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

**Reconstituição da Anexina V em sistemas de lipossomos:
associação com a Fosfatase Alcalina e correlação com
estudos de biomineralização**

Me. Maytê Bolean

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

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

Reconstituição da Anexina V em sistemas de lipossomos: associação com a Fosfatase Alcalina e correlação com estudos de biomineralização

Me. Maytê Bolean

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Bolean, Maytê

Reconstituição da Anexina V em sistemas de lipossomos: associação com a Fosfatase Alcalina e correlação com estudos de biomineralização. Ribeirão Preto, 2014.

p. 147

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Ciancaglini, Pietro

1.Anexina V 2. Fosfatase Alcalina 3.Biomineralização 4.Proteolipossomos

Agradecimentos especiais

Tiago

Obrigada por fazer tudo parecer bem mais simples e prático do que parece aos meus olhos.

Obrigada pela tranquilidade e dedicação proporcionadas durante os 6 meses em que estive nos EUA. Tenha a certeza que você foi meu alicerce e que eu não conseguiria sem seu apoio!

Obrigada pelas prévias assistidas, pelo amor e carinho dedicados a mim a cada dia, em fim por fazer parte da minha vida por tanto tempo e com tanta intensidade e por sempre estar ao meu lado me ajudando a construir esta história.

Seu incentivo e companheirismo me fortalecem e me fazem encarar os obstáculos como oportunidades de crescimento.

Sou honrada em tê-lo ao meu lado

Dedico a você esta Tese

Te Amo!!!

Com todo o meu amor, hoje e sempre.

Aos meus Pais

Pai, sua mente aguçada e ávida pelo conhecimento sempre me intrigaram e me inspiraram a ser algo a mais.

Obrigada pelo pai carinhoso e dedicado que você é!

Você é meu primeiro Mestre, Mestre em Química, em amor incondicional, em ser humano.

Mãe, você é minha fortaleza, minha amiga, minha confidente e minha principal encorajadora.

Você me proporcionou tranquilidade para estudar, me norteou nos momentos de indecisões e festejou comigo a cada conquista, me esperou por horas no skype e conversou por horas também enquanto estive fora.

Você me inspira a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Obrigada pela pessoa linda e doce que você é!

Dedico a vocês Armenak e Elisabeth este trabalho!

Amo vocês!!!

Minhas irmãs queridas Soraia e Thais

*Obrigada por sempre estarem presentes em minha vida, pelo amor
de irmãs e amigas dedicado dia-a-dia e por às vezes me tirarem
um pouco da faculdade em nossos almoços semanais,
trazendo-me um pouco para a realidade.
Vocês são essenciais em minha vida!!!*

*Vózinha Mercedes, a senhora é um exemplo de vida pra mim.
Amo muito a senhora!!!*

Caio, Lucas e Rafa

*Vocês enchem o meu coração de luz e alegria.
Obrigada por estarem na minha vida.*

Aslan e Fiona

*Meus filhotes queridos e anjos da guarda que só me
proporcionam alegria e amor incondicional.*

Pietro

Foi gratificante tê-lo como professor durante estes 11 anos de trabalho. Além de um profissional excepcional, seu lado humano e ético dignifica nossa profissão.

Obrigada pela confiança depositada em mim, pelos conselhos que me nortearam nos momentos de indecisão, pelo incentivo nos momentos de dúvida, pela paciência e carinho dedicados enquanto estive fora, pelas risadas, amizade e companheirismo adquiridos durante todos estes anos.

É um privilégio chamá-lo de amigo.

Obrigada por tudo!!!

Agradecimentos

*Primeiramente agradeço a **Deus** por ter me confiado esta oportunidade de vida, de crescimento profissional e amadurecimento pessoal.*

*Ao **Prof. Dr. José Luís Millán**, pela colaboração neste projeto e por me receber tão bem durante os 6 meses de Doutorado Sanduíche no Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, Califórnia, EUA.*

*À **Profª Drª. Rosangela Itri** pela colaboração e por me receber em seu laboratório.*

*Ao **Prof. Dr. Marc F. Hoylaerts**, pela colaboração e apoio científico.*

*Aos amigos do laboratório de Sistemas Miméticos de Membrana: **Ana, Bruno, Daniela, Juliana, Tuanny, Heitor, Amanda, Simone, Camila, Larissa**. Obrigada pela amizade, companheirismo nas horas de sufoco e risadas nos momentos de alegria. É um privilégio aprender juntos com vocês. À amiga **Carol** que agora segue sua carreira em outra universidade, mas que muita falta me faz no dia a dia do lab.*

*Aos amigos do Burnham: **Sonoko, Manisha, Tina, Pia, Campbell, Kellen, Erick, Daril, Rafael, Seiko, Viviana e Irvin**. Foram meses inesquecíveis e compartilhados com pessoas especiais. Agradeço pela ajuda técnica e pela agradável convivência.*

*Aos colegas **Andreza, Helena e Omar**, pela ajuda técnica com as análises de GUVs e pela agradável companhia durante os experimentos realizados em SP.*

***Nilton**, obrigada pela constante ajuda no laboratório e pelas informações sempre atualizadas sobre nosso Grande Poderoso Tímão, Coríntios.*

***Janaína**, pelo apoio no laboratório.*

***Drª. Ivana Aparecida Borin**, obrigada pela competência que você emprega em tudo que faz e pela ajuda com as lindas análises de AFM.*

Aos docentes, técnicos, funcionários e demais pessoas do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

À Priscila Cerviglieri, pelas correções dos textos em inglês.

À FAPESP, CAPES e CNPq, pela bolsa e auxílios concedidos ao laboratório.

Enfim, agradeço a todos que torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*“A voz de Deus nos diz constantemente: uma falsa
ciência faz um homem ateu, mas uma verdadeira ciência
leva o homem a Deus”.*

Voltaire

“Eu gosto do impossível porque lá a concorrência é menor”

Walt Disney

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	i
Resumo	iv
Abstract	vi
1. Introdução	8
1.1 Biomineralização	8
1.2 Anexina V (AnxA5)	11
1.3 Fosfatase Alcalina (TNAP)	13
1.4 A importância dos Lipídios na Biomineralização	17
1.5 Técnicas Bioquímicas e Biofísicas	19
1.5.1 Cinética Enzimática	19
1.5.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	20
1.5.3 Dicroísmo Circular (CD)	23
1.5.4 Sistemas Miméticos de Membranas: Lipossomos (SUVs) e Vesículas Gigantes (GUVs)	24
1.5.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)	26
2. Objetivos	29
3. Material e Métodos	30
3.1 Obtenção da AnxA5	30
3.2 Obtenção de cultura de células de medula óssea de rato	30
3.3 Preparação das frações de membrana ricas em TNAP	31
3.4 Dosagem de proteína	32
3.5 Solubilização e purificação parcial da TNAP com polidocanol	32

3.6 Determinação da atividade enzimática	32
3.7 Preparação dos lipossomos	33
3.8 Preparação das Vesículas Multilamelares	34
3.9 Preparação de Proteolipossomos contendo AnxA5	35
3.10 Preparação de Proteolipossomos contendo TNAP	35
3.11 Preparação de Proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5	35
3.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western blotting	36
3.13 Tratamento dos Proteolipossomos com Fosfolipase C	37
3.14 Preparação de Vesículas Gigantes Unilamelares	37
3.15 Liberação de carboxifluoresceína retida em lipossomos e proteolipossomos	38
3.16 Medidas de Espalhamento de Luz	39
3.17 Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura	39
3.18 Influxo de Cálcio para o Interior de Proteolipossomos com diferentes composições	40
3.19 Caracterização estrutural da AnxA5 por Dicroísmo Circular	40
3.20 Microscopia de Força Atômica	41
4. Resultados e Discussão	42
4.1 Padronização de Proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5	42
4.1.1 Proteolipossomos contendo TNAP	42
4.1.2 Proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5	46
4.1.3 Proteolipossomos contendo AnxA5	49
4.2 Caracterização Cinética de Proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5....	36
4.2.1 Efeito da presença da AnxA5 nos parâmetros cinéticos da TNAP.....	50

4.2.2 Efeito da composição lipídica nos parâmetros cinéticos da TNAP.....	56
4.2.3 Efeito do Tampão contendo EGTA nos Parâmetros Cinéticos da TNAP..	62
4.3 Caracterização Biofísica dos sistemas lipídicos	64
4.3.1 Efeito da concentração de DPPS no comportamento termotrópico de lipossomos constituídos de DPPC	64
4.3.2 Efeito da concentração de DPPS no comportamento termotrópico de proteolipossomos constituídos de DPPC contendo TNAP e/ou AnxA5....	70
4.4 Caracterização biofísica da AnxA5	75
4.5 Influxo de Ca^{2+} nos sistemas de Proteolipossomos	79
4.6 Interação da AnxA5 com a membrana de GUVs	82
4.7 Interação da TNAP com a membrana de vesículas gigantes	93
4.8 Interação da TNAP e AnxA5 com a membrana de vesículas gigantes	103
4.9 AFM de lipossomos e proteolipossomos.....	106
4.9.1 AFM de lipossomos	107
4.9.2 AFM de proteolipossomos	114
5.Conclusão	121
6. Referências Bibliográficas	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: Adenosina-5'-difosfato
AFM: Microscopia de Força Atômica
ALP: Fosfatase Alcalina
AMP: Adenosina-5'-monofosfato
AMPOL: 2-amino-2-metil-1-propanol
AnxA5: Anexina V
ATP: Adenosina-5'-trifosfato
ATPase: Adenosina-5'-trifosfatase
BSA: Albumina de soro bovino
CD: Dicroísmo Circular
CF: Carboxifluoresceína
Chol: Colesterol
Da: Dalton
DAB: 3,3'-diaminobenzidina, 0.7 mg/mL
DLPC: Dilauril fosfatidilcolina
DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico
DMPA: Ácido dimiristoil fosfatídico
DMPC: Dimiristoil fosfatidilcolina
DOPC: Dioleoil fosfatidilcolina
DPPC: Dipalmitoil fosfatidilcolina
DPPE: Dipalmitoil fosfatidiletanolamina
DPPS: Dipalmitoil fosfatidilserina
DSC: Calorimetria Diferencial de Varredura
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA: Ácido etilenodiaminotetracético
GM1: Gangliosídeo GM1
GPI: Glicosil fosfatidil inositol
GUV: Vesícula unilamelar gigante
IP: Índice de polidispersão
 $K_{0,5}$: Constante de afinidade
 k_{cat} : Número de renovação
 $k_{cat}/K_{0,5}$: Eficiência catalítica

L_{α} : Fase líquido-cristalina
 L_o : Fase líquido-ordenada
 MLV: Vesículas multilamelares
 MV: Vesícula da Matriz
 n : Coeficiente de Hill
 NPP1: nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1
 PA: Ácido fosfatídico
 PC: Fosfocolina
 PHOSPHO1: Fosfomonohidrolase
 PI: Fosfatidilinositol
 P_i : Fosfato inorgânico
 PIPLC: Fosfolipase C específica para fosfatidilinositol
 $PiT-1$ e $PiT-2$: cotransportadores Na^+/P_i
 PLAP: Fosfatase Alcalina de Placenta
 PMCA1: ATPase 1 transportadora de cálcio
 p -NFF: p -nitrofenilfosfato
 p -NFFase: p -nitrofenilfosfatase
 Polidocanol: Polioxietileno-9-lauril éter
 POPC: Palmitoil oleoil fosfatidilcolina
 PPase: Pirofosfatase
 PP_i : Pirofosfato inorgânico
 PS: Fosfoserina
 RH-POPE: Rodamina
 SDS: Dodecil sulfato de sódio
 SDS-PAGE: eletroforese em condições desnaturantes
 SM: Esfingomielina
 SUV: Vesículas unilamelares pequenas
 T_C : Temperatura crítica de transição
 TCA: Ácido tricloroacético
 TG2: Transglutaminase 2
 TNAP: Fosfatase Alcalina tecido não-específica
 Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
 TX-100: Triton X-100
 U: Unidade de atividade enzimática (nmol/min)

V_m : Velocidade máxima

ΔH : Variação de entalpia de transição de fase

$\Delta t_{1/2}$: Cooperatividade de transição de fase

θ : Elipticidade molar

λ_{ex} : Condutividade interna da solução

λ_{in} : Condutividade interna da solução

Resumo

A biomineralização óssea é um processo complexo e multifatorial sendo um grande desafio para a ciência à compreensão dos seus mecanismos regulatórios. Este processo é mediado pela liberação de vesículas da matriz (MVs), as quais surgem das superfícies de osteoblastos e são secretadas no local específico do início da biomineralização. MVs têm a capacidade de acumular altas concentrações de íons Ca^{2+} e fosfato (P_i), proporcionando um microambiente adequado para a formação inicial e propagação dos cristais de hidroxiapatita. Especial atenção deve ser dada a duas proteínas: Anexina V (AnxA5) e Fosfatase Alcalina (TNAP). As anexinas são as proteínas mais abundantes detectadas nas MVs e responsáveis pela formação de canais de cálcio. TNAP apresenta atividade fosfomono-hidrolítica, produzindo P_i a partir, principalmente, de pirofosfato (PP_i) e ATP.

O enfoque deste projeto foi produzir e caracterizar proteolipossomos com diferentes composições lipídicas de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) e dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS) contendo TNAP e AnxA5, e manter a funcionalidade das proteínas após incorporação nos sistemas miméticos.

Foi possível incorporar AnxA5 em DPPC-proteolipossomos (11,64 $\mu\text{g/mL}$), mas na presença de DPPS houve um aumento significativo de AnxA5 incorporada (25,79 $\mu\text{g/mL}$) a DPPC:DPPS 10%-proteolipossomos (razão molar). A presença das proteínas nos proteolipossomos compostos por DPPC e DPPC:DPPS 5, 10 e 15% (razão molar) foi confirmada por SDS-PAGE e Immunoblotting. Melhores rendimentos de incorporação das duas proteínas foram obtidos quando ambas foram incorporadas concomitantemente. DPPC-proteolipossomos e DPPC:DPPS 10%-proteolipossomos revelaram conter 75% de AnxA5 e 25% de TNAP em concentração de proteína. A presença de DPPS não afetou significativamente as porcentagens de proteínas incorporadas.

Os parâmetros cinéticos da TNAP na hidrólise de diferentes substratos fisiológicos (ATP, ADP e PP_i) foram determinados na presença e ausência de AnxA5, em pH fisiológico, e para os diversos sistemas lipídicos. A melhor eficiência catalítica da enzima foi obtida para sistemas contendo 10% de DPPS (razão molar) ($k_{\text{cat}}/K_{0.5} = 183,02; 776,06 \text{ e } 657,08 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente). A TNAP apresentou maior especificidade para a hidrólise de PP_i quando comparado com ATP e ADP.

Estudos utilizando Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) mostraram que o aumento da concentração de DPPS em DPPC-lipossomos proporcionou um

progressivo alargamento no pico de transição de fase, diminuição na $\Delta t_{1/2}$ e ΔH . A pré-transição de fase só foi detectada até a concentração de 15% de DPPS em DPPC. Para 20% de DPPS e acima, observou-se uma segregação lateral de fase com a formação de possíveis microdomínios ricos em DPPS. A interação da AnxA5 com DPPC-lipossomos e DPPC:DPPS 10%-lipossomos resultou em uma redução nos valores de ΔH (de 8,73 para 5,68 e 8,43 para 5,37 Kcal.mol⁻¹, respectivamente). Quando a TNAP está presente nos proteolipossomos, este efeito é ainda maior.

A AnxA5 incorporada em DPPC-proteolipossomos e DPPC:DPPS 10%-proteolipossomos (razão molar) foi capazes de mediar o influxo de ⁴⁵Ca²⁺ para dentro das vesículas (~ 800 nmol Ca²⁺) quando utilizados faixas de concentração de cálcio em níveis fisiológicos (~2 mM). A presença da TNAP nos proteolipossomos não afetou o influxo de Ca²⁺ mediado pela AnxA5. Entretanto, a presença da AnxA5 afetou significativamente os parâmetros cinéticos da TNAP para os diferentes substratos.

Estudos com vesículas unilamelares gigantes (GUVs) também confirmaram a inserção funcional da AnxA5 em vesículas constituídos de dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) e DOPC:DPPS 10% (razão molar). O principal efeito causado pela AnxA5 na morfologia das GUVs foi a perda de contraste óptico devido a formação de poros nas membranas das vesículas. Neste caso, a presença de DPPS não proporcionou mudanças significativas para a incorporação da AnxA5. TNAP quando inserida em GUVs provocou intensa flutuação e excesso de área das vesículas com formação de filamentos. A presença do DPPS provavelmente dificulta a inserção da TNAP à membrana das GUVs. Quando há microdomínios lipídicos heterogêneos na composição de GUVs compostas por DOPC:Colesterol:Esfingomielina (8:1:1) e DOPC:Colesterol:Esfingomielina:Gangliosídeo (7:1:1:1) (razão molar), a inserção da TNAP provocou uma maior segregação lateral de fase evidenciada por imagens com fluorescência. A presença da TNAP e AnxA5 em DPPC:DPPS 10%-proteolipossomos proporcionou mudanças significativas nas propriedades mecânicas visco-elásticas dos proteolipossomos detectadas por imagens de Microscopia de Força Atômica. Assim, no presente trabalho foi possível obter uma inédita metodologia para a formação de proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5 concomitantemente, os quais apresentaram uma reconstituição funcional das proteínas, apresentando capacidade de captar Ca²⁺ para dentro das vesículas e habilidade de hidrolisar fosfosubstratos em sua superfície.

Abstract

Bone biomineralization is a multifactorial and complex process, being a challenge for the science the understanding of their regulatory mechanisms. This process is mediated by the release of matrix vesicles (MVs), structures which arise by budding from osteoblast and chondroblast surface and are secreted in the specific site where biomineralization begins. MVs have the ability of accumulating high concentrations of Ca^{2+} and P_i ions, providing an adequate microenvironment for the initial formation and propagation of hydroxyapatite crystals. Two protein families present in MVs merit special attention: Annexins and Phosphatases. The annexins were the most abundant proteins detected in MVs and are responsible for the Ca^{2+} -channels formation (especially AnxA5). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) exhibits phosphomonohydrolytic activity, producing P_i mainly from PP_i and ATP. Such proteins regulate the formation of calcium phosphate crystals, acting directly in the bone mineralization process.

The goal of this project was to produce and characterize proteoliposomes with different lipid compositions of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS) harboring TNAP and AnxA5, keeping the functions of both proteins after their incorporation into the mimetic systems.

AnxA5 was able to incorporate into DPPC-proteoliposomes (11.64 $\mu\text{g/mL}$), but the presence of DPPS increased significantly the AnxA5 incorporation (25.79 $\mu\text{g/mL}$) into DPPC:DPPS 10%-proteoliposomes. The presence of both proteins into DPPC and DPPC:DPPS 5, 10 and 15% (molar ratios) proteoliposomes was confirmed by SDS-PAGE and Immunoblotting analysis. Better yield of TNAP and AnxA5 incorporation was observed when both proteins were reconstituted simultaneously. DPPC-proteoliposomes and DPPC:DPPS 10%-proteoliposomes (molar ratio) incorporated about 75% of AnxA5 and 25% of TNAP (protein concentration). DPPS presence did not affect significantly the yield of incorporation of both proteins.

The kinetic parameters for the hydrolysis of different physiological substrates (ATP, ADP and PP_i) by TNAP were determined in the presence and absence of AnxA5, at physiological pH, for the different systems. The best catalytic efficiencies were achieved with proteoliposomes containing DPPS 10% (molar ratio) ($k_{\text{cat}}/K_{0.5}$ = 183.02; 776.06 and 657.08 $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ for ATP, ADP and PP_i , respectively), condition that also favored PP_i hydrolysis by TNAP when compared to ATP and ADP hydrolysis.

Studies by Differential Scanning Calorimetry (DSC) showed that the increasing

DPPS concentrations in the DPPC-liposomes resulted in a progressive broadening of the phase transition peaks and decreased $\Delta t_{1/2}$ and ΔH values. The pre-transition was detected only in concentrations up to DPPS 15% in DPPC. Phase lateral segregation can be observed for DPPS 20% and above, suggesting the formation of DPPS-rich microdomains. The interaction of AnxA5 with DPPC and DPPC:DPPS 10%-liposomes resulted in a decrease of ΔH values (from 8.73 to 5.68 and from 8.43 to 5.37 Kcal.mol⁻¹, respectively). When TNAP was present in the proteoliposomes, this effect was even greater.

AnxA5 incorporated into DPPC and DPPC:DPPS 10%-proteoliposomes (molar ratio) was able to mediate ⁴⁵Ca²⁺-influx (~ 800 nmol Ca²⁺) into the vesicles at physiological Ca²⁺-concentrations (~ 2 mM), and this process was not affected by the presence of TNAP in the systems. However, AnxA5 affected significantly the hydrolysis of substrates by TNAP.

Studies with Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) also confirmed the functional reconstitution of AnxA5 in dioleoylphosphocholine (DOPC) and DOPC:DPPS 10% (molar ratio) vesicles. The main effect caused by AnxA5 in the GUVs morphology was the formation of pores in the vesicles membrane. In this case, DPPS presence did not affect the AnxA5 incorporation. The presence of TNAP in GUVs caused a several fluctuation, indicating that the vesicles acquired an excess of area and undergoes sequential budding transitions. It is suggested that the presence of DPPS makes the TNAP insertion into the GUVs membrane difficult. With the presence of heterogeneous lipid microdomains in GUVs composed of DOPC, Cholesterol (Chol), Sphingomyelin (SM) and Ganglioside (GM1) in the proportions DOPC:Chol:SM 8:1:1 and DOPC:Chol:SM:GM1 7:1:1:1 (molar ratios), the TNAP insertion caused a greater phase lateral segregation, evidenced by fluorescence analysis. Atomic Force Microscopy (AFM) analysis indicated that the presence of both proteins into DPPC:DPPS 10%-proteoliposomes (molar ratio) caused significant changes in the visco-elastic mechanical properties of the vesicles.

In conclusion, the present work describes the synthesis of proteoliposomes harboring TNAP and AnxA5 concomitantly, with the functional reconstitution of both proteins, with the ability to transport Ca²⁺ into the vesicles and hydrolyze phosphosubstrates on their surface.

1. Introdução

1.1 Biomineralização

O processo de biomineralização consiste no acúmulo de mineral constituído principalmente por íons de fosfato e cálcio que formam um sal de fosfato de cálcio, cuja estrutura se transforma em hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). O processo de ossificação mediado por osteoblastos (na formação dos ossos chatos) ou por odontoblastos (na formação do dente) é claramente distinto daquele que ocorre na calcificação da cartilagem epifisária (a partir de um modelo cartilaginoso), que é mediada por condrócitos hipertróficos.

Os osteoblastos são os responsáveis pelo início do processo de biomineralização mediada pela liberação de vesículas da matriz (MVs) (Wuthier et al., 1985; Blumenthal, 1989; Freemont, 1993; Hsu e Anderson, 1995, 2003; Millán, 2006; Golub, 2009). Os eventos bioquímicos e biofísicos responsáveis pela biogênese das MVs ainda não estão perfeitamente elucidados, mas admite-se que eles estejam relacionados com o ciclo de vida das células e, possivelmente, com o seu processo de apoptose (Anderson, 1995). Um dos grandes desafios da biologia é a compreensão de como as células se diferenciam, replicam e se dividem, e um dos aspectos importantes desse problema é saber como as células formam as MVs. A nova vesícula deve ser formada com grande precisão e possuir todas as informações necessárias para criar um microambiente adequado para a formação e preservação do mineral de hidroxiapatita (Anderson, 1995; Millán, 2006; Ciancaglini et al., 2006, 2010).

A biomineralização é um processo complexo e multifatorial sendo um grande desafio a compreensão dos mecanismos regulatórios deste processo. Além disso, existem opiniões distintas em relação ao processo de regulação da biomineralização (Kirsch, 2012). Alguns pesquisadores sugerem que a biomineralização é um processo passivo, no qual a remoção de inibidores da mineralização é suficiente para a inibição do processo (Ho et al., 2000; Terkeltaub, 2006). Outros pesquisadores sugerem que a biomineralização é um processo ativo, o qual requer ativadores e inibidores (Yagami et al., 1999; Zebboudj et al., 2002; Kim et al., 2010;

Kirsch, 2012).

Estudos realizados no final dos anos 1960 descobriram nanoestruturas extracelulares discretas, chamadas de vesículas da matriz (MVs), as quais apresentam a finalidade de nucleação dos íons que formarão os cristais de hidroxiapatita, proteção dos primeiros cristais amorfos formados e direcionamento do local específico do início da mineralização (Anderson, 1967, 1969; Bonucci, 1967, 1970, 1971, 2012), mas até hoje existem muitas dúvidas de como as MVs apresentam estas funções correlacionadas entre si (Wuthier e Lipscomb, 2011; McKee et al., 2013). As MVs, vesículas com diâmetros que variam de 100 a 300 nm, surgem por brotamento das superfícies laterais dos condrócitos e são secretadas no local específico do início da biomineralização da matriz do tecido ósseo. Nos osteoblastos, as vesículas surgem da membrana plasmática adjacente à matriz óssea recentemente formada, e nos odontoblastos, na porção apical da célula que se encontra em contato com a matriz da pré-dentina. O papel dessas vesículas como mediadoras da deposição mineral é fortemente sugerido pelos seguintes fatos: o local de aparecimento de depósitos minerais tem exata correspondência com o local das vesículas (Hsu e Anderson, 1995); os primeiros cristais na forma de pequenas agulhas ou de bastão, que precedem o crescimento do cristal extracelular, têm sido detectados dentro dessas vesículas (Wuthier et al., 1985; Anderson, 1995, 2003, 2004; Sela et al., 2000; Ciancaglini et al., 2006; Golub, 2009). Além disso, tem sido proposto que o interior das vesículas também serve como um microambiente selado, que protege o primeiro núcleo do mineral, enquanto ainda está em um estado pré-cristalino mais solúvel, antes de se converter em um cristal de hidroxiapatita. Tem sido verificado ainda que as vesículas isoladas também possuam a capacidade de depositar sais de cálcio *in vitro* (Hsu e Anderson, 1986, 1995; Garimella et al., 2006; Millán, 2006; Golub, 2009).

O conceito que MVs são nucleadores da mineralização também foi proposto por Kirsch e colaboradores (1997, 2012). Eles mostraram que somente a mineralização de placas de condrócitos que liberam MVs contendo Anexinas e Fosfatases podem mineralizar, enquanto que MVs liberadas de condrócitos sem estes componentes falham na mineralização.

MVs produzidas por condrócitos apresentam composições lipídica e proteica distintas das formadas pelos osteoblastos (Boyan et al., 1989; Anderson, 2005; Golub, 2009, 2011). Mas em ambos os sistemas as MVs servem como reservatórios

de cálcio e fosfato, criando um microambiente específico para a deposição dos primeiros complexos amorfos de fosfato de cálcio (nucleação) e posterior formação de hidroxiapatita que se forma na superfície interna das vesículas. Canais iônicos e transportadores presentes na membrana das MVs são responsáveis pela captação de diversos íons para dentro destas organelas (Balcerzak et al., 2003) e promovem o crescimento do cristal de hidroxiapatita (Golub, 2011; Kirsch, 2012).

Este processo é muito estudado, porém até o momento não se conhecem todas as moléculas envolvidas no processo. As principais biomoléculas responsáveis pelo processo de biomineralização descritas atualmente são: (i) fosfatase alcalina, também denominada TNAP (fosfatase alcalina não específica de tecido), que apresenta atividade fosfomonohidrolítica, produzindo fosfato a partir, principalmente, de pirofosfato (PP_i) e ATP; (ii) nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NPP1), enzima responsável pela formação de PP_i a partir de nucleosídeos fosforilados; (iii) uma fosfomonohidrolase encontrada especificamente dentro das vesículas, denominada PHOSPHO1, responsável pelo aumento da concentração de P_i intravesicular acoplado à degradação de fosfolípidios, através da hidrólise de fosfocolina e fosfoetanolamina (Roberts et al., 2004); (iv) transportadores de P_i PiT-1 e PiT-2 (Caverzasio et al., 1988; Montessuit et al., 1991; Palmer et al., 1997), proteínas também chamadas de cotransportadores Na^+/P_i do tipo III, e originalmente identificadas como receptores retrovirais (Collins et al., 2004), atualmente estão emergindo como importantes moléculas envolvidas tanto no metabolismo de P_i ósseo quanto em processos patológicos, como calcificação induzida por hiperfosfatemia do tecido vascular e osteoartrite (Zoidis et al., 2004; Cecil et al., 2005; Li et al., 2006; Li e Giachelli, 2007; Yoshiko et al., 2007; Gonzalez et al., 2009; Mune et al., 2009; Lau et al., 2010); (v) fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), colesterol e (vi) Anexinas, que são uma grande família de proteínas ácidas que se ligam fortemente ao cálcio e PS (Kirsch et al., 1997; Millán, 2006; 2013; Golub, 2009; Ciancaglini et al., 2010; Golub, 2011).

Dentre as principais biomoléculas presentes no processo de biomineralização, destacamos a importância de duas famílias de proteínas presentes nas MVs: AnxA5 e TNAP.

