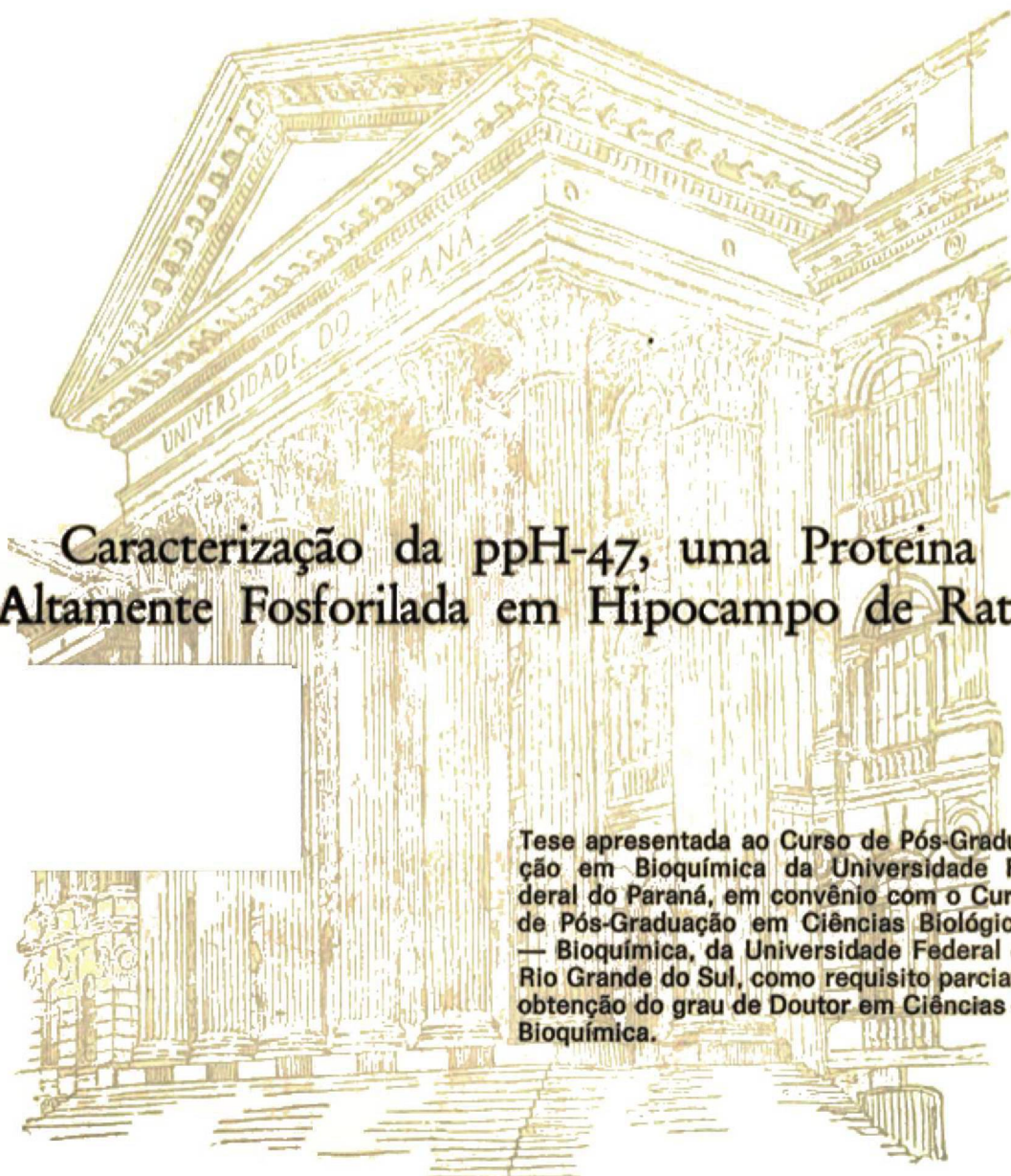


CARLOS ALBERTO SARAIVA GONÇALVES



**Caracterização da ppH-47, uma Proteína
Altamente Fosforilada em Hipocampo de Rato**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas — Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências — Bioquímica.

CURITIBA
1992

CARLOS ALBERTO SARAIVA GONÇALVES

Caracterização da ppH-47, uma Proteína Altamente Fosforilada em Hipocampo de Rato

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas — Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências — Bioquímica.

CURITIBA

1992

ERRATA

1. O item I.3.1.1 no sumário é: "Marcação com [γ -³²P]ATP"
2. Existe um "a" excedente antecedendo a palavra "partir" na tabela 2 da lista de tabelas.
3. Na linha 4 da página 7, o artigo que antecede a palavra "domínio" deve ser "um".
4. Na linha 13 da página 10, falta um "s" na palavra "característica".
5. Na linha 21 da página 14, falta um "s" na palavra "outras".
6. Na linha 7 da página 22, falta um "n" na palavra "fosfoproteínas".
7. Na última linha da página 54, há um "a" excedente antecedendo a palavra "partir".
8. Na linha 19 da página 63, o número da figura é "8" e não "6".
9. Na quarta linha da figura 4 (página 64), deve ser "D corresponde à auto-radiografia do gel C".
10. Na linha 23 da página 77, falta uma crase em "às" que antecede a palavra "características", na qual falta um "s" e tem a sílaba "ti" repetida.
11. Na linha 19 da página 82, a palavra "protéica" deve estar no singular.
12. Na figura 25 da página 94, as regiões cerebrais apresentadas correspondem a : 1- Bulbo olfatório; 2- Caudato; 3-Hipocampo; 4- Cerebelo; 5- Medula; 6- Corda espinhal.
13. Na linha 16 da página 98, a palavra "simultaneamente" tem um acento indevido.
14. Na linha 18 da página 102, a palavra "nesta" após "ppH-47" deve ser retirada.
15. Na linha 23 da página 106, falta um hífen na palavra "auto-radiografia".
16. Na linha 10 da página 112, falta a palavra "do" após a palavra "identificação" e uma vírgula após "GFAP".
17. Na linha 6 da página 113, falta um "r" na palavra "auto-radiográfica".

CARLOS ALBERTO SARAIVA GONÇALVES

CARACTERIZAÇÃO DA pPH-47, UMA PROTEINA ALTAMENTE
FOSFORILADA EM HIPOCAMPO DE RATO

Tese aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor no
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica
pela Comissão formada pelos
Professores:

Orientador: Prof. Richard Rodnight
UFRGS

Prof. Ivan Izquierdo
UFRGS

Prof. Manoel Francisco Guimarães
UFPR

Prof. Vivaldo Moura Neto
UFRJ

Prof. Roy Larson
USP - Ribeirao Preto

Curitiba, 03 de setembro de 1992

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

E

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CARACTERIZAÇÃO DA ppH-47, UMA PROTEÍNA ALTAMENTE
FOSFORILADA EM HIPOCAMPO DE RATO.

por

CARLOS ALBERTO SARAIVA GONÇALVES

sob orientação de

RICHARD RODNIGHT, D.Sc.

Presentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Curitiba
1992

Agradecimentos

Ao ROD, pela oportunidade de aprender com ele e principalmente pelo convívio exemplar como cientista e cidadão.

Ao Dr. Roy Larson e seus colaboradores, pela atenção e preparação do anti-soro-HE.

A Jussara, minha companheira, pela infinita compreensão e carinho.

Ao grupo de trabalho, cujo convívio solidário, facilitou em muito este trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica, onde encontrei apoio profissional e afetivo durante todo este trabalho.

Ao apoio financeiro do CNPq, FINEP, FAPERGS e PROPESP-UFGRS.

RESUMO/ABSTRACT

Caracterização da ppH-47, uma proteína altamente fosforilada em hipocampo de rato. A fosforilação protéica é possivelmente o mais importante mecanismo pelo qual as respostas celulares são induzidas ou controladas por sinais extracelulares, especialmente no tecido cerebral onde os substratos de proteínas-quinases são marcadamente numerosos. O sistema fosforilante da ppH-47 foi inicialmente detectada em auto-radiografias preparados de micro-fatias de hipocampo de rato incubadas com [32P]fosfato (Rodnight et al., 1988). O sistema fosforilante tem interessantes características, tais como Ca^{2+} dependência em adultos, ontogenia pós-natal e uma distribuição acentuada nas regiões do sistema límbico (Rodnight et al., 1991). Além disso a ppH-47 é Triton-insolúvel e ausente na fração sinaptossomal. A análise dos fosfoaminoácidos mostrou que aparentemente a fosfoserina é o único resíduo marcado. Estas características, juntamente com a mobilidade bidimensional e o mapeamento fosfopeptídico com protease V8 sugere a identidade com a proteína astrocítica - GFAP. A principal banda imunoreativa observada com soro policlonal anti-GFAP corresponde a ppH-47, mas não há correspondência entre o estado de fosforilação e a quantidade imunoreativa de GFAP em diversas regiões estudadas. Isto sugere que a ppH-47 é a isoforma fosforilada da GFAP com variável distribuição regional, ou que a variação da atividade do sistema fosforilante é devido a diferenças nas atividades quinase(s) e/ou fosfatase(s) sobre a proteína.

Characterization of ppH-47, a protein highly phosphorylated in the hippocampus. Protein phosphorylation is possibly the most important mechanism by which cellular responses are induced or controlled by extracellular signals, specially in brain tissue where substrates of the protein kinases are remarkably numerous. The phosphoprotein ppH-47 was first detected on autoradiographs prepared from micro-slices of rat hippocampus incubated with [32P]phosphate (Rodnight et al., 1988). The ppH-47 phosphorylating system has several interesting characteristics, such as Ca^{2+} dependency in adult rat, stimulation by glutamate, delayed postnatal ontogeny, and a characteristic distribution in limbic system (Rodnight et al., 1991). Moreover we observed its Triton-insolubility and absence in synaptosome. Phosphoamino acid analysis yielded phosphoserine as the only labelled amino acid. These characteristics, together with mobility in two dimensional electrophoresis and phosphopeptide mapping suggests an identity with glial fibrillary acidic protein (GFAP). The main immunoreactive band observed with anti-GFAP corresponded to ppH-47, but there was no correspondence between the phosphorylation rate of ppH-47 and the quantity of immunoreactive GFAP in the different brain regions studied. This suggests that either ppH-47 is a phosphorylated isoform of GFAP with variable regional distribution, or that variation in phosphorylating activity of the system is due to differences in protein kinase and/or phosphatase activity towards GFAP.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO

I.1	Fosforilação protéica como mecanismo de regulação celular	1
I.2	Sistemas fosforilantes cerebrais	3
I.2.1	Proteína-quinases e fosfatases.....	4
I.2.1.1	Proteína-quinases AMPc dependentes	4
I.2.1.2	Proteína-quinases GMPc dependentes	5
I.2.1.3	Proteína-quinases Ca ²⁺ /calmodulina dependentes	5
I.2.1.4	Proteína-quinases Ca ²⁺ /fosfolipídio dependentes	6
I.2.1.5	Proteína-quinases aparentemente independentes de segundos mensageiros	7
I.2.1.6	Proteína-fosfatases	8
I.2.1.7	Tirosina-quinases e fosfatases	9
I.2.2	Substratos protéicos	9
I.2.2.1	Sinapsinas	10
I.2.2.2	MARCKS	10
I.2.2.3	B-50	11
I.2.2.4	DARPP-32	12
I.2.2.5	Subunidade alfa da PQCαM II	12
I.2.2.6	Filamentos intermediários	13
I.2.2.7	Outras fosfoproteínas do citoesqueleto	14
I.3	Metodologia corrente no estudo de fosfopolipeptídeos cerebrais	15
I.3.1	³² P como marcador de fosfoproteínas	16
I.3.1.1	Marcação com [- ³²]ATP	16

I.3.1.2	Marcação com [32P]fosfato "in vitro"	17
I.3.1.4	Marcação com [32P]fosfato "in vivo"	18
I.3.2	Análise das [32P]fosfoproteínas	19
I.3.3	Análise estrutural das fosfoproteínas	20
I.3.4	Caracterização protéica pós-"electroblotting"	21
I.3.5	Análise de fosfoproteínas sem marcação com 32P	22
MOTIVOS E OBJETIVOS DESTE TRABALHO		23
II. MATERIAL E MÉTODOS		
II.1	Identificação da ppH-47 por eletroforese bidimensional em fatias de hipocampo marcadas com [32P]fosfato.....	25
II.1.1	Material	25
II.1.2	Obtenção das fatias hipocampais	25
II.1.3	Incubação das fatias com [32P]fosfato	26
II.1.3.1	Pré-incubação	26
II.1.3.2	Incubação	26
II.1.4	Solubilização da amostra protéica	27
II.1.5	Eletroforese bidimensional	28
II.1.5.1	Isoeletrofocalização não equilibrada - 1a dimensão	28
II.1.5.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS - 2a dimensão	30
II.1.6	Fixação, secagem e exposição auto-radiográfica do gel	30
II.2	Identificação do(s) resíduo(s) fosforilado(s) na ppH-47.....	30
II.2.1	Hidrólise alcalina no gel	31

II.2.2	Hidrólise ácida da ppH-47	31
II.2.2.1	Eluição da ppH-47 do gel de poliacrilamida	31
II.2.2.2	Hidrólise ácida	32
II.2.2.3	Análise dos fosfoaminoácidos	33
II.3	Mapeamento fosfopeptídico da ppH-47	
	com protease V8	34
II.3.1	Obtenção da ppH-47 para mapeamento	35
II.3.2	Mapeamento fosfopeptídico	35
II.4	Estudo da solubilidade da ppH-47.....	36
II.4.1	Estabilização da ppH-47 durante a homogeneização de fatias hipocâmpais	36
II.4.2	Ensaio de solubilização da ppH-47, analisados por eletroforese bidimensional	37
II.4.2.1	Efeito da variação força iônica	38
II.4.2.2	Extração alcalina	38
II.4.2.3	Solubilização com detergentes	39
II.4.3	Extração da ppH-47 a partir do "pellet" Triton- insolúvel, analisado por eletroforese unidimensional	39
II.5	Identificação e estudo da mobilidade eletroforética da ppH-47 na fração Triton-insolúvel.....	41
II.5.1	Coloração da ppH-47	41
II.5.1.1	Coloração com Coomassie blue	41
II.5.1.2	Coloração com prata	42
II.5.2	Identificação da ppH-47 na fração Triton-insolúvel, analisada por eletroforese unidimensional	43

II.5.2.1	Comparação da mobilidade eletroforética	43
II.5.2.2	Distribuição regional cerebral da ppH-47	44
II.5.2.3	Mapeamento fosfopeptídico	44
II.5.3	Estudo da mobilidade eletroforética em SDS-PAGE	45
II.6	Identificação de uma suposta ppH-47 em outras espécies de mamíferos (boi, coelho, cobaia e camundongo).....	45
II.6.1	Obtenção das micro-fatias cerebrais	46
II.6.2	Estudo da distribuição regional	46
II.6.3	Fosforilação Ca ²⁺ dependente	46
II.6.4	Insolubilidade da suposta ppH-47	47
II.6.5	Co-migração das amostras de boi e de rato	47
II.7	"Electroblotting" da [32P]fosfoproteínas para nitrocelulose - padronização do método.....	47
II.7.1	Material	47
II.7.2	Técnica de "electroblotting"	48
II.7.3	Variáveis estudadas	48
II.7.4	"Blotting" do gel fixado	49
II.8	Imunocaracterização da ppH-47 com anti-GFAP.....	49
II.8.1	Material e métodos	50
II.8.2	Eletrotransferência da amostra	50
II.8.3	Técnica de imunodeteccção da GFAP	51
II.8.4	Imunoidentificação da GFAP	52
II.9	Imunocaracterização da ppH-47 com anti-ppH-47	53
II.9.1	Produção do anticorpo contra ppH-47	53
II.9.1.1	Preparo da amostra	53

II.9.1.2	Identificação e excisão da banda correspondente à ppH-47 em gel de SDS-poliacrilamida	54
II.9.1.3	Produção e obtenção do antisoro contra a ppH-47	55
II.9.2	Imunoidentificação da ppH-47 com soro anti-HE	55
II.10	Eletrotransferência de [32P]fosfoproteínas fixadas do gel de poliácridamida para discos de nitrocelulose.	55
II.10.1	Padronização da medida da radiação Cerenkov - usada para avaliar o rendimento da eluição	56
II.10.2	Procedimento proposto de eletrotransferência - material e métodos	57

III. RESULTADOS

III.1	Identificação e comportamento migratório da ppH-47 em gel de SDS-poliacrilamida	60
III.1.1	Identificação da ppH-47 em eletroforese bidimensional	60
III.1.2	Identificação da ppH-47 corada com Coomassie ou prata na fração Triton-insolúvel	62
III.1.3	Identificação da ppH-47 em gel unidimensional	62
III.1.4	Comportamento migratório da ppH-47 em gel de poliácridamida	63
III.2	Análise estrutural da ppH-47 - resíduos fosforilados e mapeamento fosfopeptídico com protease V8	66
III.2.1	Identificação do sítio fosforilado da ppH-47	67
III.2.2	Mapeamento fosfopeptídico da ppH-47 com protease V8	69

III.3	Solubilidade da ppH-47. Estabilização e solubilização de [32P]fosfoproteínas de fatias hipocâmpais.....	71
III.3.1	Estudo da defosforilação da ppH-47 e outras fosfoproteínas hipocâmpais	71
III.3.2	Solubilização da ppH-47 e outras fosfoproteínas presentes em fatias hipocâmpais	73
III.4	Identificação de uma suposta ppH-47 em outras espécies de mamíferos.....	76
III.5	Eletrotransferência da ppH-47 para nitrocelulose....	82
III.5.1	Padronização do "semidry electroblotting".....	82
III.5.2	Eletrotransferência de [32P]fosfoproteínas fixadas do gel de poliacrilamida para discos de nitrocelulose	87
III.6	Imunocaracterização da ppH-47.....	91
IV. DISCUSSÃO		
IV.1	Considerações analíticas sobre a ppH-47	97
IV.2	Considerações sobre a identidade da ppH-47	107
IV.3	Considerações sobre as modificações pós-translacionais da GFAP/ppH-47	115
IV.4	Considerações sobre o possível envolvimento funcional da GFAP/ppH-47	118
CONCLUSÕES		121
PUBLICAÇÕES		124
BIBLIOGRAFIA		125

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPc - Adenosina monofosfato cíclica
- ARB - refere-se ao anticorpo "Anti-Rabbit Biotinylated"
- ATP - Adenosina trifosfato
- CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear
- CHAPS - Sulfonato de colamido-propil-dimetil amônio-propano
- DAB - Diaminobenzidina
- DAG - Diacilglicerol
- DARPP-32 - refere-se a "Dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 KDa"
- EDTA - Acido etilenodiamino-tetra-acético
- EGTA - Acido etileno glicol bis(aminoetil-éter)-tetra-acético
- GFAP - refere-se a "Glial acidic fibrillary protein"
- GMPc - Guanosina monofosfato cíclica
- HEPES - Acido etanosulfônico-2-hidroxi-etilpiperazina
- IEF - Isoeletrofocalização
- IP₃ - Inositol trifosfato
- LTP - refere-se a "Long term potentiation"
- MAP-2 - refere-se a "Microtubule associated protein-2"
- MARCKS - refere-se a "Myristoylated alanine-rich C kinase substrate"
- M-TBS - refere-se a solução "Tris buffered saline-milk"
- PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
- PDBu - Forbol 12,13-dibutirato
- PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil
- PQA - Proteína-quinase AMPc dependente
- PQC - Proteína-quinase Ca²⁺/fosfolipídeo dependente

PQCaM - Proteína-quinase Ca²⁺/calmodulina dependente

PQG - Proteína-quinase GMPc dependente

PVDF - refere-se a membranas de "polyvinylidene fluoride"

³²P ou ³²P - refere-se ao radio-isótopo 32 de fósforo

SDS - Dodecil sulfato de sódio

S-peroxidase - refere-se a peroxidase conjugada a estreptavidina

TCA - Ácido tri-cloroacético

TEMED - Tetrametiletilenodiamina

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

TBS - refere-se a solução "Tris buffered saline"

T-TBS - refere-se a solução "Tris buffered saline-Tween"

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coluna de eletrotransferência de fosfoproteínas de fragmentos de gel de poliacrilamida para disco de nitrocelulose	59
Figura 2. Cuba para eletrotransferência de fosfoproteínas de fragmentos de gel de poliacrilamida para disco de nitrocelulose.....	59
Figura 3. Eletroforese bidimensional de fatia hipocampal de rato marcada com [32P]fosfato	61
Figura 4. Eletroforese bidimensional da fração Triton-insolúvel corada	64
Figura 5. Comparação da migração da ppH-47 com a banda supostamente correspondente à ppH-47 em SDS-PAGE	64
Figura 6. Distribuição regional cerebral da banda supostamente correspondente à ppH-47 em eletroforese unidimensional	65
Figura 7. Mobilidade da ppH-47 em SDS-poliacrilamida	65
Figura 8. Ferguson "plot" da ppH-47	66
Figura 9. Alkali-labilidade da ppH-47 e outras fosfoproteínas no gel de poliacrilamida	68
Figura 10. Eletroforese de alta voltagem em papel do hidrolisado ácido da ppH-47 eluída do gel de poliacrilamida ...	68
Figura 11. Mapeamento fosfopeptídico da ppH-47 com protease V8	70
Figura 12. Mapeamento fosfopeptídico comparativo entre a ppH-47 e a suposta ppH-47 identificada em eletroforese unidimensional	70
Figura 13. Estudo da defosforilação da ppH-47 e outras fosfoproteínas em amostra hipocampal	72
Figura 14. Solubilidade da ppH-47, analisada por eletroforese bidimensional	75
Figura 15. Solubilização da ppH-47 a partir do "pellet" Triton-insolúvel, analisada por eletroforese unidimensional ...	75
Figura 16. Distribuição regional cerebral da suposta ppH-47 em outras espécies	79

Figura 17. Fosforilação Ca^{2+} dependente da suposta ppH-47 em outras espécies	80
Figura 18. Insolubilidade da suposta ppH-47 em outras espécies	81
Figura 19. Co-migração da amostra bovina com a amostra de rato	81
Figura 20. Eletrotransferência da fração Triton-insolúvel do gel para nitrocelulose usando alta densidade de corrente	85
Figura 21. Tempo de eletrotransferência da fração Triton-insolúvel do gel para nitrocelulose	86
Figura 22. Eletrotransferência de um gel fixado e seco para nitrocelulose	86
Figura 23. Curva de eletrotransferência da ppH-47 para o disco de nitrocelulose em função do tempo	90
Figura 24. Imunoidentificação da GFAP na amostra hipocampal marcada e analisada por eletroforese bidimensional	94
Figura 25. Auto-radiografia da eletroforese unidimensional da fração Triton-insolúvel de diversas regiões cerebrais	94
Figura 26. Imunoidentificação da GFAP em diversas regiões cerebrais	95
Figura 27. Imunoidentificação da GFAP em fatias de hipocampo e corda espinhal, incubadas em meio com e sem Ca^{2+}	95
Figura 28. Imunoidentificação da ppH-47 com anti-soro HE	96
Figura 29. Imunoidentificação da ppH-47 em diversas regiões cerebrais com anti-soro HE	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isoformas, estrutura, distribuição cerebral e alguns dos possíveis envoltimentos funcionais das proteínas-quinases dependentes de segundos mensageiros	8
Tabela 2. Solubilização da ppH-47 com diversos detergentes e uréia a partir do "pellet" Triton-insolúvel analisado por SDS-PAGE e semi-quantificado por densitometria	74
Tabela 3. Efeito da concentração de SDS no meio de equilíbrio sobre a transferência da ppH-47.....	89
Tabela 4. Eletrotransferência da sinapsina I e MARCKS para nitrocelulose, usando SDS 2% no meio de equilíbrio.....	90

I. INTRODUÇÃO

I.1 FOSFORILAÇÃO PROTÉICA COMO MECANISMO DE REGULAÇÃO CELULAR

A modificação protéica por fosforilação/defosforilação representa um, e possivelmente o mais importante, mecanismo de regulação celular, em eucariontes e procariontes (Krebs, 1983; Hanks et al., 1988; Edelman et al., 1987; Hunter, 1987). A fosforilação protéica ocorre reversivelmente nos resíduos de serina, treonina e tirosina mais frequentemente (Martensen, 1984). As fosfo-transferases que catalisam a transferência do fosfato do ATP para o substrato protéico são denominadas proteína-quinases e as fosfo-hidrolases que catalisam a defosforilação são denominadas proteína-fosfatases. Um sistema fosforilante, por definição, envolve minimamente uma proteína-quinase, uma proteína-fosfatase e o substrato protéico (Shacter et al., 1984a). A modificação protéica covalente por fosforilação/ defosforilação provoca modificação conformacional da proteína e conseqüentemente de sua atividade biológica.

A ubiquidade desse mecanismo pode ser justificada por diversas razões, como a enorme amplificação do sinal de origem, a alta sensibilidade e flexibilidade do sistema fosforilante e o baixo consumo energético envolvido no processo (Shacter et al., 1984a e 1984b).

A sensibilidade do sistema fosforilante refere-se a variável amplitude de respostas que podem ser obtidas frente a um único

efetor sobre a atividade das enzimas conversoras, enquanto a flexibilidade refere-se ao número de efetores que podem atuar sobre o sistema. Esses efetores, que podem ter origem intra e extracelular, são denominados mensageiros, por representarem sinais bioquímicos que modificam a atividade biológica. A flexibilidade dos sistemas fosforilantes pode ser ainda muito aumentada considerando a possibilidade de diferentes sítios fosforiláveis e suscetíveis à ação de distintas quinases e fosfatases num mesmo substrato protéico (Haycock, 1990; Browning et al., 1990; Roach, 1991).

Há três mecanismos descritos de ativação de proteína-quinases:

1. Por primeiros mensageiros, no qual o mensageiro estimula a atividade proteína-quinase presente no próprio receptor, que a seguir fosforila seus substratos. Este mecanismo está bem estabelecido em receptores para fatores de crescimento (Yarden e Ullrich, 1988; Carpenter e Cohen, 1990), no qual a tirosina frequentemente é o resíduo fosforilado.

2. Por segundos mensageiros, no qual o primeiro mensageiro (comumente um hormônio ou neurotransmissor) estimula uma atividade enzimática não-quinásica associada ao receptor. A ativação desta enzima tem como produto o segundo mensageiro que irá ativar proteína-quinases. As enzimas comprovadamente envolvidas na geração do segundo mensageiro incluem adenilciclase, guanilciclase, fosfolipase C e fosfolipase A_2 , que tem como produto AMPc, GMPc, DAG (e IP_3) e ácido araquidônico,

respectivamente. O Ca^{+2} extracelular também é considerado um segundo mensageiro, seja seu influxo regulado por receptor ou em canal voltagem-sensível. O mecanismo de ativação por segundos mensageiros parece ser o mecanismo mais geral (Walaas e Greengard, 1991).

3. Por auto-fosforilação, no qual o mensageiro estimula a atividade quinásica, que além de catalisar a fosforilação de substratos protéicos, catalisa a fosforilação em sítios específicos em sua própria subunidade reguladora. A ativação por auto-fosforilação parece ser um importante mecanismo de regulação da atividade quinásica (Blackshear et al., 1988).

Apesar das proteína-fosfatases terem recebido menos atenção que as quinases, há várias evidências de sua importância na regulação dos sistemas fosforilantes (Cohen, 1989). As proteína-fosfatases parecem apresentar uma menor especificidade que as quinases e podem ser grosseiramente classificadas quanto a dependência de cátion-divalente e a regulação por mensageiros e moduladores protéicos (Cohen et al., 1982; Ingebritsen e Cohen, 1983).

I.2 SISTEMAS FOSFORILANTES CEREBRAIS

A fosforilação protéica parece particularmente importante na regulação da atividade nervosa, devido a quantidade e diversidade de sistemas fosforilantes envolvidos em diversos processos neuro-específicos tais como a síntese de neurotransmissores, transporte axoplasmático, liberação de neurotransmissores, geração de

potenciais pós-sinápticos, transporte através de canais iônicos, motilidade e plasticidade neuronal (Cohen, 1982; Nestler e Greengard, 1983; Walaas e Greengard, 1991).

I.2.1 Proteína-quinases e fosfatases

De acordo, com a ativação por segundos mensageiros, as proteína-quinases no tecido nervoso podem ser classificadas em : a)proteína-quinases nucleotídeo-dependentes, b)proteína-quinases Ca^{2+} /calmodulina-dependentes, c)proteína-quinases Ca^{2+} / fosfolipídio-dependentes e d)proteína-quinases independentes de segundos mensageiros (Walaas e Greengard, 1991).

I.2.1.1 Proteína-quinases AMPc dependentes

A atividade da proteína-quinase AMPc dependente (PQA) no tecido cerebral é mais acentuada nas regiões corticais e núcleos da base (Walaas et al., 1983b). Atualmente, através da análise dos RNAm para esta quinase, podem ser identificados múltiplas isoformas das subunidades regulatórias e catalíticas (Tabela 1). As isoformas apresentam diferente distribuição regional no cérebro (Cadd e McKnight, 1989; Stein et al., 1987). Nas áreas corticais, por exemplo, predominam as isoformas C-alfa, RI-alfa e beta.

A presença de AMPc induz a dissociação da PQA tetramérica (Tabela 1), ativando as subunidades catalíticas (Granner, 1988). Com a hidrólise do AMPc pela fosfodiesterase nucleotídeo-dependente há uma reassociação das subunidades. O tipo II tem sua

reassociação retardada por auto-fosforilação (Rubin e Rosen, 1975).

A PQA no tecido nervoso, diferentemente em outros tecidos, tem uma alta atividade na fração particulada (Kelly et al., 1979). A interação da quinase com as membranas e o citoesqueleto é feita através da subunidade regulatória (Rubin et al., 1972; Theurkauf e Vallee, 1983).

I.2.1.2 Proteína-quinases GMPC dependentes

A proteína-quinase GMPC dependente (PQG) consiste de um homodímero (Tabela 1) que na presença de GMPC sofre uma alteração conformacional e o domínio inibidor é deslocado, liberando a atividade quinásica. A reversão é feita pela hidrólise do GMPC pela fosfodiesterase nucleotídeo-dependente (Corbin et al., 1986; Lincoln et al., 1978).

No cérebro apenas o cerebelo contém uma alta atividade de PQG, mais especificamente nas células de Purkinje (Schlichter et al., 1980).

I.2.1.3 Proteína-quinases Ca²⁺/Calmodulina dependentes

Proteína-quinase Ca²⁺/Calmodulina dependentes (PQCaM) parecem exercer um importante papel no cérebro, pela sua alta atividade e diversidade de substratos (Kennedy, 1989).

Dentre os vários tipos de PQCaM destaca-se no tecido nervoso o tipo II (Fukunaga et al., 1982; McGuinness et al., 1985), com suas várias isoformas (Tobimatsu e Fujisawa, 1989)(Tabela1). Cada

subunidade contém um domínio catalítico, um domínio regulatório calmodulina-dependente e um domínio de associação (Schulman, 1988; Kelly, 1992). No tecido nervoso predominam as subunidades alfa e beta, entretanto elas diferem na distribuição regional e localização celular (Miller e Kennedy, 1985).

No mecanismo proposto de ativação da quinase, o Ca^{2+} induz uma alteração conformacional da calmodulina, que então interage com o domínio específico da enzima. Todas as subunidades são auto-fosforiláveis (McGinness et al., 1985) e a auto-fosforilação torna a enzima Ca^{2+} /calmodulina independente (Ocorr e Schulman, 1991).

Outras quinases Ca^{2+} /calmodulina dependentes estão presentes no tecido nervoso, tais como a PQCα I associada às vesículas sinápticas (Nairn e Greengard, 1987), a PQCα III possivelmente envolvida na síntese protéica (Nairn e Palfrey, 1987) e a L-Miosina-quinase (Bartelt et al., 1987).

1.2.1.4 Proteína-quinases Ca^{2+} /fosfolipídio dependente

As proteína-quinases Ca^{2+} /fosfolipídio dependentes (PQC) estão envolvidas na mediação de muitas atividades no tecido cerebral (Tabela 1). Dentre as várias isoformas descritas (Bell e Burns, 1991), apenas as isoformas Ca^{2+} dependentes têm sido caracterizadas no tecido nervoso (Nishizuka, 1988; Ono et al., 1989).

São ativadas, na presença de Ca^{2+} , pelo diacilglicerol (DAG) liberado na membrana pela atividade da fosfolipase C induzida

pelo primeiro mensageiro (Fisher e Agranoff, 1987; Billah e Anthes, 1990). O DAG liga-se a um sítio específico, com alta afinidade por ésters de forbol, induzindo ao deslocamento do pseudo-substrato, uma domínio inibidor (Huang, 1989; Soderling, 1990).

Os tipos alfa e beta não se limitam ao tecido nervoso, enquanto o tipo gama parece ser específico deste tecido (Nishizuka, 1988). Estas isoformas são amplamente distribuídas no cérebro, sendo encontradas maiores atividades nas áreas corticais, incluindo hipocampo e cerebelo (Ito et al., 1990). Estudos citoquímicos têm demonstrado diferentes localizações subcelulares das isoformas (Kitano et al., 1987; Kose et al., 1988).

I.2.1.5 Proteínas quinases aparentemente independentes de segundos mensageiros

O tecido cerebral contém ainda uma variedade de outras quinases, independentes dos mensageiros conhecidos, que atuam em sítios de serina ou treonina. Entre elas estão a caseína-quinases (Girault et al., 1990), neurofilamento-quinases (Wible et al., 1989) e a piruvato desidrogenase quinase (Cain e Routtemberg, 1991).

Tabela 1. Isoformas, estrutura, distribuição cerebral e alguns possíveis envolvimento funcionais da proteína-quinases dependentes de segundos mensageiros (a)

QUINASE	ISOFORMAS	ESTRUTURA	DISTRIBUIÇÃO CEREBRAL	ENVOLVIMENTO FUNCIONAL
PQA	SUBUNIDADES CATALITICAS: C- α , C- β ; REGULADORIAS: RI- α , RI- β RII- α , RII- β	TETRÂMERO (R C) 2 2	ARRANJOS VARIADOS NAS DIVERSAS REGIÕES CEREBRAIS	REGULAÇÃO DE CANAIS IONICOS; SÍNTESE DE NEUROTRANSMISSORES; CONTROLE METABOLICO
PQG		HOMODÍMERO	CEREBELO (CELULAS DE PURKINJE)	REGULAÇÃO DE CANAIS IONICOS
PQCaM II	α , β , γ , δ	OLIGÔMERO COM 10 A 12 SUBUNIDADES	α e β	SÍNTESE E LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES REGULACAO DO CITOESQUELETO; LTP
PQC	α , β (1 e 2), γ , δ , ϵ , ζ , η		γ (NEUROESPECÍFICA) α e β	CRESCIMENTO; SÍNTESE E LIBERACAO DE NEUROTRANSMISSORES, REGULACAO DE CANAIS IONICOS E LTP.

(a) As informações foram compiladas a partir dos trabalhos: Hunter, 1987; Walaas e Greengard, 1991; Rodnight e Wofchuk, 1992.

I.2.1.6 Proteína-fosfatases

As proteína-fosfatases no tecido nervoso parecem possuir moduladores neuro-específicos, o que indica a importâncias destas enzimas nos sistemas fosforilantes cerebrais.

Além do inibidor-1 da proteína-fosfatase tipo 1 tem sido descrito a DARPP-32 (vide o item I.2.2.4), como inibidora neuro-específica desta fosfatase (Williams et al., 1986). Esses inibidores são fosforilados via AMPc, perdendo sua atividade inibidora sobre a fosfatase 1. A proteína-fosfatase tipo 2a no

tecido cerebral parece ser modulada pela proteína G, um substrato específico da PQG (Schlichter et al., 1978). A fosfatase tipo 2b, Ca²⁺/calmodulina dependente, também conhecida como calcineurina (Yang et al., 1982), parece estar envolvida em diversos sistemas fosforilantes no tecido cerebral, inclusive na defosforilação do inibidor 1 e DARPP-32 (Walaas e Greengard, 1991). A fosfatase tipo 2c, Mg²⁺-dependente, também é detectada no tecido nervoso (Cohen, 1982).

1.2.1.7. Tirosina-quinases e fosfatases

Além das serina/treonina-quinases e fosfatases o tecido cerebral apresenta sistemas fosforilantes ativos em resíduos de tirosina (Hirano et al., 1988), especialmente mediando a ação de fatores de crescimento (Yarden e Uldrich, 1988). Estes sítios fosforiláveis, diferentemente dos de serina/treonina, são alcáli-estáveis (Cooper et al., 1983) e as fosfatases envolvidas são insensíveis ao fluoreto, vanadato e fosfato (Jones et al., 1989).

1.2.2 Substratos protéicos

Há uma variedade de substratos fosforiláveis no tecido cerebral, incluído neurônio e glia. Esses substratos apresentam padrões de distribuição celular e sub-celular, têm sítios fosforiláveis sensíveis a uma ou mais quinases e o papel específico de cada um é ainda bastante especulativo. Serão aqui abordados somente alguns destes substratos - especialmente

aqueles supostamente identificados eletroforeticamente em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) durante a caracterização da ppH-47.

