qual a Ca^{2+} -ATPase utiliza a energia acumulada em ligações químicas para a construção de um gradiente de cálcio foi extensivamente estudado durante as décadas de 60 e 70. A Ca^{2+} -ATPase hidroliza nucleosídeos trifosfatados (ATP, GTP, CTP, UTP), além de outras moléculas contendo ligações fosfato de alta-energia, tais como acetil fosfato e p -nitrofenil fosfato. Porém, a afinidade da enzima por ATP ($1\text{--}3\mu\text{M}$) é uma ou mais ordens de grandeza maior que para os demais substratos (ver de Meis, 1981). A atividade ATPásica da enzima depende da presença de magnésio, sendo ATP.Mg^{2+} o verdadeiro substrato da enzima (ver de Meis, 1981 e Mintz e Guillain, 1997). A existência de um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico foi predita a partir da observação de que vesículas incubadas na presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP e $[^{14}\text{C}]\text{ADP}$ promoviam a formação de ATP radioativo (Ebashi e Lipman, 1962). Esse resultado levou Ebashi e Lipmann a sugerir em 1962 que a troca $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP}$ se devesse a fosforilação reversível da membrana durante o ciclo catalítico (Ebashi e Lipman, 1962). Três anos depois, Makinose e Hasselbach comprovaram a reversibilidade do acoplamento entre a hidrólise de ATP e a captação de cálcio nas vesículas do retículo sarcoplasmático. Ao transferirem vesículas carregadas com cálcio para um meio desprovido de cálcio, observaram que a Ca^{2+} -ATPase sintetiza ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi), utilizando a energia liberada pela dissipação do gradiente de cálcio (Makinose e Hasselbach, 1965). Em 1973, Post e Kume sugeriram que um resíduo aspartil seria o resíduo aceitador do fosfato gama do ATP na Na, K –ATPase durante o ciclo catalítico (Post e Kume, 1973). Esse resultado foi confirmado no mesmo ano por Degani e Boyer na Ca^{2+} -ATPase, apontando para a existência de um mecanismo catalítico comum as duas enzimas transportadoras (Degani e Boyer, 1973). Ainda em 1973, Makinose propôs um modelo no qual a Ca^{2+} -ATPase alternaria entre duas conformações com diferentes afinidades para o íon (E_1 e E_2) durante o ciclo catalítico de hidrólise de ATP (Makinose, 1973). Esse modelo simplificado foi expandido e vários intermediários presentes no ciclo catalítico foram caracterizados bioquimicamente após estabilização, seja pelo ajuste das condições de reação ou através de mutagênese sítio-dirigida (ver MacLennan *et al.*, 1997). No mesmo ano, Masuda e de Meis demonstraram a fosforilação da Ca^{2+} -ATPase por Pi utilizando vesículas não-seladas, que não mantêm gradientes eletroquímicos (Masuda e de Meis, 1973). Essa reação é possível desde que o sítio de cálcio de alta-afinidade no lado citoplasmático esteja desocupado. Na ausência de cálcio e na presença de magnésio, o ciclo reverso se inicia por fosforilação espontânea do resíduo aspartil da proteína por Pi (Masuda e

de Meis, 1973; ver Mintz e Guillain, 1997). A adição de cálcio, magnésio e ADP ao intermediário $E_2 P$ formado em vesículas não seladas na ausência de cálcio, é suficiente para permitir a síntese de ATP, revelando que a energia proveniente do gradiente de cálcio não é essencial para que a síntese ocorra (Kanazawa e Boyer, 1973; Masuda e de Meis, 1973). A reversibilidade do mecanismo de reação torna a Ca^{2+} -ATPase um modelo de estudo interessante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na interconversão entre energia química e gradiente químico que ocorre nas membranas biológicas, um tema central da bioenergética (de Meis, 1981). Uma versão simplificada do ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase está representado abaixo (Figura 1).

Figura 1. Ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase.

Esquematicamente, o ciclo se inicia com a enzima na conformação E_1 , com alta-afinidade para cálcio. Nessa conformação, 2 íons cálcio se ligam a sítios de alta afinidade ($K_d \cong 1\mu M$) acessíveis pelo lado citoplasmático da membrana do retículo (Inesi, 1987). Inesi demonstrou em 1980, sendo posteriormente confirmado por vários autores (Inesi *et al.*, 1980; Verjovski-Almeida e Silva, 1981; Champeil *et al.*, 1983; Tanford *et al.*, 1987), que a ligação dos dois íons ocorre sequencialmente e de um modo cooperativo (Inesi, 1987); a ligação do primeiro íon ocorre rapidamente e induz uma mudança de conformação lenta que facilita a ligação do segundo (esquema 2). Tanto a afinidade quanto a cooperatividade da ligação de cálcio são inversamente proporcionais a concentração de prótons no meio (Hill e Inesi, 1982).

Figura 2. Cooperatividade da ligação de cálcio (extraído de Inesi, 1987).

A saturação dos dois sítios de cálcio ativa a rápida transferência do fosfato- γ do ATP para o resíduo aspartil D351 da enzima formando o intermediário $E_1\sim P$ e liberando ADP (Froehlich e Taylor, 1975; Pickart e Jencks, 1984). Os dois íons cálcio ligados a $E_1\sim P$ ficam ocluídos no interior da proteína e deixam de trocar rapidamente com os "pools" de cálcio citoplasmático e lumenal (Dupont, 1980; Takisawa e Makinose, 1981). No estado $[2Ca^{2+}].E_1\sim P$, os íons cálcio não podem se dissociar a menos que ocorra uma lenta mudança conformacional de $E_1\sim P$ para $E_2\sim P$, no passo limitante do ciclo catalítico, acompanhada de uma mudança de afinidade de 3 ordens de magnitude que libera o cálcio ligado no lumen do retículo (ver MacLennan *et al.*, 1997 e Mintz e Guillain, 1997). Esse mecanismo permite o acúmulo de cálcio no interior do retículo sarcoplasmático e a construção do gradiente eletroquímico de cálcio. A acumulação de cargas positivas resultante do acúmulo de cálcio no interior do retículo é compensada pelo contra-transporte de prótons no sentido inverso durante o ciclo catalítico (Yamaguchi e Kanazawa, 1985; Yu *et al.*, 1993). A conversão $E_1\sim P \rightarrow E_2\sim P$ pode ser detectada em experimentos bioquímicos pela medida do desaparecimento do intermediário fosforilado sensível a ADP ($E_1\sim P$), e o concomitante acúmulo de uma espécie ADP-insensível ($E_2\sim P$) (ver de Meis, 1981 e Mintz e Guillain, 1997). A hidrólise do intermediário $E_2\sim P$ e a regeneração dos sítios de alta-afinidade na conformação E_1 completam o ciclo (ver MacLennan *et al.*, 1997 e Mintz e Guillain, 1997). A ocupação de apenas um sítio de ligação de cálcio é suficiente para induzir a conversão $E_2 \rightarrow E_1$, depletando o substrato envolvido na fosforilação por P_i no ciclo inverso da enzima (ver Andersen e Vilsen, 1995).

Na ausência de cálcio, a atividade ATPásica em vesículas do retículo sarcoplasmático em condições padrão (pH7, 20 °C, 3mM Mg^{2+} , 100 mM KCl, 1mM ATP) é de 0.03 μ mol de ATP hidrolizado por minuto por miligrama de proteína total. A adição de cálcio micromolar ativa em duas ordens de grandeza a atividade basal da enzima, que passa a 4 μ mol de ATP hidrolizado/mg.min. Em vesículas seladas, a atividade permanece alta até que a concentração de cálcio no interior no lumen atinja alguns milimolar, ou 80 nmol Ca^{2+} por miligrama de

proteína total. A partir dessa concentração, a saturação dos sítios de baixa afinidade voltados para o interior do retículo deslocam o equilíbrio da reação no sentido inverso do ciclo, provocando a inibição da atividade da enzima. Foi observado por microscopia eletrônica que a adição de íons quelantes de cálcio como oxalato ou Pi ao meio de reação permite que vários μ moles de cálcio por miligrama de proteína total sejam armazenados no interior das vesículas sem que ocorra inibição reversa; os complexos Ca^{2+} .oxalato e Ca^{2+} . Pi formados no interior das vesículas são bastante insolúveis e precipitam, reduzindo a concentração de cálcio livre no lumen do retículo sarcoplasmático e permitindo o acúmulo adicional de cálcio (ver de Meis, 1981 e Mintz e Guillain, 1997).

Foi observado que a Ca^{2+} -ATPase liga no equilíbrio 8-10 nanomoles de Ca^{2+} por miligrama de proteína. Esse valor corresponde ao dobro da estequiometria observada na formação de E~P por ATP, de 5 nmol fosfoenzima/mg proteína (Inesi *et al.*, 1980). Com base nesses valores, Inesi propôs que cada unidade enzimática contem 2 sítios alta-afinidade para cálcio e um sítio de fosforilação (Inesi *et al.*, 1980). Contudo, como a Ca^{2+} -ATPase (110 kDa) corresponde a 80% da proteína total do retículo sarcoplasmático, a estequiometria esperada para a ligação de cálcio e fosforilação por ATP seria de 18 e 9 nmoles por miligrama de proteína total, respectivamente. Utilizando preparações de Ca^{2+} -ATPase purificadas por gel-filtração após solubilização em deoxicolato, Barrabin et al. obtiveram um máximo de 7.3 nmoles de sítio fosforilados por mg de ATPase, o que estequiometricamente corresponde a fosforilação de 80% da proteína presente no ensaio (Barrabin *et al.*, 1984). Ainda não está claro na literatura por que apenas 50% da Ca^{2+} -ATPase presente na vesícula está reativa. Este dado pode ser explicado pela existência de reatividade em apenas metade dos sítios catalíticos, resultante da interação entre duas moléculas de Ca^{2+} -ATPase funcionalmente arranjadas sob a forma de dímero ou tetrâmero (Segel, 1975; Mintz e Guillain, 1997; Nakamura e Tajima, 1997; Carvalho-Alves *et al.*, 2000). A existência de uma estrutura dimérica para a Ca^{2+} -ATPase foi também proposta para explicar a dependência bifásica da atividade ATPásica em função da concentração de ATP (Inesi *et al.*, 1967; Møller *et al.*, 1980; Inesi, 1985), embora tenha sido sugerido que a ligação de ATP a um segundo sítio regulatório de baixa afinidade na mesma cadeia polipeptídica possa ser a explicação para a modificação da velocidade de vários passos intermediários do ciclo catalítico (Mintz e Guillain, 1997). Ainda em relação ao estado agregacional da Ca^{2+} -ATPase funcional, foi descrito na literatura que o monômero da Ca^{2+} -ATPase, obtido após solubilização das membranas do retículo com detergente e reconstituição em vesículas, é capaz de descrever o ciclo catalítico completo da enzima (Dean e Tanford, 1978; Andersen *et al.*, 1983; McIntosh

e Ross, 1988; Andersen, 1989; le Maire *et al.*, 1989). Uma crítica a esses dados deve-se a dificuldade experimental de obter medidas cinéticas e espectroscópicas da enzima quando esta se encontra suficientemente diluída de modo a garantir a presença de uma única molécula de Ca^{2+} -ATPase por micela após a reconstituição. A constante de dissociação monômero-dímero medida em preparações de Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático solubilizadas e parcialmente delipidadas é de $K_d = 0.94 \mu\text{M}$ (Silva e Verjovski-Almeida, 1985).

4. INIBIDORES

Foi observado que na presença de magnésio, o ortovanadato se liga com afinidade micromolar ao intermediário E_2 da Ca^{2+} -ATPase, deslocando drasticamente o equilíbrio $\text{E}_2 \rightleftharpoons \text{E}_1$ no sentido da estabilização do intermediário de baixa-afinidade para cálcio (Dupont e Bennet, 1982). A estrutura química do ortovanadato (VO_4) é muito semelhante a do ortofosfato (PO_4), tendo sido demonstrado que ambos se ligam de um modo competitivo ao mesmo sítio da enzima (Punzengruber *et al.*, 1978; Dufour e Goffeau, 1978; Lacapère *et al.*, 1981). Com base nesses resultados, foi proposto que o mecanismo de inibição da Ca^{2+} -ATPase pelo vanadato envolva a formação de um complexo $\text{E}_2\text{-Mg}^{2+}\text{VO}_4$ estável na vizinhança do centro catalítico da enzima (Dufour e Goffeau, 1978). Sabe-se hoje que o vanadato inibe todas as proteínas de transporte que possuem um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico, agrupadas na família das ATPases do tipo P (Møller *et al.*, 1996).

Ao contrário do vanadato, a tapsigargina é um inibidor específico da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoendoplasmático (Sagara e Inesi, 1991). Na ausência de cálcio, ou no estado E_2 do ciclo catalítico, a tapsigargina se liga com afinidade sub-nanomolar na região transmembranar M_3 da Ca^{2+} -ATPase de um modo irreversível, inativando a enzima (Sagara *et al.*, 1992; ver Mintz e Guillain, 1997).

5. PURIFICAÇÃO DA Ca^{2+} -ATPASE

A purificação em alto grau da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático foi facilitada pela alta densidade da ATPase nas vesículas e pela disponibilidade de preparações onde ela representa dois terços da proteína total (Ebashi *et al.*, 1969; Martonosi, 1971). O tratamento não-solubilizante dessas vesículas com ácidos biliares (colato/deoxicolato) na presença de sal, permitiu a remoção da maior parte das outras proteínas presentes nas vesículas do

retículo (calsequestrina e proteína ligadora de cálcio), indicando que elas interagiam perifericamente com a membrana, e permitindo a obtenção de frações enriquecidas em 90% ou mais de Ca^{2+} -ATPase com elevada atividade específica (MacLennan, 1970; McFarland e Inesi, 1971; Meissner *et al.*, 1973). A Ca^{2+} -ATPase purificada através dos métodos não-solubilizantes mantinha os lipídeos nativos do músculo do coelho e não necessitava portanto ser reconstituída em lipídeos exógenos (ver Meissner *et al.*, 1973).

O surgimento de métodos para a expressão heteróloga da Ca^{2+} -ATPase de músculo (ver Reis *et al.*, 1996), chamou a atenção para a necessidade de estratégias que permitissem o isolamento de frações enriquecidas em Ca^{2+} -ATPase a partir de um material inicial contendo no máximo 1% de ATPase recombinante, o nível encontrado em lisados totais de células COS-1 transformadas (Maruyama e MacLennan, 1988). A localização preferencial da proteína recombinante nas membranas do retículo endoplasmático da célula COS-1 permitiu o isolamento de frações microssomais seladas enriquecidas em 5% de Ca^{2+} -ATPase após a centrifugação dos lisados totais (Maruyama e MacLennan, 1988). Apesar do baixo grau de enriquecimento em Ca^{2+} -ATPase de músculo, a ausência de Ca^{2+} -ATPases endógenas nessa fração permite a obtenção de medidas de captação de cálcio sem que seja necessário um passo de purificação adicional (Maruyama e MacLennan, 1988). Por outro lado, a existência de atividades ATPásicas endógenas associadas a essa fração não permite a medida direta da atividade ATPásica Ca^{2+} -dependente nas membranas microssomais. Para contornar parcialmente essa limitação, MacLennan e colaboradores introduziram a solubilização das membranas do microssoma com detergente e posterior imunoprecipitação da Ca^{2+} -ATPase recombinante utilizando um anticorpo monoclonal específico acoplado a proteína A-Sepharose (Clarke *et al.*, 1989). Após remoção das proteínas contaminantes presentes na fração solúvel, o imunocomplexo contendo a ATPase solubilizada foi capaz de formar um intermediário fosforilado na presença de ATP e cálcio (ou Pi e EGTA), confirmando a funcionalidade da Ca^{2+} -ATPase heteróloga (Clarke *et al.*, 1989). No entanto, a reconhecida instabilidade da Ca^{2+} -ATPase solubilizada (Andersen *et al.*, 1986) impede a utilização desse método para ensaios de atividade ATPásica. Ainda assim, na ausência de um método alternativo de purificação que permitisse o estudo detalhado dos parâmetros cinéticos da enzima recombinante, essa estratégia de imunopurificação permitiu a caracterização funcional dos mutantes produzidos até o momento (MacLennan, 1997).

A expressão em levedura oferece uma alternativa atraente para a produção em larga-escala de Ca^{2+} -ATPase recombinante (Centeno *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 1996, Degand *et al.*, 1999). Ao contrário dos sistemas de expressão em células de mamífero ou inseto, a facilidade

em crescer alguns litros de cultura de células de levedura possibilita a rápida obtenção de vários miligramas de ATPase recombinante, embora o nível de expressão obtido nesses sistemas seja insuficiente para permitir a obtenção de medidas diretas de atividade (Centeno et al., 1994; Reis et al., 1996; Degand et al., 1999). Recentemente, o trocador de ânions AE1 da membrana de eritrócito humano e a H^+ -ATPase da membrana plasmática de *A.thaliana* foram expressas em levedura em níveis comparáveis a Ca^{2+} -ATPase de músculo e posteriormente foram purificadas em alto grau e com elevada atividade (Sekler *et al.*, 1995; Lanfermeijer *et al.*, 1998). Em ambos os casos, a estratégia utilizada envolveu a adição de uma sequência codificante para um “tag” de histidinas na extremidade N-terminal da proteína ao cDNA clonado no vetor de expressão de modo a permitir a purificação da proteína recombinante em uma coluna de níquel (Hochuli, 1988). A fração membranar de levedura foi inicialmente solubilizada para evitar a co-purificação de proteínas endógenas contaminantes e apenas a fração solúvel foi ligada à coluna de níquel. Após a purificação na coluna, a proteína solúvel foi reintroduzida em lipossomos de composição definida para caracterização funcional (Sekler *et al.*, 1995; Lanfermeijer *et al.*, 1998).

6. INTERAÇÕES PROTEÍNA/LIPÍDEO

Sendo uma proteína integral da membrana do retículo sarcoplasmático, a função da Ca^{2+} -ATPase está intimamente relacionada com a composição e estrutura do ambiente lipídico que a rodeia. As vesículas do retículo sarcoplasmático contêm aproximadamente 0.6 mg de lipídeos por mg de Ca^{2+} -ATPase, o que representa 80-100 moles de fosfolipídeo por mol de proteína. A fosfatidilcolina (PC) constitui o lipídeo predominante (70%), seguido de fosfatidiletanolamina (PE; 17%), fosfatidilinositol (PI; 11%), esfingomiélin (5%), fosfatidilserina (PS; 1%) e cardiolipina (0.4%) (Pikula *et al.*, 1994). A composição das cadeias alifáticas é predominantemente palmitato (16:0), oleato (18:1) e linoleato (18:2) (Mintz e Guillain, 1997). O efeito da composição lipídica sobre a atividade da Ca^{2+} -ATPase foi extensivamente estudado após reconstituição da enzima solubilizada em lipossomos de composição definida (Lee, 1998). Foi demonstrado que a atividade da enzima varia pouco quando o comprimento da cadeia alifática é mantido entre C16 e C20 (Gould *et al.*, 1987; Lee, 1998). Por outro lado, a reconstituição da Ca^{2+} -ATPase em fosfatidilcolinas com cadeia curta (C14) ou longa (C24) provocou a mudança da estequiometria de ligação de cálcio de 2 para 1 átomo do íon por molécula de ATPase, revelando a importância da espessura da bicamada no funcionamento da enzima (Michelangeli *et al.*, 1990; Lee, 1998). Embora a composição exata de fosfolipídeos não seja essencial, a existência de uma bicamada na fase

líquido-cristalina contendo preferencialmente fosfolípidos com cabeça polar zwitteriônica (PC ou PE) é necessária para manutenção de atividade ATPásica elevada; a atividade da enzima é muito reduzida quando a bicamada encontra-se na fase gel, ou é composta predominantemente por fosfolípidos com cabeça polar negativa (PS ou PA) (Starling *et al.*, 1995; Lee, 1998).

A solubilização dos lípidos da membrana com detergentes não afeta a atividade da enzima desde que uma quantidade mínima de 30 moles de fosfolípido por mol de Ca^{2+} -ATPase seja mantida. Abaixo dessa razão, a atividade da Ca^{2+} -ATPase é irreversivelmente inibida (Hesketh *et al.*, 1976). Com base nesses dados, foi proposta a existência de um anel lipídico composto por 20-30 moléculas de fosfolípido em contato com a face externa das hélices transmembranares da proteína (Hesketh *et al.*, 1976). Além dos lípidos anulares, existem evidências da existência de lípidos não-anulares, ligados entre hélices transmembranares da Ca^{2+} -ATPase (Lee, 1998; Varsanyi *et al.*, 1983; Ding *et al.*, 1994). A existência de lípidos essenciais ao funcionamento da Ca^{2+} -ATPase é um assunto ainda não resolvido na literatura. A observação de populações de lípidos com mobilidade distinta ao redor da Ca^{2+} -ATPase, determinada utilizando fosfolípidos com o spin marcado, reforça a hipótese da existência de lípidos anulares com uma maior afinidade pela proteína (Hesketh *et al.*, 1976).

7. MAPEAMENTO DOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS

A clonagem do cDNA codificante para isoformas da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de músculo de coelho em 1985 (MacLennan *et al.*, 1985; Brandl *et al.*, 1986) abriu o caminho para a caracterização molecular dos domínios funcionais da enzima. A análise do perfil de hidrofobicidade dos 994 resíduos presentes na cadeia polipeptídica da Ca^{2+} -ATPase, preditos pelo cDNA clonado, permitiu a identificação de estruturas secundárias predominantes e a postulação de um modelo tridimensional prevendo a existência de 10 regiões transmembranares e 2 domínios citoplasmáticos (MacLennan *et al.*, 1985; Green e Stokes, 1992) (Figura 3).

Figura 3. Predição da estrutura secundária da Ca^{2+} -ATPase. Resíduos empilhados representam hélices α ; resíduos em zig-zag representam fitas β . Os resíduos marcados em vermelho no interior da membrana foram preditos como participantes na coordenação do cálcio através de experimentos de mutagênese.

Na ausência de dados estruturais, a introdução de mutações pontuais e a análise do efeito da mutação sobre a atividade da enzima produzida em sistemas heterólogos, teve um papel importante na construção de modelos para o mecanismo molecular de funcionamento da Ca^{2+} -ATPase (ver MacLennan *et al.*, 1997). Uma revisão sobre os sistemas de expressão utilizados para a produção de Ca^{2+} -ATPase recombinante, publicada na revista *Bioscience Reports* (Reis *et al.*, 1996), pode ser encontrada na seção *Anexos*.

Utilizando a expressão transiente em células de mamífero, MacLennan e colaboradores caracterizaram o efeito de mutações em aproximadamente 1/3 dos resíduos da Ca^{2+} -ATPase (ver MacLennan *et al.*, 1992 e MacLennan *et al.*, 1997) (Figura 4). Devido ao baixo nível de expressão da Ca^{2+} -ATPase nesse sistema e a presença de ATPases endógenas no hospedeiro utilizado, a análise dos mutantes limitou-se a observação do efeito da mutação sobre i) a atividade transportadora de cálcio; ii) a formação (e decaimento) da fosfoenzima

formada na presença de ATP e Ca^{2+} (ou fosfato inorgânico na ausência de cálcio) (ver MacLennan *et al.*, 1992 e MacLennan *et al.*, 1997). A principal contribuição desses estudos foi a identificação dos resíduos envolvidos na formação dos sítios de ligação de cálcio de alta afinidade (E309, E771, N796, T799, D800 e E908) (Clarke *et al.*, 1989), situados em regiões preditas como hélices transmembranares (M4, M5, M6 e M8) e postuladas como participantes da formação de um canal de cálcio através da membrana (MacLennan *et al.*, 1985). Medidas diretas de ligação de cálcio confirmaram posteriormente o envolvimento do resíduo E309 na formação de um sítio de alta-afinidade para cálcio (Skerjanc *et al.*, 1993). Além de mutantes deficientes na ligação de cálcio, outras mutações ao longo da cadeia polipeptídica da Ca^{2+} -ATPase geraram mutantes com afinidade reduzida para cálcio, com afinidade reduzida para ATP, incapazes de fosforilar por ATP, ou ainda, mutantes deficientes em realizar mudanças conformacionais (transições $\text{E}_1\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{P}$ ou $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$) (ver MacLennan *et al.*, 1992).

Figura 4. Mutagênese-sítio dirigida da Ca^{2+} -ATPase. (extraído de MacLennan *et al.*, 1997). Os resíduos mutados estão coloridos de acordo com o efeito causado sobre a função da enzima: vermelho, perda da função; amarelo, perda parcial da função; verde, função inalterada.

8. ESTRUTURA TRI-DIMENSIONAL

Em 1993, a obtenção de um mapa de densidade com resolução de 14 Å, gerado a partir de imagens de microscopia eletrônica de cristais bi-dimensionais da Ca^{2+} -ATPase crescidos na presença de decavanadato, confirmou a existência de um domínio globular assimétrico no lado citoplasmático, conectado a região transmembranar por uma haste estreita (Toyoshima *et al.*, 1993). Alguns anos depois, a análise por microscopia eletrônica de cristais tri-dimensionais formados na presença de cálcio milimolar gerou imagens com 8 Å de resolução (Zhang *et al.*, 1998). Embora ainda sem resolução molecular, este trabalho permitiu confirmar a existência de 10 hélices transmembranares, preditas pelos perfis de hidrofobicidade, e indicou a localização de uma cavidade que permitiria o acesso do cálcio citoplasmático aos sítios de ligação de cálcio no interior da membrana (Zhang *et al.*, 1998). Recentemente, Toyoshima e colaboradores descreveram a primeira estrutura de alta-resolução da Ca^{2+} -ATPase obtida por difração de raio-X de cristais crescidos na presença de cálcio (Toyoshima *et al.*, 2000) (Figura 6).

A região central é ocupada pelo domínio P, que contém o resíduo fosforilado durante o ciclo catalítico D351. Este domínio é composto por 2 partes bem separadas na cadeia polipeptídica (N330 a N359, que se conecta com M4, e K605 a D737, conectada a M5) que se organizam em 7 fitas β paralelas associadas a 8 hélices α . Resíduos críticos para a hidrólise de ATP estão arranjados nesse domínio, formando uma superfície carregada negativamente e acessível a água (Toyoshima *et al.*, 2000). A estrutura observada para o domínio catalítico da Ca^{2+} -ATPase possui dobramento essencialmente idêntico ao observado no centro catalítico da L-2-dehalogenase haloácida (HAD), como previamente descrito por homologia de sequência utilizando representantes de ATPases do tipo P e hidrolases pertencentes a superfamília HAD (Aravind *et al.*, 1998).

O domínio N, constituído pela sequência compreendida entre os resíduos Q360 a R604, é o maior dos 3 domínios citoplasmáticos e está inserido entre as duas regiões da sequência primária que compõe o domínio P (Figura 6). Este domínio é composto por 7 fitas β anti-paralelas dispostas entre 2 conjuntos de hélices α (Figura 6). A análise por difração de raio-X de cristais de Ca^{2+} -ATPase incubados na presença de TNP-AMP revelou que o análogo de nucleotídeo se localiza na vizinhança do resíduo F487, previamente identificado como indispensável para a ligação de ATP, e fornece evidência direta da função desempenhada pelo domínio N na ligação do nucleotídeo (McIntosh *et al.*, 1996). Os resíduos R489, K492, K515, previamente associados à ligação de ATP, estão situados na

vizinhança do resíduo F487 e definem um "binding pocket" carregado positivamente (Toyoshima *et al.*, 2000).

Figura 6. Modelo estrutural da Ca^{2+} -ATPase com 2.6 Å de resolução (extraído de Toyoshima *et al.*, 2000). Hélices α estão representadas como cilindros, fitas β estão representadas como setas. A coloração do modelo sofre uma lenta gradação do azul para o vermelho no sentido N-terminal $\rightarrow$ Ca^{2+} -terminal. O modelo atômico confirma a arquitetura geral da enzima sugerida pelas estruturas de baixa resolução. A porção citoplasmática da proteína consiste de 3 domínios bem separados, designados como N ("Nucleotide binding domain"), P ("Phosphorylation domain") e A ("Actuator domain"). A presença de 250 moléculas de água de hidratação em regiões vizinhas ao citoplasma e ao lúmen indicam a posição da membrana relativa as hélices transmembranares (Figura 6).

O domínio A, anteriormente denominado domínio β , compreende 110 resíduos situados entre M2 e M3 (SCD) e os 40 resíduos N-terminais da enzima (Figura 6). Embora não seja totalmente clara a sua função, existem evidências de que ocorram grandes movimentações nesse domínio durante o transporte de cálcio (Andersen *et al.*, 1986; Toyoshima *et al.*, 2000). A presença de resíduos conservados nesse domínio (motivo TGE) que quando mutados produzem mutantes conformacionais, reforça a hipótese de que o domínio A desempenhe um papel importante no acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte vetorial de cálcio (Clarke *et al.*, 1990).

As 10 hélices que constituem a região transmembrana (M) possuem comprimentos, inclinações e dobramentos distintos. As hélices M4, M5, M6 e M8 rodeiam dois picos de alta-densidade identificados como íons cálcio situados na mesma altura em relação a membrana (Toyoshima *et al.*, 2000). Dois sítios de ligação (I e II) são formados com contribuições das cadeias laterais dos resíduos N768, E771, T799, D800 (sítio I), e N796, D800, E309 (sítio II). Curiosamente, as hélices M4 e M6 encontram-se parcialmente desenoveladas para formar a cavidade onde se acomodam os íons cálcio.

Apesar do avanço trazido pela solução da estrutura atômica da Ca^{2+} -ATPase na presença de cálcio, existem várias lacunas na compreensão do mecanismo de funcionamento da enzima. O análogo TNP-AMP ligado ao domínio N encontra-se a 25 Å de distância do resíduo catalítico D351, o que indica que mudanças conformacionais importantes precisam ocorrer para que se dê a autofosforilação da enzima. A aproximação entre os domínios N e P deve promover a fosforilação da enzima e transmitir mudanças conformacionais aos domínios de ligação de cálcio situados a 40-50 Å de distância, no interior da membrana. Em um primeiro momento, os íons ligados aos sítios de alta-afinidade são ocluídos. Claramente, será necessário a obtenção de cristais representantes de passos intermediários do ciclo que forneçam estruturas de alta-resolução para que seja possível a descrição em detalhe do mecanismo molecular que permite o transporte de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático.

OBJETIVOS

O primeiro objetivo desse trabalho consistiu na construção e otimização de um sistema de expressão em levedura que permitisse a produção de Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático recombinante em grande quantidade, e com elevado grau de pureza. A disponibilidade de mutantes pontuais da Ca^{2+} -ATPase com elevado grau de pureza, algo ainda não alcançado utilizando os sistemas de expressão descritos na literatura, permitirá o estudo ao nível molecular dos mecanismos de acoplamento existentes entre a hidrólise de ATP e o transporte de cálcio utilizando medidas diretas de ligação do substrato e medidas espectroscópicas. A escolha de um sistema de expressão em levedura foi feita em função da relativa facilidade em se obter uma grande quantidade de células a um custo baixo, tornando-o conveniente para a produção em grande quantidade dos mutantes da Ca^{2+} -ATPase pretendidos.

Os primeiros dados indicaram ser possível obter até 3 mg de Ca^{2+} -ATPase recombinante partindo de 6 l de cultura de leveduras. Contudo, o nível de expressão da Ca^{2+} -ATPase recombinante é baixo, constituindo apenas 0.3% da proteína total presente nos extratos de levedura. Este grau de pureza é insuficiente para a obtenção das medidas espectroscópicas pretendidas, tornando-se necessária a introdução de etapas de purificação da Ca^{2+} -ATPase recombinante. Duas estratégias foram traçadas com esse objetivo, ambas envolvendo a construção de quimeras da Ca^{2+} -ATPase do retículo contendo modificações na sua região amino-terminal. Em uma delas, a adição de uma sequência de 6 histidinas permitiria a purificação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase heteróloga utilizando as propriedades de ligação desse domínio a cátions divalentes (Hochuli *et al.*, 1988). A outra estratégia consistiu na construção de quimeras da Ca^{2+} -ATPase uma região amino-terminal da H^{+} -ATPase de levedura envolvida com o direcionamento da proteína para a membrana plasmática (Portillo *et al.*, 1989). Caso a introdução da sequência da H^{+} -ATPase favorecesse o direcionamento da Ca^{2+} -ATPase recombinante para a membrana plasmática, a expressão de quimeras H^{+} - Ca^{2+} -ATPase permitiria recuperar a proteína recombinante em vesículas secretoras, que se acumulam no citoplasma em cepas deficientes na via de secreção (Walworth e Novick, 1987) e são facilmente purificáveis (Nakamoto *et al.*, 1991).

Em paralelo com a otimização da expressão heteróloga e purificação da Ca^{2+} -ATPase, foi gerado um conjunto de mutantes pontuais com substituições nos 13 resíduos triptofanil da proteína. A caracterização espectroscópica desses mutantes deverá permitir medir a contribuição individual de cada um dos resíduos Trp para as variações da fluorescência

intrínseca da Ca^{2+} -ATPase resultantes de mudanças conformacionais que ocorrem durante a ligação reversível de cálcio (Dupont, 1976; Verjovski-Almeida e Silva, 1981). Sabe-se que as propriedades espectrais dos resíduos Trp depende da polaridade do microambiente onde estão inseridos (Lacowicz, 1983). Após mapeados os resíduos Trp que contribuem para as mudanças de fluorescência da enzima, eles poderão ser usados como sondas fluorescentes que forneçam informações a cerca do seu microambiente, revelando aspectos estruturais e dinâmicos de regiões da Ca^{2+} -ATPase que participam de mudanças conformacionais durante o ciclo catalítico.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cepas de levedura, transformação e meios de cultura.

Foram utilizadas células de *Saccharomyces cerevisiae* da cepa NY 605 (a,ura3-12, leu2-3,112, GAL2::P.Novick). Os transformantes foram obtidos da seguinte forma: Células de levedura em um eppendorf contendo 0,5ml de PLATE (40% polietilenoglicol 4000, 100mM acetato de lítio, 10mM Tris-HCl ; pH7,5, 1mM EDTA), 100 µg de ssDNA de espermatozoides de salmão, 70 mM de ditioneitol e 1 µg de plasmídeo, são incubadas durante a noite à temperatura ambiente. No dia seguinte, aplica-se um choque térmico de 42 °C por 10 min. As células são centrifugadas por 1 min. em uma microcentrífuga, lavadas com 500 µl de H₂O estéril e ressuspensas em 300 µl de H₂O estéril. A seleção dos transformantes por feita por plaqueamento em meio seletivo (Rose *et al.*, 1990) .

Para crescimento das leveduras transformadas, os inóculos foram crescidos em meio mínimo contendo 0,67% de YNB (Difco), 2% glucose (Merck) e suplementado com 0,002% uracilo ou 0,003% leucina, consoante a marca de seleção presente no vetor. O crescimento se dá a 25 °C sob agitação orbital de 180 r.p.m. até o início da fase exponencial (DO₆₀₀ = 0.5). A indução da expressão da SR Ca²⁺-ATPase é feita através da elevação da temperatura de cultura para 37 °C.

2. Indução e preparação de extrato total de levedura (Methods in Enzymology, vol. 194)

Preparar inóculo com leveduras plaqueadas em meio seletivo. Incubar no agitador orbital durante a noite a 23⁰ C

Preparar culturas em meio líquido mínimo (YNB,Glu, Ura).

Utilizar o seguinte cálculo:

Para , por exemplo, atingir DO₆₀₀ = 0.6, considerar quantas horas se passarão da preparação do inóculo até o horário de trabalho do dia seguinte e subtrair 2 unidades, obtendo um número X. Dividir X por 2,7 (tempo de geração), resultando em um número Y. Finalmente, efetuar a equação:

$$0.6/(2^Y) \times V_{\text{cultura}} = \text{DO}_{600} \text{ inóculo} \times V \text{ inóculo}$$

Incubar a cultura em um agitador orbital, durante a noite a 23 ° C.

Medir DO₆₀₀.

Induzir a expressão da SR Ca²⁺-ATPase através de um choque-térmico de 37 °C por 90 min.

Transferir para tubos de 250 ml.

Ler DO₆₀₀. Calcular DO₆₀₀ total multiplicando a DO₆₀₀ pelo volume de cultura.