1.2 Anexina V (AnxA5)

Dentre as anexinas, especificamente a Anexina V (AnxA5), proteína de ~35 kDa, é responsável pela formação de canais de cálcio que se formam pela associação desta proteína tanto com a face externa quanto interna das membranas das MVs. 20 diferentes anexinas já foram isoladas formando uma ampla variedade de tipo de células e análises proteômicas mostram que as anexinas AnxA2, AnxA5 e AnxA6 são as proteínas mais abundantes detectadas nas MVs (Kirsch et al., 1997; Wuthier e Lipscomb, 2011; Kirsch, 2012). Dentre a família das anexinas, especialmente a AnxA5 junto com fosfolipídios (PS principalmente) estão associados com a fase inicial do cristal de hidroxiapatita formando um complexo nucleacional. É possível que a anexina afete o crescimento, a estrutura e qualidade do cristal de hidroxiapatita (Genge et al., 2008; Kirsch, 2012).

A AnxA5 humana foi a primeira da família das anexinas a ter sua estrutura tridimensional caracterizada por Huber e colaboradores (Huber et al., 1990, 1992; Liemann e Huber, 1997), a qual revela uma molécula constituída por quatro domínios homólogos constituídos por cerca de 70 aminoácidos, formando domínios compactos de 5 hélices cuja estrutura tridimensional é altamente conservada ao longo da evolução das anexinas (Liemann e Huber, 1997; Lizarbe et al., 2013). Em cada domínio é encontrado uma sequência de 17 resíduos de aminoácidos, o que representam um grau ainda maior de conservação (Lizarbe et al., 2013).

Os domínios I e II, III e IV, apresentados na Figura 1, estão ligados respectivamente através de uma curta volta interhelicoidal, sendo estendido o conector entre os domínios I e II. Os quatro domínios estão dispostos de uma maneira quase cíclica planar. A molécula de um modo geral apresenta-se ligeiramente curvada, formada por um lado convexo e um lado côncavo. Os íons cálcio são localizados no lado convexo, enquanto que os domínios N- e C- terminal estão localizados no lado côncavo oposto (Huber et al., 1990, 1992; Liemann e Huber, 1997).

Estes domínios I e II, III e IV estão dispostos formando um poro hidrofílico altamente conservado no centro da proteína e esse poro apresenta atividade de canal de Ca^{2+} na membrana das MVs (Kirsch et al., 1997; Wuthier e Lipscomb, 2011). AnxA5 é uma proteína Ca^{2+} -dependente para a ligação com a membrana e

pode formar canais de cálcio voltage-dependente quando ligada à bicamada lipídica (Pollard e Rojas, 1988; Karshikov et al., 1992; Berendes et al., 1993; Demange et al., 1994; Vogl et al., 1997; Lizarbe et al., 2013).

De acordo com análises de dicroísmo circular, as anexinas apresentam-se quase inteiramente em α -hélice (Geisow, 1986; Sopkova et al., 1994; Liemann et al., 1997).

Figura 1. Estrutura cristalina da AnxA5 humana. As fitas ilustram o enovelamento altamente α -helicoidal da proteína, formando uma estrutura ligeiramente curvada. Os íons cálcio estão representados por esferas amarelas e os quatro domínios indicados por diferentes cores: domínio I (verde); domínio II (azul escuro); domínio III (azul claro e rosa); domínio IV (vermelho). A ligação alta e a ligação baixa de cálcio no domínio III estão mostradas em sobreposição revelando mudanças conformacionais que resultam na exposição do Trp-187 (na parte superior da molécula). O domínio NH₂-terminal aparece desestruturado e estendido ao longo do lado côncavo da molécula (verde) (Liemann et al., 1997).

Grskovic e colaboradores (2012) mostraram que a mineralização apresenta-se normal em camundongos deficientes de AnxA5 e AnxA6 e por outro lado, camundongos deficientes de colágeno-X, apresentam apenas sutis alterações na organização do crescimento da placa. Estes estudos *in vivo* indicam que simultâneas depleções de AnxA5, AnxA6 e colágeno-X induzem mais pronunciadas alterações

no desenvolvimento e iniciação da mineralização, mas não são suficientes para inibir completamente a mineralização mediada por MVs. Entretanto, é possível que de alguma maneira outras anexinas compensem a falta da AnxA5 e AnxA6. Por exemplo, todas as 3 anexinas (AnxA2, AnxA5 e AnxA6) tem mostrado a formação de canais e atividade de influxo Ca^{2+} para dentro das MVs (Kirsch et al., 2000; Kirsch, 2012).

Desta forma, são necessários estudos mais conclusivos utilizando novas metodologias para elucidar o real papel da AnxA5 durante o processo de biomineralização.

Na literatura também são descritas outras funções fisiológicas para a AnxA5, tais como, inibição de coagulação sanguínea fosfolípido-dependente (Hauptmann et al., 1989; Andree et al., 1992); modulação da proteína kinase C (Schlaepfer et al., 1992); inibição da atividade da fosfolipase A2 (Davidson et al., 1990) e eventos de desorganização celular resultando em processos de apoptose (Kirsch et al., 1997; Wuthier e Lipscomb, 2011).

1.3 Fosfatase Alcalina (TNAP)

As TNAP pertencem a uma família multigênica que codifica diferentes formas da enzima, distribuídas em quase todos os tecidos. No homem e nos primatas superiores, três isoformas distintas têm sido identificadas: a da placenta, a do intestino e a do fígado-osso-rim (Lowe et al., 1990; Le Du et al., 2001; Le Du e Millán, 2002; Kiffer-Moreira et al., 2014). As isoformas da placenta e do intestino são tecido-específicas e são expressas unicamente na placenta e no intestino, respectivamente, enquanto a isoforma do fígado-osso-rim é encontrada em quase todos os tecidos, sendo também denominada por esta razão de fosfatase alcalina não específica de tecido (TNAP). Além disso, níveis elevados desta isoforma têm sido encontrados, também, nas membranas dos osteoblastos durante a formação e a mineralização do tecido ósseo (Wuthier e Register, 1985; Nakamura et al., 1988; Anderson, 1995; Hsu e Anderson, 1995; Wuthier e Lipscomb, 2011; Millán, 2012). As fosfatases alcalinas catalisam a seguinte reação geral:

onde a hidrólise de R–OP origina fosfato inorgânico (P_i) e um álcool, açúcar, fenol etc. Portanto, são membros da classe de enzimas conhecidas como fosfomonoesterases, e são denominadas “alcalinas” por sua habilidade de efetuar esta reação mais eficientemente em pH acima do neutro (pH 8-11).

A fosfatase alcalina de diversos tecidos de mamíferos é uma fosfomonohidrolase inespecífica (E.C.3.1.3.1), capaz de hidrolisar em pH alcalino monoésteres de fosfato (ATP, ADP, AMP, p-nitrofenilfosfato, glicose-6-fosfato, glicose-1-fosfato, gliceraldeído-3-fosfato), pirofosfato, diésteres de fosfato (bis-p-nitrofenilfosfato e AMP-cíclico), bem como catalisar reações de transfosforilação (McComb et al., 1979; Hsu et al., 1985; Curti et al., 1987; Pizauro et al., 1987, 1992, 1993, 1994, 1995; Ciancaglini et al., 1990a; Rezende et al., 1994, 1998; Leone et al., 1997a, 1997b, 1998).

Figura 2. Estrutura tridimensional da PLAP, onde o monômero A está representado em verde e o monômero B em roxo. Estão indicados os sítios ativos metálicos por esferas vermelhas (Zn1, Zn2, Mg e Ca) e a localização relativa da âncora GPI na enzima. Três moléculas de p-nitrofenol estão ligadas em cada subunidade (Millàn, 2006; Stec et al., 2010).

Independentemente de sua origem, as fosfatases alcalinas são enzimas homodiméricas e cada sítio catalítico contém três íons metálicos (dois íons zinco e um íon magnésio) (Figura 2), necessários para a atividade da enzima (Millán, 2006; Stec et al., 2010). Um novo sítio não-catalítico que se liga a um metal (Figura 2) e parece ser ocupado por cálcio foi descoberto após a resolução da estrutura tridimensional da fosfatase alcalina de placenta (PLAP) (Le Du et al., 2001; Mornet et al., 2001). A importância estrutural e funcional deste novo sítio metálico ainda não foi elucidada, mas a descoberta de sua existência confirma estudos anteriores que indicavam que, em cartilagem, a fosfatase alcalina era uma glicoproteína ligadora de Ca^{2+} (De Bernard et al., 1986).

Os estudos referentes à participação da fosfatase alcalina no processo calcificação têm demonstrado a presença de duas formas de enzima, uma associada à membrana e outra solúvel. Embora existam controvérsias em relação ao papel fisiológico da TNAP, somente a forma ligada à membrana tem sido associada ao processo de calcificação (Cyboron e Wuthier, 1981; Wuthier e Register, 1985; Curti et al., 1986; Say et al., 1991; Leone et al., 1997a).

Há cerca de vinte anos foi demonstrado que a fosfatase alcalina, bem como outras enzimas (5'-nucleotidase e a colinesterase), não são proteínas integrais da membrana lipoprotéica, mas estão associadas à membrana por uma âncora de fosfatidilinositol. A estrutura da âncora resulta em mobilidade lateral na membrana e permite a liberação da proteína da membrana pela ação de fosfolipases (Pizauro et al., 1995; Leone et al., 1997a; Millán, 2006).

Além disso, já foi demonstrado que a TNAP também pode hidrolisar o ATP, liberando o fosfato inorgânico. A enzima é regulada alostericamente pelo ATP (Pizauro et al., 1993) e inibida competitivamente pelo produto da reação, o fosfato inorgânico (Pizauro et al., 1987), sugerindo que os níveis relativos de PP_i , um inibidor da biomineralização, e de P_i , um inibidor da fosfatase alcalina, presentes no fluído extracelular da matriz, também desempenham um papel importante na regulação do processo de mineralização biológica (Ciancaglini et al., 2010; Simão et al., 2010).

A TNAP também pode contribuir para a geração de PP_i através de sua atividade de fosfodiesterase, hidrolisando ATP (Zhang et al., 2005), contradizendo evidências de que a enzima teria uma função antagonista à da glicoproteína-1 no processo de mineralização (Hessle et al., 2002), embora uma das principais funções

já descrita da TNAP seja a remoção de PP_i do ambiente de mineralização através de sua atividade de fosfomono-hidrolase (Rezende et al., 1998). Nakano e colaboradores (2007) demonstraram que a TNAP não é a principal enzima responsável pela hidrólise de ATP e consequente mineralização de culturas de células osteoblásticas, mas que outras enzimas, tais como ATPase 1 transportadora de cálcio da membrana plasmática (PMCA1) e transglutaminase 2 (TG2), podem agir como fosfatases hidrolisando ATP, propondo uma ação sinérgica das três enzimas na regulação do processo de mineralização da matriz óssea.

Uma deficiência na isoenzima TNAP causa um erro de metabolismo congênito conhecido como hipofosfatasia e o estudo dessa doença têm fornecido grandes evidências da importância da TNAP para a mineralização óssea. (Millán et al., 2008; Yadav et al., 2011; Whyte et al., 2012). No osso, a TNAP está localizada na superfície celular de osteoblastos e condrócitos, incluindo as membranas de suas vesículas da matriz desprendidas (Ali et al., 1970; Bernard, 1978). De fato, por um mecanismo desconhecido, MVs são altamente enriquecidas em TNAP quando comparadas com células inteiras e com a membrana plasmática (Morris et al., 1992; Wuthier e Lipscomb, 2011).

Tem sido proposto que a função da TNAP na matriz óssea é gerar o P_i necessário para a cristalização da hidroxiapatita (Robison, 1923; Majeska e Wuthier, 1975; Fallon et al., 1980). É conhecido há algum tempo que fosfatases alcalinas, tanto de origem bacteriana quanto de origem mamífera, possuem atividade fosfodiesterase (Moss e Walli, 1969; Rezende et al., 1994; O'Brien e Herschlag, 2001) e são capazes de produzir PP_i a partir de ATP. Além disso, TNAP também é capaz de defosforilar ATP, ADP e AMP, que são substratos e bprodutos da função da NPP1 (Picher e Boucher, 2001; Picher et al., 2003; Ciancaglini et al., 2010). No entanto, TNAP também tem sido considerada hidrolisar o inibidor da mineralização PP_i (Meyer, 1984) para facilitar o crescimento e a precipitação do mineral (Moss et al., 1967; Rezende et al., 1994; Anderson et al., 2005). Estudos de microscopia eletrônica revelaram que vesículas da matriz deficientes em TNAP, tanto em humanos quanto em ratos, contêm cristais de apatita, mas que a propagação extravesicular do cristal é retardada (Anderson et al., 1997, 2004). Este atraso no crescimento poderia ser devido tanto à falta da função de pirofosfatase da TNAP ou à falta da geração de fosfato inorgânico.

Recentes estudos têm demonstrado que a função da TNAP no tecido ósseo

consiste em hidrolisar PP_i para manter uma concentração adequada deste inibidor da mineralização, de modo a assegurar uma mineralização óssea normal (Anderson et al., 2004; Millán, 2006; Ciancaglini, et al., 2010, 2012; Simão et al., 2010).

Recentemente em nosso grupo de pesquisa demonstramos que as propriedades catalíticas da TNAP variam dependendo do microambiente onde a enzima se encontra. Assim, diferentes formas da enzima (ligada à membrana, solubilizada com detergente ou tratada com PIPLC (fosfolipase C) apresentaram diferentes especificidades para os diversos substratos estudados, mostrando que a cinética da enzima é grandemente afetada pela presença tanto da âncora de fosfatidilinositol quanto de outros componentes da membrana celular (Ciancaglini et al., 2006; Simão et al., 2010; Bolean et al., 2010, 2011; Ciancaglini et al., 2012).

1.4 A importância dos Lipídios na Biomineralização

Evidências de que os lipídios podem estar envolvidos em alguma fase do processo de mineralização já foram obtidas através de estudos histoquímicos. As vesículas da matriz e microvilar exibem a mesma composição lipídica, com conteúdo mais alto de colesterol, esfingomielina e fosfatidilserina quando comparadas à membrana plasmática (Wuthier et al., 1985; Thouverey et al., 2009). Recentemente, Thouverey e colaboradores (2009) relataram valores aproximados de 36% de fosfatidiletanolamina (PE), 26,5% de fosfatidilcolina (PC), 3,5% de ácido fosfatídico (PA), 7% de fosfatidilinositol (PI), 16,5% de fosfatidilserina (PS) e 11% de esfingomielina (SM) para a composição de fosfolipídios das MVs. Roberts e colaboradores (2004) também demonstraram que fosfocolina e fosfoetanolamina podem ser hidrolisados por PHOSPHO 1 (Houston et al., 2004), sugerindo que a geração de P_i em células envolvidas no processo de biomineralização pode estar acoplada à degradação de fosfolipídios.

Os fosfolipídios ácidos que apresentam grande afinidade por cálcio, principalmente a fosfatidilserina, são geralmente encontrados nas membranas das vesículas extracelulares (Boyan et al., 1989) e são capazes de promover a formação de hidroxiapatita *in vitro*, mesmo na ausência de TNAP (Eanes e Hailer, 1985). Este fato sugere uma possível associação dos fosfolipídios com o processo de

mineralização. Além disso, eles podem atuar na regulação da biomineralização regulando o transporte de íons cálcio através da organização estrutural da membrana e também promovendo a nucleação de hidroxiapatita pela interação com íons cálcio e estabilização de associações de fosfato de cálcio amorfo (Wuthier et al., 1985; Boyan et al., 1989; Balcerzak et al., 2003; Blandford et al., 2003; Wuthier e Lipscomb, 2011).

Provavelmente, mudanças na atividade da TNAP podem ser resultantes de alterações na composição lipídica da membrana celular, e também mediadas pela associação da enzima com a AnxA5 ou pela variação da concentração de íons cálcio na interface lipídica mediada pela própria AnxA5. Assim, alterações que podem ocorrer nas funções das vesículas podem representar um mecanismo de regulação da formação do mineral. Um problema que tem dificultado os estudos *in vitro* é que a etapa de indução de deposição de minerais por complexos lipídio-cálcio-fosfato é lenta, necessitando frequentemente de vários dias para a obtenção significativa de mineral. Além disso, os níveis de íons minerais e/ou pH nas soluções metaestáveis de fosfato de cálcio geralmente usados nestes estudos são baixos.

Em síntese, qualquer conclusão acerca da importância dos complexos de lipídios na mineralização mediada por MVs necessita de estudos mais aprofundados sobre a cinética da mineralização induzida por tais complexos, especialmente num sistema onde o pH e os níveis de eletrólitos sejam semelhantes àqueles encontrados no interior das vesículas ou no fluido extracelular nativo.

Empregando-se os sistemas vesiculares de lipossomos, cuja metodologia de obtenção foi padronizada em nosso laboratório (Camolezi et al., 2002; Ierardi et al., 2002), o envolvimento da enzima e dos lipídios durante o processo de mineralização poderá ser melhor avaliado, pois estes sistemas podem mimetizar a função das vesículas tanto em sistemas *in vitro* bem como *in vivo*.

Vários estudos também já mostraram o envolvimento direto na biomineralização de AnxA5 associada a lipídios ou a colágeno. Mas nenhum estudo foi realizado associando-se à AnxA5 uma enzima que possa fornecer quantidades de fosfato suficientes para propiciar a nucleação e subsequente mineralização (Kohler et al., 1997; Balcerzak et al., 2003; Blandford et al., 2003; Wang et al., 2005; Genge et al., 2007, 2008; Kim e Kirsch, 2008).

1.5 Técnicas Bioquímicas e Biofísicas

1.5.1 Cinética Enzimática

A cinética enzimática é o ramo da enzimologia que determina a velocidade de reação de hidrólise de uma determinada enzima e como ela se modifica em resposta às mudanças nos parâmetros experimentais, como por exemplo, a concentração de enzima, concentrações de ligantes (substrato, inibidores e ativadores), pH, força iônica e temperatura (Segel, 1975).

O procedimento utilizado em cinética do estado estacionário para se investigar a interação entre ligantes e a enzima consiste em variar a concentração de um ligante e manter fixa a concentração dos outros. A comparação de parâmetros cinéticos (V_m , $K_{0,5}$, n , k_{cat} entre outros) é complexa e requer metodologias com rígidos controles e condições ótimas de pH, espécie tamponante, presença de diferentes íons, entre outros. Porém, os parâmetros cinéticos podem ser utilizados para comparar a atividade de enzimas (Hoylaerts et al., 1997; Leone et al., 2005, 2012; Simão et al., 2013; Kiffer-Moreira et al., 2014).

A constante $K_{0,5}$ é uma constante dinâmica que expressa a relação entre as concentrações reais no estado estacionário ao invés de concentrações no equilíbrio, para enzimas não Michaelianas. Representa uma constante valiosa que relaciona a velocidade de uma reação enzimática com a concentração de substrato, sendo uma medida aproximada de afinidade da enzima pelo substrato. O substrato com valor mais baixo de $K_{0,5}$ apresenta uma afinidade maior para a enzima. O parâmetro k_{cat} ou número de renovação é equivalente ao número de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de tempo, por uma única molécula de enzima quando saturada com o substrato. Os parâmetros $K_{0,5}$ e k_{cat} são úteis para estudar e comparar enzimas diferentes, quer sejam os mecanismos de reação simples ou complexo. Do ponto de vista experimental, o $K_{0,5}$ de uma enzima tende a ser similar à concentração do substrato presente na célula (Segel, 1975).

A melhor maneira de comparar as eficiências catalíticas entre enzimas

diferentes, ou o número de vezes que diferentes substratos são catalisados por uma mesma enzima, é comparar a relação $k_{cat}/K_{0,5}$ chamada de constante de especificidade ou eficiência catalítica (Hoylaerts et al., 1997; Hoylaerts et al., 2006; Segel, 1975).

Enzimas que possuem múltiplos sítios ativos, porém independentes, isto é, a ligação de uma molécula de substrato não afeta as constantes de dissociação intrínseca dos sítios vazios, apresentam curvas hiperbólicas normais. Entretanto, se a ligação de uma molécula de substrato induz mudanças estruturais ou eletrônicas que provoquem alterações nas afinidades dos sítios vazios, a enzima é classificada como alostérica. Os sítios de ligação de múltiplos substratos em enzimas alostéricas situam-se em subunidades proteicas diferentes, como no caso da TNAP (Hoylaerts et al., 1997) e, geralmente, este grupo de enzimas fornecem curvas de velocidade sigmoidais. Quando a ligação de uma molécula de substrato facilita a ligação da próxima molécula de substrato pelo aumento das afinidades dos sítios de ligação vazios, têm-se o fenômeno chamado “ligação cooperativa” ou “cooperatividade positiva” em relação à ligação do substrato, ou “resposta homotrópica positiva”. As interações entre ligantes diferentes, como por exemplo, substrato e ativador/inibidor ou ativador e inibidor, são chamadas de respostas heterotrópicas e podem ser tanto positivas quanto negativas. Os dados experimentais de velocidade podem ser analisados em termos da equação de Hill na forma logarítmica, obtendo uma forma linear da equação de Hill onde a inclinação da reta é igual a n . Quando $n = 1$, não são observados efeitos cooperativos entre os sítios ativos da enzima. Quando os valores de n são positivos têm-se efeitos de cooperatividade positivos e para valores negativos de n , efeitos de cooperatividade negativos (Segel, 1975).

1.5.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma ferramenta analítica de grande importância para a caracterização das propriedades termotrópicas de interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína. Além disso, representa um dos métodos mais empregados em estudos de desenovelamento de proteínas, fornecendo informações na organização estrutural e interações dos domínios

cooperativos. Baseado nos valores fornecidos por essa técnica, a análise termodinâmica de enovelamento de uma proteína permite a elucidação de características da sua estrutura terciária e ainda a determinação das contribuições das interações que mantêm a estabilidade da estrutura nativa (Minetti e Remeta, 2006; Demetzos et al., 2008).

Os lipídios podem adotar diferentes estados lamelares chamados fase gel ou semi-cristalina e estado fluido cristalino. O parâmetro determinante do comportamento físico-químico da membrana é a temperatura crítica (T_C) a qual é a temperatura de transição entre o estado gel e o estado fluido-cristalino: abaixo da T_C os lipídios estão empacotados em um estado ordenado na fase gel, entretanto acima dessa temperatura eles estão mais desordenados em um estado fluido (fluido cristalino) (Tristram-Nagle e Nagle, 2004; Mannock et al., 2006). Esta transição ocorre em membranas biológicas produzindo sua funcionalidade.

No esquema ilustrado na Figura 3 utilizaram-se lipossomos constituídos de DPPC (10 mg/mL) para a observação dos parâmetros termodinâmicos que podem ser extraídos de uma curva de DSC.

Fosfolipídios, especialmente glicerofosfolipídios, são grupos de lipídios que consistem em uma ampla variedade de moléculas, que tem a habilidade de formar estruturas de bicamada. Em meio aquoso este sistema é muito semelhante às membranas biológicas e por isso é utilizado como modelo em estudos de calorimetria.

Figura 3: Características dos parâmetros termodinâmicos de uma curva de DSC, utilizando no esquema lipossomos constituídos de DPPC com concentração igual a 10 mg/mL. Figura adaptada de Demetzos e colaboradores (2008).

Neste esquema pode-se obter a temperatura crítica de transição (T_c), temperatura na qual a amostra apresenta máxima capacidade calorífica pontuando a transição da fase gel à fase fluido cristalino. A entalpia de transição (ΔH) é um parâmetro representado pela área total do pico, o qual está relacionado à estabilidade do sistema analisado. A cooperatividade das moléculas durante o processo de transição apresenta grande importância em relação ao comportamento termotrópico da amostra e pode ser definido como a largura que corresponde à meia altura do pico de transição ($\Delta t_{1/2}$). Na transição de fase do DPPC pode ser observado o aparecimento de um pico agudo e bem definido, devido às favoráveis interações de van der Waals entre as cadeias hidrocarbônicas do lipídio, resultando em uma alta cooperatividade das moléculas. Neste esquema podemos observar dois picos de transição: o primeiro ao redor de 33°C que corresponde à pré-transição de fase e o segundo pico que corresponde à transição principal em 41°C (Demetzos et al., 2008).

1.5.3 Dicroísmo Circular (CD)

Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica muito utilizada para estudos de moléculas quirais em solução. O CD fornece informações sobre a absorção desigual da luz esquerdo e destro circularmente polarizada por moléculas opticamente ativas. Isto ocorre quando um grupo cromóforo é parte de uma estrutura assimétrica, ou quando é imobilizado dentro de um ambiente assimétrico (Miles e Wallace, 2005; Bulheller et al., 2007; Abdul-Gader et al., 2011). CD é uma técnica padrão na Biofísica utilizada na caracterização de biopolímeros, como por exemplo, proteínas e ácidos nucleicos, podendo ser empregada em análises de atividade óptica de proteínas e quantificar suas estruturas secundárias: α -hélice, β -folha, curvatura β ou torção β e estruturas ao acaso também denominadas não organizadas (Brahms e Brahms, 1980; Miles e Wallace, 2005; Bulheller et al., 2007; Abdul-Gader et al., 2011). Outras aplicações da técnica são direcionadas no monitoramento de perturbações na estrutura de proteínas quando esta interage com outras moléculas ou ainda em função de mudanças de pH ou adição de agentes desnaturantes (Rosengarth et al., 1999; Miles e Wallace, 2005). Além disso, mudanças conformacionais de proteínas podem ser monitoradas, uma vez que os espectros de CD entre a estrutura enovelada e desenovelada são usualmente muito diferentes (Cantor e Timasheff, 1982; Sreerama et al., 2004).

Proteínas são polímeros lineares de sequência bem definida de aminoácidos (estrutura primária), com a atividade biológica crucialmente dependente de sua estrutura tridimensional. Elas formam unidades secundárias devido ao fato da ligação peptídica – (CO – NH) – entre aminoácidos ser plana e rígida, tendo um caráter parcial de dupla ligação. As unidades secundárias estruturais de moléculas quirais resultam em um sinal de CD mais ou menos bem definidos, sendo esta a principal característica que possibilita usar esta técnica no estudo de estrutura secundária de proteínas, já que a maioria dos aminoácidos, embora contenham pelo menos um átomo de carbono assimétrico, apresentam somente pequenas bandas de CD (Adler et al., 1973; Cantor e Timasheff, 1982; Bulheller et al., 2007).

O espectro de dicroísmo de proteínas apresenta duas regiões no UV divididas em próximo e distante. A região do UV distante, ou região da amida (170 a 250 nm), é relacionada às conformações da cadeia principal. A região do UV próximo (250 a

300 nm), onde as contribuições peptídicas são insignificantes, está relacionada com contribuições aromáticas, através principalmente das interações dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, embora transições de ligações dissulfeto (cistinas) também colaboram para a total intensidade de absorção (Adler et al., 1973; Cantor e Timasheff, 1982; Kelly e Price, 2000; Kelly et al., 2005).

Espectros de CD distintos têm sido descritos para conformações puras como α -hélice, folha β , curvatura β e desordenado ou “ao acaso”. A α -hélice é a estrutura secundária predominante em muitas proteínas; cada passo da hélice inclui 3,6 resíduos de aminoácidos por volta. Seus espectros de CD são caracterizados por uma banda negativa em 222 nm (transição $n \rightarrow \pi^*$) e outra em 208 nm, a qual é parte de uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$, apresentando ainda uma banda positiva em 192 nm. As características gerais de espectros de CD para folha β são uma banda negativa em torno de 216 nm e uma banda positiva em 195 nm. A curvatura β apresenta no seu espectro de dicroísmo uma banda negativa em torno de 225 nm, referente à transição $n \rightarrow \pi$, uma forte transição $\pi \rightarrow \pi^*$ entre 200 e 205 nm, e uma forte banda negativa entre 180 e 190 nm. Finalmente, um espectro de dicroísmo típico de espiral ao acaso é caracterizado por um forte sinal de CD negativo abaixo de 200 nm e uma banda positiva a cerca de 218 nm (Kelly et al., 2005).

1.5.4 Sistemas miméticos de membranas: Lipossomos (SUVs) e Vesículas Gigantes (GUVs)

Diversos estudos vêm sendo realizados utilizando sistemas miméticos de membrana como carreadores de moléculas com potenciais aplicações médicas, como por exemplo, em terapias de reposição de enzimas e imunoensaio. Em muitos estudos, as enzimas têm a função de serem liberadas das vesículas em sítios especificamente marcados e neste caso as vesículas servem como sistemas carreadores (Singh et al., 2010; Ciancaglini et al., 2012).

Vesículas lipídicas são agregados polimoleculares formados em solução aquosa na dispersão de moléculas anfifílicas formando bicamadas. Em condições balanceadas de osmolaridade, as vesículas apresentam formato esférico contendo uma ou mais lamelas compostas por lipídios anfifílicos, contendo em seu interior um

núcleo hidrofílico aquoso. Dependendo do método de preparação, as vesículas podem ser multi- ou unilamelares. Por exemplo, a formação de vesículas unilamelares pequenas (SUVs) com tamanhos entre algumas dezenas e 100 nm pode ser obtida por sonicação ou extrusão de uma mistura lipídica (Marchi-Artzner et al., 1996; Lesieur et al., 2000; Nieh et al., 2003; Mertins et al., 2009). Quando uma mistura lipídica em solução é crescida entre dois eletrodos com aplicação de campo elétrico obtêm-se a formação de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) com diâmetros maiores que 10 μm (Angelova e Dimitrov, 1986; Luisi e Walde, 2000; Fa et al., 2004; Mertins et al., 2009).

