Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós – Graduação em Química

Estudos biofísicos da interação entre a Na,K-ATPase e a subunidade gama, ATP, Na⁺, K⁺, DPPC, DPPE e colesterol.

Juliana Sakamoto Yoneda

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

Estudos biofísicos da interação entre a Na,K-ATPase e a subunidade gama, ATP, Na⁺, K⁺, DPPC, DPPE e colesterol.

Juliana Sakamoto Yoneda

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química no dia 26/03/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Yoneda, Juliana Sakamoto

Estudos biofísicos da interação entre a Na,K-ATPase e a subunidade gama, ATP, Na⁺, K⁺, DPPC, DPPE e colesterol. Ribeirão Preto, 2014.

127 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Ciancaglini, Pietro

1. Na,K-ATPase. 2. Calorimetria. 3. Agregação. 4. Oligomerização 5. Estabilidade térmica.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família:

Aos meus pais Hiroshi e Yvone.

Que são os responsáveis pela minha vida, obrigada pelo amor, dedicação, por me incentivar sempre e não medir esforços para que eu sempre tivesse o melhor possível. Vocês são os melhores exemplos de seres humanos que eu poderia ter. As palavras são poucas para expressar a minha eterna gratidão. Minha vitória também é de vocês.

Às minhas irmãs Luciane e Giane pelo companheirismo, amizade e amor infinito. Vocês são as maiores torcedoras do meu sucesso e com quem eu posso contar sempre. Toda felicidade por essa etapa finalizada eu compartilho com vocês!

Agradecimentos Especiais

Agradeço a Deus por ser o meu principal guia. Iluminando a minha trajetória e me dando a sabedoria e serenidade necessárias para que meus objetivos sejam sempre alcançados.

Agradeço ao meu avô “Chico” que foi o melhor exemplo durante a minha infância. Tudo que ele me ensinou foi essencial para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

E à vovó “Bachan” pelo carinho que sempre foi me dado, pelos ensinamentos, pelo exemplo de perseverança e de um ser humano tão lindo.

Mesmo que não estejam mais entre nós, minha gratidão e amor serão eternos.

A toda minha família (cunhado, tias, tios, primas, primo) e a “Vó Tereza”, pelo apoio, torcida e orações. Agradeço imensamente. Vocês são fundamentais!

À Marcelle, Rodrigo e Santa, obrigada por estarem presentes sempre quando precisei de um ombro amigo e também por compartilhar os momentos de alegria.

*À Thuanny, por ter se tornado além de colega de trabalho, uma amiga!
Vou levar nossa amizade pra vida toda.*

E também aos amigos, inclusive os que estão longe, mas que de alguma forma se fazem presente na minha vida. A amizade de vocês é essencial!

Ao orientador Pietro, agradeço imensamente por dividir os seus conhecimentos e experiências. Por orientar, no âmbito científico e pessoal. Por ser além de professor, amigo. Por estar sempre disposto em ajudar. Obrigada pelo incentivo, conselhos e por me proporcionar a oportunidade de finalizar mais essa etapa da minha vida. Essa conquista não seria possível sem o seu apoio, Muito Obrigada!

Aos colegas de laboratório Amanda, Ana, Bruno, Camila, Cris, Dani, Heitor, Gustavo, Larissa, Maytê, Simone e Thuanny, obrigada por tornarem o dia a dia agradável, pelas risadas, pelo companheirismo e disposição em ajudar. Agradeço pela ótima convivência. Vocês foram indispensáveis para que eu finalizasse mais essa etapa. Obrigada por tudo!

Agradecimentos

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

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

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

Ao professor **Júlio Cesar Borges**, pela disposição em ajudar. Pelo auxílio na execução dos experimentos de Ultracentrifugação Analítica e na interpretação dos resultados,

Ao **CNPEM** (LEC, LNBio) – Campinas por disponibilizar o laboratório para a realização desses experimentos,

Aos professores e funcionários da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pela bolsa e auxílios concedidos ao laboratório,

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

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

Sumário

Siglas e Abreviaturas.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	IV
1. Introdução.....	1
1.1 A Na,K-ATPase.....	1
1.2 Estrutura Cristalina da Na,K-ATPase.....	7
1.3 A Na,K-ATPase e sua importância fisiológica.....	12
1.4 A Na,K-ATPase e sua interação com lipídios.....	14
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1 Preparação da Na,K-ATPase solubilizada e purificada	20
3.2 Dosagem de proteína.....	20
3.3 Extração da subunidade gama.....	20
3.4 Eletroforese.....	21
3.5 Preparação de proteolipossomo.....	21
3.6 Determinação da atividade ATPase.....	22
3.7 Espalhamento Dinâmico de Luz – DLS	23
3.8 Calorimetria Diferencial de Varredura – DSC.....	24
3.9 Titulação Isotérmica Calorimétrica – ITC.....	25
3.10 Ultracentrifugação Analítica – AUC.....	25
3.11 Análise Estatística.....	26
4. Resultados e Discussão.....	28
4.1 Isolamento da subunidade gama.....	28
4.2 Estabilidade térmica da Na,K-ATPase.....	33
4.2.1 <i>Fração de membrana</i>	34

4.2.2	<i>Na,K-ATPase solubilizada: efeito da solubilização e adição da subunidade gama.....</i>	39
4.2.3	<i>Na,K-ATPase solubilizada em diferentes concentrações de detergente.....</i>	44
4.2.4	<i>Na,K-ATPase solubilizada: efeito dos íons Na⁺ e ATP.....</i>	49
4.2.5	<i>Proteolipossomo.....</i>	55
4.2.6	<i>Comparação dos resultados de DSC.....</i>	57
4.3	Investigação da cinética enzimática da Na,K-ATPase por Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	59
4.3.1	<i>Injeção simples.....</i>	61
4.3.2	<i>Injeções múltiplas.....</i>	67
4.4	Agregação / Oligomerização da Na,K-ATPase.....	77
4.4.1	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz.....</i>	77
4.4.2	<i>Ultracentrifugação Analítica (AUC).....</i>	93
4.5	Interação entre colesterol e a Na,K-ATPase via ITC.....	102
5.	Conclusão.....	114
6.	Referências Bibliográficas.....	117
Anexo.....		127

Siglas e Abreviaturas

α M – Segmento transmembrana da subunidade α .
Ala – Alanina
Arg - Arginina
Asn - Asparagina
Asp – Aspartato
ADP – Adenosina difosfato
ATP – Adenosina trifosfato
AUC - *Analytical Ultracentrifugation* (Ultracentrifugação Analítica)
BSA – Albumina de soro bovino
C₁₂E₈ - Octaetileno Glicol Monododecil Éter
CMC - Concentração Micelar Crítica
Cp – Capacidade calorífica a pressão constante
CTS – Esteróides Cardiotônicos
Cys – Cisteína
 ΔH_t – Variação de entalpia total
D - Aspartato
DLS – *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento dinâmico de luz)
DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPE – Dipalmitoilfosfatidiletanolamina
DSC – Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Diferencial de Varredura)
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
F - Fenilalanina
Glu - Glutamato
Gly – Glicina
HEPES – Ácido hidroexietil piperazina etanosulfúrico
ITC – *Isothermal Titration Calorimetry* (Titulação isotérmica calorimétrica)
PDB – *Protein Data Bank* (Banco de dados de proteínas)
Phe – Fenilalanina
Pi – Fosfato Livre
PNFF – p-nitrofenilfosfato
Pro – Prolina
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SD – *Standart Deviation* (Desvio Padrão)
Ser – Serina
SERCA - *Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca-ATPase*
Tt – Temperatura de Transição
Tm – Temperatura média
TCA – Ácido Tricloroacético
Thr – Treonina
Tris – Tris-(hidroximetil)-aminoetano
Trp – Triptofano
Tyr – Tirosina
Val – Valina
Y – Tirosina

Resumo

A Na,K-ATPase (NKA) é expressa em todas as células animais e é um dos membros mais importantes da família das ATPases do tipo P. Consiste de três subunidades: α , β e γ . Essa proteína é responsável por gerar o gradiente eletroquímico de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática pelo uso da energia derivada da hidrólise de ATP.

Neste trabalho estudos da termoestabilidade da Na,K-ATPase foram feitos. Os resultados mostraram que a fração de membrana rica em NKA alcançou a máxima estabilidade térmica entre as amostras analisadas. Após a solubilização da proteína com C_{12}E_8 , a estabilidade da NKA diminuiu pela metade, no entanto, essa amostra solubilizada possuía atividade enzimática. Pela análise dos valores de variação de entalpia total (ΔH_t) foi possível observar que a adição do extrato contendo a subunidade γ à enzima solubilizada ($\alpha\beta$) levou à formação do complexo $\alpha\beta\gamma$ com maior estabilidade térmica. Um aumento em ΔH_t também foi verificado quando a NKA solubilizada foi reconstituída em sistemas de lipossomos. A conformação E2, induzida pelos íons K^+ , foi duas vezes mais estável que a conformação E1, que é induzida pelos íons Na^+ . A interação da conformação E2 com o substrato ATP não modificou o valor de variação de entalpia, mas com a liberação dos íons K^+ ocorreu uma mudança conformacional, que foi suficiente para resultar em um termograma com um perfil diferente.

Além do estudo de estabilidade térmica, a calorimetria também foi utilizada com o propósito de estudos cinéticos da NKA. Os parâmetros (K_m e $V_{m\text{áx}}$) foram determinados e os valores de K_m obtidos estavam dentro da faixa submilimolar esperada. A utilização de duas concentrações diferentes de proteína resultou em curvas de titulação calorimétrica distintas o que nos levou a especular que a mudança no perfil poderia ser explicada pelo estado oligomérico que a NKA assumiu em solução dependendo da sua

concentração.

Os resultados obtidos pelas técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz e Ultracentrifugação Analítica mostraram que a amostra de NKA se divide em diferentes populações oligoméricas em solução. As principais populações são de monômero - ($\alpha\beta$) e tetramero - ($\alpha\beta$)₄. Há também a formação de um agregado inespecífico que pode ser retirado por filtração simples, mas que com o tempo volta a se formar em solução. E finalmente, os experimentos de ITC mostraram que provavelmente ocorre uma interação direta do colesterol com a NKA.

Abstract

Na,K-ATPase (NKA) is expressed in all animal cells. It is an important member belonging to the family of P-type ATPases. This protein uses the energy derived from ATP hydrolysis to generate electrochemical gradient of Na^+ and K^+ across the plasma membrane. The Na,K-ATPase consists of α , β and γ subunits.

In this work, the thermostability of the NKA was analyzed in different conditions. The membrane-bound NKA reached the highest thermal stability. After the solubilization with C_{12}E_8 , the stability of this enzyme decreased by half, although the protein retained its enzymatic activity. When the extract containing the γ subunit was introduced into the solubilized enzyme, the $\alpha\beta\gamma$ complex reached higher stability compared to $\alpha\beta$. This attests to an important structural role of subunit γ in addition to its regulatory function. A recovery of the stability can also be verified when solubilized NKA is reconstituted into liposome vesicles, corroborating the crucial role of lipids in the protein stabilization. The conformation E2, induced by K^+ , was twice more stable than the conformation E1, induced by Na^+ . The interaction of the substrate ATP with conformation E2 did not modify the value of total enthalpy variation, but the release of ions K^+ caused a conformation change which was enough to promote a different thermogram profile.

Further, the calorimetry was also used for the purpose to kinetic studies of the NKA. The kinetic parameters (K_m and $V_{\text{máx}}$) were obtained and the K_m values were within the expected submillimolar range. Using multiple injection method, the curves obtained for two protein concentrations were different. This led us to speculate that the different profile could be explained by the oligomeric state that NKA assumes in solution dependent on its concentration.

In order to unveil this question, an aggregation and oligomerization study, using the techniques Dynamic Light Scattering and Analytical Ultracentrifugation was performed. The results showed that NKA is divided into different populations of oligomers in solution. The main populations are monomer - $(\alpha\beta)$ and tetramer - $(\alpha\beta)_4$. There is also the formation of a nonspecific aggregate that can be removed by a simple filtration, but it is formed again in solution over time. Finally, the ITC experiments showed that the direct interaction of cholesterol with NKA probably occurs.

1. Introdução

1. Introdução

1.1 A Na,K-ATPase:

A descoberta da Na,K-ATPase (NKA) por Skou foi um passo determinante no estudo da célula como base unitária da vida animal (Skou, 1957).

A NKA é uma proteína de membrana que move três íons Na^+ para fora e dois íons K^+ para dentro da célula para cada molécula de ATP hidrolisada, envolvendo um ciclo no qual a enzima apresenta principalmente dois estados conformacionais: uma forma E1, que tem uma alta afinidade pelo íon sódio, e E2, com alta afinidade pelo íon potássio (Skou e Esmann, 1992).

A bomba de sódio e potássio, como também é denominada a NKA é uma proteína ubíqua devido à necessidade da regulação do volume celular. Além disso, o gradiente de Na^+ formado é a fonte de energia para o transporte facilitado de outros íons e metabólitos. A formação e a manutenção do potencial de membrana são necessárias para ocorrer a transmissão do impulso nervoso, a contração muscular e a excitabilidade celular (Skou e Esmann, 1992; Bagrov et al., 2009; Lingrel et al., 2010).

A NKA funcional é um heterodímero composto pelas subunidades α e β e ainda uma terceira subunidade presente em alguns tecidos denominada γ (Figura 1A).

Figura 1. (A) Representação esquemática das subunidades α (verde), β (vermelho) e γ (azul). (B) Arquitetura da Na,K-ATPase retirada de Shinoda et al., 2009. A cor muda gradualmente entre o grupo amino-terminal (azul) e o carboxi-terminal (vermelho) para as subunidades alfa e beta. A proteína FXYD está no roxo. Esferas roxas circuladas em rosa representam os íons K^+ ligados.

A subunidade α contém aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos e possui massa molecular cerca de 110 kDa. Possui 10 segmentos transmembrana, 5 alças extracelulares e 4 intracelulares em sua estrutura (Figura 1A). A parte extracelular compreende os domínios A (atuador), N (ligação do nucleotídeo) e P (fosforilação). O domínio A consiste da parte N-terminal e o segundo domínio citoplasmático (CD2), conectando as hélices TM2 e TM3. O terceiro domínio citoplasmático (CD3) conectando as hélices TM4 e TM5 compreende os domínios N e P. O domínio N é o de ligação do ATP e o domínio P catalisa a transferência do grupo γ -fosforil para a enzima (Figura 1A) (Kaplan, 2002; Reinhard et al., 2012).

A subunidade β possui massa molecular aparente cerca de 50 kDa e é composta por aproximadamente 370 aminoácidos. Destes, cerca de 30 resíduos são expostos no citosol e 300 formam a porção extracelular (Skou e Esmann, 1992; Lingrel et al., 1994; Pedersen et al., 1996; Geering, 2000; Hasler et al., 2001; Kaplan, 2002). Esta subunidade apresenta um único segmento transmembrana e um ectodomínio que possui três pontes de sulfeto e diversas cadeias de açúcar (Figura 1A). Diversos estudos têm reportado que a subunidade β está envolvida na afinidade aparente da enzima pelo K^+ , além de ser essencial para a translação, estabilidade e correta inserção da subunidade α na membrana (Jaisser et al., 1992; Lutsenko e Kaplan, 1993; Hasler et al., 1998, 2001; Barwe et al., 2007; Morth et al., 2007). Outras funções estão sendo atribuídas à subunidade β , por exemplo, um papel importante desta em processos relacionados à polaridade da célula, como a adesão e mobilidade celular, transição de célula epitelial a mesenquimal e transformação oncogênica (Geering, 2008).

Considera-se também em alguns tecidos, a existência de uma pequena proteína com um único segmento transmembrana, apresentando a extremidade N-terminal

voltada para o meio extracelular e C-terminal para o citoplasma. Pertencente à família de proteínas contendo o motivo FXYD, foi descoberta por Forbush et al. (1978). Possui massa molecular cerca de 10 kDa (Therien e Blostein, 2000; Geering, 2006) e é considerada a terceira subunidade da bomba de sódio e potássio, denominada γ (FXYD2) em rim (Béguin et al., 1997; Garty e Karlish, 2005). Esta subunidade está localizada próxima ao segmento transmembrana α M9 e modula a atividade da enzima pela mudança da afinidade aparente pelo sódio, potássio e ATP (Geering, 2008).

Foram identificadas quatro isoformas para a subunidade α . α_1 é a isoforma predominante em todos os tecidos; α_2 é principalmente expressa no esqueleto, coração e músculo liso, além do tecido adiposo, cérebro e pulmão, α_3 é primariamente expressa por neurônios e células cardíacas. A isoforma α_4 é expressa somente em testículos e tem sido associada à mobilidade do espermatozoide. Foram reportadas três isoformas para a subunidade β . A β_1 que é encontrada em praticamente todos os tecidos, a β_2 predominantemente expressa por neurônios e β_3 expressa em testículos. (Shull et al., 1986; Martin-Vasallo et al., 1989; Gloor et al., 1990; Malik et al., 1996; Blanco, 2005; Madan et al., 2007; Morth et al., 2007).

As interações entre as subunidades α e β através de seus segmentos transmembrana e domínios citoplasmáticos parecem ter importância tanto estrutural quanto funcional, pois tentativas de separação das subunidades levaram à perda da atividade catalítica ou resultou em uma subunidade α com atividade catalítica bastante diferente daquela da forma associada (Skou e Esmann, 1992; Ivanov et al., 2000; Jorgensen et al., 2003; Barbosa et al., 2010; Rigos et al., 2010).

As isoformas podem ser combinadas para formar complexos cineticamente distintos em diferentes células e tecidos. As combinações $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_1\beta_2$, $\alpha_1\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$,

$\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 3$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 3$ já foram estudadas e se mostraram enzimas cataliticamente competentes (Blanco, 2005) e dessa maneira, a regulação da NKA é feita de maneira tecido/isoforma-específica. Mensageiros intracelulares regulam a atividade das isozimas da NKA, e essa regulação específica dá habilidade às células de coordenar a atividade de acordo com a necessidade fisiológica (Suhail, 2010).