Centrifugar 10 min a 6.000 x g e descartar sobrenadante. Ressuspender células em 20 ml 10 mM azida e recentrifugar. Ressuspender células a 20 DO/ml em 0.1 M Tris-SO₄ ; pH 9.4, 50mM β-mercaptoetanol e incubar por 10 min. a temperatura ambiente. A seguir o “pellet” é lavado duas vezes com 1ml 1.2 M sorbitol e ressuspensão em tampão de formação de esferoplastos (1.2 M sorbitol, 10 mM fosfato de potássio ; pH 7.2, 10 mM azida) na concentração de 50 DO/ml. Adiciona-se 350 µg/ml zimoliase 20T (ICN) e incuba-se a 37 °C por aproximadamente 40 min. A formação dos esferoplastos é monitorada pela queda na DO₆₀₀ ao longo do tempo de incubação. Adicionar 1 volume de Mix B (1.2 M sorbitol, 50 mM fosfato de potássio ; pH 7.5, 10 mM azida, 10 mM MgCl₂) e centrifugar 10 min a 4000 g através de um "colchão" de 3 ml de Mix C (1.7 M sorbitol, 15mM fosfato de potássio; pH 7.5). O "pellet" obtido é ressuspensionado em tampão de lise (0.3 M sorbitol, 10 mM MOPS) contendo 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml pepstatina e 10 µg/ml quimostatina (Sigma). A lise dos esferoplastos é feita por 30 passagens em um homogenizador manual do tipo "Dounce". Essa preparação de extrato total de levedura é então congelada a -70°C, onde se mantém estável por várias semanas. A concentração de proteínas totais é determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

3. Solubilização e imunoprecipitação da SR Ca²⁺-ATPase recombinante

Solubilizar 3 mg de proteína total (aprox. 3 µg de SR Ca²⁺-ATPase) em tampão de solubilização (50 mM MOPS ; pH 7.5, 80 mM KCl, 0.15 M sorbitol, 1 mM CaCl₂) contendo 25 mg/ml C₁₂E₈ (polioxietileno-8-lauril eter), 12.5 mg/ml asolectina, 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml pepstatina e 10 µg/ml quimostatina. Incubar durante 1h a 4 °C, sob leve agitação. Centrifugar 3 min. em microcentrífuga. Transferir sobrenadante contendo a fração solúvel para novo tubo. Adicionar 3 µg de anticorpo monoclonal CL-30 purificado. Incubar 2h a 4 °C, sob leve

agitação. Adicionar 60 µl de proteína A-Sepharose: H₂O (1:1). Incubar 2h a 4 °C, sob leve agitação. Recolher os "beads" por centrifugação de 1 min. Descartar o sobrenadante. Lavar os "beads" duas vezes com 0.5 ml de tampão de lavagem (50 mM MOPS ; pH 6.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 mg/ml C₁₂E₈, 0.5 mg/ml asolectina).]

4. Fosforilação da SR Ca²⁺-ATPase recombinante por ³²P-γ-ATP.

Resuspender a SR Ca²⁺-ATPase recombinante ligada à proteína A-Sepharose em 30µl de mistura de fosforilação/ATP (50 mM MOPS ; pH 6.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 mg/ml C₁₂E₈, 0.5 mg/ml asolectina, 30% glicerol, 10 µM ATP, 40 µCi ³²P-γ-ATP). A dependência de cálcio pode ser determinada adicionando à mistura de fosforilação 10 mM EGTA. Incubar 10s no gelo. Interromper a reação com 1ml 10% TCA. Centrifugar 5 min. Em microcentrífuga. Lavar 3 vezes com 1ml 2% TCA, 250µM ATP. Lavar uma vez com 0.5ml tampão de lavagem. Ressuspender em 30µl de tampão de lavagem. Adicionar 30µl de 2x tampão desnaturante ácido (3.5 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM Na₂HPO₄, 0.005% SDS, 5% LDS, 0.14 M β-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol, 30% glicerol). Sonicar durante 3 min em banho de sonicação (Bransom 1210). Aplicar em gel ácido 6% poliacrilamida. Correr durante a noite a 35 mA (constante). Secar o gel e expor a chapa Hyperfilm (Amersham) a -70°C.

5. Fosforilação da SR Ca²⁺-ATPase recombinante por ³²Pi.

Resuspender a SR Ca²⁺-ATPase recombinante ligada à proteína A-Sepharose em 30µl de mistura de fosforilação/Pi (50 mM MOPS ; pH 6.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 mg/ml C₁₂E₈, 0.5 mg/ml asolectina, 30% DMSO, 0.1mM KH₂PO₄; pH 6.8, 10 mM EGTA, 0.5 mCi ³²Pi). Incubar 1 min a temperatura ambiente. Interromper a reação com 1ml 10% TCA. Centrifugar 5 min. em microcentrífuga. Lavar 3 vezes com 1ml 2% TCA, 100mM KH₂PO₄. Lavar uma vez com 0.5ml tampão de lavagem. Ressuspender em 30µl de tampão de lavagem. Adicionar 30µl de 2x tampão desnaturante ácido. Sonicar durante 3 min em banho de sonicação (Bransom 1210). Aplicar em gel ácido (6% poliacrilamida, 70 mM NaH₂PO₄, 30 mM Na₂HPO₄,

0.1% SDS). Correr durante a noite a 35 mA (constante) em tampão de corrida (70 mM NaH₂PO₄, 30 mM Na₂HPO₄, 0.1% SDS). Secar o gel e expor a chapa Hyperfilm (Amersham) a - 70°C.

6. Fracionamento por centrifugação diferencial. (adaptado de Perlin *et al.*, 1989).

Após a indução da expressão da proteína recombinante, 500 ml de células em cultura com DO₆₀₀ 0.5-0.8 são centrifugadas e ressuspendidas a 25 DO/ml em tampão de lise (50 mM MOPS; pH7.5, 0.3 M sacarose, 1 mM CaCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol) complementado com inibidores de protease (1 mM diisopropilfluorofosfato (DFP), 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml pepstatina, 2 µg/ml leupeptina e 5 µg/ml quimostatina) e congeladas em nitrogênio líquido. Após descongelamento à temperatura ambiente, as células são rompidas por passagem em uma célula de "French-Press" (Aminco) a 20.000 Psi. O lisado total assim obtido é centrifugado a 418 g para a remoção de células intactas e restos celulares. O lisado total clarificado (sobrenadante 418 g) é então centrifugado 2 x a 24.000g por 20 min. para a obtenção de um "pellet" enriquecido no componente microssomal do lisado. Esta fração microssomal (P24.000 g) é ressuspendida em 50 mM MOPS; pH7.5, 0.3 M sacarose além de inibidores de proteases (1 mM diisopropilfluorofosfato (DFP), 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml pepstatina, 2 µg/ml leupeptina e 5 µg/ml quimostatina), homogenizado em um "Potter" revestido com teflon e congelado a -70 °C. O sobrenadante da centrifugação anterior é então transferido para novo tubo e centrifugado 2x 1h a 135.000 g. Este "pellet de alta velocidade (P 135.000 g) é ressuspendido em 50 mM MOPS; pH7.5, 0.3 M sacarose além de inibidores de proteases (1 mM diisopropilfluorofosfato (DFP), 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml pepstatina, 2 µg/ml leupeptina e 5 µg/ml quimostatina), homogenizado em um "Potter" revestido com teflon e congelado a -70 °C. Foram retidas alíquotas dos sobrenadantes gerados ao longo do fracionamento e congelados a -70 °C. A concentração de proteínas totais nas diversas frações foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

7. "Immunoblots" para detecção de SR Ca²⁺-ATPase recombinante.

Diluir 5-10 µl de amostras correspondentes a S 418g, P 24.000g e P 135.000g em 250 µl de água e aplicar em membrana de nitrocelulose (Hybond C - Amersham) disposta

em um sistema de poços múltiplos à vácuo (Gibco BRL). Secar a membrana a temperatura ambiente. Incubar em tampão de bloqueio (5% leite desnatado, 0.03% azida) por 1h. Drenar o tampão de bloqueio e adicionar anticorpo primário para a detecção de SR Ca^{2+} -ATPase (Ab A52: diluição 1:1000 em tampão de bloqueio ou Ab Cl-30: diluição 1:1 do sobrenadante de cultura em tampão de bloqueio) ou da H^{+} -ATPase (Diluído 1:1.000 em tampão de bloqueio). Incubar 2-16h à temperatura ambiente com agitação. Lavar 1x 15 min. seguido de 2x 5 min. com PBS - 0.5% Triton. Os " immunoblottings" utilizando o Ab A52 ou Ab anti- H^{+} -ATPase podem ser diretamente revelados com proteína A- ^{125}I ; incubar em tampão de bloqueio contendo 0.2 $\mu\text{Ci/ml}$ de proteína A- ^{125}I por 2-16h à temperatura ambiente com agitação. Lavar 3x 10 min. com PBS - 0.5% Triton e expôr uma chapa Hyperfilm (Amersham) a - 70°C. Alternativamente, os " immunoblots" podem ser revelados após a ligação do anticorpo primário utilizando o "kit" ECL-Luminol (Amersham): após a primeira lavagem, diluir o anticorpo secundário conjugado à peroxidase em tampão de bloqueio 1:1.000. Incubar a membrana durante 2h à temperatura ambiente com agitação. Lavar 1x 15 min. seguida de 4x 5 min. em PBS / 0.5% Triton . Escorrer o excesso de líquido e incubar durante 1 min. em solução reveladora. Expôr imediatamente a membrana a uma chapa Hyperfilm (Amersham).

Detecção utilizando o "kit" ECL-Luminol: após a primeira lavagem, diluir o anticorpo secundário conjugado à peroxidase em tampão de bloqueio 1:1.000. Incubar a membrana durante 2h à temperatura ambiente com agitação. Lavar 1x 15 min. em PBS / 0.5% Triton e 3x 5 min. em PBS. Escorrer o excesso de líquido e incubar durante 1 min. em solução reveladora. Expôr imediatamente a membrana a uma chapa Hyperfilm (Amersham).

8. Fracionamento em gradiente de sacarose.

Os lisados totais de levedura foram fracionados em gradiente de sacarose descontínuo (15-60%) essencialmente como descrito por Antebi e Fink (Antebi e Fink, 1992).

9. Ensaios enzimáticos nas frações do gradiente de sacarose.

A atividade ADPásica do marcador de Golgi guanosina difosfatase (GDPase) foi medida como descrito por Abeijon et al. (Abeijon *et al.*, 1989). A atividade do marcador de retículo endoplasmático NADPH-citocromo C redutase foi medida pelo

método de Feldman et al. (Feldman *et al.*, 1987). A atividade H^+ -ATPase inibida por vanadato foi determinada utilizando o método descrito por Nakamoto et al. (Nakamoto *et al.*, 1991).

10. Purificação de vesículas secretoras.

Leveduras *sec* -deficientes (SY2) foram transformadas com vetores contendo a sequência codificante para a Ca^{2+} -ATPase nativa, 6xHis- Ca^{2+} -ATPase e H^+ -ATPase sob controle do promotor de choque térmico. As culturas de levedura foram crescidas em meio mínimo a 23°C até atingirem DO_{600} igual a 1.0 sendo então transferidas para 37°C e incubadas por 2h. Nesse período ocorre simultaneamente a indução da proteína recombinante e a acumulação de vesículas secretoras. Após esse período as células foram recolhidas e as vesículas secretoras isoladas pelo método padrão de preparação de vesículas secretoras descrito por Ambesi et al. (Ambesi *et al.*, 1997).

11. Purificação de anticorpos em coluna de proteína A- sepharose. (adaptado de Ey *et al.*, 1978)

Ajustar o pH de 10 ml de sobrenadante de cultura do clone CL-30 para 8.3 com 1 M Tris-HCl ; pH 9. Equilibrar uma coluna contendo 1ml de proteína A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) com 100 mM fosfato de sódio; pH 8.1. A seguir, passar o sobrenadante pela coluna por duas vezes. Lavar a coluna com 10 volumes de 100 mM fosfato de sódio; pH 8.1. A eluição dos anticorpos ligados à coluna é feita pela adição 0.1 M glicina ; pH 2.5. São recolhidas alíquotas de 1 ml em tubos contendo 90 µl de 1 M Tris-HCl ; pH 9. A concentração de anticorpos em cada fração é determinada pela absorvância a 280nm .

12. Microscopia de imunofluorescência confocal. (adaptado de Pringle *et al.*, 1991)

A) Indução e preparação de esferoplastos

Inocular na véspera 2 culturas de 100 ml em meio mínimo com NY605/pSVA12, NY605/pARF1, NY605/pVVL1 e NY605/pSVA14 (contrôle negativo). Crescer durante a noite a 23°C / 180 r.p.m.

Iniciar o experimento no dia seguinte com $DO_{600} = 0.5$

Sub-dividir em duas culturas de 40 ml. Induzir uma delas a 37°C por 90 min. Incubar a outra (não-induzida) durante o mesmo tempo a 23°C.

Ler DO₆₀₀

Centrifugar 5min. a 7.000g. em tubos de polipropileno 50 ml. Ressuspender "pellet" a 2×10^7 cél./ml em 0.1 M tampão fosfato de potássio pH7.5. DO₆₀₀= 1×10^7 células/ml

Salvar apenas 5 ml das células em suspensão e adicionar 0.6 ml de 37% formaldeído a cada tubo. Incubar 2h sob agitação a temperatura ambiente (fixação das células).

Transferir para tubos Corex 15ml

Lavar células: 2x 10 ml 0.1M tampão fosfato de potássio pH7.5

1x 10 ml 1.4 M sorbitol; 0.05 M fosfato de potássio pH7.5; 5 mM NaN₃

(= fosfato de potássio sorbitol)

Ressuspender em 1 ml Kfosfato sorbitol + 2μl β-mercaptoetanol.

Adicionar 125 μl de solução estoque de zimoliase (1mg/ml).

Incubar 30-60 min. a 37°C (células induzidas) ou 23°C (células não-induzidas).

Monitorar queda na DO₆₀₀ (queda de +/- 10x)

Adicionar 15 ml fosfato de potássio sorbitol gelado

Centrifugar 4min. a 7.000g. Ressuspender em 1 ml Kfosfato sorbitol

B) Fixação a lâmina

Recobrir lâminas no local de observação com solução 0.1% poli-lisina. Incubar 5 min.

Secar 1 h a 60°C.

Lavar 5x com H₂O. Secar totalmente a temperatura ambiente

Adicionar esferoplastos à lâmina. Incubar 30 min. a temperatura ambiente, em ambiente úmido.

Lavar 5x com PBS/BSA/Azida

Submergir 6 min. em metanol -20°C

Submergir 30 seg. em acetona -20°C

Secar a temperatura ambiente

C) Marcação com anticorpos

Recobrir a lâmina no local de observação com diluição do anticorpo primário em PBS/BSA/Azida . Marcar com:

a) monoclonal anti-Ca ATPase (Cl-30) produzido em camundongo, diluição 1:30

b) policlonal anti-Bip/Kar2 produzido em coelho, Diluição 1:1.000

Incubar durante a noite em ambiente úmido

Lavar 5x com PBS/BSA/Azida

Recobrir com solução contendo o anticorpo secundário diluído.

a) 1:300 anti-camundongo conjugado a rodamina (TRITC) em PBS/BSA/Azida

b) 1:300 anti-coelho conjugado a fluoresceína (FITC) em PBS/BSA/Azida

Incubar 2h a temperatura ambiente, em ambiente úmido

Lavar 5x com PBS/BSA/Azida

Lavar 2x com 0.1M fosfato de potássio pH 6.5

Recobrir lâmina com solução 1µg/ml DAPI

Incubar 5 min. a temperatura ambiente

Lavar 5x com 0.1M fosfato de potássio pH 6.5

Secar a temperatura ambiente

D) Montagem

Colocar algumas gotas de solução de montagem junto à lamina

Cobrir com lamínula. Pressionar levemente para remover o excesso.

Aplicar esmalte de unha ao redor da lamínula para selagem

Guardar a -20°C

13. Purificação da 6xHis Ca²⁺-ATPase por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

Fração membrana obtida no protocolo 6 (Pellet 24.000 x g):

Cada 1.400 DO₆₀₀ de células induzidas correspondem a aproximadamente 5 mg proteína total no “pellet” 24.000 x g.

[Opcional: Centrifugar o Pellet 24.000 x g a 24.000 x g por 30 min].

Ressuspender em 4 ml de tampão de solubilização contendo LPC.

Utilizando a relação LPC: proteína de 1.3:1.

Solubilizar 15 min a temperatura ambiente com agitação ocasional.

Centrifugar 100.000 x g por 35 min.

Transferir sobrenadante. Retirar alíquota (200 µl) da fração solúvel.

Equilibrar 1 ml de resina Ni-NTA (Qiagen- 50 % em etanol) em coluna de polipropileno (Pierce - até 10 ml volume) com 5 ml de tampão de lavagem 5 mM imidazol.

Aplicar fração solúvel na coluna. Incubar por 1 h a 4 °C com agitação leve.

Drenar a fração não-ligada do “pellet” 24.000 x g solúvel. Retirar alíquota (200 µl).

Lavar coluna sucessivamente com:

2 x 3 ml tampão de lavagem 5 mM imidazol

2 x 3 ml tampão de lavagem 25 mM imidazol

recolher frações de 1 ml e ler DO₂₈₀ nas frações eluídas.

(Opcional) Concentrar com 10 % TCA os volumes de tampão utilizados na lavagem, lavar 1 x com 50 mM MOPS; pH 7.5 e ressuspender em tampão de amostra para SDS-PAGE.

Eluir coluna com 5 ml tampão de lavagem contendo 250 mM imidazol. Recolher frações de 0.5 ml. Ler DO₂₈₀. Manter frações eluídas no gelo.

Analizar frações contendo proteína por SDS-PAGE 7.5% acrilamida. Corar gel com Coomassie ou revelar por "Western blot" utilizando monoclonal anti SR Ca²⁺-ATPase.

Reagentes e Soluções

NTA-Ni²⁺ Agarose (Qiagen - 50 % slurry)

- Tampão base (2x): 20 mM MOPS pH8.0, 20 % glicerol, 300 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂.

- Solução estoque 1 M imidazol pH8.0

- Solução estoque C18:1 LPC 40 mg/ml em água

- Solução estoque DOPC 20 mg/ml em água: sonicar 5 min. Adicionar as soluções após adição do detergente.

- Utilizar inibidores de protease em todas as soluções: 1mM DFP ou PMSF, 1x cocktail inibidor de proteases.

Tampão de solubilização: 1x Tampão base, 5 mM imidazol, ~2% LPC.

Tampões de lavagem/eluição: 1x Tampão base, 5mM, 25mM ou 250 mM imidazol, , 0.1 % LPC, 0.05 % DOPC.

14. SDS-PAGE e "Western blot"

Preparação das amostras:

Utilizar as seguintes quantidades de material nos géis (partindo de uma DO₆₀₀ total de ~5.000 - gel grande):

~ 3 % fração solúvel

~ 3 % fração não-ligada

~ 50 % do eluato da lavagem precipitado com 10 % TCA

~ 5-10 % da fração eluída com 250 mM imidazol

Preparar as amostras em duplicata para análise por coomassie ou "Western" blot

Precipitar com 1ml 10 % TCA gelado. Manter no gelo.

Centrifugar 10 min a 15.000 g (4° C). Remover sobrenadante.

Lavar “pellet” com 0.5 ml 50 mM MOPS pH7.5.

Centrifugar 2 min a 15.000 g (4°C). Remover sobrenadante.

Ressuspender em 80-100 µl tampão de amostra para SDS-PAGE (60 mM Tris-Cl pH6.8, 2 % SDS, 10 % Glicerol, 0.025 % bromofenol blue, 700 mM β-mercaptoetanol).

Aplicar em gel 7.5 % acrilamida. Correr a 100 V em tampão de corrida (0.025 M Tris, 0.192 M glicina, 0.1 % SDS, pH 8.3).

Após o término da corrida, corar um dos géis com coomassie (0.1 % coomassie blue R-250, 40 % metanol, 10 % ácido acético) por 30-60 min. Descorar com solução 40 % metanol, 10 % ácido acético.

"Western" blot

Transferir as proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose por 90 min em um sistema de eletrotransferência semi-seco (MultiPhor II⁻ Pharmacia) ou "molhado" (Hoefer).

Enxaguar a membrana em PBS e a temperatura ambiente.

Corar membrana por 5-10 min com Ponceau S (0.1 % em 1 % ácido acético). Descorar com água milliQ.

Bloquear 2 h em solução de bloqueio (5% leite desnatado, 0.03 % NaN₃ em PBS pH 8).

Incubar durante a noite em solução de bloqueio contendo um anticorpo monoclonal específico contra a Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático. Foram utilizados os anticorpos monoclonais (camundongo) CL-30 (preparado pelo Dr. Radovan Borojevic – UFRJ) ou A52 (cedido pelo Dr. D. MacLennan).

Lavar com PBS-0.1 % tween 20 (1 x 15 min + 2 x 5 min).

Incubar 30 min em solução de bloqueio contendo um anticorpo secundário conjugado a uma peroxidase.

Lavar com PBS-0.1 % tween 20 (1 x 15 min + 4 x 5 min).

Revelar por 1 min utilizando o kit de detecção ECL (Amersham-Pharmacia).

Expor a membrana a chapas de autorradiografia por tempos crescentes. Revelar.

15. Construção de mutantes pontuais pela técnica de "Mega Primer" (adaptado de Sarkar e Sommer, 1990).

Esta técnica permite a introdução de mutações pontuais em 3 reações de PCR, utilizando apenas 3 "primers". A construção prévia de sub-clones em pBScript da Ca²⁺-

ATPase contendo a sequência a ser mutada permitirá que se utilize os "primers" T3 e T7 do vetor, disponíveis comercialmente, e um único "primer" mutagênico interno. Em um passo inicial, são gerados fragmentos de 200 - 600 bp contendo a mutação pretendida utilizando o "primer" mutagênico e um "primer" que flanqueia o sítio de clonagem do vetor (T3 / M13 "reverse" ou T7 / M13 "forward"). Este fragmento é purificado e utilizado como "primer" ("Mega primer") em um segundo passo de PCR contendo agora o "primer" complementar ao outro lado do sítio de clonagem do vetor. O fragmento amplificado no segundo passo do PCR foi reamplificado utilizando os "primers" T3 e T7, digerido com as mesmas enzimas de corte único utilizadas para a construção do sub-clone e ligado em um vetor pBScript digerido com as mesmas enzimas. As condições-padrão de amplificação utilizadas para a introdução das mutações por Megaprimer-PCR foram as seguintes:

1º passo de PCR:

meio de reação (50 µl):

0.2 mM dNTP

1x tampão VentR DNA polimerase

1 U VentR DNA polimerase

0.5 µM "primer" mutagênico e "primer" forward (T3 ou T7)

5 ng template

Condições de amplificação:

1) 95° - 5'

2) 80° - hold

3) 95° - 45"

4) 55° - 1'

5) 72° - 1'

6) 29x to 3)

7) 72° - 6'

2º passo de PCR:

meio de reação (50 µl):

0.2 mM dNTP

1x tampão VentR DNA polimerase

1 U VentR DNA polimerase

0.02 - 0.05 μ M " mega primer" e "primer" reverso (T3 ou T7)

0.6 -1 μ g template

Condições de amplificação:

1) 95° - 5'

2) 80° - hold

3) 95° - 1'

4) 55° - 1'

5) 72° - 1'30"

6) 29x to 3)

7) 72° - 6'

16. Preparação de RNA total de levedura (Curr. Prot. Mol. Biol. section 13.12).

Transferir aproximadamente 2×10^8 células induzidas por choque térmico ($1-2 \times 10^7$ células/ml durante a fase exponencial m microcentrífuga e ressuspender o "pellet" em 350 μ l de tampão de RNA. Adicionar volume equivalente a 200 μ l de pérolas de vidro (ϕ 0.45 mm) a cada tubo. Adicionar 300 μ l de 25:24:1 fenol:clorofórmio: álcool isoamílico. Agitar no vortex imediatamente durante 2 min. Centrifugar durante 1 min. a temperatura ambiente. Transferir a fase aquosa para novo tubo. e extrair novamente com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico. Transferir sobrenadante e precipitar o RNA com 3 volumes (900 μ l) 100% etanol gelado durante 45 min. a -20 °C. Centrifugar 2 min. a 4 °C em microcentrífuga. Lavar "pellet" com 70% etanol gelado e ressuspender "pellet" final em 30 μ l H₂O. Manter a -70 °C.

17. "Northern blot" (a partir de Sambrook *et al.*, 1989).

Desnaturar 10-20 μ l de RNA total de cada amostra em 1x tampão de corrida (20 mM MOPS, 50 mM NaAc; pH 7, 1 mM EDTA), 6.5% folmaldeído, 50% formamida por incubação durante 15 min a 65 °C. Resfriar no gelo. Adicionar 10 μ l de tampão de amostra (1 mM EDTA, 0.25% Azul de bromofenol, 0.25% Cianol xileno, 50% glicerol), aplicar em gel de agarose (1.4% agarose, 1x tampão de corrida e 6.5% formaldeído) e correr a 5 V/cm em 1 x tampão de corrida. Transferir durante a noite

por capilaridade para membrana de nylon Hybond - N⁺ (Amersham). Fixar RNA à membrana por incubação a 80 °C por 2 h. seguido de exposição a UV de transiluminador analítico por 1 min. Incubar membrana durante 2 h. em tampão de pré-hibridização (1x reagente de Denhardt, 1x SSPE, 0.1% SDS, 20 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado). Adicionar 500.000 cpm /ml de sonda marcada. Incubar durante a noite em forno de hibridação. Lavar 2x 10 min. a temperatura ambiente em 2x SSPE, 0.1% SDS. Lavar 1x 15 min. a 65 °C em 1x SSPE, 0.1% SDS. Lavar 1x 10 min. a 65 °C em 0.1x SSPE, 0.1% SDS. Expor a chapa de autoradiografia a - 70 °C.

Marcação das sondas

As sondas utilizadas foram marcadas utilizando o "kit" RadPrimer DNA Labeling System (GibcoBRL - Life Technologies) ou o "kit" RediPrimer Random Primer Labelling (Amersham).

Foi utilizado um fragmento BamHI de 1Kb da SR Ca²⁺-ATPase de coelho para a detecção de mRNA recombinante no RNA total extraído das cepas de levedura. Paralelamente, foi feita a hibridação das mesmas quantidades de RNA total com uma sonda de actina (0.6 Kb) a fim de estabelecer um controle interno da quantidade de RNA total aplicada em cada poço. Os mesmos filtros foram posteriormente hibridizados com sondas marcadas a partir de fragmentos de H⁺-ATPase (0.8 Kb) e GDPase (0.9 Kb) de levedura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Construções e vetores de expressão.

1. 1. SR Ca²⁺-ATPase nativa.

Possuíamos em nosso laboratório o cDNA da SR Ca²⁺-ATPase de coelho modificado nas extremidades não-codificantes 5'e 3'pela inserção dos sítios de restrição HindIII e SacI, respectivamente. Este "cassete" encontra-se clonado em um vetor de expressão controlada do tipo "shuttle" capaz de replicação em bactéria e levedura, denominado pSVA12 (Figura 7). Este plasmídeo é derivado do vetor pYEplac181 (Gietz e Sugino, 1988). É um plasmídeo episomal com múltiplas cópias devido a presença de uma origem de replicação 2 μ . Essa sequência também é responsável pela partição correta das cópias dos plasmídeos entre as células-filha durante a divisão celular. Nesse vetor, a transcrição da SR Ca²⁺-ATPase recombinante está sob o controle de um promotor composto por duas unidades *in tandem* do HSE (Heat-Shock Element) de levedura, situado imediatamente à montante do início da região codificante (Slater e Craig, 1987; Nakamoto *et al.*, 1991). Imediatamente à jusante da região codificante da SR Ca²⁺-ATPase, a seguir ao sítio SacI, foi clonada uma sequência de 650 pares de base correspondente a região 3' não-codificante do gene de PMA1 de levedura. Esta sequência contém as sequências consenso de terminação de transcrição e poliadenilação (Capieaux *et al.*, 1989). A presença do gene LEU2 no plasmídeo garante a sua manutenção em cepas leu⁻ em um meio deficiente em leucina. Como controle, foi feita uma construção idêntica sem conter o cDNA de SR Ca²⁺-ATPase. Esse plasmídeo "vazio" foi denominado pSVA14.

Figura 7- Vetores para expressão de SR Ca²⁺-ATPase em levedura.

1.2. Quimeras N-terminais da SR Ca²⁺-ATPase.

1.2.1. 6xHis Ca²⁺-ATPase.

Esta construção foi feita pela aluna de mestrado Alessandra R. Ferreira. Além do vetor pSVA12, contendo o cDNA para Ca²⁺-ATPase nativa, foram utilizados os vetores pPROEX-1 (Gibco-BRL) e Bluescript II KS (Stratagene) para a construção do vetor de expressão da 6xHis Ca²⁺-ATPase em levedura. O vetor pPROEX-1 permite a expressão de proteínas de fusão contendo uma sequência de hexahistidinas seguida de uma região espaçadora e um sítio de clivagem para uma endoprotease recombinante (rTEV protease). Duas rodadas de PCR foram feitas para introduzir sítios de restrição necessários à clonagem. Na primeira reação de PCR foi introduzido um sítio Hind III a montante do codon de iniciação da tradução no vetor pPROEX-1. O fragmento de 137 bp amplificado foi digerido com Hind III e ligado no vetor Bluescript II KS (Stratagene) digerido com a mesma enzima, originando o vetor pHexaHis. Um segundo PCR foi realizado para introduzir um sítio Nde I na extremidade 5' do cDNA da Ca²⁺-ATPase utilizando como molde o vetor pSVA12. O produto de 790bp obtido foi ligado em Bluescript digerido com EcoRV e amplificado em *E.coli*. A seguir, o vetor amplificado foi digerido com NdeI e KpnI (que corta na sequência codificante para a Ca²⁺-ATPase) e clonado no vetor pHexaHis digerido com NdeI/KpnI. Após essas etapas de clonagem, a maior parte do sítio de clonagem múltiplo do vetor pPROEX-1 foi removida, e a metionina inicial da Ca²⁺-ATPase foi posicionada 2 aminoácidos a jusante do sítio de reconhecimento da rTEV protease. O sequenciamento deste vetor utilizando "primer" T7 e o Kit sequenase version 2.0 (United States Biochemical) confirmou o posicionamento correto da janela de leitura a partir do ATG inicial, seguido da sequência codificante para 6 histidinas, a região espaçadora, o sítio de clivagem da rTEV e a extremidade N-terminal da Ca²⁺-ATPase. Após digestão com Hind III/Stu I, o fragmento resultante foi clonado no vetor pSVA12 digerido com Hind III/Stu I dando origem ao vetor pARF1, codificante para a 6xHis Ca²⁺-ATPase (Figura 7). O vetor pARF1 foi sequenciado para confirmar a construção.

1.2.2. Fusões H⁺-ATPase/Ca²⁺-ATPase.

Existem evidências de que a extremidade N-terminal da H⁺-ATPase seja necessária para o direcionamento da proteína para a membrana plasmática da levedura (Portillo *et al.*, 1989). Foram feitas duas construções utilizando o cDNA da SR Ca²⁺-ATPase e a sequência codificante para a porção N-terminal da H⁺-ATPase de levedura para testar o efeito da

segunda sobre a localização sub-celular da Ca^{2+} -ATPase quimérica. Na quimera de adição ($\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), a sequência N-terminal da H^+ -ATPase foi adicionada imediatamente a jusante da metionina inicial da Ca^{2+} -ATPase. Essa sequência inclui os 88 resíduos N-terminais e se estende até o motivo Gly-Leu, conservado nas ATPases do tipo P. Para isso, o plasmídeo pARF1 foi inicialmente digerido com NdeI. As extremidades do plasmídeo foram preenchidas usando DNA Polimerase (fragmento Klenow) a fim de torná-las não-coesivas. A seguir o vetor pARF1/NdeI foi digerido com HindIII para remoção do fragmento HindIII/NdeI (cerca de 80 bp), que contem a sequência codificante para as seis histidinas, região espaçadora e sítio de clivagem para rTEV. Após tratamento com fosfatase alcalina para evitar re-circularização, o vetor digerido com cerca de 10 Kb foi recuperado com o kit de purificação de DNA Gene Clean. O fragmento codificante para os 88 resíduos N-terminais da H^+ -ATPase foi obtido pela digestão do plasmídeo pPCR3.1, que contem o cDNA da H^+ -ATPase completo, com HindIII-StuI. O fragmento de ~300 bp gerado foi purificado com GeneClean. Finalmente, o vetor de expressão da quimera $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, denominado pVVL1, foi obtido pela ligação do fragmento HindIII/StuI ao vetor pARF1/NdeI, Klenow, HindIII (Figura 7). Uma segunda quimera foi construída onde a sequência codificante para os 24 resíduos N-terminais da Ca^{2+} -ATPase que se estendem até o consenso Gly-Leu foram substituídos pela extremidade N-terminal correspondente da H^+ -ATPase. Para isso, o gene codificante para a H^+ -ATPase (Serrano *et al.*, 1986) foi utilizado como molde em uma reação de PCR que introduziu um sítio EcoRI na extremidade 5' não-codificante e sítios StuI/EcoRI na extremidade 3', imediatamente após o consenso Gly-Leu. O fragmento de 344 bp foi digerido com EcoRI, clonado em pBlueScript e totalmente sequenciado pelo método dideoxi. Essa construção, designada pN-PMA1 foi digerida com HindIII/StuI e ligada no vetor pSVA12 digerido com HindIII/StuI dando origem ao vetor pSVA21, que contem a sequência codificante para a quimera de substituição $\text{H}^+\Delta\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Figura 7). Ambos os vetores foram sequenciados para confirmar as construções.

2. Expressão de SR Ca^{2+} -ATPase em levedura.

Na etapa inicial do trabalho foi feita a padronização da expressão heteróloga da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SR) de coelho em levedura utilizando o vetor de expressão controlada indutível por choque térmico. Leveduras transformadas com o plasmídeo pSVA12, que contem o cDNA da SR Ca^{2+} -ATPase sob controle de um promotor de choque térmico, foram crescidas a 23°C até o início da fase logarítmica e transferidas para

37°C por 60 min. Amostras de extrato total das leveduras induzidas foram analisadas por "Western blotting" revelado com um anticorpo monoclonal gerado contra a SR Ca²⁺-ATPase de coelho e proteína A-¹²⁵I. A presença de uma única banda no "Western", com o tamanho esperado de 110 kDa, indicou a ausência de degradação causada por "misfolding" ou inserção incorreta da proteína recombinante em membranas internas da levedura (Figura 8).

Figura 8 -Expressão de SR Ca²⁺-ATPase em levedura induzida por choque térmico.

Leveduras foram transformadas com um plasmídeo contendo o cDNA da Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático de coelho (**wt**) ou um plasmídeo vazio (**sem inserto**). A transcrição do cDNA está sob o controle de um promotor de choque-térmico. Culturas de leveduras transformantes foram crescidas a 23°C até uma DO₆₀₀ de 0.5 e transferidas para 37°C por 90 minutos. As células induzidas foram lisadas, e 40 µg de proteína total dos lisados totais resultantes foram separados por SDS-PAGE. A SR Ca²⁺-ATPase recombinante foi detectada por "Western blotting" utilizando um anticorpo monoclonal específico para a Ca²⁺-ATPase de músculo de coelho. 300 ng de Ca²⁺-ATPase purificada de músculo de coelho foram utilizadas como controle positivo (**SR**).

Os níveis de expressão da SR Ca²⁺-ATPase foram testados em tempos crescentes de indução por choque térmico. Na Figura 9, estão apresentados os resultados de um

experimento típico. Após 30 min de incubação da cultura a 37 °C já se detecta a expressão da proteína recombinante. Em 120 min de indução verifica-se o nível máximo de acúmulo de SR Ca²⁺-ATPase recombinante, que começa a diminuir após 150 min (Figura 9). Optou-se por um tempo de indução de 90 min nos experimentos seguintes a fim de garantir a ausência de degradação proteolítica.

Figura 9 - Expressão temporal de SR Ca²⁺-ATPase durante indução a 37°C.

Leveduras transformadas com um plasmídeo contendo o cDNA da SR Ca²⁺-ATPase nativa sob controle de um promotor regulado por choque térmico (pSVA12) foram crescidas a 23°C até uma DO₆₀₀= 0.5 e transferidas para 37°C no tempo zero. Alíquotas de células retiradas nos tempos indicados (0, 30, 60, 90, 120 e 150 min) foram homogeneizadas na presença de inibidores de protease. 40 mg do lisado total foram separados em 10% SDS-PAGE. A Ca²⁺-ATPase recombinante foi detectada em um "Western blot" revelado com um anticorpo monoclonal específico contra SR Ca²⁺-ATPase produzido em camundongo (A52), e um anticorpo secundário conjugado a peroxidase. 100 ng de SR Ca²⁺-ATPase purificada de músculo de coelho (SR) e 40 mg de proteína presente no lisado total de células transformadas com um plasmídeo vazio e submetidas as mesmas condições experimentais (C) foram aplicados em paralelo.

O nível de expressão de SR Ca²⁺-ATPase foi testado em 11 clones de leveduras transformadas com o vetor pSVA12 e induzidas a 37°C durante 90 min. Alíquotas de lisado total proveniente de cada clone foram aplicadas em membranas de nitrocelulose e analisadas por "imuno dot-blotting" revelado com anticorpo monoclonal anti-SR Ca²⁺-ATPase e proteína A-¹²⁵I. Paralelamente, a quantidade de proteína presente nos lisados totais foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). O nível médio de expressão da SR Ca²⁺-ATPase correspondeu a 0.1% da proteína total presente nos extratos das leveduras induzidas (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantificação da SR Ca²⁺-ATPase recombinante nos lisados totais de levedura.

