

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS
POLIPEPTÍDEOS, P160 E P54, DE UMA FRAÇÃO ATPase
DE CÉREBRO DE RATO**

Decivaldo dos Santos Dias

Uberlândia – MG
Julho - 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS
POLIPEPTÍDEOS, P160 E P54, DE UMA FRAÇÃO ATPase
DE CÉREBRO DE RATO**

Decivaldo dos Santos Dias

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

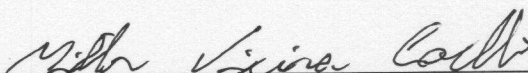
Uberlândia – MG
Julho - 2003

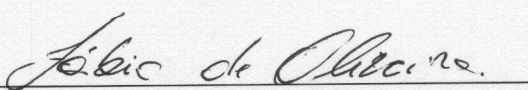
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

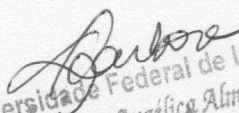
**CARACTERIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS
POLIPEPTÍDEOS, P160 E P54, DE UMA FRAÇÃO ATPase
DE CÉREBRO DE RATO**

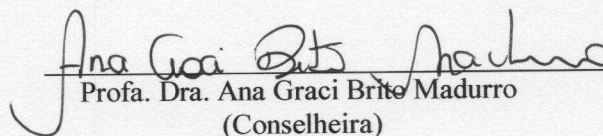
Decivaldo dos Santos Dias

Aprovado Pela Banca Examinadora Em 25 / 07 / 03 Nota 100


Prof. Dr. Milton Vieira Coelho
(Orientador)


Prof. Dr. Fábio de Oliveira
(Conselheiro)


Universidade Federal de Uberlândia
Prof.^a Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas


Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro
(Conselheira)

Uberlândia, 25 de julho de 2003.

*Aos meus pais, Delcídio Vieira Dias e
Rita dos Santos Dias*

*Aos meus irmãos, Delson, Dinalda,
Dinalva, Djalma, Divaldo e Dernevaldo*

*A Sônia Maria Alves da Silva e Luís
Eduardo Alves Dias*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Milton Vieira Coelho, pelo seu apoio e orientação.

Aos amigos de laboratório: Hugo, Vinícius (vivi), Rogério (rogê), Gabriel (docinho), Ademilton (papi), Morum (Johnny bravo) e Dona Maura.

Aos amigos: Alexandre (rosinha), Leonardo Gomes, Paulo Emílio, Livia, Tatiane, André (vaca), André (Andrezão), Maria Clara (clarinha), Leonora (lelé), Mariana (mari), Juliana, Sharita, Kelly, Cynthia (potranca do haras), Karine (tilanga), Ulisses (Tim), Carlos André (simpatko), Fernando, Cynara, Alzira (alzirão.com), Rodrigo (agrônomo).

A secretária e amiga de instituto: Marlene.

A todos os amigos de faculdade e instituto.

HUMOR

LEIS DE MURPHY

Se você é daqueles que acha que as coisas só podem piorar... Você está muito otimista.

Se alguma coisa tem a mais remota chance de dar errado, certamente dará errado.

Tudo dará errado ao mesmo tempo.

Nada está tão ruim que não possa piorar, use a criatividade.

Para cada ação existe uma crítica igual e no sentido contrário.

Nada é tão bom, que em algum lugar, alguém não irá dizer que não presta.

Se tudo o mais falhar, siga as instruções.

Você pode observar muito só olhando.

Se a probabilidade de sucesso é quase um, então ela é próxima de zero.

A lógica é um método para chegar a uma conclusão errada com confiança.

Se uma experiência funciona, algo deu errado.

A principal causa dos problemas são as soluções.

A solução do problema muda o problema.

Quando se procura a solução de um problema, sempre ajuda conhecer a resposta.

As coisas que não são iguais à coisa nenhuma são iguais entre si

Nenhuma experiência é reproduzível.

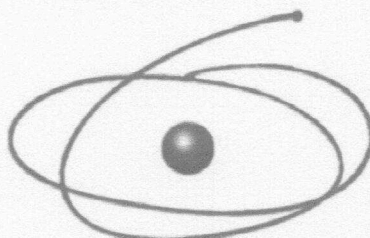
Nunca tente reproduzir uma experiência bem sucedida.

A soma de toda inteligência do planeta é igual a uma constante, e a população está aumentando.

**ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO COM O APOIO DAS SEGUINTE
INSTITUIÇÕES:**



*Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico*



C A P E S



FAPEMIG

Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de Minas Gerais

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADP	Adenosina-5'-difosfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
BSA	Soro albumina bovina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
kDa	Kilodaltons
PPi	Pirofosfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TEMED	N, N, N', N'-tetrametilenodiamino
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO-----	1
1.1. MIOSINAS-----	2
1.2. DINEÍNAS-----	7
1.3. CINESINAS-----	9
1.4. E-NTPases-----	11
1.5. FRAÇÃO ATPase CARACTERIZADA POR PINHEIRO-----	12
2. OBJETIVO GERAL-----	12
3. MATERIAL E MÉTODOS-----	13
3.1. REAGENTES-----	13
3.2. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ATPase-----	13
3.3. DOSAGEM DE FOSFATO-----	16
3.4. DOSAGEM PROTÉICA-----	17
3.5. PERFIL ELETROFORÉTICO EM SDS-PAGE-----	18
4. RESULTADOS-----	19
4.1. PERFIL ELTROFORÉTICO DOS POLIPEPTÍDEOS-----	19
4.2. ATIVIDADE Mg ²⁺ ATPásica-----	20
4.3. ASSOCIAÇÃO DE P160 E P54-----	21
4.4. EFEITO DE IMIDAZOL NA ATIVIDADE Mg ²⁺ ATPásica DE V2-----	22
4.5. DIÁLISE DE P160 E P54-----	23
5. DISCUSSÃO-----	25
6. CONCLUSÃO-----	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS-----	28

RESUMO

Em trabalho recente obtivemos uma fração ATPase enriquecida em atividade Mg^{2+} ATPase, a partir de cérebro de rato, tendo como principais polipeptídeos um de 160 kDa e outro de 54 kDa, que aparecem fortemente corados em SDS-PAGE. Essa fração foi caracterizada por Pinheiro (2001), tendo a mesma apresentado propriedade distintas de outras ATPases já conhecidas como miosina, dineína, cinesina ou E-NTPases. Seguindo o protocolo descrito por Pinheiro, conseguimos obter uma fração ATPase na qual foi evidenciada a presença de vários polipeptídeos, inclusive os dois principais polipeptídeos P160 e P54. Usando coluna de Blue-Sepharose, obtivemos a retenção dos dois polipeptídeos, que foram recuperados mediante o uso de imidazol 1M ou 2,5 M, para P160 e P54, respectivamente. A atividade Mg^{2+} ATPase total da fração ATPase aplicada em coluna Blue-Sepharose teve uma recuperação de 90% na fração "void" da coluna, que mostrou ausência de P160 e P54. Os polipeptídeos, isolados ou reassociados, não mostraram atividade Mg^{2+} ATPase. Imidazol 1 ou 2 M inibiu a atividade Mg^{2+} ATPase da fração ATPase em cerca de 40 e 60 %, respectivamente. Diálise não foi suficiente para restabelecer alguma atividade relacionada aos polipeptídeos, quer fossem dialisados juntos ou reassociados posteriormente. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os polipeptídeos P160 e P54 de nossa fração ATPase não são os responsáveis pela atividade Mg^{2+} ATPase.

ABSTRACT

In recent work we got rich a ATPase fraction in Mg^{2+} ATPase activity, from rat brain, having as main polypeptides one of 160 kDa and another one of 54 kDa, that they appear stained strong in SDS-PAGE. This fraction was characterized by Pinheiro (2001), having same presented property the distinct ones from other ATPases already known as myosin, dynein, kinesin or E-NTPases. Following the described protocol for Pinheiro, we obtained a ATPase fraction in which was evidenced the presence of some polypeptides, also the two main polypeptides P160 and P54. Using column of Blue-Sepharose, we got the retention of the two polypeptides, that had been recouped by means of 1M or 2,5 the use of imydazole, for P160 and P54, respectively. The Mg^{2+} ATPase activity total of the ATPase fraction applied in Blue-Sepharose column had a recovery of 90 % in the fraction "void" of the column, that shows absence of P160 and P54. The polypeptides, isolated or reassociated, had not shown Mg^{2+} ATPase activity. Imydazole 1 or 2 M inhibited the Mg^{2+} ATPase activity of the ATPase fraction in about 40 and 60 %, respectively. Dialysis was not sufficient to reestablish some activity related to the polypeptides, it wants were dialysed together or reassociated later. The results gotten in this work had shown that the polypeptides of P160 and P54 of our ATPase fraction are not the responsible ones for the Mg^{2+} ATPase activity.