I.2.2.1 Sinapsinas

As sinapsinas são uma família de proteínas neuro-específicas, associadas a vesículas sinápticas (De Camilli et al, 1990). As sinapsinas Ia, Ib, IIa e IIb, apresentam peso molecular aparente de 86, 80, 74 e 55 KDa, respectivamente em SDS-PAGE, sendo a sinapsina I mais básica que a sinapsina II. Todas elas têm um sítio fosforilável sensível à PQA (e PQCαM I). A sinapsina I possui, além deste, dois sítios sensíveis a PQCαM II. As isoformas parecem ter uma característica distribuição regional (Sudhof et al., 1989).

A localização vesicular da sinapsina I (De Camilli et al., 1983; Rodnight et al., 1984), a interação com o citoesqueleto (Petrucci e Morrow, 1991) e a sua fosforilação Ca^{2+} dependente durante a liberação de neurotransmissores (Nichols et al., 1990) sugerem seu envolvimento na exocitose das vesículas sinápticas.

I.2.2.2 MARCKS

A MARCKS é uma fosfoproteína ácida com peso molecular aparente de 80-87 KDa em SDS-PAGE, associada a membranas e fosforilada pela PQC (Wu et al., 1982). A análise estrutural revelou uma massa molecular de 32 KDa aproximadamente, um alto conteúdo de alanina, ausência de domínios hidrofóbicos e acilação

(miristoilação), responsável pela sua interação com membranas (Stumpo et al., 1989; Erusalimsky et al., 1991). Esta proteína tem sítios de interação com calmodulina (Graff et al., 1989) e actina (Rosen et al., 1990).

Embora tenha sido apontada como envolvida na transmissão sináptica (Nichols et al., 1987), esta fosfoproteína não está limitada às terminações nervosas. É amplamente distribuída em neurônios, células gliais (Ouimet et al., 1990) e tecidos não-neurais (Blackshear et al., 1986). Devido a sua ubiquidade e relação com a actina esta fosfoproteína poderá estar envolvida na interação membrana-citoesqueleto numa diversidade de processos, especialmente aqueles associados ao crescimento celular.

I.2.2.3 B-50

A B-50, também denominada GAP-43, F1, pp46, pp57 e neuromodulina, é uma fosfoproteína com peso molecular aparente de 45 KDa em SDS-PAGE, ponto isoelétrico de 4.3-4.6, associada a membranas e fosforilada pela PQC (Nelson e Routtemberg, 1985). Esta fosfoproteína tem muitas características similares à MARCKS, sem no entanto apresentar qualquer sequência homóloga a esta. A análise estrutural da B-50 (Benowitz et al., 1987) revela uma massa molecular de 24 KDa, ausência de domínios hidrofóbicos e acilação (palmitoilação), responsável pela sua associação com as membranas. Como a MARCKS apresenta interação com a calmodulina (Liu e Storm, 1990) e actina (Moss et al., 1990).

Embora tenha uma localização predominantemente pré-sináptica

e esteja aumentada durante a sinaptogênese, sua presença parece não estar limitada aos neurônios (Vitkovic et al., 1988). No neurônio a B-50 parece estar envolvida na transmissão e plasticidade sináptica (Coggins e Zwiers, 1991).

I.2.2.4 DARPP-32

A DARPP-32 é uma fosfoproteína com peso molecular aparente de 32 KDa em SDS-PAGE, com ponto isoelétrico de 4.7, cuja fosforilação é regulada por dopamina, via PQA (Walaas et al., 1983a). Esta proteína está localizada em neurônios e alguns tipos de células não-neurais que contém receptores D1 (Meister et al., 1989). No tecido cerebral a DARPP-32, associada ao sistema dopaminérgico, está enriquecida no caudato-putamen.

Esta fosfoproteína apresenta algumas sequências homólogas ao inibidor 1 da proteína-fosfatase 1 (Williams et al., 1986). Esta proteína apresenta dois sítios fosforiláveis - um de serina e outro de treonina, este fosforilado via PQA (Girault et al., 1990). A DARPP-32 parece estar envolvida na regulação das funções neuronais mediadas por dopamina, bem como também pode estar envolvida na regulação de muitos outros sistemas fosforilantes cerebrais, via inibição da fosfatase 1 (Walaas e Greengard, 1991).

I.2.2.5 Subunidade alfa da PQCαM II

A subunidade alfa da proteína-quinase Ca²⁺/calmodulina dependente tipo II é uma fosfoproteína com peso molecular em SDS-PAGE de 50 KDa, bastante evidenciada na fração pós-sináptica,

associada a proteínas de membrana e do citoesqueleto - possíveis substratos desta quinase (Kelly e Cotman, 1978; Kelly et al., 1984).

A subunidade alfa pode representar 20 a 50% da proteína nas densidades pós-sinápticas (Kennedy et al., 1983). No entanto, várias evidências apontam sua importância na fração pré-sináptica (Lin et al., 1990). A subunidade alfa está fortemente presente no hipocampo (chegando a representar 2% da proteína tissular) e outras áreas corticais e tem pequena presença no cerebelo e medula espinhal.

Esta proteína possivelmente esteja envolvida na transmissão sináptica e em muitas outras atividades nervosas. Além disso, talvez tenha um papel estrutural, não enzimático, junto às proteínas do citoesqueleto nas densidades pós-sinápticas (Kelly e Cotmann, 1978; Rostas et al., 1986).

1.2.2.6 Filamentos intermediários

Os filamentos intermediários do citoesqueleto aparentemente estão envolvidos na determinação da especificidade da matriz celular (Getzenberg et al., 1990). Os neurônios e astrócitos têm como proteínas formadoras de filamentos intermediários específicos - neurofilamentos (NF) e proteína glial fibrilar ácida (GFAP), respectivamente.

As proteínas de neurofilamentos NF-H, NF-M e NF-L têm pesos moleculares aparentes de 200, 140 e 68 KDa em SDS-PAGE, respectivamente (Lazarides, 1982; Carden et al., 1985). Parecem

haver múltiplos sítios de fosforilação N e C-terminais nos neurofilamentos. Os sítios amino-terminais parecem ser sensíveis à PQC e PQA, enquanto os sítios carboxi-terminais à quinases independentes de segundos mensageiros. Os neurofilamentos estão envolvidos no transporte axonal e a defosforilação N-terminal destas proteínas tem sido relacionada à polimerização fibrilar e à interação com outras proteínas do citoesqueleto e membrana plasmática (Sihag e Nixon, 1990).

A fosforilação da GFAP (50 KDa - pI 6.1) foi obtida em células intactas (Browning e Ruina, 1984) e parece ocorrer via PQA e PQC (Harrison e Mobley, 1991). A fosforilação desta proteína em astrócitos aparentemente não está fundamentalmente relacionada com a polimerização fibrilar, como acontece com outras proteínas de filamentos intermediários (Noetzel, 1990). Outra fosfoproteína de filamento intermediário encontrada em astrócitos, é a vimentina (60 KDa-pI 5.3) - uma proteína associada a células de origem mesenquimal (Harrison e Mobley, 1989).

I.2.2.7 Outras fosfoproteínas do citoesqueleto

Além das proteínas de filamentos intermediários muitas outras proteínas do citoesqueleto nervoso são fosforiláveis, como a tubulina e as proteínas associadas à microtúbulos, possivelmente via PQCαM II e PQA (Yamamoto et al., 1985). Dentre as proteínas associadas à microtúbulos destacam-se no tecido cerebral a MAP-2, enriquecida na fração dendrítica, e as proteínas tau,

enriquecidas no axônio . Estas proteínas são sensíveis a uma diversidade de quinases (Yamamoto et al., 1985; Akiyama et al., 1986; Hoshi et al., 1987). Estas fosfoproteínas parecem regular formação microtubular, estando possivelmente envolvidas na plasticidade neuronal (Matus, 1988).

A fosforilação da actina é incerta, porém é evidente a sua interação com diversas outras fosfoproteínas cerebrais do citoesqueleto como as sinapsinas ou fosfoproteínas associadas membranas como a MARCKS e a B-50 (Walaas e Greengard, 1991).

I.3 METODOLOGIA CORRENTE NO ESTUDO DE FOSFOPOLIPEPTÍDEOS CEREBRAIS

Há uma variedade de métodos disponíveis para o estudo de fosfoproteínas, incluindo : (a) o uso de ^{32}P como marcador de fosfoproteínas, (b) identificação de fosfoproteínas por reações de coloração para o fosfato, e (c) por imuno-reações usando anticorpos contra a forma fosforilada da proteína (Nairn et al., 1982; Sternberg e Sternberg, 1983).

A análise da amostra protéica frequentemente envolve a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), unidimensional (Laemmli, 1970) ou bidimensional (O'Farrel, 1975). As proteínas separadas no gel poder ser eluidas (Harrington, 1990) ou transferidas para matrizes imobilizantes (Timmons e Dunbar, 1990) e desta forma podem ser submetidas à análise estrutural ou usadas para a produção de anticorpos. A transferência para membranas de nitrocelulose, num processo introduzido por Towbin e

colaboradores (1979), tem facilitado bastante no processo de caracterização protéica.

I.3.1 ^{32}P como marcador de fosfoproteínas

O uso de ^{32}P como marcador de fosfoproteínas é o método mais comum e mais eficiente. A [^{32}P]fosfoproteína analisada, devido à emissão beta, pode ser detectada por auto-radiografia e por contagem da cintilação e/ou radiação de Cerenkov (Gould, 1972). O ^{32}P pode ser incorporado via adição de [γ - ^{32}P]ATP ou [^{32}P]fosfato. A adição de [^{32}P]fosfato exige a integridade do sistema de fosforilação oxidativa para síntese de ATP marcado.

I.3.1.1 Marcação com [γ - ^{32}P]ATP

Grande parte dos sistemas fosforilantes são estudados usando [γ - ^{32}P]ATP como doador de fosfato. Este procedimento fornece informação sobre os ativadores e inibidores do sistema, bem como da possível localização subcelular. Muitas variantes deste procedimento incluindo adição de quinases purificadas e substratos exógenos permitem estabelecer a cinética enzimática do sistema fosforilante.

O tecido cerebral possui uma variedade de neurônios e células gliais, com diversos compartimentos subcelulares, cada qual com distintos sistemas fosforilantes. Durante a homogeneização tissular essa compartimentalização é rompida, podendo levar a falsos-positivos, isto é, gerando sistemas fosforilantes não existentes na situação fisiológica, ou levar a

falsos-negativos, isto é, fazendo desaparecer sistemas fosforilantes presentes "in vivo" (Nestler e Greengard, 1984a). Desta forma é imprescindível a confirmação de sistemas fosforilantes usando procedimentos com células ou frações intactas (Rodnight et al., 1986).

1.3.1.2 Marcação com [32P]fosfato "in vitro"

No tecido nervoso a marcação com [32P]fosfato "in vitro" frequentemente envolve a fração sinaptossomal, fatias cerebrais (Rodnight et al., 1986) e cultura de células (Weiss et al., 1989; Molloy e Kennedy, 1991).

Os sinaptossomas têm sido usados como um bom modelo da situação pré-sináptica, permitindo o estudo de sistemas fosforilantes durante a despolarização e liberação de neurotransmissores (Dunkley et al., 1986a e 1986b).

O procedimento usando fatias cerebrais tem sido bastante utilizado (Yip e Kelly, 1989; Rodnight et al., 1988), devido ao fato dos sistemas fosforilantes serem mantidos compartimentalizados de forma bastante íntegra, numa situação próxima à fisiológica, exceto por estar isolado e livre da modulação intercelular da situação "in vivo". Além disso, as fatias cerebrais permitem uma diversidade de estudos tais como isquemia (Whittingham et al., 1984), despolarização (Crowder et al., 1987) e liberação de neurotransmissores (Ribeiro e Gomez, 1986).

O fracionamento sub-celular a partir de fatias incubadas com [32P]fosfato tem sido tentado, com o objetivo de localizar os

sistemas fosforilantes. Neste caso o principal problema enfrentado é a defosforilação durante o fracionamento (Jones et al., 1989; Gordon, 1991).

Uma variante do estudo "in vitro" com preparações celulares intactas é denominada "back phosphorylation" (Nestler e Greengard, 1984b). Esta consiste em estimular uma preparação de tecido intacto. Depois o tecido é fracionado e à fração em estudo é adicionada uma proteína-quinase purificada e [γ - 32 P]ATP. Neste procedimento serão evidenciados os sítios "livres", isto é, os sítios não fosforilados com a estimulação. Existem diversas dificuldades experimentais neste procedimento, especialmente em manter inibidas quinases e fosfatases após a estimulação e durante o fracionamento.

O uso de cultura de células neuronais (Molloy e Kennedy, 1991) e gliais (Harrison e Mobley, 1989) permite a caracterização celular específica de muitas fosfoproteínas com a incubação com [32]fosfato. No entanto, deve-se ser levada em conta a ausência da modulação inter-celular, até talvez mais acentuada que em fatias cerebrais, devido a alteração da matriz extra-celular (Getzenberg et al., 1990).

I.3.1.3 Marcação com [32 P]fosfato "in vivo"

Este procedimento é bastante valioso na demonstração e compreensão de sistemas fosforilantes. Comumente é feito por injeção de [32 P]fosfato nos ventrículos cerebrais (Murthy et al, 1985) ou por infusão canular de [32 P] no tecido cerebral (Mitrius

et al., 1981; Rodnight et al., 1985). A defosforilação post-mortem é comumente evitada pelo uso de N₂ líquido no congelamento cerebral.

A marcação "in vivo" aproxima-se da situação fisiológica, sem esquecer o fato de que o animal anestesiado tem importantes alterações na atividade nervosa, possivelmente reguladas por sistemas fosforilantes que portanto, podem não corresponder à real situação em vida.

I.3.2 Análise das [32P]fosfoproteínas

As [32P]fosfoproteínas são comumente analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), uni (Gower e Rodnight, 1986) ou bidimensional (Rodnight et al., 1988; Baciú e Durham, 1990).

A eletroforese bidimensional tem sido um poderoso processo analítico de proteínas cerebrais (Heydorn et al., 1983; Semple-Rowland et al., 1991; Marshall e Williams, 1991). A primeira separação, baseada na carga da proteína, é feita num gel de poliacrilamida/uréia, cilíndrico com pequeno diâmetro, onde o gradiente de pH é mantido por anfólinas. Gradientes imobilizados de pH têm sido usados na tentativa de melhorar a reprodutibilidade do processo (Gorg, 1991). A isoeletrofocalização não equilibrada na primeira dimensão (O'Farrel et al., 1977) tem como vantagens a identificação de proteínas básicas e um reduzido tempo de corrida (Rodnight et al., 1988).

A eletroforese unidimensional (e a segunda etapa da

eletroforese bidimensional) é feita em gel de SDS-poliacrilamida. O uso do SDS ampliou a resolução da eletroforese protéica e permitiu estimar o peso molecular aparente dos polipeptídios analisados (Neville, 1971). No entanto, algumas fosfoproteínas apresentam uma mobilidade irregular em SDS-PAGE (Gower e Rodnight, 1986), indicando pesos moleculares aparentes muito diferentes da realidade, como é o caso da MARCKS (Erusalimsky et al., 1991).

Outros métodos têm sido propostos para análise de fosfoproteínas incluindo cromatografia líquida substituindo a isoeletrofocalização (Leoni et al., 1990) ou fazendo-a em "slab" gel (Maurides et al, 1989).

I.3.3 Análise estrutural das fosfoproteínas

A análise estrutural de fosfoproteínas envolve inicialmente a determinação de sítios fosforilados e o mapeamento fosfopeptídico.

As fosfoproteínas analisadas em SDS-PAGE podem ser caracterizadas quanto alcali-labilidade na presença de KOH, sugerindo fosforilação em serina e/ou treonina. Fosfoproteínas eluídas do gel podem ser submetidas à hidrólise ácida e a seguir os fosfoaminoácidos podem ser identificados por cromatografia e/ou eletroforese de alta voltagem (Cooper et al., 1983).

O mapeamento peptídico tem auxiliado bastante na identificação de proteínas e consiste na análise dos peptídios resultantes da ação proteolítica de enzimas ou agentes químicos

(Judd, 1990). A proteólise enzimática é feita comumente com protease V8 e/ou tripsina. O uso da protease V8 tem sido mais frequente devido a facilidade de executar a proteólise "in situ" simultânea com a análise dos peptídios resultantes (Cleveland et al., 1977). O mapeamento fosfopeptídico com protease V8 tem sido bastante usado na caracterização de fosfoproteínas cerebrais (Browning e Ruina, 1984; Dunkley et al., 1986; Yip e Kelly, 1989).

I.3.4 Caracterização protéica pós-"electroblotting"

A eletrotransferência das proteínas separadas em SDS-PAGE para membranas de nitrocelulose (Burnette, 1981), nylon (Gershoni e Palade, 1982) e PVDF (Gultekin e Heermann, 1988) tem facilitado e acelerado o processo de caracterização protéica. As proteínas eletroblotadas podem ser caracterizadas com anticorpos (Timmons e Dunbar, 1990) ou pela afinidade com outras proteínas como calmodulina e lectinas (Hankes, 1982; Flanagan et al., 1984). Proteínas ligantes de Ca^{2+} podem ser identificadas em membranas de nitrocelulose (Zorzato e Volpe, 1988).

Além disso, pequenas quantidades de proteínas eletroblotadas podem ser usadas para produção de anticorpos (Abou-Zeid et al., 1987), análise estrutural e sequenciamento (Aebersold et al., 1987; Matsuidara, 1987). A eletroforese bidimensional seguida de "electroblotting" parece ser uma promissora metodologia na análise de proteínas cerebrais (Mobbs et al., 1989). A eletrotransferência de fosfoproteínas para membranas como PVDF

poderá facilitar a identificação dos sítios fosforilados (LeGendre, 1990).

I.3.5 Análise de fosfoproteínas sem marcação com ^{32}P

Outros métodos, menos comuns e menos sensíveis, são utilizados no estudo de fosfoproteínas sem envolver marcação com ^{32}P . Um desses métodos consiste em identificar fosfoproteínas em SDS-PAGE através de uma reação específica para o grupamento fosfato (Cutting, 1989). Outro método utilizado consiste em identificar e quantificar os resíduos fosforilados, especialmente fosfoserina, em frações protéicas ácido-hidrolisadas (Salbego e Souza, 1987; Gonçalves et al., 1990a).

I.4 MOTIVOS E OBJETIVOS DESTE TRABALHO

Atualmente são conhecidos uma centena de sistemas fosforilantes cerebrais e o papel desempenhado por eles na atividade nervosa, na grande maioria dos casos, permanece ainda incompreendido. A caracterização de fosfoproteínas neuronais e gliais, envolvendo a identificação da forma fosforilada de proteínas com atividade já conhecidas ou a identificação de atividades, estruturais ou enzimáticas, em fosfoproteínas desconhecidas, poderá contribuir para a compreensão da base molecular da atividade nervosa.

O nosso grupo tem se dedicado ao estudo de sistemas fosforilantes cerebrais, particularmente aqueles envolvidos na plasticidade neuronal. Um estudo de fosfoproteínas em microfatias cerebrais de rato incubadas com $[^{32}\text{P}]$ fosfato e analisadas por eletroforese bidimensional evidenciou a presença de uma fosfoproteína de peso molecular aparente de 50 KDa, ponto isoelétrico de 6,3, cuja fosforilação era acentuada em hipocampo e dependente de Ca^{2+} (Rodnight et al., 1988). Inicialmente esta fosfoproteína foi denominada HP-50 (Gonçalves e Rodnight, 1989, Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular).

Posteriormente alguns dados apontaram a importância deste sistema fosforilante, especialmente a ontogenia pós-natal (Salbego, 1990) e confirmação de sua presença mais acentuada em hipocampo e outras estruturas do sistema límbico em rato

(Rodnight e Leal, 1990). A taxa de fosforilação da ppH-47 mais acentuada nas estruturas do sistema límbico, um sistema estreitamente relacionado à plasticidade sináptica, bem como a ontogenia pós-natal, concomitante com a sinaptogênese, sugerem a possibilidade de envolvimento desta fosfoproteína na plasticidade neuronal.

Assim a caracterização desta fosfoproteína tornou-se uma necessidade para: (a) estabelecer sua identidade com alguma proteína já conhecida e/ou (b) elaborar um protocolo de purificação de modo a ampliar o conhecimento a cerca de sua existência.

OBJETIVOS:

1. Identificação da ppH-47 por eletroforese bi-dimensional de fatias de hipocampo incubadas com [32P]fosfato;
2. Identificação do(s) sítios fosforilado(s) da ppH-47;
3. Mapeamento fosfopeptídico;
4. Estudo da solubilidade;
5. Identificação da ppH-47 sem marcação tecidual com [32P]fosfato;
6. Identificação da ppH-47 em outras espécies de mamíferos;
7. Caracterização imunológica da ppH-47.

II MATERIAL E MÉTODOS

II.1 IDENTIFICAÇÃO DA pPH-47 POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM FATIAS DE HIPOCAMPO MARCADAS COM [32P]FOSFATO

Este procedimento foi baseado no método descrito por Rodnight e colaboradores para o estudo da fosforilação protéica em micro-fatias cerebrais de rato (Rodnight et al., 1988), introduzindo pequenas modificações.

II.1.1 Material

Foram utilizados ratos Wistar adultos (60-90 dias), procedentes do Biotério do Instituto de Biociências, UFRGS. Acrilamida, bis-acrilamida, agarose, citocromo C, dodecil sulfato de sódio (SDS), 2-mercaptoetanol, Nonidet P-40, Tris(hidroxi-metil)aminometano (Tris) e tetrametiletilenodiamina (TEMED) foram procedentes da Sigma. As anfolinas 2-4 foi proveniente da Serva, enquanto as anfolinas 3,5-10 e 5-7 foram da LKB. Uréia, hidróxido de sódio, glicose e os sais utilizados no meio de incubação foram provenientes da Merck. O [32P]Na₂HPO₄ foi obtido do CNEN, São Paulo. Filmes de Raio-X e outros materiais fotográficos forma procedentes da Kodak. Os demais reagentes, todos p.a., foram provenientes da Reagen.

II.1.2 Obtenção das fatias hipocampais

Os ratos foram mortos por decapitação e o cérebro imediatamente retirado e colocado sobre papel de filtro em uma

placa de Petri mantida em gelo. O papel era previamente molhado com o meio de incubação (item II.1.3). Os hipocampos eram retirados e colocados sobre um disco de papel de filtro Whatman. A seguir o tecido era fatiado transversalmente num McIlwain "chopper", ajustado para 0,4 mm de espessura. O hipocampo fatiado era transferido para uma pequena placa de Petri contendo meio de incubação, onde com auxílio de delicados pincéis, as fatias obtidas eram separadas.

II.1.3 Incubação das fatias com [32P]fosfato

II.1.3.1 Pré-incubação

As fatias hipocampais (6 a 8 fatias) eram transferidas, com auxílio de um pincel, para um tubo de poliestireno com tampa, contendo 0,6-0,8 ml de meio de incubação, gelado e previamente gaseificado com O₂. O meio de incubação era composto de: NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1,3 mM, Glicose 1,2 mM, CaCl₂ 1 mM e HEPES sódico 25 mM. Os tubos contendo as fatias eram gaseificados mais uma vez e tampados. As fatias eram incubadas (pré-incubadas) durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 30°C).

II.1.3.2 Incubação

O meio de pré-incubação era retirado cuidadosamente com auxílio de uma seringa ou pipeta Pasteur. A seguir era adicionado 0,3 - 0,4 ml de meio de incubação contendo [32P]fosfato (50 a 60 µCi por fatia ou 50 µl de meio). Novamente o tubo era gaseificado com O₂ e as fatias eram incubadas a 30°C por 60 minutos, com

agitação suave e periódica, a cada 5 minutos. A incubação era interrompida com ácido tricloroacético (TCA) 10% e o tubo transferido para o gelo.

Em alguns experimentos era adicionado PDBu (forbol 12,13 dibutirato) no meio de incubação (concentração final de 1 μ M) para caracterizar substratos da PQC. Isto foi feito no estudo da defosforilação protéica durante a homogeneização de fatias (item II.4.1) e na hidrólise alcalina de fosfoproteínas no gel de poliacrilamida (item II.2.1).

II.1.4 Solubilização da amostra protéica

As fatias incubadas eram lavadas com TCA 4% para retirar o $[^{32}\text{P}]$ fosfato livre e a seguir lavadas com água destilada gelada (ou etanol 80%) para remover o excesso de TCA. Então as fatias eram transferidas para tubos de Eppendorf contendo a solução A de lise, composta de: Uréia 9,5 M; lisina 12,5 mM; SDS 1%; 2-mercaptoetanol 2%; azul de bromofenol aproximadamente 0.005%. O volume de solução A era de 20 μ l por fatia. As fatias eram dissolvidas com agitação vigorosa em vortex. Algumas vezes a dissolução era facilitada pelo uso de um delicado bastão de vidro ou pelo congelamento/descongelamento. A seguir era adicionada a solução B de lise, 80 μ l por fatia. Esta solução tinha uma composição similar à solução B, diferindo apenas pelo Nonidet P-40 5% substituindo o SDS. A amostra era congelada e, antes da aplicação eletroforética, centrifugada em Spin I (aproximadamente 15.000 x g) durante 3 minutos, para separar os

fragmentos insolúveis de tecido.

II.1.5 Eletroforese bidimensional

II.1.5.1 Isoeletrofocalização (IEF) não-equilibrada - 1a dimensão

A amostra era aplicada sobre um gel cilíndrico de poliacrilamida, com 1,0 mm de diâmetro e comprimento de 11,5 a 13,5 cm, contendo: acrilamida/bis-acrilamida (29/1) 3,5%; uréia 9,5 M; anfolinas 2-4, 3,5-10 e 5-7 com concentração de 0,5%, 4,0% e 0,5%, respectivamente; Nonidet P-40 4%. O gel era polimerizado em tubos cilíndricos (1,5 mm x 16 cm) adicionando 1 µl de TEMED e 3 µl de persulfato de amônio 5% em 0,3 ml da mistura de gel, que a seguir era introduzido no tubo, posicionado verticalmente, através da pressão negativa produzida por uma seringa conectada a outra extremidade do tubo. O gel era introduzido até 2,5 a 4,5 cm do topo do tubo, espaço onde seria aplicada a amostra. A polimerização era completa em 2 a 3 horas.

O volume de amostra aplicado variou de 15 a 50 µl. Sobre a amostra eram colocados 20 a 25 µl de uma solução de uréia 8 M contendo citocromo C (aproximadamente 8 g%), usado como marcador da frente de isoeletrofocalização não-equilibrada.

NaOH 20 mM foi usado como cátólito e H₃PO₄ 10 mM como ânólito. A solução de NaOH era degaseificada previamente. A corrida foi feita a voltagem de 400V até banda principal de citocromo atingir 7,5 cm da origem, em aproximadamente 3h. Em outro procedimento, usando potência elétrica constante de 0,1 W/tubo, a voltagem variou de 400 a 800V durante a corrida.

Após a corrida o géis eram congelados (-20°C) até a transferência para a segunda dimensão.

II.1.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) - 2a dimensão

Placas de gel de poliacrilamida 8% foram preparadas em bloco (8 placas). Cada placa de gel, montada entre duas placas de vidro, media 16 cm de largura, 14 cm de comprimento e 1 mm de espessura. O gel de poliacrilamida contendo: acrilamida/ bis-acrilamida (39/1), 8%; tampão Tris-HCl 1,9 M pH 8,0, 22,5% e SDS 0,1% era polimerizado adicionando TEMED e persulfato de amônio numa concentração final de 50 μl % e 0,04%, respectivamente. A mistura de gel antes da adição de TEMED e persulfato era degaseificada, aproximadamente por 10 min.

O gel da primeira dimensão era aplicado sobre o gel de entrada 4%, preparado acima do gel de separação 8%. O gel de IEF era descongelado e expulso do tubo, com auxílio de uma seringa, para um meio de equilíbrio contendo: Tris-Glicina 25 e 190 mM, respectivamente; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 0,1%; azul de bromofenol, aproximadamente 0,005%. O gel de IEF era equilibrado sob agitação suave durante 15 min e transferido para o gel da segunda dimensão, colocando-se a extremidade ácida do gel de IEF no centro da placa do gel e a extremidade básica (cortada a 8 cm do topo) na lateral da placa. Desta forma eram aplicado dois géis de IEF por placa de gel na segunda dimensão.

O gel transferido era fixado com agarose 1%. O tampão

superior (catódico) era composto de : Tris-Glicina 25 e 190 mM, respectivamente; SDS 0,1% e 2-mercaptoetanol 0,1%, enquanto o tampão inferior (anódico) era Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. O 2-mercaptoetanol estava presente também na agarose e podia ser omitido no tampão superior sem alterar a qualidade dos resultados.

A corrida eletroforética era feita fixando-se a voltagem máxima em 120 V e a amperagem inicial era de 20 mA/placa. O corante (azul de bromofenol) atingia o final do gel em aproximadamente 7 horas.

II.1.6 Fixação, secagem e exposição auto-radiográfica do gel

Ao final da corrida o gel era fixado durante a noite em metanol - ácido acético, 53 e 7%, respectivamente. Depois era colocado em solução de secagem contendo metanol 50% e glicerol 1%, por duas horas e seguir era seco entre duas folhas de papel celofane (Juang et al., 1984).

O gel seco era montado sobre uma placa de Eucatex. Sobre o gel era colocado o filme de raio X (13 x 18 cm, X-OMAT, Kodak) e sobre este uma placa intensificadora (13 x 18 cm, Cronex, Du Pont). O conjunto era colocado a -70°C , durante 12 a 48 horas, dependendo da marcação e quantidade da amostra. O filme era revelado e fixado de acordo com as recomendações da Kodak.

II.2 IDENTIFICAÇÃO DO(S) RESÍDUO(S) FOSFORILADO(S) NA ppH-47

A identificação do(s) sítio(s) fosforilado(s) foi feita: (a)

por hidrólise alcalina das [32P]fosfoproteínas no gel de poliacrilamida (Copper et al., 1983) e (b) por análise dos [32P]fosfoaminoácidos resultantes da hidrólise ácida da ppH-47 eluída do gel de poliacrilamida (Martensen, 1984).

II.2.1 Hidrólise alcalina no gel

O gel de poliacrilamida seco, após a ser auto-radiografado, era colocado em um recipiente contendo 200 ml KOH 1 M. O papel celofane pode ser retirado após 15 minutos, com auxílio de pinças. O recipiente, devidamente tampado, era então colocado na estufa a 60°C, durante 3 horas. A solução de KOH foi substituída a cada hora. O manuseio do gel deve ser extremamente cuidadoso, devido a dilatação e fragilidade do gel durante o processo. O uso de uma peneira sob o gel facilitou o manuseio. Cuidado também deve ser tomado com o vapor de NH₄⁺ liberado durante o procedimento. Após a hidrólise o gel foi desidratado, lentamente, com diferentes soluções de metanol e ácido acético, até retomar aproximadamente seu tamanho inicial. A seguir era seco e novamente exposto para auto-radiografia. A comparação dos filmes obtidos, antes e depois da hidrólise, permitiu a identificação de resíduos fosforilados álcali-estáveis.

II.2.2 Hidrólise ácida da ppH-47

II.2.2.1 Eluição da ppH-47 do gel de poliacrilamida

A ppH-47 foi eluída do gel de poliacrilamida por homogeneização (Gurd, 1985). Áreas de gel correspondentes às

manchas auto-radiográficas de ppH-47 foram recortadas e colocadas numa placa de Petri com água destilada, durante 5 minutos, onde a seguir o papel celofane foi retirado. Depois os fragmentos de gel foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 10 mM e albumina 100 µg/ml. Cerca de 0,25 cm² de gel (seco), correspondente à área de 8 manchas de ppH-47, foi homogeneizado manualmente em 0,5 ml dessa solução num pequeno Potter Elvehjem. O homogeneizado foi transferido para um tubo de Eppendorf e centrifugado em Spin I (aproximadamente 15.000 x g), durante 5 min. O sobrenadante (eluato) foi transferido para um tubo de centrífuga. O "pellet" foi ressuspense em 0,5 ml da mesma solução usada na homogeneização e recentrifugado. O segundo sobrenadante foi adicionado ao primeiro. A seguir foi adicionado 1 ml de TCA 20% ao eluato. A mistura foi mantida no gelo por 15 minutos e então centrifugada a 10.000 x g em Sorvall RC2-B, durante 10 minutos - a fim de remover sais e SDS antes da hidrólise ácida (Martensen, 1984). A amostra protéica precipitada foi delipidada com 1 ml de etanol-éter etílico (1:1).

II.2.2.2 Hidrólise ácida

A proteína TCA-precipitada foi ressuspensa em 0,3 ml de HCl 6N, com auxílio de um delicado bastão de vidro e transferido para um tubo Pirex com tampa-rosca. A hidrólise foi feita em estufa a 110°C, durante 90 minutos. O resíduo ácido foi removido em dessecador, contra KOH em pastilhas.

II.2.2.3 Análise do(s) fosfoaminoácido(s)

A análise dos [³²P]fosfoaminoácidos no hidrolisado protéico foi feita por eletroforese de alta voltagem, em papel com duas corridas unidimensionais (Martensen et al., 1984; Hirano et al., 1988).

O hidrolisado protéico foi ressuspenso em 25 µl de água destilada e 20 µl eram aplicado sobre papel 3MM. A folha de papel media 20 x 30 cm. A amostra e os padrões de fosfoaminoácidos (1µg/µl) eram aplicados sobre uma linha suavemente traçada com lápis, a 1 cm do bordo da base da folha. Cerca de 2µl de cada padrão eram aplicados lateralmente ou junto à amostra hidrolisada.

Após a aplicação a folha de papel era molhada com o tampão da primeira corrida : ácido acético glacial, 156 ml /ácido fórmico 88%, 50 ml/ água destilada, 1794 ml (pH 1,9). O papel molhado era colocado na superfície horizontal de uma câmara para eletroforese em alta voltagem, modelo Shandon L24, acoplada a uma fonte do tipo HVE-Shandon. A folha era colocada de modo que a linha onde foram aplicados os padrões e a amostra (origem) ficasse no lado do cátodo. Pontes com papel de filtro molhadas com o tampão eram feitas entre a folha de papel 3MM e as cubas dos eletrodos. O tampão 1,9 era colocado em ambas as cubas.

A corrida era iniciada com voltagem de 500 V, durante 10 minutos e a seguir aumentada para 2000 V, durante 45 minutos. A amperagem nestas condições teve seu valor máximo em torno de 70 mA. Um sistema de resfriamento, com água gelada circulante, foi

conectado a câmara de eletroforese. Ao final da corrida a folha de papel era seca, durante 2 horas, em capela.

A seguir a folha era molhada com o segundo tampão: ácido acético glacial, 100 ml/piridina, 10ml/água destilada, 1890 ml (pH 3,5). O papel era colocado na câmara de alta voltagem como descrito acima. A segunda corrida também era feita a 2000 V, durante 45 min. Ao fim da corrida a folha era seca, durante 2 horas, em capela.

Depois a folha era imersa brevemente em ninhidrina 0,2% (em acetona) e colocada em capela, durante 5 min. A seguir era colocada na estufa, 60°C, durante 2 a 4 minutos. A folha era então colocada sobre uma placa de Eucatex, como descrito para o gel seco, e exposta ao filme de raio X. A exposição durava 6 a 12 dias.

III.3 MAPEAMENTO FOSFOPEPTÍDICO DA ppH-47 COM PROTEASE V8

O procedimento utilizado envolveu o mapeamento fosfopeptídico da ppH-47 com protease V8, "in situ" (Cleveland et al, 1977). Uma solução estoque de protease V8 de *Staphylococcus aureus*, proveniente da Sigma, foi preparada (1 mg em 1 ml de tampão Tris-HCl 125 mM, pH 6,8) e armazenada no freezer. A ppH-47 foi obtida do gel de poliacrilamida de eletroforese bidimensional (de fatias hipocâmpais) ou unidimensional (da fração hipocâmpal Triton-insolúvel, vide item II.4).

II.3.1 Obtenção da ppH-47 para mapeamento

Para aumentar a quantidade de amostras de ppH-47 para o mapeamento peptídico, uma pequena modificação na técnica de eletroforese bidimensional foi feita. Foram transferidas 4 géis de IEF na segunda dimensão ao invés de 2, para um único gel de SDS-poliacrilamida. Os géis de IEF ao serem colocados sobre a placa de gel da segunda dimensão eram cuidadosamente cortados 2 cm abaixo da origem (extremidade ácida) e 6 cm abaixo da origem (extremidade básica). O pedaço central de gel, de 4 cm, era aplicado sobre a placa de gel e colados com agarose 1%. Desta forma era possível aplicar 4 géis "curtos" de IEF ao invés de 2. O cálculo do comprimento de gel de IEF a ser aplicado teve por base a proporção entre o tamanho do gel e a posição do ppH-47 no filme auto-radiográfico obtido do gel seco.

III.3.2 Mapeamento fosfopeptídico

As áreas do gel correspondentes à ppH-47 eram recortadas. Os fragmentos de gel contendo a ppH-47 eram colocados em tampão Tris-HCl 125 mM, durante 5 min. Após a retirada do papel celofane, os fragmentos eram equilibrados em tampão Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1% e EDTA 1 mM, durante 30 min, sob agitação suave.