11 clones independentes contendo o cDNA da SR Ca²⁺-ATPase nativa sob controle de um promotor regulado por choque-térmico foram crescidos a 23 °C até uma DO₆₀₀ = 0.5 e transferidos para 37 °C. Alíquotas de células foram retiradas aos 90 min. e homogeneizadas na presença de inibidores de protease. 100 µg de proteína de lisado total foram aplicados por "dot". A membrana foi incubada sucessivamente com tampão de bloqueio contendo o anticorpo monoclonal A52 contra SR Ca²⁺-ATPase e proteína A-¹²⁵I. A radioatividade em cada "dot" foi determinada por contagem das emissões gama em cintilador, e comparadas a um padrão, com quantidades conhecidas de SR Ca²⁺-ATPase de músculo, incubado em paralelo.

clone	SR Ca ²⁺ -ATPase (ng)	
3	87	
4	55	
5	70	
6	76	
7	45	
8	62	
13	58	
14	117	
15	114	
16	71	
17	55	
média	81 ± 23	0.1% da proteína total

Em face do baixo nível de expressão da SR Ca²⁺-ATPase nas membranas da levedura,

ficou clara a necessidade de introdução de um protocolo de purificação da Ca^{2+} -ATPase recombinante para permitir a obtenção de frações com alto grau de pureza. Por outro lado, a fim de justificar esse esforço, era absolutamente necessária a demonstração de que o sistema de expressão em levedura regulado por choque térmico é capaz de produzir SR Ca^{2+} -ATPase funcional. A presença de várias ATPases endógenas, não permite a obtenção de medidas diretas de atividade da enzima recombinante utilizando extratos totais de leveduras induzidas. A fim de contornar essa limitação, empregou-se uma metodologia desenvolvida por Skerjanc et al. (Skerjanc *et al.*, 1993) para a caracterização funcional de mutantes pontuais da Ca^{2+} -ATPase produzidos em células de inseto. Assim, a SR Ca^{2+} -ATPase recombinante foi solubilizada a partir do extrato total com o detergente não-iônico C₁₂E₈ e imunoprecipitada utilizando o anticorpo monoclonal específico contra a SR Ca^{2+} -ATPase de músculo de coelho (Cl-30) e proteína A-sepharose. O complexo imune obtido dessa forma foi incubado na presença de [γ -³²P] ATP e 100 μM Ca^{2+} ou 10 mM EGTA e separado por eletroforese em gel ácido (Figura 10). A presença de uma banda fosforilada exclusivamente na presença de cálcio e [γ -³²P] ATP com o tamanho esperado de 110 kDa, confirma a expressão de SR Ca^{2+} -ATPase em estado funcional na levedura (Figura 10, B). Notar a presença de uma proteína contaminante com tamanho inferior a SR Ca^{2+} -ATPase que fosforila na presença ou ausência de cálcio (Figura 10, A e B).

Figura 10 - Fosforilação da SR Ca²⁺-ATPase recombinante por ³²P-γ-ATP.

Leveduras transformadas com um plasmídeo contendo o cDNA da SR Ca²⁺-ATPase de coelho (**wt**) ou com um plasmídeo vazio (**sem inserto**) foram induzidos a 37°C e lisadas. 3 mg do extrato total resultante foram solubilizados com C₁₂E₈ e imunoprecipitados com um anticorpo monoclonal contra a SR Ca²⁺-ATPase de músculo de coelho e Proteína A-Sepharose. O complexo imune formado foi ressuspensionado em uma mistura de fosforilação contendo 10 μM [³²P-γ] ATP e 10 mM EGTA (A) ou 0.1 mM CaCl₂ (B), e separado em gel ácido 6% poliacrilamida. Como controle positivo foram aplicados 3 μg de SR Ca²⁺-ATPase purificada de coelho (**SR**). Posteriormente, o gel foi seco e exposto a uma chapa de autoradiografia.

A seguir, foi comparada a atividade catalítica da SR Ca²⁺-ATPase selvagem expressa em levedura com a da enzima purificada do músculo de coelho. A velocidade de decaimento da fosfoenzima na presença de cálcio e ATP sugeriu que o "turn-over" da proteína recombinante seja semelhante ao descrito para a proteína de músculo nas condições de ensaio empregadas (Figura 11). Após a adição de 30% DMSO para estabilizar a SR Ca²⁺-ATPase na ausência de Ca²⁺, foi possível demonstrar pela primeira vez na SR Ca²⁺-ATPase expressa em levedura a formação de fosfoenzima a partir [³²P] fosfato inorgânico (Pi) na presença de 10 mM EGTA (Figura 12).

Figura 11 - Decaimento do intermediário E₁P da SR Ca²⁺-ATPase nativa expressa em levedura. 800 µg de uma fração membranar enriquecida em SR Ca²⁺-ATPase recombinante foram solubilizados com C₁₂E₈. Após imunoprecipitação com o anticorpo monoclonal CL-30 e Proteína A-Sepharose, o complexo imunoprecipitado foi ressuspendido em uma mistura de reação contendo 10µM [³²P-γ] ATP e 100µM CaCl₂. Após a diluição do ATP radioativo com 250µM de ATP frio, a reação foi interrompida, nos tempos indicados, pela adição de 10% TCA. As amostras foram separadas em gel ácido 6% poliacrilamida e expostas a uma chapa de autoradiografia.

Figura 12 - Fosforilação da SR Ca²⁺-ATPase recombinante por ³²Pi. Leveduras transformadas com um plasmídeo contendo o cDNA da SR Ca²⁺-ATPase de coelho (**wt**) ou com um plasmídeo vazio (**sem inserto**) foram induzidos a 37°C e lisadas. 3 mg do extrato total resultante foram solubilizados com C₁₂E₈ e imunoprecipitados com um anticorpo monoclonal contra a SR Ca²⁺-ATPase de músculo de coelho e Proteína A-Sepharose. O complexo imune formado foi ressuspendido em uma mistura de fosforilação contendo 500µM [³²Pi] e 0.1 mM CaCl₂ ou 10 mM EGTA, e separado em gel ácido 6% poliacrilamida. Como controle positivo foram aplicados 3 µg de SR Ca²⁺-ATPase purificada de coelho (**SR**). Posteriormente, o gel foi seco e exposto a uma chapa de autoradiografia.

3. Expressão em levedura de SR Ca^{2+} -ATPase contendo modificações na região N-terminal.

O baixo grau de pureza da SR Ca^{2+} -ATPase expressa em levedura (0.1% da proteína presente no lisado total de células induzidas) implicou na necessidade do desenvolvimento de um método eficiente para a purificação da Ca^{2+} -ATPase recombinante. Uma característica comum às duas estratégias concebidas consistia na modificação da sequência codificante da SR Ca^{2+} -ATPase de forma a introduzir "tags" na sua extremidade amino-terminal. A presença dos "tags" deveria permitir a purificação da SR Ca^{2+} -ATPase quimérica produzida na levedura utilizando uma estratégia de purificação apropriada. Em uma das construções testadas, foi introduzida uma sequência codificante para 6 histidinas, uma região espaçadora e um sítio de clivagem para uma endoprotease específica (rTEV protease). A quimera resultante foi denominada 6xHis Ca^{2+} -ATPase. A introdução de "tags" de hexahistidinas tem sido utilizada com sucesso para permitir a purificação de proteínas de membrana utilizando cromatografia de afinidade por quelação metálica (Crowe *et al.*, 1994; Hochuli *et al.*, 1988). Recentemente, uma H^{+} -ATPase da membrana plasmática de planta expressa em levedura foi purificada utilizando essa estratégia (Lanfermeijer *et al.*, 1998). A outra estratégia de purificação testada envolveu a introdução da sequência amino-terminal da H^{+} -ATPase da membrana plasmática de levedura (PMA1), contendo 88 resíduos que se estendem da metionina inicial até o consenso Gly-Lys, conservado na família das ATPases do tipo-P, à extremidade N-terminal da SR Ca^{2+} -ATPase. Esta sequência amino-terminal é aparentemente necessária para a correta localização da H^{+} -ATPase na membrana plasmática da levedura (Portillo *et al.*, 1989). A introdução dessa sequência na extremidade N-terminal da SR Ca^{2+} -ATPase foi realizada com o objetivo de direcionar a SR Ca^{2+} -ATPase expressa em levedura para a membrana plasmática da célula. A alteração da localização sub-celular deveria permitir o isolamento de vesículas secretoras enriquecidas em Ca^{2+} -ATPase através da expressão da $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase quimérica em leveduras deficientes na via de secreção, uma estratégia semelhante a utilizada por Nakamoto *et al.* (Nakamoto *et al.*, 1991) para a expressão de mutantes da H^{+} -ATPase de levedura. Para testar essa hipótese, duas quimeras H^{+} -ATPase – Ca^{2+} -ATPase distintas foram construídas. Na quimera de adição ($\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), o fragmento codificante para os 88 resíduos N-terminais da H^{+} -ATPase foi adicionado a extremidade 5' do cDNA da SR Ca^{2+} -ATPase. Em uma outra quimera, de substituição, os 24 resíduos N-terminais da Ca^{2+} -ATPase foram substituídos pelos 88 resíduos N-terminais da H^{+} -ATPase ($\text{H}\Delta\text{Ca}^{2+}$ -ATPase). As condições de indução utilizadas para a produção das Ca^{2+} -ATPase quiméricas foram as mesmas otimizadas para a produção

da proteína nativa. As células induzidas foram recolhidas por centrifugação e lisadas em um homogenizador de pressão do tipo "French-Press", dando origem a um lisado total. Alíquotas das diversas amostras foram analisadas por "Western blot" revelado com um anticorpo monoclonal contra a Ca^{2+} -ATPase de músculo. Uma banda única, com o tamanho esperado, foi revelada nas canaletas correspondentes a 6xHis Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, indicando a ausência de degradação causada por dobramento incorreto da proteína recombinante (Figura 13 - *6xhis* e *H/Ca*). Tanto a 6xHis Ca^{2+} -ATPase quanto a $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase apresentaram bandas bem mais intensas do que a Ca^{2+} -ATPase nativa no "immunoblot", sugerindo um nível de expressão maior nessas Ca^{2+} -ATPases quiméricas. Uma diferença significativa entre o nível de expressão da 6xHis Ca^{2+} -ATPase e da $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sugerida pelo experimento de "Western blotting" não se confirmou na quantificação realizada posteriormente utilizando "immuno dot-blotting" radioativo (Tabela 2). A intensidade distinta das bandas correspondentes as duas Ca^{2+} -ATPases modificadas esta possivelmente associada a diferença de tamanho dos "tags" presentes em cada uma das construções; a quimera $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase por ser um pouco maior que a 6xHis Ca^{2+} -ATPase é menos eficientemente transferida durante o "blotting" para a membrana de nitrocelulose (Figura 13).

Não foi possível observar expressão positiva na quimera $\text{H}\Delta\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Figura 13 – *HΔC*). Esse resultado mostra que os 88 resíduos N-terminais da H^+ -ATPase não são capazes de substituir os 24 resíduos correspondentes da Ca^{2+} -ATPase. A participação da extremidade N-terminal na formação do Domínio A revelada pelo modelo atômico da enzima (ver Figura 6), permite postular que na quimera $\text{H}\Delta\text{Ca}^{2+}$ -ATPase o dobramento desse domínio está afetado ocasionando a desestabilização da proteína.

Os níveis de expressão da SR Ca^{2+} -ATPase nativa, 6xHis Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nos extratos totais de leveduras induzidas foram determinados em paralelo, em "immuno dot-blots" quantitativos revelados com um anticorpo monoclonal contra SR Ca^{2+} -ATPase de músculo e proteína A- ^{125}I . Na tabela 2, painel A, é possível observar que a adição à extremidade amino da SR Ca^{2+} -ATPase de uma sequência de 6 histidinas (quimera 6xHis Ca^{2+} -ATPase) ou de uma sequência contendo os 88 resíduos iniciais da H^+ -ATPase de levedura (quimera $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), provocou um aumento de 3 vezes na expressão da Ca^{2+} -ATPase recombinante (1% da proteína total) quando comparado ao nível da Ca^{2+} -ATPase nativa (0.3 % da proteína total). Esse dado confirma o maior nível de expressão observado para 6xHis Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase no "Western blot" da Figura 13.

Figura 13 - Expressão de SR Ca²⁺-ATPase contendo modificações na porção N-terminal. Lisados totais de células induzidas expressando SR Ca²⁺-ATPase nativa (**WT**), 6xHis-Ca²⁺-ATPase (**6xhis**), H⁺/Ca²⁺-ATPase (**H/Ca**) ou HΔCa²⁺-ATPase (**HΔCa**) foram analisados por "Western blotting". Lisados de levedura transformadas com um plasmídeo vazio foram utilizadas como controle negativo (**C**). 0.5 µg de SR Ca²⁺-ATPase purificada de músculo foram aplicados como controle positivo (**SR**). Amostras contendo 20 µg ou 50 µg de proteína total de levedura foram separadas em 10% SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitro-celulose. A Ca²⁺-ATPase recombinante foi detectada por "immuno blotting" utilizando um anticorpo monoclonal específico para a Ca²⁺-ATPase do músculo de coelho e um anticorpo secundário conjugado a peroxidase.

O grau de inserção da Ca²⁺-ATPase recombinante nas membranas da levedura foi estimado através da determinação da quantidade de Ca²⁺-ATPase recuperada em frações de membrana que sedimentam com velocidade média (24.000 x g) ou alta (135.000 x g). Após a remoção de restos celulares utilizando uma breve centrifugação a 418 x g, os extratos totais foram centrifugados sucessivamente a 24.000 x g e 135.000 x g. Os "pellets" resultantes foram ressuspensos nos volumes iniciais e analisados por "immuno dot-blotting". 89% da SR Ca²⁺-ATPase nativa foi recuperada no "pellet" 24.000 x g, onde o grau de enriquecimento atingiu 2% da proteína total da fração (Tabela 3, painel A). A centrifugação a 135.000 x g recuperou 7% adicionais de SR Ca²⁺-ATPase nativa (Tabela 3, painel A). O fracionamento de lisados contendo 6xHis Ca²⁺-ATPase e H⁺/Ca²⁺-ATPase revelou que apenas 61% e 53% do

total sedimentam a 24.000 x g (Tabela 3, painéis B e C). As Ca^{2+} -ATPase quiméricas representam 6-7% do total de proteína recuperada no "pellet" 24.000 x g (Tabela 3, painéis B e C). A centrifugação a 135.000 x g recuperou 13% e 18% adicionais de 6xHis Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, respectivamente (Tabela 3, painéis B e C). Esses dados sugerem que a maior parte da Ca^{2+} -ATPase nativa e das Ca^{2+} -ATPase quiméricas esteja corretamente inserida em membranas internas da levedura. A adição de 6 histidinas ou de uma sequência N-terminal da H^+ -ATPase a extremidade N-terminal da SR Ca^{2+} -ATPase promoveu um aumento de 2-3 vezes na quantidade total de Ca^{2+} -ATPase presente nos lisados totais, e de 3 vezes no grau de enriquecimento em Ca^{2+} -ATPase ATPase na fração de membrana recuperada a 24.000 x g.

Tabela 2 - Recuperação de Ca^{2+} -ATPase recombinante em frações de membrana de levedura.

	Fração	Rendimento ^a ($\mu\text{g}/\text{litro}$)	Ca^{2+} -ATPase recuperada	mg de Ca^{2+} -ATPase por mg de proteína total
A	Ca^{2+} -ATPase nativa			
	Lisado total	348 ± 58 (4)	–	0.003
	S 418 x g	308 ± 34 (4)	1	0.003
	P 24,000 x g	275 ± 55 (4)	0.89	0.02
	P 135,000 x g	21 ± 11 (4)	0.07	0.01
B	$\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase			
	Lisado total	854 ± 51 (2)	–	0.01
	S 418 x g	756 ± 68 (2)	1	0.01
	P 24,000 x g	401 ± 55 (2)	0.61	0.07
	P 135,000 x g	137 ± 17 (2)	0.13	0.03
C	6xHis- Ca^{2+} -ATPase			
	Lisado total	840 ± 76 (3)	–	0.01
	S 418 x g	729 ± 95 (3)	1	0.01
	P 24,000 x g	445 ± 53 (3)	0.53	0.06
	P 135,000 x g	92 ± 8 (3)	0.18	0.03

4. Localização sub-celular da SR Ca^{2+} -ATPase nativa e quimeras N-terminais

4.1. Fracionamento em gradiente de sacarose

A fim de determinar a localização sub-celular da SR Ca^{2+} -ATPase nativa e das quimeras 6xHis Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, extratos totais de células induzidas foram equilibradas em um gradiente descontínuo de sacarose (15-60%) e o perfil de fracionamento da Ca^{2+} -ATPase nativa e das quimeras N-terminais (Figura 14, painel A) foi comparado com o perfil de vários marcadores conhecidos de compartimentos internos da levedura (Figura 14, painéis B e C). A SR Ca^{2+} -ATPase nativa co-sedimentou com o marcador de retículo endoplasmático (RE) NADPH-citocromo c redutase, ambos apresentando picos na fração 18 do gradiente (Figura 14, painéis A e B). O pico da Ca^{2+} -ATPase nativa também apresentou sobreposição com outro marcador de RE, BiP/Kar2, que apresentou picos nas frações 13 e 17 (Figura 14, painéis A e B). Essa distribuição bi-modal de BiP/Kar2 é característica e revela a existência de 2 sub-populações de membranas do RE, uma leve e outra pesada (Sanderson *et al.*, 1990). A co-sedimentação da Ca^{2+} -ATPase com a atividade H^+ -ATPase sensível a vanadato, um marcador da presença de membrana plasmática, torna inconclusivo este experimento para a determinação da localização sub-celular da Ca^{2+} -ATPase nativa. (Figura 14, painéis A e C). Curiosamente, tanto 6xHis Ca^{2+} -ATPase quanto $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foram deslocadas para regiões menos densas do gradiente quando comparadas a Ca^{2+} -ATPase nativa, apresentando um pico principal na fração 13 (Figura 14, painel A), que co-sedimenta com a fração leve do marcador de RE BiP/Kar2 (Figura 14, painel B). Uma pequena fração de ambas Ca^{2+} -ATPase quiméricas co-sedimentou com a fração pesada do marcador de RE BiP/Kar2 (Figura 14, painéis A e B).

Figura 14 - Fracionamento em gradiente de sacarose de membranas contendo SR Ca^{2+} -ATPase.

4.2. Imunolocalização utilizando microscopia confocal.

Os dados de fracionamento por gradiente de sacarose foram inconclusivos para permitir a localização da Ca^{2+} -ATPase nativa em um compartimento celular específico. Observou-se a co-localização da Ca^{2+} -ATPase com marcadores do retículo endoplasmático (NADPH Citocromo C redutase e Kar2) e da membrana plasmática (H^{+} -ATPase). A fim de tentar distinguir a localização da SR Ca^{2+} -ATPase entre esses dois compartimentos, utilizou-se microscopia de imunofluorescência confocal (Figura 15). Esferoplastos obtidos a partir de leveduras expressando Ca^{2+} -ATPase nativa foram duplamente marcados com um anticorpo contra Ca^{2+} -ATPase de músculo (CL-30, produzido em camundongo) e um anticorpo policlonal contra o marcador de RE BiP/Kar2 produzido em coelho. Após incubação com anticorpos secundários marcados com rodamina (anti-IgG de camundongo) ou fluoresceína (anti-IgG de coelho), foi possível observar um sinal fluorescente amarelo resultante da sobreposição do sinal fluorescente vermelho (rodamina) e verde (fluoresceína), predominantemente em estruturas internas da célula (Figura 15, painel A). Este resultado indica a co-localização da SR Ca^{2+} -ATPase e do marcador de RE BiP/Kar2 no mesmo compartimento intracelular. Dados semelhantes foram obtidos por Degand et al. utilizando um sistema de expressão de Ca^{2+} -ATPase em levedura sob controle do promotor constitutivo do gene PMA1 (Degand *et al.*, 1999).

A localização sub-celular das quimeras 6xHis Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase também foi estudada utilizando microscopia confocal. Em ambos os casos, foi observada uma fluorescência alaranjada mais intensa do que a observada para a Ca^{2+} -ATPase nativa (Figura 15, painéis B e C), confirmando a maior expressão dessas proteínas observada nos experimentos de "immuno dot-blotting" (Tabela 2).

Figura 15 - Imunolocalização da SR Ca^{2+} -ATPase por microscopia confocal.

Leveduras transformadas com o plasmídeo contendo o cDNA da SR Ca^{2+} -ATPase nativa, (painel A), $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (painel B), ou 6xHis Ca^{2+} -ATPase (painel C) foram induzidas a 37°C, fixadas em 4% formaldeído, convertidas a esferoplastos e fixadas a lâminas de vidro. As lâminas foram marcadas duplamente com um anticorpo monoclonal contra a SR Ca^{2+} -ATPase de coelho produzido em camundongo (CL-30; dil. 1:30) e um anticorpo policlonal produzido em coelho contra o marcador do retículo endoplasmático de levedura BiP/Kar2 (dil. 1:1,000). Os anticorpos primários foram revelados por incubação com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado a rodamina (dil. 1:300) e anti-IgG de coelho conjugado a

fluoresceína (dil. 1:300). Leveduras transformadas com um plasmídeo vazio foram preparadas em paralelo como controle negativo (painel D). A aquisição de imagens foi feita em um microscópio confocal MRC-1024 (BioRad). As barras de calibração estão representadas em μm .

4.3. Expressão de SR Ca^{2+} -ATPase em leveduras deficientes na via de secreção.

A via de secreção de proteínas em levedura foi intensivamente estudada durante a década de 80 através do isolamento de mutantes termo-sensíveis que apresentam defeitos em pontos sucessivos da via entre o retículo endoplasmático e a membrana plasmática da célula (Schekman e Novick, 1982; Walworth e Novick, 1987). Dois desses mutantes, *sec1* e *sec6*, são deficientes no passo final de fusão das vesículas secretoras com a membrana plasmática. Cepas contendo essas mutações apresentam um fenótipo selvagem a temperatura ambiente mas acumulam vesículas secretoras no citoplasma quando transferidas para temperaturas sub-letais (37°C). Essa característica permite a caracterização de proteínas retidas a caminho da membrana plasmática após purificação das vesículas retidas no citoplasma (Walworth e Novick, 1987; Ambesi *et al.*, 1997). A utilização de cepas de levedura termo-sensíveis tem

sido utilizada com sucesso para permitir a purificação e caracterização um grande número de proteínas heterólogas (Coury *et al.*, 1999), tendo tido uma importante contribuição na caracterização de mutantes da H^+ -ATPase da membrana plasmática de levedura (Figura 16) (Nakamoto *et al.*, 1991; Rao e Slayman, 1993; Ambesi *et al.*, 1996; Petrov *et al.*, 2000). Nesse contexto, a expressão em cepas deficientes na via de secreção foi testada com o objetivo de determinar se uma fração da Ca^{2+} -ATPase recombinante seria capaz de escapar a retenção no RE e ser recuperada em vesículas secretoras. O isolamento de vesículas secretoras seladas contendo Ca^{2+} -ATPase recombinante inserida na sua bicamada permitiria a caracterização direta de mutantes da proteína através de medidas de transporte de cálcio para o interior das vesículas

Figura 16 – Expressão de H^+ -ATPase em cepas selvagens (NY605) ou cepas deficientes na via de secreção (SY4).

Essa possibilidade foi testada utilizando a cepa SY2 (a, *sec6-4*, *ura3-12*, *leu2-3,112*, *GAL2*) transformada com os vetores contendo o cDNA para a Ca^{2+} -ATPase nativa, 6xHis- Ca^{2+} -ATPase ou H^+ / Ca^{2+} -ATPase, respectivamente. As culturas de levedura foram crescidas em meio mínimo a 23°C até atingirem DO_{600} igual a 1.0 sendo então transferidas para 37°C e incubadas por 2h. Nesse período ocorre simultaneamente a indução da proteína recombinante e a acumulação de vesículas secretoras. Após esse período as células foram recolhidas e as vesículas secretoras isoladas pelo método padrão de preparação de vesículas secretoras (Ambesi *et al.*, 1997). As frações geradas ao longo do isolamento das vesículas secretoras

foram analisadas através de "dot-blots" incubados com anticorpos contra a Ca^{2+} -ATPase de músculo, contra o marcador de RE BiP/Kar2, ou contra a H^{+} -ATPase da membrana plasmática de levedura, e revelados com proteína A- ^{125}I . Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 3. Apenas 9% da SR Ca^{2+} -ATPase nativa foi recuperada em vesículas secretoras. Esse valor é muito semelhante aos 8% observado para o marcador de RE BiP/Kar2 e bastante inferior a recuperação de 56% alcançada para a H^{+} -ATPase de membrana plasmática (Tabela 3). Assim, é provável que a pequena quantidade de SR Ca^{2+} -ATPase nativa encontrada nas vesículas secretora seja proveniente do contaminante de RE presente nessa fração. Também foi testada, na cepa deficiente na via de secreção, a expressão da 6xHis Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase para avaliar se as Ca^{2+} -ATPase quiméricas eram capazes de escapar da retenção no RE e progredir em direção a membrana plasmática. Embora tenha sido observado um aumento de 2 vezes na quantidade de 6xHis Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (20 e 18%) recuperada na fração enriquecida em vesículas secretoras em comparação a SR Ca^{2+} -ATPase nativa (9%), esse aumento marginal está provavelmente associado ao maior nível de expressão da Ca^{2+} -ATPase quimérica, que se reflete no contaminante de RE na fração enriquecida em vesículas secretoras (Tabela 3).

Tabela 3 – Recuperação de SR Ca^{2+} -ATPase em vesículas secretoras

Fração	Ca ²⁺ -ATPase						marcador PM H ⁺ -ATPase %	marcador RE BiP/Kar2 %
	wt		H ⁺ /Ca ²⁺		6xHis			
	IOD ^b		IOD		IOD			
	%		%		%			
Lisado total	8,656	—	15,200	—	45,016	—	—	—
Lisado clarificado	528	100	760	100	1,576	100	100	100
Pellet 100.000xg	156	30	699	84	1,271	81	75	20
Vesículas secretoras	43	9	167	20	277	18	56	8

^b unidades de Densidade Óptica Integrada

O *lisado clarificado* corresponde ao sobrenadante da centrifugação 14,500 x g do lisado total. O *pellet 100.000 x g* é obtido após centrifugação do lisado clarificado como descrito nos Métodos. As frações enriquecidas em *vesículas secretoras* foram obtidas a partir do pellet 100.000 x g após centrifugação em gradiente de sacarose (Ambesi *et al.*, 1997).

A fim de testar a possibilidade das vesículas secretoras conterem pouca quantidade de Ca^{2+} -ATPase recombinante mas uma atividade ATPásica cálcio-dependente significativa, foi medida a atividade Ca^{2+} -ATPásica presente nas vesículas secretoras. Para isso utilizou-se um sistema acoplado onde o ATP consumido é regenerado a custa de NADH (Lund *et al.*, 1989). O consumo de NADH é detectado pela diminuição da DO_{340} ao longo do tempo. Um experimento inicial (Figura 17, painel A) sugeriu a existência de alguma atividade ATPásica nas vesículas isoladas de leveduras expressando SR Ca^{2+} -ATPase (nativa, 6xHis e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$) em relação a leveduras transformadas com um plasmídeo vazio (controle). Posteriormente, verificou-se que essa pequena atividade não era sensível a tapsigargina, um inibidor específico da Ca^{2+} -ATPase do retículo de músculo (Sagara e Inesi, 1991) (Figura 17, painel B). Como controle positivo foi usada Ca^{2+} -ATPase extraída de músculo, vendo-se que nas condições usadas no ensaio ela apresenta uma atividade mensurável e inibível por tapsigargina (Fig. 17, painel C). No painel D, vê-se ainda que a atividade da $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase era independente de cálcio. Assim, foi excluída a possibilidade da existência de uma atividade Ca^{2+} -ATPásica mensurável em vesículas secretoras. Este resultado é conflitante com dados da literatura que descrevem uma atividade Ca^{2+} -ATPásica em vesículas secretoras isoladas de leveduras expressando Ca^{2+} -ATPase do músculo de coelho (Centeno *et al.*, 1994).

Figura 17 - Atividade ATPásica em vesículas secretoras de leveduras expressando SR Ca^{2+} -ATPase.

Leveduras *sec* -deficientes (SY2) foram transformadas com vetores contendo a sequência codificante para a Ca^{2+} -ATPase nativa (**SVA12**), 6xHis- Ca^{2+} -ATPase (**ARF1**) ou $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (**VVL1**). Como controle negativo foram utilizadas vesículas secretoras isoladas de leveduras transformadas com um plasmídeo vazio (**controle**). As culturas foram crescidas a 23°C até atingirem DO_{600} igual a 1.0 sendo então transferidas para 37°C e incubadas por 2h. Após a lise em uma "French-Press", as vesículas secretoras presentes no lisado total foram isoladas segundo o método descrito por Ambesi et al. (Ambesi *et al.*, 1997). O meio reacional utilizado contém 10mM Tris-Cl; pH 7.5, 50mM KNO_3 , 5mM NaN_3 , 0.1mM molibdato de amônio, 7mM MgCl_2 , 0.1mM CaCl_2 , 1mg/ml C_{12}E_8 , 0.1mg/ml lactato desidrogenase, 0.1mg/ml piruvato quinase, 0.225mM NADH, 1mM fosfoenolpiruvato, 0.1μM PMSF e 2.8mM β-mercaptoetanol. As reações foram disparadas pela adição de 200μg de proteína total presente nas frações de vesículas e 1mM ATP. O tempo total de reação foi entre 2-3 min. No painel A foram testadas as três ATPases recombinantes na presença de cálcio. No

painel B, foi adicionado 1 $\mu\text{g/ml}$ de tapsigargina, um inibidor específico da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático. No Painel C, foi adicionado 2 μg de vesículas do retículo sarcoplasmático de coelho como controle positivo do ensaio enzimático. No painel D é apresentada a atividade ATPásica em vesículas secretoras extraídas de leveduras expressando a quimera $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase na presença de cálcio mais diferentes concentrações de tapsigargina, ou na ausência de cálcio (com EGTA).

Painel A

Painel C

Painel B

Painel D

5. Fosforilação e "turnover" nas quimeras N-terminais da SR Ca^{2+} -ATPase .

A capacidade das quimeras 6xHis- Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em formar um intermediário fosforilado na presença de ATP foi analisada nas condições testadas previamente para a Ca^{2+} -ATPase nativa. Para isso, frações de membrana de levedura enriquecidas em Ca^{2+} -ATPase recombinante ("pellet" 24.000 x g) contendo 6xHis- Ca^{2+} -ATPase ou $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foram solubilizadas com o detergente C_{12}E_8 e imunoprecipitadas com um anticorpo monoclonal contra Ca^{2+} -ATPase (Cl-30) e Proteína A-Sepharose. A ATPase solubilizada e imunoprecipitada foi fosforilada por ^{32}P - γ ATP em um meio de fosforilação contendo 100 μM Ca^{2+} ou 10mM EGTA. A reação foi interrompida com ácido após 10 seg. e aplicada em um gel de poliacrilamida pH 5.3. Após exposição a uma chapa de autoradiografia, a presença de uma banda fosforilada no meio com cálcio e a sua ausência no meio com EGTA confirmou a manutenção da dependência de cálcio para a formação da fosfoenzima nas duas Ca^{2+} -ATPase quiméricas (Figura 18, painéis C e E). A velocidade de decaimento do intermediário fosforilado nas quimeras foi estimada através de experimentos de "pulso-e-caça" utilizando ^{32}P - γ ATP e ATP frio nas mesmas condições otimizadas para a Ca^{2+} -ATPase nativa. Alíquotas contendo quantidades iguais de 6xHis- Ca^{2+} -ATPase ou $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foram solubilizadas e imunoprecipitadas em paralelo. Os complexos imunoprecipitados foram ressuspensos em meio reacional contendo 10 μM ^{32}P - γ ATP e incubados por 10 seg no gelo. A velocidade de hidrólise do intermediário E_1P radioativo acumulado no estado estacionário foi medida pela adição de 250 μM ATP frio seguida da rápida desnaturação da proteína pela adição de ácido em tempos sucessivos (Figura 18, D e F). A velocidade observada para o decaimento da 6xHis- Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de E_1P para E_2 durante o ciclo catalítico (Figura 18, D e F) é semelhante a observada para a Ca^{2+} -ATPase nativa (Figura 18, B) e comparável aos dados presentes na literatura para a proteína purificada do músculo de coelho (de Meis, 1981). Estes dados confirmam que a adição de 24 aminoácidos correspondentes a sequência de hexahistidinas, ou da porção N-terminal da H^+ -ATPase na região N-terminal da Ca^{2+} -ATPase , não afeta a estrutura global ou o funcionamento da proteína recombinante.

Figura 18 - Fosforilação e decaimento da fosfoenzima nas Ca^{2+} -ATPase quiméricas.

Alíquotas contendo 1 mg de frações membranares enriquecidas em Ca^{2+} -ATPase nativa (WT), 6xHis- Ca^{2+} -ATPase (6xHis) ou $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (H/Ca) foram solubilizados com C_{12}E_8 e incubadas com Mab Cl-30 e Proteína A- Sepharose. Em **A**, **C** e **E**, os complexos imunoprecipitados foram ressuspensos em uma mistura de reação contendo $10\mu\text{M}$ $[\text{P-}^{32}\gamma]$ ATP e $100\mu\text{M}$ CaCl_2 , e incubado durante 10 seg antes da adição de 10%TCA (EP). Em **B**, **D** e **F**, triplicatas do complexo imunoprecipitado foram ressuspensas em um meio reacional contendo $10\mu\text{M}$ $[\text{P-}^{32}\gamma]$ ATP e $100\mu\text{M}$ CaCl_2 e incubadas por 10 seg. Após a diluição do ATP radioativo com $250\mu\text{M}$ ATP frio, a reação foi interrompida nos tempos indicados pela adição de 10%TCA. As amostras foram separadas em gel ácido 6% acrilamida e expostas a uma chapa de autoradiografia. N, controle de leveduras transformadas com um plasmídeo vazio.

6. Purificação da 6xHis Ca²⁺-ATPase expressa em levedura

6.1. Otimização da solubilização

As tentativas iniciais de purificação da 6xHis Ca²⁺-ATPase utilizando resina de níquel apresentaram vários problemas. Nesses experimentos, a solubilização das membranas de levedura foi feita com o detergente C₁₂E₈. Além do baixo rendimento da purificação, várias proteínas endógenas de levedura co-purificavam nas condições experimentais testadas. Outro problema observado foi que uma parte significativa da 6xHis Ca²⁺-ATPase era removida da coluna durante as etapas de lavagem, apesar das baixas concentrações de imidazol utilizadas (5mM). Ainda, uma fração significativa da 6xHis Ca²⁺-ATPase ficava retida na resina, mesmo após a passagem de tampão contendo 500 mM imidazol, sugerindo a ocorrência de agregação no interior da coluna. A escolha desse detergente não-iônico foi baseada no fato dele ter sido extensivamente utilizado em estudos envolvendo a solubilização da Ca²⁺-ATPase de músculo, onde demonstrou preservar em grau elevado a atividade da enzima (Andersen *et al.*, 1983; Levy *et al.*, 1992; Shivanna e Rowe, 1997). Embora esteja descrito que C₁₂E₈ solubiliza eficientemente membranas do retículo sarcoplasmático, em nossas condições experimentais foi observado que apenas 5% ou menos da Ca²⁺-ATPase presente em frações de membrana de levedura ("pellet" 24.000 x g) são solubilizados com C₁₂E₈ (Figura 19). A fim de tentar melhorar o rendimento da purificação, foi testada a solubilização da SR Ca²⁺-ATPase utilizando lisofosfatidilcolina (LPC), um detergente descrito na literatura para a solubilização de proteínas de membrana de levedura (Dufour e Goffeau, 1978). Encontra-se descrito na literatura que LPC solubiliza eficientemente a SR Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático, além de preservar a sua atividade (Ludi e Hasselbach, 1984). Também tem sido descrita na literatura a utilização de LPC para a solubilização sob a forma funcional de proteínas de membrana expressas em levedura, tal como o trocador de ânion humano AE1 (Sekler *et al.*, 1995). A título de comparação, foi testada em paralelo a solubilização da SR Ca²⁺-ATPase em SDS, C₁₂E₈ e lisofosfatidilglicerol (LPG). Amostras de membranas enriquecidas em 6xHis Ca²⁺-ATPase contendo a mesma quantidade de proteína total foram ressuspensas em SDS, C₁₂E₈, LPC e LPG, respectivamente, a uma relação detergente:proteína de 5:1 e uma concentração final de detergente igual a 2 % (w/w). Como controle, foi incluída uma amostra onde não foi adicionado detergente. Após incubação de 10 min no gelo as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g e o sobrenadante contendo a fração solubilizada foi separado por SDS-PAGE e analisado por "Western blot"

revelado com um anticorpo monoclonal anti-SR Ca^{2+} -ATPase e um anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Figura 19). Após exposição a uma chapa autoradiográfica, as quantidades relativas de SR Ca^{2+} -ATPase solubilizadas por cada um dos detergentes foi estimada por densitometria. O detergente C_{12}E_8 solubilizou no máximo 30 % da SR Ca^{2+} -ATPase solubilizada por SDS (Figura 19, C_{12}E_8 e *SDS*), uma quantidade comparável a fração de SR Ca^{2+} -ATPase que não sedimenta a 16.000 x g mesmo na ausência de detergente (Figura 19, *sem detergente*). Por outro lado, tanto LPC quanto LPG foram capazes de solubilizar SR Ca^{2+} -ATPase em uma quantidade equivalente a 80-100% da quantidade solubilizada por SDS (Figura 19, *LPC* e *LPG*). A preservação da atividade ATPásica em vesículas do retículo sarcoplasmático solubilizadas com LPC (Nestrick-Goyke e Hasselbach, 1981; Ludi e Hasselbach, 1984) determinaram a escolha desse detergente para a purificação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase .

Figura 19 - Otimização da solubilização da 6xHis Ca^{2+} -ATPase com lisofosfolipídeos.