1. INTRODUÇÃO

ATPases correspondem a um grupo de enzimas que possuem como principal propriedade a capacidade de hidrolisar o fosfato γ da molécula de adenosina trifosfato (ATP). Muitas dessas enzimas estão relacionadas com a realização de trabalho celular através do acoplamento da quebra do fosfato γ do ATP à promoção de outras reações químicas. A miosina de músculo acopla a quebra do ATP ao processo de contração muscular através da interação com filamentos de Actina. Outras enzimas como cinesina e dineína acoplam a quebra do ATP aos processos de transporte de vesículas no interior celular, através da interação com microtúbulos, bem como a movimentação de cílios e flagelos. A Na^+/K^+ -ATPase que é uma proteína integral de membrana utiliza a energia da hidrólise do ATP para o transporte de Na^+ e K^+ através da membrana celular (WOO et al., 1999; LINGREL & KUNTZWELER, 1994).

Miosina, cinesina e dineína, constituem a principal família de enzimas denominadas de motores moleculares e também as principais ATPases solúveis (VALE *et al.*, 1999; MERMALL *et al.*, 1998; HIROKAWA, 1998). Atualmente são conhecidas 18 classes de miosinas, dez diferentes classes de cinesinas e duas classes de dineínas (SCHLIWA & WOEHLKE, 2003). A característica comum dos motores moleculares é que são proteínas que têm a habilidade de hidrolisar o ATP convertendo parte de sua energia química em trabalho mecânico, constituindo assim um componente gerador de força para a célula. Apresentam um papel essencial em muitos processos celulares como contração muscular, fagocitose, emissão de pseudópodos, transporte de vesículas e organelas, migração de cromossomos durante o processo de divisão celular e citocinese (ENDOW & TITUS, 1992; CLARKE & SPUDICK, 1977).

Temos outras enzimas, com distribuição ubíqua nos tecidos, que hidrolisam tanto o fosfato γ como o β do ATP, bem como ADP, contudo não usam a energia liberada pela hidrólise do ATP ou ADP para a promoção de trabalho celular, sendo referidas como E-NTPases (PLESNER, 1995). Algumas destas enzimas estão relacionadas aos processos fisiológicos regulados por ATP e/ou ADP como neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea, permeabilidade de membranas celulares e também na reciclagem de nucleotídeos (KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996; KEGEL et al, 1997). Grande parte das E-NTPases identificadas constituem proteínas integrais de membranas e que, em geral, não são encontradas em frações solúveis. Entretanto parece que alguns membros desse grupo de enzimas são solúveis (ZIMMERMAMN, 1999).

1.1. MIOSINA

Miosinas constituem uma superfamília de proteínas motoras que se movimentam sobre filamentos de actina através da hidrólise do ATP, e desta maneira elas constituem um conjunto crítico nos processos de contração e motilidade celular (HOMMA et al, 2000). Os filamentos de actina geralmente estão associados com a miosina, que juntos são responsáveis por uma série de movimentos celulares.

Além da miosina II, que é encontrada em células musculares e não musculares (KORN & HAMMER, 1988), vários outros tipos de miosinas são encontrados em células não-musculares. Uma proteína ligante de actina e com atividade ATPásica característica de miosina de músculo, mas com peso molecular inferior e constituída por um único domínio globular, foi isolada inicialmente de *Acanthamoeba* (POLLARD & KORN, 1973). Posteriormente, enzimas similares a essa foram encontradas em *Dictyostelium* (COTÉ et al, 1985) e microvilosidades intestinais de vertebrados (COLLINS & BORYSENKO, 1984). As seqüências de aminoácidos na região N-terminal dessas proteínas apresentam alta homologia entre si e com miosina II. Tais enzimas de cabeça única foram denominadas de miosinas não convencionais ou miosina I (HAMMER, 1991). Em virtude da grande diversidade destas miosinas a classificação em apenas dois grupos: miosina I e II, não era adequada. Uma comparação detalhada da seqüência de aminoácidos dos domínios cabeças nas miosinas levou à conclusão de que essas proteínas deveriam ser agrupadas em várias classes distintas (ESPREÁFICO et al, 1992; MOOSEKER, 1993).

Durante as últimas décadas tem sido encontradas inúmeras proteínas com características de miosinas, por vez as miosinas estão, atualmente, sistematizadas em 18 classes, baseadas em análises filogenéticas de seqüências de domínio cabeça localizada na porção amino terminal do polipeptídeo (CHENEY & MOOSEKER, 1992; HASSON & MOOSEKER, 1996; THOMPSON & LANGFORD, 2002). A Figura 1 ilustra as diferentes classes de miosinas atualmente conhecidas. Algumas dessas ATPases já se encontram bioquimicamente bem caracterizadas como a miosina I, II, V e VI (HASSON & MOOSEKER, 1996; SELLERS, 2000).

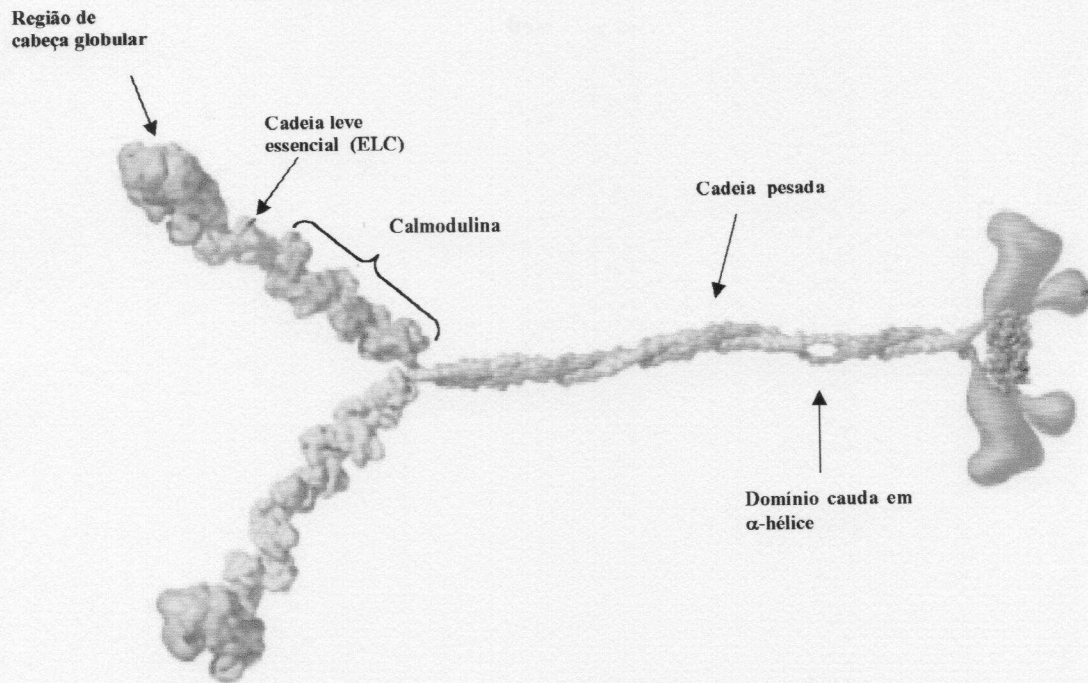


Figura 3: Miosina V, em destaque o domínio motor (em azul escuro), as cadeias leves dos motivos IQ com a molécula de calmodulina ligada (em azul claro) e a região de cadeias pesadas com o domínio cauda (em lilás), que promove a interação da miosina com sua carga. Figura construída a partir de análise por difração de raio x , colorida de forma diferente para ilustrar as cadeias e o preenchimento das estruturas (extraído de VALE, 2003).

Além da contração muscular, a família das miosinas está envolvida em várias outras funções celulares como crescimento e desenvolvimento celular, no transporte de organelas e de RNA mensageiro, exocitose, endocitose, diferenciação de leucócitos, manutenção da arquitetura celular e transdução de sinal (WU et al, 2000; MERMALL et al, 1998). Alterações da atividade destes motores muitas vezes podem levar a desordens neurológicas e neurosensoriais (LANGFORD & MOLYNEAUX, 1998). A figura 4 mostra as diferentes funções celulares exercidas pelas miosinas como no transporte de vesículas de melanossomas ou RNA por miosina V (8, 10, 11, 12), endo ou exocitose ou fagocitose por miosina I (4, 6, 7, 9).