O gel de poliacrilamida para separação dos fosfopeptídios resultantes da proteólise tinha a seguinte composição: Acrilamida/bis-acrilamida (39/1), 15% ; Tampão Tris HCl 1,9 M (pH 8,7), 20%; SDS 0,1%; TEMED 50 µl% e persulfato de amônio 0,04%. O

gel de separação tinha 1 mm de espessura, 10 cm de largura e 14 cm de comprimento. O gel de entrada, onde ocorria a proteólise enzimática, tinha 6 cm de comprimento e a seguinte composição: Acrilamida/bis-acrilamida (39/1), 4% ; tampão Tris-HCl 1,9 M (pH 8,7), 20% ; SDS 0,1% ; EDTA, 100 mM ; TEMED 20 µl% e persulfato de amônio 0,05%. Os poços no gel de entrada foram feitos com um pente contendo 10 dentes, 12 x 12 mm.

Os fragmentos de gel, após a equilibração, foram transferidos para os poços no gel de entrada, onde ficavam imersos em uma solução de tampão Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) contendo glicerol 20%. Sobre as fatias de gel eram aplicados 10 µl de tampão Tris-HCl 125 mM - glicerol 10% contendo uma quantidade de enzima variável de 10 a 500 ng, diluída da solução estoque. Em poços laterais eram aplicados os padrões de peso molecular.

Tampões Tris-glicina com SDS e Tris-HCl foram usados como tampões no cátodo e ânodo, respectivamente, conforme item II.1.5.2. A corrida eletroforética era iniciada com 20 mA, fixando a voltagem máxima em 120 V. Quando a frente de corante atingiu o final do gel de entrada corrida foi interrompida, durante 30 minutos. A seguir a corrida foi continuada com uma amperagem de 30 mA. Ao final da corrida o gel de separação era corado com Coomassie blue 0,15% (vide item II.5.1.1), seco e auto-radiografado.

II.4 ESTUDO DA SOLUBILIDADE DA ppH-47

II.4.1 Estabilização da ppH-47 durante a homogeneização de fatias hipocampais

Previamente ao estudo da solubilidade da ppH-47 foi necessário determinar sua estabilidade durante o processo de homogeneização, especialmente com relação a possibilidade de proteólise e defosforilação. Basicamente 3 inibidores de proteases foram usados: EDTA 10 mM, leupeptina 1 µg/µl e PMSF 1 mM.

O fluoreto de sódio 100 mM foi usado, juntamente com o EDTA, como inibidor de fosfatases (De Grann et al., 1989; Jones et al., 1989). Fatias hipocampais eram incubadas com [32P]fosfato conforme item II.1.3. A interrupção era feita com a adição de 2,5 ml de EDTA 10 mM. A seguir as fatias eram transferidas para um meio de homogeneização contendo 1 ml de: (A) NaCl 150 mM, Tris 10 mM e EDTA 10 mM ou (B) NaCl 50mM, NaF 100 mM, Tris 10 mM e EDTA 10 mM (solução F). Imediatamente antes da homogeneização era adicionado 10 µl PMSF dissolvido em acetona (1mg/50 µl).

A homogeneização era feita manualmente em tubo de Eppendorf. Os homogenatos eram centrifugados a 40.000 x g, durante 20 min, em Sorvall RC2-B. O "pellet", onde predominantemente era detectada a ppH-47 (vide item II.4.2), era lavado com de 1 ml de acetona e a seguir dissolvido em solução de lise e analisado por eletroforese bidimensional, conforme item II.1.5.

II.4.2 Ensaio de solubilização da ppH-47, analisados por eletroforese bidimensional

No estudo da solubilidade da ppH-47 a incubação das fatias hipocampais com [32P]fosfato (conforme item II.1.3) era interrompida com a solução F (NaF 100 mM, NaCl 50 mM, Tris 10 mM

e EDTA 10 mM) e a homogeneização era feita em diversos meios (Scopes, 1987). PMSF 1 mM (concentração final) era adicionado imediatamente antes da homogeneização. Uma fatia marcada de hipocampo era homogeneizada em 1 ml de meio e a seguir centrifugada a 40.000 x g, durante 20 min, em Sorvall RC2-B. Ao "pellet" e sobrenadante era adicionado TCA (concentração final de 10%), que a seguir eram centrifugados. Os precipitados resultantes eram lavados com 1 ml de etanol 80% e 1 ml de acetona. Depois eram dissolvidos em solução de lise (75 µl) e analisados por eletroforese bidimensional, conforme itens II.1.4 e II.1.5.

II.4.2.1 Efeito da variação da força iônica

A homogeneização foi feita usando meios de força iônica variável: 1- Meio com baixa força iônica (EDTA 10 mM); 2, Meio isoiônico (NaF 100 mM, NaCl 50 mM e EDTA 10 mM); 3- Meios com alta força iônica 0,5, 1,5 e 3,0, contendo NaF 100 mM, EDTA 10 mM e NaCl 0,4 M, 1,4 M e 2,9 M, respectivamente.

II.4.2.2 Extração alcalina

A fatia marcada era homogeneizada 1 ml de meio isoiônico (solução F), onde a seguir era adicionado 50 µl de NaOH 1M, elevando o pH do homogeneizado para aproximadamente 11,5. O homogeneizado era centrifugado e as frações obtidas eram analisadas por eletroforese bidimensional.

II.4.2.3 Solubilização com detergentes

Fatias hipocâmpais eram homogeneizadas na solução F e ao homogeneizado eram adicionados diferentes detergentes, iônicos e não-iônicos, em diferentes concentrações (Hjelmeland e Chrambach, 1984; Neugebauer, 1990). Foram usados os seguintes detergentes: Triton X-100, digitonina, colato de sódio, deoxicolato de sódio, CHAPS e SDS. Esses detergentes eram provenientes da Sigma, exceto o Triton X-100 obtido da Rohm-Haas. Os detergentes foram preparados em solução F numa concentração de 10% e adicionados ao homogeneizado em quantidades suficientes para dar a concentração final desejada. Apenas a solução estoque de digitonina era de 4%.

No homogeneizado com solução F era adicionado Triton X-100 (concentração final variável de 0,02 a 1%) , deoxicolato de sódio (0,5 e 1%) ou SDS (0,02 a 0,2%). Após adição do detergente o homogenato era agitado em vortex a cada 5 min, durante 15 minutos. Depois era centrifugado a 40.000 x g, durante 20 minutos e as frações resultantes eram analisadas por eletroforese bidimensional.

II.4.3 Extração da ppH-47 a partir do "pellet" Triton-insolúvel, analisado em eletroforese unidimensional

A primeira extração com detergentes evidenciou uma fração Triton-insolúvel, enriquecida em ppH-47. Essa fração foi submetida a eletroforese unidimensional, mostrando uma banda bem definida correspondente à ppH-47 (vide item II.5.2). Uma segunda tentativa de solubilização do ppH-47 foi feita a partir do "pellet" Triton-insolúvel usando detergentes e uréia. Os

resultados foram analisados em SDS-PAGE e avaliados por densitometria dos filmes auto-radiográficos.

Fatias hipocâmpais marcadas eram homogeneizadas em solução F/Triton X-100 1% e centrifugadas, conforme o item anterior. O "pellet" Triton-insolúvel era ressuspenso em: a) 1 ml de solução F, onde a seguir era adicionado o detergente - Triton X-100 1%, colato de sódio 20 mM, deoxicolato de sódio 1%, CHAPS 10 mM ou digitonina 1%, b) 1 ml de solução F contendo uréia (1 a 8 M).

Foram feitas tentativas de aumentar a eficiência da solubilização da ppH-47 com colato de sódio - alcalinizando o meio (com a adição de NaOH 1M até o pH atingir 11,5) ou aumentando a força iônica do meio (0,5 a 1,5, com a adição de NaCl). Em alguns experimentos houve a adição de glicerol ao meio (concentração final de 20%) também na tentativa de melhorar a eficiência da solubilização (Hampson et al., 1987).

Após a homogeneização do "pellet" Triton-insolúvel no segundo meio de extração era feita a recentrifugação. As frações resultantes eram tratadas com TCA, etanol 80% e acetona, conforme o item II.4.2. Depois eram solubilizadas com 25 μ l de "stopping solution" (Tris 286 mM, glicina 266 mM, SDS 5,7%, sacarose 28,5% e azul de bromofenol 0,03%). A amostra em "stopping solution" era aquecida a 90°C, durante 3 minutos.

A análise eletroforética unidimensional em SDS-poliacrilamida foi feita conforme item II.1.5.2, exceto pelo fato de haver poços no gel de entrada, destinados à aplicação da amostra em "stopping solution". As bandas auto-radiográficas da ppH-47

foram quantificadas num densitômetro GS 300, da Hoefer Scientific Instruments.

II.5 IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DA ppH-47 NA FRAÇÃO TRITON-INSOLÚVEL

II.5.1 Coloração da ppH-47

Fatias de hipocampo marcadas eram homogeneizadas em solução F e Triton X-100 1%. O "pellet" Triton-insolúvel era analisado por eletroforese uni ou bidimensional e o gel resultante era corado com Coomassie blue ou Prata (Wilson, 1979; Merrill et al., 1981; De Moreno et al., 1985; Garfin, 1990).

II.5.1.1 Coloração com Coomassie blue

A solução de Coomassie blue era feita da seguinte maneira: 0,15 g de Coomassie blue (R-250, Sigma) era dissolvido em 50 ml de metanol. A seguir eram adicionados 10 ml de ácido acético e 40 ml de água destilada (Smith, 1984). Grumos de corante podiam ser removidos por filtração. O volume de corante usado era de 100 ml por gel e o tempo de coloração variou de 3 a 15 h, sempre com agitação suave na primeira hora. O corante era reutilizado somente uma vez.

A descoloração era feita em solução de metanol 50% - ácido acético 10%. Eram feitas 2 a 4 lavagens com 100 ml de solução descorante, sob agitação, com duração aproximada de 30 minutos em cada uma. A descoloração ainda prosseguia em solução de secagem, por 1 ou 2 horas (vide item II.1.6). A correspondência entre a

mancha corada no gel e a mancha auto-radiográfica do ppH-47 no filme era confirmada com auxílio de furos-referenciais feitos no filme e no gel durante a exposição.

II.5.1.2 Coloração com prata

A coloração de proteínas com prata no gel de poliacrilamida foi feita baseada no método descrito por Merril e colaboradores (Merril et al., 1981; Heydorn et al., 1983), exceto pela quantidade de prata utilizada.

O procedimento era o seguinte: 1. Após a eletroforese o gel era fixado em 100 ml de metanol 50% - ácido acético 10% , "overnight". No dia seguinte o gel era equilibrado em 100 ml de metanol 10% - ácido acético 5%, por duas vezes, durante 15 minutos cada; 2. A seguir ao gel era adicionado 100 ml de dicromato de potássio 0,1% (em ácido nítrico, 0,02%). Esta etapa durava 5 a 10 minutos; 3. O gel era lavado com água deionizada até o gel clarear, isto é, perder a cor amarela. Eram feitas 2 a 3 lavagens, com 100 ml de água, durante 5 minutos cada; 4. Era adicionado 100 ml de nitrato de prata 0,1%. O gel era agitado suavemente durante 25 minutos; 5. Após a incubação com prata e gel era lavado brevemente com água deionizada; 6. A seguir era lavado brevemente (aproximadamente 1 minuto), com 50 ml de revelador (carbonato de sódio 3% contendo formaldeído 37%, 0,1 ml em 200 ml, adicionado imediatamente antes do uso), para retirar o excesso de prata; 7. Depois era adicionado 100 ml de revelador, sob suave agitação, até atingir a coloração desejada (3 a 8

minutos); 8. A reação era interrompida com a adição de 150 ml de solução metanol 10% - ácido acético 5% e agitação suave durante 5 minutos; 9. O gel era colocado em solução de secagem (metanol 50% - glicerol 1%), durante 3 a 15 horas. A secagem era feita sem aquecimento de lâmpadas infra-vermelha.

Muitas vezes um gel já seco e auto-radiografado era submetido a coloração com prata. Nestes casos, o gel era colocado em solução de metanol 10% - ácido acético 5% contendo 0,1% de SDS. Depois de 30 a 60 minutos o celofane era retirado, com auxílio de pinças. Depois o gel era lavado duas vezes com esta solução sem SDS, como na etapa 1, acima descrita. A partir daí as etapas eram as mesmas.

II.5.2 Identificação da ppH-47 na fração Triton-insolúvel analisada por eletroforese unidimensional

A ppH-47 foi identificada na fração hipocampal Triton-insolúvel, analisada por eletroforese unidimensional, com base: 1. Na mobilidade eletroforética em SDS-PAGE, 2. Na distribuição regional cerebral (Rodnight e Leal, 1990) e 3. No mapeamento fosfopeptídico.

II.5.2.1 Comparação da mobilidade eletroforética

A fração Triton-insolúvel de fatias hipocampis marcadas era obtida e submetida a eletroforese bidimensional, conforme item II.1.5. A área do gel correspondente a posição auto-radiográfica da ppH-47 era recortada e equilibrada em tampão Tris-HCl, durante 5 min. Após a retirada do papel celofane, o fragmento do gel era

colocado num poço de um gel SDS-poliacrilamida 8% onde permanecia por 30 minutos, embebido em "stopping solution". Lateralmente era aplicado uma amostra Triton-insolúvel preparada em "stopping solution". A SDS-PAGE era executada conforme o item II.1.5.2. A mobilidade das mancha correspondente à ppH-47 era avaliada autoradiograficamente.

II.5.2.2 Distribuição regional cerebral do ppH-47

Quatro regiões cerebrais foram escolhidas: duas onde a ppH-47 está altamente fosforilada - hipocampo e bulbo olfatório; e duas onde a fosforilação é baixa - córtex cerebral e caudato. Fatias cerebrais de 0,4 mm de espessura foram obtidas no McIlwain "chopper", conforme item II.1.2, e delas eram preparadas microfatias, com diâmetro de 1,5 mm, com auxílio de "punches" (Rodnight et al, 1988). Duas microfatias marcadas, de cada região, eram usadas no preparo da fração Triton-insolúvel, conforme item II.4.2. As frações obtidas eram analisadas em SDS-PAGE.

II.5.2.3 Mapeamento fosfopeptídico

A identificação da ppH-47 na fração Triton-insolúvel envolveu a comparação dos [32P]fosfopeptídios obtidos, da proteólise com a protease V8, entre a ppH-47 recortada do gel resultante da eletroforese bidimensional e a suposta banda correspondente à ppH-47 recortada do gel da eletroforese unidimensional (vide item II.3.2).

II.5.3 Estudo da mobilidade eletroforética da ppH-47 em SDS-PAGE

Foram preparados géis de poliacrilamida contínuos de 6, 8, 10 e 12%, com os mesmos reagentes citados no item II.1.5.2, variando as quantidades de solução de acrilamida e água destilada. A fração Triton-insolúvel hipocampal foi analisada em SDS-PAGE. O peso molecular aparente da ppH-47 foi determinado em função da mobilidade eletroforética (Rf). Padrões de peso molecular de 45 KDa (ovoalbumina) e 66 KDa (albumina bovina), da Sigma, foram usados para avaliar a regularidade da mobilidade do ppH-47, de acordo com o Ferguson "plot" (Neville, 1971; Gower e Rodnight, 1982).

II.6 IDENTIFICAÇÃO DE UMA SUPOSTA ppH-47 EM OUTRAS ESPÉCIES DE MAMÍFEROS (BOI, COELHO, COBAIA E CAMUNDONGO).

Esta etapa experimental foi feita na tentativa de estudar a distribuição da ppH-47 em outras espécies de mamíferos (boi, coelho, cobaia e camundongo), bem como avaliar uma outra possível fonte de ppH-47 que possibilitasse sua caracterização/purificação. A suposta identificação da ppH-47 em outras espécies foi feita com base nas características bioquímicas da ppH-47, até então conhecidas, tais como: 1- Fosforilação Ca^{2+} dependente em micro-fatias cerebrais de rato (Wofchuk e Rodnight, 1990); 2- Distribuição regional cerebral (Rodnight e Leal, 1990); e 3- Triton-insolubilidade (item II.4.2).

II.6.1 Obtenção das micro-fatias cerebrais

Os cérebros de boi foram obtidos no Frigorífico Lider, imediatamente após o abate e transportados em gelo até o laboratório. O intervalo entre a morte do animal e o transporte variou de 60 a 90 minutos. Coelhos, cobaias e camundongos, procedentes do Biotério do Instituto de Biociências - UFRGS, foram mortos por decapitação e do cérebro removido, incluindo o do boi, foram preparadas fatias cerebrais inteiras (no camundongo e cobaia) ou fatias de regiões dissecadas (no coelho e boi), em um McIlwain chopper (conforme item II.1.2). Destas fatias foram preparadas micro-fatias, com 1,5 mm de diâmetro, conforme item II.5.2.2.

II.6.2 Estudo da distribuição regional

De acordo com a distribuição regional cerebral de ppH-47 em rato (Rodnight e Leal, 1990) foram escolhidas as seguintes regiões : 1. Hipocampo e/ou globus pallidus, onde a taxa de fosforilação é alta no rato, e 2. Córtex cerebral e/ou caudato, onde essa taxa é baixa. Duas microfatias, de cada região, eram marcadas e analisadas por eletroforese bidimensional, conforme item II.1.

II.6.3 Fosforilação Ca^{2+} dependente

O efeito do Ca^{2+} sobre a fosforilação da suposta ppH-47, foi estudado de acordo com Wofchuk e Rodnight (1990), usando dois meios de incubação (e pré-incubação): 1- Com cálcio ($CaCl_2$, 1mM); 2- Sem cálcio (com a adição de EGTA, 1mM). Duas microfatias de

hipocampo e/ou globus pallidus eram incubadas com [32P]fosfato nesses meios e analisadas por eletroforese bidimensional.

II.6.4 Insolubilidade da suposta ppH-47

A fração Triton-insolúvel de 2 a 3 micro-fatias de hipocampo, das diversas espécies, era preparada e analisada por eletroforese bidimensional, conforme item II.4.2. Com micro-fatias bovinas também foi feita a extração alcalina, como descrito no item II.4.2.

II.6.5 Co-migração das amostras de boi e rato

A mobilidade da suposta ppH-47 em boi foi comparada à mobilidade da ppH-47 do rato, num experimento de co-migração. As amostras de boi e rato, em solução de lise A/B, eram misturadas : 75 µl da amostra bovina mais 25 µl da amostra de rato. Essa proporção foi decidida em função da atividade aproximada de [32P] nas amostras. A mistura foi analisada comparativamente à amostra de boi e rato, por eletroforese bidimensional.

II.7. "ELECTROBLOTTING" DAS [32P]FOSFOPROTEÍNAS PARA NITROCELULOSE - PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

II.7.1 Material

A eletrotransferência foi feita usando um "semidry electroblotter", da Bio-Rad. A nitrocelulose 0,45 um também foi proveniente da Bio-Rad. Tris, glicina e SDS usado na preparação dos tampões, bem como o amido black usado na detecção protéica na

nitrocelulose, foram procedentes da Sigma. Membranas de nylon usadas em alguns experimentos foram provenientes da Schleicher & Schuell.

II.7.2. Técnica de "electroblotting"

Após a SDS-PAGE, da amostra hipocampal Triton-insolúvel, a área de interesse no gel (variando de 48 a 60 cm²) era recortada e equilibrada em tampão de transferência. A seguir era montado o sanduiche papel-nitrocelulose-gel-papel. A dimensão das folhas de papel e da nitrocelulose acompanhava a dimensão do gel a ser "blotado". Eram colocados 3 ou 4 folhas de papel de filtro Whatman n^o3, previamente embebidas em tampão, sobre o ânodo e sobre eles a nitrocelulose, também previamente embebida em tampão. Bolhas entre as folhas eram evitadas fazendo o rolamento de um tubo de ensaio molhado com tampão. Sobre a nitrocelulose era colocado o gel equilibrado e sobre ele mais 3 ou 4 folhas de papel Whatman. O cátodo era então colocado e mantido pressionando o sanduiche. Em alguns experimentos foi usada uma membrana de nylon sobre a nitrocelulose, para avaliar a possibilidade das proteínas estarem atravessando a nitrocelulose. A eficiência da transferência foi avaliada por auto-radiografia da nitrocelulose e do gel "blotado", bem como pela coloração do gel (com Comassie blue, vide item II.5.1) e da nitrocelulose (com Amido black 0,5% em metanol 40%/ácido acético 10%).

II.7.3 Variáveis estudadas

Os parâmetros experimentados na padronização da eletrotransferência foram: a composição do tampão, a densidade da corrente (0,5 a 5,0 mA/cm²) e o tempo de transferência. Dois tampões de eletrotransferência (e equilíbrio) foram testados - o tampão Tris 25 mM/Glicina 192 mM/Metanol 20%, usado por Towbin e colaboradores (1979) e o tampão Tris 48 mM/Glicina 39 mM/Metanol 20%, com e sem SDS mM (1,3 mM), usado por Bjerrum e Schafer-Nielsen (Heegaard e Bjerrum, 1988).

II.7.4 "Blotting" do gel fixado

Durante a padronização do processo de eletrotransferência foi experimentada a possibilidade de transferir amostra em um gel fixado com metanol-ácido acético. O gel fixado era colocado em equilíbrio no tampão de Bjerrum com SDS, durante 45-60 minutos, sob agitação suave. O gel fixado e seco também foi equilibrado desta maneira, podendo o papel celofane ser retirado em 10-15 minutos. Após essa equilíbrio o gel era lavado brevemente (cerca de 2 minutos) em tampão Tris 48 mM/Glicina 39 mM com SDS 0,04% e eletrotransferido, conforme o item II.7.2, usando o tampão de Bjerrum sem SDS e uma densidade de corrente de 1,2 cm², durante 60 minutos.

II.8 IMUNOCARACTERIZAÇÃO DA ppH-47 COM ANTI-GFAP

A similaridade em muitas características da ppH-47 com a GFAP ("glial fibrillary acidic protein") apontou a necessidade de sua caracterização imunoquímica com o soro anti-GFAP.

II.8.1 Material e métodos

A detecção imunológica com anti-GFAP foi feita usando o método da peroxidase-estreptavidina-biotina e diaminobenzidina como reagente de cor (Ogata, 1988). O soro policlonal anti-GFAP de coelho era proveniente da Sigma, enquanto o anti-imunoglobulina de coelho-biotinilado, de burro (anticorpo ARB) e a streptavidina-biotinilada peroxidase (S-peroxidase) eram provenientes da Amersham. O Tween-20, o peróxido de hidrogênio e a diaminobenzidina também eram provenientes da Sigma. O leite em pó desnatado Molico foi usado no preparo da solução bloqueadora. O material usado no "blotting" foi citado anteriormente (II.7.1).

II.8.2 Eletrotransferência da amostra

A amostra protéica marcada, separada em SDS-PAGE (uni ou bidimensional) foi "blotada" para nitrocelulose de acordo com o procedimento padronizado anteriormente (item II.7). A SDS-PAGE foi feita em gel contínuo de poliacrilamida 8% ou usando gel gradiente 7-12% (Walker, 1984). Áreas de interesse no gel de SDS-poliacrilamida (comumente com dimensão 6 x 8 cm) após a corrida eletroforética eram equilibradas brevemente com tampão de Bjerrum, sem SDS (30-45 segundos) e a seguir colocadas sobre a nitrocelulose, conforme descrito no item II.7.2. A transferência era feita em corrente de 57 mA, voltagem máxima de 15 Volts e duração de 60 minutos. Após a transferência a membrana de nitrocelulose era lavada com metanol 40% - ácido acético 10% e depois com água destilada. Era então seca e exposta ao filme de

raio-X.

II.8.3 Técnica de imunodeteccção da GFAP

O procedimento básico de deteccção imunológica da GFAP consistia das seguintes etapas:

1 - A nitrocelulose era embebida e lavada com 20 ml de TBS (Tris-HCl, 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5), durante 10 minutos.

2 - A seguir a nitrocelulose era incubada com 20 ml de M-TBS (Leite Molico 5% em TBS), durante 2 a 3 horas, sob agitaçção suave. Esta fase de "blocking" era feita durante a noite, nos primeiros experimentos. Em muitos experimentos foi adicionado 20 mM de NaF ao M-TBS.

3 - Após o "blocking" a nitrocelulose era lavada com 10 ml de T-TBS (Tween-20 0,05% em TBS), durante 2 vezes, com duraçção aproximada de 5 minutos cada.

4- A nitrocelulose era então incubada em M-TBS com o soro anti-GFAP, sob agitaçção suave, durante 1 ou 2 horas. O anti-corpo era diluido 1:500 em M-TBS, isto é, 15 µl de anti-soro em 7,5 ml de M-TBS. O volume de 7,5 ml foi estabelecido como suficiente para embeber a folha de nitrocelulose 6 x 8 cm. A diluiçção foi estabelecida por "Dot-immunobinding" (Gordon e Billings, 1988), usando a fraçção hipocampal Triton-insolúvel como amostra.

5 - A nitrocelulose era lavada com 10 ml de T-TBS, durante 3 vezes, com duraçção aproximada de 5 minutos cada.

6 - A seguir era feita a incubação com anticorpo ARB, durante 1 hora, sob agitação suave. O anticorpo era diluído 1:300 em M-TBS (25 μ l em 7,5 ml de M-TBS).

7 - A nitrocelulose era novamente lavada como descrito na etapa 5.

8 - Então era a seguir incubada com S-peroxidase (25 μ l em 7,5 ml de M-TBS), durante 1 hora, sob agitação suave.

9 - A final da incubação a nitrocelulose era lavada como na etapa 5.

10 - Depois foi lavada com 20 ml de TBS, durante 5-10 minutos, enquanto era preparado o reagente de cor. O reagente de cor (DAB), preparado imediatamente antes do uso, tinha a seguinte composição: 2 mg de diaminobenzidina, 12 ml de TBS, 40 μ l de cloreto de cobalto 1% e 60 μ l de peróxido de hidrogênio 30%.

11 - Era adicionado o DAB e a reação de cor processava-se entre 1 e 3 minutos, quando era interrompida pela adição de 15 ml de água destilada. A nitrocelulose era lavada em água destilada, duas ou três vezes.

12 - A nitrocelulose revelada e seca era comparada ao filme auto-radiográfico obtido previamente (item II.8.2). Nos primeiros experimentos também era feita a auto-radiografia após a detecção imunológica.

II.8.4 Imunoidentificação da GFAP

A imunoidentificação da GFAP na fração Triton-insolúvel de micro-fatias cerebrais marcadas envolveu: 1. O estudo da

distribuição regional; 2. A proteólise Ca^{2+} dependente, incubando microfatias de hipocampo e corda espinhal, em meio com e sem Ca^{2+} , conforme o item II.6.3.

II.9 IMUNOCARACTERIZAÇÃO DA ppH-47 COM ANTI-ppH-47

Paralelamente à imunocaracterização do ppH-47 com anti-GFAP, foi feita a caracterização com um anticorpo produzido contra a ppH-47, obtida da fração Triton-insolúvel hipocampal analisada em SDS-PAGE. A fase de produção do anticorpo foi feita no laboratório do Dr. Roy Larson, no Departamento de Bioquímica da USP, em Ribeirão Preto.

II.9.1 Produção do anticorpo contra ppH-47

II.9.1.1 Preparo da amostra

A amostra hipocampal Triton-insolúvel foi obtida da seguinte maneira: Hipocampos de 30 ratos (aproximadamente 3 g de tecido) foram homogeneizados em 30 ml de uma solução contendo Tris 25 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, PMSF 0,3 mM e 2-mercaptoetanol 0,02%. A seguir foi adicionado Triton X-100, numa concentração final aproximada de 1,0%. O homogenato foi agitado durante 15 minutos, em câmara fria e então centrifugado em Sorvall, 15.000 x g, durante 10 min. O "pellet" foi ressuspensão na solução homogeneizadora e novamente foi adicionado Triton X-100 e recentrifugado. O "pellet" resultante foi ressuspensão mais uma vez com a solução homogeneizadora e recentrifugado. O "pellet" final, bastante viscoso, foi dissolvido em 3 ml SDS 5% contendo

mercaptoetanol 5%, com auxílio de uma seringa. A seguir foi adicionado 1,5 ml de "stopping solution" (SDS 6%, EDTA 6 mM, Tris 187 mM, Glicerol 27,6% e azul de bromofenol) e aquecido a 90°C, durante 5 minutos.

II.9.1.2 Identificação e excisão da banda correspondente à ppH-47 em gel de SDS-poliacrilamida

Inicialmente para confirmar a mobilidade do ppH-47 foi feito uma eletroforese em mini-gel de SDS-poliacrilamida 8% e o gel foi corado com prata. O gel de separação tinha a seguinte composição: acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), 8% ; Tris 375 mM ; EDTA 2 mM ; TEMED 0,125 % e persulfato de amônio, 0,125%. O SDS 0,1% estava presente somente no gel de entrada.

Depois foram feitos 8 géis preparativos 8%, com 2 mm de espessura. Em cada um foi aplicado 450 µl de amostra. A corrida era feita a 50-70 mA/placa e a voltagem atingia 250 Volts aproximadamente ao final da corrida. O tampão (superior e inferior) era Tris 25 mM / Glicina 192 mM, contendo EDTA 1,95 mM e SDS 0,075%. Ao tampão superior era adicionado tioglicolato de sódio (0,1 M aproximadamente).

O gel após a corrida era transferido a um recipiente, de vidro, iluminado adequadamente por baixo, onde era adicionado cerca de 150 ml de KCl 0,3 M. As bandas protéicas visualizadas pela precipitação com KCl, começavam a parecer logo e a banda supostamente correspondente ao ppH-47 era recortada (entre 3 e 5 minutos após a adição do KCl). Após 5 minutos era difícil defini-la e a partir dos 8 minutos era impossível distinguir qualquer

banda. As bandas recortadas, com espessura de 2 a 3 mm, eram lavadas com água destilada e guardadas no freezer. A posição da banda recortada foi confirmada pela coloração com prata ou Comassie Blue das laterais do gel preparativo.

II.9.1.3 Produção e obtenção do antisoro contra a ppH-47

Esta etapa foi realizada exclusivamente, pelo Dr. Larson e seus colaboradores. A amostra proteína era eletroeluída do gel e eletrodialisada, por um processo similar ao descrito por Hunkapiller e colaboradores (1983). A proteína eluída foi usada para indução de anticorpos, por inoculação em coelho. O "immunoblotting" com o soro obtido (1:500) foi feito usando amostras Triton-insolúveis de hipocampo e córtex cerebral, analisadas em gel gradiente de SDS-poliacrilamida 7-12%. O soro apresentou imunoreatividade à uma banda denominada HE-52 ("anti-hippocampus enriched, 52 KDa protein").

II.9.2 Imunoidentificação da ppH-47 com o soro anti-HE

A identificação da ppH-47 com o soro anti-HE foi feita usando fatias hipocampais marcadas e a fração Triton-insolúvel de diversas regiões cerebrais.

II.10 ELETRANFERÊNCIA DE [32P]FOSFOPROTEÍNAS FIXADAS DO GEL DE POLIACRILAMIDA PARA DISCOS DE NITROCELULOSE

Uma das intenções deste trabalho, como já foi dito, era elaborar um protocolo de purificação da ppH-47. A eluição

protéica do gel de poliacrilamida tem permitido a obtenção de quantidades protéicas, com grau de purificação bastante satisfatório para produção de anticorpos e sequenciamento (Harrington, 1990; Dunbar et al., 1990). Assim, alguns métodos de eluição protéica do gel foram estudados com a finalidade avaliar um método eficiente para eluição da ppH-47.

O estudo dos métodos existentes, especialmente no processo de eletroeluição descrito por Otto e Snejdarkova (1981) e na eletrotransferência para matrizes imobilizadas (Svoboda et al., 1985; Beisiegel, 1986), possibilitou o desenvolvimento de um método variante do "electroblotting", experimentado com a ppH-47 e outras fosfoproteínas (MARCKS e sinapsina I).

II.10.1 Padronização da medida da radiação Cerenkov - usada para avaliar o rendimento da eluição.

A medida da radiação Cerenkov do ^{32}P foi feita usando "vials" pequenos de polietileno (3 ml) em "carriers" de vidro, como recomendado por Kellogg (1983). As leituras foram feitas num RackBeta, modelo 1209, da Pharmacia-LKB.

Usando [32P]fosfato de sódio foi elaborada uma curva padrão de atividade: 99.000, 198.000, 396.000 e 792.000dpm, considerando a atividade (em μCi) da solução-mãe procedente da CNEN. A diluição era feita de forma que 10 μl correspondesse a 99.000 dpm no dia da leitura. Ao volume da solução de [32P]fosfato de sódio nos "vials" (variável de 10 a 80 μl) era adicionado: (a) 3 ml de água destilada, para medir a radiação Cerenkov ou (b) 3 ml de líquido de cintilação Aquasol-2, procedente da New England

Nuclear. O rendimento da radiação Cerenkov foi de 45-50%.

A leitura da radiação Cerenkov em fragmentos de gel (ou outros meios provenientes do processo de eletrotransferência), era feita em 20 minutos/amostra, para reduzir a margem de erro devido às baixas contagens, que variavam de 20 a 2000 cpm. Não havia diferença significativa entre os "backgrounds" desses diferentes meios.

II.10.2 Procedimento proposto de eletrotransferência - material e metodologia

Os reagentes usados : Tris, glicina, SDS, acrilamida, bis-acrilamida, agarose, TEMED e persulfato, bem como a membrana de diálise 250-9U, foram provenientes da Sigma. O metanol usado foi da Merck e o glicerol da Reagen. A membrana de nitrocelulose foi procedente da BioRad e a de nylon da Schleicher & Schuell. Fragmentos de gel contendo a pPH-47, medindo aproximadamente 2 x 3 mm, eram excisados do gel de SDS-poliacrilamida fixado e seco. Esses fragmentos (3 a 5) eram colocados em SDS 0,2%, durante 5 minutos, quando então era retirado o papel celofane do gel. A seguir eram equilibrados num tampão Tris 25 mM - Glicina 192 mM (tampão TG), contendo SDS 0,2% , mercaptoetanol 1% e glicerol 40%, durante 45 minutos, sob agitação suave. O volume deste meio era de aproximadamente 0,1 ml por mm² de gel seco. Um estudo do efeito da concentração de SDS neste meio de equilibração foi realizado para avaliar a eficiência sobre a eletrotransferência.

A coluna para eletrotransferência (vide a figura 1) consistia de um tubo de vidro, com diâmetro de 5 mm e comprimento

de 12 cm, com os 2/3 inferiores preenchidos com gel de poliacrilamida 5%, sem SDS (gel de suporte). As peças de gel equilibradas eram colocadas sobre o gel de suporte da coluna de eletrotransferência e fixadas a ele com agarose 1,5%, aproximadamente 0,1 ml, preparada em tampão TG. Sobre os fragmentos de gel era colocado 0,1 ml de tampão TG contendo glicerol 40%. A parte superior da coluna era preenchida com tampão TG/metanol 20% (aproximadamente 0,6 ml), fazendo um gradiente descontínuo de densidade. A abertura superior da coluna era coberta com um disco de nitrocelulose de 6 mm de diâmetro, previamente embebido em tampão TG/ metanol 20%. Este disco era fixada à coluna por uma membrana de diálise e um anel de borracha. O estudo da eletrotransferência para membranas de nylon foi feito, para avaliar a interferência do SDS. A coluna montada era colocada numa cuba para eletrotransferência, desenhada especialmente para este fim.

Esta cuba, de acrílico, mede 12 x 12 cm de base e 16 cm de altura (vide a figura 2). Dois eletrodos horizontais (fios de platina) ficam dispostos simetricamente, um sobre (ânodo) e outro sob (cátodo) a coluna de eletrotransferência. Tampão TG/metanol 20% é usado no compartimento superior (anódico) e tampão TG é usado no compartimento inferior (catódico).

A eletrotransferência foi executada a corrente constante de 5 mA e a voltagem máxima estabelecida foi de 250 V. Duas outras fosfoproteínas - MARCKS e sinapsina I, também foram usadas para avaliar o processo proposto de eletrotransferência.