Alíquotas contendo 150 µg de uma fração de membrana de levedura enriquecida em 6xHis Ca^{2+} -ATPase foram solubilizadas em um meio contendo 10 mM Tris-Cl; pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 % β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 1x cocktail inibidor de proteases e; 2 % SDS (**SDS**), 2 % C_{12}E_8 (**C₁₂E₈**), 2 % lisofosfatidilcolina (**LPC**) ou 2 % lisofosfatidilglicerol (**LPG**). Uma alíquota incubada na ausência de detergente foi incluída como controle (**no detergent**). Após incubação por 10 min no gelo, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi separado por SDS-PAGE e analisado por "Western blot" revelado com um anticorpo monoclonal contra a SR Ca^{2+} -ATPase de músculo de coelho e um anticorpo secundário conjugado à peroxidase. 2 µg de SR Ca^{2+} -ATPase purificada de músculo foram aplicadas em paralelo como controle positivo (**SR**).

6.2. Cromatografia de afinidade

A introdução de "tags" de hexahistidinas tem sido utilizada para permitir a purificação de proteínas recombinantes sob condições brandas de eluição que preservem sua atividade (Sekler *et al.*, 1995; Lanfermeijer *et al.*, 1998). A elevada afinidade que a sequência de polihistidinas possui para metais divalentes, como níquel, cobalto e cobre, permite a purificação de proteínas contendo o "tag" por cromatografia em coluna de afinidade (Hochuli *et al.*, 1988; Crowe *et al.*, 1994). Após ligação da proteína de interesse a matriz sólida carregada com o cátion, as proteínas contaminantes são removidas por lavagens sucessivas com tampões contendo concentrações crescentes de imidazol. A eluição da proteína ligada a resina pelo "tag" de hexahistidinas é feita utilizando uma concentração elevada (100-300 mM) de imidazol no tampão de eluição. Alternativamente, a eluição pode ser feita por mudanças no pH do tampão ou aumento da força iônica (manual QIAexpressionist - Qiagen).

Após otimizada a solubilização da 6xHis Ca²⁺-ATPase a partir de membranas de levedura pela utilização de LPC, uma nova tentativa de purificação em coluna de níquel foi testada utilizando um protocolo adaptado de Sekler *et al.* (Sekler *et al.*, 1995). Para testar a purificação da 6xHis Ca²⁺-ATPase, 30 mg de uma fração de membrana enriquecida em 6xHis Ca²⁺-ATPase (aprox. 2.1 mg) obtidos a partir de 4 litros de cultura células induzidas foram solubilizadas em 2 ml de tampão de solubilização (10 % glicerol, 100 mM NaCl, 5 mM imidazol, 10 mM fosfato de sódio; pH 8, 10 mM β-mercaptoetanol, 1mM DFP e 1x cocktail inibidor de proteases) contendo 2 % LPC. A relação detergente: proteína utilizada foi de 1.3:1. A amostra foi solubilizada por 20 min no gelo e centrifugada a 30.000 x g por 10 min. O sobrenadante contendo a 6xHis Ca²⁺-ATPase solúvel foi aplicado em uma coluna contendo 0.3 ml de resina NTA-Ni previamente equilibrada com tampão de solubilização. Após lavagem com tampão de solubilização contendo 0.1 % de C₁₂E₈ e 5 mM imidazol até uma DO₆₀₀ menor que 0.02 (~12 ml) foi feita uma eluição, recolhendo frações de 0.5 ml, com 4 ml do mesmo tampão contendo 250 mM imidazol. A leitura da DO₂₈₀ das frações eluídas indicou um pico de eluição em 1 ml de volume eluído. Uma posterior eluição com 500 mM imidazol não promoveu a eluição de proteínas adicionais. Alíquotas correspondendo as várias etapas da purificação foram separadas em um gel SDS-PAGE e coradas por Coomassie (Figura 20 A) ou transferidas para uma membrana de nitrocelulose e reveladas com um anticorpo monoclonal anti-SR Ca²⁺-ATPase (Figura 20 B). Na Figura 20 A, é possível observar a presença de uma banda eluída com 250 mM imidazol que possui o tamanho esperado para a 6xHis Ca²⁺-ATPase ligeiramente superior ao observado para a Ca²⁺-ATPase

de músculo (Figura 20 A, 250 mM imidazol e SR). Observam-se também bandas de menor tamanho que co-eluem nessa concentração de imidazol. A banda com tamanho compatível com a 6xHis Ca²⁺-ATPase corresponde a aproximadamente 20 % da proteína presente no "lane" (Figura 20, 250 mM imidazol). A análise de uma duplicata dessas amostras por "Western blot" sugere que a proteína eluída seja efetivamente a 6xHis Ca²⁺-ATPase . A banda correspondente a presumida 6xHis Ca²⁺-ATPase é revelada pelo anticorpo anti-SR Ca²⁺-ATPase (Figura 20 B, 250 mM imidazol). Outra evidência de que a banda corada por Coomassie corresponda à banda revelada pelo anticorpo vem da equivalência das intensidades relativas dessas bandas quando comparadas ao controle de SR Ca²⁺-ATPase de músculo aplicado no mesmo gel (Figura 20 A, SR e 250 mM imidazol; Figura 20 B, SR e 250 mM imidazol). Aparentemente, uma fração importante da 6xHis Ca²⁺-ATPase solubilizada se liga a coluna e é perdida durante a lavagem pois não é recuperada na fração eluída nem permanece retida na resina (Figura 20 B, Fração solúvel, 250 mM imidazol e gel fervido). Este resultado sugere que a afinidade da 6xHis Ca²⁺-ATPase pelo níquel possa estar diminuída por algum impedimento estérico resultante do dobramento da proteína. Esta primeira purificação permitiu a obtenção de 10 µg de 6xHis Ca²⁺-ATPase purificada. A recuperação estimada foi de 3 % da proteína solubilizada e o grau de enriquecimento em Ca²⁺-ATPase na fração eluída de aproximadamente 20%. O tampão fosfato utilizado para a solubilização e eluição da 6xHis Ca²⁺-ATPase não foi o mais adequado para estabilizar a Ca²⁺-ATPase na presença de detergente, pois não permite a adição dos ligantes principais da enzima, Ca²⁺ e Mg²⁺.

Figura 20 - Purificação da 6xHis Ca²⁺-ATPase solubilizada com LPC em coluna NTA-Ni²⁺.

30 mg de uma fração membranar de levedura enriquecida em 6xHis Ca²⁺-ATPase obtidos a partir de 6 litros de cultura foram solubilizados em 4 ml de tampão de solubilização (10 % glicerol, 100 mM NaCl, 5 mM imidazol, 10 mM fosfato de sódio; pH 8, 10 mM β-mercaptoetanol, 1mM DFP e 1x cocktail inibidor de proteases) contendo 2 % LPC. A amostra foi solubilizada por 20 min no gelo e centrifugada a 30.000 x g por 10 min. O sobrenadante contendo a 6xHis Ca²⁺-ATPase solúvel foi aplicado em uma coluna de 5 ml (BioRad) contendo 0.3 ml de resina NTA-Ni previamente equilibrada com tampão de solubilização. Após lavagem com tampão de solubilização contendo 0.1 % de C₁₂E₈ e 5 mM imidazol até uma DO₆₀₀ menor que 0.02 (~12 ml) a coluna foi eluída com 4 ml de tampão de solubilização contendo 0.1 % de C₁₂E₈ e 250 mM imidazol, em frações de 0.5 ml. Alíquotas correspondendo as várias etapas da purificação foram separadas em um gel SDS-PAGE e coradas por Coomassie (A) ou transferidas para uma membrana de nitrocelulose e reveladas com um anticorpo monoclonal anti-SR Ca²⁺-ATPase e um anticorpo secundário conjugado a peroxidase (B). **Fração solúvel** (1/40 do volume inicial), **Fração não-ligada** (1/40 do volume inicial), **250 mM imidazol** (1/10 do volume inicial), **gel fervido** (1/10 do volume inicial). 2 µg de SR Ca²⁺-ATPase purificada de músculo foram aplicadas como controle positivo (SR).

6.3. Otimização da cromatografia de afinidade para aumento do rendimento

A seguir, foi testada a otimização das condições de purificação descritas na figura 20 com as seguintes alterações no protocolo experimental; o tempo de incubação do sobrenadante solúvel com a resina foi aumentado para 1h e a relação mg 6xHis Ca^{2+} -ATPase /ml de resina Ni-NTA foi reduzida para 0.7 mg/ml. Essas duas alterações tiveram como objetivo maximizar a ligação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase solúvel à matriz sólida; a fim de reduzir a co-purificação de proteínas contaminantes, a concentração de imidazol foi aumentada para 10 mM no tampão de solubilização. Dessa forma pretendeu-se reduzir a co-purificação de proteínas contaminantes que interagissem com a resina de um modo semelhante as hexahistidinas mas com uma afinidade inferior, e portanto capazes de serem deslocadas com uma concentração de imidazol menor que a necessária para eluir a 6xHis Ca^{2+} -ATPase. Foram feitas duas etapas sucessivas de lavagem com tampão contendo 0.1% LPC e 5mM ou 20 mM de imidazol, respectivamente. As lavagens foram efetuadas utilizando o equivalente a ~ 25 vezes o volume de resina utilizado (0.3 ml). Alíquotas correspondentes as etapas da purificação foram separadas em um gel SDS-PAGE e coradas por Coomassie (Figura 21). A fração eluída com 250 mM de imidazol apresentou um enriquecimento de aproximadamente 75 %, determinado por densitometria, em uma banda com o tamanho esperado para 6xHis Ca^{2+} -ATPase (Figura 21, *eluição 250 mM imidazol*).

Figura 21 - Purificação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase solubilizada com LPC em coluna NTA-Ni²⁺ – condição otimizada. ver legenda da figura 20

A utilização da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático solubilizada em detergentes para a obtenção de medidas de atividade ATPásica é limitada pela desnaturação irreversível da enzima que ocorre na passagem pelo sítio de cálcio de baixa afinidade durante o ciclo catalítico (Martin *et al.*, 1984). Do mesmo modo, a presença do detergente dificulta a obtenção de curvas de ligação de cálcio que permitam a titulação do sítio de baixa afinidade devido a instabilidade da Ca^{2+} -ATPase quando a concentração de Ca^{2+} livre está abaixo da saturação do sítio de alta afinidade (Verjovski-Almeida e Silva, 1981). Uma opção para eliminar essas limitações experimentais seria reconstituir a 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada em lipossomos. Além da estabilização pretendida, a inserção da Ca^{2+} -ATPase recombinante em vesículas fosfolipídicas seladas permitiria a obtenção de medidas de captação de cálcio acoplada a hidrólise de ATP. O estabelecimento de um protocolo para a reconstituição da Ca^{2+} -ATPase em vesículas de fosfatidilcolina (PC) / ácido fosfatídico (PA) foi testado utilizando vesículas do retículo sarcoplasmático purificadas do músculo de coelho e disponíveis em grande quantidade no laboratório. As condições experimentais utilizadas foram adaptadas a partir do método descrito por Lévy *et al.* para a reconstituição da Ca^{2+} -ATPase de músculo de coelho em lipossomos de PC/PA (Lévy *et al.*, 1992). A principal diferença em relação ao método citado foi a utilização de LPC para a solubilização da Ca^{2+} -ATPase e formação de micelas mistas detergente / lipídio ao invés de C_{12}E_8 . Foram feitos 3 experimentos de reconstituição onde foram testadas condições de solubilização e remoção de detergente distintas. O protocolo otimizado resultante foi o seguinte: vesículas do retículo sarcoplasmático (3 mg) foram solubilizadas em 1,5 ml de tampão de solubilização (50 mM MOPS; pH 7.5, 80 mM KCl, 1 mM DTT, 6 mg/ml LPC) e centrifugadas a 100.000 g para remoção da fração insolúvel. Em paralelo, foram preparadas micelas mistas de PC/PA/LPC. Para tal, 18 mg PC, 2 mg PA e 30 mg LPC foram solubilizados em metanol:clorofórmio (1 : 1) e evaporados sob atmosfera de N_2 . O filme formado foi ressuspendido no vortex em 5 ml 50 mM MOPS; pH 7.5, 80 mM KCl. A relação molar detergente : lipídio utilizada (2.4) garantiu a total solubilização do fosfolipídio no meio aquoso utilizado. Micelas ternárias proteína/lipídio/detergente foram formadas pela adição da Ca^{2+} -ATPase solubilizada em LPC (0.5 ml) a mistura PC/PA/LPC e incubação por 30 min a temperatura ambiente. A relação lipídio : proteína utilizada foi de 40 : 1 (w/w). A remoção do detergente foi feita pela incubação da mistura proteína/detergente/lipídio com 500 mg/ml SM2 BioBeads (BioRad) a temperatura ambiente sob agitação durante 5 h. Após remoção dos "BioBeads", as vesículas formadas foram transferidas para novo tubo e utilizadas para a obtenção de medidas de

atividade ATPásica e captação de cálcio. A eficiência de incorporação da Ca^{2+} -ATPase nas vesículas fosfolipídicas foi avaliada por centrifugação das vesículas a 130.000 g e determinação da proteína total presente no sobrenadante e no "pellet" como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Reconstituição da Ca^{2+} -ATPase de músculo solubilizada em LPC em lipossomos de PC/PA.

	Conc. estimada	Conc. observada
Ca^{2+} -ATPase solubilizada a partir de vesículas do retículo sarcoplasmático	2 mg/ml	1.8 mg/ml (90 %)
Vesículas reconstituídas	0.18 mg/ml	0.19 mg/ml
Sobrenadante 130.000 x g de vesículas	0	0.07 mg/ml
"pellet" 130.000 x g de vesículas	0.18 mg/ml	0.11 mg/ml

As medidas de atividade ATPásica foram feitas a 25 e a 37 °C utilizando um sistema acoplado de regeneração do ATP consumido. A taxa de hidrólise de ATP ao longo do tempo foi determinada pela observação do NADH consumido estequiometricamente e medido pela queda na absorbância a 340 nm ao longo do tempo. Os ensaios foram feitos na presença do ionóforo de cálcio A23187 para impedir a acumulação de cálcio no interior das vesículas, o que causaria a retro-inibição da enzima. A atividade Ca^{2+} -ATPásica medida foi de 0.3 $\mu\text{moles} / \text{mg proteína} \cdot \text{min}$ a 25 °C e de 1.0 $\mu\text{moles} / \text{mg proteína} \cdot \text{min}$ a 37 °C. A atividade específica máxima esperada para a Ca^{2+} -ATPase do retículo a 37 °C é de 5.0 $\mu\text{moles} / \text{mg proteína} \cdot \text{min}$ (de Meis, 1981). O resultado obtido revela ter sido possível recuperar aproximadamente 20 % da atividade Ca^{2+} -ATPásica presente na preparação original de retículo sarcoplasmático. A mesma preparação de vesículas foi analisada quanto a sua capacidade em acumular cálcio no seu interior a custa da hidrólise de ATP. Uma quantidade de vesículas contendo aproximadamente 10 μg de Ca^{2+} -ATPase foi incubada a 25 °C em um meio contendo 50 mM MOPS; pH 7.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 5 μM Ca^{2+} livre, 50.000 c.p.m. $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{nmol}$, 10 μM valinomicina e 10 μM FCCP. A captação de cálcio foi iniciada pela adição de 5 mM ATP a mistura de reação. Alíquotas contendo aproximadamente 1.5 μg de Ca^{2+} -ATPase em vesículas foram retiradas ao longo do tempo e filtradas. Após a lavagem dos filtros, a radioatividade incorporada nas vesículas retidas nas

membranas foi medida utilizando um contador de cintilações. A fim de facilitar a acumulação de cálcio no interior das vesículas, o mesmo experimento foi realizado em paralelo introduzindo 5 mM de oxalato de potássio no tampão de captação. Dada a elevada insolubilidade do oxalato de cálcio em meio aquoso, um pequeno aumento na concentração de cálcio intravesicular é suficiente para promover a precipitação de cristais de oxalato de cálcio no interior das vesículas que não estaria livre para difundir para o exterior ou retro-inibir o funcionamento da enzima. O resultado de um experimento de captação está apresentado na figura 22. Foi possível observar o aumento do cálcio retido nas vesículas ao longo do tempo de incubação, na presença ou na ausência de oxalato de potássio. Após a adição do ionóforo de cálcio A23187, o gradiente de cálcio foi desfeito, indicando que as vesículas efetivamente acumulam cálcio em seu interior mediante transporte ativo catalisado pela Ca^{2+} -ATPase (Figura 22). A velocidade máxima de captação de cálcio observada foi de $0.7 - 1 \mu\text{mol Ca}^{2+} / \text{mg proteína} \cdot \text{min}$. Estes valores são compatíveis com a velocidade de hidrólise de ATP observada ($0.3 \mu\text{mol ATP} / \text{mg proteína} \cdot \text{min}$) e indicam a existência de acoplamento entre hidrólise de ATP e transporte de cálcio próximo ao valor ideal de 2 moles $\text{Ca}^{2+} / \text{mol ATP}$. A obtenção de valores de captação semelhantes na presença ou ausência do agente precipitante, além de indicar que as vesículas estejam apropriadamente seladas e impermeáveis a passagem de cálcio, sugere também que o volume das vesículas reconstituídas seja inferior ao observado nas vesículas do retículo e por isso não permitam a acumulação significativa de cristais de oxalato de cálcio em seu interior (de Meis, 1981). Esta hipótese foi confirmada pela medida do espalhamento de luz dinâmico ("quasi-elastic light scattering") das vesículas reconstituídas. As vesículas apresentaram uma distribuição de tamanho bastante homogênea (índice de polidispersão 0.05) com diâmetro hidrodinâmico predominante de 184 nm, significativamente inferior ao descrito para as vesículas do retículo sarcoplasmático (250 nm) (de Meis, 1981; Shivanna e Rowe, 1997).

As condições descritas acima para a reconstituição da Ca^{2+} -ATPase de músculo foram testadas para a reconstituição da 6xHis- Ca^{2+} -ATPase purificada a partir de membranas de levedura utilizando a resina NTA-níquel. Partiu-se de 6 litros de células induzidas que resultaram em uma fração enriquecidas de membrana contendo 49 mg de proteína total e uma quantidade estimada equivalente de 3.4 mg de 6xHis- Ca^{2+} -ATPase (7 % da proteína total). Após purificação em coluna de níquel-NTA, foi obtida uma fração contendo aproximadamente 300 μg de 6xHis- Ca^{2+} -ATPase em um volume de 1 ml. Esta fração foi concentrada a 0.5 ml utilizando uma "spin-column" BioMax 30K (Millipore). O protocolo de

reconstituição empregado foi idêntico ao descrito acima para a Ca^{2+} -ATPase obtida a partir de músculo de coelho, com exceção da relação lipídio:proteína, que foi de 70 : 1. As medidas de atividade ATPásica obtidas a 25 e 37 °C, foram respectivamente 0.1 e 0.5 $\mu\text{moles/ mg}$ proteína.min. Curiosamente, a atividade ATPásica medida no início do experimento utilizando 10, 20 ou 30 μg de Ca^{2+} -ATPase foi superior a medida após decorridos aproximadamente 30 min utilizando as mesmas quantidades de enzima. Após 1 h, apenas foi possível medir atividade ATPásica na preparação de vesículas quando utilizados 40 ou mais μg de Ca^{2+} -ATPase . A causa aparente da inativação da Ca^{2+} -ATPase reconstituída foi a redução da temperatura (~ 10 °C) decorrente da transferência da preparação da geladeira para o isopor com gelo. Esta mesma preparação foi utilizada em um experimento de captação de cálcio empregando as condições descritas acima para as vesículas reconstituídas com Ca^{2+} -ATPase obtida a partir de músculo. Não foi possível observar uma captação significativa de cálcio dependente de ATP. Este resultado revelou a baixa atividade específica da preparação de vesículas contendo a Ca^{2+} -ATPase expressa em levedura quando comparada a preparação obtida a partir de Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático. A aparente inativação provocada pela transferência para o gelo contribuiu para reduzir ainda mais a atividade da Ca^{2+} -ATPase recombinante.

Figura 22 - Captação de cálcio pela SR Ca^{2+} -ATPase extraída de músculo, solubilizada em LPC e reconstituída em vesículas de PC/PA.

10 μg de Ca^{2+} -ATPase extraída de músculo e reconstituída em vesículas fosfolipídicas foram incubados a 25 °C em 2 ml de um meio de reação (50 mM MOPS; pH 7.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 520 μM CaCl_2 , 500 μM EGTA, 50.000 c.p.m. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /nmol, 10 μM valinomicina e 10 μM FCCP) contendo ou não 5 mM oxalato de potássio. A reação foi iniciada pela adição de 5 mM ATP no tempo 0. Após 5 min de incubação foi adicionado 30 μM do ionóforo de cálcio A23187. Aliquotas de 0.25 ml foram retiradas nos tempos indicados, filtradas a vácuo através de um filtro Millipore 0.45 μm e lavadas com 7.5 ml de tampão de lavagem frio (20 mM MOPS; pH 7.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 3 mM $\text{La}(\text{NO}_3)_3$). Após secagem dos filtros, a radioatividade retida nas vesículas foi determinada em um contador de cintilações.

6.4. Estabilização da 6xHis-Ca²⁺-ATPase pela introdução de cálcio e lipídio durante as etapas de purificação

A baixa atividade específica observada na preparação de 6xHis-Ca²⁺-ATPase reconstituída em lipossomos de PC/PA sugeriu que parte da proteína estivesse desnaturando durante as etapas de solubilização em LPC e purificação utilizando resina NTA-níquel. Um fator importante na manutenção da atividade ATPásica da Ca²⁺-ATPase solubilizada em detergente é a utilização de concentrações de cálcio suficientemente altas durante a solubilização (> 500 µM) de modo a saturar o sítio de baixa afinidade da enzima (Dean e Tanford, 1978). O efeito protetor do cálcio também foi demonstrado em vesículas do retículo sarcoplasmático solubilizadas com o detergente não-iônico C₁₂Eg (Andersen *et al.*, 1986). Nesse estudo, foi observado que a utilização de ≤ 50 µM de cálcio durante a solubilização conduzia a formação irreversível de agregados da Ca²⁺-ATPase solubilizada, enquanto que a presença de 500 µM de cálcio mantinha a proteína solúvel na forma monomérica e funcional (Andersen *et al.*, 1986).

O protocolo de purificação da 6xHis-Ca²⁺-ATPase utilizado até o momento foi otimizado a partir do protocolo-padrão sugerido pelo fabricante da resina NTA-níquel (Qiagen) para a purificação de proteínas recombinantes em condições nativas(QIAexpressionistTM handbook). A utilização de um tampão fosfato nesse protocolo limitava a presença de cálcio a 5 µM devido a elevada insolubilidade do fosfato de cálcio formado. A fim de se poder utilizar uma concentração maior de cálcio durante as etapas de purificação, foi testada a utilização do tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico; pKa 7.2), que por não possuir grupamentos amino secundários ou terciários não reduziria os íons níquel coordenados na resina NTA-agarose e poderia substituir satisfatoriamente o tampão fosfato usado até então.

Uma outra possível causa de inativação da 6xHis-Ca²⁺-ATPase seria o efeito perturbador da estrutura nativa da enzima causado pela delipidação extensiva durante as etapas de lavagem da resina para remoção dos contaminantes de levedura. Existem vários trabalhos na literatura a cerca da necessidade da existência de um certo número de moléculas de lipídio ligadas à cadeia polipeptídica da Ca²⁺-ATPase para a manutenção da sua atividade enzimática (ver de Meis, 1981; de Foresta *et al.*, 1994; Lee, 1998). Recentemente, foi descrita a purificação de uma 6xHis-H⁺-ATPase da membrana plasmática de *A.thaliana* produzida em levedura após solubilização com o detergente dodecilmaltosídeo (Lanfermeijer *et al.*, 1998). Nesse trabalho foi demonstrado que a adição de asolectina durante as etapas de lavagem e

eluição é indispensável para a obtenção da H^+ -ATPase purificada com atividade. Em vista desses dados da literatura, decidiu-se acrescentar 0.05 % de DOPC aos tampões de lavagem e eluição utilizados para a purificação da 6xHis- Ca^{2+} -ATPase, sempre na presença de 0.1 % LPC, visando estabilizar a proteína solúvel. Na figura 23 é apresentado o resultado de uma purificação típica obtida após a substituição do tampão fosfato originalmente utilizado por MOPS, adicionado de 0.5 mM cálcio e 0.05 % DOPC. Aliquotas correspondentes as etapas da purificação foram separadas em géis de SDS-PAGE e coradas por Coomassie (Figura 23, A) ou analisadas por "Western blotting" utilizando um anticorpo monoclonal anti-poli-histidinas e um anticorpo secundário acoplado a peroxidase (Figura 23, B). Na figura 23 A, é possível observar a eluição de uma proteína predominante com 250 mM imidazol. Uma banda única com o tamanho foi detectada pelo anticorpo anti-poli-histidinas (Figura 23 B, *eluição 250 mM*). A quantificação das bandas eluídas com 250 mM imidazol e coradas por Coomassie revelou que a 6xHis Ca^{2+} -ATPase constitui aproximadamente 75% da proteína total eluída na fração (Tabela 5). Esse valor representa um aumento de 12 vezes no grau de pureza da Ca^{2+} -ATPase quando comparado a concentração desta nas frações de membrana iniciais, onde representa 6-7% da proteína total. (Tabela 5).

Tabela 5. - Quadro-resumo da purificação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase em coluna NTA- Ni^{2+} .

etapa da purificação	proteína total (mg)	6xHis- Ca^{2+} -ATPase (mg)	recuperação Ca^{2+} -ATPase	mg Ca^{2+} -ATPase / mg proteína total
membranas totais ^a	52	2.60	1	0.06
fração solúvel	44	2.22	0.85	0.05
fração eluída	0.11	0.08	0.03	0.74

^aobtidas a partir de 6 litros de cultura de leveduras.

Figura 23 - Purificação da 6xHis Ca²⁺-ATPase em na presença de 0.5 mM CaCl₂ e 0.05% DOPC.

29 mg de uma fração de membrana enriquecida em 6xHis Ca²⁺-ATPase (aprox. 1.5 mg) foram solubilizadas em 4 ml de tampão de solubilização (20 % glicerol, 10 mM MOPS pH 7.5, 150 mM KCl, 5mM imidazol, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 1mM DFP e 1x coquetel inibidor de proteases - P.I.C.) contendo 38 mg LPC. A amostra foi solubilizada por 15 min a temperatura ambiente e centrifugada a 100.000 x g por 35 min. O sobrenadante contendo a 6xHis Ca²⁺-ATPase solúvel foi aplicado em uma coluna contendo 0.5 ml de resina NTA-Ni e incubado a 4° C por 1 h. Após drenagem do sobrenadante, a resina foi lavada com 2 x 4 ml de tampão de lavagem (20 % glicerol, 10 mM MOPS pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 1mM DFP, 1x P.I.C., 0.1 % LPC, 0.05 % DOPC) contendo 5 mM imidazol, e com 2 x 4 ml de tampão de solubilização contendo 25 mM imidazol. A 6xHis Ca²⁺-ATPase ligada a fase sólida foi eluída em frações de 1 ml, utilizando 6 ml do tampão de lavagem contendo 250 mM imidazol. A DO₂₈₀ medida nas frações eluídas indicou um pico no primeiro 1 ml eluído. Aliquotas correspondendo as várias etapas da purificação foram separadas por SDS-PAGE 7.5 % acrilamida e coradas por Coomassie (A) ou transferidas para membranas de nitro-celulose e reveladas por “Western blot” com anticorpo anti-Ca²⁺-ATPase de músculo de coelho (B). **Fração solúvel**, 50 µl (3% total); **Fração não-ligada**, 50 µl (3% total); **lavagem com 5 e 25 mM imidazol**, 120 µl (46 % total); **eluição 250 mM imidazol**, 50 µl (5 % total)

7. Caracterização cinética da hexaHis-Ca²⁺-ATPase purificada.

A contribuição do cálcio e do lipídeo adicionados durante as etapas de purificação para a estabilização da 6xHis-Ca²⁺-ATPase purificada foi testada através da obtenção de medidas de hidrólise de ATP no estado estacionário. Os ensaios de atividade ATPásica foram feitos utilizando ³²P-γ-ATP radioativo como traçador (Hermesen *et al.*, 1998). A reação de hidrólise é iniciada com a adição de ATP e alíquotas da reação são retiradas em tempos crescentes e paradas com HCl:carvão ativado, para posterior determinação do ³²Pi produzido. Na figura 24, é possível observar que a velocidade de hidrólise de ATP mantém-se constante durante o tempo total da reação (20 min). A atividade específica de 2.5 μmol/mg.min a 30 °C observada para a 6xHis-Ca²⁺-ATPase purificada é compatível com os valores observados para a Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático solubilizada em excesso de detergente (Verjovski-Almeida e Silva, 1981; Shivanna e Rowe, 1997). A adição de 1 mM EGTA, reduzindo a concentração de cálcio livre abaixo da concentração necessária para a saturação do sítio de alta-afinidade da enzima no pH do ensaio (0.3 – 1 μM), aboliu completamente a atividade ATPásica da preparação, demonstrando a dependência de cálcio para a ativação da hidrólise de ATP pela enzima purificada (Figura 24). A inibição total da atividade ATPásica por ortovanadato, um potente inibidor das Ca²⁺-ATPases e demais enzimas pertencentes a família das ATPases do tipo P (Dupont e Bennet, 1982), confirma a integridade da 6xHis-Ca²⁺-ATPase purificada (Figura 24). A observação de que a velocidade de hidrólise de ATP se mantém estável durante 20 min de reação sem que tenha sido necessário a reconstituição em lipossomos indica que o lipídeo intercalado nas micelas de detergente exerce um forte efeito estabilizador sobre a Ca²⁺-ATPase solubilizada durante o seu ciclo catalítico (Figura 24).

Figura 24 - Atividade ATPásica Ca²⁺-dependente. Inibição da 6xHis Ca²⁺-ATPase purificada por EGTA e ortovanadato.

2μg de 6xHis-Ca²⁺-ATPase purificada em coluna de NTA-níquel a partir de membranas de levedura enriquecidas em 6xHis- Ca²⁺-ATPase nativa foram adicionados a 500 μl de uma mistura de reação contendo 10 mM MOPS pH7.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 60 μM CaCl₂, 0.1 % LPC, 0.05% DOPC e 10 mM β-mercaptoetanol. Foram testadas em paralelo misturas de reação sem cálcio (adicionadas de 1 mM EGTA) ou contendo 200 μM ortovanadato. As reações foram iniciadas pela adição de 0.5 mM ³²P-γ-ATP (2μCi /μmol) e

incubadas a 30 °C. Nos tempos determinados (5, 10 e 20 min), alíquotas de 150 µl foram retiradas e a reação interrompida pela adição de 600 µl 0.1 N HCl:carvão ativado (1:1). Após breve centrifugação, 100 µl de sobrenadante foram transferidos para tubos contendo líquido de cintilação para determinação do $^{32}\text{P}_i$ produzido. Os valores (c.p.m.) utilizados para o cálculo da atividade específica da proteína purificada (µmoles de ATP consumido $-\text{P}_i$ produzido por mg ATPase) representam a média de 3 experimentos independentes.

A caracterização funcional da Ca^{2+} -ATPase purificada foi estendida a medida da ativação da atividade ATPásica como função de concentrações distintas de cálcio no meio de reação. A curva de ativação por cálcio obtida para a 6xHis- Ca^{2+} -ATPase nativa é apresentada na figura 25. Variando a concentração de cálcio livre e medindo a concentração de cálcio necessária para atingir a metade da ativação máxima, foi possível estimar a afinidade para cálcio da 6xHis Ca^{2+} -ATPase. A afinidade de 0.2 µM observada para a 6xHis Ca^{2+} -ATPase solubilizada em LPC/DOPC é comparável a afinidade encontrada em vesículas do retículo sarcoplasmático intactas no pH do ensaio (ver de Meis, 1981) ou perturbadas pela presença de LPC (Hunter *et al.*, 1999). A ativação cinética da Ca^{2+} -ATPase tem sido descrita como sendo uma função altamente cooperativa da concentração de cálcio no meio (Tanford, 1985; Tanford *et al.*, 1987). Os dados de hidrólise de ATP da figura 20 foram re-plotados de modo a fornecerem o coeficiente de Hill (n_H), que fornece uma medida conveniente da

cooperatividade existente entre os dois sítios de cálcio de alta-afinidade da enzima (Segel, 1975). A 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada apresenta um número de Hill igual a 2.07, indicando a persistência de um alto grau de cooperatividade na atividade ATPásica cálcio-ativada na enzima purificada (Figura 25, detalhe), uma característica da enzima nativa de músculo. Além disso, a alta afinidade para cálcio está preservada ($K_{0.5} = 0.16\mu\text{M}$).

Figura 25 - Ativação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada por cálcio.

Alíquotas contendo 0.4 μg de 6xHis- Ca^{2+} -ATPase purificada nativa foram diluídas em 200 μl de meio de reação (10 mM MOPS pH7.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 0.1% LPC, 0.05% DOPC e 500 μM CaCl_2) contendo quantidades distintas de EGTA para a obtenção das concentrações finais de Ca^{2+} apresentadas na figura. As reações foram iniciadas pela adição de 0.5 mM de ^{32}P - γ -ATP ($2\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) e incubadas a 30 °C por 10 min, quando alíquotas de 150 μl foram removidas e misturadas a 600 μl 0.1 N HCl: carvão ativado (1:1). Após breve centrifugação, o ^{32}Pi presente no sobrenadante foi determinado em um contador de cintilações e utilizado para o cálculo da atividade específica. Os dados foram re-plotados em um gráfico de Hill para a obtenção dos valores de cooperatividade.

8. CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DE MUTANTES DE FLUORESCÊNCIA DA Ca^{2+} -ATPASE .

A fluorescência natural observada em proteínas deve-se à existência de fluoróforos intrínsecos, representados pelos resíduos de tirosina, triptofano e fenilalanina presentes na cadeia polipeptídica. Quando esses aminoácidos são excitados por luz ultravioleta obtêm-se um espectro de emissão de fluorescência característico de cada espécie, sendo mais significativos os provenientes dos aminoácidos Tyr e Trp. Porém, quando inseridos na cadeia polipeptídica de uma proteína, o espectro de emissão de cada resíduo será influenciado pelas características do microambiente onde se localiza o seu anel aromático (Lacowicz, 1983).

Sabe-se que a fluorescência intrínseca dos triptofanos presentes na SR- Ca^{2+} -ATPase aumenta reversivelmente após a ligação de Ca^{2+} , indicando uma modificação conformacional associada a ligação do íon (Dupont, 1976; Verjovski-Almeida e Silva, 1981; Verjovski-Almeida e Kurtenbach, 1988). Este fato, associado a sua localização e ao caráter anfipático do aminoácido, sugere que pelo menos alguns desses resíduos contribuam para as alterações conformacionais associadas ao transporte do cálcio para o interior do retículo sarcoplasmático.

Em paralelo com o desenvolvimento de um método para a obtenção de frações purificadas da Ca^{2+} -ATPase em quantidade e com o grau de pureza que permitissem estudos de ligação e a aplicação de técnicas espectroscópicas, foi feita nesse trabalho a construção de um conjunto de mutantes de fluorescência envolvendo a substituição de cada um dos 13 resíduos triptofanilo presentes na cadeia polipeptídica da SR Ca^{2+} -ATPase. A caracterização das mudanças na fluorescência intrínseca observadas durante a ligação de cálcio nesses mutantes deverá permitir a identificação da contribuição individual de cada um dos resíduos para a fluorescência intrínseca da proteína. Este mapeamento permitirá a utilização de resíduos Trp considerados relevantes como sondas fluorescentes que forneçam informações estruturais e dinâmicas de regiões da proteína envolvidas em mudanças conformacionais que ocorrem durante o ciclo catalítico da enzima.

Pretendeu-se inicialmente, avaliar a substituição por fenilalanina de 3 resíduos triptofano situados na vizinhança de resíduos já caracterizados como essenciais para a atividade ATPásica da enzima. São eles:

W107; localizado na transição entre o segmento transmembranar M_2 e a alça hidrofílica S_2 e situa-se na vizinhança de resíduos associados ao acoplamento entre a hidrólise do ATP e o transporte de cálcio (N111 e N114) (Maruyama *et al.*, 1989)

W552, situado no domínio citoplasmático, é o único resíduo triptofanil da Ca^{2+} -ATPase

localizado em um ambiente claramente hidrofílico;

W794; situado na interface entre o segmento transmembranar M₆ e o lúmen do retículo, na vizinhança de aminoácidos identificados como fazendo parte do sítio de alta afinidade para Ca²⁺ (N796, T799, e D800) (Clarke *et al.*, 1989).

Foi testada inicialmente a mutagênese dos resíduos W utilizando a técnica de "mega primer" (Sarkar e Sommer, 1990). Esta técnica permite a introdução de mutações pontuais por PCR utilizando apenas 3 "primers". A construção prévia de sub-clones em pBScript da Ca²⁺-ATPase contendo a sequência a ser mutada permitirá que se utilize os "primers" T3 e T7 do vetor, disponíveis comercialmente, e um único "primer" mutagênico interno. A estratégia utilizada para a construção dos mutantes está apresentada sob forma esquemática na Figura 26. Em um passo inicial, foram gerados fragmentos de 200 - 600 bp contendo a mutação pretendida utilizando o "primer" mutagênico e um "primer" que flanqueia o sítio de clonagem do vetor (T3 / M13 "reverse" ou T7 / M13 "forward"). Este fragmento foi purificado e utilizado como "primer" ("Mega primer") em um segundo passo de PCR contendo o "primer" complementar ao outro lado do sítio de clonagem do vetor (Figura 26). O fragmento amplificado no segundo passo do PCR foi re-amplificado utilizando os "primers" T3 e T7, digerido com as mesmas enzimas de corte único utilizadas para a construção do sub-clone e ligado em um vetor pBScript digerido com as mesmas enzimas. A sequência entre os sítios de restrição foi totalmente determinada por sequenciamento dideoxi em um sequenciador automático ABI 377 a fim de confirmar a presença da mutação pretendida e a ausência de erros introduzidos pela técnica de PCR. A seguir, o sub-clone contendo a mutação W107F e W552F foi transferido para o vetor pARF1. Não foi possível a construção do mutante W794F pela dificuldade em gerar o fragmento esperado no segundo passo de PCR. Esta dificuldade está provavelmente associada ao elevado tamanho do "megaprimer" dupla-fita gerado no passo inicial. No segundo passo, o pareamento das fitas complementares do "mega primer" compete com o pareamento com o DNA-molde, diminuindo a eficiência da amplificação. Este efeito é tanto mais pronunciado quanto maior for o "megaprimer" e exige que sejam utilizadas quantidades sensivelmente mais elevadas de DNA-molde no segundo passo do PCR. No caso do mutante W794F, o aumento da quantidade de DNA-molde não foi suficiente para permitir a amplificação do fragmento contendo a mutação.