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

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

Baseado no trabalho pioneiro de Albers (1967) e Post et al. (1969) o ciclo reacional mais aceito das ATPases do tipo P (que são fosforiladas) é o modelo Albers-

Post ou modelo E1-E2, resumido na Figura 2.

Durante o ciclo catalítico, o domínio P interage com o domínio N e A, levando à auto fosforilação e desfosforilação, respectivamente. O resíduo conservado Asp369 do domínio P é auto fosforilado utilizando o ATP ligado ao domínio N. A desfosforilação subsequente do domínio P é catalisada por uma Glu em um motivo TGE conservado do domínio A. Finalmente, a ligação de Na^+ é requerida para ocorrer a desfosforilação, que leva a formação do estado fosforilado com os íons Na^+ ocluídos ($[\text{Na}_3]\text{E1P-ADP}$) e a ligação do K^+ estimula a desfosforilação do estado E2P e forma os estados ocluídos $[\text{K}_2]\text{E2Pi}$ e $[\text{K}_2]\text{E2}$ (Morth et al., 2011).

Figura 2. Modelo Albers–Post do mecanismo de transporte da NKA. Diagrama retirado de Morth et al., 2007.

1.2 Estrutura Cristalina da Na,K-ATPase

O número baixo de estruturas cristalinas da NKA comparado à Ca-ATPase (SERCA) (mais de 20 estruturas) é explicado por uma série de razões.

Uma delas é a quantidade de NKA na membrana plasmática ser muito menor que da Ca-ATPase em membrana de retículo sarcoplasmático do músculo esquelético, o que influencia na purificação da proteína. Além disso, a expressão de NKA recombinante em larga escala é desafiadora, embora sistemas utilizando células de levedura e insetos tenham sido desenvolvidos (Cohen et al., 2005; Blanco, 2005).

Outro problema se deve ao fato da subunidade β ser altamente glicosilada, o que impõe limitações na obtenção de amostras homogêneas. A necessidade de um ambiente lipídico especial é outro fator que causa dificuldade na cristalização. Uma alta concentração de colesterol (~ 40 mol%) e fosfatidilserina ajudam a estabilizar a NKA para estudos estruturais. Essa alta proporção de colesterol causa impacto na fluidez da membrana e limita a faixa de temperatura para a cristalização. Além disso, a composição de fosfolipídios e colesterol varia de preparação para preparação, tornando difícil o controle da razão proteína/lipídio, um dos parâmetros importantes para a cristalização (Toyoshima et al., 2011).

Estruturas cristalinas da NKA com resolução melhor que 5 Å elucidaram alguns estados dessa proteína. Duas são análogas ao estado $E2 \cdot \text{Pi} \cdot 2\text{K}^+$. A primeira é o cristal da enzima extraída de rim de porco no estado $E2 \cdot 2\text{Rb}^+ \cdot \text{MgF}_x$, com resolução de 3,5 Å (Morth et al., 2007) e a segunda é da enzima extraída de glândulas retais de tubarão $E2 \cdot 2\text{K}^+ \cdot \text{MgF}_4^{2-}$, com resolução de 2,4 Å (Figura 1B) (Shinoda et al., 2009).

Outras duas estruturas são de estados ligados à ouabaína: com baixa afinidade ($E2 \cdot 2\text{K} \cdot \text{MgF}_4^{2-} \cdot \text{ouabaína}$), com 2,8 Å de resolução (Ogawa et al., 2009) e com alta

afinidade ($E2P \cdot nH^+ \cdot \text{ouabaína}$), com resolução de 4,6Å (Yatime et al., 2011). A última é do estado $E2P \cdot \text{ouabaína}$, com resolução de 3,5Å (Laursen et al., 2013).

A mais recente foi da forma $E1(AlF_4^-) \cdot ADP \cdot 3Na^+$ análoga ao estado de transição ($E1 \sim P \cdot ADP \cdot 3Na^+$) (Kanai e Ogawa et al., 2013).

Uma comparação detalhada entre a estrutura da Ca-ATPase e da Na,K-ATPase revelou importantes diferenças pertinentes às suas funções, embora cada um dos três domínios citoplasmáticos e as 10 hélices transmembranas sejam sobreponíveis. Na Ca-ATPase, o domínio citoplasmático tem uma configuração compacta, estabilizada, em parte, por duas ligações de hidrogênio entre os domínios atuador (A) e de ligação ao nucleotídeo (N). Na NKA os domínios A e N interagem fortemente, somente por uma ponte salina envolvendo a Glu 223 (A; correspondendo a Val 185 na Ca-ATPase) e Arg 551 (N; Arg 550). O domínio N da NKA está aproximadamente 22° mais afastado do domínio P que na Ca-ATPase, o que é talvez pertinente ao seu *turnover* catalítico muito mais rápido (200s⁻¹ versus 30s⁻¹) (Shinoda et al., 2009).

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

O sítio 2 está desviado 1.3 Å para o lado extracelular em comparação com o sítio 1. O sítio 2 é coordenado por três cadeias principais (Val 329, Ala 330 e Val 332), três ou quatro oxigênio de cadeias laterais (Asn 783, Glu 786, Asp 811 e possivelmente Glu 334) e nenhuma molécula de água. Embora o número de coordenação seja alto, a soma das valências parciais é mais baixa que do sítio 1, sendo 0,64. Glu 334 na α M4 é um resíduo estruturalmente muito importante, consistente com resultados de mutagêneses. Assim, os dois sítios de coordenação de íons K^+ têm características diferentes, mas a geometria de coordenação é bastante distorcida em ambos (Shinoda et al., 2009).

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

Nota-se também a presença de uma molécula de colesterol, que parece proteger a parte desenrolada da α M7. A sua presença então está potencialmente relacionada à forte dependência da atividade da NKA pelo colesterol (Shinoda et al., 2009).

A hélice transmembrana da subunidade β está inclinada aproximadamente 32° da normal da membrana, quase paralela a α M7. Entretanto, forma quatro ligações de hidrogênio e numerosos contatos com duas hélices transmembrana da subunidade α , primariamente usando dois clusters de resíduos aromáticos. O primeiro cluster, próximo do colesterol, é formado a partir de quatro resíduos (Phe 39 – Tyr 44) da subunidade β e

um (Tyr 1001) da M10 da subunidade α . Ambos, Tyr 40 e Tyr 44 interagem com α M7 e colesterol. O outro cluster está na parte extracelular, do qual sete resíduos de quatro hélices participam. Tais interações complexas entre as subunidades α e β , explicam em parte, resultados prévios que implica na participação da subunidade β na modulação dos transportes dos cátions (Shinoda et al., 2009).

A NKA extraída de glândulas retais de tubarão possui ainda uma proteína regulatória, FXYD10. A sua parte transmembrana está aproximadamente perpendicular à membrana, interagindo quase que exclusivamente com a parte extracelular da α M9. Dois resíduos conservados de Gly, em particular a Gly 34, são evidentemente importantes para isso. Ligações de hidrogênio são encontradas somente entre Cys 31 e α Glu 960. Como a α Glu 960 será exposta a parte hidrofóbica da membrana se a FXYD estiver ausente, ela terá que encontrar um par para fazer a ligação de hidrogênio dentro da subunidade α . Por isso é concebível que a FXYD10 desempenha um papel importante de regulação através das interações com a α Glu 960. A função do motivo FXYD parece claro. O primeiro resíduo, Phe 12, ancora o segmento para a subunidade β e o último resíduo, Asp 15, cobre a hélice. O terceiro resíduo, Tyr 14, e o subsequente Tyr 16 formam um cluster de resíduos aromáticos com β Tyr 69 e α Trp 987 para formar um sanduíche da subunidade β junto com a subunidade α . Glu 10/Arg 11 e Tyr 16 mediam uma complexa rede de ligações de hidrogênio entre ambas as subunidades. Então, funcionalmente, o motivo deveria ser considerado FXYD/W. O último resíduo Tyr é substituído por Trp em FXYD3 e FXYD4, mas o seu anel irá funcionar similarmente como doador de hidrogênio para β Asp 71 (Shinoda et al., 2009).

Um enigma era como os sítios de ligação para Na^+ rejeitam efetivamente os íons K^+ e Ca^{2+} e faz com que Na,K-ATPase trabalhe como uma bomba de sódio. A mais recente estrutura cristalina da forma $\text{E1}(\text{AlF}_4^-)\cdot\text{ADP}\cdot 3\text{Na}^+$ sugeriu uma explicação em

três pontos: - os sítios para o Na^+ são altamente limitados somente para os pequenos íons Na^+ . Em todos os três sítios, as cavidades são rígidas com uma rede extensa de ligações de hidrogênio e os grupos da cadeia carbonila principal localizados nos finais das hélices são usados para a coordenação. Os sítios para Na^+ são justapostos tão fortemente que somente pequenos íons monovalentes podem se ligar simultaneamente (sítio I e II). Isso significa que a estequiometria de três íons Na^+ transportados por molécula de ATP hidrolisada não é somente pela eficiência, mas também pela especificidade. Além disso, o primeiro sítio de ligação (sítio III) está localizado em uma dobradiça particularmente restritiva que somente um íon posicionado corretamente pode promover reações produtivas após a ligação (Kanai e Ogawa et al., 2013).

Outra informação que a estrutura cristalográfica forneceu foi a interação com a ouabaína, representante da classe dos glicosídeos cardíacos que têm sido utilizados no tratamento de insuficiência cardíaca e arritmias supraventriculares nos últimos 200 anos. Eles inibem a atividade da NKA e, portanto aumentam a concentração intracelular de Na^+ , que desacelera a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ resultando em um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , fortalecendo a contração muscular (Ogawa et al., 2009).

Cristais de NKA no estado análogo a $\text{E2}\cdot 2\text{K}^+\cdot \text{Pi}\cdot \text{ouabaína}$ mostrou que mudanças estruturais causada pela ouabaína são sutis limitadas as hélices transmembrana M1-M4. Contrariando prévios modelos que descreviam a ouabaína localizada na porção extracelular, a estrutura cristalográfica mostrou que ela está inserida profundamente na região transmembrana. Devido ao antagonismo entre a ouabaína e K^+ essa estrutura representou um estado com a ouabaína ligada com baixa afinidade (Ogawa et al., 2009).

1.3 A Na,K-ATPase e sua importância fisiológica

A NKA possui várias funções fisiológicas. Alterações na expressão e/ou seu mau funcionamento pode estar relacionado à patogênese de diversas doenças. De fato, alterações na expressão e atividade da NKA foram observadas em pacientes com doença de Alzheimer, diabetes e hipertensão (Chen et al., 2006). Além disso, há estudos que mostram o envolvimento da NKA em doenças cardiovasculares e renais, na capacitação espermática, apoptose, artrite reumatoide, sepsia, distúrbios neurológicos, edema pulmonar e pré-eclâmpsia. Outros estudos mostraram que a atividade da NKA e os níveis de subunidade β são reduzidos em células de carcinoma. Linhagens de células de carcinoma de vários tecidos sugerem uma ligação funcional entre a redução da expressão da subunidade β e a progressão do câncer. Assim sendo, a NKA poderia ser o alvo do desenvolvimento de drogas anti-câncer, bem como ser uma transdutora de sinal e essencial na adesão celular. Sua expressão e atividade aberrantes implicam no desenvolvimento e progressão de diferentes cânceres (Suhail, 2010).

Alguns estudos sugerem que a NKA interage com proteínas de membrana vizinhas presente nas cavéolas e organiza cascatas citosólicas de proteínas sinalizadoras para que mensagens possam ser enviadas às organelas em diferentes tecidos (Zhang et al., 2008).

A NKA atua também como receptor para os glicosídeos cardíacos. Possui funções como transdutora de sinal em resposta à estimulação pela interação com os cardiotônicos esteroides (CTS). Essa propriedade foi demonstrada pela primeira vez em culturas de células de miócitos cardíacos e células epiteliais renais (Liu e Xie, 2010).

Embora CTS fossem anteriormente considerados importantes na regulação do transporte de sódio renal e pressão arterial, trabalhos recentes implicam que esses hormônios estão envolvidos no crescimento celular, diferenciação, apoptose, modulação

de imunidade e metabolismo de carboidrato, além de várias funções do sistema nervoso. Estes inibidores possuem sítios de ligação específicos nas porções extracelulares da NKA: $\alpha M1$ - $\alpha M2$; $\alpha M5$ - $\alpha M6$ e $\alpha M7$ - $\alpha M8$. Concentrações extremamente baixas de CTS, que provavelmente não inibem a bomba, são capazes de iniciar a sinalização de diversos processos, o que é extremamente importante para diversas funções celulares (Bagrov et al., 2009).

O maior consumidor de energia nas células animais é a NKA. Em humanos, é estimado que de um quarto a um terço de toda energia em forma de ATP disponível no corpo é consumida pela bomba. Muito dessa energia é utilizada para gerar o gradiente de sódio e potássio através da membrana plasmática. Entretanto, a catálise de hidrólise de ATP pela NKA não é 100% termodinamicamente eficiente. Ou seja, nem toda energia liberada pela hidrólise do ATP é usada no bombeamento dos íons. Parte dessa energia é liberada na forma de calor e fisiologicamente, esse calor liberado pela NKA contribui para a manutenção da temperatura corporal (Noske et al., 2010).

Portanto, diferenças na atividade da NKA acarretam em diferença no consumo de ATP. Se menos ATP é consumido pela bomba, por exemplo, há um aumento na energia estocada em forma de gordura, portanto, o uso de ATP e a produção de calor pela NKA podem ter importantes consequências para a saúde humana.

Um trabalho publicado por Clarke e colaboradores (2013) mostrou que quantitativamente, a maior fonte de termogênese relacionada à NKA é derivada da difusão passiva de Na^+ para dentro da célula, que contrabalança o Na^+ bombeado para fora para manter constante o gradiente de Na^+ através da membrana. Um aumento simultâneo na atividade e na permeabilidade passiva de Na^+ podem promover uma temperatura corporal mais alta.

1.4 A Na,K-ATPase e sua interação com lipídios

Proteínas de membrana interagem com os lipídios via bicamada circundante aos segmentos de membrana, mas também, essa interação pode ocorrer de forma específica lipídio-proteína. Embora ligações específicas entre a proteína e lipídios sejam observadas, sua função ainda não é bem compreendida (Haviv et al., 2013).

Os lipídios da bicamada não aparecem geralmente nas estruturas cristalográficas de proteínas solubilizadas com detergente, já que eles são amplamente substituídos pelas moléculas de detergente, embora tenham sido vistos em alguns casos. Em contrapartida, fosfolipídios e colesterol ligados especificamente têm sido observados em diversas estruturas cristalográficas de proteínas de membrana. Esse tipo de interação pode influenciar a estabilidade e/ou atividade catalítica da NKA (Haviv et al., 2013).

A composição lipídica complexa da membrana plasmática e a formação de microdomínios lipídicos são provavelmente muito importantes na regulação da NKA. Caracterizações indiretas, utilizando sistemas de proteolipossomos já foram realizadas, mostrando a dependência da atividade da NKA com diferentes composições lipídicas (Cornelius, 2008). Cohen e colaboradores (2005) revelaram a dependência da atividade da NKA expressa em *Pichia pastoris* na ausência e na presença de fosfolipídios específicos tais como dioleoilfosfatidilcolina e dioleoilfosfatidilserina. Além disso, Esmann e Marsh (2006) revisaram a interação de lipídios com a NKA, utilizando espectroscopia de ressonância eletrônica de spin. Esses autores mostraram a estequiometria e seletividade de alguns lipídios marcados com a NKA. Outro trabalho revelou a estimulação da atividade da NKA recombinante por lipídios neutros (PC e PE). Este efeito parece ser mediado por uma interação específica entre a proteína e as moléculas de fosfolipídios (Haviv et al., 2013).

Uma proporção alta de colesterol causa impacto na fluidez da membrana e a estrutura cristalográfica da NKA revelou um sítio específico de ligação do colesterol (Morth et al., 2007; Shinoda et al., 2009, Toyoshima et al., 2011).

Algumas questões fundamentais se referem à maneira que os lipídios influenciam na função da proteína, bem como a proteína e a sua função tem impacto nas propriedades dos lipídios e na organização da membrana (Bouvrais et al., 2012).

Para esse tipo de estudos são utilizados modelos biofísicos. No nosso laboratório, um protocolo foi desenvolvido para a construção de proteolipossomos, ou seja, de sistemas nos quais a NKA é reconstituída em um sistema mimético de membrana. Inicialmente, o nosso grupo realizou um estudo verificando o efeito da composição lipídica na atividade catalítica e na orientação da proteína incorporada. Sistemas binários de lipídios com PC (fosfatidilcolina) e PE (fosfatidiletanolamina) foram eficientes na incorporação da NKA, sendo o melhor resultado obtido para um sistema com razão lipídio:lipídio igual a 1:1 (p/p) e lipídio:proteína igual a 1:3 (p/p). A integridade dos sistemas foi verificada pela liberação de calceína mediada por detergente ou alameticina. A orientação foi determinada por estudos de inibição enzimática, utilizando ouabaína e vanadato. Em proteolipossomos de DPPC:DPPE a orientação foi inside-out (Santos et al., 2005). Com esse método de preparação de proteolipossomos bem estabelecido pelo nosso grupo, estudos de influência da bicamada lipídica na estabilidade e atividade catalítica da Na,K-ATPase foram possíveis (Santos et al., 2006; Rigos et al., 2006; Yoneda et al., 2013), além de outros trabalhos envolvendo a NKA solubilizada com detergente ($C_{12}E_8$), avaliando importantes propriedades dessa enzima. Esses trabalhos investigaram a relação estrutura-função e a estabilidade da NKA pela utilização de técnicas biofísicas, tais como Dicroísmo Circular, Absorção de Infravermelho, Espectroscopia de Emissão de Fluorescência,

Tensão Superficial, Elasticidade Dilatacional, Espalhamento de raios-X em Baixo Ângulo e Calorimetria Diferencial de Varredura (Rigos et al., 2008, 2010; Barbosa et al., 2010; Yoneda et al., 2013). Outro estudo, ainda não publicado, mostrou a influencia da proporção de colesterol da bicamada na atividade catalítica e estabilidade da NKA (Yoneda, 2010).