O uso de vesículas gigantes apresenta algumas vantagens em relação ao uso de lipossomos em estudos de propriedades físicas e estruturais de biomembranas. Lipossomos gigantes ou GUVs têm sido amplamente utilizados na investigação de propriedades físicas e biológicas de membranas lipídicas tais como elasticidade e mudanças na morfologia das vesículas (Tamba e Yamazaki, 2005; Husen et al., 2012; Dezi et al., 2013), além de possibilitar a observação de mudanças no formato e propriedades físicas em tempo real induzidas por peptídeos, proteínas e pequenas moléculas como detergentes (Sudbrack et al., 2011; Alam et al., 2012; Shimanouchi et al., 2013).

Devido ao seu tamanho, similar ao tamanho da membrana plasmática de células, elas podem ser diretamente observadas usando técnicas microscópicas, tais como contraste de fase e microscopia de fluorescência. Além disso, assim como em lipossomos, pode-se controlar a composição molecular da membrana bem como as condições ambientais as quais são formadas ou estudadas (Bagatolli, 2006).

Existem muitos métodos de preparação de GUVs descritos na literatura (Reeves e Dowben, 1969; Angelova e Dimitrov, 1986; Angelova et al., 1992; Akashi et al., 1996; Moscho et al., 1996; Kahya et al., 2001; Girard et al., 2004; Bernardino de la Serna et al., 2004), porém os dois principais protocolos experimentais de obtenção de GUVs são o método de hidratação branda (“gentle hydration method”) descrito por Reeves e Dowben (1969) e o método de eletroformação descrito por Angelova e colaboradores (1986, 1992). Dentre estes dois protocolos apresentados, o método de eletroformação proporciona a formação de uma população de GUVs mais homogênea, com diâmetros de 10 a 60 μm , fornece um alto rendimento de vesículas unilamelares gigantes (~ 95%) e requer um menor tempo de preparação das vesículas (1 a 2 h) quando comparado com o método de hidratação branda (12

às 24h) (Bagatolli et al., 2000; Düzgünes et al., 2003; Bagatolli, 2006). Devido a estas vantagens, foi utilizado neste trabalho o método de eletroformação descrito por Angelova e Dimitrov (1986) para a preparação das vesículas gigantes unilamelares.

1.5.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Por muitos anos, pesquisadores tentaram conciliar a alta resolução da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão com a capacidade de se obter imagens em meio aquoso, própria dos microscópios ópticos. Com a introdução da técnica conhecida como microscopia de tunelamento (“Scanning Tunneling Microscopy – STM”) por Binnig e Rohrer, em 1981, surgiram as técnicas nanométricas (Baró et al., 1985; Binnig et al., 1985; Ferreira, 2006; Goksu et al., 2009).

O STM pode produzir imagens somente de superfícies de substâncias que conduzem elétrons, ou seja, a propriedade medida é a corrente túnel que flui entre a ponta fixada no cantilever e a amostra metálica como produto da diferença de potencial aplicada entre ambas. Com base nesta ideia, Binnig, Quate e Gerber inventaram, em 1986, o microscópio de força atômica (“Atomic Force Microscopy” - AFM), também conhecido como SFM (“Scanning Force Microscopy”), que pode produzir imagens de superfícies não condutoras e condutoras (Chichester, 1998; Ferreira, 2006).

A técnica de AFM baseia-se na varredura da superfície estudada por meio de sondas de dimensões muito reduzidas a distâncias muito pequenas (da ordem de alguns Å), proporcionando uma alta resolução espacial, tanto lateral como vertical, na visualização de superfícies em nível atômico de diferentes naturezas (metais, películas orgânicas, polímeros, amostras biológicas em sistemas condutores e isolantes) e em diversos meios (vácuo, pressão atmosférica, meios líquidos) (Ohnesorge e Binnig, 1993; Gaczynska e Osmulski, 2008).

O princípio de funcionamento da técnica baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micra de comprimento (100 a 200 µm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em um “cantilever” flexível. A sonda (ponteira + cantilever) é sempre o componente

básico para alcançar resolução atômica. A força entre a ponteira e a superfície da amostra faz com que o “cantilever” se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação. Na parte superior da haste há um espelho que reflete a luz de um feixe de laser. Após a reflexão, o feixe de laser passa por uma lente e incide sobre um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do cantilever. À medida que a ponteira varre a amostra, os diferentes tipos de “acidentes geográficos” encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais. A força mais comumente associada com AFM na deflexão do “cantilever” é a força de van der Waals (Worcester et al., 1988; Morandat et al., 2013).

A técnica de AFM pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente (“tapping”) (Chichester, 1998; Ferreira, 2006; Kirat et al., 2010; Morandat et al., 2013).

No modo contato, o “cantilever” é mantido a poucos angstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve “contato físico” com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponteira e a superfície, podem causar danos à amostra, o que é especialmente prejudicial às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre fortemente aderidas ao substrato (Ferreira, 2006; Kirat et al., 2010; Morandat et al., 2013).

No modo de não-contato, o “cantilever” é mantido de dezenas a centenas de angstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa. Neste caso a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de 10^{-12} N. Esta oscilação aumenta consideravelmente a sensibilidade do microscópio, o que faz com que forças de van der Waals e forças eletrostáticas possam ser detectadas. O modo de não-contato não sofre os efeitos do atrito sobre a amostra, causada pela ponta, conforme é observado no modo contato após diversas varreduras. Por outro lado, este modo não tem encontrado aplicabilidade geral, devido à instabilidade entre a ponta e as

forças adesivas da superfície e à resolução reduzida pela distância ponta-amostra que é relativamente grande. Esta limitação tem sido contornada com a utilização do modo intermitente (Ferreira, 2006; Kirat et al., 2010; Morandat et al., 2013).

O modo contato intermitente (“tapping”) é similar ao não-contato, exceto pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é utilizado para contornar as limitações impostas pelo modo contato. A comparação das imagens nos modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente (Ferreira, 2006; Kirat et al., 2010; Morandat et al., 2013).

Devido às vantagens técnicas do modo contato intermitente, este foi escolhido para a realização das análises de varredura nos lipossomos e proteolipossomos estudados, com o intuito de verificar mudanças morfológicas e nas propriedades mecânicas das vesículas devido às composições lipídicas distintas e presença de proteínas nas vesículas.

2. Objetivos

O objetivo principal deste projeto foi padronizar uma metodologia inédita de obtenção de proteolipossomos contendo duas proteínas simultaneamente, a AnxA5 e a TNAP, as quais apresentam importante papel no processo de biomineralização óssea. Este projeto nos permitiu estender os estudos sobre a calcificação mediada por MVs através de um esforço colaborativo com o laboratório do Prof. Dr. José Luis Millán, do Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, Califórnia, EUA.

Assim, o projeto engloba estudos bioquímicos e biofísicos de caracterização dos diferentes sistemas de proteolipossomos formados, compreendendo os seguintes objetivos específicos:

- I. Obtenção da TNAP a partir de cultura de células de medula óssea de ratos.
- II. Estudar a associação da TNAP com lipossomos de diferentes composições lipídicas;
- III. Estudar a associação de AnxA5 com lipossomos de diferentes composições lipídicas.
- IV. Estudar a associação da AnxA5 e TNAP com lipossomos de diferentes composições lipídicas;
- V. Estudo dos parâmetros cinéticos da TNAP presente em proteolipossomos constituídos com diferentes composições lipídicas e na presença de AnxA5;
- VI. Avaliar o efeito da concentração de DPPS no comportamento termotrópico de vesículas constituídas de DPPC;
- VII. Avaliar o efeito da presença das proteínas no comportamento termotrópico de vesículas constituídas de DPPC, na presença ou ausência de DPPS;
- VIII. Estudo de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ para o interior dos proteolipossomos de diferentes composições;
- IX. Avaliar o efeito da interação das proteínas com a membrana de vesículas unilamelares gigantes;
- X. Avaliação dos sistemas vesiculares por Microscopia de Força Atômica.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção da Anexina V

O plasmídeo para AnxA5 (pProEx.Htb.annexin V) foi gentilmente cedido pelo professor Seamus J. Martin de Dublin, Irlanda e foi expresso em *E. coli* com uma cauda de histidina para facilitar a sua purificação, de acordo com o protocolo descrito por Logue e colaboradores (2009). Esta etapa do trabalho foi realizada com a colaboração direta do laboratório do Prof. Dr. José Luis Millán pelo Protein Production and Analysis Facility do Sanford Burnham Medical Research Intitute, La Jolla, CA - USA.

3.2 Obtenção de cultura de células de medula óssea de ratos

As células de medula óssea de ratos foram obtidas e cultivadas conforme descrito por Simão e colaboradores (2007a). A medula óssea foi obtida de ratos machos jovens adultos da linhagem Wistar, pesando 110-120 g. Para realização da cirurgia foi utilizado antisséptico, campo cirúrgico e instrumental estéril. Antes da cirurgia o animal é anestesiado (0,4 mL de Ketamina Agener 10% e 0,4 mL de Dopaser para cada 100g de animal). Em seguida realizou-se a anti-sepsia da barriga, pernas e rabo com álcool iodado 1% para a retirada local da pele do animal. Após a retirada da pele foi feita a assepsia do local com o uso de clorexidina 2,5%. O fêmur foi separado da tíbia com cortes no tendão do joelho e em seguida os tecidos foram retirados para obtenção do fêmur com cortes de tesoura nas articulações próximas à bacia. Os fêmures retirados assepticamente foram colocados em meio de transporte (meio essencial mínimo, antifúngico (fungizona), antibiótico gentamicina) e a extração da medula óssea realizada dentro de uma capela de fluxo laminar. Para a extração da medula óssea foram realizadas três passagens em meio de transporte. Cada passagem durou no mínimo 30 minutos entre uma passagem e outra, onde foram retirados os restos de tecidos presos ao

fêmur com o auxílio de um bisturi. As epífises foram removidas e a medula extraída com jato de 20 mL de meio de cultura (meio essencial mínimo- α (α -MEM), suplementado com 15% de soro fetal bovino, 50 μ g/mL de gentamicina, 0,3 μ g/mL de fungizona, 10^{-7} M de dexametazona, 5 μ g/mL de ácido ascórbico e 7 mM de β -glicerofosfato) esguichado por uma seringa com agulha de 20 gauges. Faz-se assim uma lavagem interna do fêmur com meio de cultura extraíndo toda a medula óssea. As células liberadas foram cultivadas em frascos de 75 cm² contendo meio de cultura e cultivadas por cerca de 14 dias, sempre mantidas a 37 °C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os meios foram trocados a cada 3 ou 4 dias.

3.3 Preparação das frações de membrana ricas em TNAP

As frações de membrana ricas em TNAP foram obtidas a partir das culturas osteoblásticas, conforme descrito por Simão e colaboradores (2007a). As células foram lavadas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mM, removidas com espátula plástica e ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgSO₄ 10 mM e NaCl 0,8 M (tampão osmótico). A suspensão de células foi homogeneizada empregando-se um homogeneizador do tipo “potter” para suave ruptura das células, a 4 °C, por 10 min., centrifugada a 1.000 x g por 3 min. e, em seguida, o sobrenadante foi ultra centrifugado a 100.000 x g por 1 hora, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet, que corresponde à enzima associada à membrana, foi ressuspensão em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mM, fracionado em alíquotas de 1 mL, rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -20 °C.

Alternativamente, as frações de membrana podem ser obtidas a partir do cultivo de células CHO (ovário de hamster chinês) transfectadas com TNAP, conforme Ciancaglini e colaboradores (2010).

3.4 Dosagem de proteína

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método descrito por Hartree (1972) na presença de SDS 2% (p/v). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão. As determinações foram feitas em triplicatas e a concentração de proteína estimada a partir de uma curva padrão feita para cada dosagem.

3.5 Solubilização e purificação parcial da TNAP com polioxietileno 9-lauril éter

As frações de membrana contendo 0,2 mg/mL de proteína total foram solubilizadas com polioxietileno 9-lauril éter (polidocanol) 1% (p/v) (concentração final), a 25 °C, e após ultra centrifugação a 100.000 x g por 1 hora, a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado a 10 °C. Para a obtenção da enzima livre de detergente, a enzima solubilizada foi incubada sob agitação constante durante 2 h, a 4 °C, com a resina Calbiosorb na proporção de 200 mg/mL (peso úmido), conforme descrito por Camolezi e colaboradores (2002).

3.6 Determinação da atividade enzimática

A atividade p-nitrofenilfosfatase (p-NFFase) da TNAP foi determinada descontinuamente, a 37 °C, empregando-se um espectrofotômetro, através da formação do íon p-nitrofenolato (PNF⁻) ($\epsilon = 17.600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, pH 13, 1 M), em 410 nm. Para estudos realizados no pH ótimo de hidrólise da enzima, as condições padrão foram tampão AMPOL (2-amino-2-metil-1-propanol) 50 mM, pH 9,8, contendo MgCl_2 2 mM p-NFF 10 mM, em um volume final de 0,5 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima e interrompida com 0,5 mL de NaOH 1 M em intervalos de tempo apropriados (Camolezi et al., 2002). Para estudos realizados em pH fisiológico as condições utilizadas foram tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl_2 2 mM e os substratos adenosina trifosfato (ATP), adenosina

difosfato (ADP) e pirofosfato (PP_i), todos com a concentração de 10 mM, em um volume final de 0,5 mL. Foram realizados ensaios na presença e ausência de EGTA (ácido etilenodiaminotetracético) 200 μM no meio reacional. A reação foi iniciada pela adição da enzima, interrompida com 0,25 mL de TCA 30% gelado em intervalos de tempo apropriados e a mistura reacional foi centrifugada a $4.000 \times g$ por 10 min. A quantificação de fosfato inorgânico liberado foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Pizauro e colaboradores (1995). Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e as velocidades iniciais são esperadas ser constantes por no mínimo 90 min., já que menos que 5% do substrato é hidrolisado. Controles sem a adição de enzima foram incluídos em cada experimento para se estimar a hidrólise não-enzimática do substrato. Uma unidade de enzima (1 U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto, a 37 °C, por mL ou mg de proteína. Os dados foram descritos como a média de determinações em triplicatas de 3 preparações enzimáticas diferentes, as quais foram consideradas estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$.

3.7 Preparação de Lipossomos

Os lipídios DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina), DPPS (dipalmitoil fosfatidilserina) e DPPE (dipalmitoil fosfatidiletanolamina) foram utilizados na preparação dos lipossomos constituídos de DPPC, DPPC:DPPS:DPPE 5:4:1, DPPC:DPPS 1:1, DPPC:DPPS 5, 10, 15, 20 e 30% (razão molar).

A preparação dos lipossomos foi realizada a partir da pesagem da mistura de lipídios de acordo com as composições propostas. Os lipídios foram dissolvidos em clorofórmio, o qual foi removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela solução, formando um filme nas paredes do tubo. Estes filmes foram mantidos em vácuo por 1 hora, para garantir a completa remoção do solvente. Em seguida, o filme lipídico foi ressuspensionado em um volume apropriado de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl_2 2 mM e EGTA 200 μM , a fim de se obter uma solução de concentração final de 1,5 mg/mL. A suspensão de lipídios foi incubada a uma temperatura acima da temperatura de transição da fase gel a líquido-cristalino dos lipídios utilizados (70 °C), por 1 hora, com agitações em vortex em intervalos de 10

minutos. Foram realizados 5 ciclos de aquecimento/congelamento para garantir a completa hidratação das cabeças polares dos lipídios e em seguida a suspensão lipídica foi extrusada empregando-se o sistema de extrusão Liposofast (Sigma-Aldrich) e uma membrana de policarbonato de 100 nm. A solução extrusada foi então recolhida e armazenada 4 °C (Bolean et al., 2010, 2011).

3.8 Preparação de Vesículas Multilamelares

A dispersão de um filme lipídico seco em solução aquosa leva a formação de uma suspensão de vesículas polidispersas relativamente grandes chamadas vesículas multilamelares (MLV). É descrito na literatura que estes tipos de vesículas podem em média ser compostas por até 10 lamelas (Lichtenberg e Markello, 1984; Walde e Ichikawa, 2001). Neste método os lipídios são dissolvidos em clorofórmio, o qual é removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela solução, formando um filme nas paredes do tubo. Estes filmes foram mantidos em vácuo por 1 h, para garantir a completa remoção do solvente. Em seguida, o filme lipídico é ressuspenso em um volume apropriado de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 2 mM e EGTA 200 μM , a fim de se obter uma solução de concentração final de 1,5 mg/mL. A suspensão lipídica é incubada a uma temperatura acima da temperatura de transição da fase gel a líquido-cristalino dos lipídios utilizados (70 °C), por 1 h, com agitações em vortex em intervalos de 10 minutos. Vigorosas agitações em vortex acima da T_C dos lipídios proporciona a dispersão de multilamelas lipídicas em solução aquosa, a qual resulta na formação de vesículas com populações heterogêneas. Em seguida, foram realizados 5 ciclos de aquecimento/congelamento para garantir a completa hidratação das cabeças polares dos lipídios (Walde e Ichikawa, 2001).

3.9 Preparação de Proteolipossomos contendo AnxA5

Este ensaio foi realizado adaptando o método de inserção direta descrito por Kirsch e colaboradores (1997). Os lipossomos previamente formados foram incubados durante 12 h a 25 °C com a proteína (0,2 mg/mL) e após incubação, a amostra foi ultracentrifugada a 100.000 x g por 1 h, a 4 °C. As concentrações de proteína, presente no sobrenadante e no pellet ressuspensão, foram determinadas e utilizadas para calcular a porcentagem de incorporação da AnxA5 aos lipossomos. A incorporação da AnxA5 é evidenciada através de géis de eletroforese, dosagem de proteína, análises de DSC e estudos de influxo de cálcio conforme descrito nos itens 3.12, 3.4, 3.17 e 3.18, respectivamente.

3.10 Preparação de Proteolipossomos contendo TNAP

TNAP (0,2 mg/mL) foi incorporada aos lipossomos constituídos de diferentes composições lipídicas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mM, foram misturadas e incubadas a 25 °C durante 1 hora, na proporção 1:15000 proteína:lipídio (razão molar). Em seguida, a solução foi ultracentrifugada a 100.000 x g por 1 h, a 4 °C, e o pellet foi ressuspensão no mesmo tampão acima descrito. As atividades p-NFFase, presente no sobrenadante e no pellet ressuspensão, foram determinadas e utilizadas para calcular a porcentagem de incorporação da TNAP aos lipossomos, conforme descrito por Bolean e colaboradores (2010).

3.11 Preparação de Proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5

TNAP (0,02 mg/mL) e AnxA5 (0,2 mg/mL) foram incorporadas aos lipossomos utilizando as razões molares de 1:15000 e 1:100 (proteína:lipídio), respectivamente. A incubação foi realizada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mM, na presença e ausência de EGTA 200µM. A amostra foi homogeneizada e

incubada a 25 °C, por 24 h. Em seguida, a mistura foi ultracentrifugada a 100.000 x g por 1 h, a 4 °C, e o pellet, que corresponde aos proteolipossomos formados, foi ressuspensão em volume apropriado de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl_2 2 mM, na presença e ausência de EGTA 200 μM . As atividades p-NFFase, presente no sobrenadante e no pellet ressuspensão, foram determinadas e utilizadas para calcular a porcentagem de incorporação da TNAP aos lipossomos, conforme descrito por Bolean e colaboradores (2010).

3.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western blotting

As massas moleculares das enzimas foram estimadas por SDS-PAGE empregando-se gel de poliacrilamida 7%, com gel de empilhamento 5%, de acordo com o procedimento descrito por Laemmli (1970), utilizando-se nitrato de prata (Blum et al., 1987) para coloração das proteínas. Quando necessário, as amostras proteicas foram concentradas empregando-se Microcon 30 (Amicon). Foram utilizados como padrões de massa molecular: miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97.4 kDa), albumina de soro bovino (BSA) (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

Análise por Western blotting foi realizada, primeiramente, transferindo-se eletroforéticamente as bandas proteicas para uma membrana de nitrocelulose por 2 h, a 15 mA e 200 V. A membrana foi bloqueada por 2 h com tampão de bloqueio Tris-HCl 40 mM, pH 7.4, contendo 5% (p/v) de leite desnatado, 1% (p/v) BSA e 0.1% (v/v) Tween 20. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário para a AnxA5 (IgG monoclonal AnxA5 de camundongo) diluído 1:100 (v/v) em tampão de bloqueio e lavada com três trocas de tampão por 30 minutos cada lavagem, utilizando tampão de lavagem Tris-HCl 40 mM, pH 7.4, contendo NaCl 0,3 M. A membrana foi então incubada com o anticorpo secundário peroxidase-conjugada de cabra anti-camundongo IgG diluído 1:2.000 (v/v) em tampão de lavagem por 1,5 h. O substrato DAB (3,3'-diaminobenzidina, 0.7 mg/mL) foi utilizado para revelar as interações proteína-anticorpo.

3.13 Tratamento dos proteolipossomos com Fosfolipase C.

Os proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10% (razão molar) contendo TNAP e AnxA5 foram incubados com fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (0,2 U de PIPLC de *Bacillus thuringiensis* por mL) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 2 mM, por 2 h, a 37 °C, com agitação constante. Em seguida, a mistura foi ultracentrifugada a 100.000 x g por 1 h, a 4 °C, e o pellet foi ressuspenso em volume apropriado de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 2 mM e EGTA 200 μ M (Bolean et al., 2010). O sobrenadante obtido contendo TNAP clivada e o pellet correspondente a proteolipossomos contendo apenas AnxA5, foram avaliados para determinar sua concentração de proteína e atividade enzimática, conforme descrito nos itens 3.4 e 3.6, respectivamente.

3.14 Preparação de Vesículas Gigantes Unilamelares (GUVs)

Vesículas gigantes constituídas de DOPC (dioleoil fosfatidilcolina), DPPS (dipalmitoil fosfatidilserina), na presença e ausência de Rh-DOPE (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil)) foram preparadas no laboratório da Prof. Dra. Rosangela Itri do IF-USP utilizando o método de eletroformação (Angelova e Dimitrov, 1986). Os lipídios foram pesados e dissolvidos em clorofórmio (1 mg/mL). A solução lipídica foi espalhada nas superfícies de vidros constituídos por uma liga de óxido de índio (III) e óxido de estanho (IV) formando uma superfície condutora (ITO), os quais foram colocados com seus lados condutores voltados uma para o outro e separados entre si por um espaçador de teflon de 2 mm de espessura. Esta câmara de eletroformação foi completada com uma solução de sacarose 0,2 M e conectada a um gerador de energia alternada a 1 V com 10 Hz de frequência por 2 h. Também foram preparadas GUVs com o seu interior preenchido com uma solução de sacarose 0,2 M e 0,5 mM de $CaCl_2$. As soluções de vesículas foram removidas da câmara e diluídas 10 vezes em uma solução de glicose 0,2 M. Desta forma tem-se uma assimetria entre os açúcares no interior e exterior das vesículas. A osmolaridade das soluções de sacarose e glicose

foi mensurada com um osmômetro crioscópico Osmomat 030 (Gonotec, Berlin, Germany) e cuidadosamente combinada a fim de evitar efeitos de pressão osmótica. A solução de vesículas foi colocada em uma câmara de observação que consiste em uma lâmina e uma lamínula separadas por um espaçador de teflon de 1 cm².

Para a obtenção das imagens das vesículas gigantes foi usado o microscópio invertido (Zeiss, Axio Observer D1, Germany) equipado com as objetivas Plan Neo-Fluar 63x Ph2 (NA 0,75) e A-plan 10x Ph1 (NA 0,5) e uma com câmera AxioCam MRm acoplada.

Devido às diferenças de densidade e índice de refração entre as soluções de sacarose e glicose, as vesículas são estabilizadas pela gravidade no fundo da câmara e apresentam um melhor contraste quando observadas com microscopia de contraste de fase.

Nos experimentos de eletro deformação, as amostras foram submetidas a um campo elétrico alternado (AC) de 10 V de intensidade e 1 MHz de frequência (Riske e Dimova, 2005; Riske et al., 2009) . As vesículas gigantes foram crescidas em uma solução de sacarose contendo uma pequena quantidade de sal (0,5 mM de CaCl₂) para assegurar uma maior condutividade no interior das vesículas e assim induzir a deformação prolata e em seguida as vesículas foram diluídas em solução de glicose contendo AnxA5 (Aranda et al., 2008). A solução com as GUVs é então colocada em uma câmara especial comprada da Eppendorf (Hamburg, Germany), a qual consiste em uma moldura de teflon de 8 mm de espessura confinada entre duas placas de vidro, através da qual é possível a observação das GUVs. Um par de fios paralelos de eletrodos de platina com 90 µm de raio é fixado no interior da câmara de teflon com uma distância entre os dois fios de 0,5 mm. A câmara foi conectada a uma fonte geradora de campo elétrico e as vesículas situadas entre os dois eletrodos paralelos foram observadas usando o microscópio óptico invertido.

3.15 Liberação de carboxifluoresceína (CF) retida em lipossomos e proteolipossomos

Estudos de controle de atividade de dano à membrana lipídica foram avaliados, a 37 °C, pela liberação da sonda fluorescente encapsulada em lipossomos e

proteolipossomos (25 mM de CF). A CF aprisionada no interior do sistema vesicular não fluoresce devido ao processo de auto-supressão. A perda da integridade da membrana lipídica de lipossomos e proteolipossomos resulta na diluição do fluoróforo e, conseqüentemente, no aumento do sinal de fluorescência, como descrito por Santos e colaboradores (2005) e dos Santos e colaboradores (2010).

3.16 Medidas de Espalhamento de Luz (DLS)

As medidas de distribuição de tamanho dos lipossomos e proteolipossomos foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico empregando-se o equipamento N5 Submicron Particle Size Analyzer (Beckman Coulter), sendo as amostras previamente diluídas e filtradas (Millipore MCE membrane filter - 0,8 μ m), de modo a se obter um índice de polidispersão (IP) adequado. Os valores determinados correspondem a uma média de 5 medidas realizadas a 25 °C (Bolean et al., 2010, 2011).

3.17 Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Os estudos de calorimetria foram realizados empregando-se o equipamento N - DSC II: Differential Scanning Calorimeter (Calorimetry Sciences Corporation). As amostras e a referência (tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 2 mM e EGTA 200 μ M) foram previamente deaeradas antes de serem submetidas à análise (300 μ L de cada). Realizaram-se varreduras de temperatura de 10 °C a 90 °C, com velocidade de aquecimento de 0,5 °C/min., bem como varreduras de 10 °C a 90 °C, com velocidade de resfriamento de 0,5 °C/min.

Durante a transição, a temperatura da amostra permanece constante, enquanto que a da referência continua aumentando. O calorímetro registra uma variação de temperatura que é convertida em diferença de potência (ΔP). Os dados de potência (μ W) são transformados em capacidade calorífica molar, possibilitando a determinação dos valores de temperatura crítica de transição (T_C), cooperatividade

($\Delta t_{1/2}$) e variação de entalpia (ΔH). As análises de deconvolução, realizadas para se obter uma melhor resolução de picos distintos que podem aparecer em uma mesma corrida, foram realizadas utilizando-se o programa Origin, versão 8.0 (Bolean et al., 2010 e 2011).

3.18 Influxo de cálcio para o interior de Proteolipossomos com diferentes composições

Os ensaios de influxo de cálcio para o interior de proteolipossomos foram realizados adaptando o protocolo descrito por Hsu e Camacho (1999). Alíquotas de lipossomos (constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10%) e proteolipossomos (contendo AnxA5 e AnxA5 + TNAP) foram incubados com meio reacional (1:1 v/v) contendo Tris 50 mM, pH 7.65, NaCl 85 mM, KCl 15 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 30 mM e KH₂PO₄ 2.3 mM, a 37°C por 19 h; ⁴⁵Ca²⁺ (5.5 µCi/mL) foi utilizado como traço.

Foram utilizadas concentrações crescentes de cálcio frio de 0.5 mM a 5 mM de CaCl₂. As amostras foram filtradas com filtros Amicon Ultra 30K (30,000 NMWL) e após e ciclos de lavagem, a radioatividade associada ao interior dos proteolipossomos foi determinada por contagem de cintilação (Beckman Counter LS 6000IC). As amostras de lipossomos com a mesma composição que os respectivos proteolipossomos e tratadas em idênticas condições, foram utilizadas como branco a fim de se descontar possível presença de radioatividade não específica.

3.19 Caracterização estrutural da AnxA5 por Dicroísmo Circular (CD)

Os estudos de Dicroísmo Circular (CD) foram realizados conforme descrito por Franzoni e colaboradores (1997) utilizando-se um equipamento Jasco 810.

Os espectros de CD foram coletados a 25°C, de 190 a 250 nm para a AnxA5 (0,13 mg/mL) em solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl₂ 2 mM. Para cada medida foram realizados 3 experimentos de onde se pode fazer uma média dos valores obtidos.