Figura 26 - Construção de mutantes de fluorescência utilizando técnica de "megaprimer".

I) mutante W107F (subclone pSC_XbaI/KpnI)

1º round: oW107F + M13 rev → frag. ~400 bp

2º round: mega W107F + T7 → frag. ~600 bp

II) mutante W552F (subclone pSC_BamHI)

1º round: oW552F_R + T7 → frag. ~260 bp

2º round: mega W552F + M13 rev → frag. ~1.100 bp

III) mutante W794F (subclone pSC_SphI/SalI)

1º round: oW794F + M13 rev → frag. ~600 bp

2º round: mega W794F + T7 → frag. ~1.170 bp

A fim de contornar as dificuldades inerentes a técnica do "megaprimer", foi introduzida uma estratégia alternativa de geração de mutantes pontuais, que utilizando 2 pares de "primers" e o cDNA da Ca^{2+} -ATPase nativa como molde, amplificam 2 produtos PCR "mutantes" que se sobrepõem na região da mutação. Em uma segunda etapa de PCR, os 2 produtos gerados são adicionados em quantidades iguais em um tubo de reação para servirem

como molde (heteroduplex) em uma segunda amplificação que dará origem a um fragmento contendo sítios de restrição únicos que flanqueiam a região mutada. O resumo da estratégia utilizada está esquematizado na Figura 27. Os fragmentos contendo as mutações pretendidas foram digeridos com as enzimas de corte único que flanqueiam a mutação e sub-clonados em pBScript para sequenciamento confirmatório da mutação e da ausência de mutações fortuitas eventualmente introduzidas pela técnica de PCR. Após confirmada a integridade da sequência mutante, os sub-clones contendo as mutações W→F pretendidas foram redigeridos com as enzimas de corte único e transferidos para o vetor de expressão em levedura pARF1 dando origem a sequência codificante para os mutantes pontuais acrescidos de uma sequência de hexahistidinas na extremidade N-terminal. Esta estratégia permitiu a construção dos mutantes W50F, W77F, W272F, W288F, W794F, W832F, W854F, W855F, W928F, W932F e W967F.

Figura 27 - Construção de mutantes de fluorescência da Ca^{2+} -ATPase utilizando fragmentos de PCR com sobreposição na região da mutação.

Leveduras da cepa NY605 (*MATa*; *ura3-12*; *leu2-3,112*; *GAL*) transformadas com os vetores de expressão pW107F, pW272F, pW288F, pW552F, pW794F, pW832F, pW854F e pW855F foram plaqueadas em meio mínimo deficiente em leucina. Os clones transformantes (Leu^+ , Ura^-) foram propagados em meio mínimo sem leucina e a expressão da Ca^{2+} -ATPase mutante foi testada utilizando condições idênticas as utilizadas para a expressão da Ca^{2+} -ATPase nativa (choque térmico de 37 °C por 90 min em culturas em fase de crescimento "early-log"). Após a indução, as células foram recolhidas, transformadas em esferoplastos e lisadas em um homogenizador "potter" na presença de inibidores de protease. Amostras do lisado total de leveduras expressando os vários mutantes foram analisadas por "dot-blot" revelado com um anticorpo monoclonal específico para a Ca^{2+} -ATPase do retículo e proteína A- ^{125}I . Todos os mutantes testados, excetuando o mutante W794F, apresentaram expressão positiva. Em um novo "dot-blot", um padrão contendo quantidades conhecidas de Ca^{2+} -ATPase purificada de músculo de coelho aplicado em paralelo a fim de permitir a determinação do nível de expressão da proteína mutante (Figura 28). A densitometria da membrana de nitrocelulose foi feita em um aparelho Storm (Molecular Dynamics) e a quantificação da proteína aplicada em cada "dot" foi feita utilizando o método de Lowry. Os níveis de expressão de cada mutante foram comparados com a Ca^{2+} -ATPase nativa expressa nas mesmas condições e os resultados estão apresentados na Tabela 6. É possível observar que os nível de expressão dos vários mutantes são bastante semelhantes entre si e ao obtido com a Ca^{2+} -ATPase nativa, todos situados entre 1.5-2.5 % da proteína presente no lisado total. Dado que o mutante W794A foi expresso com sucesso em células COS-1 sem que a função da proteína mutante tenha sido afetada (Chen *et al.*, 1996), é provável que a ausência de expressão do mutante W794F em levedura se deva a escolha de uma fenilalanina ao invés de uma alanina para substituir o resíduo triptofano a ser mutado. Esta possibilidade foi testada com a construção do mutante W794A, utilizando a mesma estratégia utilizada anteriormente para a construção dos demais mutantes pontuais. A expressão positiva do mutante W794A em levedura (Figura 28), somada a expressão positiva dos mutantes W→F restantes W50F, W77F, W928F, W932F e W967F (Fig. 29), confirma a importância do resíduo localizado na posição 794 para a biogênese e/ou dobramento da Ca^{2+} -ATPase recombinante na levedura.

Figura 28 - Expressão em levedura dos mutantes de fluorescência W107F, W272F, W288F, W552F, W794A, W832F, W854F e W855F.

Leveduras transformadas com o plasmídeo contendo o cDNA da 6xHis-Ca²⁺-ATPase nativa (wt) ou o cDNA dos mutantes de fluorescência W107F, W272F, W288F, W552F, W794A, W832F, W854F e W855F foram submetidas a indução por choque térmico a 37 °C por 90 min e lisadas após conversão a esferoplastos. 10 ou 20 µl de amostras do lisado total foram aplicados em uma membrana de nitrocelulose posteriormente revelada com um anticorpo monoclonal contra a Ca²⁺-ATPase e proteína A-¹²⁵I. Como controle positivo foram aplicadas quantidades conhecidas de Ca²⁺-ATPase purificada de músculo de coelho (SR). Uma amostra de lisado obtido de leveduras transformadas com um plasmídeo vazio foi aplicada em paralelo como controle negativo (sem inserto). A densitometria do "dot-blot" foi feita em um aparelho Storm (Molecular Dynamics). A proteína total presente nos lisados de levedura foi determinada pelo método de Lowry.

Tabela 6 - Nível de expressão dos mutantes de fluorescência da Ca^{2+} -ATPase em levedura.

	$\mu\text{g ATPase/mg proteína}$	SD
nativa	0.017	0.004
W107F	0.014	0.003
W272F	0.011	0.001
W288F	0.024	0.002
W552F	0.014	0.001
W832F	0.026	0.002
W854F	0.015	0.001
W855F	0.025	0.001

Figura 29 - Expressão em levedura dos mutantes de fluorescência W50F, W77F, W928F, W932F e W967F.

Leveduras transformadas com o plasmídeo contendo o cDNA da 6xHis- Ca^{2+} -ATPase nativa (wt) ou o cDNA correspondente a dois clones distintos dos mutantes de fluorescência W50F, W77F, W928F, W932F e W967F foram submetidas a indução por choque térmico a 37 °C por 90 min e lisadas após conversão a esferoplastos. 10 μl de amostras do lisado total foram aplicados em duplicata em uma membrana de nitrocelulose posteriormente revelada com um anticorpo monoclonal contra a Ca^{2+} -ATPase e proteína A- ^{125}I . Como controle positivo foram aplicadas quantidades conhecidas de Ca^{2+} -ATPase purificada de músculo de coelho (SR). Uma amostra de lisado obtido de leveduras transformadas com um plasmídeo vazio foi aplicada em paralelo como controle negativo (sem inserto).

9. CARACTERIZAÇÃO DA HEXAHIS- Ca^{2+} -ATPASE POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A estabilidade e a conformação tridimensional da 6xHis- Ca^{2+} -ATPase purificada foi avaliada em relação as características espectrais de emissão dos resíduos triptofanil (Trp) presentes em sua cadeia polipeptídica. O espectro de emissão de fluorescência da Ca^{2+} -ATPase, presente no retículo sarcoplasmático ou purificada, apresenta um máximo de emissão a 335 nm, característico de resíduos Trp (Verjovski-Almeida e Kurtenbach, 1988) . Na Figura 30, é possível observar que a 6xHis- Ca^{2+} -ATPase purificada apresenta um máximo de emissão a volta de 335 nm. A emissão de fluorescência dos resíduos Trp é altamente sensível a polaridade do solvente que os rodeia, e em geral, esses resíduos se encontram protegidos do meio aquoso na conformação nativa das proteínas (Lacowicz, 1983). O aumento da exposição ao ambiente aquoso que ocorre durante o processo de desnaturação é acompanhado pela diminuição da intensidade de fluorescência e pelo deslocamento da emissão em direção a comprimentos de onda maiores ("red shift") (Lacowicz, 1983). Um segundo espectro de emissão da mesma preparação de 6xHis- Ca^{2+} -ATPase mantida a temperatura ambiente por um período de 4 horas revelou um máximo de emissão no mesmo comprimento de onda e com a mesma intensidade obtida no primeiro espectro, indicando a ausência de desnaturação significativa da 6xHis- Ca^{2+} -ATPase purificada nesse período de tempo (Figura 30).

Figura 30 - Espectro de emissão da 6xHis-Ca²⁺-ATPase purificada.

10 µg de 6xHis-Ca²⁺-ATPase nativa purificada foram diluídas em um cubeta de quartzo contendo 1.4 ml de tampão de fluorescência (10 mM MOPS; pH 7.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1% LPC, 0.05% DOPC e 50 mM imidazol). Os espectros de emissão foram obtidos com um intervalo de 4 horas, utilizando uma luz de excitação de 280 nm. As medidas de fluorescência foram obtidas a temperatura ambiente sob agitação constante.

Está bem estabelecida na literatura que a ligação de cálcio a Ca²⁺-ATPase em vesículas do retículo sarcoplasmático ou solubilizada em excesso de detergente promove um aumento de 2-5% na fluorescência intrínseca da proteína (Dupont, 1976; Dupont e Leigh, 1978; Verjovski-Almeida e Silva, 1981). Esse aumento é reversível pela adição de um excesso de EGTA, um quelante de cálcio, ao meio de reação (Dupont, 1976; Verjovski-Almeida e Silva, 1981). A fim de estabelecer condições ideais para a obtenção de medidas espectroscópicas utilizando a 6xHis Ca²⁺-ATPase, foram feitos alguns testes preliminares utilizando preparações de vesículas do retículo sarcoplasmático extraídas de músculo. Na Figura 31 é apresentada a emissão de fluorescência a 335 nm de vesículas do retículo sarcoplasmático na presença e na ausência de cálcio. Como esperado, foi observada a existência de uma variação de 3% na intensidade de fluorescência intrínseca da enzima durante a ligação reversível de cálcio (Figura 31).

Figura 31. - Variação da fluorescência intrínseca em vesículas do retículo sarcoplasmático extraídas de músculo durante a ligação reversível de cálcio.

50µg de vesículas do retículo sarcoplasmático purificadas de músculo como descrito em (Eletr e Inesi, 1972) foram diluídas em 1.4 ml de tampão de fluorescência (50 mM MOPS pH 7.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 500µM CaCl₂ e 450 µM EGTA) em uma cubeta de quartzo sob agitação. As quantidades de cálcio e EGTA adicionadas ao tampão fornecem uma concentração final de cálcio livre igual a 50µM. A amostra foi excitada em 280 nm e a emissão de fluorescência a 335 nm foi medida ao longo do tempo. Nesse intervalo de tempo, foi feita seguidamente a adição de EGTA (1µl 383 mM) e Ca²⁺ (1 µl 383 mM) a cubeta, sob agitação. As concentrações finais de cálcio após cada adição estão indicadas na Figura.

Utilizando o detergente não-iônico C₁₂E₈, Verjovski-Almeida e Silva demonstraram que a solubilização de vesículas do retículo sarcoplasmático em baixas concentrações de C₁₂E₈ (0.05 mg/ml) promovia a inibição da atividade da enzima e abolia as mudanças Ca²⁺-dependentes na fluorescência intrínseca da Ca²⁺-ATPase (Verjovski-Almeida e Silva, 1981). O aumento da concentração de detergente (> 0.2 mg/ml) é suficiente para restaurar a atividade ATPásica e o delta de fluorescência da enzima (Verjovski-Almeida e Silva, 1981). No mesmo trabalho, foi mostrado que a fluorescência da proteína solúvel é instável na ausência de cálcio, tornando-se insensível à ligação do íon após um breve período de incubação em EGTA (Verjovski-Almeida e Silva, 1981). Recentemente foi descrito que a adição de quantidades não-solubilizantes de LPC a vesículas do retículo sarcoplasmático (0.12 mg/ml) perturba a estrutura da bicamada de um modo que conduz à progressiva

diminuição até abolir completamente as mudanças de fluorescência Ca^{2+} -dependentes da enzima, sem afetar a sua atividade (Hunter *et al.*, 1999).

A 6xHis Ca^{2+} -ATPase é solubilizada e purificada na presença de cálcio milimolar e LPC. A fim de caracterizar o efeito desse detergente sobre a fluorescência intrínseca da Ca^{2+} -ATPase em concentrações comparáveis as utilizadas durante a purificação da enzima recombinante, foram feitos alguns testes utilizando mais uma vez vesículas do retículo sarcoplasmático. A medida da variação da fluorescência durante a ligação de cálcio utilizando concentrações crescentes de LPC revelou um padrão semelhante ao obtido na presença da C_{12}E_8 (Figura 32). Baixas concentrações de LPC abolem progressivamente a mudança de fluorescência, mas esse efeito é revertido quando a concentração do detergente é aumentada (Figura 32). Esse resultado confirma que LPC é capaz de substituir o ambiente lipídico que circunda as hélices transmembranares da proteína de um modo tão eficiente quanto C_{12}E_8 .

Figura 32 - Sensibilidade da fluorescência intrínseca da Ca^{2+} -ATPase em diferentes concentrações de detergente. Medidas da variação da fluorescência intrínseca em vesículas do retículo sarcoplasmático durante a ligação de cálcio foram obtidas como descrito na Figura 31, na presença de concentrações crescentes de C_{12}E_8 (▲) ou LPC (●) .

Foram feitos alguns experimentos na tentativa de medir variações na emissão de fluorescência intrínseca na 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada durante a ligação de cálcio. Em todos os experimentos realizados a fluorescência da proteína purificada se mostrou insensível a ligação do íon (Figura 33).

Figura 33 - Insensibilidade da fluorescência intrínseca da 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada a ligação de cálcio.

As condições experimentais utilizadas foram idênticas as descritas na legenda da Figura 31.

A ausência de mudanças de fluorescência na enzima recombinante indica que o microambiente que circunda os resíduos triptofanil participantes em mudanças conformacionais associados à ligação do íon esteja modificado. Por outro lado, o comportamento cinético da 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada é muito comparável a enzima nativa, o que demonstra que o acoplamento entre os domínios funcionais e o arranjo global da proteína está mantido (Figuras 24 e 25). Embora os dados da literatura indiquem que a substituição dos lipídios presentes nas vesículas do retículo sarcoplasmático pela diluição de vesículas em excesso de detergente (Verjovski-Almeida e Silva, 1981), ou pela adição de detergente a enzima parcialmente delipidada (Shivanna e Rowe, 1997), não afete a sensibilidade da fluorescência intrínseca da enzima à ligação de cálcio, a delipidação extensiva durante as etapas de purificação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase pode estar abolindo a mudança de fluorescência induzida por cálcio da ATPase recombinante. Na ausência de estudos sistemáticos sobre o efeito de uma delipidação extensiva sobre a atividade ou fluorescência intrínseca da Ca^{2+} -ATPase, os dados obtidos após a reconstituição da enzima em bicamadas de composição definida fornecem as melhores pistas para explicar a ausência de sensibilidade na fluorescência da 6xHis Ca^{2+} -ATPase. Existem evidências experimentais de que a alteração da espessura da bicamada lipídica tenha um efeito direto no empacotamento das hélices transmembranares, que por sua vez afeta a atividade da enzima

(Lee, 1998). A reconstituição da enzima em bicamadas com espessura definida revelou que a atividade varia pouco quando são utilizados cadeias entre C16-C20, mas está reduzida com cadeias mais curtas que C16 ou mais longas que C20 (Gould *et al.*, 1987; Lee, 1998). Também foi demonstrado que a Ca^{2+} -ATPase reconstituída em bicamadas de fosfolipídios zwitteriônicos (PC/PE) tem atividade comparável a da enzima presente nas vesículas do retículo, mas que a utilização exclusiva de lipídios ácidos (PE e PA) conduz a diminuição da atividade ATPásica (Starling *et al.*, 1996; Dalton *et al.*, 1998). Finalmente, existem indicações de que a interação específica de certos lipídios esteja envolvida na modulação da atividade da Ca^{2+} -ATPase ; a ligação de algumas moléculas de fosfatidilinositol 4-fosfato dobra a atividade da enzima (Varsanyi *et al.*, 1983; Starling *et al.*, 1995).

Assim, as principais hipóteses colocadas para justificar a ausência de mudanças de fluorescência cálcio-dependentes na 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada são:

- i) comprimento inadequado da cadeia alifática do lipídio adicionado na purificação [di(C18:1)PC]. Embora esse comprimento de cadeia seja suficiente para manter a atividade da enzima, resíduos triptofanil relevantes para as mudanças de fluorescência e situados nas hélices transmembranares podem estar excessivamente expostos ao meio aquoso, ou "enterrados" em um ambiente apolar na 6xHis Ca^{2+} -ATPase . Em ambos os casos não seriam observadas mudanças de fluorescência associadas à ligação de cálcio;
- ii) necessidade de lipídios minoritários da membrana do retículo sarcoplasmático, que embora não sendo essenciais para a atividade da enzima, seriam indispensáveis para criar microambientes necessários à observação de mudanças na fluorescência intrínseca. Incluem-se nessa categoria PE, PI, PS, esfingomielina cardiolipina e colesterol (Pikula *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1994).

Até o momento, algumas dessas hipótese foram testadas sem fornecer resultados positivos. A adição de di(C16:1)PC e di(C20:1) a enzima purificada em di(C18:1)PC não foi suficiente para restabelecer a sensibilidade da fluorescência á ligação de cálcio. Tampouco a utilização de uma mistura DOPC/DOPE durante a purificação exerceu algum efeito sobre a fluorescência da 6xHis Ca^{2+} -ATPase .

10. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS MUTANTES W794A E W552F

Em paralelo com os estudos espectroscópicos da Ca^{2+} -ATPase recombinante, foi iniciada a medida de parâmetros cinéticos de alguns mutantes de fluorescência construídos utilizando a mesma metodologia empregada na caracterização da 6xHis Ca^{2+} -ATPase nativa.

10.1. MUTANTE W794A

O resíduo W794 está localizado na hélice transmembranar 6 e é o único entre os 13 resíduos triptofanil da Ca^{2+} -ATPase que está situado na vizinhança de resíduos que participam diretamente na formação dos sítios de alta afinidade para cálcio (N796, T799 e D800) (MacLennan *et al.*, 1997; Toyoshima *et al.*, 2000). Como dito anteriormente, o mutante W794F não foi expresso na levedura, indicando que a substituição W→F na posição 794 promove alterações drásticas no dobramento e/ou inserção na membrana da proteína mutante. Por outro lado, a substituição W→A permite que o mutante seja expresso em níveis comparáveis a Ca^{2+} -ATPase nativa (Fig. 28). A figura 34 mostra o resultado da ativação do mutante W794 da Ca^{2+} -ATPase por cálcio. A atividade específica da enzima mutante é de 1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}.\text{min}$, comparável a atividade da 6xHis Ca^{2+} -ATPase nativa ($\sim 2 \mu\text{mol}/\text{mg}.\text{min}$ – Figura 24). A afinidade ($K_{0.5} = 0.25 \mu\text{M}$) e a cooperatividade para cálcio na ativação da enzima também foi mantida ($n_H = 1.76$) (Figura 34 – detalhe), confirmando que a introdução da mutação teve um efeito perturbador mínimo sobre a estrutura e/ou função da Ca^{2+} -ATPase nativa, e que é possível utilizar esse sistema para a produção de mutantes funcionais da enzima.

Figura 34. Ativação por cálcio da W794A Ca^{2+} -ATPase .As condições experimentais utilizadas foram idênticas as descritas na legenda da Figura 31.

10.2. MUTANTE W552F

O resíduo W552 é o único resíduo triptofanil que se localiza em uma região claramente hidrofílica, no domínio citoplasmático maior da enzima (MacLennan *et al.*, 1997; Toyoshima *et al.*, 2000). Nesse mutante, a atividade ATPásica está reduzida a 0.3 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$, apenas 15% da atividade medida na 6xHis Ca^{2+} -ATPase nativa, e a cooperatividade para cálcio foi totalmente abolida ($n_H = 1.05$) (Figura 35). Curiosamente, a afinidade para cálcio, medida pela ativação da enzima pelo íon, não foi afetada ($K_{0.5} = 0.27 \mu\text{M}$) (Figura 35 - detalhe).

Figura 35 - Ativação por cálcio da W552F Ca^{2+} -ATPase.

As condições experimentais utilizadas foram idênticas as descritas na legenda da Figura 31.

Este resultado se tornou particularmente interessante após a recente publicação da estrutura cristalina da Ca^{2+} -ATPase com 2.6 Å de resolução (Toyoshima *et al.*, 2000) e da disponibilidade pública do arquivo PDB contendo as coordenadas atômicas da enzima (<http://www.rcsb.org/pdb/> - 1eul.pdb). Observando a imagem tri-dimensional do modelo atômico da Ca^{2+} -ATPase, é possível observar que o resíduo W552 está localizado em uma hélice externa do domínio N ("Nucleotide binding domain"), com a cadeia lateral voltada para o interior do domínio, na vizinhança de um conjunto de fitas β anti-paralelas, que na sua face oposta fazem contato com o nucleotídeo (Toyoshima *et al.*, 2000). Na imagem apresentada na Figura 36, o nucleotídeo estaria no plano atrás do papel na vizinhança das

fitas β (amarelo-ocre).

Figura 36 – Papel do resíduo W552 na estabilização do domínio de ligação de nucleotídeo. Detalhe do modelo molecular da Ca^{2+} -ATPase mostrando o resíduo W552 (azul claro) e os resíduos situados no plano de fitas β com os quais estabelece contatos hidrofóbicos (verde). Na região denominada "hinge" que conecta o domínio N (acima) ao domínio P (abaixo), estão marcados os domínios conservados DKTGT (vermelho) e DPPR (azul escuro). Regiões com estrutura secundária definida estão pintadas de amarelo-ocre (fitas β) ou rosa (hélices α). Os contatos existentes entre os resíduos foram determinados utilizando o programa STING (Da Silva *et al.*, 2000).

Quatro resíduos localizados em três das fitas β (K365, F367, L559 e V596) possuem as cadeias laterais voltadas para o lado externo, a uma distância apropriada (2-4 Å) para o estabelecimento de interações hidrofóbicas com o anél indólico do resíduo W552 (Figura 36). Um quinto resíduo, M366, estabelece uma interação adicional com o resíduo W552 através

dos respectivos carbono α . Assim como o resíduo W552, os resíduos K365, F367, L559 e V596 estão mantidos nas demais Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco(endo)-plasmático, embora existam em alguns casos substituições conservativas K365→R365 ou V596→L596. Essa conservação é geralmente mantida nas demais ATPases do tipo P. Esses dados permitem postular que as interações hidrofóbicas entre W552 e os resíduos presentes nas fitas beta sejam importantes para manter as três fitas β no lugar e estabilizar o plano onde se encaixa o nucleotídeo (Figura 36). Duas das fitas β (a que contém os resíduos K365, F367, e a que contém o resíduo V596) estão conectadas a duas regiões que formam um "Hinge domain" ligando o domínio N ao domínio P ("Phosphorylation domain") (Figura 36). Com a determinação da estrutura cristalina, sabe-se agora que o "hinge" é constituído pelos motivos altamente conservados 352-KTGT-357 (imediatamente a seguir do resíduo catalítico D351) e 601-DPPR-604 (Figura 36). O efeito da mutação W552F pode ser explicado pelo fato de que a presença da fenilalanina em lugar do triptofano diminui o tamanho da cadeia lateral, eliminando as interações hidrofóbicas com as cadeias laterais dos 4 resíduos que ajudavam a manter as fitas β em posição. É predito que durante o ciclo catalítico o "hinge" se feche de modo a aproximar o domínio N do domínio P e permitir a fosforilação do resíduo D351, voltando a se abrir no final do ciclo (MacLennan e Green, 2000). O deslocamento dessas fitas no mutante W552F deve alterar a flexibilidade do "hinge", impedindo a sua correta movimentação e afetando a hidrólise do ATP, que no mutante está reduzida para 15% da velocidade observada para a 6xHis Ca^{2+} -ATPase nativa.

Embora a afinidade da ligação de cálcio no mutante W552F ($K_{0.5} = 0.27 \mu\text{M}$) seja comparável à da proteína nativa ($K_{0.5} = 0.16 \mu\text{M}$), a cooperatividade da ligação foi totalmente abolida ($n_H = 1,05$) (Figura 35). Como o resíduo mutado se encontra a mais de 50 Å de distância dos sítios de cálcio, a redução de cooperatividade indica que o efeito da mutação W552F sobre o sítio catalítico esteja sendo propagado aos sítios de ligação de cálcio. O mecanismo mais simples para explicar esse dado seria imaginar que a ligação do primeiro íon cálcio transmita sinais aos domínios citoplasmáticos, provavelmente através da hélice M5 e do "hinge". Na proteína nativa ocorreria então uma mudança de conformação nos domínios citoplasmáticos que retornariam um sinal à região de membrana promovendo o rearranjo das hélices transmembrana, aumentando a afinidade do segundo sítio de cálcio. A desestabilização do domínio de ligação de nucleotídeo e o seu efeito sobre a movimentação correta do "hinge" proposta para o mutante W552F estariam comprometendo o retorno do sinal inicial resultante da ligação do primeiro cálcio. Já foi demonstrado, utilizando mutantes

pontuais em que um dos sítios de ligação de cálcio foi destruído, que a ligação de 2 íons cálcio é absolutamente indispensável para ativar a hidrólise de ATP (Skerjanc *et al.*, 1993). Assim, é provável que a mutação W552F afete o mecanismo da cooperatividade sem afetar a ligação do segundo íon cálcio.

A importância da manutenção do posicionamento correto das fitas β conectadas ao "hinge" é reforçada pela publicação recente de um trabalho demonstrando que a modificação por N-etilmaleimida do resíduo C364, situado em uma das fitas β mencionadas acima, inibe i) a transição do intermediário fosforilado da forma ADP-sensível para a forma ADP-insensível, e; ii) a fosforilação por Pi na ausência de cálcio (Suzuki e Kanazawa, 1999). Pretendemos explorar o efeito da mutação W552F sobre o mecanismo catalítico da Ca^{2+} -ATPase comparando os intermediários acumulados durante o ciclo da enzima no mutante e na proteína nativa.

11. EXPRESSÃO DE MUTANTES DO SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO DA Ca^{2+} -ATPASE.

No início do trabalho, a fim de demonstrar o estado funcional da Ca^{2+} -ATPase produzida em levedura utilizando um promotor de choque térmico, foram obtidas medidas de fosforilação da Ca^{2+} -ATPase solubilizada e imunoprecipitada a partir do extrato total de células induzidas. A otimização dessa condição experimental para a Ca^{2+} -ATPase nativa, sugeriu a utilização desse método para a caracterização de aspectos não totalmente explorados do mecanismo catalítico da enzima utilizando mutantes do sítio de fosforilação produzidos em nosso laboratório utilizando mutagênese sítio-dirigida. No ciclo catalítico normal da enzima nativa, o resíduo D351 é fosforilado por ATP dando origem a um aspartil-fosfato. Já foi demonstrado que mutações nesse resíduo abolem o transporte de cálcio e a fosforilação por ATP (Maruyama e MacLennan, 1988). Este efeito é observado mesmo quando se substitui D351 por E351, que diferem apenas pela presença de um grupo metileno adicional (Maruyama e MacLennan, 1988). Não está totalmente claro se este efeito deve-se a um impedimento estérico que dificulte a transferência do fosfato do ATP para E351, ou se a presença do grupo metileno adicional exponha o sítio de fosforilação a um ambiente mais hidrofílico que dificulte a fosforilação do grupo carboxilo. Essas hipóteses seriam testadas pela medida da reatividade de vários mutantes D351 ao fosfato inorgânico (P_i). A fosforilação da Ca^{2+} -ATPase por P_i ocorre na ausência de cálcio, no ciclo inverso de funcionamento da enzima (Masuda e de Meis, 1973), e é facilitada pela presença de solventes orgânicos que aumentem a hidrofobicidade do meio (de Meis, 1981).

Fragmentos de 3 Kb contendo a sequência codificante para os mutantes do sítio de fosforilação da SR Ca^{2+} -ATPase foram transferidos para o vetor de expressão em levedura regulado por choque térmico utilizado com sucesso para a expressão da proteína nativa. Leveduras transformadas com os vetores pFM1(D351E), pFM2 (D351S), pFM3 (D351T) e pFM4 (D351A) foram crescidas em meio seletivo, induzidas por choque térmico em tempos diferentes (30, 60 e 90 minutos) e amostras do extrato total foram analisadas por "dot-blot" revelado com um anticorpo monoclonal contra SR Ca^{2+} -ATPase (Figura 37). Apenas o mutante D351A apresentou expressão positiva na levedura, em níveis comparáveis aos observados para a proteína nativa. Não foi detectada a presença dos demais mutantes no nível de sensibilidade de sistema.

Figura 37 - Expressão temporal de mutantes do sítio de fosforilação da SR Ca²⁺-ATPase em levedura.

Leveduras transformadas com o plasmídeo contendo o cDNA da SR Ca²⁺ATPase nativa (**wt**) ou dos mutantes D351 (**D→E**, **D→S**, **D→T** e **D→A**) foram submetidas a tempos crescentes de indução por choque térmico e lisadas nos tempos indicados. 5µl de amostras do lisado total foram aplicados em cada “dot”, em duplicado, e reveladas com o anticorpo monoclonal A52 e um anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Como controles positivo e negativo foram aplicadas amostras de SR Ca²⁺ATPase purificada de músculo (**SR**) e um extrato de leveduras transformadas com um plasmídeo vazio (**sem inserto**), respectivamente.

O próximo passo foi confirmar a presença de mRNA codificante para a proteína mutante nas leveduras transformadas com os 4 vetores contendo mutações distintas no sítio de fosforilação da enzima. Amostras de RNA total isolado a partir de leveduras transformadas com os vetores contendo a sequência codificante para a proteína mutante e induzidas por choque térmico durante 90 min. foram analisadas por "Northern blot" (Figura 38). Utilizou-se como sonda específica um fragmento BamHI de 1 Kb proveniente da Ca²⁺-ATPase de coelho marcado com [³²P] α-dCTP (Figura 38 A). Como controles foram utilizadas amostras de RNA extraído de leveduras transformadas com o vetor contendo a proteína nativa (wt) ou com o vetor vazio (sem inserto). Amostras do mesmo RNA foram hibridizadas em paralelo com uma sonda de actina para a obtenção de um controle interno da quantidade de RNA aplicada em cada canaleta (Figura 38 B) Observaram-se bandas bem definidas e de intensidade similar, com aproximadamente 4.3 Kb, resultantes da hibridação da sonda com o mRNA codificante para a SR Ca²⁺-ATPase nativa e para o mutante D351A (Figura 38 A, wt e D→A). Nos demais mutantes, precisamente nos que não se detectou a expressão da proteína no "immunoblot", observam-se bandas com o tamanho correto porém com intensidade menor em comparação as observadas para a proteína nativa e o mutante D351A (Figura 38 A, D→E, D→S e D→T). Imediatamente abaixo da banda correspondente ao mRNA codificante para a SR Ca²⁺-ATPase observa-se em todas as canaletas uma segunda

banda, mais evidente na proteína nativa e no mutante D351A (Figura 38 A). Esta segunda banda possui o tamanho aproximado da região codificante do mRNA da SR Ca²⁺-ATPase e corresponde provavelmente a uma fração do mRNA cuja extremidade 3' não-codificante sofreu deadenilação e se encontra a caminho da degradação.

Figura 38 - Abundância do mRNA codificante para os mutantes do sítio de fosforilação.

Amostras de RNA total extraído de leveduras transformadas com o plasmídeo contendo o cDNA dos mutantes do D351 (**D→E**, **D→S**, **D→T** e **D→A**) e induzidas 90 min. a 37°C foram analisadas por "Northern blot" . Como controle negativo foi utilizado RNA total extraído de leveduras transformadas com a cópia nativa da SR Ca²⁺-ATPase (**wt**) ou com um vetor sem inserto (**sem inserto**). Foram aplicados 10-20 µg de RNA por canaleta. As membranas foram hibridizadas com sondas resultantes da marcação de um fragmento de 1 Kb de SR Ca²⁺-ATPase (**A**), ou de um fragmento de 0.6 Kb de actina (**B**).

A seguir, foi analisado o efeito do tempo de indução por choque térmico sobre a cinética de acumulação de mRNA codificante para a SR Ca^{2+} -ATPase. A fim de facilitar o desenho experimental optou-se por caracterizar apenas leveduras expressando o mutante D351E, justamente por ser o mutante de maior interesse para o projeto. Como comparação foi utilizada a cepa expressando a Ca^{2+} -ATPase nativa. O RNA total de leveduras expressando a SR Ca^{2+} -ATPase nativa ou o mutante D351E foi extraído após 0, 10, 20, 30, 60 e 90 minutos de indução por choque térmico e analisado por “Northern blot” (Figura 39). Verifica-se que a abundância do mRNA codificante para a SR Ca^{2+} -ATPase nativa aumenta com o tempo de indução por choque térmico, atingindo um máximo de acumulação aos 90 minutos de indução (Figura 39 – **WT**, Ca^{2+} -ATPase). O mutante D351E, por sua vez, acumula mRNA codificante para a proteína recombinante nos 10 minutos iniciais. Após este tempo, a abundância do mRNA entra em declínio atingindo um mínimo entre 30 e 60 minutos (Figura 39 – **D351E**, Ca^{2+} -ATPase). Este efeito é específico para o mRNA codificante para a proteína mutante; a hibridação dos mesmos filtros com sondas específicas para a actina, H^{+} -ATPase de membrana plasmática e GDPase de Golgi de levedura revelaram que os níveis de mRNA codificante para essas proteínas se mantêm estável ou aumentam nas condições experimentais empregadas (Figura 39 – **WT**, **D351E**, *actin*, H^{+} -ATPase, GDPase). Não foi possível detectar a expressão em levedura de uma quimera da Ca^{2+} -ATPase em que a extremidade N-terminal foi substituída pela região correspondente da H^{+} -ATPase de levedura (Figura 13 - **HΔCa**). A análise por “Northern blot” da acumulação do mRNA codificante para a quimera de substituição revelou um padrão de acumulação transiente semelhante ao observado para o mutante D351E (Figura 40 - **HΔCa**). Por outro lado, a quimera de adição $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, expressa sob forma funcional na levedura (Figura 13 – **H/Ca**), apresentou um padrão de acumulação de mRNA durante a indução semelhante ao observado para a Ca^{2+} -ATPase nativa (Figura 40 - **H/Ca**).

Figura 39 - Acumulação transiente do D351E Ca²⁺ATPase mRNA durante indução por choque térmico.

O RNA total de leveduras transformadas com o plasmídeo contendo o cDNA da SR Ca²⁺ATPase nativa (**WT**) ou do mutante D351E (**D351E**) foi extraído após 0, 10, 20, 60 e 90 minutos de crescimento a 37°C e analisado por "Northern blot". 10-20 µg de RNA total foram aplicados em cada "lane", em duplicata. As membranas de "blotting" resultantes foram reveladas em paralelo com sondas radioativas resultantes da marcação de um fragmento de 1 Kb da SR Ca (Ca²⁺-ATPase), ou de um fragmento de 0.6 Kb de actina (**actina**). As mesmas membranas foram lavadas e reveladas com sondas radioativas resultantes da marcação de um fragmento de 0.8 Kb da H⁺-ATPase de membrana plasmática (**H⁺-ATPase**), ou de um fragmento de 0.9 Kb da GDPase de Golgi (**GDPase**).