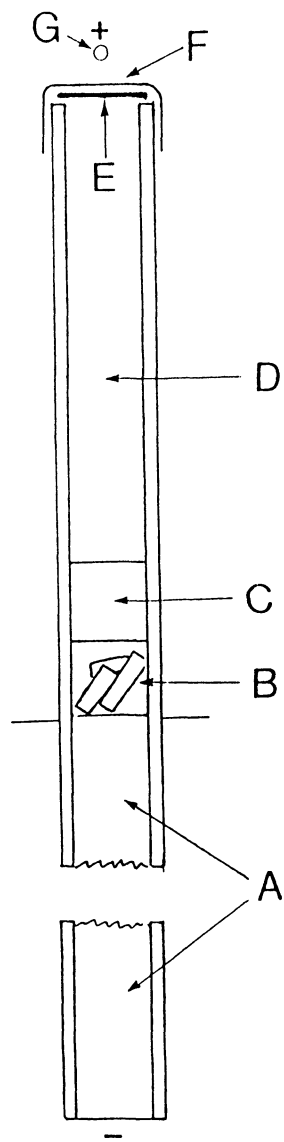
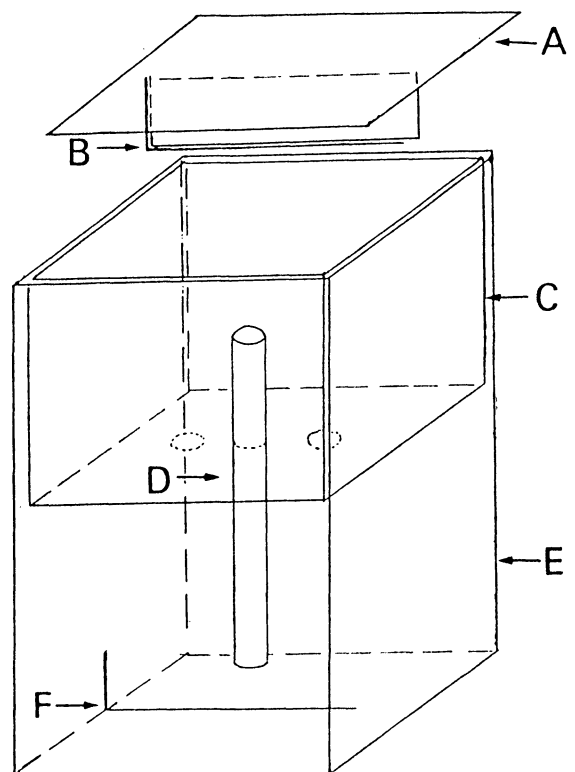


Figura 1. Coluna de eletrotransferência de fosfoproteínas de fragmentos de gel de poliacrilamida para disco de nitrocelulose. A, gel suporte de acrilamida; B, fragmentos de gel fixados em agarose; C, tampão Tris-Glicina com glicerol 40%; D, tampão Tris-Glicina com metanol 20%; E, membrana de nitrocelulose; F, membrana de diálise; G, ânodo.

Figura 2. Cuba para eletrotransferência de fosfoproteínas de fragmentos de gel de poliacrilamida para disco de nitrocelulose. A, tampa da cuba; B, ânodo; C, compartimento superior; D, coluna de eletrotransferência (os detalhes são mostrados na figura 1); E, compartimento inferior; F, cátodo.



III RESULTADOS

III.1 IDENTIFICAÇÃO E COMPORTAMENTO MIGRATÓRIO DA ppH-47 EM GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA

A ppH-47 foi identificada originalmente em microfatias cerebrais analisadas por eletroforese bidimensional (Rodnight et al., 1988). O primeiro passo na caracterização desta fosfoproteína envolveu sua identificação auto-radiográfica e por coloração com prata ou Coomassie em gel de SDS-poliacrilamida, bem como um estudo da mobilidade nesse meio.

III.1.1 Identificação da ppH-47 em eletroforese bidimensional

Fatias hipocâmpais incubadas com $[^{32}\text{P}]$ fosfato foram analisadas por eletroforese bidimensional, conforme descrito no item II.1. Na figura 3, em A é mostrado um diagrama com as principais $[^{32}\text{P}]$ fosfoproteínas identificadas e em B, a auto-radiografia correspondente. O sentido da primeira corrida (isoeletrofocalização não-equilibrada) é apontado pela seta horizontal na figura 1A e a segunda corrida (SDS-PAGE) é apontado pela seta vertical.

A classificação numérica adotada está de acordo com trabalhos anteriores de Rodnight et al. (1986) e Salbego (1990). A fosfoproteína 1 corresponde à Sinapsina I e a fosfoproteína 2 à MARCKS. A sinapsina I e a MARCKS estão situadas na faixa dos 80 kDa em SDS-PAGE e servem como referenciais do lado básico e ácido

da primeira corrida, respectivamente, apontando o sentido da eletrofocalização do ânodo para o cátodo. A fosfoproteína 4 corresponde à B-50/GAP 43/F1 e o complexo fosfopeptídico de 40 KDa está representado pelo número 6. A fosfoproteína 12 corresponde a ppC-50, uma proteína com peso molecular aparente de 50 KDa e bastante fosforilada em caudato posterior (Rodnight e Leal, 1990). A ppH-47 está representada pelo número 11 e estará indicada por uma seta nas demais figuras. O volume de amostra aplicado na primeira dimensão variou de 15 a 50 µl, sem ter havido mudanças significativas na resolução eletroforética das fosfoproteínas analisadas.

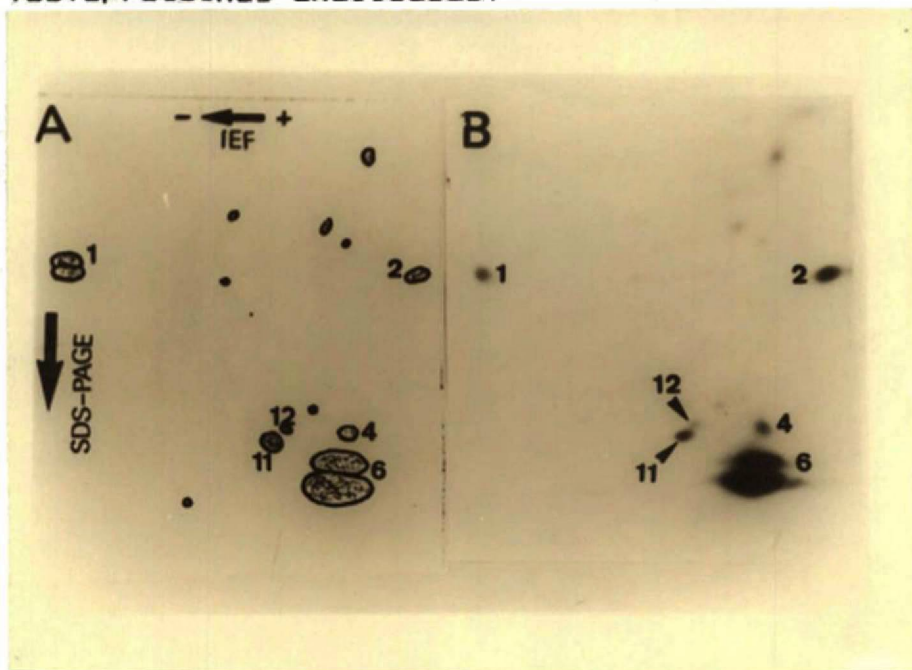


Figura 3. Eletroforese bidimensional de fatia hipocampal de rato marcada com $[^{32}\text{P}]$ fosfato. A, diagrama da distribuição das principais fosfoproteínas identificadas: 1, Sinapsina I; 2, MARCKS; 4, B-50/GAP 43/ F1; 6, Complexo fosfopeptídico de 40 KDa; 11, ppH-47; 12, ppC-50. A seta horizontal mostra o sentido da migração na primeira dimensão, uma eletrofocalização não equilibrada, do ânodo (+) para o cátodo (-). A seta vertical mostra o sentido da segunda dimensão, uma SDS-PAGE em gel 8%. B, auto-radiografia da eletroforese bidimensional, mostrando as fosfoproteínas identificadas na amostra hipocampal.

III.1.2 Identificação da ppH-47 corada com Coomassie ou prata na fração Triton-insolúvel

O estudo da solubilização da ppH-47, cujos resultados estão expressos no item III.3, permitiu a obtenção de uma fração Triton-insolúvel, enriquecida desta fosfoproteína. O gel resultante da eletroforese bidimensional desta fração foi corado (figura 4) com Coomassie Blue (em A) e com prata (em B). Os filmes auto-radiográficos desses géis são mostrados em C e D, respectivamente. A ppH-47 corada, correspondente a mancha auto-radiográfica, é indicada pela seta. A coloração do gel, particularmente com prata, evidencia uma grande quantidade de outras proteínas não marcadas nesta fração. Dentre elas somente a actina pode ser supostamente reconhecida, pela mobilidade eletroforética e abundância nesta fração insolúvel.

III.1.3 Identificação da ppH-47 em gel unidimensional

A fração Triton-insolúvel analisada por eletroforese unidimensional apresenta uma banda correspondente à ppH-47 detectada por eletroforese bidimensional. A confirmação dessa correspondência foi feita com base: na mobilidade eletroforética em SDS-PAGE; na distribuição regional cerebral desta banda; e no mapeamento fosfopeptídico com protease V8. Este último critério de identificação, será apresentado na figura 12, do item III.2. Além da idêntica mobilidade eletroforética (figura 5), entre a ppH-47 (excisada do gel da eletroforese bidimensional) e a banda no gel da eletroforese unidimensional, apresentam uma similar distribuição regional no cérebro, alta em hipocampo e bulbo

olfatório e baixa em córtex cerebral e caudato (figura 6). A confirmação definitiva da identidade entre elas foi dada pelo mapeamento fosfopeptídico, que mostrou uma perfeita homologia entre as fosfoproteínas analisadas.

III.1.4 Comportamento migratório da ppH-47 em gel de poliacrilamida

A figura 7 mostra a fração Triton-insolúvel, analisada por eletroforese unidimensional em diferentes concentrações de gel, corada com prata ou Coomassie Blue. As raias 1 e 2 desta figura mostram uma fração analisada em gel 6% corado com prata e o respectivo filme auto-radiográfico; as raias 3 e 4 mostram uma fração analisada em gel 8% corado com Coomassie e seu respectivo filme auto-radiográfico; as raias 5 e 6 mostram a análise de uma amostra em gel 12% corado com prata e seu respectivo filme auto-radiográfico. As setas indicam a banda correspondente à ppH-47. A ppH-47 apresenta, de acordo com o Rf em SDS-poliacrilamida, um peso molecular aproximado de 47 KDa em gel de 6 e 8%, 49 KDa em gel 10% e 51 KDa em gel 12 e 15%.

O Ferguson "plot" da ppH-47 analisada por SDS-PAGE em diferentes concentrações de gel é mostrado na figura 6. A mobilidade regular da fosfoproteína é comparável aos padrões de albumina sérica e ovoalbumina.

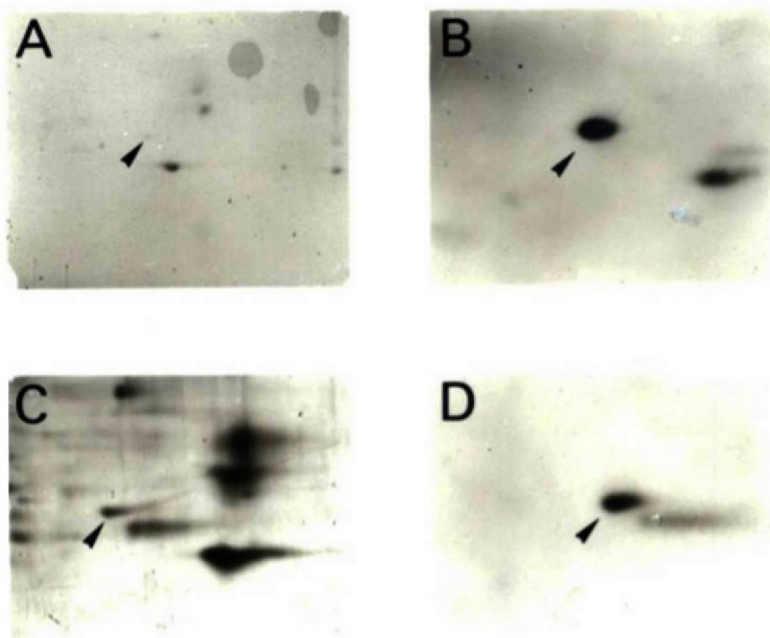


Figura 4. Eletroforese bidimensional da fração Triton-insolúvel corada. A, corresponde ao gel corado com Coomassie blue; B, corresponde à auto-radiografia do gel A; C, corresponde ao gel corado com prata; D, corresponde à auto-radiografia do gel B. A seta indica a ppH-47.

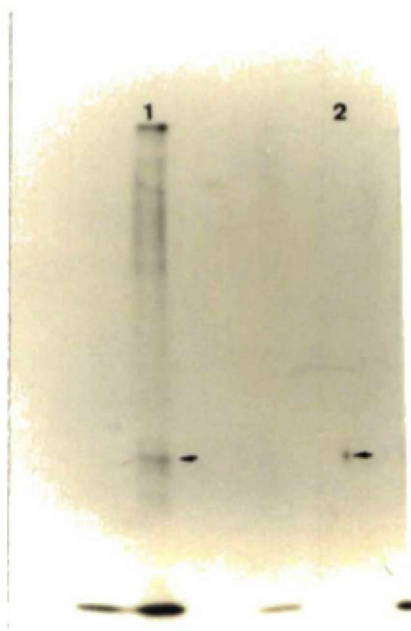


Figura 5. Comparação da migração da ppH-47 com a banda supostamente correspondente à ppH-47 em SDS-PAGE. A raia 1 corresponde a amostra Triton-insolúvel e na raia 2 está a ppH-47 excisada do gel da eletroforese bidimensional. A posição auto-radiográfica da ppH-47 está indicada na figura.

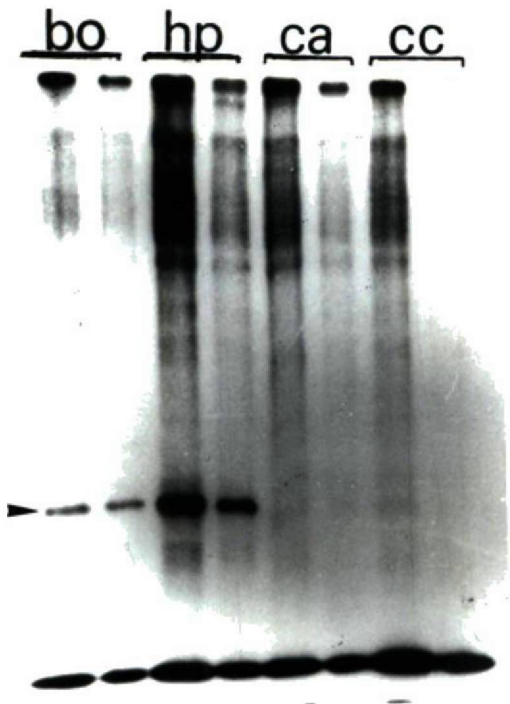


Figura 6. Distribuição regional cerebral da banda supostamente correspondente à ppH-47 em eletroforese unidimensional. bo, corresponde ao bulbo olfatório; hp, ao hipocampo; ca, caudato; cc, córtex cerebral. Duas quantidades de cada amostra são mostradas. A banda correspondente à suposta ppH-47 é indicada pela seta.

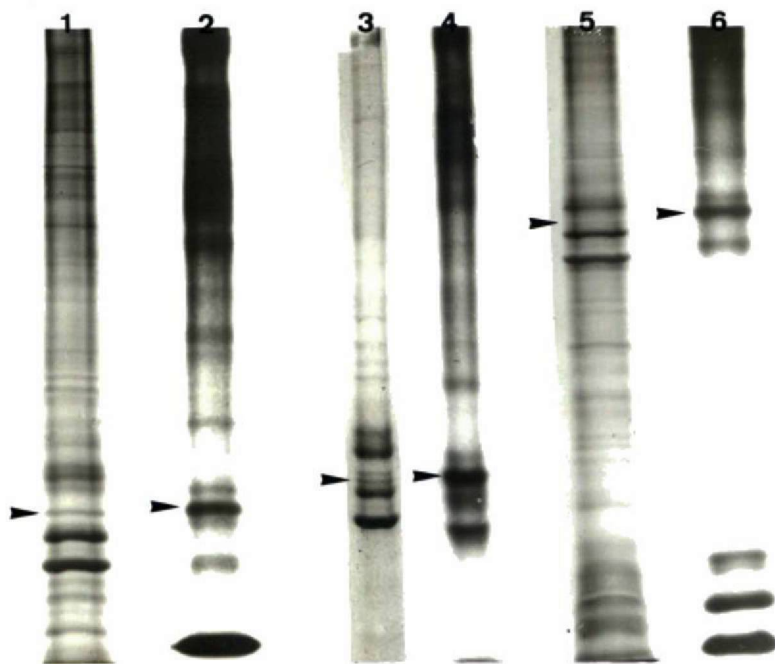


Figura 7. Mobilidade da ppH-47 em SDS-poliacrilamida. Análise da fração Triton-insolúvel em SDS-PAGE em diferentes concentrações de gel: as raias 1 e 2 correspondem ao gel 6% corado com prata e sua respectiva auto-radiografia; as raias 3 e 4 correspondem ao gel 8% corado com Coomassie blue e sua respectiva auto-radiografia; as raias 5 e 6 correspondem ao gel 12% e sua auto-radiografia, respectivamente. A ppH-47 é indicada pela seta. O volume de amostra aplicado era de 10 μ l para coloração com prata e 20 μ l para coloração com Coomassie.

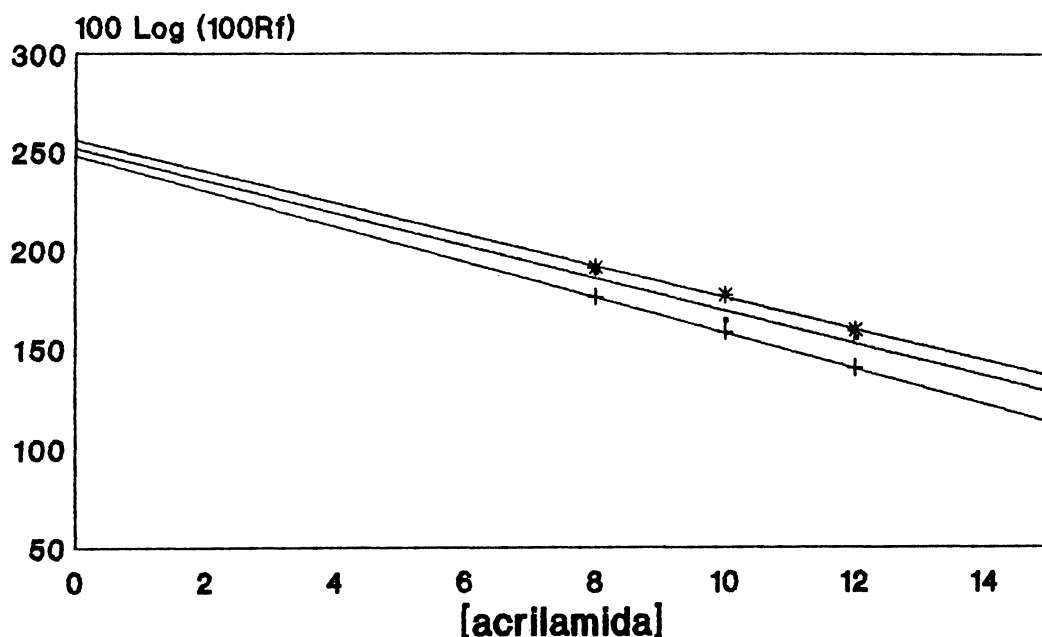


Figura 8. Ferguson "plot" da ppH-47. Estudo da mobilidade eletroforética da ppH-47 em diferentes concentrações de gel, usando albumina(+) e ovoalbumina(*) como padrões.

II.2 ANALISE ESTRUTURAL DA ppH-47 - RESÍDUOS FOSFORILADOS E MAPEAMENTO FOSFOPEPTÍDICO COM PROTEASE V8

A identificação do(s) sítio(s) fosforilado(s) de uma proteína pode dar alguma informação do tipo de quinase envolvida - serina/treonina quinase ou tirosina quinase, bem como à suscetibilidade à ação de determinadas fosfatases. Frequentemente a identificação dos resíduos fosforilados envolve a hidrólise ácida da fosfoproteína e análise dos fosfoaminoácidos resultantes. Alguns substratos de tirosina quinases são identificados pela alcali-estabilidade, um outro procedimento bastante usado na identificação de resíduos fosforilados. Neste trabalho ambos os procedimentos foram usados, até porque são complementares.

II.2.1 Identificação do sítio fosforilado na ppH-47

A hidrólise alcalina com KOH das fosfoproteínas no gel de poliacrilamida sugere, pela auto-radiografia pós-hidrólise, aquelas provavelmente fosforiladas em serina e/ou treonina, devido à álcali-labilidade destes resíduos (figura 9). A ppH-47, como a maioria das fosfoproteínas no gel, apresentou evidência de sítio(s) álcali-lábil(eis), afastando ou reduzindo a possibilidade de fosforilação em tirosina. A fosfoproteína B-50 mostrou uma fosforilação álcali-estável, nestas condições, especialmente quando a fosforilação era forbol-etimulada. Com a estimulação com forbol foi possível notar a presença do fosfopeptídeo 8, um substrato da proteína quinase C (Salbego e Rodnight, 1989), bem como confirmou a aparente insensibilidade da ppH-47 ao forbol, nestas condições.

No segundo procedimento de identificação dos sítios fosforilados, a ppH-47 era recortada e eluída do gel de poliacrilamida. A amostra protéica obtida era submetida à hidrólise ácida e os fosfoaminoácidos resultantes eram analisados por eletroforese de alta voltagem em papel. O método de separação de fosfoaminoácidos mostrou-se bastante satisfatório a julgar pelos Rfs obtidos em relação ao fosfato livre: 0,53 da fosfotirosina, 0,65 da fosfotreonina e 0,76 da fosfoserina (figura 10). O único [³²P]fosfoaminoácido detectado, no hidrolisado ácido da proteína ppH-47 eluída do gel, foi a fosfoserina, um resultado bastante compatível com a álcali-labilidade deste sítio previamente determinada (figura 9).

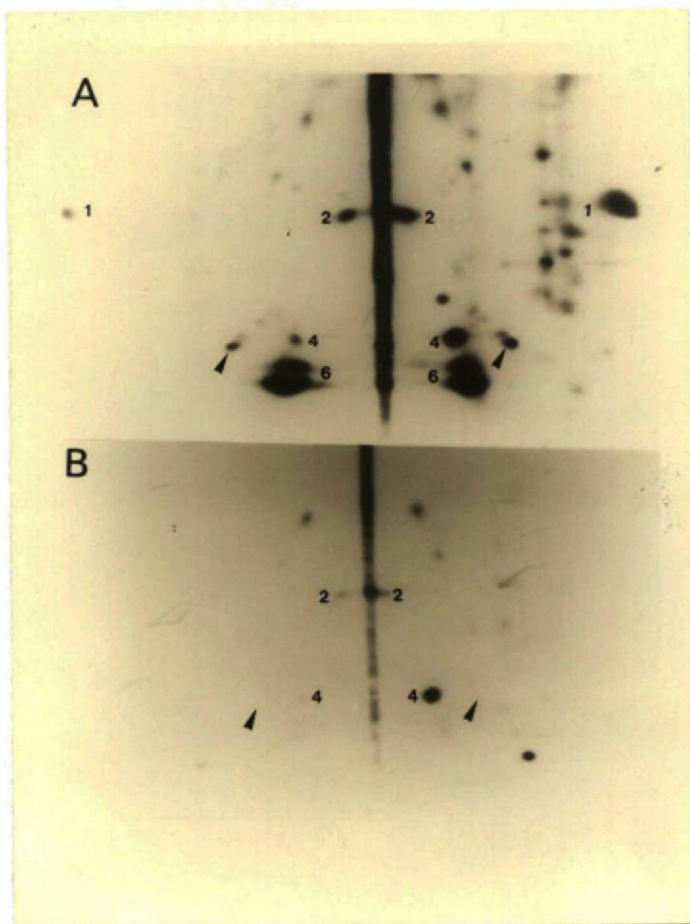


Figura 9. Alkali-labilidade em KOH da ppH-47 e outras fosfoproteínas no gel de poliacrilamida. A, auto-radiografia de fatias hipocâmpais incubadas com $[^{32}\text{P}]$ fosfato: com forbol (PDBu) à direita e sem forbol à esquerda. As fosfoproteínas 1 e 2, servem como referenciais dos lados básico e ácido, respectivamente, em cada situação analisada. B, auto-radiografia do gel mostrado em A após o tratamento com KOH 1M, 60°C , durante 3 horas.

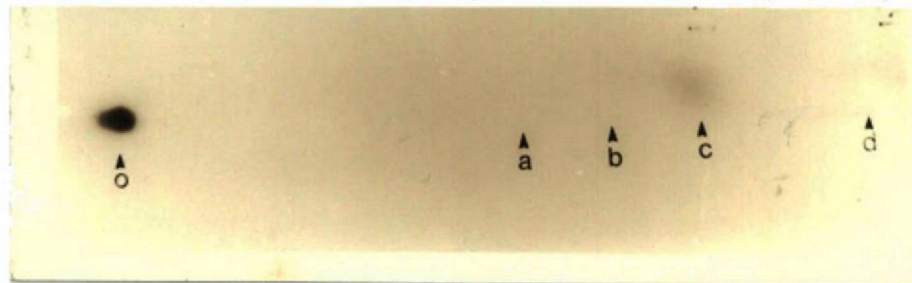


Figura 10. Eletroforese de alta voltagem em papel do hidrolisado ácido da ppH-47 eluída do gel de poliacrilamida. No autoradiografia do papel estão representados: o-origem, onde foi aplicada a amostra de ppH-47 hidrolisada (HCl 6N, 110°C , 90 min); a-posição do padrão de fosfotirosina (R_f 0,53); b-posição da fosfotreonina (R_f 0,65); c-posição da fosfoserina (R_f 0,76); d- $[^{32}\text{P}]$ fosfato livre, tomado como referência para determinação dos R_f s dos fosfoaminoácidos.

III.2.2 Mapeamento fosfopeptídico da ppH-47 com protease V8

O mapeamento fosfopeptídico de uma proteína permite a identificação da multiplicidade de sítios fosforilados, bem como pode estabelecer analogia estrutural entre as fosproteínas analisadas.

O mapeamento da ppH-47 com protease V8 foi feito "in situ" como descrito por Cleveland et al. (1977). Os fragmentos de gel contendo a ppH-47, foram obtidos após a eletroforese bi-dimensional usando géis "curtos" de IEF, como descrito no item II.5.1, que possibilitaram a obtenção de um número maior de amostras, 4 ao invés de 2.

A proteólise da ppH-47, usando a quantidade de protease V8 de 10 a 50 ng, gerou dois fosfopeptídeos de 28 e 24 KDa, aproximadamente (figura 11). Os resultados obtidos com o aumento da concentração de enzima sugere que o peptídeo menor origina-se do maior. Um mapeamento fosfopeptídico usando concentrações muito maiores de enzima é mostrado na figura 12, para confirmar a identidade da ppH-47 na fração Triton-insolúvel analisada em eletroforese unidimensional (vide item III.1.3). A homologia entre a ppH-47 e a banda fosfoprotéica supostamente correspondente a ela na fração Triton-insolúvel, analisada por eletroforese unidimensional, não deixa dúvidas sobre a sua identidade.

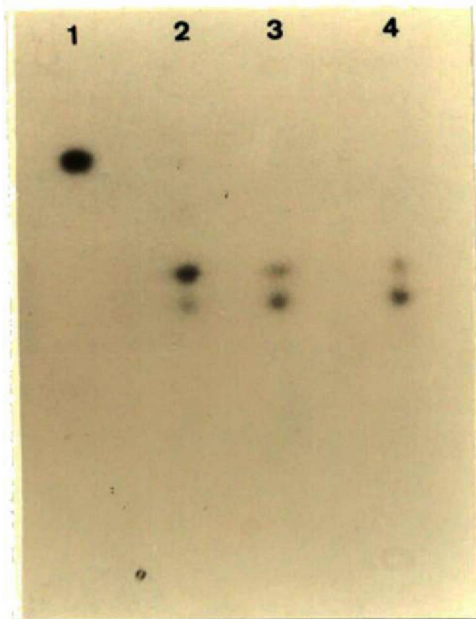


Figura 11. Mapeamento fosfopeptídico da ppH-47 com protease V8. A raia 1 corresponde a ppH-47 controle (sem protease) e as raias 2, 3 e 4 correspondem a ppH-47 com quantidades de 10, 25 e 50 ng de enzima.

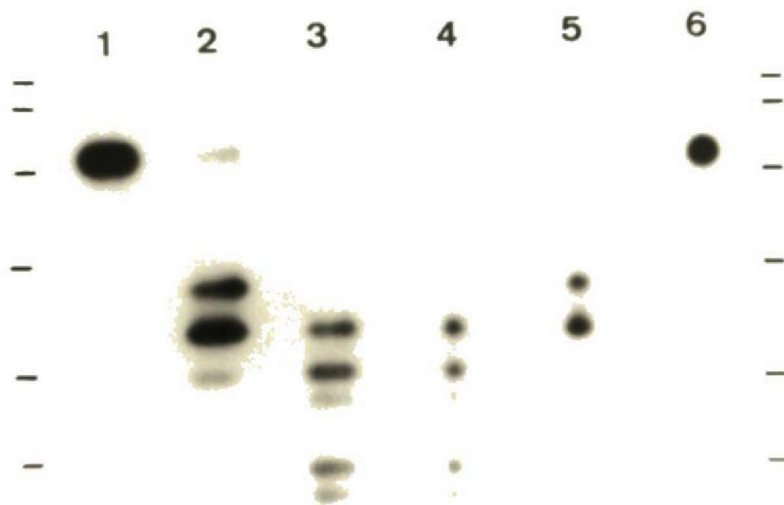


Figura 12. Mapeamento fosfopeptídico comparativo entre a ppH-47 e a suposta ppH-47 identificada em eletroforese unidimensional. O mapeamento "in situ" foi feito usando quantidades de 50 ng (raias 2 e 5) e 500 ng (raias 3 e 4) de protease V8. A suposta ppH-47 é vista nas raias 1 (sem protease), 2 e 3, enquanto a ppH-47 nas raias 4, 5 e 6 (nesta sem protease). A posição dos padrões de peso molecular é indicada lateralmente (fosforilase b - 97,4 KDa, albumina bovina - 66 KDa, ovoalbumina - 45 KDa, anidrase carbônica - 31 KDa, inibidor de tripsina - 21,5 KDa e lisozima - 14,4 KDa).

III.3 SOLUBILIDADE DA ppH-47. ESTABILIZAÇÃO E SOLUBILIZAÇÃO DE [32P]FOSFOPROTEÍNAS DE FATIAS HIPOCAMPAIS

O estudo da solubilidade da ppH-47, inicialmente envolvendo a homogeneização de fatias hipocampais, teve como primeiro passo a estabilização da amostra protéica, com relação à ação de proteases e fosfatases. A prevenção da possível proteólise da ppH-47 no homogenato foi feita com adição de EDTA 10 mM, PMSF 1 mM e leupeptina 1 ug/ul. Não foi percebida nenhuma proteólise da ppH-47 no "pellet" do homogenato hipocampal analisado por eletroforese bidimensional (e unidimensional) quando não eram adicionados PMSF e leupeptina. No entanto, o PMSF foi usado rotineiramente, especialmente devido a inibição proteolítica definitiva que provoca, sem a necessidade de adição complementar, sobre as serina-protease, as mais comuns e abundantes proteases (Scopes, 1987).

III.3.1 Estudo da defosforilação da ppH-47 e outras fosfoproteínas hipocampais

Dois inibidores de fosfatases estavam presentes na homogeneização de fatias hipocampais, incubadas com [32P]fosfato: EDTA e NaF. No entanto, somente a necessidade de fluoreto no meio foi testada, já que o EDTA também foi usado juntamente com o PMSF na inibição de proteases. Os resultados do estudo da defosforilação da ppH-47 e outras fosfoproteínas estão expressos na figura 13. Com a homogeneização de fatias hipocampais, em meios isoiônicos com NaCl/EDTA ou NaF/EDTA é possível observar uma pequena diferença entre os níveis de fosforilação da ppH-47, predominantemente encontrada no "pellet", nestas condições (vide

o item seguinte, referente a solubilidade da ppH-47).

Ainda na figura 13, é possível notar que a homogeneização com fluoreto de fatias marcadas com PDBu foi essencial para evitar a defosforilação da B-50 e MARCKS, enquanto a fosfoproteína 8, um suposto substrato da PQC (Salbego e Rodnight, 1989) parece ter resistido mais à defosforilação mesmo sem fluoreto. A adição de NaOH ao homogenato (pH 11,5) parece não provocar a defosforilação alcalina da ppH-47, nas referidas condições. O resultado da extração alcalina pode observado na figura 14d.

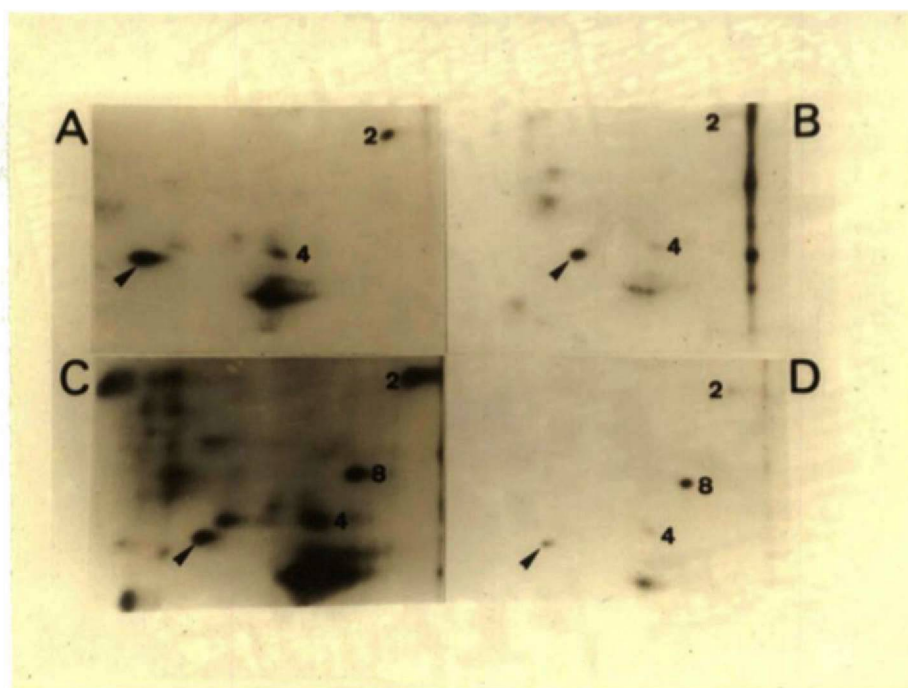


Figura 13. Estudo da defosforilação da ppH-47 e outras fosfoproteínas em amostra hipocampal. Auto-radiografias dos "pellets" obtido com a centrifugação do homogenato de fatia hipocampal com : NaF 100 mM/NaCl 50 mM/EDTA 10 mM, em A e C; NaCl 150 mM/EDTA 10 mM, em B e D. As fatias em C e D foram incubadas com forbol (PDBu). A ppH-47 é indicada pela seta. As fosfoproteínas 2 e 4 correspondem à MARCKS e B-50, respectivamente. A fosfoproteína 2 serve como referencial do lado ácido nas auto-radiografias.

III.3.2 Solubilização da ppH-47 e outras fosfoproteínas presentes em fatias hipocâmpais

Os resultados do estudo da solubilidade do ppH-47 estão expressos nas figuras 14 e 15 e na tabela 2. A homogeneização de fatias hipocâmpais em diferentes meios seguida de centrifugação (40.000 x g, 20 minutos) mostrou o comportamento insolúvel da ppH-47. A homogeneização em EDTA 10 mM somente, revelou a predominância do ppH-47 no "pellet" (figura 14a). Esse comportamento da ppH-47 não parece ter se modificado com o aumento da força iônica para 0,15 e 0,5 no meio de homogeneização (figuras 14b e 14c, respectivamente). Também é evidente nestas figuras o comportamento solúvel do complexo fosfopeptídico de 40 KDa, nestas condições experimentais.

A extração alcalina, feita com adição de NaOH ao homogeneizado, é expresso na figura 14d. É possível observar a limitada solubilização da ppH-47 nestas condições, ao contrário da fosfoproteína B-50 que aparece predominantemente na fração álcali-solúvel.

As tentativas de solubilização com detergentes confirmou o carácter insolúvel da ppH-47. Resistiu a extração com Triton X-100 1% e deoxicolato de sódio 1% (figuras 14e e 14f, respectivamente). O SDS foi um efetivo solubilizante da ppH-47 a 0,2% (figura 14g).

O "pellet" Triton-insolúvel é uma fração bastante enriquecida em ppH-47, no qual mais de 80% das [³²P]fosfoproteínas analisadas em eletroforese bidimensional estavam ausentes e 90% ou mais da ppH-47 permanecia nesta fração

(Gonçalves et al., 1990b). Uma segunda extração, a partir desse "pellet", com diversos detergentes não foi efetiva na solubilização da ppH-47 (tabela 2). Dentre os detergentes o colato de sódio foi o mais eficiente, chegando a 21% de extração (tabela 2 e figura 15). Tanto a digitonina, quanto o CHAPS foram bastante ineficientes. A eficiência do colato de sódio não foi aumentada com a força iônica (que variou no meio de 0,5 a 1,5 pela adição NaCl). A eficiência da solubilização com colato de sódio em pH fortemente alcalino (tabela 2) parece ser devido somente a alcalinização "per si" (figura 14d).

A uréia foi eficiente na solubilização do ppH-47 a 6 e 8M (tabela 2 e figura 15). Foi menos eficiente a 4M onde pode ser comparada a extração alcalina (cerca de 60%) e menos ainda a 2M onde pode ser comparada ao colato de sódio (cerca de 20%).

Tabela 2. Solubilização da ppH-47 com diversos detergentes e uréia a partir do "pellet" Triton-insolúvel analisado por SDS-PAGE e semi-quantificado por densitometria.