O grau de elipticidade molar (θ) em $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ foi calculado de acordo com a equação:

$$[\theta]_{\lambda} = \theta_{\text{obs}} \times \text{MW (ou MRW)} / 10 \times d \times C$$

onde λ = comprimento de onda; θ_{obs} = elipticidade observada; MW = massa molecular; MRW = média de massa molecular de resíduos de aminoácidos (considerou-se aproximadamente 115 Da); d = espessura da cubeta em cm e C = concentração de proteína em g/mL (Adler, 1973).

A quantidade de estrutura em α -hélice (f_H) da AnxA5 foi estimada a partir da elipticidade por resíduo em 222 nm $[\theta]_{222}$ determinada pelo espectro de CD, conforme descrito por Chen e colaboradores (1972) pela equação:

$$(f_H) = - ([\theta]_{222} + 2340) / 30300$$

3.20 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As análises de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram obtidas utilizando um equipamento Shimadzu, SPM-9600 Scanning Probe Microscope com modo de fase tapping, à temperatura ambiente, em ar, usando sonda de silicone contendo um cantilever com 124 μm de comprimento, rigidez variando de 34 a 51 Nm^{-1} e frequência de ressonância de 324-369 kHz. A varredura foi realizada em condições de força constante.

As amostras de lipossomos e proteolipossomos foram estabilizadas usando glutaraldeído, o qual foi gotejado sobre uma superfície de mica recém-clivada e deixado secar a temperatura ambiente.

A velocidade de varredura foi adequadamente reduzida a 0,2 – 0,3 Hz, e o ganho integral foi obtido como o menor possível para evitar que a ponta induza deformação nas vesículas ou danos na amostra. As imagens de altura, amplitude, AcosD, AsinD e Fase foram adquiridas simultaneamente sobre uma mesma área selecionada.

4. Resultados e Discussão

4.1 Padronização de Proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5

Os primeiros passos do trabalho se direcionaram no intuito de padronizar a obtenção de proteolipossomos contendo primeiramente TNAP e AnxA5 separadamente e em seguida obter proteolipossomos contendo as duas proteínas simultaneamente. Para isso, iniciaram-se os estudos incorporando a TNAP a sistemas lipídicos que apresentam eficiente incorporação da AnxA5.

4.1.1 Proteolipossomos contendo TNAP

Os primeiros estudos apresentaram como objetivo inicial inserir a TNAP a sistemas eficientes na incorporação da AnxA5, como já descritos na literatura, para posteriormente elaborarmos um proteolipossomo com a duas proteínas inseridas simultaneamente.

Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (Camolezi et al., 2002; Simão et al., 2010; Bolean et al., 2010) relatam uma incorporação de ~ 95% da TNAP a lipossomos constituídos somente por DPPC. O DPPC apresenta temperatura de transição de fase de 41,5 °C (Koynova et al., 1996; Cieřlik-Boczula et al., 2014), o qual foi determinado por DSC e será descrito nos itens de discussão a seguir.

Segundo relatado no material e métodos item 3.10, a incorporação da TNAP aos lipossomos de DPPC é feita à temperatura de 25 °C. Entretanto é importante ressaltar que, mesmo estando o lipídio no estado de fase gel na temperatura usada para a incorporação, obtêm-se ótimos rendimentos de inserção da enzima (acima de 90%) ao sistema lipídico (Camolezi et al., 2002).

Kirsch e colaboradores (Kirsch et al., 1997; Kirsch, 2005) demonstraram a importância do DPPS para uma reconstituição eficiente da AnxA5 aos sistemas vesiculares. Eles sugerem que a AnxA5 insere-se espontaneamente a lipossomos contendo várias concentrações de fosfatidilserina e não é capaz de inserir-se a

lipossomos constituídos somente por PC ou PE. Obtiveram melhores incorporações da AnxA5 quando lipossomos foram constituídos por estes três lipídios. Desta forma, os testes relacionados à incorporação da TNAP em composições diferentes de lipossomos iniciaram-se com a formação de lipossomos constituídos com DPPC:DPPS:DPPE com a proporção 5:4:1 (razão molar), conforme se observa na curva de incorporação apresentada na Figura 4.

Obteve-se um máximo de 29% de incorporação da atividade p-NFFase da TNAP ao sistema DPPC:DPPS:DPPE (5:4:1 razão molar), mostrando assim uma baixa porcentagem de incorporação da enzima ao sistema proposto.

Com o intuito de otimizar a porcentagem de inserção da TNAP, foi retirado do sistema o lipídio DPPE que provavelmente poderia estar dificultado a inserção da TNAP por apresentar uma carga líquida negativa.

É descrito na literatura (Kirsch et al., 1997; Moss e Gerke, 2002; Lizarbe et al., 2013) a importância da presença do lipídio DPPS para uma inserção eficiente da AnxA5 a sistemas vesiculares. Assim, propôs-se um segundo sistema composto por DPPC:DPPS 1:1 (razão molar). Porém, a estes lipossomos não foi observado uma porcentagem de incorporação significativa (< 5%) da atividade da TNAP, como observado na Figura 4.

Provavelmente este sistema é formado com um alto grau de empacotamento, resultando em uma maior organização do sistema e dificultando assim a inserção da enzima, ou ainda a presença da cabeça lipídica de serina, que em pH fisiológico resulta em uma carga líquida negativa, podendo também afetar na incorporação da TNAP.

Figura 4: Porcentagem de incorporação da atividade p-NFFase da TNAP aos sistemas de lipossomos constituídos por: (■) DPPC:DPPS:DPPE 5:4:1 (razão molar) e (●) DPPC:DPPS 1:1 (razão molar); (símbolos abertos) Sobrenadante representando proteína não incorporada; (símbolos fechados) Pellet contendo proteolipossomos.

DPPC e DPPS são dois dos principais lipídios encontrados nas membranas das MVs. Vários estudos vêm demonstrando as importantes funções do DPPS no processo de biomineralização, regulando tanto o influxo de cálcio para o interior das vesículas, como também na formação do cristal de hidroxiapatita (Kirsch et al., 1997; Wu et al., 1997, 2002; Damek-Poprawa et al., 2006; Wuthier e Lipscomb, 2011). Com estas informações, foi necessário formular proteolipossomos constituídos com os lipídios DPPC e DPPS e padronizar a incorporação das duas proteínas TNAP e da AnxA5 a estes sistemas miméticos de MVs.

Assim, realizaram-se ensaios de inserção da TNAP a sistemas de lipossomos contendo uma concentração mínima de DPPS e usando como matriz o lipídio DPPC. Neste caso o DPPC proporcionaria a inserção da TNAP em ensaios realizados futuramente, e a presença de DPPS facilitaria a inserção da AnxA5. A membrana das MVs contem domínios ricos em PS, os quais proporcionam um microambiente ideal para interações proteína-proteína e proteína-lipídio, além de proporcionar função ideal à AnxA5 no influxo de Ca^{2+} (Kirsch et al., 1997; Kirsch, 2005).

Foram feitos ensaios de inserção da TNAP a sistemas de lipossomos constituídos por DPPC com 5, 10, 15, 20 e 30% de DPPS (razão molar). Os lipossomos foram incubados com a enzima por 24 h à temperatura ambiente. As amostras foram ultracentrifugadas e dosou-se a atividade p-NFFase no sobrenadante, referente à enzima não incorporada, e no pellet, referente aos proteolipossomos formados (conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos). Os dados obtidos estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1: Porcentagens de incorporação da atividade p-NFFase da TNAP em lipossomos contendo concentrações crescentes de DPPS. As composições lipídicas estão expressas em razão molar.

Sistemas Lipídicos	Atividade p-NFFase (%)				
	Composição lipídica				
DPPC:DPPS (razão molar)	95:5 (%)	90:10 (%)	85:15 (%)	80:20 (%)	70:30 (%)
Proteína não incorporada	89,8 ± 4,5	86,7 ± 3,9	68,3 ± 4,8	52,6 ± 3,7	56,1 ± 4,7
Proteína incorporada (Proteolipossomos)	10,2 ± 2,3	13,3 ± 1,5	31,7 ± 2,9	47,4 ± 4,3	43,9 ± 3,1

Melhores porcentagens de incorporação da TNAP foram obtidas quando utilizadas menores concentrações de DPPS nos lipossomos, quando comparado com os dados obtidos para a proporção DPPS:DPPS 1:1. Entretanto, estes valores de incorporação da TNAP ainda são menores que 50% da atividade total.

Camolezi e colaboradores (2002) padronizaram a incorporação da TNAP solubilizada em polidocanol, livre de detergente, em diferentes sistemas lipídicos (DMPC, DLPC e DPPC). Eles mostraram que a incorporação da TNAP é tempo dependente e obtiveram acima de 95% de incorporação da enzima em lipossomos após 4 h de incubação a 25 °C.

Foram ainda realizados testes de incorporação da TNAP a lipossomos constituídos de DPPC:DPPS 5% (razão molar), porém acima da temperatura de transição do DPPC (41,5 °C) (Koynova et al., 1996; Cieřlik-Boczula et al., 2014) para verificar se a membrana na fase líquido-cristalina (mais fluida) proporciona uma melhor eficiência na incorporação da TNAP quando comparado com os dados de incorporação obtidos em temperatura ambiente, ou seja, com a membrana lipídica na fase gel. Obteve-se apenas em torno de 30% de incorporação da atividade fosfomonohidrolase nos proteolipossomos, mostrando um aumento, porém não expressivo, em relação aos dados anteriores com a membrana na fase gel, mas sendo ainda um baixo valor de incorporação da enzima.

De fato, cargas lipídicas apresentam importante papel nas interações entre proteínas e lipídios (Liu et al., 1999; Ronzon et al., 2002, 2004, Simão et al., 2010). Fosfatase alcalina (ALP) interage de diferentes maneiras com monocamadas constituídas de DPPC, DPPS ou DMPA, quando inserida em filmes lipídicos, sendo observados diferentes efeitos na orientação e conformação da enzima como função da composição lipídica (Ronzon et al., 2002, 2004; Sesana et al., 2008). Além disso, mostrou-se que a atividade da ALP é sensível ao empacotamento lateral e estado físico dos lipídios e no agrupamento da enzima na interface de monocamadas (Caseli et al., 2005, 2008).

4.1.2 Proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5

No intuito de produzir proteolipossomos com uma maior porcentagem de atividade fosfomonohidrolase da TNAP incorporada, foram realizados testes de

incorporação com as duas proteínas simultaneamente. Os dados obtidos estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Comparação entre as porcentagens de incorporação da atividade p-NFFase da TNAP obtidas quando incorporadas sozinha ou na presença da AnxA5. As composições lipídicas estão expressas em razão molar e os ensaios de atividade enzimática foram realizados em Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo $MgCl_2$ 2 mM e EGTA 200 μ M.

Composição Lipídica		Atividade p-NFFase (%)		Aumento (x)	
DPPC	Sobrenadante	59,1 $\pm$ 4,1	Sobrenadante	36,3 $\pm$ 1,8	1,6
	Proteo-TNAP	40,9 $\pm$ 2,8	Proteo-TNAP + AnxA5	63,7 $\pm$ 4,5	
DPPC:DPPS 5%	Sobrenadante	89,8 $\pm$ 5,4	Sobrenadante	34,9 $\pm$ 2,3	6,4
	Proteo-TNAP	10,2 $\pm$ 1,3	Proteo-TNAP + AnxA5	65,1 $\pm$ 3,2	
DPPC:DPPS 10%	Sobrenadante	86,7 $\pm$ 6,1	Sobrenadante	47,8 $\pm$ 2,8	4,0
	Proteo-TNAP	13,3 $\pm$ 1,4	Proteo-TNAP + AnxA5	52,2 $\pm$ 3,6	

Um expressivo aumento da incorporação da atividade p-NFFase da TNAP foi observado para os sistemas estudados quando a incorporação foi realizada com as duas proteínas simultaneamente. Assim, com os resultados obtidos, foi possível optar pela estratégia de incorporação utilizando as duas proteínas simultaneamente e em lipossomos constituídos com baixas concentrações de DPPS em DPPC.

TNAP e AnxA5 foram então incorporadas a sistemas de lipossomos compostos por DPPC e DPPC:DPPS 5, 10 e 15% (razão molar). A presença das proteínas inseridas nos diferentes proteolipossomos formados pode ser observada por SDS-PAGE (Figura 5-A), através de uma única banda ao redor de 60 kDa correspondente ao monômero da TNAP e outra banda ao redor de 29 kDa correspondente a presença da AnxA5. Immunoblotting também confirmou a presença da AnxA5 a todos os proteolipossomos estudados (Figura 5-B).

Figura 5: (A) SDS-PAGE (gel 10%) de diferentes composições de proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5; (B) Western blotting para análise da presença da AnxA5: (1) Padrões de peso molecular (kDa); (2) DPPC; (3) DPPC:DPPS 5%; (4) DPPC:DPPS 10% e (5) DPPC:DPPS 15% (razão molar).

Tanto lipossomos constituídos apenas por DPPC (Figura 5, Coluna 2) quanto lipossomos constituídos por DPPC:DPPS permitiram a incorporação de ambas as proteínas. Tais resultados contradizem estudos realizados previamente por Kirsch e colaboradores (1997).

Proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10% (razão molar) contendo TNAP + AnxA5 foram tratados com PIPLC, a qual cliva especificamente âncoras de GPI, liberando assim a TNAP no sobrenadante (Ciancaglini et al., 2006; Simão et al., 2010). Desta forma, é possível quantificar as concentrações das proteínas incorporadas aos sistemas vesiculares estudados. Após ultracentrifugação, foram analisadas as concentrações de proteína no sobrenadante e no pellet, resultando em 75% de AnxA5 incorporada e 25% de TNAP incorporada aos proteolipossomos. A presença de DPPS, neste caso, não afetou significativamente na concentração das proteínas incorporadas.

Também foram realizados estudos de dano à membrana das vesículas, a 37 °C pela liberação de CF (25 mM) aprisionada dentro de lipossomos e proteolipossomos constituídos com diferentes composições lipídicas. A perda da integridade da membrana dos lipossomos e proteolipossomos resultaria na diluição do fluoróforo na solução externa da vesícula, aumento consequentemente o sinal de fluorescência. Não foi detectada liberação da fluorescência da CF durante 2 dias de monitoramento dos proteolipossomos, a 37 °C. A liberação da droga só foi detectada após adição de pequenas quantidades de detergente à amostra (resultados não mostrados).

4.1.3 Proteolipossomos contendo AnxA5

A AnxA5 foi incorporada a proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10% (razão molar) com o intuito de se avaliar a influência do DPPS no rendimento de proteína incorporada. Obteve-se em torno de 11.64 µg/mL de concentração de AnxA5 incorporada a proteolipossomos constituídos apenas por DPPC e ~ 25.79 µg/mL de concentração de AnxA5 incorporada a proteolipossomos constituídos na presença de 10% de DPPS, evidenciando assim um significativo aumento (~ 2,2 x maior) na incorporação da AnxA5 quando o DPPS está presente na composição lipídica.

Apesar de alguns autores descreverem que AnxA5 não se liga a lipossomos constituídos somente por PC (Kirsch et al., 1997; Kirsch, 2005), no presente trabalho obteve-se incorporação da proteína em lipossomos constituídos apenas por DPPC, porém em menor concentração do que quando comparado quando há DPPS na composição lipídica. Na metodologia descrita por Kirsch e colaboradores (1997) para a incorporação da AnxA5 a lipossomos, eles incubaram 200 nM de proteína com lipossomos durante 1h, à temperatura ambiente. No entanto, na metodologia desenvolvida no presente trabalho, utilizou-se uma grande quantidade de proteína em solução (6 μ M) e a incubação proteína-lipídio foi realizada durante 24h à temperatura ambiente, permitindo assim sua inserção na bicamada lipídica composta por DPPC.

É necessário então investigar se proteolipossomos constituídos apenas por DPPC na presença de AnxA5 apresentarão influxo de cálcio mediado pela proteína formadora de canal.

4.2 Caracterização Cinética de Proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5.

Estudos de caracterização cinética foram realizados com o intuito de avaliar o efeito da composição dos lipossomos na atividade da TNAP reconstituída e especialmente como a presença da AnxA5 e de cargas negativas provindas do DPPS podem influenciar na atividade da enzima.

4.2.1 Efeito da presença da AnxA5 nos parâmetros cinéticos da TNAP.

Com o objetivo de verificar como os parâmetros cinéticos da TNAP são afetados na presença da AnxA5, foram realizados ensaios de cinética enzimática utilizando os principais substratos fisiológicos conhecidos para a TNAP (ATP, ADP e PP_i). Os resultados estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos para a hidrólise dos substratos ATP, ADP e PP_i (pH 7.4) por proteolipossomos com diferentes composições lipídicas contendo apenas TNAP ou TNAP + AnxA5. As porcentagens de DPPC:DPPS estão expressas em razão molar.

Substratos	Parâmetros Cinéticos	Proteos		Proteos - TNAP + AnxA5		
		TNAP				
		DPPC	DPPC	DPPC:DPPS 5%	DPPC:DPPS 10%	DPPC:DPPS 15%
ATP	V_m (U/mg)	13,59	29,85	14,02	15,74	13,86
	$K_{0,5}$ (mM)	0,068	0,184	0,197	0,172	0,279
	n	1,0	0,7	0,6	0,7	0,6
	$k_{cat} / K_{0,5}$ (M ⁻¹ .s ⁻¹)	399,71	324,46	142,34	183,02	99,35
ADP	V_m (U/mg)	5,90	8,87	11,56	5,77	4,70
	$K_{0,5}$ (μM)	0,017	60,08	32,31	14,87	30,83
	n	1,2	0,7	1,3	1,5	1,5
	$k_{cat} / K_{0,5}$ (M ⁻¹ .s ⁻¹)	694,12	295,27	715,57	776,06	304,90
PP _i	V_m (U/mg)	17,77	46,16	38,13	30,39	24,84
	$K_{0,5}$ (mM)	0,164	0,131	0,233	0,093	0,095
	n	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8
	$k_{cat} / K_{0,5}$ (M ⁻¹ .s ⁻¹)	216,71	704,73	327,30	657,08	524,05

Para proteolipossomos constituídos de DPPC contendo apenas TNAP maiores valores de V_{max} foram observados para a hidrólise de ATP e PP_i. O maior valor de afinidade ($K_{0,5}$) foi observada para hidrólise de PP_i e a menor para a hidrólise de ADP. Efeitos de cooperatividade (n) não foram observados para a hidrólise de ATP. Entretanto, efeitos de cooperatividade positiva foram encontrados para a hidrólise de ADP e, surpreendentemente, efeitos de cooperatividade negativa para a hidrólise de PP_i (Tabela 3).

Quando comparamos os parâmetros cinéticos obtidos para proteolipossomos constituídos de DPPC contendo apenas TNAP com os parâmetros obtidos para proteolipossomos contendo as duas proteínas simultaneamente (proteolipossomos-TNAP+AnxA5), para hidrólise de ATP (Figura 6), observa-se que na presença da AnxA5 ocorre um considerável aumento nos valores de $K_{0,5}$ (0,068 mM para 0,184 mM) (Tabela 3 e Figura 6) e nos valores de V_{max} (13,59 U/mg para 29,85 U/mg). Além disso, observa-se cooperatividade negativa (0,7) na presença da AnxA5 (Tabela 3 e Inserção da Figura 6).

A Figura 7 mostra os efeitos da presença da AnxA5 nos parâmetros cinéticos

da TNAP na hidrólise de ADP, quando reconstituídas em proteolipossomos constituídos de DPPC. A presença da AnxA5 proporciona aumento nos valores de $V_{\max}$ (5,90 U/mg para 8,87 U/mg) e um expressivo aumento nos valores de $K_{0,5}$ (0,017 μ M para 60,08 μ M) (Tabela 3) mostrando que a presença da AnxA5 proporciona uma diminuição significativa de afinidade da TNAP pelo substrato ADP. Para proteolipossomos contendo apenas TNAP, efeitos de cooperatividade positiva (1,2) foram encontrados, e na presença da AnxA5 os efeitos de cooperatividade se tornaram negativos (0,7) (Tabela 3 e Inserção da Figura 7).

Para a hidrólise de PP_i pela TNAP (Figura 8), observa-se que a presença da AnxA5 reconstituída nos proteolipossomos proporciona um aumento nos valores de $V_{\max}$ (> 2 vezes) e pequena diminuição nos valores de $K_{0,5}$ (Tabela 3). A cooperatividade não foi afetada na presença da AnxA5 para a hidrólise de PP_i (Tabela 3 e Inserção da Figura 8).

Através da comparação entre as eficiências catalíticas obtidas para os proteolipossomos contendo apenas TNAP e proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5 (Tabela 3), é possível observar que na presença da AnxA5 há uma redução nos valores de eficiência catalítica da TNAP na hidrólise de ATP e ADP. Apenas para a hidrólise de PP_i foi detectado uma melhor eficiência catalítica da TNAP na presença da AnxA5.

Figura 6. Efeito da presença da AnxA5 na atividade enzimática da TNAP quando associadas à proteolipossomos constituídos de DPPC: (O) Proteolipossomos contendo TNAP e (●) Proteolipossomos contendo TNAP + AnxA5. As reações foram efetuadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl_2 2 mM, utilizando ATP como substrato, conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos. Inserção: Representação de Hill para a interação do substrato com a enzima.

Figura 7. Efeito da presença da AnxA5 na atividade enzimática da TNAP quando associadas à proteolipossomos constituídos de DPPC: (O) Proteolipossomos contendo TNAP e (●) Proteolipossomos contendo TNAP + AnxA5. As reações foram efetuadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl_2 2 mM, utilizando ADP como substrato, conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos. Inserção: Representação de Hill para a interação do substrato com a enzima.

Figura 8. Efeito da presença da AnxA5 na atividade enzimática da TNAP quando associadas à proteolipossomos constituídos de DPPC: (O) Proteolipossomos contendo TNAP e (●) Proteolipossomos contendo TNAP + AnxA5. As reações foram efetuadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl_2 2 mM, utilizando PP_i como substrato, conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos. Inserção: Representação de Hill para a interação do substrato com a enzima.

4.2.2 Efeito da composição lipídica nos parâmetros cinéticos da TNAP.

A modulação da atividade enzimática e sua inserção em microambientes lipídicos parecem ser comuns entre enzimas que possuem âncora de GPI (Sesana et al., 2008; Bolean et al., 2010, 2011; Simão et al., 2010). A presença de cargas em lipídios apresenta papel crucial na interação da proteína com lipídios (Liu et al., 1999; Bellet-Amalric et al., 2000; Ronzon et al., 2002) e, conseqüentemente interação com membranas biológicas. Foi observado que quando a fosfatase alcalina de intestino bovino é inserida em filmes lipídicos, ela interage de diferentes maneiras com monocamadas constituídas de DPPC ou DPPS, com diferentes efeitos na organização desses microambientes como função da composição lipídica (Ronzon et al., 2002; Sesana et al., 2008).

Quando são comparados os parâmetros cinéticos obtidos para a TNAP reconstituída em lipossomos de diferentes composições na presença de AnxA5 para a hidrólise de ATP (Figura 9 e 12), observa-se cooperatividade negativa para proteolipossomos constituídos apenas de DPPC (0,74), com uma diminuição nos valores de cooperatividade (até 0,55) com o gradual aumento da concentração de DPPS nas vesículas (Tabela 3 e Fig. 12-A). Maiores valores de $K_{0,5}$ também foram encontrados na presença de DPPS e AnxA5 quando comparados com os valores obtidos para proteolipossomos constituídos apenas de DPPC contendo somente a TNAP (0,068 mM) (Tabela 3 e Fig. 12-B). Os valores de V_{max} para a hidrólise de ATP (Figura 9) pela TNAP diminuíram significativamente na presença de DPPS na composição dos proteolipossomos (Tabela 3 e Fig. 12-C) e, na presença de AnxA5, foi observado um considerável aumento na V_{max} para proteolipossomos constituídos de DPPC (Tabela 3).

Nos estudos de hidrólise de ADP pela TNAP (Figura 10), foi observado um aumento gradual dos valores de cooperatividade com o aumento da concentração de DPPS nas vesículas, variando de 0,7 até 1,6 (Tabela 3 e Fig. 12-A). Os valores de $K_{0,5}$ reduziram significativamente na presença de 5 e 10% de DPPS. Na presença de 15% de DPPS essa redução foi menos pronunciada quando comparado com o sistema de proteolipossomo constituído de DPPC (Tabela 3 e Fig. 12-B). Maior V_{max} foi encontrado para o sistema contendo 5% de DPPS (Figura 10).

A presença de AnxA5 e diferentes concentrações de DPPS nos

proteolipossomos não proporcionaram efeitos nos valores de cooperatividade para a hidrólise de PP_i pela TNAP (Fig. 11 e Fig. 12-A). Maior valor de $K_{0,5}$ foi encontrado para o sistema contendo 5% de DPPS além de uma diminuição nos valores de V_{max} com o aumento da concentração de DPPS na composição dos proteolipossomos (Tabela 3 e Fig. 12-A,B,C). Na presença de AnxA5 houve um expressivo aumento na V_{max} (> 2 vezes) para proteolipossomos constituídos de DPPC (Tabela 3).

A comparação entre as eficiências catalíticas para os proteolipossomos contendo diferentes concentrações de DPPS (Tabela 3) permite determinar qual o melhor sistema (razão molar DPPC:DPPS) obtido para a reconstituição das duas proteínas juntas, baseado nos parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise dos diferentes substratos estudados. A melhor eficiência catalítica foi encontrada para os proteolipossomos contendo 10% de DPPS, e por isso escolheu-se essa composição lipídica para os demais experimentos relatados abaixo, além dos sistemas constituídos apenas por DPPC.

Quando são comparados os proteolipossomos-TNAP+AnxA5 constituídos de DPPC com proteolipossomos-TNAP+AnxA5 contendo os dois lipídios em sua composição (DPPC:DPPS), melhores eficiências catalíticas foram encontradas para proteolipossomos constituídos apenas de DPPC, para a hidrólise de ATP e PP_i pela TNAP ($k_{cat}/K_{0,5} = 324,46$ e $704,73 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente).

Os dados apresentados sugerem que a presença de DPPS nos proteolipossomos pode estar influenciando na especificidade da TNAP durante a hidrólise dos diferentes substratos, proporcionando uma maior especificidade da enzima pelo PP_i e ADP quando comparado com ATP, nas condições estudadas (Simão et al., 2010; Ciancaglini et al., 2012; Bolean et al., 2014). O DPPS proporciona uma modulação sinérgica da TNAP na presença da AnxA5.

Figura 9. Efeito da concentração de DPPS na atividade enzimática da TNAP associada à proteolipossomos contendo TNAP + AnxA5: (■) DPPC, (●) DPPC:DPPS 5%, (▲) DPPC:DPPS 10% e (◆) DPPC:DPPS 15% (razão molar). As reações foram efetuadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl_2 2 mM, utilizando ATP como substrato, conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos. Inserção: Representação de Hill para a interação do substrato com a enzima.

Figura 10. Efeito da concentração de DPPS na atividade enzimática da TNAP associada à proteolipossomos contendo TNAP + AnxA5: (■) DPPC, (●) DPPC:DPPS 5%, (▲) DPPC:DPPS 10% e (◆) DPPC:DPPS 15% (razão molar). As reações foram efetuadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl_2 2 mM, utilizando ADP como substrato, conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos. Inserção: Representação de Hill para a interação do substrato com a enzima.

Figura 11. Efeito da concentração de DPPS na atividade enzimática da TNAP associada à proteolipossomos contendo TNAP + AnxA5: (■) DPPC, (●) DPPC:DPPS 5%, (▲) DPPC:DPPS 10% e (◆) DPPC:DPPS 15% (razão molar). As reações foram efetuadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo $MgCl_2$ 2 mM, utilizando PP_i como substrato, conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos. Inserção: Representação de Hill para a interação do substrato com a enzima.

Figura 12: Parâmetros cinéticos para hidrólise dos substratos (■) ATP, (▲) ADP e (●) PP_i por proteolipossomos contendo TNAP + AnxA5 constituídos de DPPC e DPPS em diferentes razões molares: **(A)** Velocidade máxima (U/mg), **(B)** Constante de afinidade (em mM). (Os valores obtidos para o ADP foram multiplicados por 1000); **(C)** Efeitos cooperativos.

4.2.3 Efeito do Tampão contendo EGTA nos Parâmetros Cinéticos da TNAP

EGTA (ácido etilenodiaminotetracético) é um ácido aminopolicarboxílico usado como agente quelante. Comparado com o EDTA, ele tem menor afinidade pelo Mg^{2+} , sendo então seletivo para íons Ca^{2+} . É útil em soluções tampão que se assemelham ao ambiente de células vivas, onde a concentração de íons cálcio é geralmente, pelo menos mil vezes menor que a concentração de íons magnésio. Além disso, está presente em protocolos de extração e purificação da AnxA5 de membranas naturais (Schlaepfer et al., 1987; Qin et al., 1999).

Sabe-se que a TNAP é uma metaloenzima estimulada sinergicamente por íons Zn^{2+} e Mg^{2+} (Ciancaglini et al., 1990b, 1992), e também por íons Mn^{2+} (Leone et al., 1995) e Co^{2+} (Ciancaglini et al., 1989, 1995). Estudos avaliando a modulação da atividade enzimática na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} mostraram que a atividade enzimática da TNAP é significativamente aumentada na presença de $10\mu M$ de $MgCl_2$ e concentrações crescentes de Ca^{2+} proporcionaram efeitos de inibição na atividade da enzima, sugerindo que íons Ca^{2+} desloquem Mg^{2+} do seu sítio ativo (Leone et al., 1997b).