Figura 40 - Acumulação transiente do mRNA da quimera $H^+ \Delta Ca^{2+}$ -ATPase

O RNA total de leveduras transformadas com plasmídeos contendo o cDNA codificante para quimeras de adição (**H/Ca**) ou substituição (**H Δ Ca**) da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de coelho com a H^+ -ATPase da membrana plasmática de levedura foi extraído após 0, 10, 20, 60 e 90 minutos de crescimento a 37°C e analisado por "Northern blot". 10-20 μ g de RNA total foram aplicados em cada "lane", em duplicata. As membranas de "blotting" resultantes foram reveladas em paralelo com sondas radioativas resultantes da marcação de um fragmento de 1 Kb da SR Ca^{2+} -ATPase (**Ca^{2+} ATPase**), ou de um fragmento de 0.6 Kb de actina (**actina**).

Uma possibilidade que explicaria a redução dos níveis de mRNA codificante para o mutante D351E seria a ocorrência de recombinação ou eliminação do plasmídeo contendo a sequência codificante para proteína mutante. O crescimento semelhante em meio mínimo de leveduras transformadas com os vetores codificantes para a Ca^{2+} -ATPase nativa ou para o mutante D351E a 37° C, sugere que a estabilidade da marca de seleção presente no vetor de expressão, bem como o número de cópias do plasmídeo não sejam afetados pela expressão da proteína mutante (Figura 41).

Figura 41 - Taxa de crescimento a 37°C de leveduras expressando Ca²⁺-ATPase nativa ou o mutante D351E

Leveduras transformadas com o plasmídeo contendo o cDNA para a SR Ca²⁺-ATPase nativa (**wt**), para o mutante D351E (**D→E**), ou com um plasmídeo vazio (**sem inserto**) foram crescidas em meio mínimo a 23 °C durante a noite e transferidas para 37°C no tempo inicial. O crescimento das células foi monitorado pela leitura da DO₆₀₀ nos tempos assinalados

A possibilidade da ocorrência de rearranjo no plasmídeo mutante foi testada pela extração do plasmídeo contendo o cDNA do mutante D351E de leveduras induzidas 30 minutos a 37°C, a sua amplificação em bactéria, digestão com enzimas de restrição e a comparação dos fragmentos gerados pela digestão do mesmo vetor antes do choque térmico. Os tamanhos dos fragmentos gerados pela digestão com HindIII e SacI antes e depois do choque térmico correspondem aos tamanhos esperados para a região codificante (3 Kb) e o restante do vetor linearizado (7,3 Kb) (Figura 42).

Figura 42 - Efeito da indução por choque térmico sobre o perfil de restrição do vetor contendo a sequência codificante para o mutante D351E da SR Ca²⁺-ATPase.

O plasmídeo contendo a sequência codificante para o mutante D351E da SR Ca²⁺-ATPase foi extraído de leveduras transformantes crescidas a 23°C (**A**) ou submetidas a 30 minutos de choque térmico (**B**). Após amplificação em bactéria, o pDNA foi digerido com as enzimas de restrição HindIII e SacI, separado em gel 1.2% agarose e corado com brometo de etídeo. 0.5 µg de fragmentos λ -BstII foram aplicados como padrão de peso molecular.

A não-deteção da proteína recombinante nos mutantes D351E, D351S e D351T em "imunoblots" revelados com um anticorpo monoclonal está provavelmente associada a degradação extensiva dessas proteínas tão logo são sintetizadas. Sendo a mutação do D351 o elemento responsável pela instabilidade da proteína recombinante nesses mutantes, existe a possibilidade de que a degradação da proteína ocorra ainda sobre a cadeia polipeptídica nascente, assim que se inicie a inserção co-traducional da região mutada na membrana do retículo endoplasmático da levedura. Neste caso, a degradação da proteína poderia ocorrer antes que o epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal utilizado fosse sintetizado (o anticorpo monoclonal utilizado reconhece um epítipo situado entre os resíduos 657 e 672). Para testar esta hipótese, amostras do extrato total de leveduras expressando Ca²⁺-ATPase nativa ou o mutante D351E foram analisadas por "Western blot" utilizando um anticorpo policlonal contra SR Ca²⁺-ATPase produzido em camundongo (Figura 43). A identificação de bandas adicionais resultantes da degradação da proteína mutante é dificultada pela existência de reação cruzada do policlonal utilizado com diversas proteínas de levedura presentes em grande quantidade (Figura 43). Além disso, a observação dos produtos de degradação é restrita aos 5-20 minutos de indução, após o que o nível de mRNA entra em

declínio. Assim, nas condições experimentais utilizadas, não foi possível observar fragmentos resultantes da degradação da SR Ca²⁺-ATPase mutante que reagissem com o anticorpo policlonal.

Figura 43 - Expressão temporal do mutante D351E em “Western blot” revelado com anticorpo policlonal contra a SR Ca²⁺-ATPase

Leveduras transformadas com o plasmídeo contendo o cDNA da SR Ca²⁺ATPase nativa (**wt**) ou do mutante D351E (**D→E**) foram submetidas a tempos crescentes de indução por choque térmico e lisadas nos tempos indicados. 20µl dos extratos totais resultantes foram aplicados em cada canaleta e analisados por “Western blot” revelado com um anticorpo policlonal contra a SR Ca²⁺ATPase purificada de músculo e um anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Como controles positivo e negativo foram aplicadas amostras de SR Ca²⁺-ATPase purificada de músculo (**SR**) e um extrato de leveduras transformadas com um plasmídeo vazio (**sem inserto**), respectivamente.

Foi testada a seguir a expressão do mutante D351E em uma cepa de levedura deficiente em proteases (#334: pep4-3, prb-112, ura3-52, leu2-3, reg-501, gal1). Também nesta cepa a expressão da proteína mutante não foi detectada por "dot-blot" (Figura 44). Este resultado sugere que a atividade proteolítica associada as enzimas proteinase A (PEP4) e proteinase B (PRB1) da levedura não seja essencial para a rápida degradação da proteína mutante.

Figura 44 - Expressão temporal do mutante D351E da SR Ca²⁺-ATPase em uma cepa deficiente em proteases.

Leveduras deficientes em proteases transformadas com o plasmídeo contendo o cDNA da SR Ca²⁺ATPase nativa (**wt**) ou do mutante D351E (**D→E**) foram submetidas a tempos crescentes de indução por choque térmico e lisadas nos tempos indicados. 5µl de amostras do lisado total foram aplicados em cada "dot", em duplicado, e reveladas com o anticorpo monoclonal A52 e um anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Como contrôles positivo e negativo foram aplicadas amostras de SR Ca²⁺ATPase purificada de músculo (**SR**) e um extrato de leveduras transformadas com um plasmídeo vazio (**sem inserto**), respectivamente.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

EXPRESSÃO EM LEVEDURA, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MUTANTES PONTUAIS DA Ca^{2+} -ATPASE.

Este estudo descreve um novo método para a produção heteróloga da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de coelho. Utilizando leveduras transformadas com um vetor de expressão regulado por choque térmico, foi possível a obtenção de vários miligramas de Ca^{2+} -ATPase recombinante partindo de alguns litros de cultura. A Ca^{2+} -ATPase heteróloga produzida segundo o método descrito é expressa sob forma funcional, sendo capaz de formar um intermediário fosforilado na presença de ATP e cálcio (ou Pi , na ausência do íon) com um "turn over" comparável ao da enzima purificada de músculo. A semelhança de outros sistemas de expressão dessa enzima em levedura (Centeno *et al.*, 1994; Degand *et al.*, 1999), células de mamífero (Maruyama e MacLennan, 1988) ou de inseto (Skerjanc *et al.*, 1993), o nível de expressão da Ca^{2+} -ATPase induzida por choque térmico nos lisados totais é baixo, atingindo apenas 0.1-0.3 % da proteína presente no lisados total (uma revisão sobre os vários sistemas utilizados para a expressão heteróloga de SR Ca^{2+} -ATPase foi publicado na revista Bioscience Reports e pode ser consultada na seção *Anexos*).

A fim de implementar uma estratégia de purificação que permitisse a obtenção de frações enriquecidas em Ca^{2+} -ATPase com o grau de pureza necessário à obtenção de medidas espectroscópicas, foram construídas quimeras amino-terminais da Ca^{2+} -ATPase utilizando técnicas descritas na literatura para outras proteínas. Observou-se que tanto a adição de uma sequência de 6 histidinas quanto da sequência amino-terminal da H^{+} -ATPase de membrana plasmática à extremidade amino-terminal da Ca^{2+} -ATPase aumentaram em 3 vezes o nível de expressão da Ca^{2+} -ATPase recombinante. A Ca^{2+} -ATPase quimérica atinge um grau de enriquecimento de até 7% em frações de membrana recuperadas através do fracionamento por centrifugação diferencial do lisado celular. Esse valor é comparável aos obtidos em frações microsomais de células COS-1, onde a SR Ca^{2+} -ATPase representa tipicamente 5% da proteína total (Maruyama e MacLennan, 1988). Esse resultado sugere que a estratégia de introdução de modificações na região amino-terminal possa ser útil para aumentar os níveis de expressão de outras ATPases do tipo P, ou mesmo de outras proteínas integrais de membrana expressas em levedura (Villalba *et al.*, 1992; Kerchoue d'Exaerde *et al.*, 1995).

O estudo da localização sub-celular da Ca^{2+} -ATPase nativa revelou que a maior parte

da proteína se acumula em uma fração pesada do Retículo Endoplasmático (RE) da levedura. Foi observado que ambas as construções quiméricas se acumulam predominantemente em uma fração leve do RE associada na literatura ao RE liso (Sanderson e Meyer, 1991), sugerindo uma maior mobilidade ao longo da via secretora da célula. O fato de sequências não-relacionadas provocarem um efeito de re-direcionamento sub-celular semelhante sugere que em ambos os casos as sequências adicionadas estejam interferindo com sinais de retenção da Ca^{2+} -ATPase no RE, permitindo parcialmente a sua progressão ao longo da via secretora da levedura. Ambas as quimeras da Ca^{2+} -ATPase puderam ser quantitativamente recuperadas em frações de membrana após fracionamento por centrifugação diferencial do lisado total, o que indica a correta inserção dessas proteínas na bicamada lipídica.

A introdução de um "tag" de 6 histidinas na Ca^{2+} -ATPase e o aumento da eficiência da solubilização das membranas de levedura com LPC permitiu a purificação da ATPase recombinante utilizando cromatografia de afinidade por quelação metálica (Hochuli *et al.*, 1988; Crowe *et al.*, 1994). Através dessa estratégia, foi possível obter frações enriquecidas em até 75% de Ca^{2+} -ATPase recombinante, algo ainda não descrito na literatura, e que representa um aumento de 15 vezes no grau de pureza em relação as frações de membrana iniciais (5%). A 6xHis Ca^{2+} -ATPase solubilizada em LPC e purificada em coluna de níquel se mantém estável desde que o lipídeo DOPC seja introduzido juntamente com o detergente durante as etapas de lavagem e eluição. Nessas condições, a enzima purificada possui elevada atividade cálcio-dependente (1.5-2.0 $\mu\text{mol/mg}$ proteína.min) durante vários minutos de reação. Este resultado indica que conseguimos condições de estabilização bastante satisfatórias dada a conhecida instabilidade da enzima solubilizada exclusivamente com detergente na ausência de cálcio (Dean e Tanford, 1978; Verjovski-Almeida e Silva, 1981). A titulação da atividade ATPásica em função do cálcio livre demonstrou que a 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada possui alta afinidade para cálcio ($K_{0.5} = 0.16 \mu\text{M}$) e mantém uma forte cooperatividade durante a ativação por cálcio ($n_H = 2.0$). A estabilidade da enzima durante tempos de reação longos permite a caracterização cinética imediata de mutantes de interesse na enzima solúvel, evitando uma etapa adicional de reconstituição em lipossomos (Levy *et al.*, 1992; Starling *et al.*, 1993; Shivanna e Rowe, 1997). Para validar essa estratégia foi feita a caracterização cinética da ativação por cálcio em dois mutantes pontuais da Ca^{2+} -ATPase com substituições em resíduos triptofanil, W794A e W552F, parte do conjunto de 13 mutantes gerados no trabalho. Enquanto o mutante W794A apresenta um comportamento ($V_{\text{máx}}$, K_m e n_H) semelhante ao da proteína nativa, o mutante W552F possui uma redução

significativa da atividade ($0.3 \mu\text{mol/mg proteína} \cdot \text{min}$) e a ausência total de cooperatividade na ativação por cálcio ($n_H = 1.05$), com manutenção da afinidade para cálcio ($K_{0.5}=0.27\mu\text{M}$). A observação do modelo estrutural da Ca^{2+} -ATPase com resolução atômica permitiu identificar o resíduo W552 em uma região de α -hélice do domínio N, formando interações do tipo hidrofóbicas com 5 resíduos conservados localizados em 3 fitas β anti-paralelas que na sua face oposta fazem contato com o sítio de ligação do nucleotídeo. Duas das fitas β estão conectadas com o "hinge domain", a região que conecta o domínio de ligação de nucleotídeo N ao domínio de fosforilação P e que durante o ciclo catalítico se movimenta para permitir a aproximação dos domínios e a formação do aspartil fosfato. É provável que a mutação W552F esteja modificando o posicionamento das fitas β e a movimentação do "hinge", contribuindo para a redução observada na atividade da enzima. Adicionalmente, a desestruturação no domínio N causada pela mutação pode estar afetando a afinidade da ligação de ATP. Contudo, o dado mais curioso é o efeito drástico causado pela mutação W552F sobre a cooperatividade da ativação por cálcio, sem um efeito observável sobre a afinidade para o íon. Como o resíduo mutado encontra-se a mais de $50 \text{ \AA}$ de distância dos sítios de cálcio, este resultado oferece uma oportunidade interessante para estudar o papel desempenhado pelas interações de longa distância entre os domínios citoplasmáticos e as regiões transmembrana no mecanismo de cooperatividade da enzima (Chen *et al.*, 1996). A caracterização dos intermediários do ciclo catalítico no mutante W552F e na Ca^{2+} -ATPase nativa deverá fornecer informações relevantes para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na formação da cooperatividade da ligação de cálcio.

Uma caracterização espectroscópica preliminar indicou que embora a 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada possua elevada atividade e apresente um espectro de emissão de resíduos Trp típico, as condições utilizadas na purificação ainda não permitem a observação de mudanças típicas na intensidade da emissão de fluorescência associadas à ligação reversível de cálcio. A manutenção do delta de fluorescência em vesículas do retículo sarcoplasmático solubilizadas em excesso de LPC confirma que esse detergente não prejudica a sensibilidade da fluorescência da Ca^{2+} -ATPase à ligação de cálcio. As variações de fluorescência intrínseca da Ca^{2+} -ATPase têm sua origem na modificação da polaridade do ambiente ao redor de resíduos Trp como consequência de mudanças conformacionais que ocorrem na proteína (Verjovski-Almeida e Kurtenbach, 1988). A causa mais provável para explicar a insensibilidade da fluorescência intrínseca da 6xHis Ca^{2+} -ATPase é a de que os resíduos Trp essenciais para a observação do delta de fluorescência não estejam sofrendo as mesmas

modificações de ambiente que ocorrem na bicamada do retículo sarcoplasmático (Dupont, 1976) ou mesmo na enzima solubilizada a partir de vesículas do RE (Verjovski-Almeida e Silva, 1981). Assim, a utilização de lipídios com o comprimento da cadeia alifática excessivamente longa poderia justificar a manutenção da polaridade ao redor de Trp que se deslocam durante a ligação de cálcio. Por outro lado, a utilização de lipídios excessivamente curtos poderiam estar causando a inclinação das hélices transmembranares e uma maior exposição de resíduos Trp ao meio aquoso (Lee, 1998). A adição de fosfolipídios com comprimentos de cadeia na faixa ideal para sustentar alta atividade ATPásica em vesículas reconstituídas (C16-C20) a 6xHis Ca^{2+} -ATPase purificada não foi suficiente para restaurar o delta de fluorescência da enzima. Outra possibilidade é que a extensiva delipidação da 6xHis Ca^{2+} -ATPase durante a purificação esteja removendo lipídios essenciais para que se observem as mudanças de fluorescência durante a ligação de cálcio. Esta hipótese será explorada pela introdução de lipídios minoritários da membrana do retículo sarcoplasmático. Incluem-se nessa categoria PE, PI, PS, esfingomielina cardiolipina e colesterol. Estão em curso no laboratório experimentos para determinar o efeito da delipidação extensiva sobre a fluorescência intrínseca da Ca^{2+} -ATPase purificada de músculo de coelho. Espera-se que esse estudo permita uma melhor compreensão dos fatores que afetam o comportamento espectroscópico da enzima recombinante. A quantidade e o grau de pureza obtidos com o método de purificação desenvolvido durante esse trabalho são suficientes para permitir a caracterização dos mutantes de fluorescência da Ca^{2+} -ATPase já construídos e expressos em levedura. Espera-se que o estudo espectroscópico desses mutantes pontuais de triptofano contribua para uma melhor compreensão do mecanismo de acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte vetorial de íons nesse modelo de proteína de transporte que é a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático.

DESESTABILIZAÇÃO DO MRNA CODIFICANTE PARA MUTANTES DO SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO DA Ca^{2+} -ATPASE .

A obtenção de mutantes do sítio de fosforilação da SR Ca^{2+} -ATPase foi alcançada com sucesso através da sua expressão transiente em células de mamífero (Maruyama e MacLennan, 1988). Neste sistema, a proteína nativa e os mutantes testados (D351 → E, N, S, T, H e A) são expressos em níveis semelhantes, o que permitiu a demonstração da necessidade absoluta da fosforilação do resíduo D351 para a atividade Ca^{2+} -transportadora da enzima (Maruyama e MacLennan, 1988). Apesar das várias vantagens inerentes à utilização

da levedura para a expressão de proteínas heterólogas, a caracterização dos mutantes do sítio de fosforilação da SR Ca^{2+} -ATPase neste sistema está limitada pelas características do dobramento e inserção em membranas internas da célula da proteína mutante. Entre os mutantes testados, apenas a mutação D351A não comprometeu a expressão da SR Ca^{2+} -ATPase. As mutações D351→ E, S ou T, por outro lado, foram devastadoras para a estabilidade da proteína recombinante ao ponto de não ser possível a detecção de produtos de degradação em "immunoblots" revelados com anticorpos mono ou policlonais. O fato da substituição do D351A não alterar a estabilidade da proteína recombinante, ao passo que a substituição deste mesmo resíduo por Glu inviabiliza a sua expressão na levedura, sugeriu que a composição da cadeia lateral do resíduo situado na posição 351 da SR Ca^{2+} -ATPase desempenhe um papel importante durante o dobramento da proteína nascente. A observação recente de que o mutante D351A produzido em células COS-1 possui a afinidade para ATP aumentada 22 vezes em relação a Ca^{2+} -ATPase nativa fornece uma evidência direta do papel desempenhado pelo resíduo D351 na ligação do nucleotídeo (McIntosh *et al.*, 1999). Um aumento semelhante na afinidade para nucleotídeo foi no mutante do sítio de fosforilação D369A da Na^+/K^+ -ATPase (Pedersen *et al.*, 1996). Na Ca^{2+} -ATPase, a substituição de D351 por E, S ou T criaria um impedimento estérico que, dificultando o acesso do γ -fosfato do ATP ao sítio de fosforilação, contribui para a desestabilização do dobramento correto da proteína nascente durante a inserção co-traducional na membrana do retículo endoplasmático da levedura, conduzindo a sua rápida degradação. Esta hipótese poderá ser testada pela obtenção de medidas de ligação de ATP no mutante D351A, bem como pela observação do efeito protetor do ATP sobre este mutante em ensaios de tripsinólise.

A análise dos níveis de mRNA codificante para o mutante D351E ao longo da indução por choque térmico revelou a existência de uma fase inicial de acumulação do mensageiro durante os 10 minutos iniciais, seguida de uma rápida diminuição até a sua estabilização em níveis muito inferiores aos observados para a SR Ca^{2+} -ATPase nativa. Um efeito semelhante foi observado sobre a abundância do mRNA codificante para uma Ca^{2+} -ATPase quimérica construída em nosso laboratório. Também nessa quimera, onde a porção N-terminal da SR Ca^{2+} -ATPase de músculo (resíduos 1 a 24) foi substituída pela extremidade N-terminal da H^+ -ATPase (resíduos 1 a 88) de levedura, não foi observada a presença da proteína recombinante em "immunoblots".

Não tendo sido detectada a ocorrência de recombinação ou eliminação do plasmídeo episomal (cópias múltiplas) contendo a sequência codificante para o mutante D351E, a

diminuição dos níveis do mRNA durante a indução por choque térmico sugere a existência de um mecanismo na levedura responsável pelo controle pós-transcricional da expressão gênica. Este mecanismo, ainda não descrito na literatura, seria responsável pelo aumento da degradação do mRNA codificante para mutantes da Ca^{2+} -ATPase sujeitos a um dobramento incorreto durante a inserção no retículo endoplasmático da célula. Embora seja reconhecida a importância do controle da estabilidade de mRNAs como um mecanismo de regulação da expressão gênica, as estruturas e mecanismos envolvidos na determinação das taxas de degradação de mRNAs específicos permanecem desconhecidas (Ross, 1996). Além disso, diversas evidências experimentais sugerem que a degradação de mRNA em eucariotos esteja acoplada ao processo de tradução (Ross, 1995). Assim, a diminuição observada na abundância do mRNA codificante para o mutante D351E estaria associada ao dobramento incorreto da proteína nascente. O "misfolding" da proteína mutante ou a sua degradação seriam responsáveis por um sinal para a degradação do mRNA. A diminuição nos níveis do mRNA codificante para a Ca^{2+} -ATPase no mutante D351E não foi acompanhada pela redução do mRNA codificante para outros genes testados em paralelo. Este resultado reforça a existência de um efeito específico sobre a estabilidade do mRNA codificante para a proteína instável. Pretende-se confirmar o aumento na taxa de degradação do mRNA codificante para o mutante D351E através da determinação da meia-vida do seu transcrito em tempos curtos e longos de indução (Ross, 1995). A inibição da síntese protéica, seja pelo uso de antibióticos ou por mutações que afetem a maquinaria de tradução, tem um efeito estabilizador sobre diversos mRNAs de levedura (Peltz *et al.*, 1992). Nessa linha, pretende-se testar o efeito do antibiótico cicloheximida, um inibidor da elongação da tradução, sobre a estabilidade do mRNA codificante para o mutante D351E da SR Ca^{2+} -ATPase (Peltz *et al.*, 1992).

BIBLIOGRAFIA

Abeijon, C., Orlean, P., Robbins, P.W., e Hirschberg, C.B. (1989). Topography of glycosylation in yeast: characterization of GDPmannose transport and luminal guanosine diphosphatase activities in Golgi-like vesicles. *Proc Natl Acad Sci* 86:6935-9.

Ambesi, A., Allen, K.E., e Slayman, C.W. (1997). Isolation of transport-competent secretory vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem* 251:127-9.

Ambesi, A., Pan, R.L., e Slayman, C.W. (1996). Alanine-scanning mutagenesis along membrane segment 4 of the yeast plasma membrane H-ATPase - Effects on structure and function. *J Biol Chem* 271:22999-3005.

Andersen, J.P. (1989). Monomer-oligomer equilibrium of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and the role of subunit interaction in the Ca pump mechanism. *Biochim Biophys Acta* 988:47-72.

Andersen, J.P., Skievery, E., Mahrous, T.S., e Møller, J.V. (1983). Reconstitution of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase with excess lipid dispersion of the pump units. *Biochim Biophys Acta* 728:1-10.

Andersen, J.P. e Vilsen, B. (1995). Structure-function relationships of cation translocation by Ca(2+)- and Na⁺, K(+)-ATPases studied by site-directed mutagenesis. *FEBS lett* 359:101-6.

Andersen, J.P., Vilsen, B., Collins, J.H., e Jørgensen, P.L. (1986). Localization of E1-E2 conformational transitions of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase by tryptic cleavage and hydrophobic labeling. *J Membr Biol* 93:85-92.

Andersen, J.P., Vilsen, B., Nielsen, H., e Møller, J.V. (1986). Characterization of detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase by high-performance liquid chromatography. *Biochemistry* 25:6439-47.

Antebi, A. e Fink, G.R. (1992). The yeast Ca(2+) ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell* 3:633-54.

Aravind, L., Galperin, M.Y., e Koonin, E.V. (1998). The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends Biochem Sci* 23:127-9.

Axelsen, K.B. e Palmgren, M.G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 46:84-101.

Barrabin, H., Scofano, H.M., e Inesi, G. (1984). Adenosinetriphosphatase site stoichiometry in sarcoplasmic reticulum vesicles and purified enzyme. *Biochemistry* 23:1542-8.

Brandl, C.J., Green, N.M., Korczac, B., e MacLennan, D.H. (1986). Two Ca²⁺ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* 58:597-607.

Campbell, Entman ML, Van Winkle WB, editors. Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Physiology. Boca Raton, FL: 1986.

Capieaux, E., Vignais, M.-L., Sentenac, A., e Goffeau, A. (1989). The yeast H-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J Biol Chem* 264:7437-46.

Carvalho-Alves, P.C., Hering, V.H., Oliveira, J.M.S., Salinas, R.K., e Verjovski-Almeida, S. (2000). Requirement of the hinge domain for dimerization of Ca-ATPase large cytoplasmic portion expressed in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 778:1-12.

Centeno, F. *et al.*, (1994). Expression of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase in yeast. *FEBS lett* 354:117-22.

Champeil, P., Gingold, M.P., Guillain, F., e Inesi, G. (1983). Effect of magnesium on the calcium-dependent transient kinetics of sarcoplasmic reticulum ATPase, studied by stopped flow fluorescence and phosphorylation. *J Biol Chem* 258:4453-8.

Chen, L., Sumbilla, C., Lewis, D., Zhong, L., Stock, C., Kirtley, M.E., e Inesi, G. (1996). Short and long range functions of amino acids in the transmembrane region of the sarcoplasmic reticulum ATPase. A mutational study. *J Biol Chem* 271:10745-52.

Clarke, D.M., Loo, T.W., Inesi, G., e MacLennan, D.H. (1989). Location of high affinity Ca-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Nature* 339:476-8.

Clarke, D.M., Loo, T.W., e MacLennan, D.H. (1990). Functional consequences of mutations of conserved amino acids in the β -strand domain of the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265:14088-92.

Coury, L.A., Zeidel, M.L., e Brodsky, J.L. (1999). Use of yeast sec6 mutant for purification of vesicles containing recombinant membrane proteins. *Methods Enzymol* 306:169-86.

Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stuber, D., e Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* 31:371-87.

Da Silva, M.C.M., Grossi, d.S., M.F., Chrispeels, M.J., Togawa, R.C., e Neshich, G. (2000). Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the specificity of binding between α -amylases and their inhibitors. *Protein Engineering* 13:167-77.

- Dalton, K.A., East, J.M., Mall, S., Oliver, S., Starling, A.P., e Lee, A.G. (1998). Interaction of phosphatidic acid and phosphatidylserine with the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum and the mechanism of inhibition. *Biochem J* 329:637-46.
- de Foresta, B., Henao, F. e Champeil, P. (1994). Cancellation of the cooperativity of Ca binding to sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by the non-ionic detergent dodecylmaltoside. *Eur J Biochem* 223:359-69.
- de Meis, The sarcoplasmic reticulum: transport and energy transduction. 1st ed. New York: John Wiley & Sons, 1981.
- de Meis, L. (1991). Fast efflux of Ca^{2+} mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase. *J Biol Chem* 266:5736-42.
- Dean, W.L. e Tanford, C. (1978). Properties of a delipidated, detergent-activated Ca--ATPase. *Biochemistry* 17:1683-90.
- Degand, I., Catty, P., Talla, E., Thines-Sempoux, D., d'Exaerde, A.D., Goffeau, A., e Ghislain, M. (1999). Rabbit sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase replaces yeast PMC1 and PMR1 Ca-ATPases for cell viability and calcineurin-dependent regulation of calcium tolerance. *Molecular Microbiology* 31:545-56.
- Degani, C. e Boyer, P.D. (1973). A borohydride reduction method for characterization of the acyl phosphate linkage in proteins and its application to sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 248:8222-6.
- Ding, J., Starling, A.P., East, J.M., e Lee, A.G. (1994). Binding sites for cholesterol on Ca(2+)-ATPase studied by using a cholesterol-containing phospholipid. *Biochemistry* 33:4974-9.
- Dufour, J. e Goffeau, A. (1978). Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 253:7026-32.
- Dupont, Y. (1976). Fluorescence studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Biochem Biophys Res Commun* 71:544-00.
- Dupont, Y. (1980). Occlusion of divalent cations in the phosphorylated calcium pump of sarcoplasmic reticulum. *Eur J Biochem* 109:231-8.
- Dupont, Y. e Bennet, N. (1982). Vanadate inhibition of the Ca-dependent conformational change of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *FEBS lett* 139:237-40.
- Dupont, Y. e Leigh, J.B. (1978). Transient kinetics of sarcoplasmic reticulum Ca + Mg ATPase studied by fluorescence. *Nature* 273:396-8.
- Ebashi, S. e Lipmann, F. (1960). *J Biochem* 48:150

- Ebashi, S. (1961). Calcium Binding Activity of Vesicular Relaxing Factor. *J Biochem* 50:236-44.
- Ebashi, S. e Lipman, F. (1962). Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle. *J Cell Biol* 14:389-400.
- Ebashi, S., Endo, M. e Ohtsuki, I. (1969). *Q Rev Biophys* 2, 351-384
- Eletr, S. e Inesi, G. (1972). Phospholipid orientation in sarcoplasmic reticulum membranes: spin-label ESR and proton NMR studies. *Biochim Biophys Acta* 282:174-9.
- Ey, P.L., Prowse, S.J., e Jenkin, C.R. (1978). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 15:429-36.
- Feldman, R.I., Bernstein, M., e Schekman, R. (1987). Product of SEC53 is required for folding and glycosylation of secretory proteins in the lumen of the yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 262:9332-9.
- Froehlich, J.P. e Taylor, E.W. (1975). Transient state kinetic studies of sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 250:2013-21.
- Gietz, R. e Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base par restriction sites. *Gene (Amst)* 74:527-34.
- Gould, G.W., McWhirter, J.M., East, J.M., e Lee, A.G. (1987). Effects of diet on the function of sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* 245:751-5.
- Green, N.M. e Stokes, D.L. (1992). Structural modelling of P-type ion pumps. *Acta Physiol Scand* 146:59-68.
- Hasselbach, W. e Makinose, M. (1961). Die Calciumpumpe der "Erschlaffungsgrana" des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung. *Biochem Z* 333:518-28.
- Hasselbach, W. e Makinose, M. (1962). ATP and Active Transport. *Biochem Biophys Res Commun* 7:132-6.
- Hermesen, H.P.H., Swartz, H.G.P., Koenderink, J.B., e De Pont, J.J.H.H.M. (1998). Mutagenesis of glutamate 820 of the gastric H,K-ATPase alpha-subunit to aspartate decreases the apparent ATP affinity. *Biochem J* 331:465-72.
- Herrick, D., Parker, R., e Jacobson, A. (1990). Identification and comparison of stable and unstable mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10:2269-84.

- Hesketh, T.R., Smith, G.A., Houslay, M.D., McGill, K.A., Birdsall, N.J.M., Metcalfe, J.C., e Warren, G.B. (1976). Annular lipids determine the ATPase activity of a calcium transport protein complexed with dipalmitoyllecithin. *Biochemistry* 15:4145-51.
- Hill, T. e Inesi, G. (1982). Equilibrium cooperative binding of calcium and protons by sarcoplasmic reticulum ATPase. *Proc Natl Acad Sci* 79:3978-82.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R., e Stuber, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology* 6:1321-5.
- Hunter, G.W., Bigelow, D.J., e Squier, T.C. (1999). Lysophosphatidylcholine modulates catalytically important motions of the Ca-ATPase phosphorylation domain. *Biochemistry* 38:4604-12.
- Huxley, A.F. e Taylor, R.E. (1957). *Progr Biophys* 7:255
- Huxley, A.F. e Taylor, R.E. (1958). *J Physiol* 144:426
- Inesi, G. (1985). Mechanism of calcium transport. *Ann Rev Physiol* 47:573-601.
- Inesi, G. (1987). Sequential Mechanism of Calcium Binding and Translocation in Sarcoplasmic Reticulum AdenosineTriphosphatase. *J Biol Chem* 262:16338-42.
- Inesi, G., Goodman, J.J., e Watanabe, S. (1967). Effect of diethyl ether on the adenosine triphosphatase activity and the calcium uptake of fragmented sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 242:4637-63.
- Inesi, G., Kurzmack, M., Coan, C., e Lewis, D.E. (1980). Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* 255:3025-31.
- Kanazawa, T. e Boyer, P.D. (1973). Occurrence and characteristics of a rapid exchange of phosphate oxygens catalyzed by sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* 248:3163-72.
- Kerchove d'Exaerde, A., Supply, P., Dufour, J., Bogaerts, P., Thinès, D., Goffeau, A., e Boutry, M. (1995). Functional complementation of a null mutation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H-ATPase by a plant H-ATPase gene. *J Biol Chem* 270:23828-37.
- Kumagai, H., Ebashi, S., e Takeda, F. (1955). *Nature* 176:166
- Lacapère, J.J., Gingold, M.P., Champeil, P., e Guillain, F. (1981). Sarcoplasmic reticulum ATPase phosphorylation from inorganic phosphate in the absence of a calcium gradient. Steady state and kinetic fluorescence studies. *J Biol Chem* 256:2302-6.

- Lacowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum press, New York: 1983.
- Lanfermeijer, F.C., Venema, K., e Palmgren, M.G. (1998). Purification of a histidine-tagged plant plasma membrane H-ATPase expressed in yeast. *Protein Expr Purif* 12:29-37.
- le Maire, M., Viel, A., e Moller, J.P. (1989). Size exclusion chromatography and universal calibration of gel columns. *Anal Biochem* 177:50-6.
- Lee, A.G. (1998). How lipids interact with an intrinsic membrane protein: the case of the calcium pump. *Biochim Biophys Acta* 1376:381-90.
- Levy, D., Gulik, A., Bluzat, A., e Rigaud, J.L. (1992). Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. *Biochim Biophys Acta* 1107:283-98.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., e Randall, R.J. (1951). *J Biol Chem* 193:265-75.
- Ludi, H. e Hasselbach, W. (1984). State of aggregation of detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase investigated by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 297:111-7.
- Lund, S., Orlowski, S., de Foresta, B., Champeil, P., LeMaire, M., e Moller, J.V. (1989). Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264:4907-15.
- MacLennan, D.H. (1970). Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 245:4508-18.
- MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczac, B., e Green, N.M. (1985). Amino-acid sequence of a Ca⁺ Mg-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316:696-700.
- MacLennan, D.H., Clarke, D.M., Loo, T.W., e Skerjanc, I.S. (1992). Site-directed mutagenesis of the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Physiol Scand* 146:141-50.
- MacLennan, D.H. e Green, N.M. (2000). Pumping ions. *Nature* 405:633-4.
- MacLennan, D.H., Rice, W.J., e Green, N.M.J. (1997). The Mechanism of Ca transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca-ATPases. *J Biol Chem* 272:28815-8.
- Makinose, M. (1969). The phosphorylation of the membranal protein of the sarcoplasmic vesicles during active calcium transport. *Eur J Biochem* 10:74

- Makinose, M. (1973). Possible functional states of the enzyme of the sarcoplasmic calcium pump. *FEBS lett* 37:140-3
- Makinose, M. e Hasselbach, W. (1965). The influence of oxalate on calcium transport of isolated sarcoplasmic reticular vesicles. *Biochem Z.* 343:360-82.
- Martin, D.W., Tanford, C., e Reynolds, J.A. (1984). Monomeric solubilized sarcoplasmic reticulum Ca pump protein: demonstration of Ca binding and dissociation coupled to ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci* 81:6623-6.
- Martonosi, A. (1971). Biomembranes. Plenum Pres, New York. Vol. 1, pp.191-256
- Maruyama, K., Clarke, D.M., Fujii, J., Inesi, G., Loo, T.W., e MacLennan, D.H. (1989). Functional consequences of alterations to amino acids located in the catalytic center (isoleucine 348 to threonine 357) and nucleotide-binding domain of the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264:13038-42.
- Maruyama, K. e MacLennan, D.H. (1988). Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca transport activity of the Ca-ATPase expressed in COS-1 cells. *Proc Natl Acad Sci* 85:3314-8.
- Masuda, H. e de Meis, L. (1973). Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum membrane by orthophosphate. Inhibition by calcium ions. *Biochemistry* 12:4581-5.
- McFarland, B.H. e Inesi, G. (1971). Solubilization of sarcoplasmic reticulum with Triton X-100. *Arch Biochem Biophys* 145:456-464.
- McIntosh, D.B. e Ross, D.C. (1988). Reaction cycle of solubilized monomeric Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum is the same as that of the membrane form. *J Biol Chem* 263:12220-3.
- McIntosh, D.B., Woolley, D.G., MacLennan, D.H., Vilsen, B., e Andersen, J.P. (1999). Interaction of nucleotides with Asp⁻ and the conserved phosphorylation loop of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *J Biol Chem* 274:25227-36.
- McIntosh, D.B., Woolley, D.G., Vilsen, B., e Andersen, J.P. (1996). Mutagenesis of segment ⁴⁸⁷Phe-Ser-Arg-Asp-Arg-Lys⁴⁹² of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase produces pumps defective in ATP binding. *J Biol Chem* 271:25778-89.
- Meissner, G., Conner, G.E., e Fleischer, S. (1973). *Biochim Biophys Acta* 298:246-69.
- Michelangeli, F., Orlowski, S., Champeil, P., Grimes, E.A., East, J.M., e Lee, A.G. (1990). Effects of Phospholipids on binding of Calcium to (Ca-Mg)-ATPase. *Biochemistry* 29:8307-12.