AGENTE	CONCENTRAÇÃO	% DE SOLUBILIZAÇÃO
Triton X-100	1%	5-10
Colato de sódio	20 mM	16-21
Deoxicolato de sódio	1%	11-19
CHAPS	10mM	4-6
Digitonina	1%	6-10
Colato de sódio em meio fortemente alcalino(a)	20 mM	57-60
Colato de sódio em meio de alta força iônica (b)	20 mM	16-25
Uréia	2 M 4 M 6 e 8 M	14-20 56-61 79-82

(a) Adição de NaOH 1 M até pH atingir 11,5 aproximadamente. (b) Força iônica no meio variou de 0,5 a 1,5 por adição de NaCl.

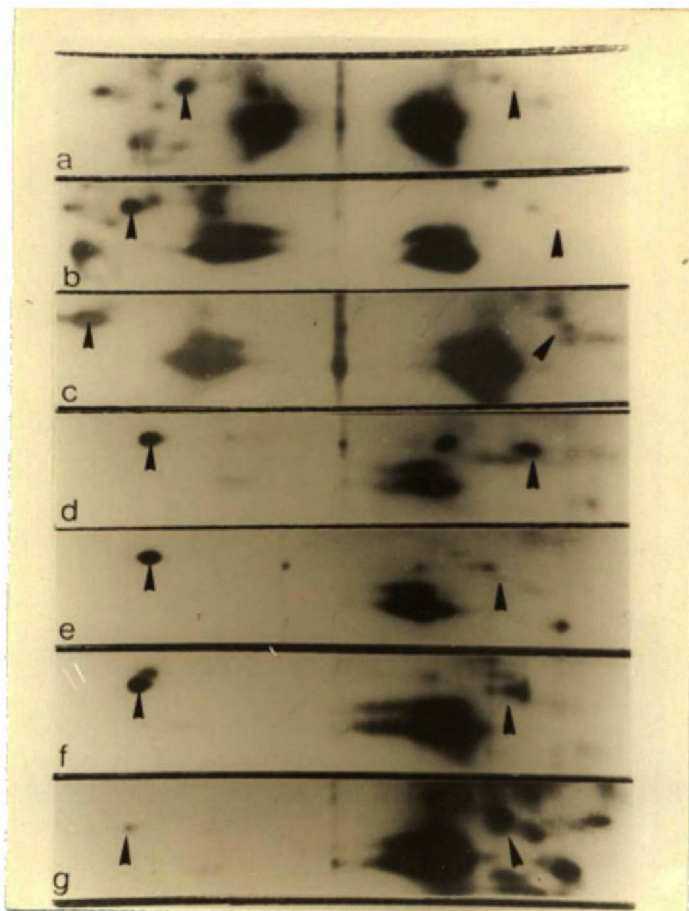


Figura 14. Solubilidade da ppH-47 analisada em eletroforese bidimensional. Auto-radiografias dos "pellets" (à esquerda) e sobrenadantes (à direita) obtidos de fatias hipocâmpais homogeneizadas em diferentes meios: a, EDTA 10 mM; b, NaCl 50 mM/NaF 100 mM/EDTA 10 mM (solução F); c, NaCl 1,4 M/NaF 100 mM/EDTA 10 mM; d, Solução F, alcalinizando com NaOH 1M até pH 11,5 aproximadamente; e, Triton X-100 0,5%; f, Deoxicolato de sódio 0,5%; g, SDS 0,2%. Os detergentes era adicionados em solução F. As frações obtidas eram analisadas em eletroforese bidimensional. A ppH-47 é indicada pela seta.

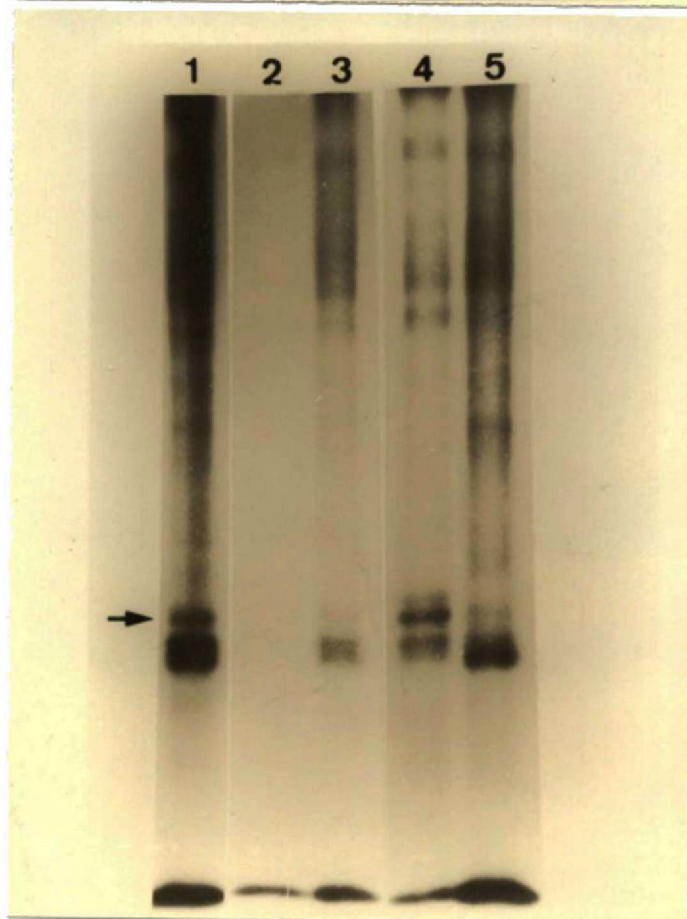


Figura 15. Solubilização da ppH-47 a partir do "pellet" Triton-insolúvel, analisada por eletroforese unidimensional. O "pellet" Triton-insolúvel de fatias hipocâmpais (raia 1) era ressuspensão em colato de sódio 20 mM ou uréia 6M e centrifugado a 40.000 x g, durante 20 min. Sobrenadante e "pellet" da extração com colato são mostradas nas raias 2 e 3, respectivamente. Nas raias 4 e 5 são mostrados sobrenadante e "pellet" da extração com uréia, respectivamente. A ppH-47 é indicada pela seta.

III.4 IDENTIFICAÇÃO DE UMA SUPOSTA ppH-47 EM OUTRAS ESPÉCIES DE MAMÍFEROS

Estudo da solubilidade foi o primeiro passo na direção da purificação da ppH-47. A seguir foi feita uma investigação na tentativa de descobrir uma outra fonte de ppH-47 que permitisse ampliar a possibilidade de caracterizar e/ou purificar esta proteína. Quatro espécies de mamíferos foram analisadas: boi, coelho, cobaia e camundongo. Nesta fase, não havia sido feita a imunocaracterização da ppH-47 e portanto a sua suposta identificação em outras espécies não envolveu o uso de anticorpos. A identificação foi feita com base nas características bioquímicas da ppH-47, até então conhecidas, tais como: 1. A fosforilação Ca^{2+} dependente em micro-fatias de rato adulto (Wofchuk e Rodnight, 1990); 2. A distribuição regional cerebral (Rodnight e Leal, 1990); 3. A Triton-insolubilidade (item II.4).

A figura 16 mostra a distribuição regional da suposta ppH-47 (indicada por uma seta), nas diferentes espécies. É possível observar uma fosfoproteína bastante evidente em hipocampo (coelho e cobaia) e globus pallidus (camundongo) e discreta ou ausente em caudato (coelho e camundongo) e córtex cerebral (cobaia). No boi, embora não tão evidente, é possível notar uma diferença entre o giro dentado hipocampal e o caudato. Também é possível observar nas micro-fatias bovinas a ausência do peptídeo maior do complexo fosfopeptídico de 40 KDa (indicado pelo número 6). Esta ausência é evidenciada na figura 19, no experimento de co-migração boi-rato.

A fosforilação Ca^{2+} dependente da suposta ppH-47 (indicada por uma seta) é observada na figura 17, em todas as espécies analisadas, exceto em boi. Nas micro-fatias bovinas, com a estimulação com forbol (figura 17C), pode-se identificar proteínas associadas ao crescimento : MARCKS (fosfoproteína 2) e B-50 (fosfoproteína 4).

A insolubilidade da suposta ppH-47 à extração com Triton X-100 1% pode ser observada em todas as espécies analisadas (figura 18). Em boi três fosfopeptídeos apresentaram comportamento Triton-insolúvel - a suposta ppH-47, a B-50 (fosfoproteína 4) e a fosfoproteína 7. A fosfoproteína 7 apresenta algumas similaridades, porém não conclusivas, com a subunidade alfa da proteína quinase CaM II. Somente a suposta ppH-47 foi resistente à extração alcalina (figura 18B), em micro-fatias bovinas.

As dúvidas sobre a suposta ppH-47 em boi foram em parte resolvidas com um experimento de co-migração com um amostra hipocampal de rato, mostrado na figura 18, onde é possível observar a mobilidade eletroforética similar entre a ppH-47 (de rato) e a suposta ppH-47 (em boi).

A análise eletroforética bidimensional das micro-fatias cerebrais das espécies analisadas evidenciou em todas elas, excetuando-se ao boi, uma fosfoproteína similar à ppH-47 do rato, no que se refere as características de distribuição regional, fosforilação Ca^{2+} dependente e Triton-insolubilidade. Embora a suposta ppH-47 nessas espécies tenha apresentado uma pequena

diferença na mobilidade eletroforética em relação à ppH-47 no rato e mesmo entre as espécies analisadas, este fato não exclui a identidade com a ppH-47, porém indica a necessidade de um estudo mais detalhado da fosfoproteína. Em boi, apesar da suposta ppH-47 não ter apresentado fosforilação Ca^{2+} dependente e nem a distribuição regional característica, a fosfoproteína apresentou uma migração eletroforética idêntica à ppH-47 do rato, nestas condições.

Este estudo, embora inconclusivo, aponta uma suposta ppH-47 em outras espécies, com base nas características conhecidas da ppH-47 no rato. No entanto, a confirmação da identidade nestas espécies deve envolver uma análise estrutural e imunoquímica da fosfoproteína supostamente correspondente à ppH-47.

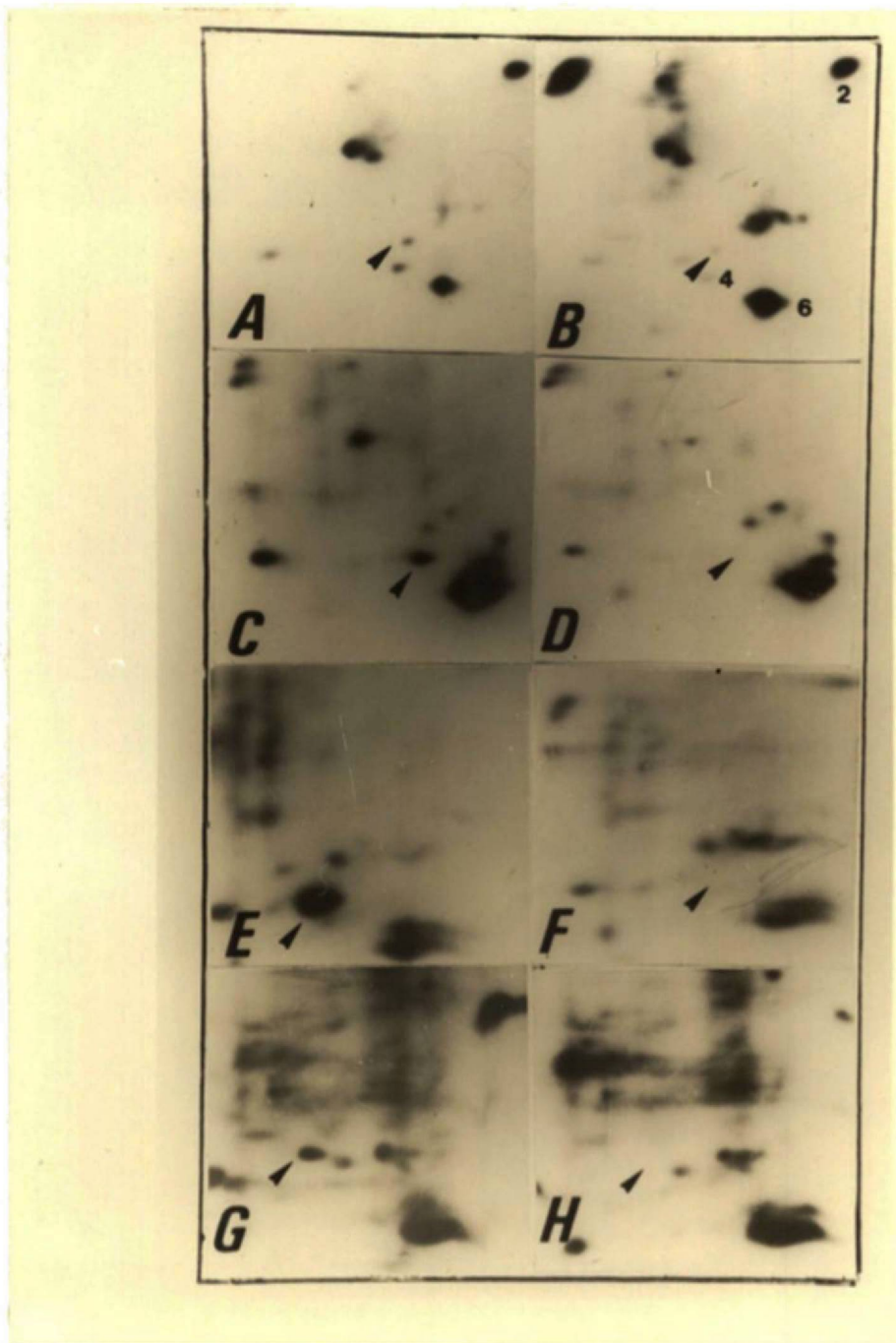


Figura 16. Distribuição regional cerebral da suposta ppH-47 em outras espécies. Eletroforese bidimensional de fatias cerebrais de: boi (A, hipocampo e B, caudato); camundongo (C, globus pallidus e D, caudato); coelho (E, hipocampo e F, caudato) e cobaia (G, hipocampo e H, córtex cerebral), incubadas com $[^{32}\text{P}]$ fosfato. A seta indica a posição da suposta ppH-47. Em B estão indicados outras fosfoproteínas: 2 (MARCKS), 4 (B-50) e 6, correspondente ao peptídeo menor do complexo fosfopeptídico de 40 KDa.

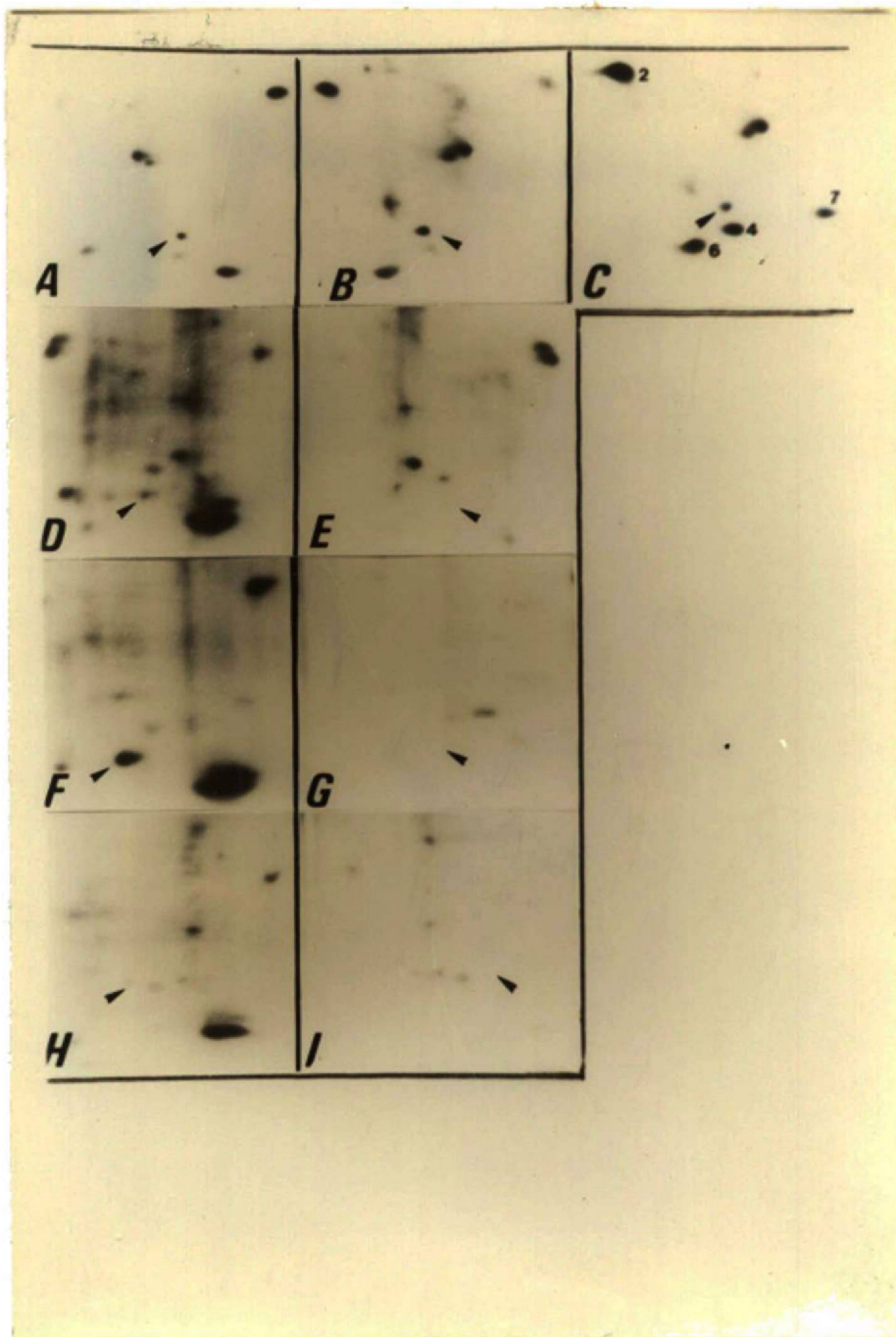


Figura 17. Fosforilação Ca^{2+} dependente da suposta ppH-47 em outras espécies. Eletroforese bidimensional de fatias cerebrais de: boi (A, com Ca^{2+} , B, sem Ca^{2+} e C, com Ca^{2+} e forbol); camundongo (D, com Ca^{2+} e E, sem Ca^{2+}); coelho (F, com Ca^{2+} e G, sem Ca^{2+}) e cobaia (H, com Ca^{2+} e I, sem Ca^{2+}), incubadas com $[^{32}\text{P}]$ fosfato. A suposta ppH-47 é indicada pela seta. Em C estão indicadas outras fosfoproteínas: 2 (MARCKS), 4 (B-50/GAP43), 6 (peptídeo menor do complexo fosfopeptídico de 40 KDa) e a 7.

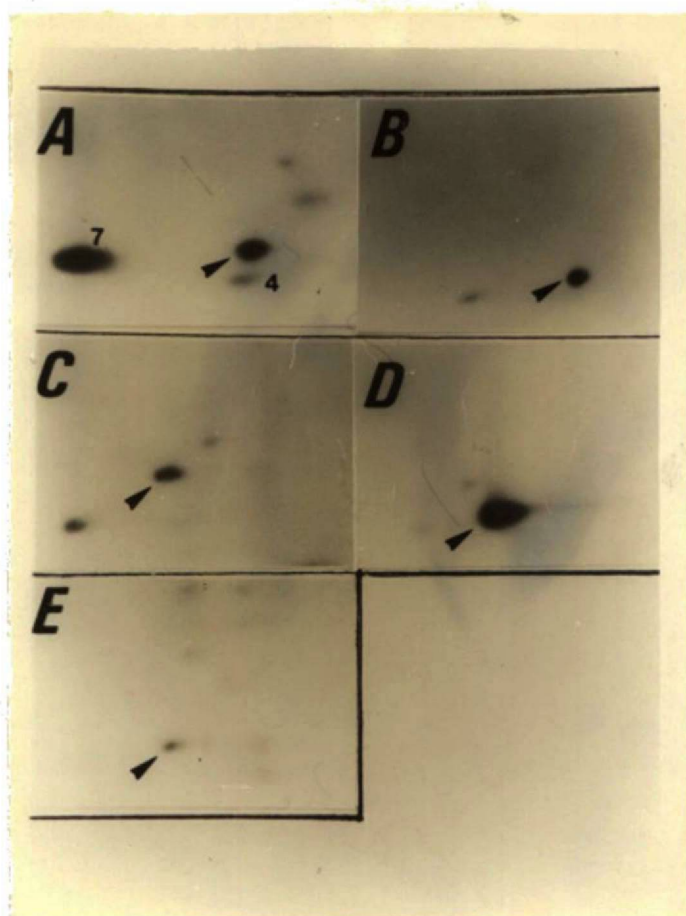


Figura 18. Insolubilidade da suposta ppH-47 em outras espécies: à extração com Triton X-100 1% em boi (A), camundongo (C), coelho (D) e cobaia (E) e extração alcalina com adição de NaOH 1 M, pH 11,5 em boi (B). A suposta ppH-47 está indicada pela seta e em A estão indicadas as fosfoproteínas 4 (B-50) e 7.

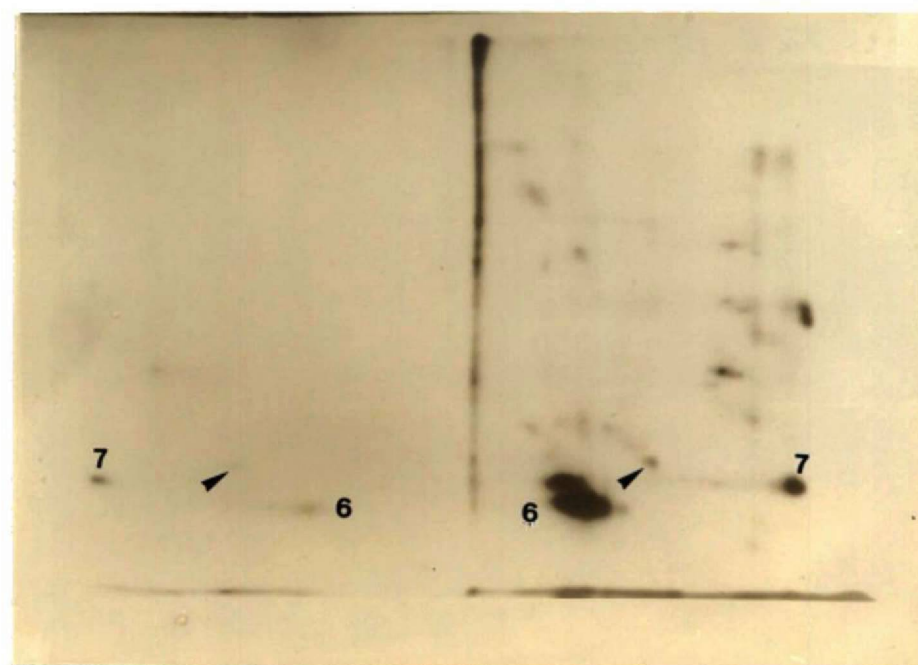


Figura 19. Co-migração da amostra bovina com a amostra de rato. A esquerda está a migração da amostra bovina e à direita a mistura boi-rato. A seta indica a suposta ppH-47 à esquerda e a ppH-47 à direita. Estão indicadas como referenciais as fosfoproteínas 6 (complexo fosfopeptídico de 40 KDa) e 7.

III.5 ELETROTRANSFERÊNCIA DA ppH-47 PARA NITROCELULOSE

A eletrotransferência de proteínas do gel de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose tem sido amplamente utilizado na caracterização protéica, devido a possibilitar o acesso de diversos ligantes, tais como anticorpos, às proteínas transferidas (Tovey e Baldo, 1989; Timmons e Dunbar, 1990). A eficiência da transferência envolve diversos parâmetros e cada proteína apresenta um comportamento específico, o que exige a padronização de um método para cada proteína. Uma variante do processo de eletrotransferência foi introduzida por Svoboda e colaboradores (1985) - o "semidry electroblotting", no qual a transferência é feita usando eletrodos em placa e permite o uso de diferentes tampões nos eletrodos (Kyhse-Anderson, 1988).

Inicialmente foi feita a padronização da eletrotransferência da ppH-47 para nitrocelulose, especialmente usando a fração Triton-insolúvel, usando um "semidry electroblotter". Mais recentemente foi desenvolvido em nosso laboratório um outro procedimento de eletrotransferência capaz de transferir uma amostra protéica de diversos fragmentos de gel fixados e secos para um único disco de nitrocelulose. Este último procedimento, já submetido à publicação, poderá ser bastante útil na caracterização protéica.

III.5.1 Padronização do "semidry electroblotting"

O primeiro parâmetro avaliado foi a composição do tampão, usado tanto na transferência quanto na equilibração do gel. Nesta

fase foi usada uma equilibração de 15 minutos , uma amperagem inicial de (5 mA/cm²), a voltagem máxima foi estabelecida em 15 ou 20 Volts e a duração da transferência foi 30 minutos.

O tampão de Bjerrum (Tris 48 mM/ glicina 39 mM/ SDS 1,3 mM/ metanol 20%), nestas condições, permitiu uma melhor eluição protéica do gel que o tampão de Towbin (Tris 25 mM/ Glicina 192/ metanol 20%), especialmente das bandas de baixo peso molecular - incluído a ppH-47. A presença de SDS no tampão Towbin não mudou esse resultado. No entanto, eficiência do processo de transferência, nestas condições, era muito baixa, isto é, as [32P]fosfoproteínas eluídas do gel não eram fixadas na nitrocelulose e vestígios eram encontrados no papel de filtro, ou na membrana de nylon quando usada, sob a nitrocelulose.

Nesse sentido foi estudada a densidade da corrente aplicada, fixando a voltagem em 15 ou 20 Volts. O gel era equilibrado durante 15 minutos em tampão de Bjerrum com SDS e a seguir era submetido a eletrotransferência, durante 30 minutos, com densidade de corrente variável de 0,5 a 5,0 mA/cm². Valores inicialmente estabelecidos acima de 2,0-2,5 mA/cm² decresciam durante a transferência, mantendo-se a voltagem alta e constante. Um resultado da eletrotransferência nestas condições pode ser observada na figura 20. A eluição [32P]fosfoprotéica do gel era bastante satisfatória, porém pouco era fixado à nitrocelulose e na membrana de nylon podem ser vistos vestígios dessa "fuga" protéica. Usando-se valores mais baixos, isto é, menores que 2,0 mA/cm² o comportamento da voltagem mudava. Ela iniciava baixa,

cerca de 3-7 Volts, e subia lentamente até atingir 9-14 Volts. A amperagem mantinha-se contante, e conseqüentemente a densidade de corrente. Neste caso a eluição do gel era baixa, em 30 minutos. Considerando que a eletrotransferência poderia ser mais efetiva usando-se uma baixa densidade de corrente por um período de tempo maior, foi necessário fazer uma curva de tempo para avaliar esse período. Foi introduzida uma pequena modificação em relação aos procedimentos anteriores: fez-se uma equilibração curta (menos de um minuto), usando o tampão de Bjerrum sem SDS. A eficiência do processo foi avaliada por auto-radiografia da nitrocelulose e por coloração da nitrocelulose com Amido Black, que era substituída a cada 5 ou 10 minutos, durante a transferência.

A curva de tempo mostrou que a transferência da ppH-47 ocorria, nestas condições, mais acentuadamente entre 25 e 50 minutos. Na figura 21 são mostradas as auto-radiografias das membranas de nitrocelulose dos intervalos 0-15 min, 15-50 min e 50-65 min, a membrana de nitrocelulose do intervalo 15-50 corada com amido black e o gel "blotado" corado com Coomassie e sua respectiva auto-radiografia. A membrana de nylon colocada sob a nitrocelulose não mostrou nenhum vestígio de [³²P]fosfoproteína. A quantidade protéica transferida à nitrocelulose avaliada por coloração com Coomassie blue do gel "blotado" (e/ou coloração com Amido black da nitrocelulose) indica uma eficiência superior a 80%. No entanto, a transferência da ppH-47 avaliada por auto-radiografia foi cerca de 60-70%.

O resultado da eletrotransferência de uma amostra hipocampal

analisada por eletroforese bidimensional, fixada e seca pode ser visto na figura 22. Ficou evidente a possibilidade de eletrotransferência de uma amostra fixada e seca. No entanto, nas condições referidas, a eficiência foi baixa comparada ao procedimento usando gel não-fixado. Atualmente um procedimento usado em nosso laboratório, no qual o gel fixado e seco é equilibrado durante 45-60 min em tampão Tris 25 mM/ glicina 192 mM/ SDS 0,1% e a seguir é lavado em tampão de Bjerrum e transferido como descrito no item II.8.2, apresenta uma eficiência de pelo menos 50%.

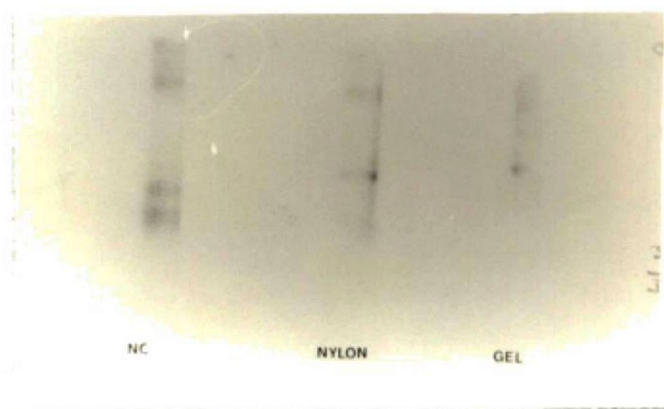


Figura 20.
Eletrotransferência da fração Triton-insolúvel do gel de poliacrilamida para nitrocelulose, usando alta densidade de corrente. Após a SDS-PAGE a fração [³²P]fosfoprotéica era transferida para NC em "semidry electroblotter", com uma densidade inicial de corrente de 3,0 mA/cm², durante 30 minutos. Gel - gel de poliacrilamida após a eletrotransferência, NC - membrana de nitrocelulose e Nylon - membrana de nylon colocada sob a nitrocelulose.

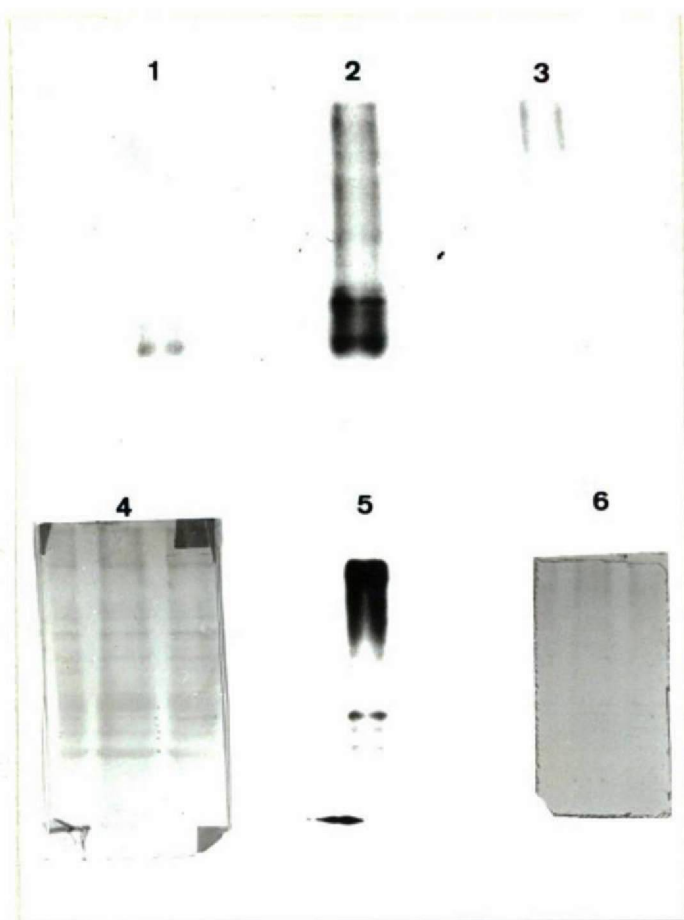


Figura 21. Tempo de eletrotransferência da fração Triton-insolúvel do gel de poliacrilamida para nitrocelulose. Após a SDS-PAGE a fração $[^{32}\text{P}]$ fosfoprotéica era transferida em tampão de Bjerrum sem SDS e com uma densidade de corrente $1,2 \text{ mA/cm}^2$: 1, auto-radiografia da NC (nitrocelulose) no período 0-15 min; 2, auto-radiografia da NC no período 15-50 min; 3, auto-radiografia da NC no período 50-65 min; 4, NC (15-50 minutos) corada com Amido black; 5, auto-radiografia do gel "blotado"; 6, coloração com Coomassie do gel "blotado".



Figura 22. Eletrotransferência de uma amostra hipocámpal analisada por eletroforese bidimensional, do gel de poliacrilamida fixado e seco para nitrocelulose: 1, gel "blotado"; 2, nitrocelulose no período 0-30 min; 3, nitrocelulose no período 30-60 min. A seta indica a ppH-47.

III.5.2 Eletrotransferência de [³²P]fosfoproteínas do gel de poliacrilamida para discos de nitrocelulose

As proteínas podem ser recuperadas do gel de poliacrilamida por: eluição por homogeneização (Gurd, 1985; Feick e Shiozawa, 1990); eletroeluição para dentro de um saco de diálise (Hanaoka et al., 1979; Hunkapiller et al., 1983) ou para um descontínuo gradiente de condutividade (Otto e Snejdarkova, 1981; Stralfors e Belfrage, 1983); eletrotransferência para membranas immobilizadas (Towbin et al., 1979; Gershoni e Palade, 1982; Gultekin e Heermann, 1988). A eluição por homogeneização é bastante demorada e geralmente tem baixo rendimento. Eletroelutos são frequentemente contaminados com SDS e sais, cuja remoção acarreta em perda da proteína. A eletrotransferência de proteínas para membranas tem superado estes problemas. Além disso, tem facilitado em muito a caracterização protéica, já que pequenas quantidades de uma proteína "blotada" pode ser usada para imunização (Abou-Zeid et al., 1987) e sequenciamento (Matsuidara, 1987; Aebersold et al., 1987).

Entretanto, as condições ótimas de eletrotransferência do gel para membranas são difíceis de obter. A presença de SDS no tampão de equilíbrio e transferência pode facilitar a eluição da proteína, mas reduz sua adsorção à membrana. O metanol comumente é adicionado aos tampões para reduzir o inchaço do gel durante a equilíbrio, retirar o SDS das proteínas e aumentar a adsorção destas à membrana. No entanto, o metanol decresce a solubilidade de muitas proteínas. Levando em conta estes problemas, foi elaborado um procedimento de eletrotransferência

de [³²P]proteínas ácido-fixadas de fragmentos secos de gel para um pequeno disco de nitrocelulose, usando um descontínuo gradiente de densidade (vide figura 1).

Os resultados obtidos com o método aqui proposto, de eletrotransferência de fosfoproteínas para discos de nitrocelulose (ou nylon), estão expressos nas tabelas 3 e 4 e na figura 23.

O efeito da concentração de SDS na equilibração e eletrotransferência dos fragmentos de gel de poliacrilamida, fixados e secos, contendo a ppH-47, pode ser visto na tabela 3. A radioatividade foi medida nos fragmentos de gel, no meio de transferência (o qual consistia de agarose, TG-glicerol e TG-metanol na coluna) e o disco de nitrocelulose. Apenas 18% da radioatividade [³²P]fosfoprotéica foi eluída com 0,02% de SDS, durante a equilibração, mas mais que 90% foi eluído usando 0,2% ou 2%. A detecção da fosfoproteína no disco de nitrocelulose variou de 78-84%, nessas condições. Resultados similares a este foram encontrados usando discos de nylon e 2% de SDS na equilibração. Pequena quantidade de radioatividade era detectada no meio de equilibração, mesmo com altas quantidades de SDS. A figura 23 mostra a curva de tempo de eletrotransferência da ppH-47, a corrente constante de 5 mA. A transferência aumenta rapidamente numa primeira fase, atingindo mais que 50% e 75% nos primeiros 20 e 30 minutos, respectivamente. Depois a taxa de transferência cresce mais lentamente atingindo 84% aos 60 minutos.

A eletrotransferência de outras fosfoproteínas, nas condições estabelecidas para ppH-47, apresentou uma eficiência menor (tabela 4). No caso da sinapsina I somente 53% foi detectada na nitrocelulose e 34-41% permaneceu nos fragmentos de gel. A transferência da MARCKS foi ainda menos eficiente. Grande parte permaneceu no gel (31-34%) e uma quantidade variável era detectada na nitrocelulose (37-50%).

A coluna de eletrotransferência, isto é, o gel de suporte, pode ser utilizado mais de uma vez (até 3 vezes) sem haver prejuízo na eficiência da eletrotransferência da ppH-47, nesta condição.

Tabela 3. Efeito da concentração de SDS no meio de equilíbrio sobre a transferência da ppH-47.

	CONCENTRAÇÃO DE SDS (%)		
	0,02	0,2	2
	(3)	(3)	(9)
Meio de equilíbrio	0,5-1,5	3-5	4-6
Fragmentos de gel	76-81	6-10	4-10
Meio de transferência	2	2-4	3-5
Disco de nitrocelulose	14-22	78-84	79-83

Os valores expressos representam a percentagem da radioatividade total determinada pela radiação de Cerenkov. O número de experimentos em cada condição esta indicado entre os parenteses. O meio de transferência refere-se a agarose, TG-glicerol e TG-metanol na coluna de eletrotransferência.