Uma vez que foram detectadas mudanças significativas no comportamento cinético da TNAP quando a reação de catálise foi realizada no tampão de trabalho para a AnxA5 contendo EGTA, foi necessário avaliar qual a influência do EGTA nos parâmetros cinéticos da TNAP. As reações de cinéticas foram então realizadas utilizando os substratos ATP, ADP e PP_i . Os parâmetros cinéticos obtidos estão sumarizados na Tabela 4, onde se pode comparar a eficiência catalítica da TNAP na presença ou ausência de EGTA no meio reacional.

Para a hidrólise de ATP pela TNAP reconstituída em proteolipossomos constituídos de DPPC, observa-se que a presença de EGTA proporciona uma grande diminuição nos valores de eficiência catalítica (4 vezes menor). Quando os proteolipossomos contem as duas proteínas simultaneamente (proteolipossomos-TNAP+AnxA5) há uma redução nos valores de eficiência catalítica na presença de EGTA, porém menos pronunciada.

Quando o ADP é utilizado como substrato na presença de EGTA, a eficiência catalítica da TNAP reconstituída em proteolipossomos reduz em torno de 2 vezes. Porém, excepcionalmente para proteolipossomos contendo as duas proteínas

simultaneamente (proteolipossomos-TNAP+AnxA5) há um pequeno aumento nos valores de eficiência catalítica na presença de EGTA.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos para a hidrólise dos substratos ATP, ADP e PP_i (pH 7.4) por proteolipossomos constituídos de DPPC contendo apenas TNAP ou TNAP + AnxA5. Efeito da presença de EGTA nos parâmetros cinéticos da TNAP.

Substratos	Parâmetros Cinéticos	Ausência de EGTA (*)		Presença de EGTA (**)	
		TNAP	TNAP+AnxA5	TNAP	TNAP+AnxA5
ATP	V _m (U/mg)	13,59	29,85	7,39	27,49
	K _{0,5} (mM)	0,068	0,184	0,149	0,178
	k _{cat} / K _{0,5} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	399,71	324,46	99,19	308,87
ADP	V _m (U/mg)	5,90	8,87	7,58	7,44
	K _{0,5} (μM)	0,017	60,08	0,042	34,45
	k _{cat} / K _{0,5} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	694,12	295,27	360,95	431,93
PP _i	V _m (U/mg)	17,77	46,16	27,77	15,36
	K _{0,5} (mM)	0,164	0,131	0,533	0,138
	k _{cat} / K _{0,5} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	216,71	704,73	103,43	222,60

*Tampão Estoque: Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl₂ 2 mM. (valores reportados da Tabela 3 para facilitar a comparação).

**Tampão Estoque com EGTA: Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl₂ 2 mM e EGTA 200μM.

Nos últimos resultados obtidos, para a hidrólise de PP_i, as reduções nos valores de eficiência catalítica na presença de EGTA são ainda maiores. Para proteolipossomos contendo apenas TNAP, na presença de EGTA a eficiência catalítica reduz 2 vezes e para proteolipossomos contendo as duas proteínas, a eficiência catalítica da TNAP reduz 3 vezes.

Os dados aqui apresentados sugerem que o EGTA possa estar quelando além dos íons Ca²⁺ os íons Mg²⁺, os quais são essenciais para a atividade catalítica da TNAP e assim proporcionando consideráveis mudanças nos parâmetros cinético da enzima. Por esse motivo, apenas os ensaios de influxo de Ca²⁺ mediado pela AnxA5 reconstituída em proteolipossomos, foram realizados na presença de tampão

contendo EGTA (item 4, Resultados e Discussão). Os demais experimentos de cinética enzimática foram realizados na ausência de EGTA.

4.3 Caracterização Biofísica dos sistemas lipídicos

4.3.1 Efeito da concentração de DPPS no comportamento termotrópico de lipossomos constituídos de DPPC.

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica de grande importância na caracterização termodinâmica de modelos de membranas e biomembranas. DSC é uma técnica altamente sensível capaz de medir as propriedades termodinâmicas de transições induzidas termicamente. Por isso, esta técnica foi escolhida para a caracterização das interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína presentes nos sistemas vesiculares utilizados no presente trabalho.

Lipossomos constituídos com DPPC (Fig. 13-a) são caracterizados por uma temperatura principal de transição de fase de 40.8 °C. Além do pico de transição principal, detectou-se um pico menor e largo referente à sua pré-transição com T_C em torno de 33 °C. Estes resultados são condizentes com os valores descritos na literatura (Koynova et al., 1996; Tristram-Nagle e Nagle, 2004; Bolean et al., 2010; Cieřlik-Boczula et al., 2014).

As diferentes composições de lipossomos foram analisadas por DSC e os termogramas estão apresentados na Figura 13. Os dados obtidos de temperatura de transição principal de fase (T_C), entalpia de transição (ΔH) e cooperatividade de transição de fase ($\Delta t_{1/2}$) estão resumidos na Tabela 5.

Figura 13: Termograma C_p ($\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) vs. T ($^{\circ}\text{C}$) para lipossomos constituídos de DPPC e DPPS (concentração final de lipídio 1,5 mg/mL) em diferentes razões molares de DPPS: **(a)** 0%; **(b)** 5%; **(c)** 10%; **(d)** 15%; **(e)** 20% e **(f)** 30%.

Tabela 5. Caracterização biofísica de lipossomos constituídos de DPPC e DPPS em diferentes razões molares: parâmetros termodinâmicos de DSC e valores de DLS.

DPPS Razão molar (%)	Diâmetro (nm)	IP	ΔH (Kcal.mol ⁻¹)	T _c (°C)	$\Delta t_{1/2}$
0	143.2 ± 3.03	0.102 ± 0.04	8.73 ± 0.05	40.8 ± 0.1	1.29 ± 0.01
5	140.6 ± 0.94	0.075 ± 0.05	9.80 ± 0.05	42.3 ± 0.1	2.04 ± 0.01
10	131.8 ± 0.47	0.057 ± 0.02	8.43 ± 0.07	41.9 ± 0.1	1.96 ± 0.02
15	128.5 ± 4.25	0.107 ± 0.04	8.62 ± 0.06	42.5 ± 0.1	2.53 ± 0.02
20	110.3 ± 9.04	0.142 ± 0.03	7.29 ± 0.09	43.1 ± 0.3	2.81 ± 0.04
30	121.6 ± 2.10	0.162 ± 0.01	7.05 ± 0.18	43.0 ± 0.2	3.12 ± 0.05

Com o aumento na concentração de DPPS nos sistemas constituídos de DPPC, pode-se observar um progressivo alargamento no pico de transição principal devido a uma diminuição na cooperatividade de transição de fase e valores de ΔH (Figura 13, Tabela 5), resultando em um processo de transição gel-fluido menos cooperativo com o aumento da concentração de DPPS nos lipossomos. É importante salientar que este alargamento observado até a concentração de 15% de DPPS em DPPC (Figura 13-a,b,c,d) ocorre devido à junção gradual do pico referente à pré-transição do DPPC (T_c = 34,7 °C) com o pico de transição principal, o qual poderá ser melhor detectado na Figura 15 a seguir.

Além disso, na concentração de 20% de DPPS e acima (Figura 13-e,f), pode-se observar uma segregação lateral de fase, evidenciada pelo aparecimento de um ombro a direita do pico de transição principal, o qual indica a formação de microdomínios ricos em DPPS. Um pequeno deslocamento na T_c também é observado com o aumento da concentração de DPPS. Este comportamento também foi descrito por Pedersen e colaboradores (2001).

A média dos diâmetros dos lipossomos constituídos de DPPC:DPPS não variou significativamente quando comparamos com os diâmetros obtidos para lipossomos constituídos apenas de DPPC. Obtivemos amostras com tamanhos homogêneos, isto é, com baixos valores de índice de polidispersão para os diferentes lipossomos estudados (Tabela 5).

A pré-transição de fase é uma transição de baixa entalpia, abaixo da transição principal, a qual é dependente do grupo cabeça-polar do lipídio. Está relacionada à

formação de ondulações periódicas na membrana e pode ser claramente observada em fosfocolinas, mas não em fosfoerinas (Rand et al., 1975; Luna e McConnell, 1977). As pré-transições parecem ser dependentes do estado vesicular dos lipídios.

Com o intuito de avaliarmos a influência do DPPS na pré-transição do DPPC, foram realizados estudos calorimétricos com sistemas multilamelares, os quais exibem pré-transições mais bem definidas e separadas da transição principal quando comparamos com sistemas unilamelares (Fig. 14-A e B). As pré-transições também podem ser encontradas em sistemas unilamelares lipossomais (Fig. 14-A), mas os picos são menos cooperativos (mais largos) e menos separados do pico de transição principal (Heimburg, 2000), sendo assim mais definidos em vesículas multilamelares (Fig. 14-B).

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos de DSC para vesículas Unilamelares (LUV) e Multilamelares (MLV) constituídas de DPPC.

Vesículas		ΔH (Kcal.mol ⁻¹)	T_c (°C)	$\Delta t_{1/2}$
LUV	Pré-transição	2.20 ± 0.05	38.4 ± 0.2	7.45 ± 0.05
	Transição Principal	6.31 ± 0.05	40,8 ± 0.1	1.29 ± 0.01
MLV	Pré-transição	1.00 ± 0.01	34.7 ± 0.1	1.88 ± 0.01
	Transição Principal	7.47 ± 0.02	41.1 ± 0.1	0.46 ± 0.01

Para os sistemas vesiculares estudados, a pré-transição apresenta um comportamento similar à transição principal. Com o aumento da concentração de DPPS nos sistemas, há um progressivo alargamento no pico de pré-transição, diminuição nos valores de ΔH e aumento nos valores de $\Delta T_{1/2}$. Com o aumento da concentração de DPPS, o pico é deslocado para a direita, isto é para maiores temperaturas, se juntando ao pico de transição principal (Tabela 6). Em vesículas com 15% DPPS e acima, a pré-transição já não pode mais ser detectada separada da transição principal (Fig. 15).

Figura 14: Termograma C_p ($\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) vs. T ($^{\circ}\text{C}$) para vesículas lipídicas constituídas de DPPC (1,5 mg/mL): **(A)** Unilamelares (LUV) e **(B)** Multilamelares (MLV).

Figura 15: Termograma C_p ($\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) vs. T ($^{\circ}\text{C}$) para pré-transições de vesículas Multilamelares constituídas de DPPC e DPPS (concentração final de lipídio 1,5 mg/mL) em diferentes razões molares de DPPS: **(a)** 0%; **(b)** 5%; **(c)** 10% e **(d)** 15%.

4.3.2 Efeito da concentração de DPPS no comportamento termotrópico de proteolipossomos constituídos de DPPC contendo TNAP e/ou AnxA5.

Lipossomos constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10% (razão molar) foram incubados com as proteínas formando sistemas de proteolipossomos contendo TNAP, AnxA5 e as duas proteínas simultaneamente. Estes sistemas foram estudados utilizando as técnicas de DSC e DLS. Os parâmetros obtidos estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7. Caracterização biofísica de proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPS em diferentes razões molares: parâmetros termodinâmicos de DSC e valores de DLS.

Composição dos Proteolipossomos			Diâmetro (nm)	IP	ΔH_{total} (Kcal.mol ⁻¹)	T _c (°C)	$\Delta t_{1/2}$
Lipídio (razão molar)	TNAP	AnxA5					
DPPC	+	-	226.5 ± 4.36	0.426 ± 0.05	3.58 ± 0.02	40.9 ± 0.1	1.32 ± 0.01
DPPC	-	+	271.8 ± 9.87	0.385 ± 0.18	5.68 ± 0.05	41.0 ± 0.1	0.96 ± 0.01
DPPC	+	+	270.0 ± 8.01	0.465 ± 0.03	6.38 ± 0.05	41.4 ± 0.1	1.16 ± 0.01
DPPC:DPPS 10%	+	-	206.5 ± 8.91	0.372 ± 0.25	4.34 ± 0.02	42.2 ± 0.2	2.19 ± 0.01
DPPC:DPPS 10%	-	+	221.5 ± 8.30	0.360 ± 0.02	5.37 ± 0.02	42.0 ± 0.1	1.50 ± 0.02
DPPC:DPPS 10%	+	+	248.1 ± 8.98	0.476 ± 0.08	5.56 ± 0.04	42.4 ± 0.2	1.76 ± 0.01

O comportamento termotrópico dos proteolipossomos (proteolipossomos-TNAP e proteolipossomos-AnxA5) está apresentado na Figura 16, onde se pode observar que a presença de AnxA5 proporciona uma diminuição nos valores de ΔH quando comparados com seus respectivos sistemas de lipossomo. Quando a TNAP está presente nos proteolipossomos, este efeito é ainda maior (Tabelas 1 e 2) além de um alargamento no pico de transição principal.

Similares resultados foram reportados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Bolean et al., 2010, 2011). Concluiu-se que este intenso decréscimo nos valores de ΔH para TNAP-proteolipossomos (Tabela 7), quando comparados com seus respectivos lipossomos (Tabela 5), está relacionado principalmente à inserção da âncora de GPI à bicamada lipídica (Bolean et al., 2010). De fato, a ligação de uma proteína periférica de membrana à superfície da bicamada lipídica é seguida

por uma parcial inserção da proteína à bicamada. Neste caso, a TNAP é inserida à superfície da bicamada através de sua âncora de GPI, a qual interage com a cadeia lipídica de hidrocarbonetos e resultando assim em uma diminuição nos valores de T_c e/ou ΔH , os quais podem ser explicados devido ao decréscimo nas interações de van der Waals entre as cadeias lipídicas acil após a inserção da âncora de GPI (Bolean et al., 2010). Acredita-se que estas proteínas interagem com a bicamada lipídica através de uma combinação de forças eletrostáticas e hidrofóbicas (Kleinschmidt, 2013).

Figura 16: Termograma C_p ($\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) vs. T ($^{\circ}\text{C}$) para lipossomos (1,5 mg.mL) e proteolipossomos (0,605 mg/mL) constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10% (razão molar): **(a)** DPPC-lipossomos; **(b)** DPPC:DPPS 10%-lipossomos; **(c)** DPPC:DPPS 10%-proteolipossomos contendo TNAP + AnxA5 e **(d)** DPPC:DPPS 10%-proteolipossomos contendo TNAP.

Figura 17: Termograma C_p ($\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) vs. T ($^{\circ}\text{C}$) para lipossomos (1,5 mg.mL) e proteolipossomos (0,605 mg/mL) constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10% (razão molar): **(a)** DPPC-lipossomos; **(b)** DPPC:DPPS 10%-lipossomos e **(c)** DPPC:DPPS 10%-proteolipossomos contendo AnxA5.

Por outro lado, proteínas hidrofóbicas integrais de membrana, como por exemplo, as Anexinas, penetram profundamente no interior hidrofóbico da bicamada lipídica, impedindo que algumas moléculas de lipídio participem da transição de fase. Como consequência, estas proteínas proporcionam um pequeno efeito na T_C e, frequentemente, uma diminuição linear nos valores de ΔH com o aumento da concentração de proteína (Kleinschmidt, 2013). A interação da AnxA5 com lipossomos constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10% também é manifestada através da diminuição nos valores de $\Delta T_{1/2}$. Por outro lado, quando a TNAP interage com estes lipossomos existe um aumento nos valores de $\Delta T_{1/2}$ (Tabela 5 e 7).

Um interessante efeito é observado quando a AnxA5 está presente nos TNAP-proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10%. Quando a TNAP é reconstituída em DPPC-lipossomos, obtêm-se uma incorporação de 40,9% da atividade reconstituída e observa-se uma intensa diminuição nos valores ΔH quando comparados com o respectivo lipossomo. Entretanto, quando a AnxA5 é adicionada ao sistema, ela provoca um aumento na incorporação da atividade da TNAP (63,7%) além de proporcionar um significativo aumento na ΔH do sistema. Similar comportamento é observado para os proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (Tabela 2).

A presença das proteínas nos sistemas de proteolipossomos, juntas ou separadas, não proporciona mudanças significativas na T_C quando comparadas com os respectivos lipossomos, isto é, de mesma composição (Tabela 5 e 7).

Uma melhor compreensão entre a composição lipídica e o comportamento das membranas é essencial para a utilização desses sistemas como potenciais sistemas miméticos de MVs. Além disso, tais resultados podem ajudar futuramente na compreensão dos complexos mecanismos envolvidos na interação de proteínas com os componentes da bicamada lipídica, os quais estão presentes no processo de biomineralização óssea.

4.4 Caracterização biofísica da AnxA5.

A estrutura cristalina da AnxA5 de placenta humana foi determinada por Huber e colaboradores em 1990, a qual contém 320 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 35.730 Da (Huber et al., 1990, 1992; Liemann and Huber, 1997; Vogl et al., 1997). A proteína é amplamente α -helicoidal, não contém carboidratos e pontes de dissulfeto (Vogl et al., 1997). Assume-se que a interação da AnxA5 com a membrana ocorre através da ligação de parte da molécula contendo o sítio curvado de ligação do metal (Ca^{2+}) com fosfolipídios negativamente carregados (Voges et al., 1994; Andree et al., 1992, 1993; Bazzi e Nelsestuen, 1992; Blackwood e Ernst, 1990; Junker e Creutz, 1993; Gilmanashin et al., 1994). Esta interação está associada com a penetração do triptofano 187 dentro da dupla camada lipídica e a movimentação do W187 é manifestada por uma forte supressão da sua fluorescência em torno de 350 nm, o qual tem sido amplamente utilizado como sonda conformacional em soluções de estudo (Meers, 1990; Meers e Mealy, 1993a, 1993b, 1994). A ligação de Ca^{2+} à AnxA5 e a interação da proteína com a superfície de membranas estão associadas com novas mudanças estruturais da proteína (Gerstein et al., 1994), sendo importante a realização de estudos de caracterização biofísica da proteína em solução e quando inserida em sistemas miméticos de membrana.

A estabilidade conformacional da AnxA5 em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl_2 2 mM, foi determinada por CD e DSC.

O espectro de CD da AnxA5 (Figura 18) apresenta característica típica de estrutura secundária em α -hélice, com dois picos mínimos em 208 e 222 nm, além de uma banda positiva ao redor de 192 nm. Calculando-se a porcentagem de estrutura em α -hélice (Chen, 1972), pode-se observar em torno de 60% da estrutura com esta conformação. Dados descritos na literatura apresentam em torno de 80% de α -hélice na estrutura da AnxA5, segundo análises de estrutura secundária por raios-X e CD (Huber et al., 1990; Weng et al., 1993; Rosengarth et al., 1999, 2001). Porém esta diferença apresentada na porcentagem de estrutura em α -hélice pode estar relacionada com o método de expressão no qual a proteína é obtida.

Os dados de DSC (Figura 19) foram obtidos com o mesmo tampão usado para os estudos de CD e mostram que a desnaturação térmica da AnxA5 é irreversível.

Entretanto, a desnaturação induzida por cloreto de guanidina apresenta alto grau de reversibilidade (Vogl et al., 1997). Os parâmetros termodinâmicos obtidos por DSC são: $\Delta H = 157,55 \pm 0.08$ (Kcal.mol⁻¹), $T_C = 47.3 \pm 0.03$ (°C) e $\Delta T_{1/2} = 3.49 \pm 0.03$. Os dados obtidos são muito similares aos até agora descritos na literatura (Vogl et al., 1997; Rosengarth et al., 1999), em similares condições experimentais. Parâmetros como pH do meio e velocidade de aquecimento/resfriamento influenciam diretamente no perfil da curva de desnaturação de proteínas. No caso da AnxA5, com o aumento do pH as curvas de transição de fase são deslocadas para maiores temperaturas (Vogl et al., 1997).

Após análises de DSC, a amostra de AnxA5 foi coletada e submetida ao dicróismo circular, para assim avaliar quais mudanças são provocadas pela temperatura na estrutura secundária da proteína. O espectro de CD obtido está apresentado na Figura 18 (linha tracejada), onde se observa uma nítida perda dos picos característicos que compõem o perfil de espectro de CD para α -hélice. Calculando-se a porcentagem de estrutura em α -hélice em 222 nm (Chen, 1972) após análise de DSC, observa-se apenas em torno de 15% da estrutura secundária da AnxA5 remanescente com esta conformação.

Serão necessários estudos futuros de caracterização estrutural da AnxA5 quando inserida aos diferentes sistemas miméticos de membrana utilizados no presente trabalho, com o intuito de observar os efeitos na estrutura secundária após interação da proteína com a bicamada lipídica.

Figura 18. Espectro de Dicroísmo Circular da AnxA5 (0,1325 mg/mL). O experimento foi realizado a 25°C em Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl_2 2 mM. Linha tracejada simboliza o espectro de CD para a amostra de AnxA5 após análise em DSC.

Figura 19. Termograma C_p ($\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) vs. T ($^{\circ}\text{C}$) para a desnaturação térmica irreversível da AnxA5 em solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl_2 2 mM.

4.5 Influxo de Ca^{2+} nos sistemas de Proteolipossomos

Para comprovar se a AnxA5 apresenta sua função de canal iônico Ca^{2+} -seletivo quando incorporada aos diferentes proteolipossomos estudados, foi analisado o influxo de Ca^{2+} para dentro dos proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10% (razão molar). Estes experimentos foram realizados durante meu Doutorado Sanduíche no Sanford Burnham Medical Research Institute, na cidade de La Jolla, Califórnia – EUA, em colaboração com o Prof. Dr. José Luis Millán.

AnxA5-proteolipossomos foram incubados com uma concentração fixa de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ quente ($5.5 \mu\text{Ci.mL}^{-1}$) e concentrações crescentes de Ca^{2+} frio (0.5 a 5 mM), resultando em um linear aumento na captação do íon, chegando ao máximo de captação com 2 mM Ca^{2+} para os DPPC-proteolipossomos e captação de 2,5 mM para os DPPC:DPPS-proteolipossomos (Figura 20).

É importante salientar que embora os níveis de Ca^{2+} variem de célula a célula, geralmente é aceito que as concentrações de Ca^{2+} no fluido fisiológico extracelular variem em torno de 2 mM, existindo diferenças significativas quando comparado com as concentrações de Ca^{2+} intracelular (em torno de 10 μM) (Tas, 2014). Valores médios para Ca^{2+} citosólico em células a partir de diferentes zonas de placa de crescimento são bastante similares, porém os níveis em células individuais e compartimentos subcelulares variam significativamente (Wu, et al. 1997).

Em torno de 800 nmol de Ca^{2+} foram incorporados às vesículas, apresentando um perfil muito similar para todas as composições de proteolipossomos estudados (Figura 20).

Figura 20: Influxo de Ca^{2+} aos proteolipossomos constituídos com diferentes composições lipídicas (○) DPPC-proteolipossomos e (●) DPPC:DPPS 10%-proteolipossomos: **(A)** Proteolipossomos contendo AnxA5 e **(B)** Proteolipossomos contendo AnxA5 e TNAP.

O lipídio DPPS possui carga negativa a qual atrai por afinidade eletrostática os íons Ca^{2+} na superfície externa das vesículas, provavelmente resultando em um menor número de íons disponíveis em solução a serem transportados para o interior dos proteolipossomos. Assim, foi necessária uma maior concentração de íons cálcio presente no meio reacional (2,5 mM) a fim de se obter um similar influxo quando comparado com proteolipossomos na ausência de DPPS (2 mM) (Fig. 20-A). Além disso, o EGTA foi utilizado a fim de se controlar a concentração de cálcio no meio reacional. O EGTA tem a propriedade de quelar cálcio controlando eficientemente a concentração desse íon livre em solução, resultando assim em um menor número de íons disponíveis a serem transportados para o interior dos proteolipossomos.

Quando são avaliados os valores de contagem de cintilação para as amostras de lipossomos, os quais foram usados como controle para os respectivos proteolipossomos, pode-se observar que na presença de DPPS os valores dos controles (lipossomos) são sempre maiores, fortalecendo a hipótese de interação superficial entre Ca^{2+} e lipossomos contendo DPPS em sua composição (Wuthier, 1976; Kirsch, 2005; Wuthier e Lipscomb, 2011).

Entretanto, os comportamentos de todos os proteolipossomos são muito similares e após saturação (em torno de 800 nmol Ca^{2+}) observa-se um decréscimo no influxo de cálcio. A presença da TNAP nos proteolipossomos de diferentes composições (Figura 20-B) não proporcionou significativa alteração no transporte de Ca^{2+} mediado pela AnxA5. Por outro lado, a presença da AnxA5 afetou significativamente a hidrólise dos substratos PP_i , ATP e ADP mediados pela TNAP como reportado no item 4.2.1.

Burger e colaboradores (1994) através de estudos de AnxA5 mutantes e raios-X forneceram uma visão detalhada sobre a base estrutural do canal iônico. Análises eletrofisiológicas de seletividade iônica *in vitro* e propriedades de canal voltagem-dependente da AnxA5 presentes em modelos de membrana, apoia plenamente a interpretação estrutural da função dos canais (Vogl et al., 1997).

4.6 Interação da AnxA5 com a membrana de GUVs.

Os experimentos com vesículas gigantes (GUVs) foram realizados no laboratório da Prof^a. Dr^a. Rosângela Itri no Instituto de Física da USP-SP. Os ensaios foram realizados com o objetivo de investigar se a AnxA5 interage com a membrana de GUVs de diferentes composições e confirmar se há a formação de canais iônicos, completando os dados obtidos com o influxo de cálcio descrito no item anterior, onde foi possível observar influxo desses íons mediado pela AnxA5 tanto em proteolipossomos constituídos de DPPC quanto na composição DPPC:DPPS 10% (razão molar).

Morfologias complexas em membranas lipídicas surgem tipicamente devido a heterogeneidade química. Por exemplo, aglomerações de diferentes espécies lipídicas podem resultar em domínios na membrana com diferentes curvaturas intrínsecas (Simon e Vaz, 2004) e proteínas transmembrana podem induzir a curvatura local e mudanças morfológicas (Zimmerberg e Kozlov, 2006; Hirst et al., 2012).

Os experimentos com GUVs foram realizados em temperatura ambiente, e por esse motivo foi escolhido o DOPC na composição das vesículas, uma vez que este lipídio apresenta-se na fase líquido-cristalina (fluida) em temperatura ambiente.

O DPPC apresenta, relativamente, uma alta T_c (41,5 °C), caracterizada por DSC no item 4.3.1, quando comparado com o DOPC (-18 °C) (Koynova e Caffrey, 1998; Walde e Ichikawa, 2001) e com o método de eletroformação, o uso de lipídios com menor T_c resulta em um procedimento mais eficiente.

Antes da adição da proteína, as GUVs são esféricas, tensas e exibem alto contraste nas imagens de microscopia de contraste de fase apresentadas na Figura 21, devido à diferença de índice de refração produzido pela presença da sacarose na parte interna das vesículas e glicose presente na parte externa.

A AnxA5 (28,5 μ M) foi incubada com as GUVs constituídas de DOPC e colocadas imediatamente em observação no microscópio óptico. As imagens obtidas estão apresentadas nas Figuras 22.

Figura 21: Imagens obtidas por contraste de fase de GUVs constituídas de DOPC (2,5 mM): **(A)** Objetiva 10x e barra de escala referente a 50 μm ; **(B)** Objetiva 60x e barra de escala referente a 20 μm .

Figura 22: Efeito da presença da AnxA5 (28,5 μ M) na morfologia de GUVs constituídas de DOPC (2,5 mM) com o tempo de incubação: **(A)** 20 min.; **(B)** 2 h e **(C)** 4 h de incubação. Objetiva 10x e barra de escala referente a 10 μ m.

Após 20 minutos de incubação das GUVs com AnxA5 (Figura 22-A), pode-se notar o efeito da presença da proteína através da formação de poros nas membranas das vesículas, proporcionando a troca de soluções do meio interno com o meio externo das vesículas e assim resultando na perda de contraste óptico. Após 4 h de incubação praticamente todas as vesículas já haviam perdido o contraste óptico (Figura 22-C)

As GUVs também foram crescidas na presença de DPPS, para investigar se a presença desse lipídio carregado negativamente iria resultar em uma interação mais rápida da AnxA5 com as membranas das GUVs. Para isso, GUVs constituídas de DOPC:DPPS 10% (razão molar) foram crescidas e as imagens obtidas estão apresentadas na Figura 23-B.

Foi possível crescer GUVs na presença de DPPS, porém a presença deste lipídio com cargas negativas proporcionou a formação de um menor número de vesículas, quando comparado com o número de vesículas constituídas apenas por DOPC (Figura 23-A e B). Obteve-se uma redução ao redor de 85% no número de vesículas formadas na presença de DPPS. Além disso, formaram-se vesículas mais instáveis que foram usadas apenas no dia em que foram crescidas.