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi realizar um estudo da interação da Na,K-ATPase com o ATP, proteína gama e colesterol, verificando qual o efeito que a presença destes fatores provocam em diferentes condições experimentais e assim contribuir para o entendimento de aspectos regulatórios e funcionais da enzima que ainda permanecem elusivos, utilizando o sistema de solubilização, purificação e reconstituição desenvolvido em nosso laboratório.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e purificar a subunidade γ de rim de coelhos,
- Analisar a estabilidade térmica da Na,K-ATPase em diferentes condições (na fração de membrana, solubilizada e purificada na presença dos íons Na^+ , K^+ , do substrato ATP, em diferentes proporções de C_{12}E_8 e incorporada em sistemas lipídicos),
- Analisar a oligomerização das subunidades α e β dependendo da concentração da proteína solubilizada, pelas técnicas de DLS e AUC,
- Verificar se o estado de oligomerização altera o perfil cinético de hidrólise do ATP pela Na,K-ATPase, utilizando a calorimetria de titulação isotérmica,
- Estudar a interação de colesterol com a Na,K-ATPase pela técnica de ITC.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparação da Na,K-ATPase solubilizada e purificada

As frações de membrana da Na,K-ATPase foram extraídas da medula externa de rim de coelho e solubilizadas com C₁₂E₈ na relação proteína:detergente de 1:1 (p/p), a 4°C, conforme descrito por Santos et al. (2002).

A Na,K-ATPase solubilizada foi purificada em sistema Äkta purifier (Amersham Biosciences) empregando-se coluna de Sepharose 6FF (2,6 x 200 cm), equilibrada e eluída com tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e C₁₂E₈ 0,005 mg/mL, a 4°C. O eluato foi monitorado continuamente a 280 nm e as frações coletadas foram acompanhadas por atividade PNFFase. As frações que apresentaram atividade e foram reunidas e concentradas por ultrafiltração em sistema Amicon. Após isso as amostras foram congeladas empregando-se gelo seco e acetona e finalmente armazenadas em freezer a -20°C.

3.2 Dosagem de proteína

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

3.3 Extração da subunidade gama

A extração da subunidade gama foi realizada conforme descrito por Fontes et al. (1999) com algumas alterações: 1,10 mL de fração de membrana obtida como descrito no item [3.1] foi diluída 16 vezes com uma mistura de 46% de metanol (v/v); 46% de clorofórmio (v/v) e 8% de NH₄HCO₃ (750 mM) (v/v). A amostra foi então centrifugada

por 10 minutos a 570 x g. O sobrenadante contendo a subunidade γ foi seco utilizando uma corrente de nitrogênio e o material foi ressuspensão em 1,0 mL de tampão 5,0 mM Tris-HCl, e 0,5 mM KCl, pH 7,0. Essa amostra foi identificada como “extrato 1”.

1,0 mL do extrato 1 foi diluído com 4,0 mL de éter etílico gelado. Essa mistura foi mantida em freezer (-20°C) por 2 horas e então centrifugada por 30 minutos a 3500 RPM em centrífuga clínica (FANEM – Excelsa Baby I, diâmetro = 15 cm). Foram formadas três fases – uma aquosa, uma orgânica e uma sólida. As fases foram separadas, secas e ressuspensas em 0,5 mL de tampão 5,0 mM Tris-HCl, e 0,5 mM KCl, pH 7,0. (Essas amostras foram identificadas por extratos 2a, 2o e 2s, respectivamente).

3.4 Eletroforese

As amostras (extrato 1, 2a, 2o e 2s) foram preparadas para a eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes. A eletroforese foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando-se nitrato de prata (Blum et al., 1987) para coloração das proteínas e um padrão de baixo peso molecular (2,5 – 45 KDa).

3.5 Preparação de proteolipossomo

A mistura de fosfolipídios foi dissolvida em clorofórmio, que foi removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio, formando um filme nas paredes do tubo. Estes filmes foram mantidos a vácuo por 1 hora, para garantir a completa remoção do solvente. Em seguida os filmes foram ressuspensos em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e C₁₂E₈ 10 mg/mL e deixados em banho à temperatura de 60°C durante uma hora com agitações a cada 10 minutos em Vortex. Posteriormente a mistura lipídio-detergente foi sonicada por 1 minuto, utilizando-se um sonicador de ponta (VibraCell VC-600) e deixada por 1 hora à temperatura ambiente.

Os proteolipossomos foram preparados pela co-solubilização de lipídios, proteína e detergente conforme descrito por Santos et al. (2005). A Na,K-ATPase solubilizada e purificada em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e C₁₂E₈ 0,005 mg/mL foi incubada com a mistura de lipídio-detergente por 10 minutos, em banho de gelo. O detergente foi então removido pela adição da resina Bio-Beads (200 mg/mL), em intervalos de 5, 10 e 45 minutos. A resina foi centrifugada em centrífuga clínica (FANEM – Excelsa Baby I, diâmetro = 15 cm) a 3.000 RPM por 10 minutos e finalmente, a suspensão de vesículas foi ultracentrifugada por 1 hora, a 100.000xg a 4°C.

As atividade ATPase e dosagem de proteína total, antes da ultracentrifugação bem como do sobrenadante e do pellet foram usadas para calcular a porcentagem de incorporação da Na,K-ATPase aos lipossomos.

3.6 Determinação da atividade ATPase

A atividade ATPase foi determinada descontinuamente, a 37°C, utilizando-se um espectrofotômetro Spectronic Modelo Genesis 2 (Milton Roy), pela dosagem do fosfato inorgânico liberado, em meio reacional HEPES 50 mM contendo ATP 3 mM, pH 7,5 e KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM e NaCl 50 mM em volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de enzima ao meio reacional e interrompida pela adição de solução gelada de TCA 30% (p/v), em tempos reacionais pré-estabelecidos (Santos et al., 2005).

Os tubos foram então colocados em banho de gelo para diminuir a hidrólise do ATP e imediatamente centrifugados por 10 minutos. Em seguida, foi efetuada a dosagem de fosfato, seguindo o método descrito por Heinomen e Lahti (1981). Em cada experimento foram incluídos controles sem a enzima para se estimar a hidrólise não

enzimática do substrato. As determinações foram feitas em duplicatas e tomando-se o cuidado para não hidrolisar mais que 5% de substrato. Uma unidade de enzima foi definida arbitrariamente como sendo 1 nmol de fosfato liberado por minuto, nas condições padrões do teste.

3.7 Espalhamento Dinâmico de Luz - DLS

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

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

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

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

D é o coeficiente de difusão das partículas,

q é o módulo do vetor de espalhamento

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

onde λ é o comprimento de onda da radiação e θ é o ângulo da luz coletada em relação ao feixe incidente.

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

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

onde K_B é a constante de Boltzmann

T é a temperatura (Kelvin)

η é a viscosidade do solvente

R_H é o raio hidrodinâmico, Santos e Castanho (1996)

Para a medida do diâmetro médio as amostras foram preparadas na concentração adequada para que a intensidade estivesse dentro da faixa requerida pelo equipamento (entre 5×10^4 e 1×10^6 cps).

3.8 Calorimetria Diferencial de Varredura - DSC

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

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

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

proporcional à energia envolvida na reação.

Para proteínas, um pico de absorção de calor é frequentemente observado no varrimento de temperatura referente à desnaturação, esse gráfico é denominado termograma. Após a correção da linha de base e a normalização da concentração de proteína, a curva pode ser integrada fornecendo o valor de variação de entalpia para o processo (ΔH) (Equação 1). A temperatura de transição (*melting*) (T_m) também é determinada.

$$\Delta H = \int_{T_i}^T C_p.dT \quad \text{Equação 4}$$

A análise dos dados foi feita pelo software CpCalc fornecido pela CSC (Calorimetry Sciences Corporation).

3.9 Titulação Isotérmica Calorimétrica - ITC

Os experimentos de ITC foram realizados empregando-se um equipamento Nano ITC Series III da Calorimetry Sciences Corporation.

Para realizar as titulações foi feito um número adequado de injeções de um determinado volume da solução titulante em solução contendo a amostra de proteína ou tampão, dependendo do experimento, com intervalos predeterminados entre as injeções. Utilizou-se água Milli-Q como referência e velocidade de agitação de 250 RPM a uma temperatura de 25°C ou 37°C. O volume da célula é de 914 μL .

3.10 Ultracentrifugação Analítica - AUC

O experimento foi realizado no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do LNBio- CNPEM em Campinas, SP, com a orientação do Prof. Dr. Júlio César Borges do Instituto de Química de São Carlos (USP).

A proteína solubilizada e purificada de acordo com o item 1 foi submetida aos experimentos de velocidade de sedimentação em diferentes concentrações. A ultracentrífuga analítica utilizada foi da Beckman Coulter e rotor foi o AN50-TI. A temperatura foi de 13 ou 20°C, o comprimento de onda de 288 nm e o número de aquisições igual a 100. Os dados de velocidade de sedimentação foram analisados pelo programa SedFit versão 11.2.

3.11 Análise dos dados cinéticos

Os parâmetros cinéticos Velocidade máxima (V_m), coeficiente de Hill (n), constante de Michaelis Menten (K_m) da hidrólise do substrato foram determinados pelo ajuste de Hill no programa Origin 8.0.

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Isolamento da subunidade gama:

Proteínas que contém o motivo FXYD formam uma classe de pequenas proteínas de membrana. Pelo menos cinco dos setes membros dessa família: FXYD1 (fosfoleman), FXYD2 (subunidade gama da Na,K-ATPase), FXYD3 (Mat-8), FXYD4 (CHIF) e FXYD7 são subunidades auxiliares e regulam a atividade da Na,K-ATPase de maneira específica dependendo do tecido e da isoforma presente (Geering, 2006).

Sabe-se que a subunidade gama aumenta a afinidade da Na,K-ATPase por íons K^+ num alto potencial negativo de membrana tanto na ausência quanto na presença de Na^+ extracelular. Mas por outro lado, a FXYD2 diminui a afinidade aparente pelo K^+ em potencial de membrana menor, mas somente na presença de Na^+ extracelular (Béguin et al., 2001). Outros autores descreveram que FXYD2 também aumenta a afinidade pelo ATP (Therien et al., 1997).

Neste projeto, foram realizadas tentativas de extração da subunidade gama (FXYD2) baseando-se no trabalho descrito por Fontes et al. (1999).

A obtenção da Na,K-ATPase de rim de coelho no nosso laboratório é feita de maneira diferente desse grupo. Sendo assim, algumas alterações no procedimento foram necessárias, a fim de obter uma melhor recuperação da proteína.

A subunidade gama foi extraída com clorofórmio-metanol como descrito em Materiais e Métodos (item 3.3). Após essa extração a proteína encontra-se provavelmente misturada com os lipídeos da membrana. Então, foi necessária outra etapa de purificação. Sabe-se que a subunidade gama é precipitada seletivamente em éter etílico gelado, enquanto lipídeos neutros e fosfolipídeos permanecem em solução (Cortes et al., 2006), sendo assim, uma extração com éter foi realizada.

As etapas da extração foram acompanhadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de SDS (Figuras 3 e 4).

1ª etapa:

Após a extração com clorofórmio-metanol, a amostra foi tratada e aplicada em gel de eletroforese:

Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes do extrato 1 obtido após extração com Clorofórmio/Metanol, descrito em Materiais e Métodos (3.3 e 3.4).

2ª etapa:

Após a precipitação seletiva com éter etílico:

Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes do extrato 2s após extração com éter etílico, descrito em Materiais e Métodos (3.3 e 3.4).

Após a extração com clorofórmio-metanol, várias bandas são visualizadas no gel de eletroforese (Figura 3). Uma banda mais escura, indicando uma concentração maior de proteína com um baixo peso molecular de 14 kDa, é observada. Essa banda obtida corresponde provavelmente à proteína gama, descrita na literatura com um peso molecular de 6 – 12 kDa (Fontes et al., 1999).

Realizando a extração com éter, os três extratos obtidos (2a, 2o e 2s) também foram aplicados em gel de eletroforese. Apareceram bandas apenas no extrato 2s (pellet) e a banda escura vista anteriormente foi mantida, indicando que a subunidade foi precipitada (Figura 4). Outras bandas mais claras entre 14 e 20 kDa apareceram, indicando a presença de outras proteínas, porém com concentrações menores.

A atividade da enzima foi medida. Para o controle positivo a atividade da enzima foi determinada na ausência dos extratos. Para as medidas na presença dos extratos obtidos (Figura 5), 30 µL da solução desses foram adicionados ao meio reacional e a atividade enzimática foi medida como descrita em Materiais e Métodos, item 3.6.

Observa-se que na presença do extrato 1 houve um aumento da atividade de 14%, e na presença dos extratos 2a e 2s o aumento foi de 6 e 10% respectivamente, e na presença do extrato 2o, houve uma queda de 5%. Outro controle, acrescentando somente os extratos ao meio reacional, na ausência da Na,K-ATPase solubilizada também foi feito e o resultado foi uma atividade nula (controle negativo).

Figura 5. Atividade enzimática somente do extrato contendo a proteína gama (controle negativo), da Na,K-ATPase solubilizada e purificada (controle positivo) e da Na,K-ATPase solubilizada e purificada na presença dos extratos 1, 2a, 2o e 2s. Os valores são a média $\pm$ SD de três determinações.

Esses resultados indicam que o extrato obtido (2s) deve conter a proteína FXVD2 (subunidade γ), visto que foi observado um peso molecular baixo e correspondente a essa proteína no gel de eletroforese e a sua presença alterou a atividade da enzima. No entanto, era esperado que somente o extrato 1 e o 2s alterassem a atividade enzimática da proteína, já que para os demais extratos não foi observada nenhuma banda em gel de eletroforese. O que pode ter acontecido é que nos extratos 2a e 2o poderiam conter também a proteína gama, no entanto numa concentração baixa e que não foi detectada no gel de eletroforese, mas suficiente para alterar a atividade enzimática da Na,K-ATPase.

Uma vez obtida a subunidade gama (extrato 2s), experimentos de estabilidade por calorimetria foram realizados para analisar a influência dessa subunidade na estrutura da Na,K-ATPase como descrito a seguir.

4.2 Estabilidade térmica da Na,K-ATPase

O perfil de capacidade térmica de um sistema macromolecular passando por um processo induzido pelo aumento da temperatura (por exemplo: desnaturação de proteína) é caracterizado pela presença de um ou mais picos na faixa de temperatura da transição. A variação da entalpia (ΔH) associada com a desnaturação é a área sob a curva (Freire et al., 1990).

Após a extração da subunidade gama, alguns testes de estabilidade térmica, utilizando a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foram realizados com a finalidade de averiguar a influência da proteína gama na estabilidade da estrutura da NKA como um todo. Como controle, foi determinado o perfil de desnaturação térmica da amostra de fração de membrana contendo a NKA (material de partida), bem como da

proteína após a solubilização com detergente. Além disso, foi feita uma tripsinização da fração de membrana para auxílio na análise dos resultados como discutido a seguir:

4.2.1 Fração de membrana

A Figura 6 mostra o perfil de capacidade térmica da fração de membrana, rica em Na,K-ATPase extraída da medula interna de rim de coelho. A deconvolução da curva indica uma desnaturação ocorrendo em cinco passos. As temperaturas de transição (T_t) foram de 47,9; 52,9; 57,7; 62,9 e 69,0°C, respectivamente e $T_m \approx 58^\circ\text{C}$ (Tabela 1), onde T_m é a média das temperaturas de transição. Outros grupos descreveram valores próximos. As temperaturas obtidas para a fração de membrana extraída de rim de porco foram 47,5; 54,3 e 58,4°C, respectivamente ($T_m \approx 53^\circ\text{C}$) (Grinberg et al., 2001). Fodor et al. (2008) descreveram quatro temperaturas de transição (33,2; 41,5; 45,1 e 50,2°C – $T_m \approx 44^\circ\text{C}$) para a fração de membrana extraída da glândula de sal de tubarão e cinco temperaturas (49,0; 52,7; 54,6; 62,7 e 70,1°C – $T_m \approx 54^\circ\text{C}$) para a fração de membrana extraída de rim de porco.

Uma segunda varredura da amostra revelou que o processo de desnaturação temperatura-induzido é irreversível, já que nenhum pico foi visualizado na segunda coleta do termograma.

A NKA compreende domínios que são expostos no meio aquoso e outros que estão em contato com os lipídios da membrana. Sabe-se que a desnaturação térmica de proteínas de membrana e proteínas solúveis se difere devido ao ambiente distinto das duas classes (Haltia e Freire, 1995; Donnet et al., 2001).

A variação de entalpia total (ΔH_t) cerca de 500 kcal/mol (Tabela 2) obtida é menor que o valor esperado para a variação de entalpia da desnaturação de uma proteína globular pequena. Isso indica que as hélices transmembrana provavelmente retém a

maior parte, se não toda a sua estrutura secundária e que somente uma parte da proteína sofre perda de estrutura, e é muito provável que sejam domínios cooperativos situados fora da membrana.

Tabela 1. Temperaturas de desnaturação (T_i) dos i-domínios ($i= 1-5$) da proteína em diferentes condições

	T1 (°C)	T2 (°C)	T3 (°C)	T4 (°C)	T5(°C)
FM	47,9	52,9	57,7	62,9	69,0
FM digerida	-	50,8	57,2	64,0	-
PS sem K^+	-	-	52,2	57,8	66,9
PS com K^+	-	-	55,0	62,7	69,5
PS com Na^+	-	-	54,3	61,7	68,8
PS com γ/K^+	48,4	-	56,8	62,8	69,2
PS + ATP/ K^+	-	-	54,2	61,9	69,8
PS + lipídio	-	-	54,8	64,3	71,9

FM: fração de membrana rica em Na,K-ATPase

PS: proteína solubilizada

Tabela 2. Variação de entalpia da desnaturação (ΔH_i) dos i-domínios ($i= 1-5$) da proteína em diferentes condições

	$\Delta H1$ (kcal/mol)	$\Delta H2$ (kcal/mol)	$\Delta H3$ (kcal/mol)	$\Delta H4$ (kcal/mol)	$\Delta H5$ (kcal/mol)	ΔHt (kcal/mol)
FM	65	114	207	109	18	513
FM digerida	-	24	136	40	-	200
PS sem K^+	-	-	12	99	21	131
PS com K^+	-	-	18	176	51	245
PS com Na^+	-	-	23	64	18	105
PS com γ/K^+	43	-	177	126	48	394
PS + ATP/ K^+	-	-	57	106	83	246
PS + lipídio	-	-	180	217	41	438

FM: fração de membrana rica em Na,K-ATPase

PS: proteína solubilizada

O valor de ΔH encontrado para a desnaturação térmica da fração de membrana rica em Na,K-ATPase (513 kcal/mol, Tabela 2) está relativamente próximo aos valores reportados por outros grupos ~ 420 kcal/mol (Grinberg et al., 2001) e ~ 690 kcal/mol (Fodor et al., 2008). A diferença se deve à utilização de fontes de proteína, método de preparação e condições do meio diferentes.