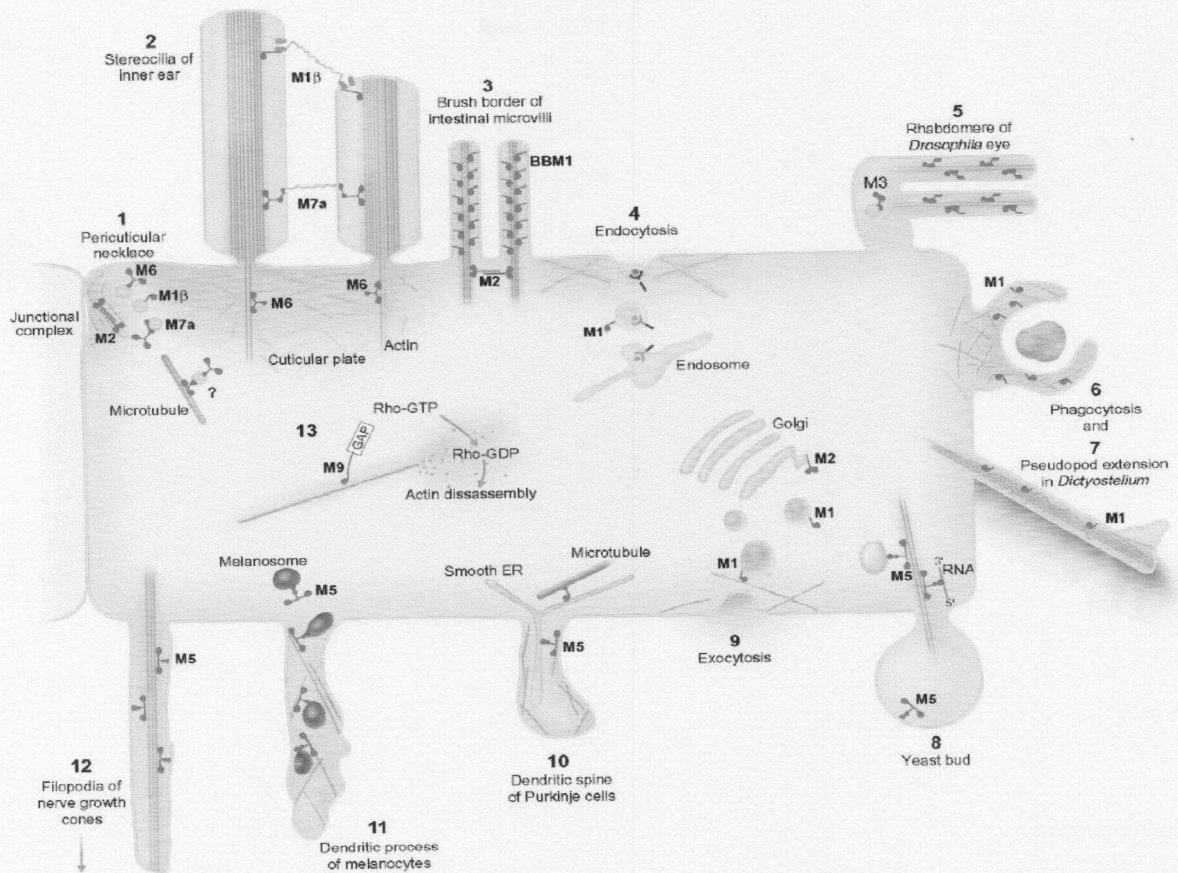


Figura 4: Representação das diferentes funções celulares das miosinas: endocitose, transporte de RNA, fagocitose, transporte de vesículas, exocitose, etc (extraído de MERMALL, 1998).

As miosinas também apresentam como características a capacidade de terem suas atividades mecanoquímicas reguladas pela presença de certas substâncias. A atividade Mg^{2+} -ATPásica de miosina pode sofrer regulação direta ou indireta pela presença de cálcio ou Ca^{2+} -Calmodulina, respectivamente, bem como terem atividade Ca^{2+} -ATPásica estimulada pela presença de calmodulina como miosina V, por exemplo (COZELMAN & MOOSEKER, 1987; HANSSON & MOOSEKER, 1996; ESPINDOLA et al, 1992). Fluoreto de alumínio por formar um complexo com ADP, adquirindo estrutura semelhante ao fosfato γ do ATP, pode ter efeito inibitório na atividade Mg^{2+} -ATPásica desses motores moleculares (FAÇANHA & OKOROKOVA-FAÇANHA, 2002; TROULLIER et al, 1992). Vanadato, por

possuir estrutura análoga a do ATP, pode, em concentrações elevadas, inibir a atividade Mg^{2+} -ATPásica de miosina II de músculo, bem como de miosina I (COZELMAN & MOOSEKER, 1987). As miosinas apresentam como caráter diagnóstico a expressão de atividade ATPásica em soluções contendo elevadas concentrações de K^+ /EDTA (COZELMAN & MOOSEKER, 1987).

1.2. DINEÍNA

Dineína axonemal e citoplasmática são morfologicamente similares, sendo a forma citoplasmática relacionada, mas não idêntica a dineína axonemal (HOLZBAUR & VALLEE, 1994). As dineínas foram descritas primeiramente como estruturas semelhantes a braços laterais presentes em pares de microtúbulos externos de axonemas de cílios e flagelos (GIBBONS, 1965). Esses braços são ATPases responsáveis pela geração de movimentos de deslizamento entre microtúbulos e causam o batimento de cílios e flagelos. A forma citoplasmática da dineína foi isolada inicialmente de tecido cerebral como o motor molecular responsável pelo transporte axonal retrogrado de organelas, bem como o transporte centrípeto de endossomos, lisossomos e elementos do complexo golginense nas células em geral. Esta família de motores moleculares encontra-se amplamente distribuída na natureza (PASCHAL & VALLEE, 1987).

A dineína citoplasmática, isolada de cérebro bovino, é composta de duas moléculas de cerca de 532 kDa, três cadeias intermediárias de 74 kDa e quatro cadeias leves de 59, 57, 55 e 53 kDa (PASCHAL & VALLEE, 1987). A figura 5 ilustra uma molécula de dineína citoplasmática com as cadeias pesadas com os domínios motores globulares, cadeias intermediárias ligadas às cadeias pesadas, cadeias leves e cadeias intermediárias ligantes de dinactina.

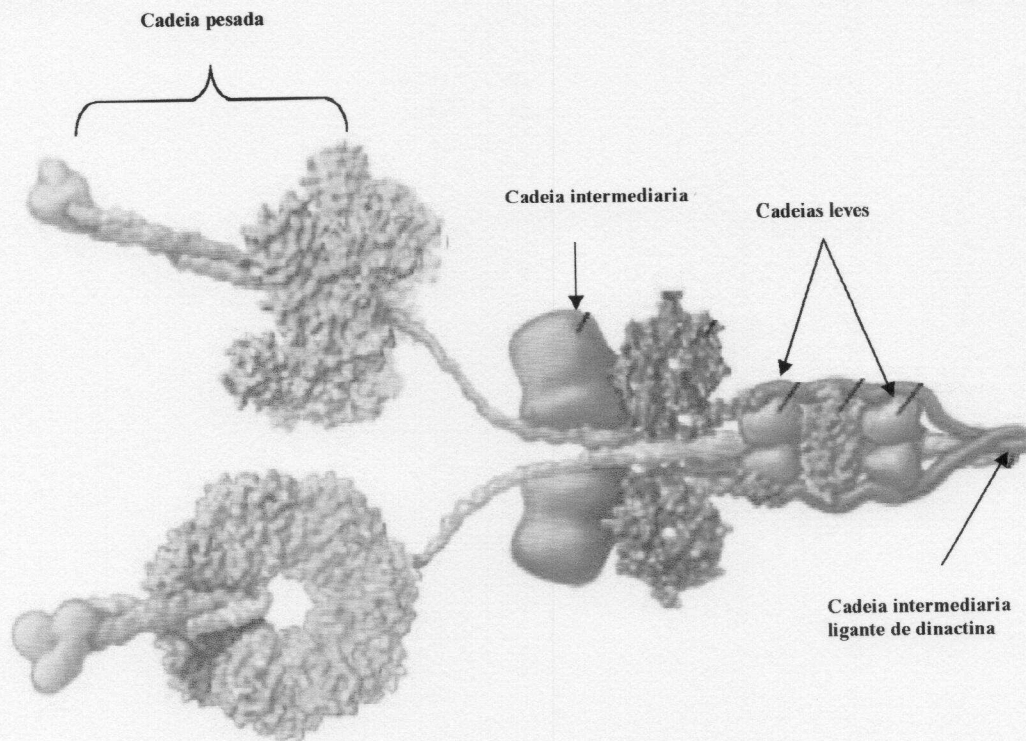


Figura 5: Dineína citoplasmática evidenciando as cadeias pesadas (em azul escuro), cadeias intermediárias, cadeias leves e cadeias intermediárias ligantes de dinactina no transporte de vesículas. Figura construída a partir de análise por difração de raio x , colorida de forma diferente para ilustrar as cadeias e o preenchimento das estruturas (extraído de VALE, 2003)

Dineína citoplasmática, dineína flagelar e ciliar possuem uma região relativamente conservada, a cabeça, envolvida na produção de força ao longo de microtúbulos (VALLEE et al, 1988). As dineínas axonemal e citoplasmática são capazes de conduzir o deslizamento de microtúbulos *in vitro* (PASCHAL, et al, 1987) e ambas enzimas geram força na direção (-) do microtúbulo (PASCHAL & VALLEE, 1987; HOLZBAUR & VALLEE, 1994).