- Mintz, E. e Guillain, F. (1997). Ca transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1318:52-70.
- Møller, J.V., Lind, K.E., e Andersen, J.P. (1980). Enzyme kinetics and substrate stabilization of detergent-solubilized and membraneous (Ca + Mg)-activated ATPase from sarcoplasmic reticulum. Effect of protein-protein interaction. *J Biol Chem* 255:1912-20.
- Møller, J.V., Andersen, J.P. e le Maire, M. (1982) The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase *Mol Cell Biochem* 42:83-107
- Møller, J.V., Juul, B., e le Maire, M. (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1286:1-51.
- Nakamoto, R.K., Rao, R., e Slayman, C.W. (1991). Expression of the yeast plasma membrane [H]ATPase in secretory vesicles. *J Biol Chem* 266:7940-9.
- Nakamura, J. e Tajima, G. (1997). Independence of two conformations of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase molecules in hydrolyzing acetyl phosphate. A two-pair model of the ATPase structural unit. *J Biol Chem* 272:19290-4.
- Nestruck-Goyke, A.C. e Hasselbach, W. (1981). Preparative isolation of Apo(Ca-ATPase) from sarcoplasmic reticulum and the reactivation by lysophosphatidylcholine of Ca-dependent ATP hydrolysis and partial-reaction steps of the enzyme. *Eur J Biochem* 114:339-47.
- Pedersen, P.A., Rasmussen, J.H., e Jorgensen, P.L. (1996). Expression in high yield of pig $\alpha 1\beta 1$ Na,K-ATPase and inactive mutants D369N and D807N in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271:2514-22.
- Peltz, S.W., Donahue, J.L., e Jacobson, A. (1992). A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12:5778-84.
- Perlin, D.S., Harris, S.L., Seto-Young, D., e Haber, J.E. (1989). Defective H-ATPase of hygromycin B-resistant *pma1* mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 264:21857-64.
- Petrov, V.V., Padmanabha, K.P., Nakamoto, R.K., Allen, K.E., e Slayman, C.W. (2000). Functional role of charged residues in the transmembrane segments of the yeast plasma membrane H-ATPase. *J Biol Chem* 275:15709-16.
- Pickart, C.M. e Jencks, W.P. (1984). Energetics of the calcium-transporting ATPase. *J Biol Chem* 259:1629-43.

- Pikula, S., Epstein, L., e Martonosi, A. (1994). The relationship between phospholipid content and Ca-ATPase activity in the sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1196:1-13.
- Portillo, F., de Larrinoa, I.F., e Serrano, R. (1989). Deletion analysis of yeast plasma membrane H-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. *FEBS lett* 247:381-5.
- Post, R.L. e Kume, S. (1973). Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 248:6993-7000.
- Pringle, J.R., Adams, A.E.M., Drubin, D.G., e Haarer, B.K. (1991). Immunofluorescence methods for yeast. *Methods Enzymol* 194:565-602.
- Punzengruber, C., Prager, R., Kolassa, N., Winkler, F., e Suko, J. (1978). Calcium gradient-dependent and calcium gradient-independent phosphorylation of sarcoplasmic reticulum by orthophosphate. The role of magnesium. *Eur J Biochem* 92:349-59.
- Rao, R. e Slayman, C.W. (1993). Mutagenesis of conserved residues in the phosphorylation domain of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase – Effects on structure and function. *J Biol Chem* 268:6708-13.
- Reis, E.M.R., Slayman, C.W., e Verjovski-Almeida, S. (1996). Heterologous expression of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Bioscience Reports* 16:107-13.
- Rose *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, .Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual. New York: 1990.
- Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59:423-50.
- Ross, J. (1996). Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. *Trends Genet* 12:171-5
- Sagara, Y., Fernandez-Belda, F., de Meis, L., e Inesi, G. (1992). Characterization of the inhibition of intracellular Ca transport ATPases by thapsigargin. *J Biol Chem* 267:12606-13.
- Sagara, Y. e Inesi, G. (1991). Inhibition of the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Transport ATPase by Thapsigargin at Subnanomolar Concentrations. *J Biol Chem* 266:13503-6.
- Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: 1989.

- Sanderson, C.M., Crowe, J.S., e Meyer, D.I. (1990). Protein retention in yeast rough endoplasmic reticulum: expression and assembly of human ribophorin I. *J Cell Biol* 111:2861-70.
- Sanderson, C.M. e Meyer, D.I. (1991). Purification and functional characterization of membranes derived from the rough endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266:13423-30.
- Sarkar, G. e Sommer, S. (1990). The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 8:404-7.
- Schekman e Novick, Editors: Strathern JN, Jones EW, Broach JR,. The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* : Metabolism and Gene Expression. NY: 1982.
- Segel, Anonymous Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. New York: 1975.
- Sekler, I., Kopito, R., e Casey, J.R. (1995). High level expression, partial purification, and functional reconstitution of the human AE1 anion exchanger in *Saccharomyces cerevisiae* . *J Biol Chem* 270:21028-34.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C., e Fink, G.R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ K), K- and Ca-ATPases. *Nature* 319:689-93.
- Shivanna, B. e Rowe, E.S. (1997). Preservation of the native structure and function of Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum: solubilization and reconstitution by new short-chain phospholipid detergent 1,2-diheptanoyl-*sn*-phosphatidylcholine. *Biochem J* 325:533-42.
- Silva, J.L. e Verjovski-Almeida, S. (1985). Monomer-Dimer Association Constant of Solubilized Sarcoplasmic Reticulum ATPase. *J Biol Chem* 260:4764-9.
- Skerjanc, I.S., Toyofuku, T., Richardson, C., e MacLennan, D.H. (1993). Mutation of glutamate 309 to glutamine alters one Ca-binding site in the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum expressed in Sf9 cells. *J Biol Chem* 268:15944-50.
- Slater, M.R. e Craig, E.A. (1987). Transcriptional regulation of an hsp70 heat shock gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7:1906-16.
- Starling, A.P., Dalton, J.M., East, J.M., Oliver, S., e Lee, A.G. (1996). Effects of phosphatidylethanolamines on the activity of the Ca(2⁺)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* 320:309-14.

- Starling, A.P., East, J.M., e Lee, A.G. (1993). Effects of phosphatidylcholine fatty acyl chain length on calcium binding and other functions of the(Ca-Mg)-ATPase. *Biochemistry* 32:1593-600.
- Starling, A.P., East, J.M., e Lee, A.G. (1995). Phosphatidylinositol 4-phosphate increases the rate of dephosphorylation of the phosphorylated Ca(2+)-ATPase. *J Biol Chem* 270:14467-70.
- Starling, A.P., East, J.M., e Lee, A.G. (1995). Effects of gel phase phospholipid on the Ca(2+)-ATPase. *Biochemistry* 34:3084-91.
- Stokes, D.L. e Nakamoto, R.K. (1994). Structures of P-type and F-type ion pumps. *Current Opinion in Structural Biology* 4:197-203.
- Stokes, D.L., Taylor, W.R., e Green, N.M. (1994). Structure, transmembrane topology and helix packing of P-type ion pumps. *FEBS lett* 346:32-8.
- Suzuki, H. e Kanazawa, T. (1999). Formation of the ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase of which both Cys344 and Cys364 are modified by N-ethylmaleimide. *Biochemistry* 38:820-5.
- Takisawa, H. e Makinose, M. (1981). Occluded bound calcium on the phosphorylated sarcoplasmic transport ATPase. *Nature* 290:271-3.
- Tanford, C. (1985). Thermodynamic and kinetic cooperativity in ligand binding to multiple sites on a protein: Ca activation of an ATP-driven Ca pump. *Proc Natl Acad Sci* 82:4688-92.
- Tanford, C., Reynolds, J.A., e Johnson, E.A. (1987). Sarcoplasmic reticulum calcium pump: A model for Ca binding and Ca-coupled phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* 84:7094-8.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., e Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405:647-55.
- Toyoshima, C., Sasabe, H., e Stokes, D.L. (1993). Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature* 362:469-71.
- Varsanyi, M., Tolle, H.G., Heilmeyer, L.M.G., Dawson, R.M.C., e Irvine, R.F. (1983). *EMBO Journal* 2:1543-8.
- Verjovski-Almeida, S. e Kurtenbach, E.. Editors: Hidalgo C. (1988) Physical Properties of biological membranes and their functional implications.

Verjovski-Almeida, S. e Silva, J.L. (1981). Different degrees of cooperativity of the Ca-induced changes in fluorescence intensity of solubilized sarcoplasmic reticulum ATPase. *J Biol Chem* 256:2940-4.

Villalba, J.M., Palmgren, M.G., Berberían, G.E., Ferguson, C., e Serrano, R. (1992). Functional expression of plant plasma membrane H-ATPase in yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 267:12341-9.

Walworth, N.C. e Novick, P.J. (1987). Purification and characterization of constitutive secretory vesicles from yeast. *J Cell Biol* 105:163-74.

Yamaguchi, M. e Kanazawa, T. (1985). Coincidence of H⁺ binding and Ca²⁺ dissociation in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase during ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 260:4896-900.

Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J.L., e Inesi, G. (1993). H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys J* 64:1232-42.

Zhang, P., Toyoshima, C., Yonekura, K., Green, N.M., e Stokes, D.L. (1998). Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8-Å resolution. *Nature* 392:835-9.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Eduardo Moraes Rego Reis

Data de Nascimento: 31/5/1968

Naturalidade: Rio de Janeiro – RJ

EDUCAÇÃO

- Colégio Santo Agostinho, Rio de Janeiro – RJ, 1985
- ICBAS/Universidade do Porto, Porto-Portugal, 1989/93
Licenciatura em Ciências do Meio Aquático
- IST/Universidade Técnica de Lisboa, 1993/1994
Parte curricular do Mestrado em Biotecnologia

OCUPAÇÃO

- Bolsa de Mestrado concedida pelo CNPq entre 03/95 - 10/96
- Bolsa de Doutorado concedida pela FAPESP entre 12/96 - 02/00
- Pedido de bolsa de pós-doutoramento no País aprovado pela FAPESP.

PUBLICAÇÕES

- Costa V.; **Reis E.**, Quintanilha A. and Moradas Ferreira P. (1993) "Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* - the key role of mitochondrial superoxide dismutase". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **300**: 608-614
- **Reis E.M.R.**, Slayman C. W. and Verjovski-Almeida S. (1996) " Heterologous expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase" *Bioscience Reports*, **16**: 107-113
- Costa V., Amorim M.A., **Reis E.**, Quintanilha A. and Moradas-Ferreira P. (1997) " Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase". *Microbiology*, **143**: 1649-1656

- **Reis E. M. R.**, Kurtenbach E., Ferreira A.R., Biselli, P.J.C., Slayman C. W. and Verjovski-Almeida S.(1999) " N-terminal chimeric constructs improve the expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in yeast ". *Biochimica et Biophysica Acta*, **1461**: 83-95

REVIEW

Heterologous Expression of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase

Eduardo M. R. Reis,^{1,3} Carolyn W. Slayman,² and Sergio Verjovski-Almeida¹

Received October 31, 1995

In recent years, expression of rabbit sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase in heterologous systems has been a widely used strategy to study altered enzymes generated by site-directed mutagenesis. Various eukaryotic expression systems have been tested, all of them yielding comparable amounts of recombinant protein. However, the relatively low yield of recombinant protein obtained so far suggests that novel purification techniques will be required to allow further characterization of this enzyme based on direct ligand-binding measurements.

KEY WORDS: ATPase; calcium; expression systems; sarcoplasmic reticulum.

INTRODUCTION

The sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase is an integral membrane enzyme that transports calcium from the cytoplasm into the reticulum lumen and plays a critical role in the physiology of muscle relaxation. This enzyme has been extensively studied, and much is known about its structure (Green and Stokes, 1992) and reaction kinetics (Inesi *et al.*, 1990). In recent years, cloning of the cDNAs encoding the rabbit fast-twitch (SERCA1) and slow-twitch/cardiac (SERCA2) isoforms of the enzyme (MacLennan *et al.*, 1985; Brandl *et al.*, 1986) has opened the way for molecular characterization of functional domains of the protein. Much of the work has involved the substitution of individual amino acid residues by site-directed mutagenesis, followed by expression and analysis of the mutant proteins. Several expression systems have been developed for this purpose, including cultured mammalian and insect cells, yeast, and *Escherichia coli*; each of these systems will be discussed in turn in the following sections.

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, S.P., Brazil and ² Department of Genetics, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA.

³ To whom correspondence should be addressed.

EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS

Expression of rabbit fast-twitch SR Ca^{2+} -ATPase was obtained for the first time in an heterologous system by Maruyama and MacLennan (1988). In this study, cDNAs coding for adult and neonatal isoforms of the enzyme were cloned in appropriate expression vectors and transiently expressed in COS-1 cells. The ATPase was found mainly in microsomes, where it accounted for approximately 5% of total microsomal protein. As demonstrated by two different assays, the ATPase was functionally active, able to form its characteristic phosphorylated intermediate when incubated with ATP in the presence of Ca^{2+} and to carry out the ATP-dependent transport of Ca^{2+} into the microsomal vesicles.

Using the COS-1 expression system, more than one-quarter of the residues of rabbit SR Ca^{2+} -ATPase have been replaced by site-specific mutagenesis and the mutants tested for altered function (MacLennan, 1990). Much valuable information has been obtained: for example, the assignment of high-affinity Ca^{2+} -binding sites to individual residues in transmembrane regions of the protein (Clarke *et al.*, 1989). However, the yield of recombinant protein in the COS-1 system has not been sufficient for many kinds of biochemical and biophysical studies, including direct measurements of ligand-binding. The exclusively transient expression of the ATPase and the low transfection efficiency of the COS-1 cells are other drawbacks inherent to this approach (Hussain *et al.*, 1992).

In a complementary set of studies, Fambrough and co-workers have described the stable expression of an avian SR Ca^{2+} -ATPase in cultured mouse cells (Karin *et al.*, 1989). In this case, a mouse myogenic cell line (C2C12) was co-transfected with two plasmids, one containing the cDNA for chicken fast-twitch skeletal muscle SR Ca^{2+} -ATPase under the control of the simian virus 40 (SV 40) early promoter, and the other conferring resistance to G418 (Karin *et al.*, 1989). Selection of transfectants in G418 medium allowed the isolation of clones in which the Ca^{2+} -ATPase cDNA had been stably integrated into the cell genome. As in the COS-1 studies, the ATPase protein appeared to be retained in the endoplasmic reticulum, since immunofluorescence with anti-ATPase antibody gave a pattern virtually identical to that seen when the ER was selectively stained with cyanine dye (DiOC₆). However, further development of the mouse myogenic cell system was hindered by difficulty in obtaining a functionally intact microsomal fraction (Hussain *et al.*, 1992).

More recently, Inesi and co-workers have obtained stable expression of chicken fast-twitch SR Ca^{2+} -ATPase in Chinese hamster lung (CHL) fibroblast cells (Hussain *et al.*, 1992). Cells were transfected with a dual-promoter expression vector containing two cDNAs: one encoding Ca^{2+} -ATPase under control of the constitutive human β -actin gene promoter, and the second encoding a methotrexate-resistant form of dihydrofolate reductase (A3/DHFR) under control of a SV40 promoter-enhancer. Stable transfectants could thus be selected by growth in medium containing methotrexate. Initially, the transfectants expressed extremely low levels of SR Ca^{2+} -ATPase, but stepwise increases in methotrexate concentration led to co-amplification in some cells of A3/DHFR and SR Ca^{2+} -ATPase sequences and thus to increased expression. Once again,

the ATPase accumulated mainly in the endoplasmic reticulum, where it exhibited high Ca^{2+} transport activity and Ca^{2+} -dependent phosphorylation from ATP (Hussain *et al.*, 1992). Comparative studies showed that there was a significant difference in the time-course of Ca^{2+} transport between transiently transfected COS-1 cells and stably transfected CHL cells: namely, uptake slowed after only a few minutes in the COS-1 cells, while it continued linearly for at least 30 minutes in the CHL cells. It seems likely that the difference reflects the distribution of expressed protein in the two cell lines, with immunoreactive ATPase highly concentrated in 2–3% of total microsomes in the COS-1 cells but spread among 50% of microsomes in the CHL cells (Hussain *et al.*, 1992).

EXPRESSION IN A BACULOVIRUS SYSTEM

As described above, the need for larger amounts of recombinant SR Ca^{2+} -ATPase has called for the development of non-mammalian expression systems. One obvious candidate is the baculovirus system (Matsuura *et al.*, 1987) which has been used to express high levels of many heterologous proteins. Typically, the cDNA of interest is cloned into a plasmid under control of the constitutive viral polyhedrin promoter and co-transfected with viral DNA into Sf9 insect cells, yielding a homogeneous culture of protein-producing cells. Skerjanc *et al.* (1993) have recently employed the baculovirus system to express fast-twitch SR Ca^{2+} -ATPase. Western blots of membrane fractions from infected cells revealed abundant quantities of recombinant SR Ca^{2+} -ATPase which appeared, based on measurements of Ca^{2+} uptake, to be located in the microsomes. In quantitative terms, 3 mg of ATPase were produced per liter of infected cell cultures before any purification step; and after isolation of a microsomal fraction followed by solubilization with non-ionic detergent C_{12}E_8 and immunoprecipitation with monoclonal antibodies, it was possible to recover at least 90% of the total Ca^{2+} -ATPase protein present in the original cell extracts (Skerjanc *et al.*, 1993). Significantly, the immunoprecipitated Ca^{2+} -ATPase retained enzymatic activity while still bound to the specific monoclonal antibody and allowed, for the first time, the measurement of Ca^{2+} -binding in mutant forms of the enzyme. For example, mutation of Glu³⁰⁹ to Gln had already been shown in COS-1 cells to lead to the loss of Ca^{2+} activated phosphorylation and Ca^{2+} transport (Clarke *et al.*, 1989). Expression of the same mutant ATPase in the baculovirus system permitted the direct measurement of Ca^{2+} -binding under conditions that favored either the E1 or E2 conformation, and provided direct evidence for the participation of Glu³⁰⁹ in high-affinity Ca^{2+} binding (Skerjanc *et al.*, 1993).

EXPRESSION IN YEAST

Because the production of recombinant SR Ca^{2+} -ATPase in mammalian and insect cells has proven to be both laborious and expensive, it has seemed worthwhile to explore expression in microorganisms such as yeast

(*Saccharomyces cerevisiae*). Here, useful background information has come from expression studies with the homologous plasma membrane H^+ -ATPase (Portillo and Serrano, 1988; Nakamoto *et al.*, 1991) and with a growing list of heterologous proteins (reviewed by Romanos *et al.*, 1992). Two groups have undertaken work with rabbit SR Ca^{2+} -ATPase. Centeno *et al.* (1994) cloned Ca^{2+} -ATPase cDNA into an expression vector under control of the inducible *GAL10* promoter, introduced it into yeast cells, and selected transformants by means of a *URA3* marker. In the resulting cells, transcription of Ca^{2+} -ATPase cDNA was seen following a shift from glucose- to galactose-containing medium. Western blot analysis of total extracts confirmed the appearance of a protein with the expected size of 110 kDa. Similar results have been obtained by Verjovski-Almeida *et al.* (1994) with an expression vector containing Ca^{2+} -ATPase cDNA under control of a heat-shock activated promoter (see Figure 1).

The subcellular localization of SR Ca^{2+} -ATPase in yeast is not yet clear. In the study by Centeno *et al.* (1994), Western blots revealed Ca^{2+} -ATPase protein in isolated subcellular fractions that were believed to be enriched in plasma membrane. However, sucrose gradient profiles (Centeno *et al.*, 1994) failed to show co-localization of the Ca^{2+} -ATPase with plasma-membrane H^+ -ATPase, and in immunofluorescence measurements, the strongest signals came from cytoplasmic structures and from the area surrounding the cell nucleus. On

Fig. 1. Expression of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase in yeast. Yeast cells were transformed with a plasmid vector containing either a wild type or no rabbit Ca^{2+} -ATPase cDNA insert. Transcription of the insert was under control of a heat-shock promoter. Transformed yeast cells were grown at 25°C to an OD of 0.6 and the cultures were shifted to 37°C for 90 min. Yeast total lysates were prepared and 40 µg samples of total protein from either culture were separated by SDS-PAGE. Ca^{2+} -ATPase was detected by immunoblotting with A52 monoclonal antibody which is specific for the rabbit Ca^{2+} -ATPase. A control of 300 ng of 110 kDa Ca^{2+} -ATPase isolated from rabbit muscle (SR) was run in parallel.

balance, then, the data would seem to favor localization in the endoplasmic reticulum.

Recent results from our laboratory also suggest an ER location (Reis *et al.*, *in preparation*). In this case, there was once again a strong pattern of immunofluorescence within cytoplasmic structures. Furthermore, quantitation by Western blots showed that a plasma membrane fraction, prepared by the method of Perlin *et al.* (1989), contained at most 20% of the total Ca^{2+} -ATPase. Thus, it is likely that the fractionation of yeast internal compartments will be required to obtain a good yield of recombinant SR Ca^{2+} -ATPase. At the moment, Ca^{2+} -ATPase expression in *S. cerevisiae* transformants is lower than in the other expression systems discussed so far, amounting to only 0.1% of total yeast protein or 900 μg of recombinant protein per liter of cell culture (Centeno *et al.*, 1994); on the other hand, many liters of yeast culture can easily be grown in the laboratory.

When mammalian proteins are expressed in microorganisms, it is important to ask whether the proteins are functional. In the study by Centeno *et al.* (1994), where phosphoenzyme formation from ATP served as a functional assay, no Ca^{2+} -dependent phosphorylation was seen in isolated yeast membranes, possibly due to the low abundance of the SR Ca^{2+} -ATPase. However, when the membranes were solubilized with non-ionic detergent C_{12}E_8 and immunoprecipitated with Ca^{2+} -ATPase antibody according to the procedures described by Skerjanc *et al.* (1993), phosphorylation from ATP of ATPase bound to the antibodies could be detected (Centeno *et al.*, 1994). Our experiments (Reis *et al.*, *in preparation*) have confirmed these results.

EXPRESSION IN BACTERIA

While bacterial systems have been widely used for the heterologous expression of hydrophilic proteins, there have been no successful reports of the use of bacteria to express membrane proteins with extensive hydrophobic domains. On the other hand, Dupont and coworkers have been successful with the large, central hydrophilic portion (LCL) of the rabbit SR Ca^{2+} -ATPase, a segment extending from Lys³²⁹ to Phe⁷⁴⁰ (Moutin *et al.*, 1994). LCL is of interest because it contains both the ATP binding domain and the phosphorylation domain (Green and MacLennan, 1989; Green and Stokes, 1992), and the goal was to obtain enough material for structural and functional studies. The first step was to clone the cDNA fragment encoding LCL in the plasmid pQE8 (Qiagen), resulting in a protein that carried a hexa-histidine ($6 \times \text{His}$) purification tag at its NH_2 terminus. After the plasmid was transformed into *E. coli*, overexpression of the fusion protein was induced by addition of IPTG to the culture medium, generating an insoluble cytoplasmic aggregate. Solubilization with urea and purification on a Ni^{2+} -NTA column yielded 8–12 mg of fusion protein per liter of culture. Importantly, the fusion protein was capable of binding ATP, as judged by the intrinsic fluorescence change upon addition of ATP and by the competitive binding of 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine-5'-triphosphate (TNP-ATP)

(Moutin *et al.*, 1994). Quantitatively, the binding site in the recombinant ATPase differed slightly from that in native SR Ca^{2+} -ATPase, having an 8-fold lower affinity for ATP. The authors suggested that, since recombinant LCL does not contain the membranous segments of SR Ca^{2+} -ATPase, it may not be able to undergo conformational changes upon ATP binding that contribute to the increase in affinity for ATP.

CONCLUSIONS

In the absence of detailed atomic crystallographic data, heterologous expression and functional analysis of site-specific mutants of the SR Ca^{2+} -ATPase have proved to be the most powerful tool available to evaluate models for the tertiary structure and reaction mechanism of this Ca^{2+} -transporting enzyme. All of the expression systems used so far have yielded comparable amounts of functional Ca^{2+} -ATPase per volume of liquid culture, with the limiting factor being either the total amount of recombinant protein or the purity of the fractions that contain the protein. One can expect that improvement in the techniques for purifying recombinant Ca^{2+} -ATPase will be an important next step in the heterologous expression strategies. Large amounts of pure protein obtained by recombinant techniques will then permit a wide variety of biophysical and biochemical approaches to be applied, increasing our understanding of the structural and functional relationships in the Ca^{2+} -ATPase.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work in the laboratories of the authors is supported by grants from Fapesp, PADCT/CNPq and FIRCA/NIH to S.V.A. and from NIH to C.W.S. The Ca^{2+} -ATPase SERCA1 cDNA and the A52 monoclonal antibody were kindly supplied by Dr. D. H. MacLennan.

REFERENCES

- Brandl, C. J., Green, N. M., Korczak, B. and MacLennan, D. H. (1986). Two Ca^{2+} -ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* **44**:597-607.
- Centeno, F., Deschamps, S., Lompré, A. M., Anger, M., Moutin, M. J., Dupont, Y., Gjedde, P., Villalba, J. M., Møller, J. V., Falson, P. and le Maire, M. (1994). Expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in yeast. *FEBS Lett.* **354**:117-122.
- Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G. and MacLennan, D. H. (1989). Location of high affinity Ca^{2+} -binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Nature* **339**:476-478.
- Green, N. M. and MacLennan, D. H. (1989). ATP driven ion pumps: an evolutionary mosaic. *Biochem. Soc. Trans.* **17**:819-822.
- Green, N. M. and Stokes, D. L. (1992). Structural modelling of P-type ion pumps. *Acta Physiol. Scand.* **146**:59-68.
- Hussain, A., Lewis, D., Sumbilla, C., Lai, L. C., Melera, P. W. and Inesi, G. (1992). Coupled expression of Ca^{2+} transport ATPase and a dihydrofolate reductase selectable marker in a mammalian cell system. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**:539-546.

- Inesi, G., Sumbilla, C. and Kirtley, M. E. (1990). Relationships of molecular structure and function in the calcium transporting ATPase. *Physiol. Rev.* **70**:749-760.
- Karin, N. J., Kaprielian, Z. and Fambrough, D. M. (1989). Expression of avian Ca^{2+} -ATPase in cultured mouse myogenic cells. *Mol. Cell. Biol.* **9**:1978-1986.
- MacLennan, D. H. (1990). Molecular tools to elucidate problems in excitation-contraction coupling. *Biophys. J.* **58**:1355-1365.
- MacLennan, D. H., Brandl, C. J., Korczak, B. and Green, N. M. (1985). Amino-acid sequence of a Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* **316**:696-700.
- Maruyama, K. and MacLennan, D. H. (1988). Mutation of glutamate 309 to glutamine alters one Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum expressed in Sf9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:3314-3318.
- Matsmura, Y., Possee, R. D., Overton, H. A. and Bishop, D. H. L. (1987). Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **68**:1233-1250.
- Moutin, M. J., Cuillel, M., Rapin, C., Miras, R., Anger, M., Lompré, A. M. and Dupont, Y. (1994). Measurements of ATP binding on the large cytoplasmic loop of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase overexpressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:11147-11154.
- Nakamoto, R. K., Rao, R. and Slayman, C. W. (1991). Expression of the yeast plasma membrane H^+ -ATPase in secretory vesicles. *J. Biol. Chem.* **266**:7940-7949.
- Perlin, D. S., Harris, S. L., Seto-Young, D. and Haber, J. E. (1989). Defective H^+ -ATPase of hygromycin B-resistant pmal mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**:21857-21864.
- Portillo, F. and Serrano, R. (1988). Dissection of functional domains of the yeast proton-pumping ATPase by directed mutagenesis. *EMBO J.* **7**:1793-1798.
- Reis, E. M. R., Kurtenbach, E., Slayman, C. W. and Verjovski-Almeida, S. (in preparation).
- Romanos, M. A., Scorer, C. A. and Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**:423-488.
- Skerjanc, I. S., Toyofuku, T., Richardson, C. and MacLennan, D. H. (1993). Mutation of glutamate 309 to glutamine alters one Ca^{2+} -binding site in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum expressed in Sf9 cells. *J. Biol. Chem.* **268**:15944-15950.
- Verjovski-Almeida, S., Kurtenbach, E. and Slayman, C. W. Subcellular localization of rabbit calcium-ATPase expressed in yeast. *Annals of the Annual Meeting of the "Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular"*, Caxambú, Brazil, May 1994, p. 65.

N-terminal chimeric constructs improve the expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in yeast

Eduardo M.R. Reis ^a, Eleonora Kurtenbach ^b, Alessandra R. Ferreira ^a,
Paolo J.C. Biselli ^a, Carolyn W. Slayman ^c, Sergio Verjovski-Almeida ^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, S.P., Brazil

^b Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21944-590 Rio de Janeiro, R.J., Brazil

^c Department of Human Genetics, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA

Received 19 May 1999; received in revised form 31 August 1999; accepted 31 August 1999

Abstract

Wild-type and chimeric constructs comprising rabbit sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase and the N-terminal cytoplasmic portion of yeast plasma membrane H^{+} -ATPase were expressed in yeast under control of a heat-shock regulated promoter. The wild-type ATPase was found predominantly in endoplasmic reticulum (ER) membranes. Addition of the first 88 residues of H^{+} -ATPase to the Ca^{2+} -ATPase N-terminal end promoted a marked shift in the localization of chimeric $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase which accumulated in a light membrane fraction associated with yeast smooth ER. Furthermore, there was a three-fold increase in the overall level of expression of chimeric $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Similar results were obtained for a chimeric Ca^{2+} -ATPase containing a hexahistidine sequence added to its N-terminal end. Both $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and 6 $\times$ His- Ca^{2+} -ATPase were functional as demonstrated by their ability to form a phosphorylated intermediate and undergo fast turnover. Conversely, a replacement chimera in which the N-terminal end of SR Ca^{2+} -ATPase was replaced by the corresponding segment of H^{+} -ATPase was not stably expressed in yeast membranes. These results indicate that the N-terminal segment of Ca^{2+} -ATPase plays an important role in enzyme assembly and contains structural determinants necessary for ER retention of the ATPase. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Ca^{2+} -ATPase; Endoplasmic reticulum; Heterologous expression; Membrane targeting; *Saccharomyces cerevisiae*

1. Introduction

Sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase is an integral membrane enzyme that transports calcium from the cytoplasm into the reticulum lumen of muscle cells and plays a critical role in the physiology

of muscle relaxation. Over the past 10 years, studies on site-specific mutants produced in mammalian cells have led to significant progress in defining structure-function relationships throughout the ATPase polypeptide [1,2]. However, the low level of SR Ca^{2+} -ATPase expressed in COS-1 cells has prevented the direct measurement of hydrolytic activity and ligand-binding constants [3,4]. Larger quantities of SR Ca^{2+} -ATPase can be produced in the baculovirus expression system [5]. Notwithstanding, the excessive amount of transfected insect cells required for ligand-

* Corresponding author. Fax: +55-11-818-2186; E-mail: verjo@iq.usp.br, <http://www.iq.usp.br/wwwchem/bioquimica/>

binding studies renders this expression system unsuitable for analyzing large numbers of mutants.

In parallel with these efforts, several laboratories have worked to express SR Ca^{2+} -ATPase in yeast, which offers a powerful array of genetic and cell biological methods to dissect protein function. While it is clear that functional SR Ca^{2+} -ATPase can be obtained in yeast, quantities are limited and do not yet permit biochemical and biophysical studies [6–8]. Furthermore, the subcellular localization of yeast-expressed SR Ca^{2+} -ATPase has been controversial in the literature. Centeno et al. [6] have shown that SR Ca^{2+} -ATPase expressed in yeast under control of the *GAL10* promoter accumulates in several internal membranes. In their work, the Ca^{2+} -ATPase was predominantly recovered in a fraction that was believed to contain plasma membranes [6], though it failed to co-localize with the yeast plasma membrane H^+ -ATPase upon sucrose gradient fractionation. When secretory vesicles were isolated from a *sec*-deficient strain expressing SR Ca^{2+} -ATPase, Ca^{2+} -dependent ATPase activity could be measured with a coupled enzyme assay. Thus, it was proposed that a significant amount of the recombinant Ca^{2+} -ATPase was trapped in secretory vesicles en route to the yeast plasma membrane [6]. In contrast, Degand et al. [7] recently showed by sucrose gradient fractionation and immunogold electron microscopy that the SR Ca^{2+} -ATPase, in this case expressed under control of the constitutive *PM1* promoter, was mainly localized to yeast membranes derived from the endoplasmic reticulum (ER). The recombinant Ca^{2+} -ATPase was functional in vivo, as demonstrated by its ability to restore growth of mutant host cells deprived of the endogenous organellar Ca^{2+} -ATPase *PMR1* and *PMC1* [7].

In a previous study, we have shown the expression of SR Ca^{2+} -ATPase in yeast under control of a heat shock-activated promoter [8]. The heat shock-induced SR Ca^{2+} -ATPase appeared by immunofluorescence microscopy to be localized in yeast internal membranes and was functional, since a detergent-solubilized and immunoprecipitated preparation was able to form a phosphorylated intermediate in the presence of Ca^{2+} and ATP [9]. In the work to be described below, we have aimed to improve expression by constructing N-terminal chimeras between SR Ca^{2+} -ATPase and yeast plasma membrane H^+ -

ATPase and testing the ability of signal sequences from the latter to direct the $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase chimera to the plasma membrane. This approach was motivated by the fact that the N-terminal sequence from yeast H^+ -ATPase was previously shown to be necessary to target this enzyme to the plasma membrane [10]. Two types of chimeric constructs were devised: in one of them, the N-terminal cytoplasmic moiety of yeast plasma membrane H^+ -ATPase was added to SR Ca^{2+} -ATPase immediately before the initial methionine (additive chimeric $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase). In a second construct, the N-terminal H^+ -ATPase sequence was substituted for the N-terminal moiety of SR Ca^{2+} -ATPase (replacement chimeric $\text{H}^+\Delta\text{Ca}^{2+}$ -ATPase). A third construct, a SR Ca^{2+} -ATPase chimera containing a hexahistidine motif added to its N-terminal methionine, was tested in parallel to observe the effect of addition of an unrelated sequence on the stability and activity of the Ca^{2+} -ATPase. Although the replacement chimera was not expressed in yeast, both the additive chimera and the hexahistidine chimera were produced at three-fold higher levels than unmodified SR Ca^{2+} -ATPase. In both cases, most of the chimeric protein accumulated in a distinct light ER subcompartment, as opposed to wild-type Ca^{2+} -ATPase, which accumulated in heavy ER. Thus, the exogenous sequences introduced in the N-terminal region did modify ER retention determinants but were not sufficient to direct the Ca^{2+} -ATPase chimeras to the plasma membrane.

2. Materials and methods

2.1. Strains and media

Saccharomyces cerevisiae strain NY605 (*MATa*; *ura3-12*; *leu2-3,112*; *GAL*), provided by Dr. Peter Novick (Department of Cell Biology, Yale University School of Medicine), was used as the host organism for the expression of rabbit SR Ca^{2+} -ATPase. Secretory-deficient strain SY2 (*MATa*; *ura3-52*; *leu2-3,112*; *his4-619*; *sec6-4*; *GAL*) was used for characterization of Ca^{2+} -ATPase expression in secretory vesicles. Yeast cells were transformed by the method of Elble [11]. Transformed NY605 cells were selected and propagated on minimal medium

containing 2% glucose and supplemented with 20 mg uracil/l. Transformed SY2 cells were selected in the same medium additionally supplemented with 20 mg histidine/l.

2.2. Plasmid constructions

The cloned 2991 bp cDNA from fast-twitch rabbit SR Ca^{2+} -ATPase [12] was kindly provided by Dr. David MacLennan (University of Toronto). Unique restriction sites *Hind*III and *Sac*I were introduced by PCR in the 5' and 3' non-coding flanking regions of the Ca^{2+} -ATPase gene, respectively, by standard techniques [13]. The upstream primer used for introducing the *Hind*III site was 5' CC AAG CTT AAA TTA ATA ATG GAG GCC GCG CAC TC 3' (non-homologous sequence is underlined), which simultaneously introduced an A at position -3 for proper translation initiation in yeast [14]. The *Hind*III-*Sac*I fragment containing the Ca^{2+} -ATPase cDNA was then moved to the yeast episomal plasmid YE-plac181 [15]. To optimize expression, a *Sal*I-*Hind*III fragment containing two in tandem copies of the yeast heat shock element (*HSE2*) [16] was cloned immediately before the 5' end of the Ca^{2+} -ATPase cDNA, and a 650 bp fragment containing the transcription termination consensus sequence from the 3' non-coding region of the yeast *PMA1* gene [17] was cloned immediately after the 3' end of the Ca^{2+} -ATPase cDNA. The final construct has been designated pSVA12.