Na tentativa de identificação das transições, uma digestão seletiva da fração de membrana com tripsina foi conduzida. A região exposta da subunidade α é atacada enquanto a subunidade β e a porção intramembrana permanecem intactas (Grinberg et al., 2001; Popot e Engelman, 1990).

A comparação entre a endoterma da fração de membrana intacta e a amostra digerida revelou que somente a parte central da curva é mantida com temperatura de transição de 57°C , enquanto a primeira (T1) e a última (T5) transições desaparecem (Figura 7). Além disso, o valor de ΔH é reduzido para menos que a metade do valor inicial (Tabela 2).

Grinberg et al. (2001) identificaram uma transição intermediária da amostra tripsinizada e atribuíram à subunidade β . No presente trabalho a região central do pico é mantida após a proteólise, sugerindo que esta também possa ser associada à subunidade β .

Infelizmente não é possível identificar qual domínio perde sua estrutura em determinada temperatura, nem que tipo de alteração conformacional ocorre com o aumento de temperatura. No entanto, conclui-se que o começo e o fim do processo de desnaturação podem ser atribuídos à parte extracelular da subunidade α .

Figura 6. Capacidade calorífica vs. Temperatura da amostra contendo a fração de membrana rica em Na,K-ATPase extraída de rim de coelho (concentração de proteína = 1,52 mg/mL), após a subtração da linha de base. As linhas pontilhadas representam a melhor deconvolução da curva. A proteína está em tampão imidazol 20 mM, pH 6,8 contendo 250 mM de sacarose, 6 mM de EDTA e 6 mM de Tris.

Figura 7. Excesso de capacidade calorífica da fração de membrana rica em Na,K-ATPase tripsinizada (concentração de proteína = 0,48 mg/mL) , após a subtração da linha de base. As linhas pontilhadas representam a melhor deconvolução da curva. A proteína está em tampão imidazol 20 mM, pH 6,8 contendo 250 mM de sacarose, 6 mM de EDTA e 6 mM de Tris.

4.2.2 Na,K-ATPase solubilizada: efeito da solubilização e adição da subunidade gama

A maioria dos estudos são realizados com a Na,K-ATPase inserida na membrana (fração de membrana). Entretanto, a solubilização da proteína é necessária para algumas técnicas bioquímicas e biofísicas. Portanto, é muito importante manter a proteína em um estado funcional após a solubilização com moléculas de detergente para o estudo *in vitro* (Privé, 2007).

A NKA foi removida de seu ambiente natural pela utilização do detergente C₁₂E₈, que foi seguida por uma purificação em apenas um passo cromatográfico como descrito em Santos et al. (2002).

O perfil de desnaturação térmica para a proteína solubilizada, na presença de íons K⁺, é mostrado na Figura 8. A desnaturação dessa amostra se inicia em uma temperatura mais alta quando comparada com a fração de membrana rica em NKA. Além disso, a deconvolução evidencia somente três picos em 55,0; 62,7 e 69,5°C (Tabela 1) e a ΔH_t é menor (245 kcal/mol, Tabela 2).

A desnaturação térmica dos domínios 1 ($T_t = 47,9^\circ\text{C}$) e 2 ($T_t = 52,9^\circ\text{C}$) não é mais visualizada após a solubilização. Isso acontece provavelmente porque o processo de solubilização provoca o desenovelamento dessas estruturas, embora a enzima solubilizada e purificada retenha atividade catalítica (~ 60%). Isso indica que estas estruturas não são primordiais para a atividade da NKA.

O microambiente em torno da NKA pode promover essa diferença na desnaturação térmica da fração de membrana e da NKA solubilizada. A substituição dos lipídios endógenos da membrana pelas moléculas de C₁₂E₈ e a perda da subunidade gama durante o processo de solubilização podem determinar a diferença observada nas endotermas.

Figura 8. Excesso de capacidade calorífica da Na,K-ATPase solubilizada (concentração de proteína = 1,34 mg/mL), após a subtração da linha de base. As linhas pontilhadas representam a melhor deconvolução da curva. A proteína está em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0, contendo 15 mM de KCl, 6mM de EDTA e 0,005 mg/mL de C₁₂E₈.

Nenhuma banda correspondente à subunidade γ é visualizada no gel de eletroforese da NKA solubilizada, já que essa subunidade é provavelmente perdida durante o processo de solubilização/purificação.

A subunidade γ ou FXYD2 pertence à família das proteínas FXYD. Não é essencial para a função da NKA, mas modula as propriedades cinéticas da enzima. Há sete pequenas proteínas pertencentes a essa família. São expressas e associadas à NKA de uma maneira tecido-específica (Mishra et al., 2011).

FXYD2 ou subunidade γ tem duas variações (FXYD2a e FXYD2b) que são principalmente expressas no segmento grosso do ramo ascendente do rim. A interação com a FXYD2a e FXYD2b afeta a afinidade aparente da NKA pelos íons K^+ extracelular e diminui a afinidade aparente da NKA pelos íons Na^+ (Geering, 2006).

Sabe-se também que a subunidade γ aumenta a termoestabilidade da NKA (Jones et al., 2005; Mishra et al., 2011).

A proteína FXYD2 foi extraída como descrito no item 3.3 e incubada com a amostra de NKA solubilizada, que levou a um aumento da atividade enzimática. O perfil de capacidade calorífica dessa amostra é exibido na Figura 9. A endoterma pode ser separada em quatro componentes. Um pico abaixo de $55^{\circ}C$ aparece. Mais especificamente em $48,4^{\circ}C$. Os outros picos observados para a proteína solubilizada na ausência da subunidade γ são mantidos.

A comparação entre os termogramas da fração de membrana rica em NKA, da proteína solubilizada na ausência e na presença da subunidade γ evidencia que a proteína FXYD2 está provavelmente envolvida no passo inicial da desnaturação térmica.

Após aquecer a NKA a $55^{\circ}C$, Donnet et al. (2001) mostraram que três segmentos transmembrana ($\alpha M8 - \alpha M10$) e a parte C-terminal da subunidade α são

expulsas para fora da membrana, enquanto que o restante da subunidade α mantém a sua topologia normal com respeito à bicamada lipídica. Tendo em mente que a estrutura cristalina revelou que a subunidade γ mantém contato com a hélice $\alpha M9$ (Shinoda et al., 2009), espera-se que a presença da subunidade γ tenha influência no início da desnaturação térmica que ocorre até 55°C.

Os resultados de DSC mostraram que a desnaturação se inicia por volta de 48°C. Essa transição é afetada pela presença da subunidade γ . A parte da estrutura da enzima (domínio 1) que seria estabilizada por γ pode estar desenovelada na sua ausência. O primeiro passo da desnaturação térmica deve estar relacionado à porção proteica próxima de $\alpha M9$. Esse resultado mostra que a estrutura do domínio 1 que foi perdida (ou o processo que ocorre na temperatura próxima de 48°C) é provavelmente recuperada pela presença da subunidade γ . Isso mostra um papel da subunidade γ na estrutura total da NKA em adição à sua função reguladora.

Figura 9. Excesso de capacidade calorífica da Na,K-ATPase solubilizada após incubação com o extrato contendo a subunidade gama (concentração de proteína = 1,20 mg/mL), após a subtração da linha de base. As linhas pontilhadas representam a melhor deconvolução da curva. A proteína está em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0, contendo 15 mM de KCl, 6mM de EDTA e 0,005 mg/mL de $C_{12}E_8$.

4.2.3 *Na,K-ATPase solubilizada em diferentes concentrações de detergente*

A expressão e purificação em quantidades suficientes de proteína de membrana são dificultadas por sua natureza hidrofóbica inerente. Este tipo de proteína é imersa na bicamada lipídica, que é um ambiente complexo, heterogêneo e dinâmico, mesmo nos organismos mais simples.

Essas proteínas têm uma forte tendência em se agregar quando são removidas do seu ambiente natural. O uso de detergentes é então essencial para manter a proteína em um estado funcional na ausência do seu ambiente nativo. Embora seja um sistema simples, a interação entre a proteína de membrana e as moléculas de detergente ou lipídios (lipossomo) mimetiza a interação com a membrana natural. Em princípio é necessário utilizar esse sistema mais simples para obter informações suficientes antes de atingir um sistema mais complexo e mais próximo do real (Seddon et al., 2004; Privé, 2007; Harris e Booth, 2012; Ciancaglini et al., 2012).

C₁₂E₈ tem sido utilizado com sucesso na solubilização da NKA e foi utilizado na cristalização da proteína (Morth et al., 2007).

Os experimentos de calorimetria foram realizados com a finalidade de verificar a influência da razão molar detergente/proteína (D/P) na estabilidade térmica da NKA.

A proteína é mantida solubilizada em uma concentração de C₁₂E₈ igual a 0,005 mg/mL, que está abaixo da concentração micelar crítica (CMC = 0,053 mg/mL, determinada no tampão de trabalho).

Os termogramas da NKA solubilizada, nas concentrações de C₁₂E₈ abaixo, acima e na CMC podem ser vistos na Figura 10 e os valores de temperatura de transição e variação de entalpia na Tabela 3.

Figura 10. Excesso de capacidade calorífica da Na,K-ATPase solubilizada (concentração de proteína = 1,71 mg/mL), após a subtração da linha de base. As linhas pontilhadas representam a melhor deconvolução da curva. A proteína está em tampão Tris-HCl 5mM, pH 7,0, contendo 15 mM de KCl, 6mM de EDTA em diferentes razão molar Detergente/Proteína: A-1,72 (0,005 mg/mL $C_{12}E_8$), B-17,2 (0,05 mg/mL $C_{12}E_8$), C-34,4 (0,10 mg/mL $C_{12}E_8$), D-172 (0,50 mg/mL $C_{12}E_8$), E-344 (1,0 mg/mL $C_{12}E_8$), F-1700 (5,0 mg/mL $C_{12}E_8$), G-3400 (10 mg/mL $C_{12}E_8$).

Tabela 3. Temperatura de desnaturação (Ti) e variação de entalpia de desnaturação (ΔH_i) dos i-domínios (i= 3-5) da proteína solubilizada em diferentes razões molar Detergente/Proteína

Razão molar D/P	T3 (°C)	T4 (°C)	T5 (°C)	ΔH_3 (kcal/mol)	ΔH_4 (kcal/mol)	ΔH_5 (kcal/mol)	ΔH_t (kcal/mol)
1,72	55,0	62,7	69,5	18	176	51	245
17,2	55,2	61,8	68,5	37	167	51	255
34,4	55,4	61,8	68,5	39	167	79	285
172	54,1	62,0	67,9	23	215	28	266
344	54,4	61,0	67,7	66	81	54	201
1700	-	60,4	65,3	-	33	119	152
3400	-	63,0	65,7	-	17	49	66

As mesmas três transições são observadas para todas as razões até D/P = 344.

Em altas concentrações de detergente, a forma da curva é alterada, indicando que a quantidade de $C_{12}E_8$ influencia diretamente na estabilidade térmica da NKA. Alta concentração de detergente provoca a eliminação da transição em 55°C e diminui a atividade enzimática (Figura 10 F, G e 11).

Figura 11. Atividade enzimática relativa da Na,K-ATPase solubilizada em diferentes razões Detergente/Proteína. Os ensaios foram feitos em tampão 50 mM HEPES, pH 7,5, contendo 3 mM de ATP, 5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de KCl e 50 mM de NaCl. 100% é a atividade da enzima solubilizada em 0,005 mg/mL de $C_{12}E_8$ ($D/P = 1,72$). Os valores são a média $\pm$ SD de três determinações.

Uma amostra de detergente pura foi aquecida no calorímetro para controle. Apareceu um pico em torno de 80°C, que está fora da faixa de desnaturação da NKA.

Um trabalho em colaboração com o grupo do Instituto de Física – USP (São Paulo) realizou o espalhamento de raios-X em baixo ângulo da amostra de NKA solubilizada em diferentes concentrações de detergente. Os resultados mostraram que alta concentração de C₁₂E₈ induz a dissociação do oligômero ($\alpha\beta$)_n em protômero ($\alpha\beta$) e até a separação das subunidades ($\alpha + \beta$) em condições extremas. Após a separação a subunidade α se associa em α_4 (Barbosa et al., 2010).

A atividade enzimática atingiu um máximo para determinada quantidade de C₁₂E₈ (D/P = 172). Portanto, deve haver uma proporção adequada de surfactante para manter a NKA num estado ativo e que não seja alta suficiente para induzir a separação das subunidades. A área do pico intermediário alcança um máximo para essa concentração de detergente (Tabela 3), que se deve ao fato de que há uma maior estabilização e consequentemente uma maior atividade enzimática.

Outra evidência é que há atividade enzimática quando as três transições são observadas no termograma. Quando a primeira transição em 55°C desaparece, a atividade catalítica não é mais detectada (Figuras 10 A – E, 11).

Um trabalho anterior realizado por nosso grupo mostrou por CD (Dicroísmo Circular) que 28-40% da estrutura secundária são perdidos em 55°C. Além disso, a estrutura secundária é alterada quando a razão molar D/P varia de 7,5 a 1500 (Rigos et al., 2008). Considerando que a enzima perde sua atividade em ambos os casos (por aquecimento a 55°C e aumentando a razão D/P) pode-se concluir que essa perda de estrutura secundária é suficiente para desestabilizar a interação entre as subunidades, provocando a sua separação.

Pode-se especular se a perda da atividade enzimática é consequência de alguma perda estrutural causada pela presença do detergente ou da separação das subunidades. Essa consideração é baseada no fato de que o complexo $\alpha\beta$ é necessário para a função da NKA.

A inativação pode ser consequência da perda de alguma estrutura (ou alteração conformacional) que é necessária para a atividade da NKA. Alta concentração de $C_{12}E_8$ leva à inativação via uma desnaturação química que ocorreria termicamente a 55°C . O que se pode concluir é que essa parte estrutural tem uma função primordial para a função da NKA. Este resultado está de acordo com os encontrados por Miles et al. (2011), que descreveram que a região do sítio ativo deve ser a primeira estrutura a se desenovelar. No presente trabalho, a transição observada para a NKA solubilizada em 55°C deve estar relacionada com o desenovelamento da estrutura que contem o sítio ativo.

4.2.4 Na,K-ATPase solubilizada: efeito dos íons Na^+ e ATP

Como discutido na Introdução, o ciclo de reação da NKA envolve a transição entre duas conformações principais. A presença dos íons Na^+ e K^+ induz as conformações E1 e E2, respectivamente.

Na Introdução também foi ressaltada a dificuldade em obter as estruturas cristalinas da NKA, portanto, técnicas que possam diferenciar as conformações, mesmo que indiretamente, são bastante válidas no estudo da bomba de sódio e potássio.

A solubilização da fração de membrana rica em NKA é realizada na presença de íons K^+ . Sabe-se que a presença desses íons estabiliza a proteína (Jorgensen e Andersen, 1986; Donnet et al., 2001).

Uma amostra de NKA solubilizada foi dialisada com o mesmo tampão de solubilização, mas na ausência de íons K^+ . O perfil de Capacidade Calorífica vs. Temperatura para essa amostra está representado na Figura 12. Na ausência de K^+ as temperaturas de desnaturação térmica são menores que as temperaturas da amostra na presença de K^+ . Essa diminuição alcança até $5^{\circ}C$ para o segundo pico, confirmando o efeito protetor dos íons potássio (Tabelas 1 e 2).

O trabalho de Kaufman e colaboradores (2012) mostrou um efeito oposto dos íons Na^+ e K^+ na termoestabilidade da NKA, utilizando as técnicas de fluorescência e CD. Esses autores mostraram que enquanto íons K^+ estabilizam, os íons Na^+ diminui a estabilidade da NKA.

Figura 12. Excesso de capacidade calorífica da Na,K-ATPase solubilizada (ausência de K^+ , concentração de proteína = 1,50 mg/mL), após a subtração da linha de base. As linhas pontilhadas representam a melhor deconvolução da curva. A proteína está em tampão Tris-HCl 5mM, pH 7,0, contendo 6mM de EDTA e 0,005 mg/mL C_{12}E_8 .

No presente trabalho, a adição de íons Na^+ , na presença de Pi , alterou o perfil da curva (Figura 13). As temperaturas de transição são menores quando comparada com a amostra na presença de K^+ . A variação de entalpia também é menor (Tabela 2), o que mostra uma maior labilidade da proteína na conformação E1, quando comparada com a conformação E2. Os valores de T_t (Tabela 1) mostram que a ligação dos íons K^+ aumenta a estabilidade térmica da NKA.

Sabemos que a conformação E1 é diferente da E2. Pelas endotermas obtidas em cada situação, conclui-se que essa diferença foi suficiente para alterar a termoestabilidade da proteína (Figura 13 e 8).

Quando se adicionou ATP à amostra de proteína solubilizada na presença de K^+ , as temperaturas de transição (Tabela 1) nem o valor ΔH_t (Tabela 2) foram alterados significativamente, mas a forma da curva foi claramente modificada como se observa na Figura 14. Os picos se tornam mais bem definidos, ou seja, com uma menor dependência entre eles. A adição de ATP à forma $\text{E2}(2\text{K}^+)$ da NKA induz a separação dos domínios citoplasmáticos para a liberação dos íons K^+ . No esquema da Figura 1, essa transição está marcada pela passagem do estado 5 para o 6. O afastamento entre os domínios citoplasmáticos provoca uma cooperatividade menor, que é refletida na endoterma de desnaturação térmica. Isso reforça que os estados fechado e aberto possuem conformações diferentes, e essa diferença é suficiente para promover estabilidades térmicas diferentes.