GUVs de DOPC:DPPS 10% também foram crescidas da presença de 0,2% de Rodamina (Rh-DOPE), possibilitando assim a observação de possíveis formações de microdomínios heterogêneos. Em algumas vesículas foi possível observar uma distribuição homogênea da fluorescência da Rodamina (Figura 24-B) na membrana das GUVs, porém em outras imagens pode-se notar a formação de microdomínios distintos (Figura 24-C e D). Este efeito de formação de microdomínios ricos em DPPS também pode ser observado por DSC na Figura 13, porém este efeito foi observado por calorimetria a partir da composição lipídica contendo 20% de DPPS.

Figura 23: Imagens obtidas por contraste de fase de GUVs (2,5 mM) constituídas de: **(A)** DOPC e **(B)** DOPC:DPPS 10% (razão molar). Objetiva 10x e barra de escala referente a 50 μm .

Figura 24: Imagem obtida com contraste de fase de GUV constituída de **(A)** DOPC:DPPS 10%; Imagens de microscopia de Fluorescência de GUVs constituídas de **(B, C e D)** DOPC:DPPS 10% na presença de Rodamina (0,2%). Objetiva 60x de aumento e barra de escala referente a 20 μm .

A AnxA5 também foi incubada com GUVs constituídas de DOPC:DPPS 10%, nas mesmas condições utilizadas anteriormente (28,5 μ M), porém os efeitos observados foram muito similares aos efeitos obtidos com GUVs de DOPC. A perda de contraste óptico foi observada em um tempo muito similar de incubação da proteína ao sistema constituído de apenas por DOPC (~20 min.), mostrando portanto, que a presença de DPPS não proporcionou mudanças significativas para a incorporação da AnxA5 com este método (Figura 25).

Após obtenção dos resultados de interação entre AnxA5 com ambos os sistemas estudados (DOPC e DOPC:DPPS 10%), através da formação de poros na membrana e subsequente perda de contraste óptico das GUVs sem ruptura das vesículas e mudanças da estrutura da membrana (em até ~20 minutos), foram planejados experimentos submetendo as GUVs à incorporação com AnxA5, adequando à concentração de proteína utilizada e aplicando campo elétrico para avaliar o efeito que a proteína proporciona na membrana antes da perda de contraste óptico. É importante ressaltar que características e mecanismos de formação de poros ainda não são bem elucidados na literatura (Tamba, 2005; Wuthier e Lipscomb, 2011).

Figura 25: Efeito da presença da AnxA5 (28,5 μM) na membrana de GUVs constituídas de DOPC:DPPS 10% (razão molar) com o tempo de incubação: **(A)** 20 min.; **(B)** 2 h e **(C)** 4 h de incubação. Barra de escala referente a 20 μm .

GUVs quando submetidas ao campo elétrico alternado podem obter as formas prolata, oblata e esférica, dependendo da razão entre as condutividades interna (λ_{in}) e externa (λ_{ex}) da solução (Aranda et al., 2008). Neste estudo, investigou-se a interação da AnxA5 com GUVs, sob ação de um campo elétrico alternado com amplitude constante, com o objetivo de confirmar a reconstituição funcional da AnxA5 quando esta interage com modelos de membranas.

Com este intuito, GUVs constituídas de DOPC e DOPC:DPPS 10% (razão molar) foram crescidas contendo em seu interior CaCl_2 0,5 mM e dispersadas em solução externa livre de sal (Fig. 26). Desta maneira, inicialmente a solução interna apresenta maior condutividade em relação à solução externa.

Antes da aplicação do campo elétrico, as vesículas são esféricas (Fig. 26-A). Vesículas dispersas em solução sem AnxA5 e submetidas a campo elétrico, exibem uma transição morfológica à forma prolata (Fig. 26-B) expondo a área de superfície oculta, devido a flutuações térmicas (Riske et al., 2009).

Por outro lado, vesículas dispersas em solução de glicose contendo AnxA5 exibem a forma oblata (Fig. 26-C). Esta observação pode ser atribuída ao transporte de sal de dentro para fora das GUVs, devido à presença da proteína na membrana. O transporte de sal para fora das vesículas provoca uma compressão inicial da membrana externa a qual deforma as GUVs para o formato oblato. É importante ressaltar que não foi observado perda de contraste óptico durante os experimentos de aplicação de campo elétrico, indicando a formação de canais Ca-seletivos na membrana (Aranda et al. 2008).

A sequente transição da forma oblata (Fig. 26-C) para esférica (Fig. 26-D) está relacionada ao reestabelecimento do equilíbrio do gradiente de concentração iônico com a diluição do sal na parte externa das vesículas igualando assim as condutividades interna e externa.

Comportamento similar foi observado para GUVs constituídas de DOPC:DPPS 10% (razão molar), como apresentado na Figura 27.

Também com esta metodologia, confirma-se a inserção funcional da AnxA5 aos diferentes sistemas miméticos de membrana estudados, evidenciado através de sua função de transporte de Ca^{2+} tanto em GUVs constituídas com DOPC como em GUVs constituídas de DOPC:DPPS 10% (razão molar).

Figura 26: Deformação das GUVs sujeitas a campo elétrico na presença ou ausência de AnxA5. Imagens obtidas por contraste de fase, objetiva 60x e barra de escala referente a 20 µm: **(A)** GUVs constituídas de DOPC com 0.5 mM de CaCl_2 em seu interior exibindo formato esférico; **(B)** Sob ação de campo elétrico, as GUVs assumem forma prolata; **(C)** GUVs foram incubadas com AnxA5 (8.22 µM) e sujeitas à ação do campo elétrico. As vesículas sofrem deformação oblate devido ao vazamento de sal de dentro para fora através dos canais de cálcio; **(D)** Com o tempo (~20 minutos) as concentrações, interna e externa, se igualam proporcionando com que as GUVs retornem ao formato esférico.

Figura 27. Deformação das GUVs sujeitas a campo elétrico na presença ou ausência de AnxA5. Imagens obtidas por contraste de fase, objetiva 60x e barra de escala referente a 20 μm : **(A)** GUVs constituídas de DOPC:DPPS 10% (razão molar) com 0.5 mM de CaCl_2 em seu interior exibindo formato esférico; **(B)** Sob ação de campo elétrico, as GUVs assumem forma prolata; **(C)** GUVs foram incubadas com AnxA5 (8.22 μM) e sujeitas à ação do campo elétrico. As vesículas sofrem deformação oblate devido ao vazamento de sal de dentro para fora através dos canais de cálcio; **(D)** Com o tempo (~20 minutos) as concentrações, interna e externa, se igualam proporcionando com que as GUVs retornem ao formato esférico.

4.7 Interação da TNAP com a membrana de vesículas gigantes

A enzima TNAP solubilizada foi tratada com resina segundo descrito no item Material e Métodos (3.5), para assim remover o detergente antes da incubação da enzima com as vesículas gigantes. A enzima (30 nM) foi então incubada com as GUVs constituídas de DOPC e colocadas imediatamente em observação no microscópio óptico. As imagens obtidas estão apresentadas na Figura 28.

Logo com 5 minutos de incubação, foi possível notar o efeito da presença da enzima através da intensa flutuação das GUVs com alteração na morfologia das vesículas que flutuam e apresentam formato de halteres assimétricos, resultando em duas esferas conectadas (Figura 28, A - F). Além disso, nota-se um excesso de área com formação de filamentos, os quais vão aumentando com o tempo de incubação e completando praticamente todo o perímetro da membrana (Figura 28, G - J). A presença da TNAP na membrana das vesículas causa provavelmente um aumento na tensão da membrana provocando uma desestabilização. Com isso, há a formação de filamentos lipídicos com o intuito de reestabelecer o equilíbrio da membrana.

A TNAP livre de detergente também foi incubada com GUVs constituídas de DOPC:DPPS 10%, nas mesmas condições utilizadas com GUVs de DOPC (30 nM), para avaliar se as presenças de cargas negativas iriam influenciar na interação da TNAP com as membranas das GUVs. Neste caso, percebe-se em geral, que os efeitos provocados pela enzima na morfologia das GUVs são menores. Após 5 minutos de incubação (Figura 29-A), pode-se observar que as GUVs começam a flutuar, porém os efeitos de excesso de área com formação de filamentos são observados apenas após 15 minutos de incubação com a enzima (Figura 29-D) e em geral em menor proporção. Este resultado sugere aparentemente, que a presença do DPPS dificulta a inserção da TNAP à membrana das vesículas, quando comparado com os resultados obtidos para GUVs constituídas apenas por DOPC. Este efeito também foi observado nos testes de porcentagem de incorporação da TNAP monitorado pela atividade p-NFFase associada à sistemas de lipossomos constituídos de DPPC e DPPC:DPPS (item 1.2, Tabela 2).

Figura 28: Efeito da presença da TNAP livre de detergente (30 nM) na membrana de GUVs constituídas de DOPC (2,5 mM) com o tempo de incubação. Efeito na morfologia das GUVs: **(A)** 5 min.; **(B)** 8 min.; **(C)** 11 min.; **(D)** 16 min.; **(E)** 10 min. e **(F)** 23 minutos de incubação. Barra de escala referente a 10 μm . Efeito de excesso de área e formação de filamentos nas GUVs: **(G)** 5 min.; **(H)** 8 min.; **(I)** 16 min. e **(J)** 23 minutos de incubação. Barra de escala referente a 20 μm .

Figura 29: Efeito da presença da TNAP livre de detergente (30 nM) na membrana de GUVs constituídas de DOPC:DPPS 10% (razão molar, 2,5 mM) com o tempo de incubação: **(A)** 0 min.; **(B)** 5 min.; **(C)** 15 min. e **(D)** 23 minutos de incubação. Barra de escala referente a 20 μm .

Diversas fosfatases alcalinas GPI-ancoradas têm sido incorporadas a diferentes tipos de membranas artificiais e seu comportamento de segregação em microdomínios lipídicos tem sido estudado por diferentes metodologias (Schroeder et al., 1994, 1998; Dietrich et al., 2001; Saslowsky et al., 2002; Kahya et al., 2005; Bolean et al., 2010, 2011, 2014).

A organização da membrana biológica em microdomínios tem um papel chave em vários processos celulares semelhantes a receptores proteicos e a transdução de sinal. A existência de microdomínios, também denominados de “rafts” tem sido explicada pela separação das membranas lipídicas em duas fases: líquido-cristalina ($L\alpha$) e fase líquido-ordenada (L_o) rica em colesterol e esfingolipídios, que funcionam como plataformas que concentram e segregam proteínas dentro do plano da bicamada em constante flutuação dinâmica tanto de composição quanto de movimentação, por isso o nome “raft” – jangada (Simons e Ikonen, 1997).

Recentes trabalhos de nosso grupo de pesquisa (Bolean et al., 2010, 2011, 2014) correlacionaram mecanismos de controle da atividade da TNAP com a organização intermolecular e o estado de fase de alguns lipídios que compõem as MVs. Foi estudada a modulação da atividade da enzima e sua inserção a sistemas de lipossomos constituídos com diferentes composições lipídicas (DPPC, Colesterol (Chol), Esfingomielina (SM) e Gangliosídeo (GM1)), isto é, verificar como mudanças de organização molecular, induzida por colesterol e/ou outros lipídios, podem modular a atividade de enzimas, regulando a produção de mensageiros lipídicos secundários e/ou processos de fusão e recombinação topológica da bicamada lipídica, modulando concomitantemente a atividade da TNAP.

A ideia de que proteínas GPI-ancoradas estão fortemente associadas à microdomínios detergente-resistentes chamados “rafts”, esta baseada na sua insolubilidade em detergentes aniônicos (Simons e van Meer, 1988; Simons e Ikonen, 1997; Simons e Toomre, 2000; Kahya et al., 2005; Kahya, 2010). A PLAP (isoforma placentar humana da fosfatase alcalina) foi encontrada abundantemente em membranas detergente-resistentes após tratamento com Triton X-100 a 4 °C (Brown et al., 1992; Schroeder et al., 1998; Kahya, 2010).

Com estas informações, foram crescidas GUVs com diferentes composições lipídicas (DOPC, Chol, SM e GM1) proporcionando a formação de microdomínios heterogêneos na membrana das vesículas. O intuito destes experimentos foi avaliar se a presença de microdomínios lipídicos influencia na incorporação da TNAP, assim

como observado anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Bolean et al., 2011) e se há mudanças morfológicas significativas após inserção da enzima. Para detecção dos microdomínios formados por Microscopia de Fluorescência, foram utilizados 0,2% de Rodamina (Rh-DOPE) na composição das GUVs, e as imagens obtidas estão apresentadas na Figura 30.

GUVs de DOPC na presença de Chol, SM e GM1 (Figura 30-A) são esféricas, exibem alto contraste nas imagens de microscopia de contraste de fase e geralmente exibem pequenas ondulações típicas de membranas fluidas (Veatch e Keller, 2005; Dietrich et al., 2001; Haluska et al., 2012; Gomide et al., 2013).

É possível observar a formação de microdomínios heterogêneos nas membranas das GUVs através das imagens de microscopia de fluorescência (Figura 30-B), uma vez que a Rh-DOPE distribui-se preferencialmente nos microdomínios líquido-desordenados ($L\alpha$) ricos em DOPC, evidenciados nas imagens pelas regiões brilhantes de fluorescência nas GUVs (Semrau et al., 2009; Gomide et al., 2013).

Após incorporação da TNAP com GUVs de composição ternária (Figura 30-C e D) e quaternária (Figura 31-C e D), observa-se um aumento na tensão das membranas, as quais começam a flutuar e apresentar intensos efeitos de excesso de área com formação de filamentos. Interessante efeito notado é uma maior segregação dos domínios quando a proteína está presente. A segregação de fase pode ser evidenciada tanto nas imagens de contraste de fase quanto das imagens com fluorescência. Pode-se assim supor que a TNAP provoca uma maior segregação lateral de fase lipídica quando presente em GUVs constituídas por misturas lipídicas.

Figura 30: Imagens obtidas por contraste de fase (**A e C**) e Fluorescência (**B e D**) na presença de Rodamina (0,2%). Objetiva 60x de aumento e barra de escala referente a 20 μm . (**A e B**) GUVs compostas pela mistura ternária de DOPC:Chol:SM (8:1:1 razão molar, 2,5 mM); (**C e D**) Efeito da presença da TNAP livre de detergente (30 nM) na membrana de GUVs constituídas de DOPC:Chol:SM.

Figura 31: Imagem obtida com contraste de fase de GUV ternárias constituída de DOPC:Chol:SM:GM1 (7:1:1:1 razão molar): **(A)** DOPC:DPPS 10%; Imagens de microscopia de Fluorescência de GUVs constituídas de **(B, C e D)** DOPC:DPPS 10% na presença de Rodamina (0,2%). Objetiva 60x de aumento e barra de escala referente a 20 μm .

Os efeitos de flutuação e excesso de área com formação de filamentos após a adição da TNAP à GUVs com composições ternárias e quaternárias (Fig. 30 e 31) foram muito mais rápidos (< 2 minutos de incubação) do que quando comparado com os dados obtidos com GUVs constituídas de DOPC e DOPC:DPPS 10% (razão molar).

Kahya e colaboradores (2005) mostraram por Microscopia Confocal de Fluorescência que GUVs constituídas de DOPC:SM:Chol (1:1:1) (razão molar) apresentam a formação de grandes domínios revelando a coexistência de fases lipídicas fluidas e estas segregações de duas fases em equilíbrio exibem um coeficiente de difusão típico de fases líquido-ordenada (Lo) e líquido-cristalino (L α), assim como os obtidos no presente trabalho. Quando PLAP humana (razão proteína-lipídio 1:2000) foi incubada às GUVs constituídas de DOPC:SM:Chol, ela preferencialmente ligou-se a fase líquido-desordenada (L α) rica em DOPC. Apenas uma pequena fração da PLAP (~20-30%) foi associada à fase Lo das GUVs. Entretanto, não foram observadas mudanças na morfologia dos domínios, estrutura e estabilidade das GUVs na presença da PLAP, nas condições utilizadas no trabalho citado.

É importante ressaltar que os dados apresentados por Kahya e colaboradores (2005, 2010) coincidem com os dados obtidos por nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores, onde Bolean e colaboradores (2010, 2011) mostraram que quando há a presença de microdomínios em proteolipossomos ricos em colesterol, esfingomielina e gangliosídeos a incorporação da TNAP ao sistema vesicular é significativamente reduzida, uma vez que ela prefere ligar-se a microdomínios líquido-desordenados.

Outro aspecto relevante é a possível presença de detergente na amostra de proteína, a qual é solubilizada e estocada em ~ 17 mM de polidocanol (C₁₂E₉). Antes da incubação da TNAP com as GUVs, o detergente foi removido através do ensaio descrito no item de Material e Métodos (3.5) e padronizado por Camolezi e colaboradores (2002). Este método de remoção do detergente com o uso de resina apresenta grande eficiência (>99% de remoção), porém para análises de deformações morfológicas em GUVs na presença da proteína, talvez a presença dessa pequena quantidade remanescente de detergente pode estar influenciando nos resultados obtidos.

As transformações de formato de vesículas lipídicas induzidas por detergentes

tem chamado a atenção de diversos grupos de pesquisa (Alonso et al., 1981; De la Maza e Parra, 1994; Edwards e Almgren, 1991), e vários autores mostraram que a presença de detergente neutro (como por exemplo, o $C_{12}E_8$ e Triton X-100) pode acelerar as transformações de formato em GUVs (Babnik et al., 2003; Mavcic et al., 2004; Sudbrack et al., 2011).

Sudbrack e colaboradores (2011) apresentaram a habilidade de detergentes como o Triton X-100 (TX-100), em equilibrarem-se entre as duas lamelas da bicamada lipídica de GUVs constituídas de POPC e provocar mudanças morfológicas nas vesículas durante o primeiro estágio de solubilização. O TX-100 apresenta um caráter não iônico e assume-se na literatura ser similar ao $C_{12}E_8$, assim como o $C_{12}E_9$, utilizado na solubilização da TNAP. TX-100 equilibra-se rapidamente entre ambas as monocamadas causando inicialmente um aumento de área da bicamada e, em seguida, a bicamada é solubilizada através do dinâmico processo de perfuração.

Como o processo de remoção de detergente não remove 100% das moléculas de surfactante, supondo um resquício de apenas 0,10 mM de polidocanol na amostra de TNAP incubada com as GUVs, foram propostos ensaios incubando GUVs constituídas de DOPC com 0,10 mM de polidocanol (Figura 32).

Pode-se notar através da Figura 32 que a presença do polidocanol, mesmo em uma quantidade muito pequena (0,10 mM), resulta na solubilização de uma grande porcentagem de GUVs (~ 87%), resultando em um número menor de GUVs em solução. Resultados similares foram descritos por Sudbrack e colaboradores (2011).

Estudos futuros serão necessários variando a concentração de proteína e detergente, separadamente e em conjunto para melhor elucidar os resultados obtidos.

Figura 32: Imagens obtidas por contraste de fase de GUVs (2,5 mM) constituídas de: **(A)** DOPC e **(B)** DOPC contendo 0,10 mM polidocanol. Objetiva 10x e barra de escala referente a 50 μm .

4.8 Interação da TNAP e AnxA5 com a membrana de vesículas gigantes

A TNAP livre de detergente (30 nM) e a AnxA5 (28,5 μ M) foram incubadas com GUVs constituídas de DOPC e colocadas imediatamente em observação no microscópio óptico. As imagens obtidas estão apresentadas na Figura 33.

Na Figura 33-B pode-se observar o início da perda de contraste óptico de algumas GUVs. Este efeito está relacionado com a presença da AnxA5 formando poros na membrana das vesículas, como visto anteriormente. Quando as duas proteínas são inseridas concomitantemente na solução de GUVs, o efeito de perda de contraste é observado na metade do tempo observado (~10 minutos) para o mesmo sistema lipídico, porém contendo apenas a AnxA5 (~20 minutos) (Figura 22-A). Além disso, é possível observar a formação de filamentos e flutuação das vesículas (Fig. 33, C - F), efeitos estes relacionados principalmente com a presença da TNAP, como observado anteriormente nos sistemas contendo apenas GUVs e TNAP (Figura 28).

As proteínas também foram incubadas concomitantemente com as GUVs constituídas de DOPC:DPPS 10% (razão molar) nas mesmas condições relatadas anteriormente e colocadas imediatamente em observação no microscópio óptico, obtendo assim as imagens apresentadas na Figura 34. Os resultados obtidos são muito similares aos resultados visualizados em GUVs de mesma composição lipídica na presença de AnxA5 (Figura 25) e na presença da TNAP (Figura 29), isto é, a perda de contraste óptico e formação de filamentos, respectivamente. Além disso, mais uma vez pode-se notar que os efeitos causados na morfologia das GUVs são mais rápidos quando as proteínas são incubadas simultaneamente.

Figura 33: Efeito da presença das duas proteínas simultaneamente (TNAP livre de detergente 30 nM e AnxA5 28,5 μ M) na membrana de GUVs constituídas de DOPC (2,5 mM) com o tempo de incubação: **(A)** 5 min.; **(B)** 10 min.; **(C)** 15 min.; **(D)** 25 min.; **(E)** 30 min. e **(F)** 1h 30 min. de incubação. Barra de escala referente a 10 μ m.

Figura 34: Efeito da presença das duas proteínas simultaneamente (TNAP livre de detergente 30 nM e AnxA5 28,5 μ M) na membrana de GUVs constituídas de DOPC:DPPS 10% (razão molar, 2,5 mM) com o tempo de incubação: **(A)** 5 min.; **(B)** 10 min.; **(C)** 60 min. e **(D)** 1h 30 min. de incubação. Barra de escala referente a 10 μ m.

Em resumo, tanto os dados de incorporação da TNAP monitorados pela atividade p-NFFase, quanto os dados de inserção obtidos nos experimentos com GUVs sugerem que a interação da TNAP com vesículas contendo DPPS é menos favorecida. Entretanto, quando as duas proteínas são inseridas concomitantemente, tanto os dados de incorporação da TNAP obtidos pela atividade p-NFFase, quanto os efeitos provocados na morfologia de GUVs, foram favorecidos.

Uma grande variedade estrutural de lipídios e proteínas proporciona heterogeneidade na organização da membrana, os quais podem estar relacionados de alguma maneira com os processos biológicos altamente regulados nas células. Neste contexto, os modelos de membrana são sistemas isolados chave para o entendimento dos processos biológicos. Entretanto, metodologicamente, a inter-relação de lipídios e proteínas no espaço e tempo representa um grande desafio (Kahya, 2010).

Em geral é importante ressaltar que, os dados aqui reportados de inserção de duas proteínas em sistemas miméticos unilamelares, de lipossomos e vesículas gigantes, são de difícil comparação com a literatura, uma vez que são sistemas inéditos e de grande complexidade.

4.9 Microscopia de Força Atômica (AFM) de lipossomos e proteolipossomos

AFM é uma ferramenta recentemente utilizada em estudos de lipossomos por proporcionar análises em nanoescala de morfologia e propriedades mecânicas de vesículas simultaneamente. Esta técnica fornece imagens de topografia superficial com resolução espacial próxima de 1 Å e curvas de força x distância com limite de detecção próximo de 10^{-12} N. A ponteira da AFM pode mover-se no topo de vesículas individuais de modo que as propriedades mecânicas de vesículas menores possam ser mensuradas em nanoescala.

4.9.1 AFM de lipossomos

Todas as medidas foram realizadas utilizando o modo “tapping”, onde a ponteira faz contato intermitente com a amostra. Este modo apresenta uma significativa vantagem para amostras moles como lipossomos/proteolipossomos quando comparada com o modo contanto, uma vez que evita a influência das forças laterais que são aplicadas sobre a amostra no modo contato e a ausência do contato contínuo diminui a deformação da amostra. Com o objetivo de evitar esta deformação, foi ajustado um valor de ganho integral pequeno, ainda que isso tenha ocasionado uma diminuição da resolução da imagem topográfica, e uma baixa velocidade de varredura. (Mao et al., 2004).

Monitorando a fase da frequência de oscilação da ponteira, quando a imagem é obtida no modo contato intermitente, podem ser obtidos diferentes tipos de informações sobre uma amostra, extraídas a partir do atraso de fase ocasionado por interações de adesão (viscosidade e elasticidade) entre a ponteira e a composição das diferentes regiões da amostra (Tamayo e Garcia, 1996; James et al., 2001).

Além dos sinais de altura, que fornecem informações topográficas, a componente do sinal de fase relacionada ao cosseno fornece informações que refletem especialmente diferenças de elasticidade na amostra. As imagens obtidas através destes sinais serão chamadas aqui simplesmente de imagens de elasticidade. Podem ser obtidos também sinais que são sensíveis a diferentes domínios visco-elásticos, ou seja, imagens de diferenças de fases (chamados simplesmente de imagens de Fase).

Nas imagens de elasticidade, onde é possível verificar os domínios elásticos da amostra, regiões com alta elasticidade são mostradas com tonalidades mais escuras.

As imagens de Fase fornecem informações sobre os domínios visco-elásticos da amostra. Regiões que ocasionam em um grande atraso de fase (alta elasticidade e alta viscosidade) aparecem mais claras nas imagens obtidas. Considerando-se que proteínas e lipídeos apresentam diferenças em suas propriedades físicas, a presença desses compostos pode ser detectada como domínios visco-elásticos distintos em imagens de Fase e de elasticidade, por AFM.

Primeiramente foram analisadas amostras de lipossomos constituídos de

DPPC (Figura 35) e os resultados obtidos por AFM mostram que foi possível obter imagens de lipossomos intactos. Lipossomos constituídos de DPPC apresentam superfície lisa, são esféricos, não apresentando irregularidades topográficas significativas (Fig. 35-C e D) nem alterações visco-elásticas significativas (Fig. 35-A e B).

Nas análises de AFM, o deslocamento da amostra é realizado pelo scanner que faz com que a amostra se desloque em uma mesma direção, porém em sentidos opostos, em uma linha de varredura (para a direita ou para a esquerda, por exemplo) antes que a varredura se inicie na próxima linha, fornecendo informações através dos sinais de varredura e de varredura de retorno do scanner.

Na Figura 36, é possível notar tanto no sinal de viscosidade quanto na imagem de Fase que as amostras de lipossomos permanecem estáveis durante a realização da varredura, mostrando que não há deformações significativas causadas pela ponteira na amostra, uma vez que as imagens obtidas em um sentido da varredura (Fig. 36-A e C) são praticamente idênticas às obtidas no sentido oposto (Fig. 36-B e D).

Figura 35. Imagens de AFM para amostras de lipossomos constituídos de DPPC (1,5 mg/mL): **(A)** imagem de elasticidade da amostra; **(B)** imagem de Fase; **(C)** zoom da imagem de elasticidade e **(D)** perfil topográfico em 3D.

Figura 36. Imagens de AFM para amostras de lipossomos constituídos de DPPC (1,5 mg/mL). Análises de varredura da amostra na mesma direção e em sentidos opostos: **(A)** direita, imagem de elasticidade; **(B)** esquerda, imagem de elasticidade; **(C)** direita, imagem de Fase e **(D)** esquerda, imagem de Fase.

Lipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (razão molar) (Figura 37) também foram analisados por AFM a fim de avaliar se a presença de cargas negativas provindas do DPPS proporcionam mudanças morfológicas e mudanças nas propriedades mecânicas dos lipossomos quando comparado com lipossomos constituídos apenas por DPPC. As imagens obtidas (Figura 37) mostram vesículas esféricas, porém com superfícies rugosas. Essa rugosidade é observada nas imagens obtidas através de todos os sinais analisados e quando são comparados os perfis topográficos através das análises em 3D para lipossomos-DPPC (Fig. 35-D) e para lipossomos-DPPC:DPPS 10% (Fig. 37-D) as irregularidades na superfície dos lipossomos ficam ainda mais evidentes.

Assim, como observado para lipossomos constituídos de DPPC (Figura 36), lipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (Figura 38) também permaneceram intactos durante a realização da varredura, não apresentando deformações significativas causadas pela ponteira sobre a amostra, como pode ser notado nas imagens provenientes das análises de elasticidade e de Fase.

A largura lateral ou diâmetro das esferas de lipossomos também foram mensurados por AFM. Utilizando o perfil de altura para lipossomos DPPC e DPPC:DPPS 10% (razão molar), obtiveram-se os diâmetros médios de 102,5 nm e 292,89 nm, respectivamente. Os valores de diâmetro encontrados por AFM para lipossomos-DPPC são menores (102,5 nm) quando comparados com os valores de diâmetro mensurados em solução por DLS (Tabela 5, $143,2 \text{ nm} \pm 3,03$). Os valores de diâmetro por AFM para lipossomos-DPPC:DPPS 10% foram significativamente maiores ($\sim 291,89 \text{ nm}$) quando comparados com os valores mensurados por DLS (Tabela 5, $131,8 \text{ nm} \pm 0,47$).

Mesmo utilizando o modo contato intermitente de menor interferência na obtenção das imagens por AFM, podem-se observar possíveis achatamentos da vesícula ou provavelmente pode ser que a estrutura não seja visualizada como um todo, não sendo uma técnica indicada para análise de diâmetro de vesículas. Dados de distorção de diâmetro de lipossomos comparados entre AFM e DLS também foram mostrados na literatura (Mao et al., 2004; Ruozzi et al., 2007, 2009).

Figura 37. Imagens de AFM para amostras de lipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (razão molar) (1,5 mg/mL): **(A)** imagem de elasticidade da amostra; **(B)** imagem de Fase; **(C)** zoom da imagem de Fase e **(D)** perfil topográfico em 3D.