Tabela 4. Eletrotransferência da sinapsina I e MARCKS para nitrocelulose, usando SDS 2% no meio de equilíbrio.

	SINAPSINA I	MARCKS
	(3)	(5)
Fragmentos de gel	34-41	31-34
Disco de nitrocelulose	51-55	37-50

Os valores estão expressos como na tabela 3.

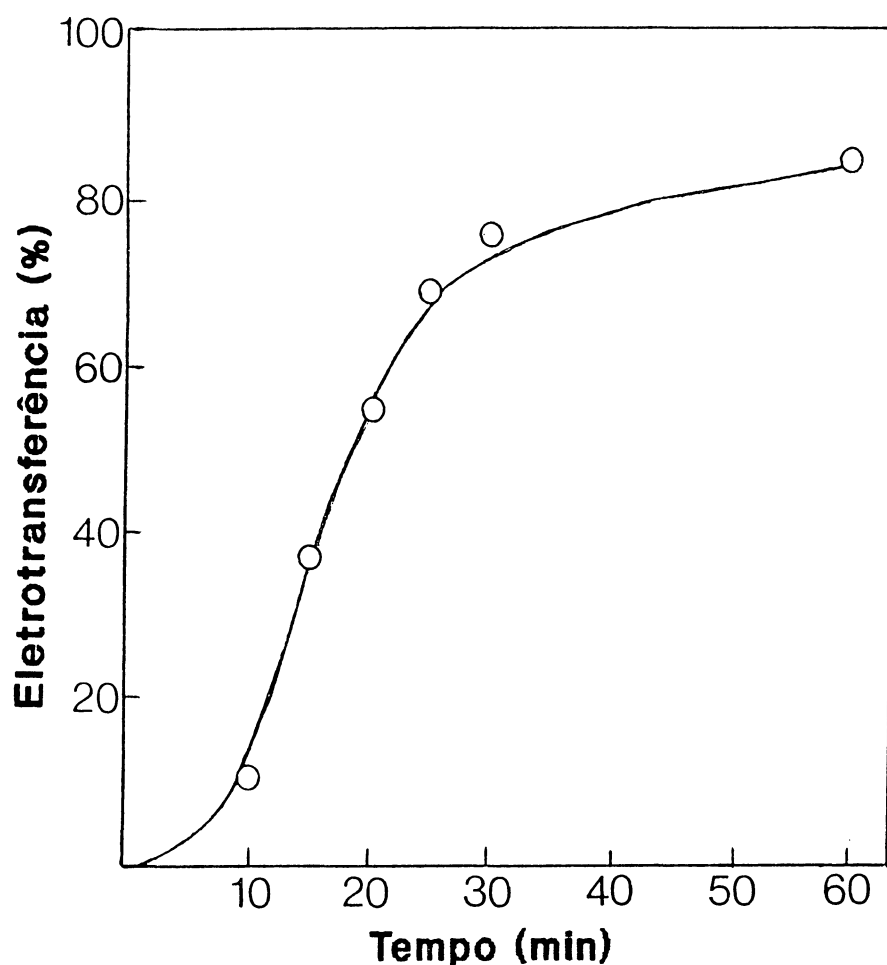


Figura 23. Curva da eletrotransferência da ppH-47 para o disco de nitrocelulose em função do tempo. Os valores expressos representam o percentual da radioatividade determinada pelo Cerenkov na membrana de nitrocelulose durante o processo.

III.6 IMUNOCARACTERIZAÇÃO DA ppH-47

No curso de caracterização da ppH-47 muitos aspectos desta fosfoproteína mostravam similaridade à uma fosfoproteína astrocítica, a GFAP. Entre os aspectos comuns às duas proteínas estavam: a mobilidade eletroforética (ponto isoelétrico e peso molecular); o mapeamento fosfopeptídico que sugeria a possibilidade de uma analogia entre as fosfoproteínas; a insolubilidade ao Triton X-100. Além destes, outros aspectos descritos paralelamente, apontavam a possibilidade de serem a ppH-47 e a GFAP a mesma proteína: a ontogenia pós-natal da ppH-47, detectada aos 10 dias (Salbego, 1990) e a ausência desta fosfoproteína em sinaptossomas, uma fração neuronal-específica (Rodnight et al., 1991). Algumas características da GFAP colocavam em dúvida sua identidade com a ppH-47, especialmente com relação à distribuição regional (Patel et al., 1985), à fosforilação Ca^{2+} independente (Noetzel, 1990) e à estimulação com forbol (Harrison e Mobley, 1989).

Dois procedimentos de caracterização por "immunoblotting" foram feitos com a ppH-47: 1. Usando o soro policlonal anti-GFAP da Sigma; 2. Usando um soro produzido contra a ppH-47, obtido de uma amostra hipocampal Triton-insolúvel, separada em SDS-PAGE, como descrito no item II.9.1.

A identificação da ppH-47 usando soro anti-GFAP é mostrado na figura 24. A amostra hipocampal analisada por eletroforese bidimensional, transferida para nitrocelulose e identificada com soro anti-GFAP apresenta uma única mancha correspondente a GFAP,

coincidente com a mancha auto-radiográfica da ppH-47. A confirmação de sua identidade com GFAP envolveu um estudo da distribuição regional (figura 26) e da proteólise Ca^{2+} dependente (figura 27).

Na figura 25 é mostrada a distribuição de ppH-47 na fração Triton-insolúvel de regiões cerebrais, incluindo medula e corda espinhal. A banda auto-radiográfica da ppH-47 na fração Triton-insolúvel está fortemente presente em hipocampo, praticamente ausente em medula e bastante fraca em corda espinhal.

No entanto, a imunoidentificação com anti-GFAP usando as mesmas amostras de algumas destas regiões cerebrais (figura 26), mostra uma acentuada quantidade da GFAP em corda espinhal e uma menor quantidade nas áreas corticais, onde o hipocampo se destaca. A principal banda imunoreativa coincide com a posição da ppH-47.

A proteólise Ca^{2+} dependente da banda imunoidentificada em hipocampo e corda espinhal com anti-GFAP está expressa na figura 27. A corda espinhal mesmo incubada em meio sem Ca^{2+} apresenta uma banda secundária imunoreativa com anti-GFAP bastante evidente, que é acentuada com a incubação em meio com Ca^{2+} . Além desta, pelo menos mais 4 bandas imunoreativas podem ser vistas nesta condição. Fatias hipocampais incubadas em meio com Ca^{2+} apresentam esta segunda banda imunoreativa, que está ausente na incubação sem Ca^{2+} . Outras áreas corticais incubadas com Ca^{2+} , como o hipocampo, apresentam esta banda secundária (figura 26).

Confirmando os dados de imunoidentificação da GFAP em corda

espinhal, onde a taxa de fosforilação é baixa, foi feito um experimento de co-migração de amostras Triton-insolúveis de hipocampo de corda espinhal. Aplicando quantidades equivalentes de proteína, foi possível notar uma banda fortemente corada com Coomassie não fosforilada em corda espinhal, que tem a mesma mobilidade da banda auto-radiográfica da ppH-47 (dados não mostrados).

Um problema encontrado na imunocaracterização foi a defosforilação da ppH-47. A redução do tempo de "blocking" e a adição de NaF 20 mM no M-TBS, durante as diversas etapas parece ter reduzido, mas não evitado a defosforilação.

A identificação da ppH-47 com o soro produzido contra essa proteína, preparado pelo Dr. Larson, foi feita por eletroforese bidimensional de amostra hipocampal (figura 28). A mancha corada na nitrocelulose corresponde a mancha auto-radiográfica da ppH-47. A imunoidentificação envolvendo diferentes áreas cerebrais (bulbo olfatório, córtex cerebral, hipocampo e corda espinhal) pode ser observado na figura 29. A banda imunoreativa, embora mais fraca nestas condições, mostrou uma similaridade aos resultados encontrados com anti-GFAP (figura 26).

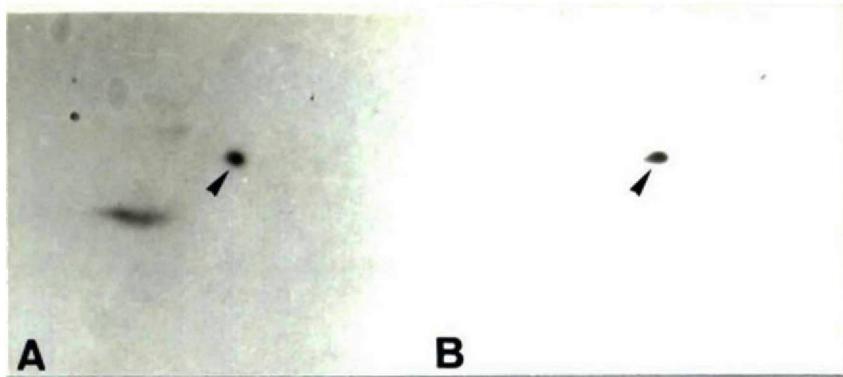


Figura 24. Imunoidentificação da GFAP na amostra hipocampal marcada e analisada por eletroforese bidimensional. A amostra hipocampal foi transferida para nitrocelulose e imunocaracterizada com anti-GFAP. A seta indica a posição autorradiográfica da ppH-47 na nitrocelulose (em A) e a mancha imunoreativa correspondente (em B).

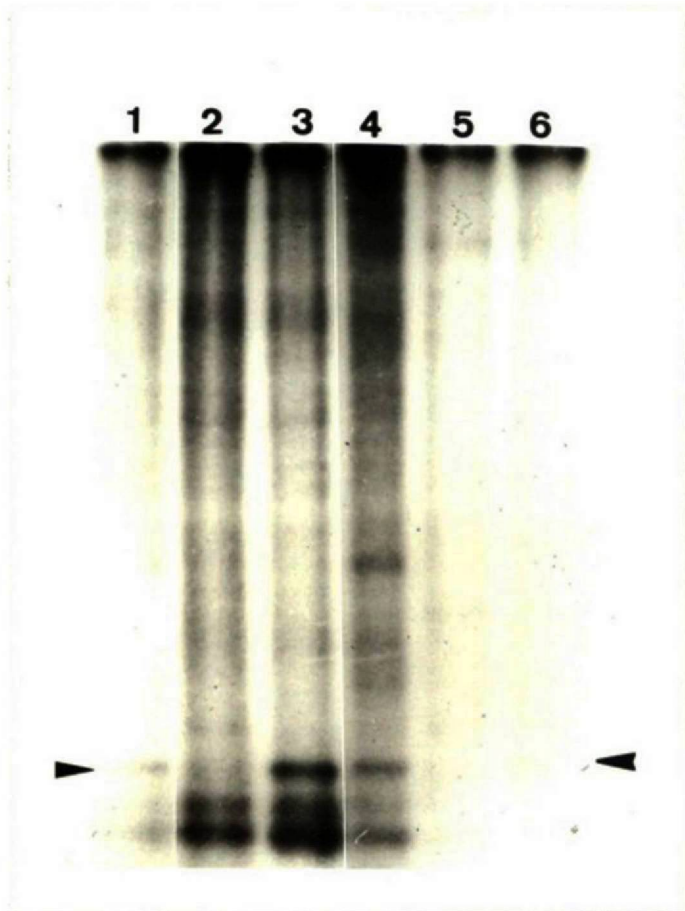


Figura 25. Auto-radiografia da eletroforese unidimensional da fração Triton insolúvel de diversas regiões cerebrais : 1- Bulbo olfatório; 2- Caudato; 3- Hipocampo; 4- Cerebelo; 5- Medula; 6- Corda espinhal.

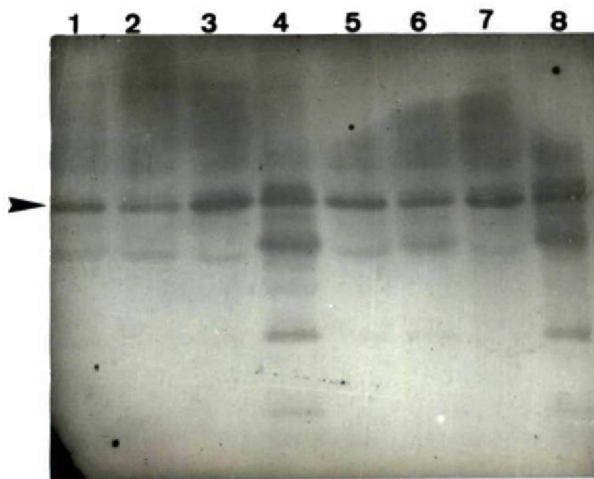


Figura 26. Imunoidentificação da GFAP em diversas regiões cerebrais. As mesmas amostras da fração Triton-insolúvel de algumas regiões cerebrais vistas na figura 25 foram transferidas para nitrocelulose e caracterizadas com soro anti-GFAP. 1 e 5, bulbo olfatório; 2, córtex cerebral; 3 e 7, hipocampo; 4 e 8, corda espinhal; 6, córtex cerebelar. A seta indica a principal banda imuno-reativa, correspondente à ppH-47.

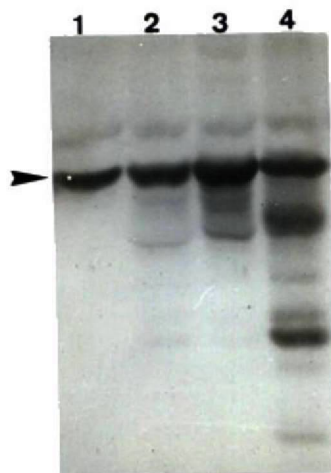


Figura 27. Imunoidentificação de GFAP em fatias de hipocampo e corda espinhal, incubadas em meio com e sem Ca^{2+} : 1, Hipocampo sem Ca^{2+} ; 2, Hipocampo com Ca^{2+} ; 3, Corda espinhal sem Ca^{2+} ; 4, Corda espinhal com Ca^{2+} . A seta indica a principal banda imunoreativa, correspondente a posição da ppH-47.

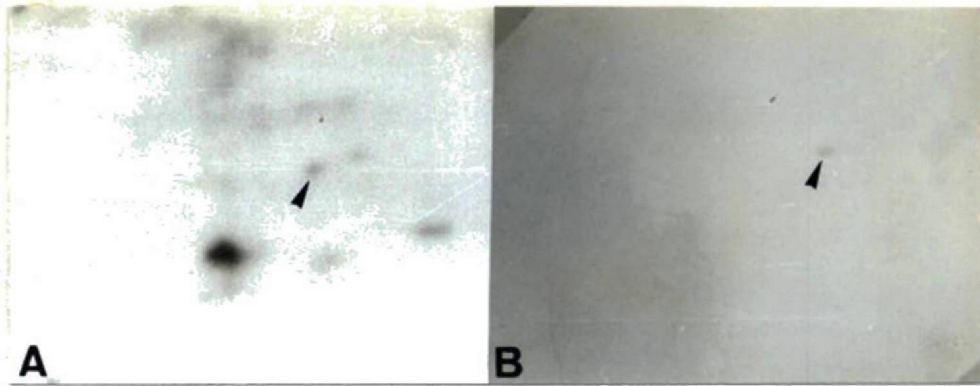


Figura 28. Identificação da ppH-47 com anti-soro HE. A amostra hipocampal foi analisada por eletroforese bidimensional e transferida para nitrocelulose. A imunodeteccção foi feita com anti-soro HE, produzido contra ppH-47. A seta indica a mancha auto-radiográfica da ppH-47 (à esquerda) coincidente com a banda imunoreativa (à direita).

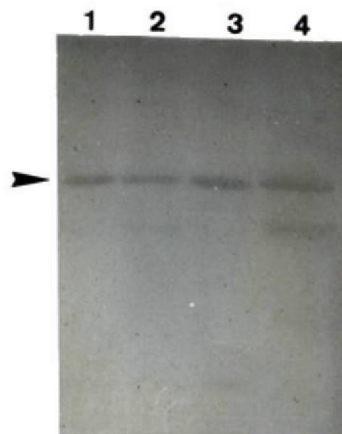


Figura 29. Imunoidentificação da ppH-47 com anti soro HE na fração Triton-insolúvel de diversas áreas cerebrais: 1, bulbo olfatório; 2, córtex cerebelar; 3, hipocampo; 4, corda espinhal.

IV DISCUSSÃO

IV.1 CONSIDERAÇÕES ANALÍTICAS SOBRE A ppH-47

Identificação e mobilidade eletroforética da ppH-47. A eletroforese bidimensional, com uma primeira separação feita em função principalmente da carga elétrica protéica e uma segunda principalmente em função do peso molecular, ampliou enormemente o poder analítico do método eletroforético (O'Farrel, 1975; O'Farrel et al., 1977). Este procedimento tem sido largamente utilizado no estudo de amostras cerebrais (Heydorn et al., 1983; Rodnight et al., 1986; Semple-Rowland et al., 1991). Diversos parâmetros devem ser considerados para garantir uma adequada qualidade da eletroforese bidimensional (Duncan e Hershey, 1984; Hochstrasser et al., 1988; Marshall e Williams, 1991). O método aqui empregado (Rodnight et al., 1986; Rodnight et al., 1988), usa a isoeletrofocalização não-equilibrada na primeira dimensão (O'Farrel et al., 1977), que permite uma resolução mais rápida sem perda das proteínas básicas. Este método mantém bastante atualidade na busca de resolução e reprodutibilidade na análise protéica do tecido cerebral.

A concentração usualmente recomendada de proteína na amostra varia de 0,1 a 0,25 µg/µl e a quantidade aplicada varia de 5 a 50 µl (Heydorn et al., 1983; Dunbar et al., 1990). O procedimento utilizado (Rodnight et al., 1988), onde a concentração protéica é

de aproximadamente 2 µg/µl, permitiu a análise de uma volume variável de 15 a 50 µl de amostra, sem interferir na resolução eletroforética da ppH-47. A alta resolução do procedimento é mostrada na figura 3, onde estão indicadas, além da ppH-47, algumas das principais fosfoproteínas cerebrais já descritas tais como Sinapsina I (Greengard, 1987), MARCKS (Stumpo et al., 1989; Erusalimsky et al., 1991) e B-50/GAP 43 (Coggins e Zwiers, 1991) e algumas outras não tão bem caracterizadas como a ppC-50 e o complexo fosfopeptídico de 40 KDa (Rodnight e Leal, 1990).

A fração Triton-insolúvel, enriquecida em ppH-47, quando analisada por eletroforese unidimensional, apresenta banda correspondente à ppH-47, identificada pela mobilidade, distribuição regional e pelo mapeamento fosfopeptídico. A identificação da ppH-47 nessa fração, por eletroforese unidimensional, facilitou a sua caracterização, permitindo analisar e comparar diversas amostras simultaneamente. A mobilidade da ppH-47 em SDS-PAGE foi analisada pelo Ferguson "plot". A interação SDS-proteína é variável de proteína para proteína, podendo a determinação do peso molecular ser superestimada devido a pequena migração em SDS-PAGE, como acontece com a MARCKS, B-50 e o neurofilamento de alto peso molecular (Erusalimsky et al., 1991). A ppH-47 apresenta pequena variação no peso molecular aparente (47 a 51 KDa) em diversas concentrações de gel SDS-poliacrilamida (6 a 15%). No entanto, a regularidade da migração da ppH-47, ao Ferguson "plot", aponta a possibilidade de estimar o seu peso molecular em SDS-PAGE (Neville, 1971).

Análise estrutural da ppH-47. A determinação do sítio fosforilado da ppH-47 envolveu dois procedimentos: A, hidrólise alcalina dos resíduos fosforilados nas no gel e B, análise dos fosfoaminoácidos resultantes da hidrólise ácida da fosfoproteína eluída do gel. O mapeamento fosfopeptídico da ppH-47 foi feito com protese V8.

Os resíduos de serina e treonina, diferentemente da tirosina, são álcali-lábeis (Cooper et al, 1983; Duclos, 1991) e a identificação de resíduos fosforilados em tirosina de proteínas do sistema nervoso tem sido feita por hidrólise alcalina (Hama e Guroff, 1985; Ellis et al., 1988). Desta forma a hidrólise alcalina no gel de poliacrilamida, como mostra a figura 9, indica a natureza álcali-lábil do(s) resíduo(s) fosforilado(s) da ppH-47 e da maioria das fosfoproteínas analisadas, afastando ou reduzindo a possibilidade de fosforilação em tirosina. A separação dos fosfoaminoácidos resultantes da hidrólise ácida da ppH-47 eluída do gel, mostrou a fosforilação aparentemente exclusiva em serina.

Na figura 9, também é possível notar a resistência do sítio fosforilado da B-50 à hidrólise alcalina. Este resultado foi inesperado, pois o o sítio fosforilado desta fosfoproteína é reconhecidamente serina, na posição 41 (Chan et al., 1986; Graff et al., 1989; Apel et al., 1990; Coggins e Zwiers, 1991). Um outro sítio fosforilável também em serina tem sido proposto (House et al., 1987). O resultado encontrado justifica a necessidade de determinar o sítio fosforilado por mais de um

método (Kosma et al., 1990), especialmente pela possibilidade de artefatos durante essa determinação (Weller, 1979).

O mapeamento peptídico "in situ" com protease V8 de *Staphylococcus aureus* (Cleveland et al., 1977) tem sido usado frequentemente na identificação estrutural de fosfoproteínas cerebrais (Browning e Ruina, 1984; Zwiers et al., 1985; Yip e Kelly, 1989). A proteólise da ppH-47 por este procedimento mostrou dois fosfopeptídeos resultantes com peso molecular virtual de 28 e 24 KDa em SDS-PAGE 15% (figura 11). O mapeamento fosfopeptídico permitiu estabelecer conclusivamente a identidade da ppH-47 na fração Triton-insolúvel, analisada por eletroforese unidimensional (figura 12). É difícil estabelecer uma homologia entre mapeamentos fosfopeptídicos, obtidos em diferentes condições. No entanto, o mapeamento da ppH-47 lembra o mapeamento fosfopeptídico obtido com a GFAP (Browning e Ruina, 1984), uma fosfoproteína astrocítica com outras características similares à ppH-47, bem como parece não apresentar analogia com o mapeamento da subunidade alfa da PQ CaM II (Kelly et al., 1984), uma proteína bastante abundante em hipocampo, especialmente na fração citoesquelética das densidades pós-sinápticas e cuja fosforilação é Ca^{2+} /calmodulina dependente (Yip e Kelly, 1989; Kelly, 1992).

Estudo da solubilidade da ppH-47. O fracionamento subcelular de [^{32}P]fosfoproteínas marcadas "in vivo" ou usando tecido intacto é bastante dificultado pela possibilidade de defosforilação. Dois inibidores de fosfatases estavam presentes na homogeneização das fatias hipocâmpais: Fluoreto de sódio e

EDTA, este último também usado na inibição de proteases, juntamente com o PMSF. O uso do fluoreto tem sido largamente empregado no estudo da fosforilação protéica cerebral (Jones et al., 1989; Haavik et al., 1989). O Zn^{2+} é um potente inibidor de fosfatases cerebrais (Forn e Greengard, 1978), incluindo as proteína-fosfatases que atuam em sítios de tirosina (Gordon, 1991), porém seu não uso aqui foi devido à incompatibilidade com quelantes e à possibilidade de ativação de proteases Zn^{2+} dependentes (Orlowsky, 1982). Além disso, o Zn^{2+} parece alterar o fracionamento protéico com Triton X-100 (dados não mostrados).

O fluoreto, como sugere a figura 7, parece ter reduzido a defosforilação da ppH-47 durante a homogeneização das fatias hipocâmpais marcadas. Também nesta figura é possível notar o efeito do fluoreto de proteção sobre a fosforilação da B-50 (De Grann et al., 1988).

A ppH-47 não foi solubilizada pela ação de quelantes ou pela variação da força iônica do meio (Penefky e Tzagolff, 1971; Hjelmeland e Chranmbach, 1984). Na figura 14 é possível perceber que o complexo fosfopeptídico de 40 KDa mostrou-se bastante solúvel em meio iso-iônico e de alta força iônica. A ppH-47 resistiu a extração alcalina, ao contrário da B-50 (Zwiers et al., 1985; Perrone-Bizzozero et al., 1988; Changelian et al., 1990). Esse comportamento insolúvel da ppH-47 à extração pela ação de quelantes, variação da força iônica ou pH afastou a possibilidade de tratar-se de uma proteína associada à membrana e apontou a necessidade do uso de detergentes (Hjelmeland, 1990).

Diversos detergentes usados na solubilização de receptores cerebrais foram experimentados na extração da ppH-47 (Hampson et al., 1987; Ho et al., 1987; El Mestikawy et al., 1989; Kavanaugh et al., 1989; Brose et al., 1989; Takazawa et al., 1989). Excetuando-se ao SDS todos falharam na tentativa de solubilização, nas condições usadas. O "pellet" Triton-insolúvel mostrou ser uma fração bastante enriquecida de ppH-47, no qual mais de 80% das [32P]fosfoproteínas analisadas em eletroforese bidimensional estavam ausentes e 90% ou mais da ppH-47 permanecia (Gonçalves et al., 1990b). A extração com detergentes a partir desse "pellet" também foi inefetiva (tabela 2). A uréia a 6-8M foi bastante efetiva na solubilização da ppH-47.

O comportamento Triton-insolúvel da ppH-47 sugere tratar-se de uma proteína do citoesqueleto (Chiu et al., 1981). A sua ausência na fração sinaptossomal, evidenciada por um experimento de co-migração desta fração com o "pellet" Triton-insolúvel (Rodnight et al., 1991), levou-nos a pensar na labilidade do sistema fosforilante da ppH-47 nesta ou na sua inexistência nesta fração neuronal-específica.

Identificação de uma suposta ppH-47 em outras espécies. A identificação da ppH-47 em outras espécies (boi, coelho, cobaia e camundongo), baseada em algumas características bioquímicas da fosfoproteína em rato (Rodnight et al., 1991), foi tentada com o objetivo de descobrir outras possíveis fontes de amostra para caracterização/purificação da ppH-47.

Excetuando-se à amostra bovina, as demais espécies

analisadas (coelho, cobaia e camundongo) apresentaram claramente uma fosfoproteína mais presente em hipocampo que caudato ou córtex cerebral, cuja fosforilação era Ca^{2+} dependente e que apresentava um comportamento bastante insolúvel. Apresentam, no entanto, pequenas variações entre si e em relação à ppH-47 do rato no que refere ao peso molecular em SDS-PAGE e ao ponto isoelétrico.

A suposta ppH-47 em boi, ao contrário das outras espécies, embora não tenha apresentado uma distribuição regional muito evidente e nem uma fosforilação Ca^{2+} dependente, a fosfoproteína apresentou uma similar insolubilidade em Triton X-100 e álcali, bem como apresentou uma idêntica mobilidade eletroforética. A fosforilação da ppH-47 independente de Ca^{2+} em boi, pode ser devido à idade dos animais analisados. Ratos jovens também apresentam essa característica (Wofchuck e Rodnight, 1990). A ausência do fosfopeptídeo maior no complexo de 40 KDa em boi (peptídeo 6), que está de acordo com padrão ontogenético imaturo em rato (Salbego, 1990), confirma essa possibilidade. No entanto, uma confirmação mais conclusiva da ppH-47 em boi e outras espécies deverá envolver a imunoidentificação e a análise estrutural da fosfoproteína supostamente correspondente à ppH-47.

Eletrotransferência da ppH-47 do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose. A eletrotransferência de proteínas do gel de poliacrilamida para matrizes imobilizadas tem se tornado um importante instrumento na investigação protéica (Gershoni e Palade, 1983; Beisigel et al., 1986; Timmons e Dunbar, 1990). As

proteínas transferidas são acessíveis às diversas caracterizações, tais como identificação com anticorpos, afinidade por lectinas, calmodulina, Ca^{2+} , bem como permitem a produção de anticorpos (Abou-Zeid et al., 1987) e o sequenciamento (Aebersold et al., 1987). O processo de transferência protéica tem duas fases distintas: uma de eluição do gel e outra de adsorção à membrana. A eluição de proteínas do gel é facilitada pela presença de SDS, mas esta substância interfere na adsorção à membrana. O metanol comumente é usado para melhorar a eficiência de adsorção à membrana.

O processo utilizado, de "semidry eletroblotting", permite a obtenção de um campo elétrico alto e uniforme, sem um aquecimento excessivo e bastante econômico, em relação ao volume de tampão usado (Svoboda et al., 1985).

Muitos tampões e procedimentos têm sido propostos para eletrotransferência de proteínas insolúveis (Ito e Akiyama, 1985; Small et al., 1988; Wang et al., 1989). O uso do tampão de Bjerrum e Schafer-Nielsen com baixa força iônica e mais alcalino em relação ao tampão de Towbin (Heegaaard e Bjerrum, 1988) foi mais efetivo na eluição da ppH-47 do gel. Uma equilibrção curta (menos de 1 minuto) do gel nesse tampão sem SDS mostrou-se mais efetiva da transferência que uma equilibrção longa (10-15 min) com SDS (0,04%). A equilibrção longa conduz a uma expansão do gel, bem como pode dificultar a eluição protéica do gel, não somente pela remoção do SDS mas pela redução da porosidade do gel (Gershoni e Palade, 1982; Garfin e Bers, 1989).

Um outro método de eletrotransferência foi aqui proposto (item II.10), no qual a proteína é eletrotransferida de um fragmento de gel reidratado para uma membrana de nitrocelulose (ou nylon), usando um gradiente descontínuo de densidade, onde a proteína transferida passa por duas fases, uma favorável à eluição protéica pela presença de SDS e outra favorável à adsorção pela presença do metanol. O método tem várias vantagens sobre o método convencional de eletrotransferência. Primeiro, depois de uma apropriada reidratação e equilibração num tampão contendo SDS, as proteínas ácido-fixadas podem ser eluidas do gel previamente usado para auto-radiografia; além disso, quantidades de SDS relativamente altas podem ser usadas no meio de equilibração sem interferir subsequentemente a adsorção à membrana. Segundo, uma concentração significativa de uma proteína desejada pode obtida por transferência de vários fragmentos de gel para uma única membrana. Terceiro, bandas de proteínas com migração muito próxima no gel de poliacrilamida podem após a fixação e secagem do gel ser cortadas e separadas convenientemente, antes da eletrotransferência. Finalmente, o método é altamente econômico no uso de membranas.

Uma cuba para eletrotransferência foi convenientemente desenhada (figura 2), tendo cuidado especial com a homogeneidade do campo elétrico gerado e o aquecimento produzido. (Gershoni et al., 1985; Svoboda et al., 1985).

O método permitiu uma eficiente transferência da ppH-47, 78-84% (tabela 3), usando 0,2 ou 2% de SDS no meio de equilibração e

uma corrente constante de 5 mA. A mesma eficiência foi obtida na transferência da ppH-47 para a membrana de nylon, usando 2% de SDS no meio de equilíbrio. Considerando que a membrana de nylon é particularmente sensível ao SDS (Tovey e Baldo, 1989), o resultado mostra que quantidades significantes do detergente não são transferidas com a proteína.

Usando as mesmas condições de transferência (tempo, corrente e meio de equilíbrio), a recuperação de outras fosfoproteínas testadas, sinapsina I e MARCKS, foi mais baixa que a obtida com a ppH-47 (tabela 4). É bem conhecido que a eficiência da transferência para nitrocelulose varia de proteína para proteína, muito em função do peso molecular. Isto poderia explicar a baixa transferência da sinapsina I, sob estas condições. Entretanto, no caso da MARCKS, além da baixa eluição, uma quantidade baixa e variável da proteína foi detectada na membrana de nitrocelulose. A MARCKS é uma fosfoproteína acilada com alto conteúdo de aminoácidos ácidos e baixo conteúdo de resíduos hidrofóbicos (Erusalimsky et al., 1991). Talvez o uso de outro detergente na equilíbrio pudesse aumentar sua eluição e outras condições de transferência - tempo e corrente, pudesse melhorar a sua adsorção à membrana de nitrocelulose.

O procedimento proposto utilizou géis previamente secos para autoradiografia, mas não há razão para duvidar que não funcione com géis logo após a SDS-PAGE. No entanto, com procedimentos usando proteínas radio-marcadas é muito mais conveniente usar géis secos para obter auto-radiografias já que usando géis

molhados, embora possível, é tecnicamente trabalhoso.

O método descrito é bastante simples, rápido e econômico na eletrotransferência de proteínas ácido-fixadas em fragmentos secos de poliacrilamida para pequenos discos de nitrocelulose. Este procedimento poderá permitir a obtenção de pequenas quantidades protéicas necessárias ao microsequenciamento e outros estudos.

II.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A IDENTIDADE DA ppH-47

A ppH-47 durante o curso de sua caracterização mostrava similaridades com uma fosfoproteína bem conhecida - a GFAP, uma proteína originalmente descrita em astrócitos fibrosos (Eng et al., 1971).

Muitas características, incluindo a fosforilação, a solubilidade e a ontogenia, apontam a similaridade entre a GFAP e a ppH-47.

Fosforilação da GFAP. A forma fosforilada da GFAP (50K-6.1) foi inicialmente identificada em cultura de células de glioma, analisadas por eletroforese bidimensional, onde a fosforilação (e a síntese) da proteína era estimulada via AMPc (Browning e Ruina, 1984). Pequena proporção da GFAP era fosforilada, em cultura de astrócitos estimulada com AMPc (Browning e Ruina, 1984; McCarthy et al., 1985). A fosforilação da GFAP, em cultura de astrócitos, com ésteres de forbol evidenciou o possível envolvimento da PQC (Harrison e Mobley, 1989). Porém, o efeito sobre a GFAP com PMA (12-miristato, 13-acetato de forbol) foi menor que o obtido com

dAMPc (dibutiril AMPc). A fosforilação via PQA e PQC da GFAP tem sido confirmada em fatias cerebrais de ratos jovens (Noetzel, 1991) e na fração citoesquelética de astrócitos, incubada com [³²P]ATP e quinases purificadas (Harrison e Mobley, 1992). A fosforilação da GFAP também tem sido obtida incubando fatias cerebrais em meio livres de cálcio (Noetzel, 1990).

Além disso, uma atividade quinase, independente da PQA e PQC, foi detectada nessa fração citoesquelética, dependente de Mg²⁺ e estimulada pela presença de Ca²⁺/calmodulina (Harrison e Mobley, 1992).

Solubilidade da GFAP. A identificação imunológica da GFAP na matéria cerebral branca humana e em outras espécies (boi, ovelha, cão, coelho, rato, peixe e tubarão) foi feita na fração solubilizada com tampão fosfato 10 mM e CaCl₂ (Dahl e Bignami, 1973). Diferenças no padrão eletroforético foram observados entre as espécies analisadas.

A solubilização da GFAP foi obtida com tampões de baixa força iônica em pH neutro (Rueger et al., 1979), provavelmente devido a dissociação de filamentos intermediários que pode ocorrer nestas condições (Malloch et al., 1987). No entanto, somente uma pequena fração da proteína (menos de 20%) é solubilizada nestas condições (Patel et al., 1985). A solubilidade desta proteína em tampão fosfato 50 mM era extremamente aumentada pela adição de uréia 6-8 M. O uso de EDTA na homogeneização, embora reduza a proteólise da GFAP (Schlaepfer e Zimmerman, 1981), diminui a solubilização desta proteína

(Reuger et al., 1979).

Com o uso de detergentes neutros (Hynes e Destree, 1978; Chiu et al., 1981) foi possível obter uma fração insolúvel, enriquecida em GFAP. A fração Triton-insolúvel tem sido frequentemente usada no estudo da GFAP (Browning e Ruina, 1984; Malloch et al., 1987; Noetzel, 1990; Harrison e Mobley, 1992). A inclusão do NaF, aqui usada para inibir as fosfatases, pode ter contribuído à estabilização da fração citoesquelética (Baumgold et al., 1981; Gallant et al., 1986).

Ontogenia da GFAP. O estudo ontogenético da GFAP, em camundongo, mostrou ter a proteína um aparecimento pós-natal tardio, em torno do décimo segundo dia (Jacque et al., 1976). A composição de filamentos intermediários na fração citoesquelética astroglial muda durante o desenvolvimento, com alta relação vimentina/GFAP em ratos recém-nascidos e baixíssima em ratos adultos, onde predomina a GFAP (Tapscott et al., 1981; Yen e Fields, 1981).

A quantidade de GFAP na fração Triton-insolúvel aumenta com o desenvolvimento e a quantidade de proteína solúvel, em tampão isoiônico sem Triton, permanece constante neste período (Malloch et al., 1987). Resultado contrário a este, com relação a quantidade de proteína solúvel foi descrito anteriormente (Weir et al., 1984), onde a GFAP solúvel aumentava proporcionalmente durante o desenvolvimento.

A incorporação de [³H]aminoácidos e [³²P]fosfato à GFAP, em fatias cerebrais de rato, indica um desenvolvimento pós-natal com

um pico de síntese em torno de 6-7 dias e a incorporação mais acentuada de ^{32}P no décimo dia (Noetzel, 1990). A acumulação de GFAP após esse pico de síntese deve-se provavelmente a redução na degradação da proteína (Noetzel, 1990; Tardy et al., 1989).