Figura 13. Excesso de capacidade calorífica da Na,K-ATPase solubilizada (concentração de proteína = 1,50 mg/mL), após a subtração da linha de base. As linhas pontilhadas representam a melhor deconvolução da curva. A proteína está em tampão Tris-HCl 5mM, pH 7,0, contendo 15mM de NaCl, 6mM de EDTA e 0,005 mg/mL $C_{12}E_8$.

Figura 14. Excesso de capacidade calorífica da Na,K-ATPase solubilizada (concentração de proteína = 1,22 mg/mL), após a subtração da linha de base. As linhas pontilhadas representam a melhor deconvolução da curva. A proteína está em tampão Tris-HCl 5mM, pH 7,0, contendo 15mM de KCl, 3mM de ATP, 6mM de EDTA e 0,005 mg/mL $C_{12}E_8$.

4.2.5 *Proteolipossomo*

Com o método de preparação de proteolipossomos bem estabelecido pelo nosso grupo, estudos de influência da bicamada lipídica na estabilidade e atividade catalítica da Na,K-ATPase foram possíveis (Santos et al., 2005; Santos et al., 2006; Rigos et al., 2006; Rigos et al., 2010; Yoneda et al., 2013).

Pela análise calorimétrica de um proteolipossomo formado por DPPC, DPPE e NKA foi possível determinar a diferença na estabilidade da NKA solubilizada e incorporada em sistema mimético de membrana. O perfil para o proteolipossomo é também dividido em três picos (Figura 15). A primeira transição (T3) é mantida em 55°C, enquanto que T4 e T5 aumentam em 2°C comparando com a enzima solubilizada (Tabela 1). A variação de entalpia total é quase que o dobro na presença dos lipídios (Tabela 2). A elevação em T4 e T5 (Tabela 1) indica uma proteção dos lipídios principalmente no segundo e terceiro domínios. No entanto, se é feita a análise dos valores de ΔH , nota-se que ΔH_3 é aumentando em quase dez vezes (Tabela 2).

Figura 15. Excesso de capacidade calorífica da Na,K-ATPase reconstituída em lipossomo de DPPC/DPPE após a subtração da linha de base (concentração de proteína = 0,48 mg/mL). As linhas pontilhadas representam a melhor deconvolução da curva. A amostra de proteolipossomo está em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0, contendo 15 mM de KCl e 6 mM de EDTA.

Quando se compara com a proteína solubilizada, o resultado para o proteolipossomo revela um valor de ΔH_t maior (Tabela 2), e que é ligeiramente menor que o valor de ΔH para a fração de membrana rica em NKA. Portanto, isso mostra que os lipídios protegem contra a desnaturação térmica, mas que o ambiente natural com a ligação de lipídios específicos é importante na estabilidade da proteína.

4.2.6 Comparação dos resultados de DSC

Utilizando a Calorimetria Diferencial de Varredura foi possível realizar uma comparação quantitativa da estabilidade da NKA em diferentes condições. A Figura 16 mostra a comparação da variação de entalpia total da desnaturação térmica da NKA em todas as circunstâncias estudadas. As Tabelas 1 e 2 mostram que cada fator estudado influencia diferentemente na desnaturação térmica dos domínios. Isso sugere que os fatores analisados se interagem e têm efeito na estabilidade de diferentes partes estruturais da NKA.

Figura 16. Variação de entalpia total da desnaturação térmica da Na,K-ATPase em diferentes condições. FM: Fração de membrana rica em Na,K-ATPase, PS+K: Proteína solubilizada na presença de íons K^+ , PS-K: Proteína solubilizada na ausência de íons K^+ , PS+Na: Proteína solubilizada na presença de íons Na^+ , PS+K+ γ : Proteína solubilizada na presença de íons K^+ e subunidade γ . PS+K+ATP: Proteína solubilizada na presença de íons K^+ e ATP. PS+lipídio: amostra de proteolipossomo.

4.3 Investigação da cinética enzimática da Na,K-ATPase por Calorimetria de Titulação Isotérmica

Estudos de cinética enzimática estão entre os procedimentos mais importantes em bioquímica. A velocidade com que uma enzima catalisa uma reação é tradicionalmente medida por uma variedade de métodos incluindo espectroscopia, medidas potenciométricas e cromatografia. Entretanto, cada método deve ser desenvolvido para reações enzimáticas específicas. Além disso, o uso de métodos espectrais para medida em soluções concentradas é limitado devido ao espalhamento e/ou absorção de luz. O uso da calorimetria para medir a velocidade de reações enzimáticas tem sido bastante útil. Sabendo que praticamente todas as reações consomem ou produzem calor, a atividade enzimática pode ser monitorada em tempo real sem a necessidade de sondas, substratos análogos ou enzimas acopladas (Olsen, 2006).

Sabe-se que o maior consumidor de energia em células animais é a Na,K-ATPase. Em humanos é estimado que de um quarto a um terço de toda energia em forma de ATP disponível é consumido por essa enzima. Muito dessa energia é utilizada para criar os gradientes de Na^+ e K^+ essenciais para as funções descritas anteriormente na Introdução. Entretanto, a catálise da hidrólise do ATP pela Na,K-ATPase em células não é 100% termodinamicamente eficiente, ou seja, nem toda energia liberada pela hidrólise do ATP é convertida em bombeamento de íons. Parte dessa energia é liberada como calor (Noske et al., 2010).

Fisiologicamente, o calor liberado pela Na,K-ATPase contribui para a manutenção da temperatura corporal. De fato, diferenças na atividade da bomba têm sido publicadas para explicar, em parte, a diferença da temperatura entre animais ecto e endotérmicos (Else et al., 1996, Turner et al., 2005; Noske et al., 2010).

Além disso, do ponto de vista experimental, a liberação de calor da proteína pode ser bastante útil, já que o calor representa o sinal de atividade enzimática. E isso proporciona a possibilidade de determinar os parâmetros cinéticos a partir do sinal calorimétrico (Noske et al., 2010).

Há somente dois trabalhos na literatura, utilizando a calorimetria com propósitos cinéticos para a Na,K-ATPase (Li et al., 2004 e Noske et al., 2010). No atual projeto, utilizou-se a calorimetria para o estudo de cinética enzimática da bomba de sódio e potássio, visto as vantagens que esse método possui. Diferentemente dos métodos colorimétricos, pode-se medir a atividade enzimática de soluções concentradas. Isso é particularmente útil para a Na,K-ATPase, já que essa proteína pode estar em estados oligoméricos diferentes dependendo da concentração e consequentemente alterar o seu comportamento cinético.

Dois métodos foram utilizados para determinações cinéticas usando a titulação isotérmica calorimétrica (ITC), baseados na proporcionalidade entre a velocidade de reação e a potência térmica gerada: 1: Injeção simples. 2: Múltiplas injeções (a enzima é titulada com quantidades crescentes de substrato).

4.3.1 Injeção simples

Inicialmente, realizou-se a determinação dos parâmetros cinéticos pelo método de injeção simples.

Determinou-se o valor da variação de entalpia para a reação. Para isso, o meio reacional foi colocado na célula e após a estabilização da linha de base, a enzima foi adicionada e a potência térmica gerada foi acompanhada. Para descontar o calor de diluição, outro teste foi feito, adicionando solução tampão no lugar da solução de proteína, gerando o calor de diluição. O valor da variação de entalpia da reação é dado pela área sob a curva. Realizou-se a integração da curva (utilizando o programa OriginPro versão 8.0) do início até o fim da reação, quando o sinal retorna a linha de base (Figura 17). O mesmo foi feito para a diluição e o valor encontrado foi descontado.

Cálculo do valor de ΔH :

Área: 110094 μJ

Área diluição: 42039 μJ

Número de mol de ATP na célula: $9,14 \times 10^{-7}$ mol

$$\Delta H = (110094 - 42039) 10^{-6} / 9,14 \times 10^{-7} = 74,4 \text{ kJ/mol}$$

Para determinação dos parâmetros cinéticos, foram feitas adições de proteína ao meio reacional contendo diferentes concentrações iniciais de substrato (ATP) na célula do equipamento. As curvas geradas estão apresentadas na Figura 18.

Figura 17. Injeção de 30 μL de Na,K-ATPase solubilizada, na concentração de 8375 nM ($M_r = 160$ kDa), em meio reacional, contendo HEPES 50 mM, pH 7,4, contendo ATP 1 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM e NaCl 50 mM (—). Injeção de 30 μL de tampão de solubilização em meio reacional, contendo HEPES 50 mM, pH 7,4, contendo ATP 1 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM e NaCl 50 mM (—). O experimento foi conduzido a 37°C. O sinal voltado para cima representa uma reação exotérmica. Nesse caso, a diluição do tampão em meio reacional também foi exotérmica.

Figura 18. Injeção de 30 μL de Na,K-ATPase solubilizada, na concentração de 8375 nM ($M_r = 160$ kDa), em 914 μL de meio reacional, contendo HEPES 50 mM, pH 7,4, contendo KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM e NaCl 50 mM e ATP nas concentrações indicadas no gráfico. O experimento foi conduzido a 37°C. O sinal voltado para cima representa uma reação exotérmica.

Cálculo das velocidades:

O calor medido em função do tempo é definido como potência térmica:

$$\text{Potência} = dQ/dt \quad (\text{Equação 5})$$

A quantidade de calor associada com a conversão de n mols de substrato em produto é dada por:

$$Q = n \Delta H = [P] V \Delta H \quad (\text{Equação 6}),$$

onde V é o volume de solução na célula de reação, [P] é a concentração de produto gerado e ΔH é a variação de entalpia molar, determinada experimentalmente.

Portanto,

$$\text{Potência} = dQ/dt = d[P]/dt \cdot V \cdot \Delta H \quad (\text{Equação 7})$$

Rearranjando a equação temos:

$$\text{Velocidade} = d[P]/dt = dQ / V \cdot \Delta H \cdot dt \quad (\text{Equação 8})$$

O valor dQ/dt é obtido do gráfico como indicado na Figura 19. Com o valor do volume de célula (914 μL) e o valor de ΔH calculado anteriormente (74,4 kJ/mol) calcula-se os valores de velocidade.

Após os cálculos das velocidades, o gráfico Vel vs. [Substrato] é traçado para a determinação dos parâmetros cinéticos (Figura 20). Para esses cálculos, utilizou o valor de dQ/dt para tempo próximo de 10000 s.

Figura 19. Injeção de 30 μL de Na,K-ATPase solubilizada, na concentração de 8375 nM ($M_r = 160$ kDa), em 914 μL de meio reacional, contendo HEPES 50 mM, pH 7,4, contendo ATP 1 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM e NaCl 50 mM. O experimento foi conduzido a 37°C. O sinal voltado para cima representa uma reação exotérmica.

Figura 20. Velocidade de reação vs. Concentração inicial de ATP na célula obtidas pela titulação de Na,K-ATPase solubilizada em meio reacional, contendo HEPES 50 mM, pH 7,4, contendo KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM e NaCl 50 mM e ATP nas respectivas concentrações. O experimento foi conduzido a 37°C.

4.3.2 Injeções múltiplas

Determinou-se o valor da variação de entalpia para a reação. Para isso, a enzima foi colocada na célula em meio reacional e realizou a titulação com solução de ATP 4,6 mM. Deixou-se um tempo longo suficiente entre as injeções para que se alcançasse o fim da reação, fazendo com que o substrato fosse totalmente consumido e o sinal retornasse à linha de base. Foi realizada a próxima injeção, para poder confirmar a área (variação de entalpia) (Figura 21). Foi visto que a área dos picos permaneceu constante, o que indica que a síntese de ATP a partir dos produtos ADP e Pi não ocorre durante o experimento. Realizou também a injeção apenas de ATP em meio reacional, na ausência de proteína para descontar o valor da diluição (insert Figura 21).

Cálculo do valor de ΔH :

Área: 3177 μJ

Área diluição: 105 μJ

Número de mol de ATP na célula: $4,6 \times 10^{-8}$ mol

$$\Delta H = (3177 - 105) 10^{-6} / 4,6 \times 10^{-8} = 66,8 \text{ kJ/mol}$$

A amostra de enzima foi titulada com ATP após a estabilização da linha de base e a curva obtida está representada na Figura 22.

A adição de substrato causa uma diminuição da potência térmica do equipamento para manter as condições isotérmicas. A potência que permanece é devido à reação enzimática e se mantém constante enquanto a reação se processa em estado estacionário. A velocidade de calor gerada pela enzima é equivalente à diminuição da potência aplicada pelo calorímetro $(dQ/dt)_1$, indicado no gráfico em vermelho.

Figura 21. Uma série de injeções sequenciais de 10 μL de ATP (4,6 mM em tampão HEPES) foi feita em Na,K-ATPase solubilizada. A célula continha o meio reacional HEPES 50 mM, pH 7,4, contendo KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM e NaCl 50 mM e a concentração inicial de proteína era 470 nM. O intervalo entre as injeções foi de 40 minutos para que a reação se processasse por completo. A célula de referência foi preenchida com água. No insert está representado o calor de diluição, quando solução de ATP (4,6 mM) foi titulada na célula contendo meio reacional na ausência de Na,K-ATPase. A diluição do ATP foi exotérmica. O sinal estreito endotérmico é a diluição do tampão HEPES em meio reacional.

Figura 22. Uma série de injeções sequenciais de 10 μL de ATP (4,6 mM em tampão HEPES) foi feita em Na,K-ATPase solubilizada. A célula continha o meio reacional HEPES 50 mM, pH 7,4, contendo KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM e NaCl 50 mM e a concentração inicial de proteína era 470 nM. O intervalo entre as injeções foi de 10 minutos. A célula de referência foi preenchida com água. O sinal voltado para cima é devido à reação enzimática (exotérmico) e o sinal estreito endotérmico que aparece é a diluição do tampão HEPES em meio reacional.

Em seguida é realizada outra adição de substrato e, portanto, a quantidade de ATP na célula aumenta. Isso resulta em aumento na diminuição da potência térmica gerada devido ao aumento da velocidade de reação $(dQ/dt)_2$, indicado no gráfico em azul. E assim são feitas adições sucessivas até que o sinal não se modifica mais e a reação atinge a sua velocidade máxima.

No gráfico, o sentido para cima representa uma reação exotérmica. Portanto, o sinal que é voltado nesse sentido é devido à reação enzimática, que é exotérmica, ou seja, ocorre a liberação de calor e aumenta a temperatura da célula, fazendo com que o equipamento diminua a potência aplicada para manter as condições isotérmicas com a célula de referencia que foi preenchida com água.

Fez-se o cálculo das velocidades e obteve-se a curva Vel vs.[ATP] para a determinação dos parâmetros cinéticos (Figura 23).

Para determinar a quantidade de ATP remanescente em cada ponto a seguinte equação foi utilizada:

$$[ATP]_t = [ATP]_{t-1} + \Delta ATP - v_{t-1} \Delta t \quad \text{Equação 9}$$

Ou seja, calcula-se a quantidade de ATP que não foi consumida na injeção anterior e soma a quantidade adicionada, levando em consideração a diluição.

Essa reação foi feita para concentração de enzima igual a 0,075 mg/mL (ou 470 mM, considerando MM = 160 kDa).

Figura 23. Titulação de injeções múltiplas da Na,K-ATPase (470 nM) com ATP (4,6 mM). Velocidade *vs.* Concentração acumulativa de ATP (corrigida pela diluição e consumo pela enzima, conforme descrito na Equação 9).

Realizou-se a titulação com uma solução de enzima mais concentrada igual a 1,1 mg/mL ou 6875 nM, considerando MM = 160 kDa (Figura 24).

Observa-se o aumento da diferença de potência térmica gerada com as sucessivas injeções de ATP, indicando o aumento da velocidade de reação. Mas nesse caso, chega a um ponto que o sinal é reduzido. Isso deve ser explicado pela diminuição da velocidade de reação que se torna constante a partir desse ponto. Nesse estágio a velocidade alcança um valor máximo e devido à alta taxa de hidrólise de ATP, deve ter tido o acúmulo de uma quantidade suficiente de ADP que possui um efeito inibitório, resultando em uma velocidade máxima menor.

O perfil obtido não possui uma função já estabelecida e, portanto, não foi possível realizar um ajuste para a determinação dos parâmetros.

Realizando os cálculos das velocidades e quantidade de ATP em cada ponto, obtém-se a curva representada na Figura 25.

Figura 24. Uma série de injeções sequenciais de 10 μL de ATP (23 mM em tampão HEPES) foi feita em Na,K-ATPase solubilizada. A célula continha o meio reacional HEPES 50 mM, pH 7,4, contendo KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM e NaCl 50 mM e a concentração inicial de proteína era 6875 nM. O intervalo entre as injeções foi de 40 minutos. A célula de referência foi preenchida com água. O sinal voltado para cima é devido à reação enzimática (exotérmico) e o sinal estreito endotérmico que aparece é a diluição do tampão HEPES em meio reacional.

Figura 25. Titulação de injeções múltiplas da Na,K-ATPase (6875 nM) com ATP (23 mM). Velocidade *vs.* Concentração acumulativa de ATP (corrigida pela diluição e consumo pela enzima, conforme descrito na Equação 9).

Houve diferença nos parâmetros cinéticos encontrados quando se faz uma comparação entre os dois métodos. Isso pode ser explicado pela diferença das condições experimentais e concentração de proteína.

No método de injeção simples, o meio reacional se encontra na célula e a solução de proteína é injetada. Com isso, há diluição da enzima e seu estado oligomérico deve ter sido alterado (a diluição foi de 8375 nM para 266 nM).

No método de injeção múltipla, a enzima se encontra na célula com uma concentração de 470 nM e provavelmente assume um estado oligomérico diferente de uma amostra mais diluída.