Figura 38. Imagens de AFM para amostras de lipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (razão molar) (1,5 mg/mL). Análises de varredura da amostra na mesma direção e em sentidos opostos, direita e esquerda: **(A)** direita, imagem de elasticidade; **(B)** esquerda, imagem de elasticidade; **(C)** direita, imagem de Fase e **(D)** esquerda, imagem de Fase.

4.9.2 AFM de proteolipossomos

Proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (razão molar) contendo AnxA5 foram analisados por AFM (Figura 39). As imagens de elasticidade (Fig. 39-A) mostram o aparecimento de pontinhos claros na superfície das vesículas, evidenciando diferenças nas propriedades elásticas de determinadas regiões, isto é, existem regiões na superfície dos proteolipossomos com composições distintas (os pontos mais claros estão relacionados a domínios mais rígidos). Através da imagem de Fase (Fig. 39-B), observa-se que os pontos na superfície dos proteolipossomos são mais escuros que a superfície total da vesícula, sendo estes pontos mais escuros domínios com menor visco-elasticidade.

As análises de AFM para proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (razão molar) contendo TNAP estão apresentadas na Figura 41. Assim como observado para proteolipossomos contendo AnxA5, nas imagens de elasticidade (Fig. 41-A) podem-se observar pontos mais claros na superfície dos proteolipossomos contendo a TNAP, porém são pontos significativamente maiores e mais agrupados. Portanto, existem regiões na superfície desses proteolipossomos com composições distintas (domínios mais rígidos). Pela imagem de Fase (Fig. 41-B), observa-se que os pontos na superfície dos proteolipossomos são mais escuros que a superfície total da vesícula. Estes pontos mais escuros são domínios com menor visco-elasticidade.

É importante correlacionar os dados obtidos de lipossomos e proteolipossomos. Para lipossomos com a composição DPPC:DPPS 10% (Figura 37-A e B) não foi observada a presença de microdomínios com propriedades visco-elásticas distintas. Estes microdomínios distintos são detectados apenas quando a AnxA5 ou a TNAP estão presentes nas vesículas. Pode-se assim sugerir que as proteínas provocam a formação destes microdomínios distintos, os quais apresentam propriedades mecânicas diferenciadas e, por isso, pode-se afirmar que possuem composição química diferente.

Figura 39. Imagens de AFM para amostras de proteolipossomos constituídos com DPPC:DPPS 10% (razão molar) contendo AnxA5: **(A)** imagem de elasticidade e **(B)** imagem de Fase.

Figura 40. Imagens de AFM para amostras de proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (razão molar) contendo AnxA5. Análises de varredura da amostra na mesma direção e em sentidos opostos, direita e esquerda: **(A)** direita, imagem de elasticidade; **(B)** esquerda, imagem de elasticidade; **(C)** direita, imagem de Fase e **(D)** esquerda, imagem de Fase.

Figura 41. Imagens de AFM para amostras de proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (razão molar) contendo TNAP: **(A)** imagem de elasticidade da amostra; **(B)** imagem de Fase; **(C)** zoom da imagem de Fase e **(D)** perfil topográfico em 3D.

Figura 42. Imagens de AFM para amostras de proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (razão molar) contendo TNAP. Análises de varredura da amostra na mesma direção e em sentidos opostos, direita e esquerda: **(A)** direita, imagem de elasticidade; **(B)** esquerda, imagem de elasticidade; **(C)** direita, imagem de Fase e **(D)** esquerda, imagem de Fase.

Figura 43. Imagens de AFM para amostras de proteolipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (razão molar) contendo TNAP + AnxA5. Análises de varredura da amostra na mesma direção e em sentidos opostos, direita e esquerda: **(A)** direita, imagem de elasticidade; **(B)** esquerda, imagem de elasticidade; **(C)** direita, imagem de Fase e **(D)** esquerda, imagem de Fase.

Quando as duas proteínas estão presentes nos proteolipossomos (Figura 43) nota-se que os microdomínios com fases distintas são maiores e mais concentrados numa mesma região. Pela imagem de elasticidade (Fig. 43-A) observa-se que esta região se mostra mais clara do que a superfície dos proteolipossomos-TNAP+AnxA5, apresentando assim composição distinta (domínios mais rígidos). Pela imagem de Fase (Fig. 43-B), observa-se que estes microdomínios na superfície dos proteolipossomos são mais escuros apresentando uma fase com menor viscoelasticidade.

Todos os proteolipossomos estudados (Figuras 40, 42 e 43) permaneceram intactos durante a realização da varredura, não apresentando deformações significativas causadas pela ponteira na amostra quando se observam as imagens formadas pelo tratamento de todos os sinais (elasticidade e Fase) analisados.

Não foram encontrados trabalhos na literatura com análises de AFM para proteolipossomos. Atualmente existem poucos trabalhos utilizando AFM para análise de amostras de lipossomos e, em geral, as análises são realizadas utilizando suporte de bicamada lipídica ou bicamada planar, as quais proporcionam imagens planas de diferentes domínios lipídicos (Goksu et al., 2009; Kirat et al., 2010; Morandat et al., 2010). Poucos trabalhos apresentam lipossomos intactos, e mesmo assim são imagens com pouca nitidez (Jass et al., 2000; Ruozi et al., 2009, 2011).

No presente trabalho utilizou-se a mica como suporte e glutaraldeído como estabilizador das amostras de vesículas. O glutaraldeído protege a amostra durante o período de secagem sobre a mica, impedindo que as vesículas estourem e permitindo as análises das vesículas em sua forma esférica.

Tais resultados nos encorajam a investigar ainda mais os dados obtidos, uma vez que a técnica é muito promissora para estudos topográficos de vesículas lipídicas.

5. Conclusão

A compreensão da inter-relação entre as composições lipídica e proteica com o comportamento de membranas é muito importante para um potencial uso desses sistemas vesiculares de proteolipossomos como sistemas miméticos de MVs.

Nos estudos de incorporação da AnxA5 em sistemas de protelipossomos, mostrou-se que é possível inserir a proteína tanto em lipossomos constituídos de DPPC:DPPS 10% (razão molar), como descrito na literatura, quanto em lipossomos constituídos apenas por DPPC. De fato, melhores rendimentos de incorporação da proteína foram obtidos quando o DPPS está presente na composição lipídica dos lipossomos. Para estudos de incorporação da TNAP em proteolipossomos, melhores porcentagens de incorporação da enzima foram obtidas quando menores concentrações de DPPS foram utilizadas. Entretanto, estes valores de incorporação da TNAP foram relativamente baixos, isto é, menores que 50% da atividade total. Os resultados sugerem que a presença do DPPS dificulta a inserção da TNAP à membrana das vesículas de lipossomos e GUVs. Desta forma, conclui-se que melhores rendimentos de incorporação das duas proteínas foram obtidos quando ambas foram incorporadas concomitantemente.

Os parâmetros cinéticos da TNAP na hidrólise de diferentes substratos fisiológicos foram determinados na presença e ausência de AnxA5, em pH fisiológico, e para os diversos sistemas lipídicos. A melhor eficiência catalítica da enzima foi obtida para sistemas contendo 10% de DPPS (razão molar) ($k_{cat}/K_{0.5} = 183,02; 776,06$ e $657,08 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, para a hidrólise de ATP, ADP e PP_i , respectivamente). A TNAP apresentou maior especificidade para a hidrólise de PP_i quando comparado com os demais substratos.

Com estudos calorimétricos, ficou evidente que a presença de DPPS em lipossomos constituídos de DPPC proporciona alargamento no pico de transição de fase, além da diminuição na $\Delta t_{1/2}$ e ΔH . A pré-transição de fase só foi detectada até a concentração de 15% de DPPS em DPPC, e para 20% de DPPS e acima, observou-se uma segregação lateral de fase com a formação de possíveis microdomínios ricos em DPPS. A interação da AnxA5 com DPPC-lipossomos e DPPC:DPPS 10%-lipossomos resultou em uma redução nos valores de ΔH (de 8,73 para 5,68 e 8,43 para 5,37 $\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivamente). Quando a TNAP está presente nos

proteolipossomos, este efeito foi ainda maior (de 8,73 para 3,58 e 8,43 para 4,34 Kcal.mol⁻¹ para os sistemas constituídos de DPPC e DPPC:DPPS 10%, respectivamente).

O principal efeito causado pela AnxA5 na morfologia das GUVs foi a perda de contraste óptico devido a formação de poros nas membranas das vesículas. TNAP quando inserida em GUVs provocou intensa flutuação e excesso de área das vesículas com formação de filamentos. Na presença de microdomínios lipídicos heterogêneos na composição das GUVs (DOPC, Colesterol, Esfingomiéline e Gangliosídeo), a inserção da TNAP provocou uma maior segregação lateral de fase evidenciada por imagens com fluorescência. Além disso, a presença da TNAP e da AnxA5 em DPPC:DPPS 10%-proteolipossomos proporcionou mudanças significativas nas propriedades mecânicas visco-elásticas dos proteolipossomos detectadas por AFM.

Em análises de AFM, não foi observada a presença de microdomínios distintos em lipossomos constituídos por DPPC e DPPC:DPPS 10% (razão molar). Entretanto, microdomínios com propriedades mecânicas distintas, só foram detectados quando a AnxA5 ou a TNAP estavam presentes nos proteolipossomos. Conclui-se que as proteínas provocam a formação destes microdomínios, os quais apresentam propriedades visco-elásticas diferenciadas, apresentando assim composição química diferente.

Esta abordagem de estudos biofísicos e bioquímicos de reconstituição da TNAP e da AnxA5 em lipossomos e GUVs com diferentes composições lipídicas são abordagens inéditas e de difícil comparação com estudos apresentados na literatura. Estes dados confirmam a ideia da importância do microambiente lipídico na interação das proteínas com a membrana.

Uma vez que as MVs são sistemas altamente complexos, com vários canais iônicos e transportadores, bem como um grupo de enzimas responsáveis pelo controle da razão PP_i/P_i no meio extracelular, é muito importante o uso de sistemas miméticos de proteolipossomos com o intuito de compreender como a presença combinada de diferentes proteínas afeta suas respectivas funções.

No presente trabalho desenvolveu-se uma inédita metodologia para a obtenção de proteolipossomos contendo TNAP e AnxA5 concomitantemente, os quais apresentaram uma reconstituição funcional das proteínas. Provou-se por diferentes técnicas a eficiente capacidade de captar Ca²⁺ para dentro das vesículas

(proteolipossomos e GUVs) mediado pela AnxA5 e a habilidade da TNAP em hidrolisar fosfosubstratos quando presente na superfície dos proteolipossomos.

A presença da TNAP nos proteolipossomos não afetou o influxo de Ca^{2+} mediado pela AnxA5. Entretanto, a presença da AnxA5 afetou significativamente os parâmetros cinéticos da TNAP para os diferentes substratos.

Até o momento foi possível padronizar um sistema de proteolipossomos contendo duas proteínas, entretanto outras proteínas são necessárias para mimetizar as MVs no processo de biomineralização, como por exemplo, a presença da PiT-1, proteína responsável pelo influxo de P_i para o interior das vesículas miméticas. Neste contexto, sabe-se que para obter proteolipossomos contendo 3 proteínas simultaneamente (TNAP, AnxA5 e PiT-1), é necessário um estudo sistemático de porcentagem de incorporação funcional de todas as proteínas estudadas bem como uma composição lipídica adequada, aumentando assim o grau de complexidade do sistema uma vez que a presença de uma proteína proporciona significativas alterações nas características das demais proteínas incorporadas.

A relevância dos resultados aqui apresentados nos incentiva à continuidade de desenvolvimento de proteolipossomos que mimetizem as MVs, aumentando o grau de complexidade dos sistemas através de um estudo sistemático de cada sistema proposto. Estes resultados ajudarão na compreensão dos complexos mecanismos envolvendo interações específicas entre lipídios e proteínas, desenvolvendo assim os estudos sobre a calcificação mediada por MVs.

6. Referências Bibliográficas

- Abdul-Gader, A.; Miles, A.J. and Wallace, B.A. (2011) A reference dataset for the analyses of membrane protein secondary structures and transmembrane residues using circular dichroism spectroscopy. *Bioinformatics*. 27(12):1630-1636.
- Adler, A.J.; Greenfield, N.J. e Fasman, G.D. (1973) In *methods in Enzimology*. Hirs, C.H.W. (ed.) Academic Press, London and New York, Vol. 27, pp. 675.
- Akashi, K.; Miyata, H.; Itoh, H. and Kinoshita Jr., K. (1996) Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophys. J.*, Vol. 71, pp. 3242–3250.
- Alam, J.M.; Kobayashi, T. and Yamazaki, M. (2012) The single-giant unilamellar vesicle method reveals lysenin-induced pore formation in lipid membranes containing sphingomyelin. *Biochemistry*. 51(25):5160-5172.
- Ali, S.Y.; Sajdera, S.W. and Anderson, H.C. (1970) Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 1513-20.
- Alonso, A.; Villena, A. and Goni, F.M. (1981) Lysis and reassembly of sonicated lecithin vesicles in the presence of Triton X-100. *FEBS Letters*, 123(2): 200-204
- Anderson, H. C. (1967): Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J Cell Biol*, 35, 81- 101.
- Anderson, H. C.: (1969) Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol*, 41, 59-72.
- Anderson, H.C. (1995) Molecular biology of matrix vesicles. *Clin. Orthop. Rel. Research*. 314:266-280.
- Anderson, H.C. (2003) Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* 5: 222-226.
- Anderson, H.C.; Garimella, R. and Tague, S.E. (2005) The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front. Biosci.* 10: 822-37.

- Anderson, H.C.; Hsu, H.H.; Morris, D.C.; Fedde, K.N. and Whyte, M.P. (1997) Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. *Am. J. Pathol.* 151:1555-1561.
- Anderson, H.C.; Sipe, J.B.; Hessle, L.; Dharmayamraju, R.; Atti, E.; Camacho, N.P. and Millán, J.L. (2004) Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 164:41-847.
- Anderson, H.C.; Sipe, J.B.; Hessle, L.; Dharmayamraju, R.; Atti, E.; Camacho, N.P. and Millán, J.L. (2004) Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 164:841-847.
- Andree, H.A.; Stuart, M.C.; Hermens, W.T.; Reutelingsperger, C.P.; Hemker, H.C.; Frederik, P.M. and Willems, G.M. (1992) Clustering of lipid-bound annexin V may explain its anticoagulant effect. *J. Biol. Chem.* 267(25):17907-17912.
- Andree, H.A.; Willems, G.M.; Hauptmann, R.; Maurer-Fogy, I.; Stuart, M.C.; Hermens, W.T.; Frederik, P.M. and Reutelingsperger, C.P. (1993) Aggregation of phospholipid vesicles by a chimeric protein with the N-terminus of annexin I and the core of annexin V. *Biochemistry* 32(17):4634-4640.
- Angelova, M.I. and Dimitrov, D.S. (1986). Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81:303–311.
- Angelova, M.I.; Soléau, S.; Meléard, P.; Faucon, J.F. and Bothorel, P. (1992) Preparation of giant vesicles by external AC fields. Kinetics and application. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 89:127–131.
- Angelova, M.I. and Dimitrov, D.S. (1986) Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81:303–311.
- Aranda, S.; Riske, K.A.; Lipowsky, R. and Dimova, R. (2008) Morphological transitions of vesicles induced by alternating electric fields. *Biophys. J.* 95:L19-L21.
- Babnik, B.; Miklavcic, D.; Kanduser, M.; Hägerstrand, H.; Kralj-Iglic, V. and Iglic, A. (2003) Shape transformation and burst of giant POPC unilamellar liposomes modulated by non ionic detergent C₁₂E₈. *Chem. Phys. Lipids.* 125(2):123-138.

- Bagatolli, L.A. (2006) To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758(10):1541-156.
- Bagatolli, L.A.; Parasassi, T. and Gratton, E. (2000) Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods: a two photon fluorescence microscopy study. *Chem. Phys. Lipids* 105:135–147.
- Balcerzak, M.; Hamade, E.; Zhang, L.; Pikula, S.; Azzar, G.; Radisson, J.; Bandorowicz-Pikula, J. and Buchet, R. (2003) The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim. Pol.* 50:1019-1038.
- Baró, A.M.; Miranda, R.; Alamán, J.; García, N.; Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C. and Carrascosa, J.L. (1985) Determination of surface topography of biological specimens at high resolution by scanning tunnelling microscopy. *Nature* 315(6016):253-254.
- Bazzi, M.D. and Nelsestuen, G.L. (1992) Interaction of annexin VI with membranes: highly restricted dissipation of clustered phospholipids in membranes containing phosphatidylethanolamine. *Biochemistry* 31(42):10406-10413.
- Bellet-Amalric, E.D.; Blaudez, B.; Desbat, F.; Graner, F.; Gauthier, A. and Renault, E. (2000) Interaction of the third helix of Antennapedia homeodomain and a phospholipid monolayer, studied by ellipsometry and PM-IRRAS at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 1467:131-143.
- Berendes, R., Voges, D., Demange, P., Huber, R., and Burger, A. (1993) Structure-function analysis of the ion channel selectivity filter in human annexin V. *Science* 262:427-430.
- Bernard, G.W. (1978) Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in initial intramembranous osteogenesis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 135:218-25.
- Bernardino de la Serna, J.; Perez-Gil, J.; Simonsen, A.C. and Bagatolli, L.A. (2004) Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. *J. Biol. Chem.* 279:40715-40722.

- Binnig, G.; Garcia, N. and Rohrer, H. (1985) Conductivity sensitivity of inelastic scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. B Condens Matter*. 32(2):1336-1338.
- Blackwood, R.A. and Ernst, J.D. (1990) Characterization of Ca^{2+} -dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *Biochem. J.* 266(1):195-200.
- Blandford, N.R.; Sauer, G.R.; Genge, B.R.; Wu, L.N. and Wuthier, R.E. (2003) Modeling of matrix vesicle biomineralization using large unilamellar vesicles. *J. Inorg. Biochem.* 94:14-27.
- Blum, H.; Beir, H. and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, 8:93-99.
- Blumenthal, N.C. (1989) Mechanism of inhibition of calcification. *Clin. Orthop.* 247: 279-289.
- Bolean, M.; Simão, A.M.S.; Favarin, B.F.; Millán, J.L. and Ciancaglini, P. (2010) The effect of cholesterol on the reconstitution of alkaline phosphatase into liposomes. *Biophys. Chem.* 152:74-79.
- Bolean, M.; Simão, A.M.S.; Favarin, B.F.; Millán, J.L. and Ciancaglini, P. (2011) Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase. *Biophys. Chem.* 158:111-118.
- Bolean, M.; Simão, A.M.S.; Kiffer-Moreira, T.; Hoylaerts, M.F.; Millán, J.L.; Itri, R. and Ciancaglini, P. (2014) Proteoliposomes harboring Annexin V and Alkaline Phosphatase with the ability to transport Ca^{2+} into the vesicles and hydrolyze phosphosubstrates on their surface. *J. Phys. Chem B* (submitted).
- Bonucci, E. (1967) Fine structure of early cartilage calcification. *J Ultrastruct Res.* 20(1):33-50.
- Bonucci, E. (1970) Fine structure and histochemistry of "calcifying globules" in epiphyseal cartilage. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 103(2):192-217.
- Bonucci, E. (1971) The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clin. Orthop.* 78:108-139.
- Bonucci, E. (2012). Bone mineralization. *Front. Biosci.* 17:100–128.

- Boyan, B.D.; Schwartz, Z.; Swain, L.D. and Khare, A. (1989) Role of lipids in calcification of cartilage. *Anat. Rec.* 224:211-219.
- Brahms, S. and Brahms, J. (1980) Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* 138(2):149-178.
- Bulheller, B.M.; Rodger, A. and Hirst, J.D. (2007) Circular and linear dichroism of proteins. *Phys. Chem.* 9(17):2020-2035.
- Camolezi, F.L.; Daghashtanli, K.P.R.; Magalhães, P.P.; Pizauro, J.M. and Ciancaglini, P. (2002) Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1282:1-11.
- Cantor, C. and Timasheff, S.N. (1982) In the proteins. 3rd ed., Neurath, H. (ed.) Academic Press, N.Y. Vol V, p. 145.
- Caseli, L.; Oliveira, R.G; Masui, D.C.; Furriel, R.P.; Leone, F.A.; Maggio, B. and Zaniquelli, M.E. (2005) Effect of molecular surface packing on the enzymatic activity modulation of an anchored protein on phospholipid Langmuir monolayers. *Langmuir.* 21(9):4090-4095.
- Caseli, L.; Masui, D.C.; Furriel, R.P.; Leone, F.A; Zaniquelli, M.E.; Orbulescu, J. and Leblanc, R.M. (2008) Rat osseous plate alkaline phosphatase as Langmuir monolayer an infrared study at the air-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 320(2):476-482.
- Caverzasio, J.; Selz, T. and Bonjour, J.P. (1988) Characteristics of phosphate transport in osteoblastlike cells. *Calcif. Tissue Int.* 43(2):83-87.
- Cecil, D.L.; Rose, D.M.; Terkeltaub, R. and Liu-Bryan, R. (2005) Role of interleukin-8 in PiT-1 expression and CXCR1-mediated inorganic phosphate uptake in chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 52(1):144-154.
- Chen, Y-H.; Yang, J.T. and Martinez, H.M. (1972) Determination of the Secondary of Proteins by Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion. *Biochemistry* 11:4120-4131.
- Chichester, B.L. (1998) Procedures in Scanning Probe Microscopies, John Wiley & Sons, Inc.: England.

- Ciancaglini, P.; Pizauro, J.M.; Grecchi, M.J.; Curti, C. and Leone, F.A. (1989) Effect of Zn(II) and Mg(II) on phosphohydrolitic activity of rat matrix-induced alkaline phosphatase. *Cell. Mol. Biol.* 35:503-510.
- Ciancaglini, P.; Pizauro, J.M.; Rezende, A.A.; Rezende L.A. and Leone, F.A. (1990a) Solubilization of membrane-bound matrix-induced alkaline phosphatase with polyoxyethylene 9- lauryl ether (polidocanol): purification and metalloenzyme properties. *Int. J. Biochem.* 22:385-392.
- Ciancaglini, P.; Pizauro, J.M.; Curti, C.; Tedesco, A.C. and Leone, F.A. (1990b) Effect of membrane moiety and magnesium ions on the inhibition of matrix-induced alkaline phosphatase by zinc ions. *Int. J. Biochem.* 22:747-751.
- Ciancaglini, P.; Pizauro, J.M. and Leone, F.A. (1992) Polyoxyethylene 9-lauryl ether-solubilized alkaline phosphatase: synergistic stimulation by zinc and magnesium ions. *Int. J. Biochem.* 24(4):611-615.
- Ciancaglini, P.; Pizauro, J.M. and Leone, F.A. (1995) Mechanism of action of cobalt ions on rat osseous plate alkaline phosphatase. *J. Inorg. Biochem.* 60(3):155-162.
- Ciancaglini P.; Simão, A.M.S.; Camolezi, F.L.; Millán, J.L. and Pizauro, J.M. (2006) Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39(5):603-610.
- Ciancaglini, P.; Yadav, M. C.; Simão, A.M.S.; Narisawa, S.; Pizauro, J.M.; Farquharson, C.; Hoylaerts, M.F. and Millán, J.L. (2010) Kinetic Analysis of Substrate Utilization by Native and TNAP-, NPP1- or PHOSPHO1-Deficient Matrix Vesicles. *J. Bone and Mineral Research* 25(4):716-723.
- Ciancaglini, P.; Simão, A.M.S.; Bolean, M.; Millán, J.L.; Rigos, C.F.; Yoneda, J.S.; Colhone, M.C. and Stabeli, R.G. (2012) Proteoliposomes in nanobiotechnology. *Biophys. Rev.* 4:67-81.
- Cieřlik-Boczula, K.; Swiętek. P.; Jaszczyszyn, A.; Zawilska, P.; Gąsiorowski, K.; Malinka, W. and Köhler, G. (2014) Phase Separation in Phosphatidylcholine Membrane Caused by the Presence of Pyrimidine-Analogue of Fluphenazine with High anti-Multidrug Resistance Activity. *J. Phys. Chem. B.* DOI: 10.1021/jp410882r.

- Collins, J.F.; Bai, L. and Ghishan, F.K. (2004) The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors. *Pflugers Arch.* 447(5):647-652.
- Curti, C.; Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1987) Kinetic characteristics of some inhibitors of matrix- induced alkaline phosphatase. *Cell. Mol. Biol.* 33:625-635.
- Cyboron, G.W. and Wuthier, R.E. (1981) Purification and initial characterization of intrinsic membrane-bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 256:7262-7268.
- Damek-Poprawa, M.; Golub, E.E.; Otis, L.; Harrison, G.; Phillips, C. and Boesze-Battaglia, K. (2006) Chondrocytes utilize a cholesterol-dependent lipid translocator to externalize phosphatidylserine. *Biochem.* 45:3325-3336.
- Davidson, F.F.; Lister, M.D. and Dennis, E.A. (1990) Binding and inhibition studies on lipocortins using phosphatidylcholine vesicles and phospholipase A2 from snake venom, pancreas, and a macrophage-like cell line. *J. Biol. Chem.* 265:5602-5609.
- de Bernard, B.; Bianco, P.; Bonucci, E.; Costantini, M.; Lunazzi, G.C.; Martinuzzi, P.; Modricky, C.; Moro, L.; Panfili, E. and Pollesello, P. (1986) Biochemical and immunohistochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a Ca^{2+} -binding glycoprotein. *J. Cell. Biol.* 103:1615-1623.
- De La Maza, A. and Parra, J.L. (1994) Vesicle-micelle structural transition of phosphatidylcholine bilayers and Tritn X-100. *Biochem. J.* 303(3):907-914.
- de Lima Santos, H.; Lopes, M.L.; Maggio, B. and Ciancaglini, P. (2005) Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 41(4):239-248.
- Demange, P.; Voges, D.; Benz, J.; Liemann, S.; Gottig, P.; Berendes, R.; Burger, A. and Huber, R. (1994) Annexin V: the key to understanding ion selectivity and voltage regulation? *Trends Biochem. Sci.* 7:272-277.
- Demetzos, C. (2008) Differential Scanning Calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *J. Liposome Res.* 18(3):159-173.

- Dezi, M.; Di Cicco, A.; Bassereau, P. and Lévy, D. (2013) Detergent-mediated incorporation of transmembrane proteins in giant unilamellar vesicles with controlled physiological contents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(18):7276-7281.
- dos Santos, G.A.; Thomé, C.H.; Ferreira, G.A.; Yoneda, J.S.; Nobre, T.M.; Daghashtanli, K.R.; Scheucher, P.S.; Gimenes-Teixeira, H.L.; Constantino, M.G.; de Oliveira, K.T.; Faça, V.M; Falcão, R.P.; Greene, J.L.; Rego, E.M. and Ciancaglini, P. (2010) Interaction of 10-(octyloxy) decyl-2-(trimethylammonium) ethyl phosphate with mimetic membranes and cytotoxic effect on leukemic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1798(9):1714-1723.
- Düzgünes, N.; Bagatolli, L.A.; Meers, P.; Oh, Y.K.; Straubinger, R.M.; Weissig, V. and Torchilin, V. (2003), *Liposomes: A Practical Approach* (2nd ed.), Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 105–147.
- Eanes, E.D. and Hailer, A.W. (1985) Liposome-mediated calcium phosphate formation in metastable solutions. *Calcif. Tissue Int.* 37:390-394.
- Edwards, K. and Almgren, M. (1991) Solubilization of lecithin vesicles by C12E8. Structural transitions and temperature effects. *J. Colloid Interface Sci.* 147(1):1-21.
- Fa, N.; Marques, C.M.; Mendes, E. and Schroder, A.P. (2004). Rheology of giant vesicles: a micropipette study. *Phys. Rev. Lett.* 92:108-113.
- Fallon, M.D.; Whyte, M.P. and Teitelbaum, S.L. (1980) Stereospecific inhibition of alkaline phosphatase by L-tetramisole prevents in vitro cartilage calcification. *Lab. Invest.* 43:489-494.
- Ferreira, A.A.P.F. (2006) Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. *Quim. Nova*, 29(1):137-142.
- Franzoni, L.; Nicastro, G.; Pertinhez, T.A.; Tatò, M.; Nakaie, C.R.; Paiva, A.C.; Schreier, S. and Spisni, A. (1997) Structure of the C-terminal fragment 300-320 of the rat angiotensin II AT1A receptor and its relevance with respect to G-protein coupling. *J. Biol. Chem.* 272(15):9734-9741.
- Freemont, A. J. (1993) Basic bone cell biology. *Int. J. Exp. Path.* 74:411-416.
- Gaczynska, M. and Osmulski P.A. (2008) AFM of biological complexes: what can we learn? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 13(5):351-367.