Outra importante característica da GFAP é sua proteólise. O estudo da degradação da GFAP em tecido cerebral e homogenato, em rato e boi, revelou múltiplas bandas imuno-reativas, onde duas bandas apresentavam maior estabilidade, 40 e 45 KDa em SDS-PAGE (Dahl, 1973). A proteólise da GFAP postmortem é Ca^{2+} dependente, similar aos neurofilamentos (Schlaepfer e Zimmerman, 1981; DeArmond et al., 1983). A análise de diversas áreas cerebrais por "immunoblotting" com anti-GFAP permite observar a diferença das quantidades de produtos proteolíticos da GFAP, bastante mais acentuados em corda espinhal (Patel et al., 1985). A degradação da GFAP ocorre mesmo na presença de inibidores de proteases (Malloch et al., 1987), sugerindo uma degradação "in vivo" ou ocorrendo entre a morte e a homogeneização do tecido.

Em suma, as similaridades entre a GFAP e a ppH-47 incluem:

1. O peso molecular e o ponto isoelétrico. A ppH-47 mostrou um peso entre 47-51 KDa em SDS-PAGE e um ponto isoelétrico de 6.3, bastante similar aos 50 KDa e pI 5,7-6,1 da GFAP (Browning e Ruina, 1984; Winsky et al., 1989);

2. A insolubilidade ao Triton X-100 (Chiu et al., 1981), bem como a solubilização com uréia 6M (Dahl, 1976);

3. O mapeamento fosfopeptídico com protease V8 (Browning e Ruina, 1984), embora não conclusivo devido a comparação

indireta, sugere uma analogia entre a ppH-47 e a GFAP;

4. A ontogenia pós-natal da ppH-47 detectável aos 10 dias compara-se ao desenvolvimento da GFAP (Malloch et al., 1987; Noetzel, 1990);

5. A ausência da ppH-47 na fração sinaptossomal de amostras hipocâmpais (Rodnight et al., 1991).

No entanto, alguns aspectos colocavam dúvidas à identidade da GFAP com ppH-47:

1. A distribuição cerebral da GFAP, identificada imunologicamente, é mais acentuada em corda espinhal e bulbo olfatório que em outras áreas corticais (Patel et al., 1985; Winsky et al., 1989). A [³²P]fosforoteína ppH-47, detectada autoradiograficamente, ao contrário da GFAP, é predominantemente encontrada no hipocampo (Rodnight e Leal, 1990) e muito pouco em medula e corda espinhal (vide figura 25). A presença no bulbo olfatório da ppH-47 pode ser vista nas figuras 6 e 25. Existe uma variação sub-regional da quantidade de ppH-47 no bulbo olfatório (Rodnight e Leal, dados não publicados). No entanto, essa diferença entre os dados da distribuição cerebral da GFAP e ppH-47, devido a diferença metodológica de caracterização, não exclui a identidade entre elas. Sendo assim, se estas bandas correspondem a mesma proteína, devem estar sujeitas a atividades diferentes de quinases e fosfatases;

2. A fosforilação da GFAP é independente de Ca²⁺ em fatias cerebrais (Noetzel, 1990). No entanto, esses resultados foram obtidos utilizando ratos jovens, com menos

de 20 dias. Resultado similar com a ppH-47 foi descrito em fatias hipocâmpais de ratos jovens (Wofchuk e Rodnight, 1990; Rodnight et al., 1991).

3. A identificação do sítio fosforilado na GFAP como sendo nos resíduos de serina e treonina, onde a incorporação de [32P]fosfato foi a mesma em ambos os resíduos (Noetzel, 1990), difere do resultado obtidos com a ppH-47, no qual a serina é aparentemente o único resíduo fosforilado. No entanto, o resíduo de treonina fosforilado não foi confirmado em outro trabalho de identificação sítio fosforilado na GFAP incubando cultura de astrócitos com [32P]fosfato (Harrison e Mobley, 1991). Mesmo estimulando a fosforilação da GFAP com forbol e AMPc o único sítio fosforilado encontrado foi serina. Além disso, a fosforilação da GFAP na fração citoesquelética com [32P]ATP, evidenciou a serina como predominante sítio fosforilado, na presença de Ca^{2+} /calmodulina (Harrison e Mobley, 1992).

4. A estimulação da fosforilação da GFAP com forbol (Harrison e Mobley, 1989) é bastante contraditória aos resultados até agora obtidos com ppH-47 (Salbego e Rodnight, dados não publicados). A insensibilidade da ppH-47 ao PDBu em fatias hipocâmpais pode ser visto na figura 7. No entanto, os resultados até agora publicados por Harrison e Mobley (1989 e 1991), foram obtidos a partir de cultura de astrócitos.

Todos estes fatos, indicando ou não excluindo a possibilidade de ser a ppH-47 a forma fosforilada da GFAP apontaram a necessidade da imunocaracterização da ppH-47 com o

soro anti-GFAP.

A caracterização imunológica com soro policlonal anti-GFAP e o soro anti-HE, produzido contra a ppH-47, permitiu a identificação da ppH-47 com a GFAP. Fazendo a imunocoloração com DAB, uma única mancha da GFAP foi visível na análise bidimensional, coincidente com a mancha auto-radiográfica da ppH-47.

A distribuição regional cerebral da principal banda imunoreativa da GFAP, na fração Triton insolúvel e coincidente com a banda auto-radiográfica da ppH-47, está em acordo aos resultados obtidos por Patel e colaboradores (1985). A intensa presença de GFAP na corda espinhal em comparação as demais áreas pode ser visto. A banda imunoreativa secundária abaixo da banda principal, provavelmente um produto proteolítico da GFAP, está fortemente presente em corda espinhal e menos acentuadamente nas áreas corticais e bulbo olfatório.

A confirmação da origem desta banda inferior é mostrada na figura 27. A banda resulta da proteólise da GFAP, evidenciada pela presença de Ca^{2+} durante a incubação das fatias, em acordo ao mecanismo de degradação Ca^{2+} dependente postulado aos filamentos intermediários (Schlaepfer e Zimmerman, 1981; DeArmond et al., 1983).

A identificação da ppH-47 com soro anti-HE, também mostrou uma única mancha corada com DAB e correspondente à mancha auto-radiográfica da ppH-47. A distribuição regional cerebral da banda imuno-reativa com este soro mostrou similaridade aos resultados obtidos com anti-GFAP.

Na imuno-identificação com anti-GFAP também é possível perceber nas figuras uma banda imuno-reativa difusa superior à GFAP/ppH-47. Esta banda possivelmente corresponda a outro outro filamento intermediário ou à produto proteolítico deste (Pruss et al., 1981), mas não provavelmente à vimentina já que este filamento encontrado em astrócitos é característico de animais jovens (Tapscott et al., 1981; Yen e Fields, 1981).

Embora as limitações do método de coloração com DAB, na avaliação quantitativa das amostras analisadas, fica evidente a diferença entre as amostras. Há diferenças indubitáveis entre o hipocampo e a corda espinhal. O hipocampo apresenta uma altíssima taxa de fosforilação da ppH-47 comparada à corda espinhal, enquanto esta apresenta uma quantidade de GFAP muito maior, pelo menos 3 vezes maior a julgar pela banda imunoreativa e pela coloração com Coomassie no gel. Desta forma a relação fosforilação/quantidade de proteína, pode indicar diferentes sistemas de fosforilação no hipocampo e corda espinhal, isto é, a diferença da fosforilação pode ser atribuída a diferença na atividade da(s) quinase(s) e fosfatase(s) envolvidas ou ainda, pela diferença entre as isoformas da proteína nessas regiões.

Além disso, a sensibilidade à degradação Ca^{2+} dependente da GFAP parece ser mais acentuada em corda espinhal, do que em hipocampo e outras áreas corticais. Isto talvez indique que o mecanismo proteolítico da GFAP/ppH-47 em corda espinhal tenha maior atividade ou seja diferente do mecanismo em hipocampo. Isto está de acordo com a observação feita por Dahl (1976), com

relação à degradação regional diferenciada da GFAP.

II.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS MODIFICAÇÕES PÓS-TRANSLACIONAIS DA GFAP/ppH-47

A fosforilação e a proteólise de filamentos intermediários são duas modificações pós-translacionais bem descritas (Eagles et al., 1981; Carden et al., 1985; Gallant et al., 1986). A modificação protéica por fosforilação é um mecanismo celular regulatório extensamente caracterizado (Hankes et al., 1988; Edelman et al., 1987) e particularmente importante na atividade cerebral, a julgar pela diversidade de quinases, fosfatases e substratos protéicos neste tecido (Cohen, 1982; Wallas e Greengard, 1991; Rodnight e Wofchuk, 1992).

A proteólise Ca^{2+} ativada tem frequentemente sido associada: ao "turnover" de filamentos intermediários, envolvido na plasticidade celular; às modificações funcionais, especialmente de neurofilamentos no transporte axonal; à degeneração neural (Nixon et al., 1982; Gallant et al., 1986; Siesjo et al., 1989; Arrigoni e Cohadon, 1991).

A fosforilação da GFAP, como a dos demais filamentos intermediários, tem sido relacionada ao mecanismo de formação fibrilar (Malloch et al., 1987). No entanto, a fosforilação/defosforilação parece não ser o principal mecanismo envolvido na polimerização da GFAP (Noetzel, 1990). Por outro lado a degradação da GFAP, que como os demais filamentos intermediários tem um mecanismo Ca^{2+} dependente, tem sido frequentemente

associada à degeneração neural (Siesjo et al., 1989; Haglid et al., 1991). No entanto, não fica descartada a possibilidade de que os produtos proteolíticos sejam mensageiros da resposta celular ao dano causado ou outro estímulo Ca^{2+} liberador.

Sendo assim, é possível conceber a GFAP/ppH-47 como substrato de dois sistemas regulatórios distintos: um fosforilante/defosforilante e outro proteolítico, envolvidos em respostas celulares diferentes ou não. O glutamato que estimula a fosforilação da ppH-47, de maneira Ca^{2+} dependente, em fatias hipocâmpais de animais jovens (Wofchuk e Rodnight, 1990), possivelmente estimule a degradação da GFAP nestas fatias, devido ao comprovado efeito protetor sobre a proteólise desta proteína que exerce o MK 801, um antagonista não-competitivo do NMDA (Haglid et al., 1991).

A relação entre o estado de fosforilação da GFAP/ppH-47 e a suscetibilidade à degeradação está em aberto e talvez aponte para um papel protetor da fosforilação sobre a proteólise Ca^{2+} dependente. Isto é grosseiramente sugerido pelas diferenças entre os sistemas fosforilante e proteolítico, em hipocampo e corda espinhal. Esta possibilidade encontra apoio no fato de que as proteases Ca^{2+} dependentes atuantes sobre o citoesqueleto possivelmente estejam envolvidas na mediação da degeneração celular (Arai et al., 1991) e que a proteção de neurônios hipocâmpais à lesão isquêmica aparentemente envolve a inibição da proteólise Ca^{2+} ativada (Lee et al., 1991).

A diferença entre hipocampo e corda espinhal com relação a

fosforilação e proteólise da GFAP/ppH-47, permite supor sistemas pos-translacionais distintos, com atividades distintas nessas regiões. O sistema fosforilante da GFAP/ppH47, entre hipocampo e corda espinhal, aponta a possibilidade de uma variabilidade microregional desse sistema fosforilante, envolvendo diferentes quinases, fosfatases e isoformas da GFAP.

Além da variabilidade regional, o sistema fosforilante da ppH-47 em hipocampo apresenta uma Ca^{2+} dependência idade-dependente (Rodnight et al., 1991). Portanto, além da variabilidade regional desse sistema, deve ser considerada a variabilidade temporal, isto é, desenvolvimental. Neurônios hipocâmpais apresentam uma alta atividade quinase Ca^{2+} /calmodulina dependente (Ocorr et al., 1991), cuja dependência ao Ca^{2+} diminui acentuadamente pela auto-fosforilação (Ocorr e Schulman, 1991; Molloy e Kennedy, 1991). Este tipo de modificação não justificaria a variabilidade desenvolvimental do sistema fosforilante da ppH-47 em astrócitos. No entanto, essa variabilidade desenvolvimental poderia ser similar a que acontece em neurônios granulares e piramidais do hipocampo, onde a atividade quinase Ca^{2+} /calmodulina dependente é expressa somente no período pré-natal e no adulto (Jensen et al., 1991).

A variabilidade regional e ontogenética dos sistemas fosforilantes poderia explicar a discrepância dos resultados obtidos com o forbol sobre a GFAP/ppH-47. No entanto, também deve ser levado em conta o fato de que o efeito do forbol sobre a fosforilação da GFAP foi descrito em cultura de astrócitos

(Harrison e Mobley, 1989), onde a ausência da matriz extracelular pode alterar a resposta celular (Getzenberg et al., 1990) e o meio de cultura usado pode determinar o estágio de diferenciação astrocítica (Raff et al., 1983). Além desta dúvida, muitas outras permanecem, especialmente com relação à síntese/polimerização da GFAP (Weir et al., 1984; Malloch et al., 1987; Noetzel, 1990) e com relação a imuno-reatividade de seus produtos proteolíticos (Dahl, 1976).

IV.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O POSSÍVEL ENVOLVIMENTO FUNCIONAL DA GFAP/ppH-47

O papel da GFAP na atividade cerebral tem sido intensamente investigado, especialmente com relação à lesão nervosa. A síntese da GFAP, em adultos, aumenta paralelamente ao aumento astrocítico em resposta à lesão neural, incluindo doença de Alzheimer, epilepsia e esclerose múltipla (Kimelberg e Norenberg, 1989; Harpin et al., 1990) e o efeito de diversos agentes neuro-nocivos sobre a síntese GFAP tem sido demonstrado (O'Callaghan et al., 1991; Karlsson et al., 1991; Hansen et al., 1991).

Possivelmente a fosforilação e/ou proteólise da GFAP/ppH-47 estejam envolvidas na atividade funcional astrocítica. Os astrócitos aparentemente estão envolvidos no processamento de neurotransmissores, no controle da composição iônica extracelular, na regulação do crescimento neuronal, na manutenção da barreira cérebro-sangue e na resposta imunológica (Kimelberg e Norenberg, 1989). A compreensão da função astrocítica e da

síntese de sua proteína específica é central na compreensão da atividade cerebral (Besnard et al., 1991).

Morfológicamente os astrócitos são classificados em fibrosos e protoplasmáticos, que se encontram predominantemente na matéria branca e cinzenta, respectivamente (Bradford, 1986). No entanto, essas diferenças podem ser devido ao diferente meio envolvente e não correspondem a tipos celulares distintos. Na matéria branca, há pelo menos dois tipos de astrócitos 1 e 2, distintos estrutural e imunologicamente (Raff et al., 1983). Na matéria cinzenta os tipos celulares não têm sido claramente classificados, podendo apresentar variações regionais (Barres et al., 1990). Alguns astrócitos poderiam, devido a sua localização, estar diretamente envolvidos na atividade neuronal, mais do que simplesmente dando suporte a esta atividade. Essa diferenciação astrocítica, poderia explicar as diferenças encontradas entre a GFAP/ppH-47 do hipocampo e corda espinhal, isto é, sendo a ppH-47 isoforma fosforilada da GFAP, o sistema fosforilante poderia estar mais ativo num determinado tipo de astrócito.

Aparentemente há uma estreita relação entre a atividade funcional do neurônio e o conteúdo astrocítico de GFAP (Steward et al., 1991). Recentemente foi sugerida uma dinâmica comunicação neurônio-glial envolvendo receptores e canais iônicos astrocíticos tipo 2 (Barres et al., 1989). A proteólise da GFAP via NMDA (Haglid et al., 1991) e a fosforilação da ppH-47 via glutamato (Wofchuk e Rodnight, 1990), aqui identificadas como sendo a mesma proteína, apontam a possibilidade da

participação da GFAP/ppH-47 nessa interação neurônio-gliial, mediada pelo glutamato de maneira Ca^{2+} dependente.

Além disso, a distribuição da ppH-47, predominantemente em hipocampo e outras estruturas do sistema límbico (Rodnight e Leal, 1990), frequentemente associadas à plasticidade cerebral, indica que essa especificidade regional seja devido possivelmente a seu envolvimento na atividade plástica sináptica. Em acordo a esta possibilidade a plasticidade astrocítica tem sido recentemente demonstrada (Kraig et al., 1991; Wenzel et al., 1991).

Em suma, a imunoidentificação da ppH-47 com o soro anti-GFAP, bem como diversas outras características aqui apresentadas, mostram que a ppH-47 é a isoforma fosforilada da GFAP e/ou o sistema fosforilante desta proteína apresenta uma variável distribuição regional. Diversas evidências sugerem a importância desta fosfoproteína na atividade nervosa - incluindo a plasticidade. A investigação da possibilidade de haver diferentes isoformas da proteína, deverá envolver uma análise estrutural e imunoquímica da GFAP/ppH-47. O procedimento de eletrotransferência aqui proposto, poderá ser usado nessa investigação.

CONCLUSÕES

1. A fosfoproteína ppH-47 foi identificada em fatias hipocâmpais marcadas com ^{32}P e analisadas por eletroforese bidimensional. Esta fosfoproteína foi encontrada bastante enriquecida na fração Triton-insolúvel.

2. O fracionamento com Triton X-100 permitiu a identificação da ppH-47 por eletroforese unidimensional. A confirmação de sua identidade na fração Triton-insolúvel foi feita com base na mobilidade eletroforética, distribuição regional cerebral e mapeamento fosfopeptídico.

3. A fosfoproteína em estudo apresentou um peso molecular aparente em SDS-PAGE de 47-51 KDa e uma mobilidade eletroforética regular ao Ferguson "plot".

4. A identificação do resíduo fosforilado da ppH-47, realizado por hidrólise ácida da fosfoproteína eluída do gel e hidrólise alcalina da fosfoproteína no gel, apontou a serina como único resíduo fosforilado aparentemente.

5. O mapeamento fosfopeptídico com protease V8 revelou a presença de dois peptídeos com pesos aparentes de 28 e 24 KDa. Os peptídeos resultantes: (a) diferem dos obtidos com o mapeamento da subunidade alfa da PQCαM II, uma fosfoproteína citoesquelética, de 50 KDa e fortemente presente em hipocampo; (b) apresentam similaridade aos obtidos no mapeamento da GFAP, uma fosfoproteína proteína astrocítica de 50 KDa.

6. O estudo da solubilidade da ppH-47 demonstrou seu forte carácter insolúvel à variação de pH, força iônica e adição de quelantes. A sua insolubilidade ao Triton X-100 apontou a possibilidade de localização citoesquelética.

7. A identificação de uma suposta fosfoproteína correspondente à ppH-47 foi feita em outras espécies de mamíferos (boi, coelho, cobaia e camundongo), com base na distribuição regional cerebral, na fosforilação Ca^{2+} dependente e na Triton-insolubilidade.

8. Diversas características da ppH-47 mostraram similaridade à GFAP, tais como mobilidade eletroforética, insolubilidade e mapeamento fosfopeptídico. Além destas, outras características da ppH-47 descritas paralelamente tais como a ontogenia e a ausência na fração sinaptossomal (Rodnight et al., 1991), reforçaram a possibilidade da identidade entre a ppH-47 e GFAP.

9. A imunocaracterização com anti-GFAP mostrou uma correspondência entre a posição da ppH-47 e a banda imuno-reativa.

10. Apesar da correspondência da posição entre as bandas da ppH-47 e da GFAP não houve correspondência entre a quantidade da GFAP e a taxa de fosforilação da ppH-47, em diversas regiões cerebrais analisadas. Considerando que se trata da mesma proteína, a relação fosforilação (ppH-47)/quantidade de proteína (GFAP) é muita vezes maior no hipocampo que na corda espinhal, por exemplo.

11. A diferente relação entre a fosforilação e a quantidade de proteína em diversas regiões cerebrais aponta as seguintes

possibilidades: (a) diferentes sistemas fosforilantes/atividades atuando sobre a proteína nas diversas áreas cerebrais; (b) diferentes isoformas da proteína nas diversas regiões cerebrais; (c) ambas as possibilidades anteriores.

12. A GFAP imunoidentificada apresentou proteólise Ca^{2+} dependente mais acentuada na corda espinhal que nas regiões corticais.

13. A variabilidade regional da suscetibilidade à proteólise da GFAP, como a variabilidade regional do estado de fosforilação da proteína, aponta a possibilidade de diferentes sistemas proteolíticos e/ou isoformas da proteína.

14. Sem esquecer as limitações e diferenças metodológicas, é possível conceber atualmente que a fosforilação via proteína quinase C da GFAP encontrada em astrócitos em cultura (Harrison e Mobley, 1989) e a insensibilidade da ppH-47 ao PDBu, um ativante desta quinase, seja devido à diferentes sistemas fosforilantes e/ou isoformas da proteína.

15. No curso da caracterização da ppH-47 foi possível desenvolver um sistema variante do "electroblotting", bastante eficiente, que poderá ser usado na identificação de possíveis isoformas desta proteína, bem como na caracterização de muitas outras proteínas.

PUBLICAÇÕES

1. GONÇALVES, C.A., SALBEGO, C., WOFCHUK, S., ROCHA, E., and RODNIGHT, R.. Properties of phosphorylating system that labels a 47 KDa phosphoprotein (ppH-47) in slices of rat hippocampus. Neuroscience Research Communications, v.6, p.129-134, 1989.

2. RODNIGHT, R., GONÇALVES, C.A., LEAL, R., ROCHA, E., SALBEGO, C., and WOFCHUK, S.T. Regional distribution and properties of an enzyme system in rat brain that phosphorylates ppH-47, an insoluble protein highly phosphorylated in tissues slices from hippocampus. Progress in Brain Research, v.89, p.15-167, 1991.

3. GONÇALVES, C.A., and RODNIGHT, R. Electrotransference of fixed phosphoproteins from pieces of dried polyacrilamide to small disks of nitrocellulose (submetido).

4. GONÇALVES, C.A., and RODNIGHT, R. Apparent identity of ppH-47, a protein highly phosphorylated in hippocampus, with a form of glial fibrillary acidic protein (submetido).

BIBLIOGRAFIA

- ABOU-ZEID, C., FILLEY, E., STEELE, J., and ROOK, G.A. A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands cut from western blots into antigen-bearing particles. Journal of Immunological Methods, v.98, p.5-10, 1987.
- AEBERSOLD, R.H., LEAVITT, J., SAAVEDRA, R.A., HOOD, L.E., and KENT, S.B. Internal aminoacid sequence analysis of proteins separated by one or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.84, p.6970-6974, 1987.
- AKIYAMA, T., NISHIDA, E., ISHIDA, J., SAJI, S., OGAWAA, H., HOSHI, M., MIYATA, Y. and SAKAI, H. Purified protein kinase C phosphorylates MAP-2. Journal of Biological Chemistry, v.261, p.15648-15651, 1986.
- APEL, E.D., BYFORD, M.F., AU D., WALSH, K.A., and STORM, D.R. Identification of the protein kinase C phosphorylation site in neuromodulin. Biochemistry, v.22, p.4618-4624, 1983.
- ARAI, A., VANDERLKISH, P., KESSLER, M., LEE, K., and LYNCH, G. A brief period of hypoxia causes proteolysis of cytoskeletal proteins in hippocampal slices. Brain Research, v.555, p.276-280, 1991.
- ARRIGONI, E., and COHADON, F. Calcium-activated neutral protease activities in brain trauma. Neurochemical Research, v.16, p.483-488, 1991.
- BACIU, P.C., and DURHAM, J.P. A procedure for the extraction and high resolution two-dimensional gel electrophoresis of total nuclear phosphoproteins from isotonically purified nuclei. Electrophoresis, v.11, p.162-166, 1990.
- BARTELT, D.C., MORONEY, S., and WOLFF, D.J. Purification, characterization and substrate specificity of calmodulin-dependent myosin light-chain kinase from bovine brain. Biochemical Journal, v.247 p.747-756, 1987.
- BARRES, B.A. A new form of transmission? Nature, v.339, p.343-344, 1989.

- BARRES, B.A., CHUN, L.L., and COREY, D.P. Ion channels in vertebrate glia. Annual Review of Neuroscience, v.13 p.441-474, 1990.
- BAUMGOLD, J., TERAKAWA, S., IWASA, K., and GAINER, H. Membrane-associated cytoskeletal protein in squid giant axons. Journal of Neurochemistry, v.36, p.759-764, 1981.
- BEISIEGEL, U. Protein blotting. Electrophoresis, v.7, p.1-18, 1986.
- BELL, R.M., and BURNS, D.J. Lipid activation of protein kinase C. Journal of Biological Chemistry, v.266, p.4661-4664, 1991.
- BENOWITZ, L.I., PERRONE-BIZZOZERO, N.I., and FINKLESTEIN, S.P. Molecular properties of the growth associated protein GAP-43 (B-50). Journal of Neurochemistry, v.48, p.1640-1647, 1987.
- BESNARD, F., BRENNER, M., NAKATANI, Y., CHAO, R., PUROHIT, H.J., and FREESE, E. Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. Journal of Biological Chemistry, v.266, p.18877-18883, 1991.
- BILLAH, M.H., and ANTHES, J.C. The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. Biochemical Journal, v.269, p.281-291, 1990.
- BLACKSHEAR, P.J., NAIRN, A.C. and KUO, J. Protein kinases, a current perspective. FASEB Journal, v.2, p.2957-2969, 1988.
- BLACKSHEAR, P.J., WEN, L., GLYNN, B.P., and WITTERS, L.A. Protein kinase C-stimulated phosphorylation in vitro of a Mr 80,000 protein phosphorylated in response to phorbol esters and growth factor in intact fibroblasts. Journal of Biological Chemistry, v.261, p.1459-1469, 1986.
- BRADFORD, H.F. Glial cells: Mechanical and functional supporting cells of nervous system. In Chemical Neurobiology, ed. by H.F. Bradford, pp. 62-117, Freeman, New York, 1986.
- BROSE, N., HALPAIN, S., SUCHANEK, C., and JANH, R. Characterization and partial purification of a chloride and calcium-dependent glutamate-binding protein from rat brain. Journal of Biological Chemistry, v.264, p.9619-9625, 1989.
- BROWNING, E.T., and RUINA, M. Glial fibrillary acidic protein: norepinephrine stimulated phosphorylation in intact C6 glioma cells. Journal of Neurochemistry, v.42, p.718-726, 1984.

- BROWNING, M.D., BUREAU, M., DUDEK, E.M. AND OLSEN, R.W. Protein kinase C and AMPc dependent protein kinase phosphorylate the beta subunit of purified GABA receptor. Proceedings of National Academy of Science USA, v.87, p.1315-1318, 1990.
- BURNETTE, W.N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Analytical Biochemistry, v.112, p.195-203, 1981.
- CADD, G. and McKNIGHT, G.S. Distinct patterns of cAMP dependent protein kinase gene expression in mouse brain. Neuron, v.3, p.71-79, 1989.
- CAIN, S.T., and ROUTEMBERG, A. Phosphorylation of pyruvate dehydrogenase in the hippocampal slice - time course of response to cellular depolarization. Neuroscience Letters, v.130, p.65-68, 1991.
- CARDEN, M.J., SCHLAEPFER, W.W., and LEE, V.M. The structure, biochemical properties, immunogenicity of neurofilament peripheral regions are determined by phosphorylation state. Journal of Biological Chemistry, v.260, p.9805-9817, 1985.
- CARPENTER, G. and COHEN, S. Epidermal growth factor. Journal Biological Chemistry, v.265, p.7709-7712, 1990.
- CHAN, S.Y., MURAKAMI, K., and ROUTEMBERG, A. Phosphoprotein F1: purification and characterization of brain kinase C substrate related to plasticity. Journal of Neuroscience, v.6, p.3618-3627, 1986.
- CHANGELIAN, P.S., MEIRI, K., SOPPET, D., VALENZA, H., LOEWY, A., and WILLARD, M. Purification of the GAP-43 by reversed phase chromatography: amino acid sequence analysis and cDNA identification. Brain Research, v.510, p.259-268, 1990.
- CHIU, F-C., NORTON, W.T., and FIELDS, K.L. The cytoskeleton of primary astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein, and the fibroblast-type filament protein, vimentin. Journal of Neurochemistry, v.37, p.147-155, 1981.
- CLEVELAND, D.W., FICHER, S.G., KIRSCHNER, M.W., and LAEMMLI, U.K. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by electrophoresis. Journal of Biological Chemistry, v.252, p.1102-1106, 1977.
- COGGINS, P.J., and ZWIERS, H. B-50(GAP-43): biochemistry and functional neurochemistry of a neuron-specific phosphoprotein. Journal of Neurochemistry, v.56, p.1095-1106, 1991.

- COHEN, P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. Nature, v.296, p.613-620, 1982.
- COHEN, P. The structure and regulation of protein phosphatases. Annual Review of Biochemistry, v.58, p.453-508, 1989.
- COOPER, J.A., SEFTON, B.M., and HUNTER, T. Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins. Methods in Enzymology, v.99, p.387-402, 1983.
- CORBIN, J.D., OGREID, D., MILLER, J.P., SUVA, R.H., JASTORFF, B. and DOSKELAND, S.O. Studies of cGMP analog specificity and function of the two intrasubunit binding sites of cGMP dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry, v.261, p.1208-1214, 1986.
- CROWDER, J.M., CROUCHER, M.J., BRADFORD, H.F., and COLLINS, J.F. Excitatory amino acid receptors and depolarization-induced Ca²⁺ influx into hippocampal slices. Journal of Neurochemistry, v.48, p.1917-1924, 1987.
- CUTTING, J.A. Gel protein stains: phosphoproteins. Methods in Enzymology, v.104, p.451-455, 1984.
- DAHL, D. Glial fibrillary acidic protein from bovine and rat brain degradation in tissue and homogenates. Biochimica et Biophysica Acta, v.420, p.142-154, 1976.
- DAHL, D., and BIGNAMI, A. Immunochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. Brain Research, v.61, p.279-293, 1973.
- DeARMOND, S.J., FAJARDO, M. NAUGHTON, S.A., and ENG, L.F. Degradation of glial fibrillary acidic protein by a calcium dependent proteinase: an electroblot study. Brain Research, v.262, p.275-282, 1983.
- DeCAMILLI, P., CAMERON, R., and GREENGARD, P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. Journal of Cell Biology, v.96, p.1337-1354, 1983.
- DeCAMILLI, P., BENFENATI, F., VALTORTA, F., and GREENGARD, P. The synapsins. Annual Review of Cell Biology, v.6, p.433-460, 1990.
- De GRAAN, P., HEEMSKERK, F.M., DEKKER, L.V., MELCHERS, B.P., GINNOTTI, C., and SCHRAMA, L.H. Phorbol esters induce long and short-term enhancement of B-50/GAP 43 phosphorylation in rat hippocampal slices. Neuroscience Research Communication, v.3, p.175-182, 1988.

- De MORENO, M.R., SMITH, J.F., and SMITH, R.V. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie Blue - silver stain procedure. Analytical Biochemistry, v.151, p.466-470, 1985.
- DUCLOS, B., MARCANDIER, S., and DOZZONE, A.J. Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis. Methods in Enzymology, v.201, p.10-21, 1991.
- DUNBAR, B.S., KIMURA, H., and TIMMONS, T.M. Protein analysis using high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Methods in Enzymology, v.182, p.441-459, 1990.
- DUNCAN, R. AND HERSHEY, J.W. Evaluation of isoelectric focusing running conditions during two-dimensional isoelectric focusing/SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; variation of patterns with changing conditions and optimized isoelectric focusing conditions. Analytical Biochemistry, v.138, p.144-155, 1984.
- DUNKLEY, P.R., BAKER, C.M., and ROBINSON, P.J. Depolarization dependent protein phosphorylation in rat cortical synaptosomes: Characterization of active protein kinases by phosphopeptide analysis of substrates. Journal of Neurochemistry, v.46, p.1692-1703, 1986a.
- DUNKLEY, P.R., JARVIE, P.E., HEATH, J.W., KIDD, G.J., and ROSTAS, J.A. A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. Brain Research, v.372, p.115-129, 1986b.
- EAGLES, P.A., GILBERT, D.S., and MAGGS, A. The localization of phosphorylation sites and Ca²⁺ dependent cleavage sites on the major neurofilament polypeptides from myxicola infundibulum. Biochemical Journal, v.199, p.101-111, 1981.
- EDELMAN, A.M., BLUMENTHAL, D.K., and KREBS, E.G. Protein serine/threonine kinases. Annual Review of Biochemistry, v.56, p.567-613, 1987.
- ELLIS, P.D., BISSOON, N., and GURD, J.W. Synaptic protein tyrosin kinase: Partial characterization and identification of endogenous substrates. Journal of Neurochemistry, v.51, p.611-620, 1988.
- EL MESTIKAWY, S., GOSLAN, T.H., EMERIT, M.B., PONCHANT, M., and HAMON, M. Chromatographic analyses of the serotonin 5-HT_{1A} receptor solubilized from the rat hippocampus. Journal of Neurochemistry, v.53, p.1555-1566, 1989.

- ENG, L.F., VANDERHAEGHEN, J.J., BIGNAMI, A., and GERSTL, B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain Research, v.28, p.351-354, 1971.
- ERUSALIMSKY, J.D., BROOKS, S.F., HERGET, T., MORRIS, C., and ROZEMGURT. Molecular cloning and characterization of the acidic 80-KDa protein kinase C substrate from rat brain. Journal of Biological Chemistry, v.266, p.7073-7080, 1991.
- FEICK, R.G., and SHIOZAWA, A.J. A high-yield method for the isolation of hydrophobic proteins and peptides from polyacrylamide gels for protein sequencing. Analytical Biochemistry, v.187, p.205-211, 1990.
- FISHER, S.K., and AGRANOFF, B.W. Receptor activation and inositol lipid hydrolysis in neural tissues. Journal of Neurochemistry, v.48, p.999-1017, 1987.
- FLANAGAN, S.D. and YOST, B. Calmodulin-binding proteins: visualization by 125-I-calmodulin overlay on the blots quenched with Tween 20 or bovine serum albumin and poly(ethylene oxide). Analytical Biochemistry, v.140, p.510-519, 1984.
- FORN, J. and GREENGARD, P. Depolarizing agents and cyclic nucleotides regulate the phosphorylation of specific neuronal proteins in rat cerebral cortex slices. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.75, p.5195-5199, 1978.
- FUKUNAGA, K., YAMAMOTO, H., MATSUI, K., HIGASHI, K. and MIYAMOTO, E. Purification and characterization of a Ca²⁺ and calmodulin dependent protein kinase from rat brain. Journal of Neurochemistry, v.39, p.1607-1617, 1982.
- GALLANT, P.E., PANT, H.C., PRUSS, R.M., and GAINER, H. Calcium activated proteolysis of neurofilament proteins in the squid giant neuron. Journal of Neurochemistry, v.46, p.1573-1581, 1986.
- GARFIN, D.E., and BERS, G. Basic aspects of protein blotting. In Protein Blotting. Methodology, research and diagnostic applications, ed. by B.A. Baldo and E.R. Tovey, p.8-42, Karger, London, 1989.
- GARFIN, D.E. One-dimensional gel electrophoresis. Methods in Enzymology, v.182, p.425-441, 1990.
- GERSHONI, J.M., and PALADE, G.E. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. Analytical Biochemistry, v.124, p.396-405, 1982.