Além disso, a faixa de concentração de ATP é diferente para os dois casos. No método de injeção simples, a faixa de concentração de ATP pode ser escolhida e a variação pode ser maior que no método de injeções múltiplas. Neste último, a faixa de concentração fica restrita, e depende da concentração da solução de substrato na seringa de titulação.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos obtidos pelos dois métodos com a técnica de ITC

Método de Injeções	Concentração enzima (nM)	K_m (mM)	V_{máx} (nmol /L s)	N
Simple	266	0,41	243	0,54
Múltiplas	470	0,13	129	1,85

No entanto, os dois valores de K_m encontrados (Tabela 4) estão dentro da faixa submilimolar esperada para a Na,K-ATPase (Li et al., 2004; Noske et al., 2010), inclusive quando se compara com outros métodos (Robinson, 1974).

O trabalho de Noske et al. (2010) encontrou um K_m de 0,58 mM e 0,11 mM para a Na,K-ATPase extraída de porco e tubarão, respectivamente. No presente trabalho, encontramos 0,41 mM e 0,13 mM para os métodos de injeção simples e múltipla, respectivamente, da enzima extraída de coelho. Esses valores, segundo Clarke (2009) são consistentes com uma estimulação da atividade enzimática pela ligação alostérica do ATP ao sítio de baixa afinidade na conformação E2 da enzima. Na realidade, a enzima também possui um sítio catalítico de ligação de ATP na conformação E1 com afinidade na faixa submicromolar (Noske et al., 2010).

No nosso experimento a $V_{m\acute{a}x}$ foi de 243 nmol /L s e 129 nmol/L s para os métodos de injeção simples e múltipla, respectivamente. Os valores de $V_{m\acute{a}x}$ encontrados por Noske et al. (2010) foram maiores (2250 nmol/L s), já que eles consideraram a inibição por ADP. Experimentalmente a $V_{m\acute{a}x}$ atingida foi de aproximadamente 275 nmol/L s.

Os dados termodinâmicos mostraram que a variação de entalpia que acompanha a hidrólise do ATP foi de 74,4 kJ/mol e 66,8 kJ/mol para os métodos de injeção simples e múltipla, respectivamente. A variação de entalpia da hidrólise de ATP foi independente da quantidade de ADP produzida na célula de reação, o que indica que a inibição da enzima via reversão da reação de fosforilação não está acontecendo (Noske et al., 2010).

Dois experimentos utilizando o método de injeções múltiplas foram realizados com concentrações de enzima na célula diferentes. Curvas diferentes foram obtidas. Essa diferença pode ser explicada pelo estado oligomérico diferente da Na,K-ATPase.

Se a enzima segue uma cinética não michaeliana, a cooperatividade é dependente do estado oligomérico que a enzima assume em solução. Essa diferença é refletida nas curvas e parâmetros cinéticos diferentes.

As estruturas cristalinas elucidadas mostraram que a translocação dos íons é feita através de uma simples unidade catalítica (subunidade α) e, portanto, não há nenhuma razão estrutural para a bomba se agregar em dímeros ou oligômeros maiores. O papel do efeito alostérico do ATP e a oligomerização da Na,K-ATPase é um dos tópicos mais controversos e menos compreendidos na área (Clarke, 2009).

Diante dessa especulação, experimentos de espalhamento dinâmico de luz e ultracentrifugação analítica foram realizados com a finalidade de encontrar o estado oligomérico que a NKA assume em solução.

4.4 Agregação / Oligomerização da Na,K-ATPase

4.4.1 Espalhamento Dinâmico de Luz

Há uma grande evidência na literatura que sugere que ATPase do tipo P se agregam em seu ambiente nativo e formam dímeros ou oligômeros maiores. No caso da Na,K-ATPase, experimentos de co-imunoprecipitação (Blanco et al., 1994), de inativação radioativa (Nørby e Jensen, 1974) evidenciaram oligômeros. Além disso, dados genéticos são melhores explicados quando se assume a presença de um complexo oligomérico (Palladino et al., 2003). Diprotômeros $(\alpha\beta)_2$ e tetraprotômeros $(\alpha\beta)_4$ estáveis, juntamente com protômeros $(\alpha\beta)$ de Na,K-ATPase de rim de cachorro foram isolados por cromatografia (Kobayashi et al., 2007 e Mimura et al., 2008).

No atual trabalho, um estudo foi realizado para averiguar o estado oligomérico após a preparação/purificação da Na,K-ATPase extraída de rim de coelho nas condições descritas em Materiais e Métodos (3.1).

Para isso, a amostra purificada (como saiu da coluna cromatográfica) (Figura 26) bem como as amostras que foram posteriormente concentradas em sistema Amicon (membrana porosa de 30 kDa) (Figura 27) foram analisadas em DLS. Essas amostras foram filtradas em filtro de 220nm com a finalidade de eliminar os grandes agregados da amostra (Figura 28). Para os experimentos de DLS, a viscosidade e o índice de refração foram anterior e experimentalmente determinados. Realizou-se a quantificação de proteína antes e após a filtração, bem como a medida de atividade enzimática. Duas amostras foram utilizadas e ambas apresentaram resultados similares.

Figura 26. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica (diluída ~ 0,1 mg/mL e não filtrada).

Figura 27. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica, concentrada (0,23 mg/mL) e não filtrada.

Figura 28. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica, concentrada e filtrada (220nm).

Houve redução na concentração da proteína após a filtração para ambas as amostras. Na amostra 1, foi de 0,68 (1) para 0,55 (5) mg/mL: 21% de redução; na amostra 2, foi de 0,23 (2) para 0,16 (1) mg/mL: 30% de redução.

Fazendo a medida de atividade enzimática, verificou-se que a atividade específica da amostra filtrada foi maior que da não filtrada. Para a amostra 1 o aumento foi de 19% e para a amostra 2 foi de 24%. Isso implica que a porção proteica que é retirada através da filtração não possui atividade enzimática. Esse resultado mostra que apesar de parte da amostra estar agregada e inativa, outra porção está em algum estado que é ativo. O desafio é afirmar qual é esse estado oligomérico que a Na,K-ATPase assume em solução e inferir qual estado que a bomba se encontra naturalmente na membrana celular. Todas essas medidas foram repetidas utilizando o filtro de 100 nm e obtiveram-se resultados similares.

Verificou-se também que se as “partículas” maiores são retiradas com a filtração, mais agregados se formam com o decorrer do tempo (Figura 29, 30 e 31). Tendo em mãos esses resultados, buscamos estratégias para o impedimento da formação novamente de agregados. Para isso, fizemos o controle de quanto tempo a amostra filtrada permanecia sem o aparecimento de “partículas” maiores e se o detergente C₁₂E₈ e o glicerol seriam bons agentes capazes de evitar a agregação.

Figura 29. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica, concentrada, logo após a filtração (220nm) sem adição de mais detergente.

Figura 30. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica, concentrada, 18 hora após filtração (220nm) sem a adição de mais detergente.

Figura 31. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica, concentrada, 96 horas após filtração (220nm), sem adição de mais detergente.

A amostra foi filtrada e analisada em DLS. Outras medidas foram feitas de tempo em tempo para determinar a estabilidade temporal da amostra filtrada. Em paralelo, adicionamos glicerol (5, 10, 15, 20 e 25%) e aumentamos a concentração de $C_{12}E_8$ nas amostras filtradas.

Os melhores resultados foram quando $C_{12}E_8$ foi adicionado após a filtração (Figuras 32, 33 e 34). A concentração de $C_{12}E_8$ foi aumentada dez vezes e a atividade catalítica apresentou um ligeiro aumento (12 %). A estabilidade analisada por DLS foi de aproximadamente 72 horas.

A adição de glicerol não se mostrou interessante, visto que houve redução da atividade catalítica mesmo na mais baixa concentração. Além disso, não houve uma melhora para evitar a agregação quando comparado ao $C_{12}E_8$.

Portanto, a melhor estratégia foi aumentar a concentração de detergente em dez vezes, após a filtração da amostra.

Figura 32. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica, concentrada, logo após a filtração (220nm) com a adição de 10 vezes mais detergente.

Figura 33. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica, concentrada, 72 horas após a filtração (220nm), com a adição de 10 vezes mais detergente.

Figura 34. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica, concentrada, 120 horas após a filtração (220nm), com a adição de 10 vezes mais detergente.

Tendo isso em mente, realizou-se uma purificação com um tampão de eluição contendo dez vezes mais detergente, para tentar evitar a agregação durante a cromatografia. Pelas medidas de DLS, mesmo com essa concentração de $C_{12}E_8$ no tampão houve a formação de agregados com a concentração (Figura 35 e 36).

O resultado de DLS comprovou que há agregados em solução e que eles ou pelo menos, parte deles, são inativos. Verificou-se de que esses agregados estão em equilíbrio em solução, já que se constatou que após a sua retirada por filtração, mais agregados se formaram.

Diversos trabalhos descritos na literatura, realizados com a Na,K-ATPase solubilizada, não levam em consideração a presença de diversos níveis oligoméricos. Dependendo do experimento, essa não consideração compromete a interpretação dos resultados, levando a conclusões equivocadas. Portanto, um estudo alertando para esse problema é essencial no campo da pesquisa com a NKA.

Testes de Ultracentrifugação Analítica com a proteína solubilizada nessas condições estudadas por DLS (após filtração) foram feitos para determinar quais espécies oligoméricas estão presentes em solução.

Figura 35. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica equilibrada com tampão contendo 10 vezes mais detergente, diluída (0,07 mg/mL).

Figura 36. Duas repetições da Distribuição de Intensidade (u.a.) vs. Diâmetro (nm) realizadas por DLS de uma amostra de Na,K-ATPase solubilizada e purificada como descrito em Materiais e Métodos 3.1 após eluição da coluna cromatográfica equilibrada com tampão contendo 10 vezes mais detergente, concentrada (0,46 mg/mL).

4.4.2 Ultracentrifugação Analítica (AUC)

Ultracentrifugação Analítica é uma das mais poderosas e versáteis técnicas para a caracterização quantitativa de associações de macromoléculas em solução.

Experimentos de AUC foram realizados com a finalidade de determinar o estado oligomérico da NKA solubilizada (com C₁₂E₈) em função da sua concentração. Isso foi realizado com o intuito de obter explicação para a alteração dos perfis de cinética enzimática para as amostras de proteína com concentrações diferentes.

Algumas propriedades foram calculadas a partir da sequência de aminoácidos como indicado na Tabela 5:

Tabela 5. Valores de Massa Molecular (MM), Coeficiente de Sedimentação (s), Coeficiente de Difusão (D) e Raio (R_o) respectivamente, em água e a 20°C

Na,K-ATPase	MM (Da)	s _{máx} (S)	D _{máx} (x10 ⁻⁷ cm ² /s)	R _o (Å)
(αβ) ₁	147916	9,62	6,1	35
(αβ) ₂	295834	15,27	4,8	44
(αβ) ₃	443751	20,02	4,2	51
(αβ) ₄	501668	24,24	3,8	56

A análise da estrutura cristalográfica apresentada no modelo PDB:3A3Y pelo programa HydroPro sugere que o valor de s_{20w} (coeficiente de sedimentação a 20°C em água pura) é de 7,08S, conforme a Tabela 6. Se em solução a proteína possui estrutura similar ao modelo cristalográfico, dados similares a estes são esperados experimentalmente.

Tabela 6. Dados preditos para a estrutura PDB (*Protein Data Bank*) pelo programa HydroPro

PDB	MM(Da)	R_s (Å)	R_g (Å)	s (S)	$D_{m\acute{a}x}$ (Å)
PDB:3A3Y	156499	50	47	7,08	171

R_s : Raio de Stokes

R_g : Raio de giro

s: Coeficiente de sedimentação

$D_{m\acute{a}x}$: Distância máxima

Os experimentos de velocidade de sedimentação (SV) da NKA foram feitos como descritos em Materiais e Métodos 3.10.

A análise dos dados de velocidade de sedimentação mostra que a solução de proteína apresentou alta heterogeneidade. Pelo menos 10 espécies na faixa de concentração utilizada (0,2 – 1,0 mg/mL) foram observadas. A menor espécie em solução possui massa molecular acima de 1MDa e um coeficiente de sedimentação acima de 30S, um valor muito superior ao valor esperado pela análise da estrutura cristalográfica. Várias espécies podem ser observadas com massa molecular no intervalo de 2 a 100MDa e outras espécies de até 500 MDa podem ser observadas na concentração de 1 mg/mL.

Vale ressaltar que os parâmetros de ajuste do programa SedFit foram obtidos deixando-os livres ao máximo, o que reduz a confiabilidade do resultado.

O perfil de espécies em função da concentração de proteínas foi bastante variável, sugerindo que há agregação inespecífica. Apesar de estarem agregadas, todas as amostras apresentaram atividade enzimática, o que nos sugere que pelo menos uma das espécies é ativa.

Devido a esses primeiros resultados outros experimentos foram realizados com amostra não concentrada e filtrada.

Nestes experimentos foi utilizada uma estratégia de corrida rápida (~ 5 h) com

velocidade de 18000 RPM (26127 g) de amostras submetidas a diferentes tratamentos: amostra purificada por gel filtração e não submetida ($\sim 0,1$ mg/mL) e submetida ($\sim 0,4$ μ g/mL) ao processo concentração. Também se trabalhou em temperatura de 13°C.

A análise dos dados de velocidade de sedimentação da NKA mostra que a proteína se apresentou com alta heterogeneidade em ambas as condições experimentais. Os ajustes dos dados são apresentados abaixo.

A amostra submetida à SV - 0,1 mg/mL/18000 RPM apresentou 5 espécies e a de 0,4 mg/mL/18000 RPM apresentou aproximadamente as mesmas espécies, porém com a presença substancial de várias outras espécies maiores, sugerindo que o processo de concentração ocasiona a agregação da proteínas nas condições testadas. Entretanto, em relação ao teste anterior (amostras não filtradas), houve avanço considerável na qualidade das amostras (amostras filtradas). A Figura 37 compara estes 2 ajustes:

Figura 37. Distribuição do coeficiente de sedimentação $c(S)$ vs. Coeficiente (S) das amostras de Na,K-ATPase solubilizada após a filtração nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ (—) e 400 $\mu\text{g/mL}$ (—). A corrida foi de 5 horas na velocidade de 18000 RPM, a temperatura de 13 °C.

É necessário cuidado na análise destes dados, pois as condições de ajuste matemático só foram alcançadas em modo pouco restritivo.

A Tabela 7 abaixo sumariza as propriedades de cada uma das espécies observadas juntamente com a quantidade relativa encontrada no ajuste da amostra de SV 0,1 mg/mL/18000 RPM. Perante estes dados, pode-se concluir que a espécies monomérica e tetramérica são as principais.

Tabela 7. Propriedades das espécies observadas nos experimentos a 18000 RPM

Espécie	1	2	3	4	5
s_{app} (S)	5,426	13,218	20,193	25,854	32,845
MM (Da)	146869	558404	1054330	1527470	2187230
%	27	30	18	14	11

s_{app} = coeficiente de sedimentação aparente

Sabendo que a amostra não concentrada apresentava heterogeneidade, porém um número menor de agregados fez-se então uma corrida mais longa (14 h) em uma velocidade relativa menor (12000 RPM – 11612 g) somente com a amostra não concentrada em 3 concentrações (~ 0,03; ~ 0,06 e ~ 0,10 mg/mL). Destas, foi possível tratar as de ~ 0,06 e ~ 0,10 mg/mL. A de ~ 0,03 µg/mL não permitiu extrair os dados provavelmente devido à baixa intensidade de sinal.

O uso de velocidades menores permite acumular mais dados durante a sedimentação da amostra no campo centrífugo e normalmente aumenta a resolução e exatidão dos dados. Nesta nova condição, foram observadas 7 espécies principais. Os ajustes destas amostras se encontram abaixo e a figura a seguir (Figura 38) mostra a comparação destes ajustes.

Figura 38. Distribuição do coeficiente de sedimentação $c(S)$ vs. Coeficiente (S) das amostras de Na,K-ATPase solubilizada após a filtração (100 nm) nas concentrações de 60 $\mu\text{g/mL}$ (—) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (—). A corrida foi de 14 h com uma velocidade de 12000 RPM, a 13 °C.

Baseado nos dados destes experimentos, as duas primeiras foram as mais relevantes seguidas das 3 seguintes e enfim, as duas últimas de menor concentração relativa. Estes dados podem ser observados na Tabela 8 abaixo e sugerem boa reprodutibilidade nas duas concentrações testadas.

Tabela 8. Propriedades das espécies observadas nos experimentos a 12000 RPM

$\mu\text{g/mL}$	Espécie →	1	2	3	4	5	6	7
~60	s (S)	6,44	14,17	20,36	27,13	33,76	41,60	51,42
	$s_{20,w}$ (S)	7,43	16,35	23,5	31,3	38,9	48,0	59,3
	MM (kDa)	190	620	1080	1640	2280	3110	4280
	%	26	29	18	16	7	5	2
~100	s (S)	6,25	14,49	20,48	27,02	34,83	44,32	53,80
	$s_{20,w}$ (S)	7,21	17,71	23,6	31,2	40,2	51,1	62,0
	MM (kDa)	177	623	1046	1585	2320	3330	4455
	%	26	28	17	16	10	4	1

Considerando as propriedades hidrodinâmicas da espécie 1 em condições padrão (corrigido para água e 20°C) e das preditas para o modelo cristalográfico 3A3Y.pdb obtidas pelo programa HydroPro (Tabela 6), pode-se concluir que a espécie 1 refere-se ao monômero da proteína Na,K-ATPase nas condições experimentais testadas.

Em seguida, fizemos a sedimentação em equilíbrio com a amostra não concentrada em 3 velocidades (3000, 4000 e 5000 RPM) e 3 concentrações (~30, ~60 e ~100 $\mu\text{g/mL}$). A temperatura utilizada foi de 13°C e monitoramento em 225 nm. Os dados brutos do sistema em equilíbrio são apresentados a seguir (Figura 39):

Figura 39. Perfil de Sedimentação em Equilíbrio da amostra de Na,K-ATPase não concentrada em 3 velocidades - 3000, 4000 e 5000 RPM (726, 1290 e 2016 g) e 3 concentrações (~30, ~60 e ~100 $\mu\text{g/mL}$). A temperatura utilizada foi de 13°C com monitoramento em 225 nm.