Embora dineína hidrolise outros nucleotídeos trifosfato, apenas a atividade ATPásica é estimulada por microtúbulos e suporta movimento (PASCHAL et al, 1987). Diferente da dineína de axonema, a dineína citoplasmática não contém sítios ligantes de microtúbulos insensível a ATP e sua atividade ATPásica é alterada na presença de detergente iônico (SHPETNER et al, 1988). Dineína citoplasmática, na presença de triton X-100 um detergente não iônico, não sofre inibição de sua atividade ATPase, entretanto triton X-100 pode estimular a atividade ATPásica de outras dineínas (GIBBONS & FRONK, 1979). Dineína de cérebro tem sua atividade ATPásica inibida na presença de baixas concentrações de vanadato (SHPETNER et al, 1988).

1.3. CINESINA

As cinesinas constituem uma superfamília de ATPases associadas a microtúbulos. Todas as cinesinas atuam como motores moleculares, que em associação com microtúbulos, transformam a energia do ATP em ação específica. As cinesinas hidrolisam o ATP usando um centro catalítico altamente conservado, cuja interação microtúbulo-nucleotídeo estimula a atividade ATPásica (SABLIN, 2000).

A primeira cinesina foi descoberta em axoplasma de lula por Vale et al (1985). Cinesina converte a energia liberada da hidrólise de ATP em movimento unidirecional ao longo de microtúbulos (GOLDSTEIN, 1991), sendo responsável pelo movimento centrifugo (VALE et al, 1985) e pelo transporte axonal anterógrado (ENDOW & TITO, 1992).

A cinesina isolada de vários tecidos é geralmente um tetrâmero ($\alpha_2\beta_2$) que consiste de duas cadeias α pesadas e duas β leves. As cadeias pesadas possuem entre 110-113 kDa, estando os domínios motores localizados na extremidade N-terminal das cadeias. A cadeia pesada é segmentada e pode ser dividida em quatro domínios: o domínio catalítico globular, um domínio pescoço, uma região em α -hélice denominada haste e uma cauda globular. O domínio catalítico globular é altamente conservado entre cinesinas e contém os sítios de ligação aos microtúbulos e ATP (SABLIN, 2000). O domínio cauda se liga às cadeias leves e a organelas específicas, além de ter função regulatória das atividades ATPásica e motora das cinesinas (COY et al, 1999). A figura 6 representa uma molécula de cinesina mostra a presença do domínio cabeça, a porção em helicoidal da cadeia pesada e o domínio cauda com as cadeias leves aderidas.

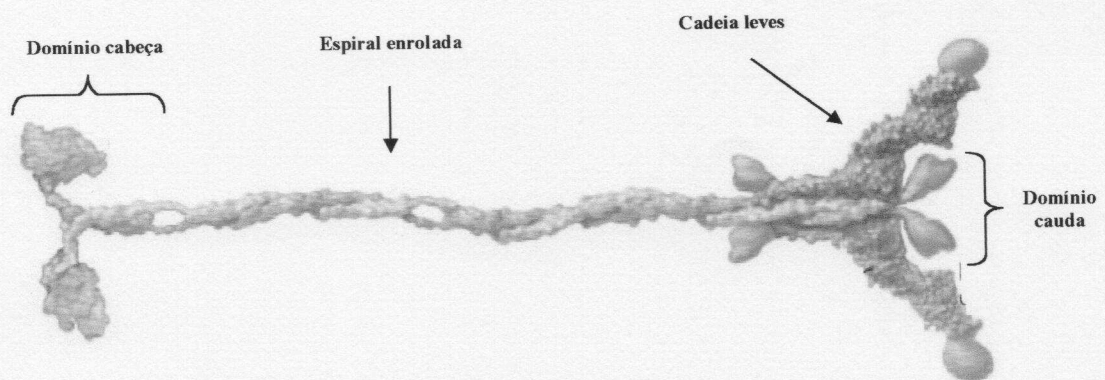


Figura 6: Cinesina citoplasmática evidenciando as cadeias pesadas (em azul escuro), cadeias intermediárias e a interação com dinactina no transporte de vesículas. Figura construída a partir de análise por difração de raio X, colorida de forma diferente para ilustrar as cadeias e o preenchimento das estruturas (extraído de VALE, 2003)

Descobertas recentes indicam que as cinesinas constituem uma família diversa de proteínas (HIROKAWA, 1998). Além do membro descrito anteriormente, que é uma proteína tetramérica, existem membros que são monoméricos e também, com diversos outros tipos de estrutura quaternária. Enquanto a cinesina de cérebro descoberta inicialmente possui o domínio motor na extremidade N-terminal (tipo N), alguns membros dessa família apresentam o domínio motor na extremidade C-terminal (tipo C) e outros apresentam esse domínio no meio da molécula (tipo M). Alguns membros da família das cinesinas realizam movimento para a extremidade (+) dos microtúbulos, enquanto outros realizam o transporte para a extremidade (-) de microtúbulos (SABLIN, 2000; HIROKAWA, 1998). As cinesinas estão envolvidas em vários processos celulares como transporte de organelas em neurônios, divisão celular, dinâmica de microtúbulos e transporte de melanossomos (HARA et al., 2000; HIROKAWA, 1998).

As cinesinas têm sua atividade Mg^{2+} -ATPásica estimulada na presença de microtúbulos, entretanto na ausência destes apresentam uma atividade Ca^{2+} -ATPásica mais elevada (KACHAR et al, 1987). Na presença de alta força iônica e N-etilmaleimida, as cinesinas têm sua atividade Mg^{2+} -ATPásica inibida (KACHAR et al, 1987), bem como na presença de inibidores de movimento como vanadato e AMP-PNP, a cinesinas apresentam diminuição de sua atividade ATPásica (COHN et al, 1987). Pode-se citar como uma das características das cinesinas, frente a inibidores específicos, o fato de ligarem-se fortemente a microtúbulos na presença de AMP-PNP (VALE, 1987). A figura 7 representa as moléculas de dineína e cinesina interagindo com microtúbulo e seus sentidos de movimento ao longo dos mesmos.

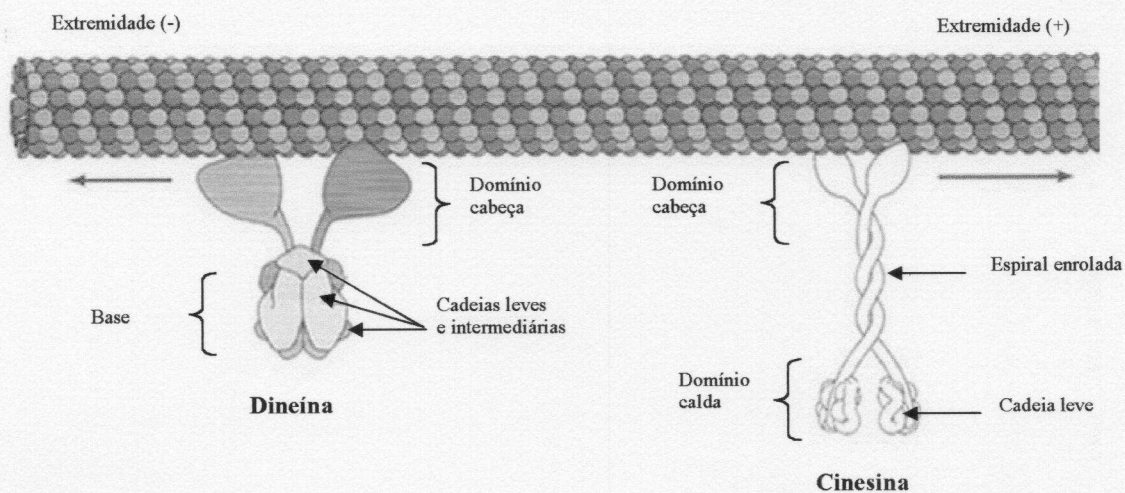


Figura 7: Interação de dineína citoplasmática e cinesina com microtúbulos e sentido de movimento de ambas ao longo do microtúbulo (extraído de COOPER, 2001)

1.4. E-NTPase

Também denominadas ecto-ATPases, ecto-apirases ou E-ATPases, são enzimas que hidrolisam nucleotídeos trifosfato ou tanto nucleotídeos di e trifosfato apresentando distribuição ubíqua em seres eucariotos (KACZMAREK et al., 1996; PLESNER, 1995). As E-ATPases são fundamentais em alguns processos fisiológicos onde ATP e/ou ADP estão envolvidos. Dentre esses processos temos: neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea, permeabilidade de membranas celulares e transporte de macromoléculas e também na reciclagem de nucleotídeos regulando as atividades de 5'-nucleotidases e adenilato ciclase (KOMOSZYNSKI & WOJTCZFAK, 1996).