- GERSHONI, J.M., and PALADE, G.E. Protein blotting: principles and applications. Analytical Biochemistry, v.131, p.1-15, 1983.
- GERSHONI, J.M., DAVIS, F.E., and PALADE, G.E. Protein blotting uniform or gradient electric fields. Analytical Biochemistry, v.144, p.32-40, 1985.
- GETZEMBERG, R.H., PIENTA, K.J., and COFFEY, D.S. The tissue matrix: Cell dynamics and hormone action. Endocrine Reviews, v.11, p.399-417, 1990.
- GIRAULT, J., HEMMINGS, H.C., ZORN, S.H., GUSTAFSON, E.L., and GREENGARD, P. Characterization in mammalian brain of a DARP-32 serine kinase identical to casein kinase II. Journal of Neurochemistry, v.55, p.1772-1783, 1990.
- GONÇALVES, C.A., SALBEGO, C., WOFCHUK, S., ROCHA, E., and SOUZA, D. Effects of undernutrition during suckling on phosphoryl-serine levels in nuclear and synaptosomal proteins from cortex cerebral of rats. Journal of Nutrition, v.12, p.594-597, 1990a.
- GONÇALVES, C.A., SALBEGO, C., WOFCHUK, S.T. ROCHA, E., and RODNIGHT, R. Properties of a phosphorylating system that labels a 47 KDa phosphoprotein (ppH-47) in slices of rat hippocampus. Neuroscience Research Communication, v.6, p.129-134, 1990b.
- GORDON, J. Use do vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. Methods in Enzymology, v.201, p.477-482, 1991.
- GORDON, J., and BILLING, P. Dot immunobinding - general principles and procedures. In Handbook of Immunoblotting of Proteins, ed. by O.J Bjerrum and N.H. Heegaard, v.1, p.27-30, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988.
- GORG, A. Two-dimensional electrophoresis. Nature, v.349, p.545-546, 1991.
- GOULD, M.J., CATHER, R., and WINGET, G.D. Advantages of use of Cerenkov counting of determination of P^{32} in photo-phosphorylation research. Analytical Biochemistry, v.50, p.540-548, 1972.
- GOWER, H., and RODNIGHT, R. Intrinsic protein phosphorylation in synaptic plasma membrane fragments from the rat. General characteristics and migration behaviour on polyacrylamide gels of the main phosphate acceptors. Biochimica et Biophysica Acta, v.716, p.45-52, 1982.
- GRAFF, J.M., STUMPO, D.J., and BLACKSHEAR. Characterization of the phosphorylation sites in the chicken and bovine myristoylated alanine-rich C kinase substrate protein, a prominent cellular substrate for protein kinase C. Journal of

- Biological Chemistry, v.264, p.11912-11919, 1989.
- GRAFF, J.M., YOUNG, N.T., JOHNSON, J.D., and BLACKSHEAR, P.J. Phosphorylation-regulated calmodulin binding to a prominent cellular substrate for protein kinase C. Journal of Biological Chemistry, v.264, p.12818-21823, 1989.
- GRANNER, D.K. Hormone action, In: Harper's Biochemistry, ed by R. Murray, chapter 44, p.472-481, Appleton & Lange, Norwalk, 1988.
- GREENGARD, P. Neuronal phosphoproteins - Mediators of signal transduction. Molecular Neurobiology, v.1, p.81-119, 1987.
- GULTEKIN, H. and HEERMANN, K.H. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. Analytical Biochemistry, v.172, p.320-329, 1988.
- GURD, J. Phosphorylation of the postsynaptic density glycoprotein gp 180 by endogenous tyrosine kinase. Brain Research, v.333, p.385-388, 1985.
- HAAVIK, J., SCHELLING, D.L., CAMPBELL, D.G., ANDERSON, K.K., FLATMARK, T. and COHEN P. Identification of protein phosphatase 2A as the major tyrosine hydroxylase phosphatase in adrenal medulla and corpus striatum: evidence from effects of okadaic acid. FEBS Letters, v.251, p.36-42, 1989.
- HAGLID, K.G., WANG, A., HAMBERGER, A., LEHMANN, A., and MOLLER, C.J. Neuronal and glial protections in the evaluation of the protective action of MK 801. Journal of Neurochemistry, v.56, p.1957-1961, 1991.
- HAMA, T., and GUROFF, G. Distribution of Nsp100 and Nsp100 kinase, a nerve growth-factor-sensitive phosphorylation system, in rat tissues. Journal of Neurochemistry, v.45, p.1279-1287, 1985.
- HAMPSON, D.R., HUIE, D., and WENTHOLD, R.J. Solubilization of kainic acid binding sites from rat brain. Journal of Neurochemistry, v.49, p.1209-1215, 1987.
- HANAOKA, F., SHAW, J.L., and MUELLER, G.C. Recovery of functional proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, v.99, p.170-174, 1979.
- HANKES, S.K., QUINN, A.M., and HUNTER, T. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science, v.241, p.42-52, 1988.
- HANSEN, A., JORGENSEN, O.S., BOLWIG, T.G., and BARRY, D.I. Hippocampal kindling in the rat is associated with time-dependent increases in the concentration of the fibrillary

- acidic protein. Journal of Neurochemistry, v.57, p.1716-1720, 1991.
- HARPIN, M.L., DELAERE, P., JAVOY-AGID, F., BOCK, E., JAQUE, C., DELPECH, B., VILLARROYA, H., DUYCHAERTS, C., HAUW, J.S., and BAUMANN, N. Glial fibrillary acidic protein and beta-a4 protein deposits in temporal lobe of aging brain and senil dementia of the Alzheimer type. Journal of Neuroscience Research, v.27, p.587-594, 1990.
- HARRINGTON, M.G. Elution of proteins from gel. Methods in Enzymology, v.182, p.488-495, 1990.
- HARRISON, B.C., and MOBLEY, P.L. Protein phosphorylation in astrocytes mediated by protein kinase C: comparasion with phosphorylation by cyclic AMP dependent protein kinase. Journal of Neurochemistry, v.53, p.1245-1251, 1989.
- HARRISON, B.C., and MOBLEY, P.L. Phorbol myristate acetate and 8-bromo-cyclic AMP - induced phosphorylation of GFAP and vimentin in astrocytes. Journal of Neurochemistry, v.56, p.1723-1730, 1991.
- HARRISON, B.C., and MOBLEY, P.L. Phosphorylation of GFAP and vimentin by cytoskeletal-associated intermediate filament protein kinase activity in astrocytes. Journal of Neurochemistry, v.58, p.320-327, 1992.
- HAWKES, R. Identification of concanavalin A - binding proteins after sodium dodecyl sulfate - gel electrophoresis and protein blotting. Analytical Biochemistry, v.123, p.143-146, 1982.
- HAYCOCK, J.W. Phosphorylation of tyrosine hydroxilase in situ at serine 8, 19, 31 and 40. Journal of Biological Chemistry, v.265, p.11682-91, 1990.
- HEEGAARD, N.H., and BJERRUM, O.J. Immunoblotting - General principles and procedures. In Handbook of Immunoblotting of Proteins, ed. by O.J. Bjerrum and N.H. Heegaard, v.1, p.1-15, CRC, Boca Raton, Florida, 1988.
- HEJLMELAND, L.M. Solubilization of native membrane proteins. Methods in Enzymology, v.182, p.253-264, 1990.
- HEJLMELAND, L.M. and CHRAMBACH, A. Solubilization of functional membrane proteins. Methods in Enzymology, v.104, p.305-318, 1984.
- HEYDORN, W.E., CREED, G.J., GOLDMAN, D., KANTER, D., MERRIL, C.R., and JACOBOWITZ, D.M. Mapping and quantitation of proteins frm nuclei and other areas of the rat brain by two-dimensional gel electrophoresis. Journal of Neuroscience, v.3, p.2597-2606,

1983.

- HIRANO, A.A., GREENGARD, P., and HUGANIR, R.L. Protein tyrosine kinase activity and its endogenous substrates in rat brain: a subcellular and regional survey. Journal of Neurochemistry, 50:1447-1455, 1988.
- HO, A.K., LING, Q-L., DUFFIELD, R., LAM, P.H., and WANG, J.H. Phosphorylation of brain muscarinic receptor; evidence of receptor regulation. Biochemical and Biophysical Research Communication, v.142, p.911-918, 1987.
- HOSCHSTRASSER, D., HARRINGTON, M.G., HOSCHSTRASSER, A.C., MILLER, M.J., and MERRIL, C. Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. Analytical Biochemistry, v.173, p.424-435, 1988.
- HOSHI, M., NISHIDA, E., MIYATA, Y., SAKAY, H., MIYOSHI, T., OGAWARA, H., and AKIYAMA, T. Protein kinase C phosphorylates tau and induces its functional alterations. FEBS Letters, v.217, p.237-241, 1987.
- HOUSE, C., WETTENHALL R.E., and KEMP B.E. The influence of basis residues on the substrate specificity of protein kinase C. Journal of Biological Chemistry, v.262, p.772-777, 1987.
- HUANG, K.P. The mechanism of protein kinase C activation. Trends in Neuroscience, v.12, p.425-432, 1989.
- HUNKAPILLER, M.W., LUJAN, E., OSTRANDER, F., and HOOD, L.E. Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. Methods in Enzymology, v.91, p.227-236, 1983.
- HUNTER, T. A thousand and one protein kinases. Cell, v.50, p.823-829, 1987.
- HYNES, R.O., and DESTREE, A.T. 10 nm filaments in normal and transformed cells. Cell, v.13, p.151-163, 1978.
- INGEBRITSEN, T.S. and COHEN, P. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. Science, v.221, p.331-338, 1983.
- ITO, A., SAITO, N., HIRATA, M., KOSE, A., TSUIJIND, T., YOSHIHARA, C., OGITA, K., KISHIMOTO, A., NISHIZUKA, Y., and TANAKA, C. Immunocytochemical localization of the alfa subspecies of protein kinase C in rat brain. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.87, p.3195-3199, 1990.

- ITO, K., and AKIYAMA, Y. Protein blotting through a detergent layer, a simple method for detecting integral proteins separated by SDS-PAGE. Biochemical and Biophysical Research Communication, v.133, p.214-221, 1985.
- JACQUE, C.M., JORGENSEN, O.S., BAUMANN, N.A., and BOCK, E. Brain-specific in quaking mouse during ontogeny. Journal of Neurochemistry, v.27, p.905-907, 1976.
- JENSEN, K.F., OHMSTEDE, C.A., FISHER, R.S., OLIN, J.K., and SAHYOUN, N. Acquisition and loss of a neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase during neuronal differentiation. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.88, p.4050-4053, 1991.
- JONES, S.W., ERIKSON, R.L., INGEBRITSEN, V.M., and INGEBRITSEN, T.S. Phosphotyrosyl-protein phosphatases. Separation of multiple forms from bovine brain and purification of the major form to near homogeneity. Journal of Biological Chemistry, v.264, p.7747-7753, 1989.
- JUANG, R-H., CHANG, Y-D., SUNG, H., and SU, J-C. Oven-drying method for polyacrilamide gel slab packed in cellophane sandwich. Analytical Biochemistry, v.141, p.348-350, 1984.
- JUDD, R.C. Peptide mapping. Methods in Enzymology, v.182, p.613-626, 1990.
- KARLSSON, J.E., ROSENGREN, L.E., and HAGLID, K.G. Quantitative and qualitative alterations of neuronal and glial intermediate filaments in rat nervous system after exposure to 2,5-hexanedione. Journal of Neurochemistry, v.57, p.1437-1444, 1991.
- KAVANAUGH, M.P., PARKER, J., BOBKER, D.H., KEANA, J.F., and WEBER, E. Solubilization and characterization of sigma-receptors from guinea pig brain membranes. Journal of Neurochemistry, v.53, p.1575-1580, 1989.
- KELLOGG, T.F. The effect of sample composition and vial type on Cerenkov counting in a liquid scintillation counter. Analytical Biochemistry, v.134, p.137-143, 1983.
- KELLY, P.T. Calmodulin-dependent protein kinase II: multifunctional roles in neuronal differentiation and synaptic plasticity. Molecular Neurobiology, v.5, in press, 1992.
- KELLY, P.T., and COTMAN, C.W. Synaptic proteins. Characterization of tubulin and actin and identification of a distinct postsynaptic density polypeptide. Journal of Cell Biology, v.79, p.173-178, 1978.

- KELLY, P.T., COTMAN, C.W. and LARGEN, M. Cyclic AMP stimulated protein kinases at brain synaptic junctions. Journal of Biological Chemistry, v.254, p.1564-1575, 1979.
- KELLY, P.T., McGUINNESS, T.L., and GREENGARD, P. Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.81, p.945-949, 1984.
- KENNEDY, M.B. Regulation of neuronal function by calcium. Trends in Neuroscience, v.12; p.417-420, 1989.
- KENNEDY, M.B., BENNETT, M.K., and ERONDU, E.E. Biochemical and immunochemical evidence that the "major postsynaptic density protein" is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.80, p.7357-7361, 1983.
- KIMELBERG, H.K., and NORENBERG, M.D. Astrocytes. Scientific American, v.60/4, p.66-76, 1989.
- KITANO, T., HASHIMOTO, T., KIKKAWA, U., ASE,, K. SAITO, N., TANAKA, C., ICHIMORI, Y., TSUKAMOTO, K, and NISHIZUKA, Y. Monoclonal antibodies against rat brain protein kinase C and their application to immunocytochemistry in nervous tissues. Journal of Neuroscience, v.7, p.1520-1525, 1987.
- KOSE, A., SAITO, N., ITO, H., KIKKAWA, U., NISHIZUKA, Y. and TANAKA, C. Electron microscopic localization of type I protein kinase C in rat Purkinje cells. Journal of Neuroscience, v.8, p.4262-4268, 1988.
- KOZMA, L.M., ROSSOMANDO, A.J. AND WEBER, M.J. Comparasion of three methods for detecting tyrosine-phosphorylated proteins. Methods in Enzymology, v.201, p.28-43, 1991.
- KRAIG, R.P., DONG, L., THISTED, R., and JAEGER, C.B. Spreading depression increases immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein. Journal of Neuroscience, v.11, p.2187-2198, 1991.
- KREBS, E.G. Historical perspectives on protein phosphorylation and a classification system for protein kinases. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, v.B302, p.3-11, 1983.
- KYHSE-ANDERSON, J. Semidry electroblotting - transfer using equipment without buffer vessel. In Handbook of Immunoblotting of Proteins, ed. by O.J. Bjerrum and N.H. Heegaard, v.1, p.79-83, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, p.680-685, 1970.
- LAZARIDES, E. Intermediate filaments: a chemically heterogenous, developmentally regulated class of proteins. Annual Review of Biochemistry, v.51, p.219-250, 1982.
- LEE, K.S., FRANK, S., VANDERKLISH, P., ARAI, A., LYNCH, G. Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.88, p.7233-7237, 1991.
- LeGENDRE, N. Immobilon-P transfer membrane: applications and utility in protein biochemical analysis. Biotechniques, v.9, p.788-805, 1990.
- LEONI, P., HEYWORTH, P., and SEGAL, A.W. Separation of phosphoproteins by fast protein liquid chromatography. Journal of Chromatography, v.527, p.152-157, 1990.
- LINCOLN, T.M., FLOCKHART, D.A., and CORBIN, J.D. Studies on the structure and mechanism of activation of the guanosine 3'-5'-monophosphate dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry, v.253, p.6002-6009, 1978.
- LIN, J.W., SUGIMORI, M., LLINAS, R.R., McGUINNESS, T.L., and GREENGARD, P. Effects of synapsin and calcium/calmodulin dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.87, p.8257-8261, 1990.
- LIU, Y., and STORM, D.R. Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration. Trends in Pharmacological Science, v.11, p.107-111, 1990.
- MALLOCH, G.D., CLARK, J.B., and BURNET, F.R. Glial fibrillary acidic protein in cytoskeletal and soluble protein fractions of the developing rat brain. Journal of Neurochemistry, v.48, p.299-306, 1987.
- MARSHALL, T., and WILLIAMS, K.M. The simplified technique of high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: Biomedical applications in health and disease. Electrophoresis, v.12, p.461-471, 1991.
- MARTENSEN, T.M. Chemical properties, isolation and analysis of O-phosphates in proteins. Methods in Enzymology, v.107, p.3-23, 1984.

- MATSUIDARA, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. Journal of Biological Chemistry, v.262, p.10035-10038, 1987.
- MATUS, A. Microtubule-associated protein: Their potential role in determining neuronal morphology. Annual Review of Neuroscience, v.11, p.29-44, 1988.
- MAURIDES, P.A., AKKARAJU, G.R., and JAGUS, R. Evaluation of protein phosphorylation state by a combination of vertical slab gel isoelectric focussing and immunoblotting. Analytical Biochemistry, v.183, p.144-151, 1989.
- McCARTHY, K.D., PRIME, J., HARMON, T., and POLLENZ, R. Receptor-mediated phosphorylation of astroglial intermediate filament proteins in cultured astroglia. Journal of Neurochemistry, v.44, p.723-730, 1985.
- McGUINNESS, T.L., LAI, Y., and GREENGARD, P. Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II. Journal of Biological Chemistry, v.260, p.1696-1704, 1985.
- MEISTER, B., FRYCKSTEDT, J., SCHALLING, M., CORTES, R., HOKFELT, T., APERIA, A., HEMMINGS, H.C., NAIRN, A.C., EHRLICH, M., and GREENGARD, P. Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32) and dopamine DA1 agonist-sensitive Na⁺,K⁺-ATPase in renal tubule cells. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.86, p.8068-8072, 1989.
- MERRIL, C.R., GOLDMAN, D., SEDMAN, S.A., and EBERT, M.H. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science, v.211, p.1437-1438, 1981.
- MILLER, S., and KENNEDY, M.B. Distinct forebrain and cerebellar isoenzymes of type II Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. Journal of Biological Chemistry, v.260, p.9039-9046, 1985.
- MITRIUS, J.C., MORGAN, D.G., and ROUTTEMBERG, A. In vivo phosphorylation following [³²P]ortho-phosphate injection into neostriatum or hippocampus: selective and rapid labelling of electrophoretically separated brain proteins. Brain Research, v.212, p.67-81, 1981.
- MOBBS, C., BERMAN, J., MARQUARDT, M., and PFAFF, D. Comprehensive polypeptide analysis of microdissected rat brain areas: combining 2-dimensional gel electrophoresis with 2-dimensional HPLC and immunoanalysis and sequence procedures. Journal of Neuroscience Methods, v.29, p.5-15, 1989.

- MOLLOY, S., and KENNEDY, M.B. Autophosphorylation of type II Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase in cultures of postnatal rat hippocampal slices. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.88, p.4756-4760, 1991.
- MOSS, D.J., FERNYHOUGH, P., CHAPMAN, K., BAIZER, L., BRAY, D., and ALLSOPP, T. Chicken growth-associated protein GAP-43 is tightly bound to the actin-rich neuronal membrane skeleton. Journal of Neurochemistry, v.54, p.729-736, 1990.
- MURTHY, A.S., BRAMBLETT, G.T., and FLAVIN, M. The sites at which brain microtubule-associated protein 2 is phosphorylated in vivo differ from these accessible to cAMP-dependent kinase in vitro. Journal of Biological Chemistry, v.260, p.4364-4370, 1985.
- NAIRN, A.C., DETRE, J.A., CASNELLIE, J.E, and GREENGARD, P. Serum antibodies that distinguish between the phospho and dephospho forms of a phosphoprotein. Nature, v.299, p.734-736, 1982.
- NAIRN, A.C., and GREENGARD, P. Purification and characterization of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase I from bovine brain. Journal of Biological Chemistry, v.262, p.7273-7281, 1987.
- NAIRN, A.C., and PALFREY, H.C. Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. Journal of the Biological Chemistry, v.262, p.17299-17303, 1987.
- NELSON, R.B., and ROUTEMBERG, A. Characterization of protein F1 (47 KDa, 4.5 pI): a kinase C substrate directly related to neural plasticity. Experimental Neurology, v.89, p.213-224, 1985.
- NESTLER, E.J., and GREENGARD, P. Protein phosphorylation in the brain. Nature, v.305, p.583-588, 1983.
- NESTLER, E.J., and GREENGARD, P. Fact versus artifact in demonstration of substrate protein. In Protein Phosphorylation in the Nervous System, ed. by E.J. Nestler and P. Greengard, chapter 8, p.274-287, John Wiley & Sons, New York, 1984a.
- NESTLER, E.J., and GREENGARD, P. Substrate proteins. In Protein Phosphorylation in the Nervous System, ed. by E.J. Nestler and P. Greengard, chapter 4, pp.95-98, John Wiley & Sons, New York, 1984b.
- NEUGEBAUER, J.M. Detergents: an overview. Methods in Enzymology, v.182, p.239-253, 1990.

- NEVILLE, D. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by electrophoresis in a discontinuous buffer system. Journal of Biological Chemistry, v.246, p.6328-6334, 1971.
- NICHOLS, R.A., HAYCOCK, J.W., WANG, J.T., and GREENGARD, P. Phorbol ester enhancement of neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. Journal Neurochemistry, v.48, p.615-621, 1987.
- NICHOLS, R.A., SIHRA, T.S., CZERNIK, A.J., NAIRN, A.C., and GREENGARD, P. Calcium/calmodulin dependent protein kinase II increases glutamate and noradrenaline release from synaptosomes. Nature, v.343, p.647-651, 1990.
- NISHIZUKA, Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. Nature, v.334, p.661-665, 1988.
- NIXON, R.A., BROWN B.A., and MAROTTA, C.A. Posttranslational modification of a neurofilament protein during axoplasmic transport: implications for regional specialization of CNS axons. Journal of Cell Biology, v.94, p.150-158, 1982.
- NIXON, R.A., and SIHAG, R.K. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. Trends in Neuroscience, v.14, p.501-506, 1991.
- NOETZEL, M.J. Synthesis and phosphorylation of the GFAP during brain development: a tissue slice study. Glia, v.3, p.450-457, 1990.
- NOETZEL, M.J. Synthesis and phosphorylation of the glial fibrillary acidic protein during brain development. Journal of Neurochemistry, v.57(suppl), p.S43, 1991.
- O'CALLAGHAN, J.D., BRINTON, R.E., and McEWEN, B.S. Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. Journal of Neurochemistry, v.57, p.860-869, 1991.
- OCORR, K.A., and SCHULMAN, H. Activation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin - dependent kinase in intact hippocampal slices. Neuron, v.6, p.907-914, 1991.
- O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional separation of proteins. Journal of Biological Chemistry, v.250, p.4007-4021, 1975.

- O'FARREL, P.Z., GOODMAN, H.M., and O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell, v.12, p.1133-1142, 1977.
- OGATA, K. Immunovisualization with peroxidase labeled anti-antibodies, the peroxidase antiperoxidase, and biotin-straptavidin methods. In Handbook of Immunoblotting of Proteins, ed by O.J. Bjerrum and N.H. Heegaard, p.167-176, 1988.
- ONO, Y., FUJII, T., OGITA, K., KIKKAWA, U., IGARASHI, K., and NISHIZUKA, Y. Protein kinase C subspecies from rat brain: its structure, expression and properties. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.86, p.3099-3103, 1989.
- ORLOWSKI, M. Proteinases. In Handbook of Neurochemistry - Enzymes in Nervous System, ed. by A. Lajtha, p. 21-66, Plenum, New York, 1982.
- OTTO, M., and SNERDARKOVA, M. A simple and rapid method for the quantitative isolation of proteins from polyacrylamide. Analytical Biochemistry, v.111, p.111-114, 1981.
- OUIMET, C.C., WANG, J.T., WALAAS, S.I., ALBERT, K.A., and GREENGARD, P. Localization of the MARCKS (87 KDa) protein, a major specific substrate for protein kinase C, in rat brain. Journal of Neuroscience, v.10, p.1683-1698, 1990.
- PATEL, A., WEIR, M., HUNT, A., TAHOURDIN, C.S., and THOMAS, D.G. Distribution of glutamine synthetase and GFAP and correlation of glutamine synthetase with glutamate decarboxylase in different regions of the rat central nervous system. Brain Research, v.331, p.1-9, 1985.
- PENEFSKY, H.S., and TZAGOLOFF, A. Extraction of water-soluble enzymes and proteins from membranes. Methods in Enzymology, v.22, p.204-219, 1971.
- PERRONE-BIZZOZERO, N.I., WEINER, D., HAUSER, G., and BENOWITZ, L.I. Extraction of major acidic Ca²⁺ dependent phosphoproteins from synaptic membranes. Journal of Neuroscience Research, v.20, p.346-350, 1988.
- PETRUCCI, T.C., and MORROW, J.S. Actin and tubulin binding domains of synapsins Ia e Ib. Biochemistry, v.30, p.413-422, 1991.
- PRUSS, R.M., MIRSKY, R., RAFF, M.C., THORPE, R., DOWDING, A.J., and ANDERSON B.H. All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. Cell, v.27, p.419-428, 1981.

- RAFF, M.C., MILLER, R.H., and NOBLE, M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte dependig on culture medium. Nature, v.303, p.390-396, 1983.
- RIBEIRO, A.M., and GOMEZ, M.V. The effect of calmodulin inhibitors on the release of acetylcholine and protein phosphorylation induced by tityustoxin, K⁺ and ouabain. Brain Research Bulletin, v.16, p.673-680, 1986.
- ROACH, P. Multisite and hierarchal protein phosphorylation. Journal of Biological Chemistry, v.266, p.14139-42, 1991.
- RODNIGHT, R., GONÇALVES, C.A., LEAL, R., ROCHA, E., SALBEGO, C., and WOFCHUK, S.T. Regional distribution and properties of an enzyme system in rat brain that phosphorylates ppH-47, an insoluble protein highly phosphorylated in tissue slices from hippocampus. Progress in Brain Research, v.89, p.157-167, 1991.
- RODNIGHT, R., GOWER, H., and ROBERTSON, R. On the disposition of a phosphorylated protein (synapsin I) and its associated kinases in synaptosomes from rat brain. Neurochemical Research, v.9, p.771-783, 1984.
- RODNIGHT, R., and LEAL, R. Regional variations in protein phosphorylating activity in rat brain studied in micro-slices labeled with [P³²]phosphate. Journal of Molecular Neuroscience, v.2, p.115-122, 1990.
- RODNIGHT, R., PERRET, C., and SOTERIUS, S. Two-dimensional patterns of neural phosphoproteins from the rat labeled in vivo under anaesthesia, and in vitro in slices and synaptosomes. Progress in Brain Research, v.69, p.373-381, 1986.
- RODNIGHT, R., TROTTA, E.E., and PERRETT, C. A simple and economical method for studying protein phosphorylation in vivo in the rat brain. Journal of Neuroscience Methods, v.13, p.87-95, 1985.
- RODNIGHT, R., and WOFCHUK, S.T. Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. Essays in Biochemistry, v.27, 1992, in press.
- RODNIGHT, R., ZAMANI, R., and TWEEDALE, A. An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. Journal of Neuroscience Methods, v.24, p.27-38, 1988.
- ROSEN, A., KEENAN, K.F., THELEN, M., NAIRN, A.C., and ADEREM, A.A. Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia. Journal of Experimental Medicine, v.172, p.211-215, 1990.

- ROSTAS, J.A., BRENT, V.A., HEATH, J.W., NEAME, R.B., POWIS, D.A., WEINBERGER, R.P., and DUNKLEY, P.R. The subcellular distribution of membrane-bound calmodulin stimulated protein kinase. Neurochemical Research, v.11, p.253-268, 1986.
- RUBIN, C.S., ERLICHMAN, J. and ROSEN, O.M. Cyclic adenosine 3,5-monophosphate dependent kinase of human erythrocyte membranes. Journal of Biological Chemistry, v.247, p.6135-6139, 1972.
- RUBIN, C.S. and ROSEN, O.M. Protein phosphorylation. Annual Review of Biochemistry, v.44, p.831-887, 1975.
- RUEGER, D.C., HUSTON, J.S., DAHL, D., and BIGNAMI, A. Formation of 100 Å filaments from purified glial fibrillary acidic protein in vitro. Journal of Molecular Biology, v.135, p.53-68, 1979.
- SALBEGO, C. Estudo ontogenético de fosfopeptídeos cerebrais em micro-fatias de cortex cerebral e hipocampo de ratos normais e desnutridos. Tese de Doutorado, UFPR, Curitiba, 1990.
- SALBEGO, C., and RODNIGHT, R. Ontogenic development of protein kinase C activity towards endogenous substrates in rat brain studied in micro-slices and by two-dimensional electrophoresis. Journal of Neurochemistry, v.52 (suppl.), p.S167, 1989.
- SALBEGO, C. and SOUZA, D. Effects of undernutrition during suckling on phosphoryl-serine levels in brain nuclear proteins of adult rats. Journal of Nutrition, v.116, p.2303-2310, 1986.
- SCOPES, R.K. Protein purification - Principles and practice, ed. by C.R. Cantor, second edition, Springer-Verlag, New York, 1987.
- SCHLAEPFER, W.W., and ZIMMERMAN, V.-J.P. Calcium-mediated breakdown of glial filaments and neurofilaments in rat optic nerve and spinal cord. Neurochemistry Research, v.6, p.243-255, 1981.
- SCHLICHTER, D.J., CASNELLIE, J.E., and GREENGARD, P. An endogenous substrate for cGMP dependent protein kinase in mammalian substrate. Nature, v.273, p.61-62, 1978.
- SCHLICHTER, D.J., DETRE, J.A., ASWAD, D.W., CHEHRAZI, B. and GREENGARD, P. Localization of cGMP dependent protein kinase and substrate in cerebellum. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.77, p.5537-5541, 1980.
- SCHOOK, W.J., PARKER, C., SILVA, W.I., KOHTZ, D.S., STAVE, S., and PUSZKIN, S. Phosphorylation characteristics of brain clathrin-coated vesicle endogenous proteins. Journal of Neurochemistry, v.49, p.434-441, 1987.

- SCHULMAN, H. The multifunctional Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase. Advances in Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Research, v.22, p.39-112, 1988.
- SEMPLE-ROWLAND, S., ADAMUS, G., COHEN, R.J., and ULSHAFFER, R.J. A reliable two-dimensional gel electrophoresis procedure for separating neural proteins. Electrophoresis, v.12, p.307-312, 1991.
- SHACTER, E., CHOCK, P.B., and STADTMAN, E.R. Regulation through phosphorylation/dephosphorylation cascade systems. Journal of Biological Chemistry, v.259, p.12252-12259, 1984a.
- SHACTER, E., CHOCK, P.B., and STADTMAN, E.R. Energy consumption in a cyclic phosphorylation/dephosphorylation cascade. Journal of Biological Chemistry, v.259, p.12260-12264, 1984b.
- SIESJO, B.K., BENGTSSON, F., GRAMPP, W. and THEANDER, S. Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. Annals of the New York Academy of Science, v.568, p.234-251, 1989.
- SMALL, G.M., IMANAKA, T., and LARAROW, P.B. Immunoblotting of hydrophobic integral membrane proteins. Analytical Biochemistry, v.169, p.405-409, 1988.
- SMITH, B.J. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of protein. In Methods in Molecular Biology, ed by J. Walker, v.1, p.41-55, Humana Press, Clifton, New Jersey, 1984.
- SODERLING, T.R. Protein kinases. Journal of Biological Chemistry, v.265, p.1823-1826, 1990.
- STEIN, J.C., FAROOQ, M., NORTON, W.T. and RUBIN, C.S. Differential expression of isoforms of the regulatory subunit of type II cAMP dependent protein kinase in rat neurons, astrocytes and oligodendrocytes. Journal of Biological Chemistry, v.262, p.3002-3006, 1987.
- STERNBERGER, L.A., and STERNBERGER, N.H. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.80, p.6126-6130, 1983.
- STEWART, D., TORRE, E.R., TOMASULO, R., and LOTHMAN, E. Neuronal activity up-regulates astroglial gene expression. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.88, p.6819-6823, 1991.
- STRALFORS, P., and BELFRAGE, P. Electrophoretic elution of proteins from polyacrylamide gel slices. Analytical Biochemistry, v.128, p.7-10, 1983.

- STUMPO, D.J., GRAFF, J.M. ALBERT, K.A. GREENGARD, P., and BLACKSHEAR, P.J. Molecular cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding the "80 to 87 KDa" myristoylated alanine-rich C kinase substrate: a major cellular substrate for protein kinase C. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.86, p.4012-4016, 1989.
- SUDHOF, T.C., CZERNIK, A.J., KAO, H.T., TAKEI, K., JOHNSTON, P.A., HORIUCHI, A., KANAZIR, S.D., WAGNER, M.A., PERIN, M.S., DeCAMILLI, P., and GREENGARD, P. Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. Science, v.245, p.1474-1480, 1989.
- SVOBODA, M., MEURIS, S., ROBYN, C., and CHRISTOPHE, J. Rapid electrotransfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose membrane using surface-conductive glass as anode. Analytical Biochemistry, v.151, p.16-23, 1985.
- TAKAZAWA, K., PASSAREIRO, H., DUMONT J.E., and ERNEUX, C. Purification of bovine brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. Biochemical Journal, v.261, p.483-488, 1989.
- TAPSCOTT, S.J., BENNETT, G.S., and HOLTZER, H. Neural precursor cells in the chick neural tube express neurofilaments protein. Nature, 292:836-838, 1981.
- TARDY, M., FAGES, C., RIOL, H., LePRINCE, G., RATABOUL, P., CHARRIERE-BERTRAND., and NUNEZ, J. Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in the central nervous system and in cultured astrocytes. Journal of Neurochemistry, v.52, p.162-167, 1989.
- TIMMONS, T.M., and DUNBAR, B.S. Protein blotting and immunodetection. Methods in Enzymology, v.182, p.679-688, 1990.
- THEURKAUF, W.E. and VALLEE, R.B. Extensive cAMP dependent and cAMP independent phosphorylation of microtubule-associated protein 2. Journal of Biological Chemistry, v.258, p.7883-7886, 1983.
- TOBIMATSU, T., and FUJISAWA, H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin dependent protein kinase II mRNAs. Journal of Biological Chemistry, v.264, p.17907-17912, 1989.
- TOVEY, E.R., and BALDO, B.A. Protein binding to nitrocellulose, nylon and PVDF membranes in immunoassays and electroblotting. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, v.19, p.169-184, 1989.
- TOWBIN, H.T., STAHELIN, T., and GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proceedings of the

- National Academy of Science USA, v.76, p.4350-4354, 1979.
- VITKOVIC, L., STEISLINGER, H.W., ALOYO, V.J. and MERSEL, M. The 43 KDa neuronal growth-associated protein (GAP-43) is present in plasma membranes of rat astrocytes. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.85, p.8296-8300, 1988.
- WANG, K., FANGER, B.O., GUYER, C.A., and STAROS, J.V. Electrophoretic transfer of high molecular weight proteins for immunostaining. Methods in Enzymology, v.172, p.687-696, 1989.
- WALAAS, S.I. and GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. Pharmacological Reviews, v.43, p.299-349, 1991.
- WALAAS, S.I., ASWAD, D.W., and GREENGARD, P. A dopamine and cyclic AMP regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. Nature, v.301, p.69-71, 1983a.
- WALAAS, S.I., NAIRN, A.C. and GREENGARD, P. Regional distribution of calcium and cyclic adenosine 3,5-monophosphate regulated protein phosphorylation systems in mammalian brain. Journal of Neuroscience, v.3, p.291-301, 1983b.
- WALKER, J.M. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis. In Methods in Molecular Biology, ed. by J.Walker, p.57-61, Humana Press, Clifton, New Jersey, 1984.
- WEIR, M.D., PATEL, A.J., HUNT, A., and THOMAS, D.G. Developmental changes in the amount of GFAP in three regions of the brain. Developmental Brain Research, v.15, p.147-154, 1984.
- WEISS, S., ELLIS, J., HENDLEY, D.D., and LENOX, R.H. Translocation and activation of PKC in striatal neurons in primary culture: relationship to phorbol dibutyrate actions on the inositol phosphate generating system and neurotransmitter release. Journal of Neurochemistry, v.52, p.530-536, 1989.
- WELLER, M. Phosphorylated aminoacids which occur in proteins and their chemical properties. In Protein phosphorylation, ed. by M. Weller, p.1-5, Pion Limited, London, 1979.
- WENZEL, J., LAMMERT, G., MEYER, U. and KRUG, M. The influence of long term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. Brain Research, v.560, p.112-121, 1991.
- WHITTINGHAM, T.S., LUST, W.D., and PASSONEAU, J.V. An "in vitro" model of ischemia: metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice. Journal of Neuroscience, 4:793-802, 1984.

- WIBLE, B.A., SMITH, K.E., and ANGELIDES, K.J. Resolution and purification of neurofilament-specific kinase. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.86 p.720-724, 1989.
- WILLIAMS, K.R., HEMMINGS, H.C., LoPRESTI, M.B., KONIGSBERG, W.H., and GREENGARD, P. DARPP-32, a dopamine and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein. Primary structure and homology with protein phosphatase inhibitor-1. Journal of Biological Chemistry, v.261; p.1890-1903, 1986.
- WILSON, C.M. Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R and Fast Green FCF as stains for protein after polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical Biochemistry, v.96, p.263-278, 1979.
- WINSKY, L., HARVEY, J.A., McMASTER, S.E., and JACOBWITZ, D.M. A study of proteins in the auditory system of rabbits using two-dimensional gels: identification of glial fibrillary acidic protein and vitamin D-dependent calcium binding protein. Brain Research, v.493, p.136-146, 1989.
- WOFCHUK, S.T., and RODNIGHT, R. Stimulation by glutamate of the phosphorylation of two substrates of protein kinase C, B-50/GAP 43 and MARCKS, and of the ppH-47, a protein highly labelled in incubated slices from the rat hippocampus. Neuroscience Research Communications, v.6, p.135-140, 1990.
- WU, W.S., WALLAS, S.I., NAIRN, A.C., and GREENGARD, P. Calcium/phospholipid regulates phosphorylation of a Mr "87" substrate protein in brain synaptosomes. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.79, p.5249-5253, 1982.
- YAMAMOTO, H., FUKUNAGA, K., GOTO, S., TANAKA, E., and MYAMOTO, E. Calcium/calmodulin dependent regulation of microtubule formation via phosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor and tubulin, and comparison with cyclic AMP dependent phosphorylation. Journal of Neurochemistry, v.44, p.759-768, 1985.
- YANG, S.D., TALLANT, A., and CHEUNG, W.Y. Calcineurin is a calmodulin-dependent protein phosphatase. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.106, p.1419-1425, 1982.
- YARDEN, Y. and ULLRICH, A. Growth factor receptor tyrosine kinases. Annual Review of Biochemistry, v.57, p.443-478, 1988.
- YEN, S.H., and FIELDS, K.L. Antibodies to neurofilament, glial filament and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system. Journal of Cell Biology, v.88, p.115-126, 1981.

- YIP, R.K., and KELLY, P.T. In situ protein phosphorylation in hippocampal tissue slices. Journal of Neuroscience, v.9, p.3618-3630, 1989.
- ZORZATO, F., and VOLPE, P. Calcium binding proteins of junctional sarcoplasmic reticulum: detection by ⁴⁵C ligand overlay. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.261, p.324-329, 1988.
- ZWIERS, H., VERHAAGEN, J., VAN DONGEN, C.J., DE GRAAN, P.N., and GISPEN, W.H. Resolution of rat brain synaptic phosphoprotein B-50 into multiple forms by two-dimensional electrophoresis: evidence for multisite phosphorylation. Journal of Neurochemistry, v.44, p.1083-1090, 1985.