Apesar de observar, pela sobreposição das 3 curvas nas mesmas velocidades, que o sistema entrou em equilíbrio, não foi possível tratar estes dados devido: 1) ao processo de auto agregação observado (deslocamento das curvas para a direita conforme o aumento da velocidade sem que as mesmas se cruzem) e 2) foi observado por velocidade de sedimentação a presença de pelo menos 7 espécies e sistemas com presença de mais de 4 espécies não possuem solução matemática satisfatória que as diferenciem.

Esses resultados nos mostra que a Na,K-ATPase assume diferentes níveis oligoméricos em solução e que estes estão em equilíbrio e dependem da concentração da proteína e condições do meio.

A dúvida se a unidade funcional das ATPases do tipo P, incluindo a Na,K-ATPase é um monômero, um dímero, ou outros oligômeros tem sido assunto de intenso debate pelos últimos 30 anos.

Alguns estudos têm mostrado um papel alostérico do ATP. Em bioquímica quando se usa a palavra “alosterismo” associamos ao clássico exemplo da hemoglobina. Por analogia, podemos imaginar que se a Na,K-ATPase tem um efeito alostérico devido ao ATP isso poderia talvez, estar relacionado com a interação proteína-proteína dentro do oligômero (Clarke, 2009).

Portanto, a determinação do nível oligomérico é um importante aspecto na pesquisa envolvendo a Na,K-ATPase. Infelizmente, isolar um estado parece não ser simples e isso compromete a interpretação dos resultados obtidos, uma vez que não se sabe quais complexos e em que proporção há de fato em solução.

Infelizmente não houve tempo para aprofundar esses estudos e a tentar isolar uma população. No entanto, esses resultados são úteis para alertar quando se realiza experimentos com a Na,K-ATPase solubilizada.

4.5 Interação entre colesterol e a Na,K-ATPase via ITC

Uma parte dos resultados obtidos no mestrado mostrou a influência da proporção de colesterol contido na bicamada lipídica na estabilidade da NKA. Além disso, foi verificado que a atividade foi dependente do conteúdo de colesterol. Isso implica na dependência do funcionamento da bomba de sódio e potássio com a composição da membrana plasmática e mais especificamente pela quantidade de colesterol (Yoneda, 2010).

A composição lipídica complexa da membrana plasmática e a formação de microdomínios lipídicos tais como rafts são provavelmente muito importantes na regulação da Na,K-ATPase (Cornelius, 2008).

Proteínas de membrana interagem com os lipídios via bicamada circundante aos segmentos de membrana, no entanto, essa interação pode ocorrer de forma específica lipídio-proteína (Haviv et al., 2013).

Os lipídios da bicamada não aparecem geralmente nas estruturas cristalográficas de proteínas solubilizadas, já que eles são amplamente substituídos pelas moléculas de detergente, embora tenham sido vistos em alguns casos. Em contrapartida, fosfolipídios e colesterol ligados especificamente têm sido observados em diversas estruturas cristalográficas de proteínas de membrana, no entanto, suas funções ainda não são bem compreendidas. A princípio, fosfolipídios e colesterol ligados especificamente poderiam afetar a estabilidade e/ou atividade catalítica da NKA (Haviv et al., 2013).

O mapa de densidade eletrônica indicou uma molécula de colesterol localizada entre o segmento transmembrana da subunidade γ (γM) e o oitavo segmento transmembrana da subunidade α ($\alpha M8$) (Laursen et al., 2013).

Estudos sobre a influência da proporção de colesterol via bicamada já foram realizados, utilizando proteolipossomos (DPPC:DPPE:Chol:Na,K-ATPase) (Yoneda,

2010). Com a finalidade de detectar a interação direta da proteína com a molécula de colesterol, experimentos de ITC foram realizados.

Para isso, utilizamos uma solução de colesterol solúvel em água como titulante. O colesterol solúvel é um complexo colesterol-metil- β -ciclodextrina.

No início, uma solução mais diluída (10 vezes) foi utilizada, mas nenhum calor de interação foi detectado. A concentração da solução de colesterol foi sendo aumentada até que se obteve a curva indicada na Figura 41.

Para essa concentração de colesterol utilizada (1 mM), realizamos o experimento de controle, ou seja, titulou a solução de colesterol em tampão (Figura 40).

Quando a solução de colesterol foi titulada em proteína solubilizada, obteve-se uma curva (Figura 41). O melhor ajuste pelo programa *NanoAnalysis* resultou nos parâmetros, logo abaixo da Figura 42.

Figura 40: Titulação calorimétrica de uma solução de colesterol (1 mM) em tampão Tris-HCl 5 mM, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM pH 7,0. 25 injeções de 10 μL com intervalo entre as injeções de 600 s, a 25°C.

Figura 41: Titulação calorimétrica de uma solução de colesterol (1 mM) em solução de Na,K-ATPase (2,4 μM) em tampão Tris-HCl 5 mM, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM pH 7,0. 25 injeções de 10 μL com intervalo entre as injeções de 600 s, a 25°C.

Figura 42: Calor por injeção após a subtração do calor de diluição vs. razão molar [Coolesterol]/[Na,K-ATPase].

- Modo de ajuste: Modelo Independente
- $K = 3,98 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
- $\Delta H = -1692 \text{ kJ/mol}$
- $n = 6,05 \text{ mol}$

O valor de n ser aproximadamente igual a 6, nos indica que 6 moléculas de colesterol se ligam por molécula de proteína. Para realizar os cálculos, a massa molecular foi do monômero – $\alpha\beta$ (160 kDa). Segundo a interação visualizada (colesterol-proteína) pela estrutura cristalográfica, o valor esperado seria de apenas uma molécula de colesterol por molécula de proteína.

É válido ressaltar que o colesterol em solução está complexado com a metil- β -ciclodextrina. Portanto, a concentração de colesterol livre para interagir não deve ser a concentração teórica da solução preparada. Outro problema seria a interação da própria metil- β -ciclodextrina com a proteína e, portanto, uma interferência no sinal calorimétrico poderia ocorrer. Para averiguar esse efeito realizou a titulação de uma solução de metil- β -ciclodextrina em proteína (Figura 43).

De acordo com a curva, um sinal baixo e praticamente constante foi verificado. Os valores podem ser descontados, considerando como se fosse um efeito de diluição.

Além disso, após identificar o problema com a agregação, novos experimentos de interação, com amostra de proteína purificada e filtrada foram realizados. Vale lembrar que após a filtração a formação de novos agregados foi detectada e devido ao tempo grande de experimento, provavelmente há formação de agregados durante a titulação e isso acaba acarretando em erros na análise dos dados.

Figura 43: Titulação calorimétrica de uma solução de metil- β -ciclodextrina (7,1 mM) em uma solução de Na,K-ATPase (2,4 μ M) em tampão Tris-HCl 5 mM, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM pH 7,0; filtrada em filtro de 100 nm. 25 injeções de 10 μ L com intervalo entre as injeções de 600 s, a 25°C.

Após a filtração, as curvas indicadas nas Figuras 44 e 45 foram obtidas. Feito o ajuste, o valor de n encontrado foi de 4,5, ou seja, a estequiometria diminuiu.

A interpretação dos resultados é dificultada pelo fato de que pode haver mais de um estado oligomérico em solução e dessa forma a quantidade de mol que calculamos não é a correta. Infelizmente, devido a esses problemas encontrados não foi possível determinar quantitativamente a interação Na,K-ATPase – colesterol. No entanto, pode-se verificar que o perfil calorimétrico obtido é diferente quando a titulação é feita somente com a metil- β -ciclodextrina ou com o complexo colesterol- metil- β -ciclodextrina. Essa diferença nos indica que há interação direta da Na,K-ATPase com o colesterol.

Figura 44: Titulação calorimétrica de uma solução de Colesterol (1 mM) em uma solução de Na,K-ATPase (2,4 μ M) em tampão Tris-HCl 5 mM, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM pH 7,0; filtrada em filtro de 100 nm. 25 injeções de 10 μ L com intervalo entre as injeções de 600 s, a 25°C.

Figura 45: Calor por injeção após a subtração do calor de diluição vs. razão molar [Colesterol]/[Na,K-ATPase].

- Modo de ajuste: Modelo Independente
- $K = 1,72 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
- $\Delta H = -411 \text{ kJ/mol}$
- $n = 4,5 \text{ mol}$

Em resumo, os resultados obtidos mostraram que experimentos realizados com a proteína solubilizada não permitem uma interpretação conclusiva dos dados devido à heterogeneidade da amostra.

É provável que a Na,K-ATPase se encontre em diferentes estados oligoméricos em solução na forma de um equilíbrio como discutido anteriormente, com base nos resultados de DLS e AUC:

onde φ é um agregado inespecífico. Esse agregado pode ser retirado com a filtração da amostra, no entanto sobram diferentes “espécies” em solução e dessa maneira certas análises ficam impossibilitadas. O desafio é determinar se todos ou quais estados são ativos e entender o motivo e a consequência que a combinação dos protômeros em oligômeros maiores provoca na estrutura e função da bomba de sódio e potássio.

5. Conclusão

5. Conclusão

Embora a fonte e o método de extração sejam diferentes, a Na,K-ATPase analisada nesse projeto divide similaridades em termos de desnaturação térmica quando se compara com resultados publicados por outros grupos usando a microcalorimetria.

Além disso, foi possível comparar a termoestabilidade da NKA em diferentes condições: a fração de membrana rica em NKA alcançou a máxima estabilidade térmica entre as amostras, já que mais energia foi requerida para a desnaturação acontecer. Após a solubilização, a estabilidade dessa proteína diminuiu pela metade, embora atividade enzimática ainda fosse detectada. A perda dessa estabilidade pode ser explicada pela melhor ação dos lipídios endógenos quando comparado às moléculas de C₁₂E₈. Além disso, a subunidade γ é perdida durante o processo de solubilização, o que colabora para a diminuição da estabilidade da NKA. Isso foi confirmado pela introdução do extrato contendo a subunidade γ à enzima solubilizada, que levou a formação do complexo $\alpha\beta\gamma$ e quase que recuperou totalmente a estabilidade, quando se analisou os valores de ΔH . O aumento da estabilidade também foi verificado quando a NKA solubilizada foi reconstituída em sistemas de lipossomos, mostrando a função essencial dos lipídios na estabilização estrutural da proteína. A conformação E2, induzida pelos íons K⁺, foi duas vezes mais estável que a conformação E1, induzida pelos íons Na⁺. A interação da conformação E2 com o substrato ATP não modificou o valor de ΔH_t , mas com a liberação dos íons K⁺ ocorreu uma mudança conformacional que foi suficiente para resultar em um termograma com perfil diferente.

Além do estudo de estabilidade térmica, a calorimetria também foi utilizada com propósito de estudar a cinética enzimática da NKA. Os dois métodos (injeção simples e múltipla) feitos por ITC foram comparados. Os valores de K_m foram diferentes (0,41 e 0,13 mM), porém dentro da faixa submilimolar esperada. Utilizando o método de

injeção múltipla, as curvas obtidas para duas concentrações de proteína foram diferentes. Isso nos levou a especular que o perfil diferente poderia ser explicado pelo estado oligomérico que a NKA assumiu em solução dependendo da concentração.

Então, se iniciou um estudo de agregação/oligomerização. Os resultados mostraram que a NKA está dividida em diferentes populações oligoméricas em solução. As principais populações são monômero - ($\alpha\beta$) e tetramero - ($\alpha\beta$)₄. Há também a formação de um agregado inespecífico que pode ser retirado por filtração simples, mas que com o tempo, volta a se formar em solução.

Os experimentos de ITC mostraram que provavelmente ocorre a interação direta do colesterol com a NKA. Fazendo a consideração de que a NKA está em solução apenas como monômero, determinou que a estequiometria da interação foi de 4,5. Ou seja, 4,5 moléculas de colesterol se ligam por molécula de proteína. Infelizmente, o resultado não foi conclusivo, já que foi visto pelo estudo de oligomerização que a NKA possui diferentes níveis oligoméricos em solução.

Houve alguns obstáculos durante a execução desse projeto, mas que não impediram que importantes conclusões fossem alcançadas. A presença de mais que um estado oligomérico foi sem dúvida um empecilho nos estudos de interação que haviam sido planejados no início. Entretanto, isso explicou a pouca reprodutibilidade quando se tentou estudar a interação entre a ouabaína/ATP além do colesterol e a NKA solubilizada.

Em resumo, apesar de que alguns experimentos foram impossibilitados devido à heterogeneidade da amostra de proteína, parte dos resultados obtidos nesse projeto (Estabilidade Térmica por DSC) já foi publicada – anexo.

6. Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- Albers, R.W. (1967) Biochemical aspects of active transport. *Ann. Biochem.* 36: 727-756.
- Antolovic, R.; Hamer, E.; Serpersu, E.H.; Kost, H.; Linnertz, H.; Kovarik, Z. and Schoner, W. (1999) Affinity labelling with MgATP analogues reveals coexisting Na^+ and K^+ forms of the alpha-subunits of Na^+/K^+ -ATPase. *Eur. J. Biochem.* 261:181-189.
- Askari, A. (1987) Na,K-ATPase: on the number of the ATP sites of the functional unit. *J. Bioenergetics Biomembranes* 19: 359-374.
- Bagrov, A.Y.; Shapiro, J.I.; Fedorova, O.V. (2009) Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev.* 61(1):9-38.
- Barbosa, L.R.S.; Rigos, C.F.; Yoneda, J.S.; Itri, R.; Ciancaglini, P. (2010) Unraveling the Na,K-ATPase α Subunit Assembling Induced by Large Amounts of C12E8 by Means of Small-Angle X-ray Scattering. *Journal of Physical Chemistry. B* 114 11371-11376.
- Barwe, S.P.; Kim, S.; Rajasekaran, S.A.; Bowie, J.U.; Rajasekaran, A.K. (2007) Janus model of the Na,K-ATPase beta-subunit transmembrane domain: distinct faces mediate alpha/beta assembly and beta-beta homo-oligomerization. *J Mol Biol.* 365(3):706-14.
- Béguin, P.; Crambert, G.; Guennoun, S.; Garty, H.; Horisberger, J.D. and Geering K. (2001). CHIF, a member of the FXYD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the γ -subunit. *EMBO J* 20: 3993-4002.
- Béguin, P.; Wang, X.; Firsov, D.; Puoti, A.; Claeys, D.; Horisberger, J.D. and Geering, K. (1997) The γ subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* 16: 4250-4260.
- Blanco, G. (2005) Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin. Nephrol.* 25: 292-303.
- Blanco, G.; Koster, J.C.; Mercer, R.W. (1994) The alpha subunit of the Na,K-ATPase specifically and stably associates into oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A. 91(18):8542-6.
- Blum, H.; Heise, H. and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.
- Boldyrev, A.A. (2001) Na/K-ATPase as an oligomeric ensemble. *Biochemistry* 66: 821-831.
- Bouvrais, H.; Cornelius, F.; Ipsen, J.H.; Mouritsen, O.G. (2012) Intrinsic reaction-cycle time scale of Na⁺,K⁺-ATPase manifests itself in the lipid-protein interactions of nonequilibrium membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*.109(45):18442-6.
- Chen, J.Q.; Contreras, R.G.; Wang, R.; Fernandez, S.V.; Shoshani, L.; Russo, I.H.; Cerejido, M. and Russo J. (2006) Sodium/potassium ATPase (Na⁺, K⁺-ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: A new paradigm for development of anti-breast cancer drugs? *Breast Cancer Res Treat.* 96(1):1-15.
- Ciancaglini, P.; Simão, A.M.S.; Bolean,M.; Millán, J.L.; Rigos, C.F.; Yoneda, J.S.; . Colhone, M.C; Stabeli, R.G. (2012) Proteoliposomes in nanobiotechnology. *Biophysical Reviews* 4 67-81.
- Clarke, R.J. (2009) Mechanism of allosteric effects of ATP on the kinetics of P-type ATPases. *Eur Biophys J.* 39(1):3-1. Review.
- Clarke, R.J.; Catauro, M.; Rasmussen, H.H. and Apell, H.J. (2013) Quantitative calculation of the role of the Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase in thermogenesis. *Biochim Biophys Acta*.1827(10):1205-12.
- Cohen, E.; Goldshleger, R.; Shainskaya, A.; Tal, D.M.; Ebel, C., le Maire, M.; Karlsh, S.J. (2005) Purification of Na⁺,K⁺-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid-protein interactions. *J Biol Chem.* 280(17):16610-8.
- Cornelius, F. (2008) Cholesterol-dependent interaction of polyunsaturated phospholipids with Na,K-ATPase. *Biochemistry* 47(6):1652-1658.
- Cortes, V.F.; Veiga-Lopes, F.E.; Barrabin, H.; Alves-Ferreira, M. and Fontes, C.F. (2006) The gamma subunit of Na⁺, K⁺-ATPase: role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*; 38(11):1901-13.
- Costa, C.J.; Gatto, C. and Kaplan, J.H. (2003) Interactions between Na,K-ATPase alpha-subunit ATP-binding domains. *J Biol Chem.* 278: 9176-84.
- Donnet, C.; Aristarkhova, E. and Sweadner, K.J. (2001) Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and gamma subunit association with the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 276: 7357-7365.