De acordo com as propriedades catalíticas, a família das E-NTPases pode ser dividida em ectonucleotídeo-difosfohidrolase (ecto-ATPDases), que hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatos e ectonucleotídeo-trifosfases (ecto-ATPases), que hidrolisam apenas nucleotídeos trifosfatos (PLESNER, 1995), ambos os membros dessa família são enzimas glicosiladas com pelo menos um domínio transmembrana, contudo alguns membros são proteínas solúveis. A proteína não glicosilada apresenta em torno de 55 kDa, enquanto a glicosilada possui entre 70 a 80 kDa (ZIMMERMANN, 1999). A glicosilação é necessária para a oligomerização das E-NTPases e para a atividade enzimática, que diminui com a remoção do açúcar da molécula (SMITH et al, 1997). Estas enzimas apresentam uma seqüência altamente conservada denominada ACR "região conservada apirase" (HANDA & GUIDOTTI, 1996).

Nem todos os membros da família de E-NTPases são ecto-enzimas. Existem vários membros solúveis destas enzimas (SMITH et al., 1997; HANDA & GUIDOTTI, 1996). As E-NTPases humanas CD39L2 e CD39L4 apresentam algumas características de proteínas solúveis (ZIMMERMANN, 1999). Outras formas solúveis de E-NTPases de mamíferos podem ser excretadas após estimulação da inervação simpática como demonstrado por Todorov et al (1997).

E-NTPases como a purificada de oviduto de galinha pode não sofrer inibição de sua atividade Ca^{2+} ou Mg^{2+} -ATPásica, na presença de inibidores de ATPases de membrana como azida (KNOWLES & NAGY, 1999). Destarte, na presença de triton X-100 as E-NTPases podem não sofrer inibição de sua atividade ATPase (SMITH et al, 1997).

1.5. FRAÇÃO ATPase CARACTERIZADA POR PINHEIRO

Nosso laboratório tem se dedicado à caracterização de ATPases como uma abordagem preliminar para identificar motores moleculares em tecido de mamíferos. Em trabalhos recentes, foi obtida uma fração ATPase, a partir de cérebro de rato, enriquecida de atividade Mg^{2+} -ATPásica (PINHEIRO, 2001). Pinheiro, seguindo procedimentos bioquímicos de purificação como cromatografia, centrifugação e precipitação por sal, obteve uma fração altamente enriquecida em atividade ATPase. Essa fração obtida e caracterizada por Pinheiro (2001) apresentou propriedades distintas de ATPases já conhecidas. Na presença de solução contendo concentração de potássio 60 ou 600 mM, essa fração não apresentou atividade ATPásica, não teve atividade na presença de íons cálcio, bem como não teve sua atividade Mg^{2+} -ATPásica influenciada pela associação de magnésio e cálcio, sugerindo ausência de miosinas. Pinheiro, observou que a presença de fluoreto de alumínio, a partir da adição de fluoreto de sódio 2,5 mM e cloreto de alumínio 0,5 mM, inibiu a atividade Mg^{2+} -ATPásica dessa fração em cerca de 30%, sendo observado igual valor de inibição para vanadato de sódio 1 mM. Na presença de Triton X-100 a 0,2%, a fração ATPase teve sua atividade Mg^{2+} -ATPásica fortemente inibida. Também teve sua atividade ATPásica inibida fortemente pela presença de alta força iônica. Azida 1 mM não inibiu a atividade da fração ATPase. Tais indícios sugerem a ausência de ATPases de membrana e também de ATPases como dineína e cinesina.

A fração analisada por Pinheiro (2001) na presença de outros substratos como GTP, ADP e PP_i não expressou atividade significativa. Nessa fração Pinheiro (2001) verificou a presença de dois polipeptídeos principais, de massa molecular de 160 e 54 kDa, que aparecem fortemente corados em gel SDS-PAGE, os quais foram citados como possíveis responsáveis pela atividade ATPásica.

2. OBJETIVO

Separar e verificar se os dois principais polipeptídeos, P160 e P54, presentes na fração ATPase caracterizada por Pinheiro, são os responsáveis pela atividade ATPásica de nossa fração ATPase.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. REAGENTES

Os reagentes ATP, Trizma-Base, Imidazol, EDTA, sulfato de amônio, inibidores de proteases e DTT foram obtidos da SIGMA. As resinas SP e Q-Sepharose *fast flow* e resina Blue-Sepharose foram obtidas da Pharmacia Biotech. Os demais reagentes usados são de grau analítico.

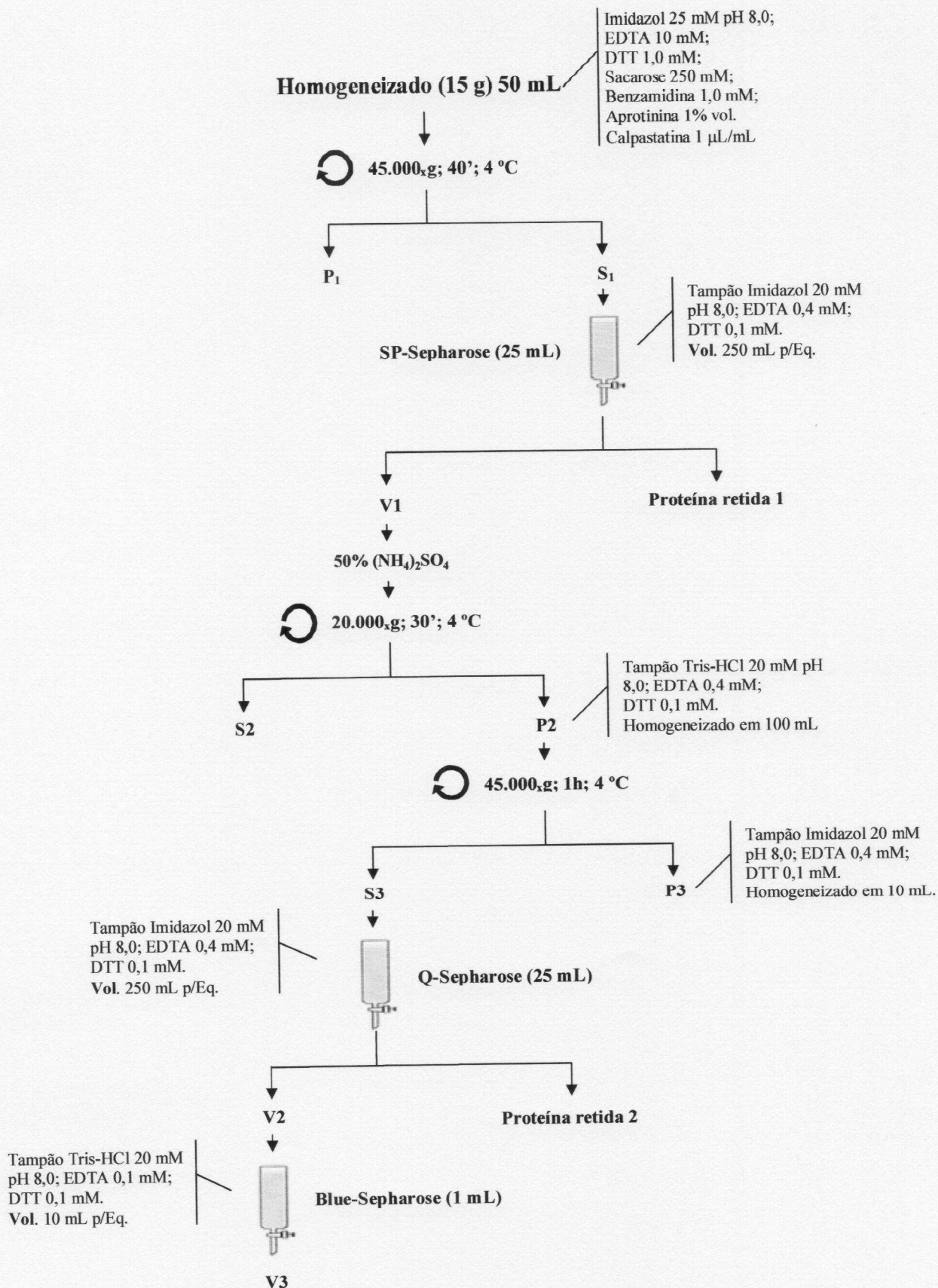
3.2. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ATPase

Seguindo processo semelhante ao descrito por Pinheiro (2000), ratos Wistar adultos foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por decapitação, seus cérebros foram removidos, em seguida lavados em solução de KCl 150 mM, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e conservados a -80°C . Uma concentração de aproximadamente 0,3 g/mL de cérebros foram homogeneizados em tampão de extração (Imidazol 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, Sacarose 250 mM, Benzamidina 1 mM, Aprotinina 1%/vol e Calpastatina $1\mu\text{L/mL}$); usando homogeneizador manual de vidro (PYREX, 40 mL) por um período de aproximadamente 15 min e, em seguida, foi realizada centrifugação a $45.000\times g$, 40', 4°C . A fração precipitada (P1) foi descartada. A fração sobrenadante (S1) foi aplicada em resina SP-Sepharose (25 mL), previamente equilibrada com tampão: Imidazol 20 mM pH 8,0; DTT 0,1 mM e EDTA 0,1 mM; coletando-se a fração "void" (V1).