- Garimella, R.; Bi, X.; Anderson, H.C. and Camacho, N.P. (2006) Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: An FTIR imaging study. *Bone* 38:811-817.
- Geisow, M.J. (1986) Common domain structure of Ca^{2+} and lipid-binding proteins. *FEBS Lett.* 203:99–103.
- Genge, B.R.; Wu, L.N.Y. and Wuthier, R.E. (2007) Kinetic analysis of mineral formation during in vitro modeling of matrix vesicle mineralization: effect of annexin A5, phosphatidylserine, and type II collagen. *Analyt. Biochem.* 367:159-166.
- Genge, B.R.; Wu, L.N.Y. and Wuthier, R.E. (2008) Mineralization of annexin-5-containing lipid-calcium-phosphate complexes: modulation by varying lipid composition and incubation with cartilage collagens. *J. Biol. Chem.* 283:9737-9748.
- Gilmanshin, R.; Creutz, C.E. and Tamm, L.K. (1994) Annexin IV reduces the rate of lateral lipid diffusion and changes the fluid phase structure of the lipid bilayer when it binds to negatively charged membranes in the presence of calcium. *Biochemistry* 33(27):8225-8232.
- Girard, P.; Pecreaux, J.; Lenoir, G.; Falson, P.; Rigaud, J.L. and Bassereau, P. (2004) A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 87:419-429.
- Goksu, E.I.; Vanegas, J.M.; Blanchette, C.D.; Lin, W.C. and Longo, M.L. (2009) AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1788(1):254-266.
- Golub, E.E. (2009) Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim. Biophys. Acta* 1790:1592-1598.
- Golub, E.E. (2011) Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol.* 33(5):409-17.
- Gonzalez, M.; Martínez, R.; Amador, C. and Michea, L. (2009) Regulation of the sodium-phosphate cotransporter Pit-1 and its role in vascular calcification. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 7:506-512.

- Grskovic, I.; Kutsch, A.; Frie, C.; Groma, G.; Stermann, J.; Schlötzer-Schrehardt, U.; Niehoff, A.; Moss, S.E.; Rosenbaum, S.; Pöschl, E.; Chmielewski, M.; Rappl, G.; Abken, H.; Bateman, J.F.; Cheah, K.S.; Paulsson, M. and Brachvogel, B. (2012) Depletion of annexin A5, annexin A6, and collagen X causes no gross changes in matrix vesicle-mediated mineralization, but lack of collagen X affects hematopoiesis and the Th1/Th2 response. *J. Bone Miner. Res.* 27(11):2399-2412.
- Hauptmann, R.; Maurer-Fogy, I.; Krystek, E.; Bodo, G.; Andree, H. and Reutelingsperger, C.P.M. (1989) Vascular anticoagulant beta: a novel human Ca^{2+} /phospholipid binding protein that inhibits coagulation and phospholipase A2 activity. Its molecular cloning, expression and comparison with VAC-alpha. *Eur. J. Biochem.* 185:63-71.
- Heimburg, T. (2000) A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophys. J.* 78(3):1154-1165.
- Hessle, L.; Johnson, K.A.; Anderson, H.C.; Narisawa, S.; Sali, A.; Goding, J.W.; Terkeltaub, R. and Millán, J.L. (2002) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9445-9449.
- Hirst, L.S.; Ossowski, A.; Fraser, M.; Geng, J.; Selinger, J.V. and Selinger, R.L. (2013) Morphology transition in lipid vesicles due to in-plane order and topological defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:3242-3247.
- Ho, A.M.; Johnson, M.D. and Kingsley, D.M. (2000) Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 289:265-270.
- Houston, B.; Stewart, A.J. and Farquharson, C. (2004) PHOSPHO1-A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralization in bone and cartilage. *Bone* 34:629-637.
- Hoylaerts, M.F.; Manes, T. and Millán, J.L. (1997) Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J. Biol. Chem.* 272:22781-22787.
- Hoylaerts, M.F.; Ding, L.; Narisawa, S.; Van kerckhoven, S. and Millan, J.L. (2006) Mammalian Alkaline Phosphatase Catalysis Requires Active Site Structure Stabilization via the N-Terminal Amino Acid Microenvironment. *Biochemistry* 45:9756-9766.

- Hsu, H.H.T. and Anderson, H.C. (1977) A simple and defined method to study calcification by isolated matrix vesicles. Effect of ATP and vesicles phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 500:162-172.
- Hsu, H.H.T. and Anderson, H.C. (1978) Calcification of isolated matrix vesicles and reconstituted vesicles from fetal bovine cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3805-3808.
- Hsu, H.H.T.; Munoz, P.A.; Barr, J.; Oppliger, I.; Morris, D.C.; Vaananen, H.K.; Tarkenton, N. and Anderson, H.C. (1985) Purification and partial characterization of alkaline phosphatase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 260:1826-1831.
- Hsu, H.H.T and Anderson, H.C. (1986) The deposition of calcium pyrophosphate by NTP pyrophosphohydrolase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. *Int. J. Biochem.* 18:1141-1146.
- Hsu, H.H.T. (1994) Mechanisms of initiating calcification. ATP-stimulated Ca- and Pi-depositing activity of isolated matrix vesicles. *Int. J. Biochem.* 26:1351-1356.
- Hsu, H.H.T. and Anderson, H.C. (1995) A role for ATPase in the mechanisms of ATP-dependent Ca and phosphate deposition by Isolated rachitic matrix vesicles. *Int. J. Biochem.* 27:1349-1356.
- Hsu, H.H.T. and Camacho, N.P (1999) Isolation of calcifiable vesicles from human atherosclerotic aortas. *Atherosclerosis* 143:353–362.
- Huber, R.; Romisch, J. and Paques, E.P (1990) The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J.* 9(1- 2):3867-3874.
- Huber, R.; Berendes, R.; Burger, A.; Schneider, M.; Karshikov, A.; Luecke, H.; Römisch, J. and Paques, E. (1992) Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J. Mol. Biol.* 223(3):683-704.
- Husen, P; Arriaga, L.R.; Monroy, F.; Ipsen, J.H. and Bagatolli, L.A. (2012) Morphometric image analysis of giant vesicles: a new tool for quantitative thermodynamics studies of phase separation in lipid membranes. *Biophys. J.* 103(11):2304-2310.

- Ierardi, D.F.; Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. (2002) Erythrocyte ghost cell-alkaline phosphatase: construction and characterization of a vesicular system for use in biomineralization studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1567:183-192.
- James, P.J.; Antognozzi, M.; Tamayo, J.; McMaster, T.J.; Newton, J.M. and Miles, M.J. (2001) Interpretation of Contrast in Tapping Mode AFM and Shear Force Microscopy. A Study of Nafion. *Langmuir* 17:349-360.
- Jass, J.; Tjarnhage, T. and Puu, G. (2000) From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* 79:3153–3163.
- Junker, M. and Creutz, C.E. (1993) Endonexin (annexin IV)-mediated lateral segregation of phosphatidylglycerol in phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry* 32(38):9968-9974.
- Kahya, N.; Pecheur, E.I.; de Boeij, W.P.; Wiersma, D.A. and Hoekstra, D. (2001) Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion. *Biophys. J.* 81:1464-1474.
- Kahya, N.; Brown, D.A. and Schwille, P. (2005) Raft Partitioning and Dynamic Behavior of Human Placental Alkaline Phosphatase in Giant Unilamellar Vesicles. *Biochem.* 44: 7479-7489.
- Kahya, N. (2010) Protein–protein and protein–lipid interactions in domain-assembly: Lessons from giant unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1798: 1392–1398.
- Karshikov, A.; Berendes, R.; Burger, A.; Cavalie, A.; Lux, H.D. and Huber, R. (1992) Annexin V membrane interaction: an electrostatic potential study *Eur. Biophys. J.* 20:337-344.
- Kelly, S.M.; Jess, T.J. and Price, N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1751(2):119-139.
- Kelly, S.M. and Price, N.C. (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1(4):349-384.
- Kiffer-Moreira, T.; Sheen, C.R.; Gasque, K.C.; Bolean, M.; Ciancaglini, P.; van Elsas, A.; Hoylaerts, M.F. and Millán, J.L. (2014) Catalytic signature of a heat-stable,

- chimeric human alkaline phosphatase with therapeutic potential. PLoSOne. 9(2):e89374.
- Kim, H.J and Kirsch, T. (2008) Collagen/annexin V interactions regulate chondrocyte mineralization. J. Biol. Chem. 283:10310-10317.
- Kim, H.J.; Delaney, J.D. and Kirsch, T. (2010) The role of pyrophosphate/ phosphate homeostasis in terminal differentiation and apoptosis of growth plate chondrocytes. Bone 47:657–665.
- Kirat, K.E.; Morandat, S. and Dufrêne, Y.F. (2010) Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy. Biochim. Biophys. Acta. 1798(4):750-765.
- Kirsch, T.; Nah, H.D.; Demuth, D.R.; Harrison, G.; Golub, E.E.; Adams, S.L. and Pacifici, M. (1997) Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization, Biochem. 36:3359-3367.
- Kirsch, T.; Harrison, G.; Golub, E.E. and Nah, H.D. (2000). The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. J. Biol. Chem. 275:35577–35583.
- Kirsch, T. (2005) Annexins - their role in cartilage mineralization. Front. Biosci. 10:576-581.
- Kirsch T. (2012) Biomineralization:an active or passive process? Connect Tissue Res. 53(6):438-445.
- Kleinschmidt, J.H. (2013) In: Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols Institut für Biologie, Abteilung Biophysik Universität Kassel, Heinrich-Plett-Strabe 40, Kassel, Germany.
- Kohler, G.; Hering, U.; Zschornig, O. and Arnold, K. (1997) Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH. Biochemistry 36:8189-8194.
- Koynova, R.; Koumanov, A. and Tenchov, B. (1996) Metastable rippled gel phase in saturated phosphatidylcholines: calorimetric and densitometric characterization. Biochim. Biophys. Acta 1285(1):101-108.

- Koynova, R. and Caffrey, M. (1998) Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* 1376(1):91-145.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- Lau, W.L.; Festing, M.H. and Giachelli, C.M. (2010) Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thromb. Haemost.* 104:464-470.
- Le Du, M.H.; Stigbrand, T.; Taussig, M.J.; Menez, A. and Stura, E.A. (2001) Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 276:9158-9165.
- Le Du, M.H. and Millán, J.L. (2002) Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* 277:49808-49814.
- Leone, F.A.; Pizauro, J.M. and Ciancaglini, P. (1997a) Rat osseous plate alkaline phosphatase: a search for its role in biomineralization. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 3:57-73.
- Leone, F.A.; Ciancaglini, P. and Pizauro, J.M. (1997b) Effect of calcium ions on rat osseous plate alkaline phosphatase activity. *J. Inorg. Biochem.* 68(2):123-127.
- Leone, F.A.; Rezende, L.A.; Ciancaglini, P. and Pizauro, J.M. (1998) Allosteric modulation of pyrophosphatase activity of rat osseous plate alkaline phosphatase by magnesium ions. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30:89-97.
- Leone, F.A.; Baranauskas, J.A.; Furriel, R.P.M. and Borin, I.A. (2005) SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem. Mol. Ed.* 33:399-403.
- Leone, F.A.; Masui, D.C.; de Souza Bezerra, T.M.; Garçon, D.P.; Valenti, W.C.; Augusto, A.S. and McNamara, J.C. (2012) Kinetic analysis of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in selected ontogenetic stages of the Amazon River shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): interactions at ATP- and cation-binding sites. *J. Membr. Biol.* 245(4):201-215.
- Lesieur, P.; Kiselev, M.A.; Barsukov, L.I. and Lombardo, D. (2000). Temperature-induced micelle to vesicle transition: kinetic effects in the DMPC/NaC system. *J.*

- Appl. Cryst. 33:623–627.
- Li, X. and Giachelli, C.M. (2007) Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular calcification. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16:325-328.
- Li, X.; Yang, H.Y. and Giachelli, C.M. (2006) Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ. Res.* 98:905-912.
- Lichtenberg, D. and Markello, T. (1984) Structural characteristics of phospholipid multilamellar liposomes. *J. Pharm. Sci.* 73(1):122-125.
- Liemann, S. and Huber, R. (1997) Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci.* 53(6):516-521.
- Liu, C.; Marshall, P.; Schreiber, I.; Vu, A.; Gai, W. and Whitlow, M. (1999) Interaction between terminal complement proteins C5b-7 and anionic phospholipids. *Blood* 93:2297-2301.
- Lizarbe, M.A.; Barrasa, J.I.; Olmo, N.; Gavilanes, F. and Turnay, J. (2013) Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. *Int. J. Mol. Sci.* 14:2652-2683.
- Logue, S.E.; Elgendy, M. and Martin, S.J. (2009) Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nat. Protoc.* 4:1383-1395.
- Lowe, M.K.; Strauss, A.W.; Alpers, R. and Seetharam, S. (1990) Molecular clone and expression of cDNA encoding the membrane-associated rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta* 1037:170-177.
- Luisi, P.L. and Walde, P. (2000). *Giant Vesicles. Perspectives in Supramolecular Chemistry*, Vol. 6 Wiley, New York.
- Luna, E.J. and McConnell, H.L. (1977) Lateral phase separations in binary mixtures of phospholipids having different charges and different crystalline structures. *Biochim Biophys Acta.* 470(2):303-316.
- Majeska, R.J. and Wuthier, R.E. (1975) Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 391:51-60.

- Mannock, D.A.; Lewis, R.A.H. and McElhaney, R.N. (2006) Comparative calorimetric and spectroscopic studies of the effects of lanosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biophys. J.* 91:3327-3340.
- Marchi-Artzner, V.; Jullien, L.; Belloni, L.; Raison, D.; Lacombe, L.; et al. (1996) Interaction, lipid exchange, and effect of vesicle size in systems of oppositely charged vesicles. *J. Phys. Chem.* 100:13844–13856.
- Mavcic, B.; Babnik, B.; Iglic A.; Kanduser M.; Slivnik T. and Kralj-Iglic V. (2004) Shape transformation of giant phospholipid vesicles at high concentrations of C12E8. *Bioelectrochemistry*.63(1-2):183-187.
- McComb, R.B.; Bowers, G.N. and Posen, S. (1979) In: “Alkaline phosphatase”. Plenum Press, New York.
- McKee, M.D.; Murshed, M. and Kaartinen, M.T. (2012) *Mineralized Tissues in Oral and Craniofacial Science: Biological Principles and Clinical Correlates*, First Edition.
- McKee, M.D.; Yadav, M.C.; Foster, B.L.; Somerman, M.J.; Farquharson, C. and Millán, J.L. (2013) Compounded PHOSPHO1/ALPL deficiencies reduce dentin mineralization. *J. Dent. Res.* 92(8):721-727.
- Meers, P. (1990) Location of tryptophans in membrane-bound annexins. *Biochemistry* 29(13):3325-3330.
- Meers, P. and Mealy, T. (1993a) Calcium-dependent annexin V binding to phospholipids: stoichiometry, specificity, and the role of negative charge. *Biochemistry* 32(43):11711-11721.
- Meers, P. and Mealy, T. (1993b) Relationship between annexin V tryptophan exposure, calcium, and phospholipid binding. *Biochemistry* 32(20):5411-4518.
- Mertins, O.; da Silveira, N.P.; Pohlmann, A.R.; Schröder, A.P. and Marques, C.M. (2009) Electroformation of giant vesicles from an inverse phase precursor. *Biophys. J.* 96(7):2719-2726.
- Meyer, J.L. (1984) Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch. Biochem. Biophys.* 231: 1-8.

- Miles, A.J. and Wallace, B.A. (2006) Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. *Chem. Soc. Rev.* 35(1):39-51.
- Millán, J.L. (2006) In: *Mammalian Alkaline Phosphatase: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Millán, J.L.; Narisawa, S.; Lemire, I.; Loisel, T.P.; Boileau, G.; Leonard, P.; Gramatikova, S.; Terkeltaub, R.; Camacho, N.P.; McKee, M.D.; Crine, P. and Whyte, M.P. (2008) Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Res.* 23:777–787.
- Millán, J.L. (2012) The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif. Tissue Int.* 93(4):299-306.
- Minetti, C.A. and Remeta, D.P. (2006) Energetics of membrane protein folding and stability. *Arch. Biochem. Biophys.* 453(1):32-53.
- Montessuit, C.; Caverzasio, J. and Bonjour, J.P. (1991) Characterization of a Pi transport system in cartilage matrix vesicles. Potential role in the calcification process. *J. Biol. Chem.* 266(27):17791-17797.
- Morandat, S.; Azouzi, S.; Beauvais, E.; Mastouri, A. and El Kirat, K. (2013) Atomic force microscopy of model lipid membranes. *Anal. Bioanal. Chem.* 405(5):1445-1461.
- Mornet, E.; Stura, E.; Lia-Baldini, A.S.; Stigbrand, T.; Ménez, A. and Le Du, M.H. (2001) Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J. Biol. Chem.* 276:31171-31178.
- Morris, D.C.; Masuhara, K.; Takaoka, K.; Ono, K. and Anderson, H.C. (1992) Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner.* 19:287-298.
- Moscho, A.; Orwar, O.; Chiu, D.T.; Modi, B.P. and Zare, R.N. (1996) Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11443–11447.

- Moss, D.W.; Eaton, R.H.; Smith, J.K. and Whitby, L.G. (1967) Association of inorganic-pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations. *Biochem. J.* 102:53-57.
- Moss, D.W. and Walli, A.K. (1969) Intermediates in the hydrolysis of ATP by human alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 191:476-477.
- Mune, S.; Shibata, M.; Hatamura, I.; Saji, F.; Okada, T.; Maeda, Y.; Sakaguchi, T.; Negi, S. and Shigematsu, T. (2009) Mechanism of phosphate-induced calcification in rat aortic tissue culture: possible involvement of Pit-1 and apoptosis. *Clin. Exp. Nephrol.* 13:571-577.
- Nakamura, T.; Nakamura, K. and Stinson, R.A. (1988) Release of alkaline phosphatase from human osteosarcoma cell by phosphatidylinositol phospholipase C: effect of tunicamycin. *Arch. Biochem. Biophys.* 265:190-196.
- Nakano, Y.; Addison, W.N. and Kaartinen, M.T. (2007) ATP-mediated mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone* 41:549-561.
- Nieh, M. P.; Harroun, T.A.; Raghunathan, V.A.; Glinka, C.J. and Katsaras, J. (2003) Concentration-independent spontaneously forming biomimetic vesicles. *Phys. Rev. Lett.* 91:158105:1-4
- O'Brien, P.J. and Herschlag, D. (2001) Functional interrelationships in the alkaline phosphatase superfamily: phosphodiesterase activity of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry* 40:5691-5699.
- Ohnesorge, F. and Binnig, G. (1993) True atomic resolution by atomic force microscopy through repulsive and attractive forces. *Science* 260(5113):1451-146.
- Palmer, G.; Bonjour, J.P.; Caverzasio, J. (1997) Expression of a newly identified phosphate transporter/retrovirus receptor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and its regulation by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 138(12):5202-5209.
- Pedersen, T.B.; Sabra, M.C.; Frokjaer, S.; Mouritsen, O.G. and Jørgensen, K. (2001) Association of acylated cationic decapeptides with dipalmitoylphosphatidylserine-dipalmitoylphosphatidylcholine lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids.* 113:83-95.
- Picher, M. and Boucher, R.C. (2001) Metabolism of extracellular nucleotides in human airways by a multienzyme system. *Drug Dev. Res.* 52:66-75.

- Picher, M.; Burch, L.H.; Hirsh, A.J.; Spsychala, J. and Boucher, R.C. (2003) Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J. Biol. Chem.* 78:13468-13479.
- Pizauro, J.M.; Curti, C.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1987) Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B:921-926.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1992) Phosphotransferase activity associated with rat osseous plates alkaline phosphatase: a possible role in biomineralization. *Int. J. Biochem.* 24:1391-1396.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1993) Allosteric modulation by ATP, calcium and magnesium ions of rat osseous plate alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta* 1202:22-28.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1994) Osseous plate alkaline phosphatase is anchored by GPI. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27:453-456.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone F.A. (1995) Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. *Mol. Cel. Biochem.* 152:121-129.
- Pollard, H. B., and Rojas, E. (1988) Ca²⁺-activated synexin forms highly selective, voltage-gated Ca²⁺ channels in phosphatidylserine bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2974-2978.
- Qin, N.; Olcese, R.; Bransby, M.; Lin, T. and Birnbaumer, L. (1999) Ca²⁺-induced inhibition of the cardiac Ca²⁺ channel depends on calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(5):2435-2438.
- Rand, R.P.; Chapman, D. and Larsson, K. (1975) Tilted hydrocarbon chains of dipalmitoyl lecithin become perpendicular to the bilayer before melting. *Biophys. J.* 15:1117-1124.
- Reeves, J.P. and Dowben, R.M. (1969) Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles *J. Cell Physiol.* 73:49-60.

- Rezende, A.A.; Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1994) Phosphodiesterase activity is a novel property of alkaline phosphatase from osseous plate. *Biochem. J.* 301:517-22.
- Rezende, A.A.; Pizauro J.M.; Ciancaglini, P. and Leone F.A. (1998) Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cel. Mol. Biol.* 44:293-302.
- Riske, K.A. and Dimova, R. (2005) Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. *Biophys. J.* 88:1143-1155.
- Riske, K.A.; Sudbrack, T.P. and Archilha, N.L. (2009) Giant vesicles under oxidative stress induced by a membrane-anchored photosensitizer. *Biophys. J.* 97:1362-1370.
- Roberts, S.J.; Stewart, A.J.; Sadler, P.J. and Farquharson, C. (2004) Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities. *Biochem. J.* 382:59-65.
- Robison, R. (1923) The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* 17:286-93.
- Ronzon, F.; Desbat, B.; Chauvet, J.P. and Roux, B. (2002) Behavior of a GPIanchored protein in phospholipid monolayers at the air- water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 1560:1-13.
- Ronzon, F.; Morandat, S.; Roux, B. and Bortolato, M. (2004) Insertion of a glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme into liposomes. *J. Membr. Biol.* 197: 169-177.
- Rosengarth, A.; Rösger, J.; Hinz, H.J. and Gerke, V. (1999) A comparison of the energetics of annexin I and annexin V. *J. Mol. Biol.* 288(5):1013-1025.
- Say, J.C.; Ciuffi, K.; Furriel, R.P.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1991) Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochim. Biophys. Acta* 1074:256-262.

- Schlaepfer, D.D.; Mehlman, T.; Burgess, W.H. and Haigler, H.T. (1987) Structural and functional characterization of endonexin II, a calcium- and phospholipid-binding protein. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 84(17):6078-6082.
- Schlaepfer, D.D.; Jones, H. and Haigler, H.T. (1992) Inhibition of protein kinase C by annexin V. *Biochem.* 31:1886-1891.
- Segel, I.H. (1975), *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems.* John Wiley & Sons, Inc.
- Sela, J.; Gross, U.M.; Kohavi, D.; Shani, J.; Dean, D.D.; Boyan, B.D. and Schwartz, Z. (2000) Primary mineralization at the surfaces of implants. *Critical Reviews in Oral Bio. and Med.* 11:423-436.
- Sesana, S.; Re, F.; Bulbarelli, A.; Salerno, D.; Cazzaniga, E.; Masserini, M. (2008) Membrane features and activity of GPI-anchored enzymes: Alkaline phosphatase reconstituted in model membranes. *Biochem.* 47:5433-5440.
- Simão, A.M.; Yadav, M.C.; Narisawa, S.; Bolean, M.; Pizauro, J.M.; Hoylaerts, M.F.; Ciancaglini, P. and Millán, J.L. (2010) Proteoliposomes harboring alkaline phosphatase and nucleotide pyrophosphatase as matrix vesicle biomimetics. *J. Biol. Chem.* 285(10):7598-609.
- Simão, A.M.; Bolean, M.; Hoylaerts, M.F.; Millán, J.L. and Ciancaglini, P. (2013) Effects of pH on the production of phosphate and pyrophosphate by matrix vesicles' biomimetics. *Calcif. Tissue Int.* 93(3):222-232.
- Singh, S. (2010) Nanomedicine-nanoscale drugs and delivery systems. *J Nanosci Nanotechnol.* 10(12):7906-7918.
- Shimanouchi, T.; Umakoshi, H. and Kuboi R. (2013) Growth behavior of giant vesicles using the electroformation method: Effect of proteins on swelling and deformation. *J. Colloid Interface Sci.* 394:269–276.
- Sopkova, J.; Gallay J.; Vincent, M.; Pancoska, P. and Lewit- Bentley, A. (1994) The dynamic behavior of annexin V as a function of calcium ion binding: a circular dichroism, UV absorption, and steady-state and time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* 33:4490–4499.

- Sreerama, N. and Woody, R.W. (2004) On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Sci.* 13(1):100-112.
- Stec, B.; Cheltsov, A. and Millán, J.L. (2010) Refined structures of placental alkaline phosphatase show a consistent pattern of interactions at the peripheral site. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66:866–870.
- Sudbrack, T.P.; Archilha, N.L.; Itri, R. and Riske, K.A. (2011) Observing the solubilization of lipid bilayers by detergents with optical microscopy of GUVs. *J. Phys. Chem. B* 115(2):269-277.
- Tamayo, J. and Garcia, R. (1996) Deformation, Contact Time, and Phase Contrast in Tapping Mode Scanning Force Microscopy. *Langmuir* 12:4430-4435.
- Tamba, Y. and Yamazaki, M. (2005) Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. *Biochemistry* 44(48):15823-15833.
- Terkeltaub, R. (2006) Physiologic and pathologic functions of the NPP nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family focusing on NPP1 in calcification. *Purinergic Signal* 2:371–377.
- Thouverey, C.; Strzelecka-Kiliszek, A.; Belcerzak, M.; Buchet, R. and Pikula, S. (2009) Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells. *J. Cel. Biochem.* 106:127-138.
- Tristam-Nagle, S. and Nagle, J.F. (2004) Lipid bilayers:thermodynamics, structure, fluctuations and interactions. *Chem. Phys. Lipids* 127:3-14.
- Voges, D.; Berendes, R.; Burger, A.; Demange, P.; Baumeister, W. and Huber, R. (1994) Three-dimensional structure of membrane-bound annexin V. A correlative electron microscopy-X-ray crystallography study. *J. Mol. Biol.* 238(2):199-213.
- Vogl, T.; Jatzke, C.; Hinz, H.J.; Benz, J. and Huber, R. (1997) Thermodynamic stability of annexin V E17G: equilibrium parameters from an irreversible unfolding reaction. *Biochemistry* 36(7):1657-1668.
- Walde, P. and Ichikawa, S. (2001) Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol. Eng.*18(4):143-177.

- Wang, W.; Xu, J. and Kirsch, T. (2005) Annexin V and terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 305:156-165.
- Whyte MP, Greenberg CR, Salman NJ, Bober MB, McAlister WH, et al. (2012) Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. *N. Engl. J. Med.* 366:904–913.
- Worcester, D.L.; Miller, R.G. and Bryant, P.J. (1988) Atomic force microscopy of purple membranes. *J. Microsc.* 152(3):817-821.
- Wu, L.N.Y.; Genge, B.R.; Dunkelberger, D.G.; LeGeros, R.Z.; Concannon, B. and Wuthier, R.E. (1997) Physicochemical characterization of the nucleational core of matrix vesicles. *J. Biol. Chem.* 272:4404-4411.
- Wu, L.N.Y.; Genge, B.R.; Kang, M.W.; Arsenault, A.L. and Wuthier, R.E. (2002) Changes in phospholipid extractability and composition accompany mineralization of chicken growth plate cartilage matrix vesicles. *J. Biol. Chem.* 277:5126-5133.
- Wuthier, R.E. and Register, T.C. (1985) Role of alkaline phosphatase, a polifunctional enzyme, in mineralizing tissues. In: “The chemistry and biology of mineralized tissues”. (Butler, W.T. ed.) EBSCO Média Inc. Birgmingham pp. 113-124.
- Wuthier, R.E.; Chin, J.E.; Hole, J.E.; Register, T.C.; Laura, Y.H. and Ishikawa, Y. (1985) Isolation and characterization of calcium accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. *J. Biol. Chem.* 260:15972-15979.
- Wuthier, R.E. and Lipscomb, G.F. (2011) Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. *Front. Biosci.* 17:2812-2902.
- Yadav, M.C.; Lemire, I.; Leonard, P.; Boileau, G.; Blond, L. et al. (2011) Dose response of bone-targeted enzyme replacement for murine hypophosphatasia. *Bone* 49:250–256.
- Yagami, K.; Suh, J.Y.; Enomoto-Iwamoto, M.; Koyama, E.; Abrams, W.R.; Shapiro, I.M.; Pacifici, M. and Iwamoto, M. (1999) Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *J. Cell Biol.* 147:1097–1108.

- Yoshiko, Y.; Candelieri, G.A.; Maeda, N. and Aubin, J.E. (2007) Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Mol. Cell. Biol.* 27:4465- 4474.
- Zebboudj, A.F.; Imura, M. and Bostrom, K. (2002) Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J. Biol. Chem.* 277:4388–4394.
- Zhang, L.; Balcerzak, M.; Radisson, J.; Thouverey, C.; Pikula, S.; Azzar, G. and Buchet, R. (2005) Phosphodiesterase activity of alkaline phosphatase in ATP-initiated Ca²⁺ and phosphate deposition in isolated chicken matrix vesicles. *J. Biol. Chem.* 280:37289-37296.
- Zoidis, E.; Ghirlanda-Keller, C.; Gosteli-Peter, M.; Zapf, J. and Schmid, C. (2004) Regulation of phosphate (Pi) transport and NaPi-III transporter (Pit-1) mRNA in rat osteoblasts. *J Endocrinol.* 181(3):531-540.