- Else, P.L.; Windmill, D.J.; Markus, V. (1996) Molecular activity of sodium pumps in endotherms and ectotherms. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 2):R1287-94.
- Esmann, M.; Marsh, D. (2006) Lipid-protein interactions with the Na,K-ATPase. *Chem Phys Lipids.* 141(1-2):94-104.
- Fodor, E.; Fedosova, N.U.; Ferencz, C.; Marsh, D.; Pali, T.; Esmann, M. (2008) Stabilization of Na,K-ATPase by ionic interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1778(4):835-43.
- Fontes, C.F.L.; Lopes, F.E.V; Scofano, H.M.; Barrabin, H. and Norby, J.G. (1999) Stimulation of ouabain binding to Na,K-ATPase in 40% dimethyl sulfoxide by a factor from Na,K-ATPase preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 366: 215-223.
- Forbush, B.; Kaplan, J.H. and Hoffman, J.F. (1978) Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na, K-ATPase. *Biochemistry* 17: 3667-3676.
- Freire, E.; van Osdol, W. W.; Mayorga, O.L.; Sanchez-Ruiz, J.M. (1990) Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in proteins, *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 19: 159–188.
- Garty, H. and Karlish, S.J. (2005) FXYD proteins: tissue-specific regulators of the Na,K-ATPase. *Semin. Nephrol.* 25: 304-11.
- Geering, K. (2000) Topogenic motifs in P-type ATPases. *J. Membr. Biol.* 174: 191-190.
- Geering, K. (2006) FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Semin. Nephrol.* 25: 304-311.
- Geering, K. (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 17(5):526-32.
- Gloor, S.; Antonicek, H.; Sweadner, K.J.; Pagliusi, S.; Frank, R; Moos, M. and Schachner, M. (1990) The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the β subunit of the Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.* 110: 165-174.
- Glynn, I.M. (1985) The Na,K-transporting adenosine triphosphatase. *The enzymes of biological membranes*, 3: 35-114.
- Grinberg, A.V.; Gevondyan, N.M.; Grinberg, N.V. and Grinberg, V.Y. (2001) The thermal unfolding and domain structure of Na^+/K^+ - exchanging ATPase. A scanning calorimetry study. *Eur. J. Biochem.* 268: 5027-5036.
- Haltia, T.; Freire, E. (1995) Forces and factors that contribute to the structural stability

- of membrane proteins, *Biochim Biophys Acta*. 1241(2) 295-322.
- Harris, N. J.; Booth, P.J. (2012) Folding and stability of membrane transport proteins in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1818(4) 1055-66.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.* 48: 422-427.
- Hasler, U.; Crambert, G.; Horisberger, J.D. and Geering, K. (2001) Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase beta subunit revealed by tryptophan scanning. *J. Biol. Chem.* 276:16356-13364.
- Hasler, U.; Wang, X.Y.; Crambert, G.; Beguin, P.; Jaisser, F.; Horisberger, J.D. and Geering, K. (1998) Hole of the beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 273: 30826-30835.
- Haviv, H.; Habeck, M.; Kanai, R.; Toyoshima, C.; Karlsh, S.J. (2013) Neutral phospholipids stimulate Na,K-ATPase activity: a specific lipid-protein interaction. *J Biol Chem.* 288(14):10073-81.
- Heinonen, S.K. and Lathi, R.J (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analyt. Biochem.* 113: 313-317.
- Ivanov, A.; Modyanov, N.N. and Askari, A. (2002) Role of the self-association of beta subunits in the oligomeric structure of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem. J.* 364: 293-299.
- Ivanov, A.; Zhao, H. and Modyanov, N.N. (2000) Packing of the transmembrane helices of Na,K-ATPase: direct contact between beta-subunit and H8 segment of alpha-subunit revealed by oxidative cross-linking. *Biochemistry* 39: 9778-9785.
- Jaisser, F.; Horisberger, J.D. and Rossier, B.C. (1992) The beta subunit modulates potassium activation of the Na-K pump. *Ann N Y Acad Sci.* 671:113-9.
- Jones, D.H.; Li, T.Y.; Arystarkhova, E.; Barr, K.J.; Wetzel, R.K.; Peng, J.; Markham, K.; Sweadner, K.J.; Fong, G.H.; Kidder, G.M. (2005). Na,K-ATPase from mice lacking the gamma subunit (FXVD2) exhibits altered Na⁺ affinity and decreased thermal stability. *J Biol Chem.*; 280(19):19003-11.
- Jørgensen, P.L.; Andersen, J.P. (1986) Thermoinactivation and aggregation of alpha beta units in soluble and membrane-bound (Na,K)-ATPase. *Biochemistry.* 25(10) 2889-97.
- Jorgensen, P.L.; Hakansson, K.O. and Karlsh, S.J.D. (2003) Structure and Mechanism

- of Na, K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65: 817-849.
- Kanai, R.; Ogawa, H.; Vilsen, B.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. (2013) Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺,K⁺-ATPase preceding the E1P state. *Nature*. 502(7470):201-6.
- Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 511-535.
- Kaufman, S.B.; González-Flecha, F.L.; González-Lebrero, R.M. (2012) Opposing effects of Na⁺ and K⁺ on the thermal stability of Na⁺,K⁺-ATPase, *J Phys Chem B*. 116(10) 3421-9.
- Kobayashi, T.; Tahara, Y.; Takenaka, H.; Mimura, K.; Hayashi, Y. (2007) Na⁺- and K⁺-dependent oligomeric interconversion among alphabeta-protomers, diprotomers and higher oligomers in solubilized Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biochem.* 142(2):157-73. Epub 2007 Jul 25.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Laughery, M.; Todd, M.; Kaplan, J.H. (2004) Oligomerization of the Na,K-ATPase in cell membranes. *J Biol Chem.* 279(35):36339-48.
- Laursen, M.; Yatime, L.; Nissen, P.; Fedosova, N.U. (2013) Crystal structure of the high-affinity Na⁺,K⁺-ATPase-ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(27):10958-63.
- Leone, F.A.; Degreve L.; Baranauskas, J.A. (1992) Sigraf-A versatile computer program for fitting enzyme kinetic data. *Biochemical Education*. 20:94-96.
- Li, X.; Li, J.; Wang, Z.-Y.; Xie, X.-Y.; Yang, X.; Wang, C.-X. (2004) kinetic studies on Na⁺/K⁺-ATPase by using thermokinetic method. *Chin. J. Chem.* 22, 252-255.
- Lingrel, J.B., (2010) The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase, *Annu Rev Physiol.* 72 395-412.
- Lingrel, J.B. and Kuntzweiler, T. (1994) Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 269: 19659-19662.
- Liu, J. and Xie, Z.J. (2010) The sodium pump and cardiotonic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking *Biochim Biophys Acta*. 1802(12):1237-45.
- Lutsenko, S. and Kaplan, J.H. (1993) An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochem.* 32: 6737-6743.
- Madan, P.; Rose, K.; Watson, A.J. (2007) Na/K-ATPase beta1 subunit expression is

- required for blastocyst formation and normal assembly of trophoctoderm tight junction-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 282: 12127-12134
- Mahaney, J.E.; Girard, J.P. and Grisham, C.M. (1990) Saturation transfer EPR measurements of the rotational motion of a strongly immobilized ouabain spin label on renal Na,K-ATPase. *FEBS Lett.* 260: 160-164.
- Malik, N.; Canfield, V.A.; Beckers, M.C.; Gros, P. and Levenson, R. (1996) Identification of the mammalian Na,K-ATPase $\beta 3$ subunit. *J. Biol. Chem.* 271: 22754-22758.
- Martin, D.W. (2005) Structure-function relationships in the Na^+, K^+ -pump. *Semin. Nephrol.* 25: 282-91.
- Martin, D.W.; Marecek, J.; Scarlata, S. and Sachs, J.R. (2000) $\alpha\beta$ protomers of Na^+, K^+ -ATPase from microsomes of duck salt gland are mostly monomeric: Formation of higher oligomers does not modify molecular activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 97: 3195-3200.
- Martin-Vasallo, P.; Dackowski, W.; Emanuel, J.R. and Levenson, R. (1989) Identification of a putative isoforma of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 264: 4613-4618.
- Miles, A.J.; Wallace, B.A.; Esmann, M. (2011) Correlation of structural and functional thermal stability of the integral membrane protein Na,K-ATPase, *Biochim Biophys Acta.* 1808: 2573-80.
- Mimura, K.; Matsui, H.; Takagi, T. and Hayashi, Y. (1993) Change in oligomeric structure of solubilized Na,K-ATPase induced by octaethylene glycol dodecyl ether, phosphatidylserine and ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 1145: 63-74.
- Mimura, K.; Tahara, Y.; Shinji, N.; Tokuda, E.; Takenaka, H.; Hayashi, Y. (2008) Isolation of stable (alpha-beta)₄-Tetraprotomer from Na⁺/K⁺-ATPase solubilized in the presence of short-chain fatty acids. *Biochemistry.* 47(22):6039-51.
- Mishra, N.K.; Peleg, Y.; Cirri, E.; Belogus, T.; Lifshitz, Y.; Voelker, D.R.; Apell, H.J.; Garty, H.; Karlisch, S.J. (2011) FXYD proteins stabilize Na,K-ATPase: amplification of specific phosphatidylserine-protein interactions, *J Biol Chem.* 286: 9699-712.
- Morth, J. P.; Pedersen, B.P.; Toustrup-Jensen, M.S; Sørensen, T.L.M.; Petersen J.; Andersen, J.P.; Vilsen B.; Nissen, P.(2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450: 1043-1050.

- Morth, J.P.; Pedersen, B.P.; Buch-Pedersen, M.J.; Andersen, J.P.; Vilsen, B.; Palmgren, M.G.; Nissen, P. (2011) A structural overview of the plasma membrane Na^+, K^+ -ATPase and H^+ -ATPase ion pumps, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12: 60-70.
- Nørby, J.G.; Jensen, J. (1974) Binding of ATP to Na^+, K^+ -ATPase. *Ann N Y Acad Sci.* 242(0):158-67.
- Noske, R.; Cornelius, F.; Clarke, R.J. (2010) Investigation of the enzymatic activity of the Na^+, K^+ -ATPase via isothermal titration microcalorimetry. *Biochim Biophys Acta.* 1797(8):1540-5.
- Ogawa, H.; Shinoda, T.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na^+, K^+ -ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc Natl Acad Sci.* 106(33):13742-7.
- Olsen, S. N. (2006) Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions. *Thermochimica Acta* 448 12-18
- Palladino, M.J.; Bower, J.E.; Kreber, R.; Ganetzky, B. (2003) Neural dysfunction and neurodegeneration in *Drosophila* Na^+/K^+ ATPase alpha subunit mutants. *J Neurosci.* 23(4):1276-86.
- Pedersen, P.A.; Rasmussen, J.H. and Jorgensen, P.L. (1996) Consequences of mutations to the phosphorylation site of the alpha-subunit of Na, K -ATPase for ATP binding and E1-E2 conformational equilibrium. *Biochemistry* 35: 16085-16093.
- Pilotelle-Bunner, A.; Matthews, J.M.; Cornelius, F.; Apell, H.J.; Sebban, P. and Clarke, R.J. (2008) ATP binding equilibria of the $\text{Na}^{(+)}, \text{K}^{(+)}$ -ATPase. *Biochemistry.* 47(49):13103-14.
- Popot, J.L.; Engelman, D.M. (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry.* 29(17) 4031-7.
- Post, R.L; Kume, S.; Tobim, T.; Orcutt, B. and Sem, A.K. (1969) Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. *J. Gen. Physiol.* 54: 306-326.
- Privé, G.G. (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods.* 41(4):388-97.
- Reinhard, L.; Tidow, H.; Clausen, M.J.; Nissen, P. (2012) $\text{Na}^{(+)}, \text{K}^{(+)}$ -ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the $\text{Na}^{(+)}, \text{K}^{(+)}$ -ATPase. *Cell Mol Life Sci.* 70(2):205-22.
- Rigos, C.F.; Santos, H.L.; Yoneda, J.S.; Montich. G.; Maggio. B.; Ciancaglini, P.

- (2010) Cytoplasmatic domain of Na,K-ATPase alpha-subunit is responsible for the aggregation of the enzyme in proteoliposomes. *Biophys Chem.* 146(1):36-41.
- Rigos, C.F; Nobre, T.M; Zaniquelli, M.E.D; Ward, R.J; Ciancaglini, P. (2008) The association of Na,K-ATPase subunits by circular dichroism, surface tension and dilatational elasticity. *J. Colloid Interface Sci.* 325: 478-484.
- Rigos, C.F; Santos, H.L.; Ward, R.J. and Ciancaglini, P. (2006) Lipid bilayer stabilization of the Na,K-ATPase reconstituted in DPPC:DPPE-liposomes. *Cell Biochem. and Biophys.* 44: 438-445.
- Robinson JD. (1974) Cation interactions with different functional states of the Na⁺, K⁺-ATPase. *Ann N Y Acad Sci.* 242(0):185-202.
- Santos, N.C. e Castanho M.A. (1996) Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus. *Biophys J.* 71(3):1641-50.
- Santos, H.L. and Ciancaglini, P. (2003) Kinetic characterization of the Na,K-ATPase from the rabbit outer renal medulla: properties of the ($\alpha\beta$)₂ dimer. *Comp. Biochem. Physiol. Part b.* 135: 539-549.
- Santos, H.L., Lamas, R.P., Ciancaglini, P. (2002) Solubilization of Na,K-ATPase from rabbit kidney outer medulla using only C₁₂E₈. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 277-288.
- Santos, H.L., Rigos, C.F. and Ciancaglini, P. (2006) Kinetics behaviors of Na,K-ATPase: comparison of solubilized and DPPC:DPPE-liposome reconstituted enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 142(3-4): 309-16.
- Santos, H.L.; Lopes, M.L.; Maggio, B. and Ciancaglini, P. (2005) Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41: 239-248.
- Seddon, A.M.; Curnow, P.; Booth, P.J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666 105-117.
- Shinoda, T.; Ogawa, H.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature.* 459(7245):446-50.
- Shull, G.E.; Lane, L.K. and Lingrel, J.B. (1986) Amino-acid sequence of the beta-subunit of the (Na⁺K⁺) ATPase deduced from a cDNA. *Nature.* 321:429-431.
- Skou, J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23 394-401.
- Skou, J.C. and Esmann, M. (1992) The (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J. Bioenergetics Biomembranes* 24: 249-261.

- Suhail M. (2010) Na, K-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *J Clin Med Res.* 2(1):1-17.
- Takeda, K. and Kawamura, M. (2001) The functional unit of Na,K-ATPase is a monomeric alphabeta protomer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1364-1366.
- Taniguchi, K.; Kaya, S.; Abe, K. and Mardh, S. (2001) The oligomeric nature of Na/K-transport ATPase. *J. Biochem.* 129(3): 335-342.
- Therien, A.G. and Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 279: C541-C566.
- Therien, A.G., Goldshleger, R., Karlsh, S.J. and Blostein, R. (1997) Tissue-specific distribution and modulatory role of the γ subunit of Na, KATPase. *J. Biol Chem* 272: 32628-32634.
- Thoenges, D. and Schoner, W. (1997) 2'-O-Dansyl analogs of ATP bind with high affinity to the low affinity ATP site of Na⁺/K⁺-ATPase and reveal the interaction of two ATP sites during catalysis. *J. Biol. Chem.* 272: 16315-16321.
- Toyoshima, C.; Kanai, R.; Cornelius, F. (2011) First crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase: new light on the oldest ion pump. *Structure.* 19(12):1732-8.
- Turner, N.; Hulbert, A.J.; Else, P.L. (2005) Sodium pump molecular activity and membrane lipid composition in two disparate ectotherms, and comparison with endotherms. *J Comp Physiol B.* 175(2):77-85.
- Ward, D. G. and Cavieres, J. D. (1993) Solubilized $\alpha\beta$ Na,K-ATPase remains protomeric during turnover yet shows apparent negative cooperativity toward ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5332-5336.
- Ward, D.G. and Cavieres, J.D. (1996) Binding of 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)ADP to soluble alpha beta protomers of Na,K-ATPase modified with fluorescein isothiocyanate. Evidence for two distinct sites. *J. Biol. Chem.* 271: 12317-12321.
- Yatime, L.; Laursen, M.; Morth, J.P.; Esmann, M.; Nissen, P.; Fedosova, N.U. (2011) Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase. *J Struct Biol.* 174(2):296-306.
- Yoneda, J.S. (2010) Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de fosfolipídios e colesterol: caracterização biofísica e bioquímica. Dissertação de Mestrado.
- Yoneda, J.S.; Rigos, C.F and Ciancaglini P. (2013), Addition of subunit γ , ions K⁺, and lipid restores the thermal stability of solubilized Na,K-ATPase *Arch. Biochem.*

Biophys. 15;530(2):93-100.

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

Artigos Publicados:

Rigos, Carolina Fortes; Santos, Hérica de Lima; **Yoneda, Juliana Sakamoto**; Montich, Guilherme; Maggio, Bruno; Ciancaglini, Pietro. Hytoplasmatic domain of Na,K-ATPase α -subunit is responsible for the aggregation of the enzyme in proteoliposomes. *Biophysical Chemistry* v.146, Issue 1, 2010, p. 36–41
DOI: 10.1016/j.bpc.2009.10.002

Barbosa, Leandro Ramos Souza; Rigos, Carolina Fortes; **Yoneda, Juliana Sakamoto**; Itri, Rosangela; Ciancaglini, Pietro. Unraveling the Na,K-ATPase α 4 Subunit Assembling Induced by Large Amounts of C 12 E 8 by Means of Small-Angle X-ray Scattering . *Journal of Physical Chemistry B*, v.114, p.11371-11376, 2010.
DOI: 10.1021/jp1013829

dos Santos, G.A.; Thomé, C.H.; Ferreira, G.A.; **Yoneda, J.S.**; Nobre, T.M.; Daghashtanli, K.R.P.; Scheucher, P.S.; Teixeira, H.L.; Constantino, M.G.; de Oliveira, K.T.; Faça, V.M.; Falcão, R.P.; Greene, L.J.; Rego, E.M.; Ciancaglini, Pietro . Interaction of 10-(octyloxy) decyl-2-(trimethylammonium) ethyl phosphate with mimetic membranes and cytotoxic effect on leukemic cells. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, v. 1798, p. 1714-1723, 2010.
DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.05.013

Ciancaglini, P.; Simão, A. M. S.; Bolean, M.; Millán, J. L.; Rigos, C. F.; **Yoneda, J. S.**; Colhone, M. C.; Stabeli, R. G. Proteoliposomes in nanobiotechnology. *Biophysical reviews*, v. 4, p. 67-81, 2012.
DOI: 10.1007/s12551-011-0065-4

Yoneda, Juliana Sakamoto; Rigos, Carolina Fortes; Ciancaglini, Pietro. Addition of subunit γ , K^+ ions, and lipid restores the thermal stability of solubilized Na,K-ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 530, p. 93-100, 2013.
DOI: 10.1016/j.abb.2012.12.022