A fração V1 foi submetida a um processo de precipitação com sulfato de amônio a 50% em banho de gelo; em seguida foi centrifugada a $20.000\times g$, 30', 4°C ; obtendo-se um precipitado (P2) e um sobrenadante (S2), sendo este conservado para análise. P2 foi homogeneizado em 100 mL de tampão (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM e DTT 0,1 mM), em banho de gelo; sendo então centrifugado a $45.000\times g$, 01:00h, 4°C ; obtendo-se um novo precipitado (P3) e um sobrenadante (S3). A fração S3 foi aplicada em resina Q-Sepharose (25 mL), equilibrada previamente com tampão: Tris-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM e DTT 0,1 mM, a baixa temperatura, coletando-se a fração ATPase (V2). Um volume de aproximadamente 4 mL da fração V2 foi aplicado em coluna de Blue-Sepharose, antecipadamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0; DTT 0,1 mM e EDTA 0,1 mM) a temperatura ambiente; coletando-se o "void" (V3).

Após a obtenção de V3, a coluna Blue-Sepharose foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio, com posterior eluição com Imidazol 1M pH 8,0, ou 2,5 M pH 7,2, EDTA 0,1 mM e DTT 0,1 mM. Amostras frações contendo os principais polipeptídeos foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM e DTT 0,1 mM, em um volume de 2 L, por um período de três horas.

FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ATPase DE CÉREBRO DE RATO



3.3. ATIVIDADE ATPásica

A atividade ATPásica foi determinada pela medida do fosfato inorgânico liberado do ATP, quando incubado com a enzima em meio adequado. O fosfato liberado foi dosado pelo método colorimétrico de Heinonen e Lahti (1981). Sendo a reação conduzida em tampão: Imidazol 25 mM pH 7,5; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; KCl 60 mM e MgCl₂ 4 mM.

A reação foi iniciada pela adição de ATP com concentração final de 1 mM, seguida de incubação a 37 °C por um período de aproximadamente 10 minutos. Ao final do respectivo período, a reação colorimétrica foi iniciada com a adição da solução de dosagem AAM (2 volumes de acetona, 1 volume de molibdato de amônio 10 mM e 1 volume de ácido sulfúrico 5 N) e agitada por 15 segundos; sendo interrompida com a adição de 200 µL de ácido cítrico 1 N e agitada por mais 15 segundos. Por vez, os brancos, para cada amostra, foram feitos mediante a incubação da amostra em meio de reação; nos quais o ATP foi adicionado imediatamente antes de iniciar a reação colorimétrica com a solução AAM. Todas as reações foram feitas em duplicatas e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (HITACHI U-2000) a 355 nm na luz visível, utilizando cuvetas de quartzo. Uma curva-padrão de fosfato foi feita compreendendo a faixa de 0 a 200 nmols de fosfato. A concentração de ortofosfato das amostras em *nmols* foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão (Figura 1). Sendo feita uma curva padrão para cada dosagem de fosfato.

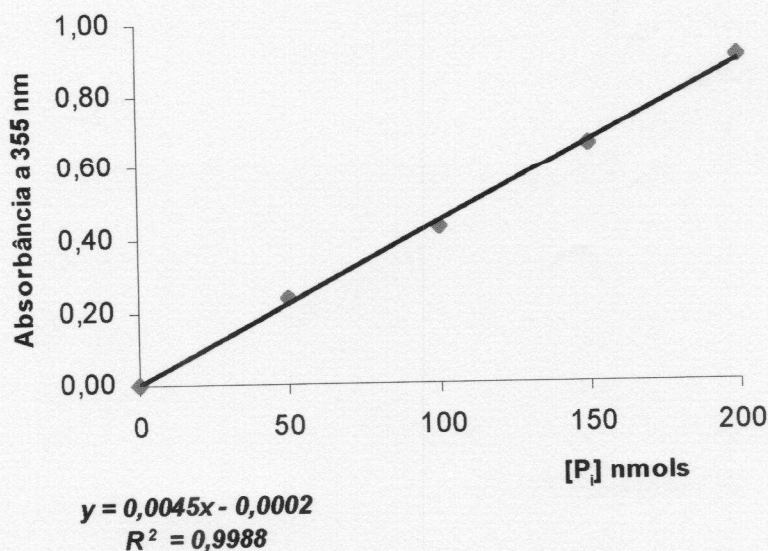


Figura 8. Exemplo de uma curva padrão usada para determinar a concentração de fosfato, com equação e coeficiente de linearidade.

3.4. DOSAGEM DE PROTEÍNA

A determinação da concentração protéica foi feita pelo método de Bradford (1976). 10 µL das frações obtidas durante o preparo da fração ATPase foram adicionados a 90 µL de água Milli-Q em tubos de vidro. A cada tubo foram adicionados 3 mL de solução de Bradford (Comassie blue G-250 0,01 % em etanol 4,7 % e ácido fosfórico 8,5 %). As determinações foram feitas em duplicatas e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 595 nm na luz visível, usando cuvetas de acrílico, sendo lavadas com álcool (80%) e água Milli-Q. Paralelamente à dosagem de proteínas das frações, foi feita uma curva-padrão de soroalbumina bovina, de concentrações compreendidas na faixa de 0 a 30 µg, que corresponde à faixa linear da curva. A concentração de proteínas em mg/mL das amostras foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão. Observando que para cada dosagem de proteína fez-se uma curva padrão.

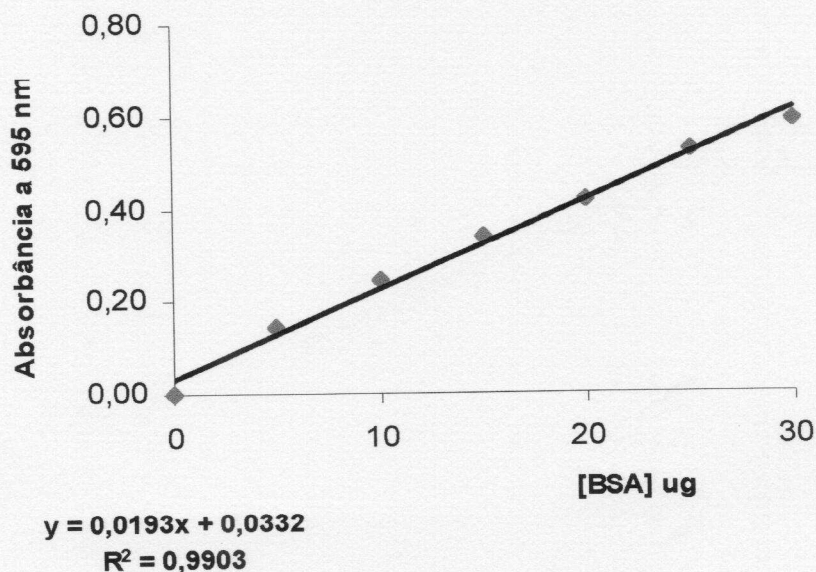


Figura 9. Exemplo de uma curva padrão de BSA, no intervalo linear do método, com equação e coeficiente de linearidade.

3.4.1. Determinação da atividade específica das frações.

A atividade específica foi calculada a partir da densidade óptica das amostras, através da equação:

$$AE = \frac{\text{D.O. amostra} \times \text{nmols de } P_i \text{ do padrão}}{\text{D.O. padrão} \times \text{mg de proteína na reação} \times \text{tempo de reação}}$$

Onde: D.O. = densidade óptica ou absorvância.

A atividade específica foi expressa em nmols de P_i por mg de proteína por unidade de tempo. Sendo a atividade total para cada amostra o produto de sua atividade específica pela quantidade de proteína total da amostra.

3.5. PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE

Os polipeptídeos das frações protéicas foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE); usando o sistema de tampão descontínuo descrito por Laemmli e Favre (1973) e o sistema de placas empregado por Studier (1973).