Plasmid pARF1 was derived from pSVA12 and from pPROEX-1 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) to generate a hexahistidine-tagged Ca^{2+} -ATPase cDNA. Two rounds of PCR were performed using these plasmids as templates in order to create appropriate restriction sites for cloning. Firstly, a 187 bp fragment obtained by PCR amplification of vector pPROEX-1 with primers 5' ACC AAG CTT AAA TTA ATA ATG GGT CAT CAT CAT CAT CAT C 3' (forward) and 5' C AAG CTT GGC TGT TTT GGC G 3' (reverse) was digested with *Hind*III and cloned on a *Hind*III-digested pBlueScript II (Stratagene, LaJolla, CA) giving vector pHexaHis. Secondly, a *Nde*I restriction site was introduced on the 5' end of the Ca^{2+} -ATPase coding sequence by PCR amplification of plasmid pSVA12 with primers

5' ATC AAG CTT AAA TTA CAT ATG GAG GCC G 3' (forward) and 5' CAG CTG CTC CCC GAA CTC ATC C 3' (reverse). The 790 bp amplified fragment was digested with *Nde*I and *Kpn*I and cloned on *Nde*I-*Kpn*I-digested pHexaHis giving vector pHexaHis-N-ATP. Dideoxy sequencing confirmed the correct frame for the ATG translation initiation codon followed by the sequence coding for six histidines plus a seven amino acid spacer region and a seven amino acid site for rTEV protease cleavage (from the pPROEX-1 vector, Life Technologies, Gaithersburg, MD) which were joined to the amino-terminal residues from SR Ca^{2+} -ATPase. pHexaHis-N-ATP was digested with *Hind*III and *Stu*I and the 140 bp *Hind*III-*Stu*I fragment was cloned into *Hind*III-*Stu*I-digested pSVA12.

Two chimeric plasma membrane H^{+} -ATPase/SR Ca^{2+} -ATPase constructs were obtained. In one of them, a replacement chimeric $\text{H}^{+}\Delta\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, residues Met1–Leu24 from Ca^{2+} -ATPase were replaced by the first 88 residues from yeast plasma membrane H^{+} -ATPase. To that end, the yeast *PMA1* gene [18] was used as a template for PCR amplification with primers 5' GAA CGG AAT TCA GAA AAT CAT TGA AAA GAA TAA GAA G 3' (forward) and 5' CAT CGG AAT TCA GGC CTG TAG ATG GGT CAG TTT GTA AAT ATT C 3' (reverse). The 344 bp amplified fragment contained the sequence coding for the 88 amino acid residues of H^{+} -ATPase flanked by an *Eco*RI restriction site at its 5' non-coding end and *Stu*I-*Eco*RI restriction sites at its 3' end. This fragment was digested with *Eco*RI, cloned into *Eco*RI-digested pBlueScript II and fully sequenced by the dideoxy method. This construct was designated pN-PMA1. pN-PMA1 was digested with *Hind*III-*Stu*I and the 292 bp *Hind*III-*Stu*I fragment was ligated to *Hind*III-*Stu*I-treated pSVA12 giving plasmid pSVA21. A second, additive $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase chimera was constructed by placing the first 88 residues from yeast plasma membrane H^{+} -ATPase immediately before Met1 of Ca^{2+} -ATPase. To that end, plasmid pARF1 was digested with *Nde*I, made blunt with Klenow and digested with *Hind*III to remove the fragment containing the hexahistidine sequence. pN-PMA1 was digested with *Hind*III-*Stu*I and the 292 bp *Hind*III-*Stu*I fragment was ligated to *Nde*I-Klenow-*Hind*III-treated pARF1 giving pVVL1.

2.3. Induction of SR Ca^{2+} -ATPase synthesis and isolation of membranes

Transformed yeast cells (strain NY605) were grown at 23°C in glucose minimal medium supplemented with uracil to early-log phase ($\text{OD}_{600} \sim 0.5$) and then shifted to 37°C for 90 min. Preparation of cell lysates was essentially as described by Perlín et al. [19]. Following a low speed ($418 \times g$ for 3 min) centrifugation for removal of unbroken cells and large debris, the lysate was sequentially spun at medium speed (two times $24\,000 \times g$ for 20 min) and high speed ($135\,000 \times g$ for 1 h). The resulting pellets were resuspended in the original volume of homogenization buffer by use of a Potter-Elvehjem tissue grinder and stored at -80°C . Alternatively, the $24\,000 \times g$ pellet was resuspended at $1400 \text{ OD}_{600}/\text{ml}$ in 50 mM MOPS, pH 7.5, 0.3 M sucrose, 1 mM CaCl_2 in order to concentrate the Ca^{2+} -ATPase for functional assays. Protease inhibitors were included in the homogenization buffer and in all subsequent steps at the following concentrations: diisopropyl fluorophosphate, 1 mM; chymostatin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; and leupeptin, pepstatin and aprotinin, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each.

2.4. Sucrose gradient fractionation

Yeast lysates were fractionated by sucrose gradient centrifugation essentially as described by Antebi and Fink [20].

2.5. Isolation of secretory vesicles

Secretory vesicles were isolated as described by Ambesi et al. [21], using *sec*-deficient cells expressing either wild-type Ca^{2+} -ATPase or N-tagged Ca^{2+} -ATPase.

2.6. Protein methods and enzyme assays

Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. [22] using bovine serum albumin as a standard. Guanosine diphosphatase was assayed according to Abeijon et al. [23]. NADPH-cytochrome *c* reductase was assayed as described by Feldman et al. [24]. Vanadate-sensitive H^+ -ATPase

activity was measured as described by Nakamoto et al. [16].

2.7. Electrophoretic and immunological methods

For Western blots, electrotransfer of proteins from SDS gels to nitrocellulose membranes and blocking with non-fat milk were performed according to standard procedures [25]. Monoclonal antibody against rabbit SR Ca^{2+} -ATPase (A52) was diluted 1:2000 and detected with the ECL-luminol kit (Amersham-Pharmacia). For quantitative dot-blots one of the following antibodies was used: monoclonal antibody A52 (1:2000 dilution), yeast endoplasmic reticulum BiP/Kar2 antiserum [26] (1:5000 dilution) or a polyclonal antibody against *Neurospora crassa* plasma membrane H^+ -ATPase [27] (1:2000 dilution). Following incubation with 2 μCi protein A- ^{125}I for 2 h, the bound antibodies were detected by exposure to an autoradiography film (Hyperfilm/Amersham-Pharmacia). The relative amounts of Ca^{2+} -ATPase, BiP/Kar2 or H^+ -ATPase present in each fraction, expressed in integrated optical density units (IOD), were determined using the ImageMaster VDS densitometer and software (Amersham-Pharmacia). Quantitation of expressed Ca^{2+} -ATPase was estimated by comparison with SR Ca^{2+} -ATPase purified from rabbit muscle and spotted on the dot-blot membranes.

2.8. Immunofluorescence microscopy

Fixation and immunofluorescent staining of induced yeast cells were performed essentially as described by Pringle et al. [28]. The slides were incubated overnight with a mouse monoclonal antibody against rabbit SR Ca^{2+} -ATPase (mAb Cl-30) diluted 1:30 plus rabbit polyclonal antibody against yeast endoplasmic reticulum BiP/Kar2 diluted 1:1000. After 2 h incubation with secondary antibodies (Sigma, USA) against mouse IgG labelled with tetramethyl-rhodamine isothiocyanate and rabbit IgG labelled with fluorescein isothiocyanate (diluted 1:300), the slides were mounted with *p*-phenylenediamine. Fluorescence and differential interference contrast images were acquired using a Zeiss PlanApocho-

matic 100 1.4 NA objective on a Zeiss Axiovert 100 microscope attached to a Bio-Rad MRC-1024 UV confocal laser scanning system.

2.9. Immunoprecipitation of SR Ca^{2+} -ATPase

The 24000 g yeast membrane fraction described in Section 2.3 was used for detergent solubilization and immunoprecipitation of heterologous Ca^{2+} -ATPase as described by Skerjanc et al. [5] using 3 mg of a monoclonal antibody raised against rabbit SR Ca^{2+} -ATPase (mAb Cl-30) and 30 μl protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia).

2.10. Phosphoenzyme formation and turnover

Phosphoenzyme formation was carried out by incubation of the immunoprecipitated Ca^{2+} -ATPase in 30 μl of phosphorylation buffer (50 mM MOPS, pH 6.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , 1 mg/ml C_{12}E_8 , 0.5 mg/ml asolectin) containing 10 μM [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP and 100 μM CaCl_2 for 10 s at 4°C, as described by Clarke et al. [4]. The phosphorylation reaction was stopped by addition of 0.5 ml ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA) and acid-washed by centrifugation as described [4]. When indicated in Section 3, addition of 100 μl of phosphorylation buffer containing 250 μM cold ATP before stopping the reaction with acid was performed to determine the decay rate of phosphoenzyme intermediate. Following separation by acidic SDS-PAGE [4] the E- ^{32}P intermediate was detected by autoradiography.

3. Results

3.1. Effect of N-terminal sequence tags on SR Ca^{2+} -ATPase expression

The first goal of this study was to ask whether modification of the N-terminus would affect the expression of SR Ca^{2+} -ATPase in yeast. To that end, an 88 amino acid sequence from yeast *PMA1* [18] stretching from the initial methionine to the N-terminal conserved consensus Gly-Leu of P-type ATPases was either substituted for the 24 amino residues of SR Ca^{2+} -ATPase ($\text{H}^+\Delta\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) or fused to

Fig. 1. Expression of N-terminal-tagged Ca^{2+} -ATPase. Total lysates from induced cells expressing wild-type SR Ca^{2+} -ATPase (WT), hexahistidine-tagged Ca^{2+} -ATPase (6 His), additive chimeric $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ATPase (H/Ca) or replacement $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ATPase ($\text{H}^+\Delta\text{Ca}$) were analyzed by Western blotting. Lysate from yeast transformed with an empty plasmid served as a negative control (C), and 0.5 μg of Ca^{2+} -ATPase purified from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum served as a positive control (SR). Samples of 20 μg or 50 μg of total yeast protein were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Recombinant Ca^{2+} -ATPase was detected by immunoblot using a monoclonal antibody specific for fast-twitch Ca^{2+} -ATPase and a peroxidase-conjugated secondary antibody.

the initial methionine of SR Ca^{2+} -ATPase ($\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase). To test the effect of an unrelated sequence upon Ca^{2+} -ATPase expression, a 24 amino acid sequence containing a hexahistidine motif (plus a spacer region and a protease cleavage site) was added to the N-terminus of the SR Ca^{2+} -ATPase (6 His- Ca^{2+} -ATPase). The cDNAs encoding $\text{H}^+\Delta\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ATPase and 6 His- Ca^{2+} -ATPase fusion proteins were cloned into pSVA12 to give plasmids pSVA21, pVVL1 and pARF1, respectively. NY605 cells were transformed with these plasmids, grown at 23°C, and shifted to 37°C for induction. After 2 h of incubation at 37°C, total lysates were analyzed by Western blotting with an anti- Ca^{2+} -ATPase monoclonal antibody and a peroxidase-conjugated secondary antibody.

Both $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and 6 His- Ca^{2+} -ATPase were expressed with the expected size and displayed no significant degradation (Fig. 1, lanes H/Ca and 6 His). Conversely, there was no detectable expression of the $\text{H}^+\Delta\text{Ca}^{2+}$ -ATPase chimera (Fig. 1,

H Δ Ca). No Ca²⁺-ATPase could be detected in the empty plasmid control (Fig. 1, lane C), confirming that the monoclonal antibody was specific for recombinant Ca²⁺-ATPases and did not cross-react with endogenous yeast ATPases. Inspection of the intensity of the bands when equal amounts of total protein were applied in the gel suggested that the Ca²⁺-ATPase chimeras were expressed at a much higher level than wild-type Ca²⁺-ATPase produced in the same conditions (Fig. 1, lanes WT, H/Ca and 6 $\times$ His). Indeed, quantitative dot-blots described in detail in Section 3.2 showed a three-fold higher level of expression of the chimeras when compared with wild-type Ca²⁺-ATPase, making clear that the electrotransfer used in the Western blot was not quantitative.

3.2. Recovery of wild-type and chimeric Ca²⁺-ATPase in yeast membrane fractions

The amount of wild-type SR Ca²⁺-ATPase per liter of induced yeast culture, as determined by quantitative dot-blotting, averaged 348 ± 58 μ g, corresponding to approximately 0.3% of the protein present in the total yeast lysate (Table 1, panel A). Proper membrane insertion of SR Ca²⁺-ATPase constructs was evaluated by the measurement of Ca²⁺-ATPase recovery within yeast membrane fractions

sedimenting with medium-speed (24 000 $\times g$) or high-speed (135 000 $\times g$) velocities. After removal of large cellular debris by low-speed centrifugation (418 $\times g$), 89% of the remaining SR Ca²⁺-ATPase was recovered in the 24 000 $\times g$ pellet, where it amounted to 2% of the protein present in that fraction. Further centrifugation at 135 000 $\times g$ recovered an additional 7% of Ca²⁺-ATPase (Table 1, panel A).

Quantitative dot-blotting of H⁺/Ca²⁺-ATPase and 6 $\times$ His-Ca²⁺-ATPase revealed that both chimeras were expressed at an elevated level of 850 μ g/l of yeast culture (Table 1, panels B and C), corresponding to 1% of the protein present in total yeast lysate. When 418 $\times g$ supernatants were fractionated, 61 and 53% of the remaining Ca²⁺-ATPase was recovered in the 24 000 $\times g$ pellet for H⁺/Ca²⁺-ATPase and 6 $\times$ His-Ca²⁺-ATPase, respectively (Table 1, panels B and C). The N-tagged Ca²⁺-ATPase chimeras amounted to 6–7% of the total protein present in the 24 000 $\times g$ membrane pellet (Table 1, panels B and C). Further centrifugation of the 24 000 $\times g$ supernatant at 135 000 $\times g$ recovered an additional 13 and 18% of the chimeric Ca²⁺-ATPases (Table 1, panels B and C).

Thus, the majority of both wild-type and N-terminal-tagged Ca²⁺-ATPase was recovered in the 24 000 $\times g$ pellet fraction. The addition of either

Table 1
Recovery of heterologous rabbit Ca²⁺-ATPase on yeast membrane fractions

Fraction	Yield ^a (μ g/l)	Ca ²⁺ -ATPase recovery	mg of Ca ²⁺ -ATPase per mg of total protein
A: wt Ca²⁺-ATPase			
Total lysate	348 ± 58 (4)	–	0.003
S 418 $\times g$	308 ± 34 (4)	1	0.003
P 24 000 $\times g$	275 ± 55 (4)	0.89	0.02
P 135 000 $\times g$	21 ± 11 (4)	0.07	0.01
B: H⁺/Ca²⁺-ATPase			
Total lysate	854 ± 51 (2)	–	0.01
S 418 $\times g$	756 ± 68 (2)	1	0.01
P 24 000 $\times g$	401 ± 55 (2)	0.61	0.07
P 135 000 $\times g$	137 ± 17 (2)	0.13	0.03
C: 6$\times$His-Ca²⁺-ATPase			
Total lysate	840 ± 76 (3)	–	0.01
S 418 $\times g$	729 ± 95 (3)	1	0.01
P 24 000 $\times g$	445 ± 53 (3)	0.53	0.06
P 135 000 $\times g$	92 ± 8 (3)	0.18	0.03

^aYield refers to μ g of recombinant Ca²⁺-ATPase produced per liter of induced yeast cell culture which corresponded to approximately 700 OD₆₀₀ units. Ca²⁺-ATPase content in each fraction was determined by quantitative dot-blot using a monoclonal antibody against rabbit Ca²⁺-ATPase and ¹²⁵I-protein A.

Fig. 2. Distribution of rabbit Ca^{2+} -ATPase and marker enzymes on a sucrose gradient. Yeast lysates prepared from induced cells transformed with plasmids containing the cDNA for wild-type SR Ca^{2+} -ATPase or N-tagged- Ca^{2+} -ATPase were fractionated by centrifugation on a discontinuous sucrose density gradient (15–60%). Gradient fractions of 1.5 ml were collected from top (fraction 1) to bottom (fraction 21) and assayed as described in Section 2 (A) Wild-type Ca^{2+} -ATPase (○), $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (◆), 6xHis- Ca^{2+} -ATPase (●). (B) BiP/Kar2 (■) and NADPH-cytochrome *c* reductase (□) (endoplasmic reticulum markers). (C) GDPase (△) (Golgi marker) and H^{+} -ATPase (▲) (plasma membrane marker)

Fig. 3. Double-immunofluorescence localization of rabbit SR Ca^{2+} -ATPase expressed in yeast. Yeast cells expressing wild-type Ca^{2+} -ATPase (A), $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ chimeric ATPase (B) or hexahistidine-tagged Ca^{2+} -ATPase (C) were fixed in 4% formaldehyde, converted to spheroplasts and immobilized on glass slides. The slides were incubated with mouse monoclonal antibody CI-30 against SR Ca^{2+} -ATPase (dilution 1:30) plus rabbit polyclonal antibody against yeast BiP/Kar2 endoplasmic reticulum marker (dilution 1:1000) followed by rhodamine-conjugated anti-mouse secondary antibody (dilution 1:300) plus fluorescein-conjugated anti-rabbit secondary antibody (dilution 1:300). Yeast cells transformed with an empty plasmid were treated likewise and used as a negative control (D). Image acquisition was performed on an MRC-1024 Bio-Rad confocal laser microscope. Rhodamine fluorescence is shown in red, fluorescein is shown in green and they are superimposed on differential interference contrast gray images to highlight the cell contours. Calibration bars are in μm .

H^{+} -ATPase or hexahistidine N-terminal sequences caused a 2–3-fold increase in the amount of Ca^{2+} -ATPase present in total yeast lysates and a three-fold increase in the enrichment of SR Ca^{2+} -ATPase in the 24000 g pellet fraction (going from 2% to 7% of total protein, see Table 1).

3.3. Localization of wild-type and chimeric SR Ca^{2+} -ATPase on yeast internal membranes

To determine the subcellular location of wild-type and chimeric SR Ca^{2+} -ATPase, transformed yeast cells were subjected to heat shock for 90 min, and

total lysates were fractionated by equilibrium centrifugation through a 15–60% discontinuous sucrose gradient. In Fig. 2, the fractionation profiles of wild-type and N-tagged Ca^{2+} -ATPase (panel A) were compared to the profiles of several yeast sub-cellular markers (panels B and C). Wild-type Ca^{2+} -ATPase co-sedimented with the ER marker NADPH-cytochrome *c* reductase, both displaying peaks in fraction 18 of the gradient (Fig. 2A,B). As expected, the wild-type Ca^{2+} -ATPase peak displayed a significant overlap with another ER marker, BiP/Kar2, that exhibited its typical bimodal distribution [29], with peaks in fractions 13 and 17 (Fig. 2B). The ATPase was well separated from GDPase activity, which served as a Golgi marker (Fig. 2C), but co-sedimented with vanadate-sensitive H^{+} -ATPase activity, a plasma membrane marker (Fig. 2C).

Curiously, both $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase- and $6\times\text{His}$ - Ca^{2+} -ATPase-containing fractions exhibited a significant shift towards lighter regions of the gradient, as compared with wild-type Ca^{2+} -ATPase. Both chimeras displayed a predominant peak in fraction 13 (Fig. 2A), which co-sedimented with a light fraction of the ER marker BiP/Kar2 (Fig. 2B). A small, secondary peak containing chimeric Ca^{2+} -ATPase was recovered together with a heavy fraction of ER marker BiP/Kar2 in fraction 17 (Fig. 2A,B).

Next, immunofluorescence confocal laser microscopy was carried out to see whether the wild-type SR Ca^{2+} -ATPase was predominantly localized in the ER compartment or on the plasma membrane. Induced spheroplasts were double-labeled with a

mouse anti- Ca^{2+} -ATPase monoclonal antibody and a rabbit polyclonal antiserum raised against ER marker BiP/Kar2. Following incubation with both rhodamine-conjugated anti-mouse IgG and fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG, a significant yellow fluorescence signal resulting from the overlay of red (rhodamine-labeled Ca^{2+} -ATPase) and green (fluorescein-labeled BiP/Kar2) fluorescence could be detected in internal organelles, with little if any labeling at the cell periphery (Fig. 3A). This observation suggests the co-localization of wild-type Ca^{2+} -ATPase with BiP/Kar2 and is consistent with the idea that the recombinant enzyme is located in the ER. Sub-cellular localization of SR Ca^{2+} -ATPase chimeras was also evaluated by immunofluorescence confocal laser microscopy. A stronger yellow to orange immunofluorescence signal was observed in cells expressing either $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase or $6\times\text{His}$ - Ca^{2+} -ATPase when compared with cells expressing wild-type Ca^{2+} -ATPase (Fig. 3A–C), correlating with the higher expression level seen by quantitative immunoblotting. The distribution of ATPase was somewhat heterogeneous and spread over much of the cytoplasm (Fig. 3A–C).

Expression in a secretory-deficient yeast strain (SY2) was devised as a conclusive test to see whether any SR Ca^{2+} -ATPase was able to move out of the ER. Upon shifting to 37°C , these cells accumulate secretory vesicles, which can be isolated and assayed for proteins en route to the plasma membrane [30]. In the experiment of Table 2, SY2 cells were transformed with plasmids pSVA12, pVVL1 or pARF1

Table 2
Recovery^a of wild-type and chimeric SR Ca^{2+} -ATPase in yeast secretory vesicles

Fraction	Ca ²⁺ -ATPase						Plasma membrane H ⁺ -ATPase (%)	Endoplasmic reticulum Kar2 (%)
	wt		H ⁺ /Ca ²⁺		6 × His			
	IOD ^b	%	IOD	%	IOD	%		
Total lysate	8 656	-	15 200	-	45 016	-	-	-
Clarified lysate	528	100	760	100	1 576	100	100	100
High-speed pellet	156	30	699	84	1 271	81	75	20
Secretory vesicles	43	9	167	20	277	18	56	8

Clarified lysate is the supernatant of a $14\,500\times g$ centrifugation of the total lysate and High-speed pellet is obtained by a $100\,000\times g$ centrifugation of the clarified lysate as described in Section 2. Secretory vesicles were prepared from the high-speed pellet by sucrose gradient fractionation according to Ambesi et al. [21].

^aRecovery of Ca^{2+} -ATPase, H^{+} -ATPase and Kar2 in each step of secretory vesicle preparation was assayed by quantitative dot-blotting using specific monoclonal or polyclonal antibodies and ^{125}I -protein A (see Section 2).

^bIntegrated optical density units

and Ca^{2+} -ATPase expression was induced by a temperature shift to 37°C for 2 h. Secretory vesicles were then isolated and assayed for Ca^{2+} -ATPase by quantitative dot-blotting. As summarized in Table 2, only 9% of the wild-type SR Ca^{2+} -ATPase present in the clarified lysate was recovered in the secretory vesicles. This value is very similar to the 8% recovery of the ER marker BiP/Kar2 and substantially lower than the 56% recovery of plasma membrane H^+ -ATPase. Thus, it is likely that the trace amounts of SR Ca^{2+} -ATPase in the secretory vesicle fraction represent contamination with fragments of ER, and that little if any ATPase is able to exit the ER under the conditions of these experiments. As with wild-type Ca^{2+} -ATPase, *sec*-deficient cells expressing either $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase or 6 His- Ca^{2+} -ATPase were used to evaluate the ability of chimeric Ca^{2+} -ATPase to exit the ER (Table 2). There was a two-fold increase in the recovery of $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and 6 His- Ca^{2+} -ATPase in the secretory vesicles fraction (18% and 20%) as compared with the wild-type control (9%) (Table 2). It is worth mentioning that the clarified lysate supernatant prepared according to the standard procedure for isolation of secretory vesicles [21] contained only a small fraction of the Ca^{2+} -ATPase present in the total lysate for both wild-type and chimeric Ca^{2+} -ATPase constructs (see Total lysate and Clarified lysate in Table 2). This indicates that most of the expressed SR Ca^{2+} -ATPase was discarded within the heavy fraction that sedimented at $14\,500\text{ g}$ when preparing the clarified lysate (Table 2). Thus, the overall recovery of either wild-type or chimeric SR Ca^{2+} -ATPase in the secretory vesicle fractions was quite small, corresponding to approximately 0.5–1.1% of the total Ca^{2+} -ATPase initially present in the crude lysates (see Total lysate and Secretory vesicles in Table 2).

3.4. Phosphoenzyme formation and turnover of wild-type and chimeric Ca^{2+} -ATPase

To determine whether the chimeric Ca^{2+} -ATPase expressed in yeast was functional, enriched membranes recovered within the $24\,000\text{ g}$ pellet were assayed for the ability to form the characteristic β -aspartyl phosphate intermediate upon incubation with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. For this purpose, the method of Skerjanc et al. [5] was used, in which Ca^{2+} -ATPase is first

Fig. 4. Phosphorylation and phosphoenzyme decay of wild-type and N-terminal-tagged SR Ca^{2+} -ATPase. Yeast membrane fractions enriched in recombinant SR Ca^{2+} -ATPase were prepared from cells expressing either wild-type Ca^{2+} -ATPase (A and B), hexahistidine-tagged Ca^{2+} -ATPase (C and D) or $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ chimeric ATPase (E and F) as described in Section 2. Aliquots containing 1 mg of total protein were collected and Ca^{2+} -ATPase was solubilized and immunoprecipitated as described in Section 2. Maximal levels of phosphoenzyme intermediate (EP) were measured (A, C and E) by reacting the immunoprecipitated ATPase on ice for 10 s in a medium containing 50 mM MOPS, pH 6.5, 80 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , 1 mg/ml C_{12}E_8 , 0.5 mg/ml asolectin, 30% glycerol, 10 μM ATP and 40 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Reactions were stopped by addition of 10% TCA. Phosphoenzyme intermediate was detected after separation of samples on a 6% acrylamide acidic gel and exposure to an X-ray film. Yeast cells transformed with an empty plasmid were used as a negative control (N). Decay of phosphoenzyme (B, D and F) was measured by reacting the ATPase with radioactive ATP for 10 s as described above, followed by addition of 250 mM of non-radioactive ATP. Phosphorylation reaction was stopped by addition of 10% TCA after incubation with non-radioactive ATP for either 0, 5 or 10 s as indicated in the figure.

immunoprecipitated, then phosphorylated and separated by acid gel electrophoresis. In the present work, chimeric Ca^{2+} -ATPase was solubilized from enriched yeast membrane fractions with the non-ionic detergent C_{12}E_8 and immunoprecipitated with anti- Ca^{2+} -ATPase monoclonal antibody and protein A-Sepharose. Wild-type Ca^{2+} -ATPase was used as a control in parallel (Fig. 4A). The immune complex was able to form a phosphoenzyme intermediate upon incubation with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in the presence of micromolar amounts of Ca^{2+} (Fig. 4A, lane EP). No band was seen in samples from control cells transformed with an empty plasmid vector (Fig. 4A, lane N). When the phosphorylated SR Ca^{2+} -ATPase was

chased with excess cold ATP, the phosphoenzyme diminished in 5 s and had virtually disappeared by 10 s (Fig. 4B), indicating that it is capable of rapid turnover. Likewise, the ability of chimeric Ca^{2+} -ATPase to form a phosphorylated intermediate was tested by reacting detergent-solubilized and immunoprecipitated samples with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. An acid-stable phosphoenzyme intermediate was detected for both $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and $6\times\text{His}\text{-Ca}^{2+}$ -ATPase after acid gel electrophoresis and autoradiography (Fig. 4C,E, lane EP). The rate of decay of the phosphoenzyme intermediate was similar to that of wild-type ATPase, and no radioactive band was detected after a 10 s chase with non-radioactive ATP (Fig. 4D,F).

4. Discussion

In this work, we demonstrate that the bulk of wild-type SR Ca^{2+} -ATPase expressed in yeast under control of a heat shock promoter accumulates in a heavy fraction of ER membranes. The addition of the N-terminal portion of H^{+} -ATPase to the N-terminal end of SR Ca^{2+} -ATPase improved the ability of chimeric $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase to move along the secretory pathway, allowing it to accumulate in a light ER membrane fraction (Fig. 2) which has been associated in the literature with the smooth ER [31]. Interestingly, Degand et al. [7] observed in a recent work that the wild-type SR Ca^{2+} -ATPase expressed under control of the constitutive yeast PMA1 promoter accumulated in a light fraction of yeast ER. It is possible that the location of wild-type SR Ca^{2+} -ATPase in distinct ER subcompartments in each work is related to the different promoters employed.

When *sec*-deficient cells were transformed with either the $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase or the hexahistidine-tagged Ca^{2+} -ATPase cDNA, a two-fold increase in the amount of chimeric ATPase was found in secretory vesicles, as compared to wild-type enzyme. The increase can be accounted for by the presence of contaminant ER in the secretory vesicles fraction, as seen by detection of Kar2 ER marker in this fraction (Table 2).

A distinct shift was observed in the localization of chimeric ATPase, which accumulated predominantly in light ER, as opposed to wild-type ATPase that accumulated in heavy ER fractions. Since this effect

was seen for both $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase or the hexahistidine-tagged Ca^{2+} -ATPase chimeras, a general effect of partial disruption of ER retention determinants, rather than one exerted by a particular targeting sequence present in the H^{+} -ATPase N-terminal portion (such as the conserved motif DDDIDALIEEL [10,32]), is probably responsible for the increased progression of the chimeric Ca^{2+} -ATPases along yeast ER. Conceivably, the addition of either H^{+} -ATPase or hexahistidine tags partially disrupts the ER retention signals present in native SR Ca^{2+} -ATPase. In this case, the chimeric Ca^{2+} -ATPases would accumulate in additional subcompartments of yeast ER, which may explain the remarkable three-fold increase in the overall expression level of both chimeras when compared with wild-type Ca^{2+} -ATPase. On the other hand, further progression along the secretory pathway is limited by the presence of additional ER retention signals located elsewhere in the Ca^{2+} -ATPase polypeptide, most likely within its first two transmembrane segments [33]. Recently, Boxembaum et al. [34] have obtained strong evidence indicating that the N-terminal region interacts with the first cytoplasmic loop, and eventually with the large cytoplasmic loop, to modulate the equilibrium kinetics of the $\text{Na}^{+},\text{K}^{+}$ -ATPase. The existence of analogous interactions in the SR Ca^{2+} -ATPase could provide the structural basis to explain the lack of ATPase activity in a truncated Ca^{2+} -ATPase chimera in which this domain was deleted [35].

We found that the corresponding region of yeast plasma membrane H^{+} -ATPase could not replace the N-terminal cytoplasmic moiety of SR Ca^{2+} -ATPase. The lack of expression of the deleted chimera points to the absence of functional conservation between the N-terminal domains of these two P-type cation-transporting ATPases. Previous findings from Skerjanc et al. [35] demonstrated that the removal of 32 N-terminal residues produced a non-functional ATPase but did not affect Ca^{2+} -ATPase expression and assembly in COS-1 cells. It is probable that the removal of 24 N-terminal residues from the Ca^{2+} -ATPase and its replacement with 88 N-terminal residues of yeast H^{+} -ATPase, as done in the chimeric $\text{H}^{+}\Delta\text{Ca}^{2+}$ -ATPase construct, resulted in a misfolded enzyme and prevented the stable expression in yeast.

The quantitative recovery of wild-type and chimeric Ca^{2+} -ATPase in yeast membrane fractions follow-

ing medium- and high-speed centrifugations indicated that most of the recombinant Ca^{2+} -ATPase was inserted into the membrane. Moreover, both wild-type and chimeric Ca^{2+} -ATPases were functional as demonstrated by their ability to form a phosphorylated intermediate in the presence of ATP and Ca^{2+} and to undergo fast turnover. This evidence reinforces the assumption that targeting of the recombinant constructs was not limited by inadequate folding of the chimeric Ca^{2+} -ATPases. It should be noted that a fraction containing 25–30% of the chimeric Ca^{2+} -ATPase was not recovered by high-speed centrifugation and represents a portion of the expressed Ca^{2+} -ATPase that is not fully integrated in yeast membranes.

The modification of the SR Ca^{2+} -ATPase by addition of amino-terminal tags described in this work led to a three-fold increase in the amount of recombinant protein produced in yeast and a seven-fold increase in the enrichment of SR Ca^{2+} -ATPase in ER fractions, where it amounted to 7% of the total protein. This is similar to results reported for COS-1 microsomes, where expressed SR Ca^{2+} -ATPase typically represents 5% of membrane protein [3]. Thus, this approach may be useful to increase the yield of P-type ATPases [36,37] or other heterologously expressed integral membrane proteins [38] that are largely retained in the yeast ER. Additionally, the expression of functional N-terminal-tagged SR Ca^{2+} -ATPase constructs, such as the $6 \times \text{His}$ - Ca^{2+} -ATPase, paves the way for the development of a SR Ca^{2+} -ATPase purification scheme based on metal-chelating affinity chromatography [39–41].

Acknowledgements

We thank Dr. David H. MacLennan, University of Toronto, for supplying the Ca^{2+} -ATPase SERCA1 cDNA and the A52 monoclonal antibody, Dr. Mark D. Rose, Princeton University, for supplying the anti-BiP/Kar2 polyclonal antibody, Dr. Radovan Borojevic and Flavio Braga, Universidade Federal do Rio de Janeiro, for producing monoclonal antibody Cl-30 and Dr. Renato A. Mortara and Roberto Tedesco, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, for use of confocal microscopy facilities and technical expertise. This work was supported by grants

from FAPESP and CNPq (to S.V.A.) and NIH-FIRCA (to C.W.S. and S.V.A.).

References

- [1] D.H. MacLennan, *Biophys. J.* 58 (1990) 1355–1365.
- [2] D.H. MacLennan, W.J. Rice, N.M.J. Green, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 28815–28818.
- [3] K. Maruyama, D.H. MacLennan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 3314–3318.
- [4] D.M. Clarke, T.W. Loo, G. Inesi, D.H. MacLennan, *Nature* 339 (1989) 476–478.
- [5] I.S. Skerjanc, T. Toyofuku, C. Richardson, D.H. MacLennan, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 15944–15950.
- [6] F. Centeno, S. Deschamps, A.M. Lompr, M. Anger, M.J. Moutin, Y. Dupont, P. Gjedde, J.M. Villalba, J.V. Moller, P. Falson, M. le Maire, *FEBS Lett.* 354 (1994) 117–122.
- [7] I. Degand, P. Catty, E. Talla, D. Thines-Sempoux, A.D. d'Exaerde, A. Goffeau, M. Ghislain, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 545–556.
- [8] E.M.R. Reis, C.W. Slayman, S. Verjovski-Almeida, *Biosci. Rep.* 16 (1996) 107–113.
- [9] E.M.R. Reis, P.J.C. Biselli, S. Verjovski-Almeida, *Annals of the Annual Meeting of the Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 1996, p. 121 (Abstract).
- [10] F. Portillo, I.F. de Larrinoa, R. Serrano, *FEBS Lett.* 247 (1989) 381–385.
- [11] R. Elble, *BioTechniques* 13 (1992) 18–20.
- [12] D.H. MacLennan, C.J. Brandl, B. Korczak, N.M. Green, *Nature* 316 (1985) 696–700.
- [13] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [14] M. Kozak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 8301–8305.
- [15] R. Gietz, A. Sugino, *Gene* 74 (1988) 527–534.
- [16] R.K. Nakamoto, R. Rao, C.W. Slayman, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 7940–7949.
- [17] E. Capieaux, M.-L. Vignais, A. Sentenac, A. Goffeau, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 7437–7446.
- [18] R. Serrano, M.C. Kielland-Brandt, G.R. Fink, *Nature* 319 (1986) 689–693.
- [19] D.S. Perlin, S.L. Harris, D. Seto-Young, J.E. Haber, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 21857–21864.
- [20] A. Antebi, G.R. Fink, *Mol. Biol. Cell* 3 (1992) 633–654.
- [21] A. Ambesi, K.E. Allen, C.W. Slayman, *Anal. Biochem.* 251 (1997) 127–129.
- [22] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [23] C. Abcijn, P. Orlean, P.W. Robbins, C.B. Hirschberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 6935–6939.
- [24] R.I. Feldman, M. Bernstein, R. Schekman, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9332–9339.
- [25] E. Harlow, D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*.

- Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- [26] M.D. Rose, L.M. Misra, J.P. Vogel, *Cell* 57 (1989) 1211–1221.
- [27] K.M. Hager, S.M. Mandala, J.W. Davenport, D.W. Speicher, E.J. Benz Jr., C.W. Slayman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7693–7697.
- [28] J.R. Pringle, A.E.M. Adams, D.G. Drubin, B.K. Haarer, *Methods Enzymol.* 194 (1991) 565–602.
- [29] C.M. Sanderson, J.S. Crowe, D.I. Meyer, *J. Cell Biol.* 111 (1990) 2861–2870.
- [30] N.C. Walworth, P.J. Novick, *J. Cell Biol.* 105 (1987) 163–174.
- [31] C.M. Sanderson, D.I. Meyer, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13423–13430.
- [32] R. Serrano, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 (1989) 61–94.
- [33] D. Foletti, D. Guerini, E. Carafoli, *FASEB J.* 9 (1995) 670–680.
- [34] N. Boxenbaum, S.E. Daly, Z.Z. Javadi, L.K. Lane, R. Blostein, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 23086–23092.
- [35] I.S. Skerjanc, D.M. Clarke, T.W. Loo, D.H. MacLennan, *FEBS Lett.* 336 (1993) 168–170.
- [36] J.M. Villalba, M.G. Palmgren, G.E. Berberian, C. Ferguson, R. Serrano, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 12341–12349.
- [37] A. Kerchova d'Exaerde, P. Supply, J. Dufour, P. Bogaerts, D. Thinès, A. Goffeau, M. Boutry, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 23828–23837.
- [38] K. Kuchler, J. Thorner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 2302–2306.
- [39] J. Crowe, H. Dobeli, R. Gentz, E. Hochuli, D. Stuber, K. Henco, *Methods Mol. Biol.* 31 (1994) 371–387.
- [40] F.C. Lanfermeijer, K. Venema, M.G. Palmgren, *Protein Express. Purif.* 12 (1998) 29–37.
- [41] I. Sekler, R. Kopito, J.R. Casey, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21028–21034.