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi confeccionada em placas de vidro e de cerâmica de dimensões e de 10 x 10 x 0,06 cm. As amostras para SDS-PAGE foram preparadas utilizando 90 μL da fração e 10 μL de solução tampão de amostra (Tris-HCl 187 mM pH 6,8; glicerol 27,6%; SDS 6%; EDTA 6 mM pH 7,5; 2-mercaptoetanol 28,8 mM e bromofenol 0,05g) e, antes de serem aplicadas no gel, foram levadas por dois minutos em água em ebulição.

Todas as frações foram analisadas em gel de poliacrilamida com SDS, sendo que a eletroforese foi executada na cuba *Hoefler Mighty Small II*, usando como tampão eletrodo Tris 25 mM pH 8,3, EDTA 2 mM, glicina 200 mM e SDS 25 mM. As amostras foram aplicadas, nos "poçinhos", usando-se microseringa (Hamilton), em volumes variáveis. Foi usado como padrão de massa molecular SDS6H da SIGMA (cadeia pesada de miosina II 205 kDa, β -galactosidase 116 kDa, fosforilase-b 97 kDa, albumina bovina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa e anidrase carbônica 29 kDa). A cuba foi ligada a uma fonte (Electroforesis Power Supply-EPS-200, Pharmacia Biotech), realizando a eletroforese sob uma corrente elétrica constante de 25 mA a 200 V. Interrompeu-se a eletroforese antes da frente de bromofenol sair na extremidade inferior do gel. Os géis foram corados com solução corante (comassie brilhante blue-R250, metanol 50% e ácido acético 20%). Sendo o excesso de solução corante retirado com solução descorante (água Milli-Q 86%, metanol 5% e ácido acético 9%).

4. RESULTADOS

4.1. Perfil eletroforético dos polipeptídeos

Subseqüente às etapas de fracionamento para a obtenção da fração ATPase, amostras das frações foram aplicadas em SDS-PAGE, a fim de observar o perfil eletroforético dos polipeptídios (Fig. 3), onde verificou-se, além de vários outros polipeptídeos, a presença dos dois principais polipeptídeos de 160 e 54 kDa (setas à direita), cuja fração apresentou alta atividade Mg^{2+} -ATPásica.

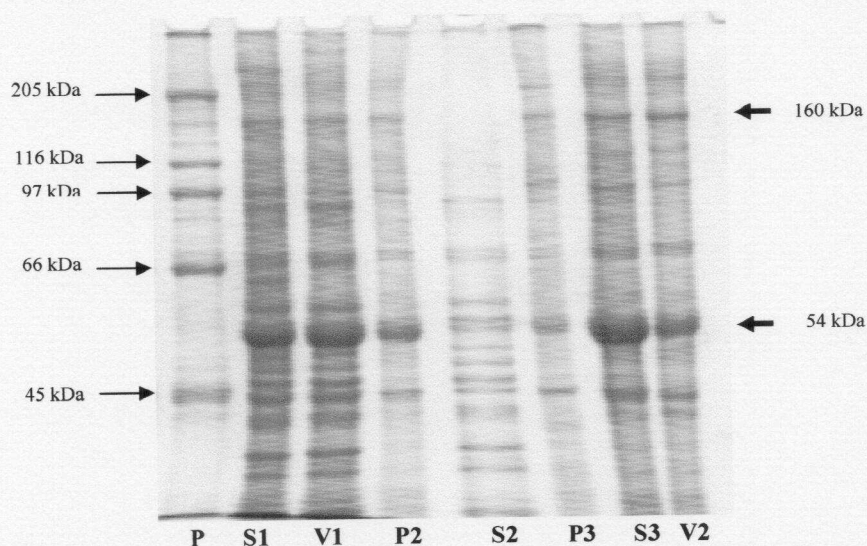


Figura 10. SDS-PAGE da preparação da fração ATPase de cérebro de rato. Foram aplicados: 0,9 μ g de S1; 0,8 μ g de V1; 0,8 μ g de P2; 0,5 μ g de S2; 0,8 μ g de P3; 1,5 μ g de S3; 1,2 μ g de V2. P-Padrão SDS 6H. As setas a direita indicam os polipeptídios de 160 e 54 kDa.

A aplicação de V2 em coluna Blue-Sepharose resultou na completa retenção dos dois principais polipeptídeos, de 160 e 54 kDa, que foram recuperados após eluição da coluna com imidazol em alta concentração. A primeira eluição com imidazol 1 M mostrou em SDS-PAGE a recuperação do polipeptídeo de 160 kDa, que foi designado de E1. Por conseguinte, a eluição com imidazol 2,5 M mostrou a recuperação do polipeptídeo de 54 kDa, o qual foi denominado de E2. A figura 11 mostra perfil eletroforético para as frações V2 aplicada na coluna Blue, a fração “void” (V3), E1 e E2.

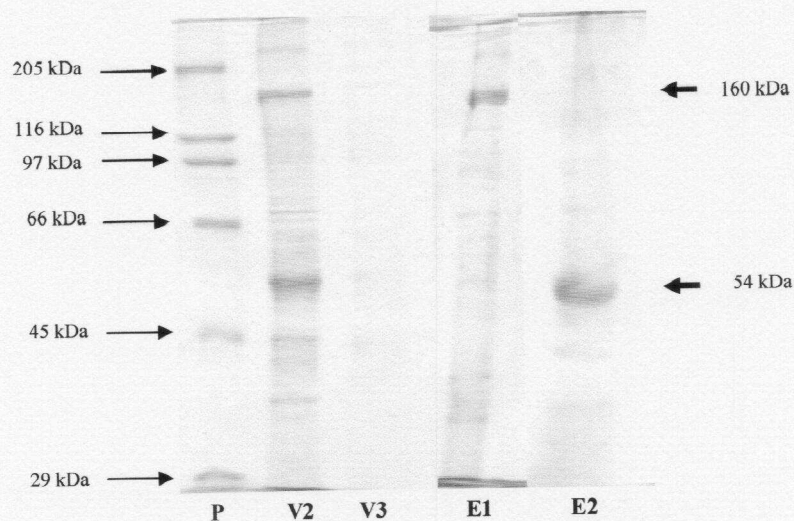


Figura 11. Separação de P160 e P54 em coluna Blue-Sepharose. SDS-PAGE da separação dos polipeptídios de 160 e 54 kDa (setas a direita) em coluna de Blue-Sepharose. Eluição com Imidazol 1 M (E1); eluição com Imidazol 2,5 M (E2). Foram aplicados: 1,2 μg de V2; 0,2 μg de V3; 1,5 μg de E1; 1,6 μg de E2. P-Padrão SDS 6H.

4.3. Atividade Mg^{2+} -ATPásica

A obtenção de E1 e E2, usando coluna Blue-Sepharose, teve como etapa subsequente a determinação da atividade trifosfatásica para verificar a possível relação dos polipeptídeos com a atividade Mg^{2+} -ATPásica. Foram realizados ensaios para V2, V3, E1 e E2. Os resultados foram expressos em termos de atividade Mg^{2+} -ATPásica total, como visto na figura 12.

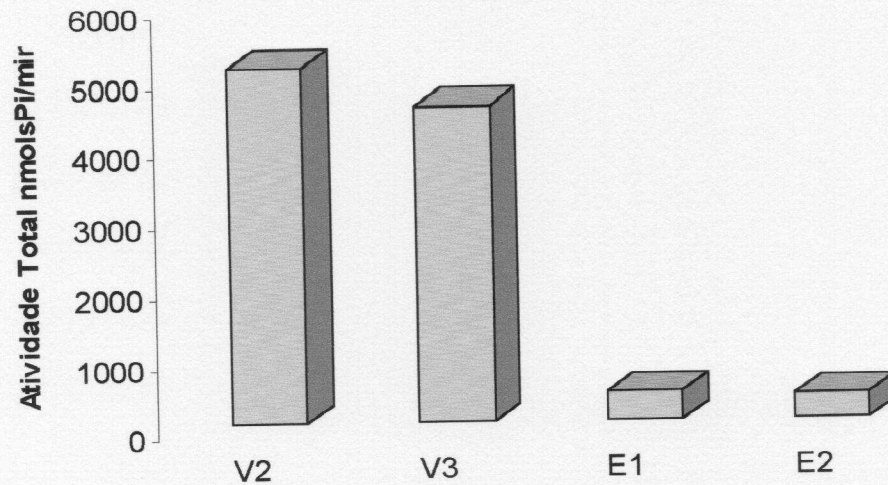


Figura 12. Recuperação da atividade Mg^{2+} -ATPásica Total em coluna de Blue-Sepharose. 50 μ L foram incubados por 10 min a 37°C em meio de reação contendo Imidazol-HCl 25 mM pH 8, EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM. A reação foi iniciada com ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. O P_i liberado foi dosado pelo método Heinonen & Lahti (1981).

4.4. Associação de E1 e E2

Embora, tenha recuperado parte considerável de atividade Mg^{2+} -ATPásica total na fração V3, foi realizado ensaio comparativo das frações E1 e E2 com associação dos mesmos (Fig. 6), tendo como perspectiva a análise da interação dos mesmos. Os resultados obtidos foram expressos em termos de concentração de nmols de P_i .

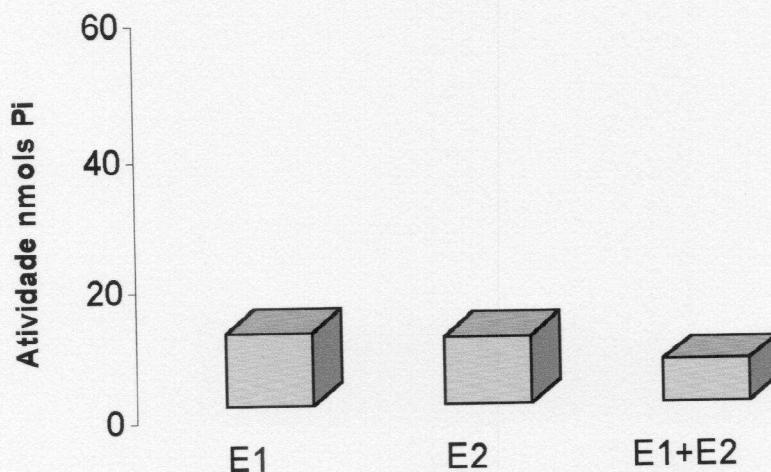


Figura 13. Efeito da associação de frações na Atividade Mg^{2+} -ATPásica, dos eluatos da coluna de Blue-Sepharose. 50 μ L, de cada fração, foram incubados por 10 min. a 37°C em meio de reação contendo Imidazol-HCl 25 mM pH 8, EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM. A reação foi iniciada com ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. O P_i liberado foi dosado pelo método Heinonen & Lahti (1981).

4.4. Efeito de Imidazol na atividade Mg^{2+} da fração V2

As frações E1 e E2 foram obtidas usando altas concentrações de imidazol. Para verificar a interferência de alta concentração de Imidazol na atividade Mg^{2+} -ATPásica da fração V2, foi conduzido ensaio em meio de reação com acréscimo de Imidazol 1M, pH 8,0 e 2 M, pH 7,2 (Fig. 14), notando-se uma inibição considerável da atividade enzimática de V2.

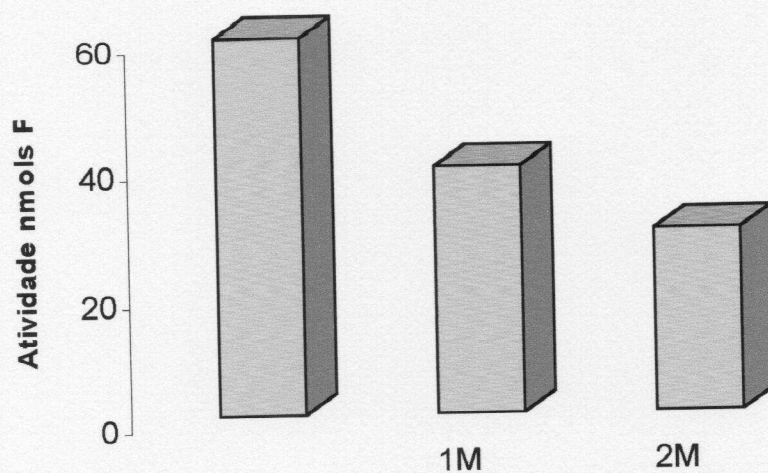


Figura 14. Efeito de Imidazol na atividade Mg^{2+} -ATPásica da fração V2. 50 μL , da fração V2, foram incubados por 10 min a $37^{\circ}C$ em meio de reação contendo Imidazol-HCl 25 mM pH 8, EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 5 mM mais Imidazol 1 ou 2 M, conforme indicado (1M e 2M). A reação foi iniciada com ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. O P_i liberado foi dosado pelo método Heinonen & Latthi (1981).

4.5. Diálise de E1 e E2

Os ensaios para a interferência de alta concentração de imidazol mostraram que a fração V2, a qual apresenta os polipeptídeos de 160 e 54 kDa, foi razoavelmente inibida. Para minimizar o efeito da alta concentração de imidazol nas frações E1 e E2, amostras destes foram dialisadas contra tampão Tris-HCl. A figura 15 mostra atividade Mg^{2+} -ATPásica comparativa de E1 e E2 antes e após diálise.

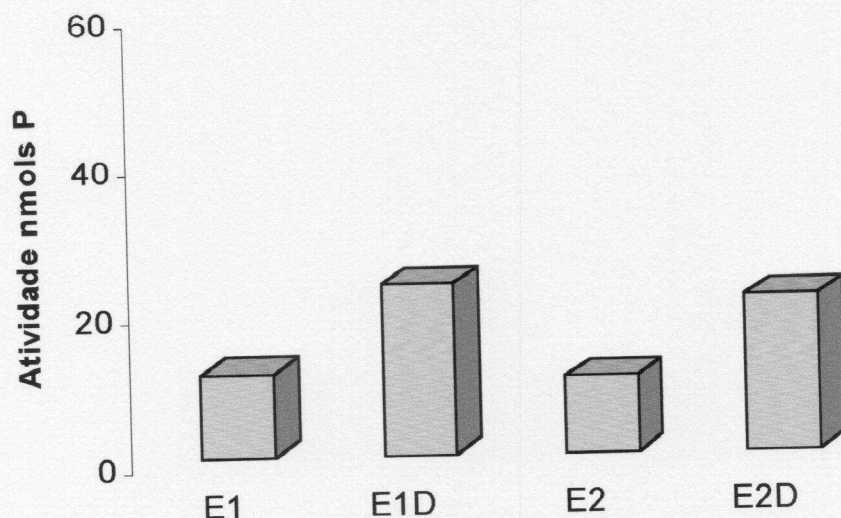


Figura 15. Efeito da diálise na Atividade Mg^{2+} -ATPásica, dos eluatos da coluna de Blue-Sepharose. As frações foram dialisadas por 3 h contra tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM. Onde E1D e E2D são as amostras dialisadas. 50 μ L, de cada fração, foram incubados por 10 min. a 37°C em meio de reação contendo Imidazol-HCl 25 mM pH 8, EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM. A reação foi iniciada com ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. O P_i liberado foi dosado pelo método Heinonen & Lahti (1981).

Uma vez tendo realizado diálise para diminuir a interferência de imidazol nos ensaios de atividade Mg^{2+} -ATPásica de E1 e E2, amostras dos mesmos foram dialisados juntas ou separadas, sendo os dados obtidos apresentados na figura 16.

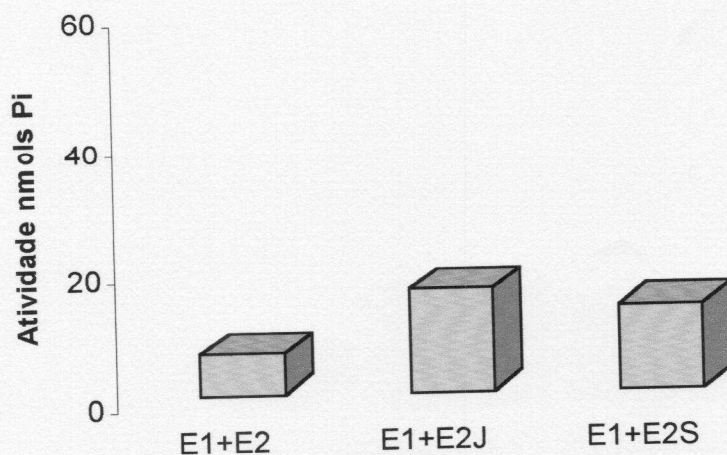


Figura 16. Efeito da diálise na Atividade Mg^{2+} -ATPásica para a associação dos eluatos da coluna de Blue-Sepharose. As frações foram dialisadas por 3 h contra tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM; juntas (J) ou separadas (S) nas mesmas proporções. 50 μ L, de cada fração, foram incubados por 10 min. a 37°C em meio de reação contendo Imidazol-HCl 25 mM pH 8, EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM. A reação foi iniciada com ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. O P_i liberado foi dosado pelo método Heinonen & Lahti (1981).

5. DISCUSSÃO

Usando o protocolo descrito por Pinheiro (2001), obtivemos uma fração ATPase (V2) com um perfil em gel SDS-PAGE semelhante à fração ATPase “flow through” de Q-Sepharose (FT/Q) obtida por Pinheiro. A fração V2, em SDS-PAGE, mostrou a presença de vários polipeptídeos, inclusive os dois principais polipeptídeos de 160 e 54 kDa densamente corados (Fig. 10), assim como foi observado por Pinheiro em sua fração ATPase. V2 também apresentou uma atividade Mg^{2+} -ATPásica específica próxima ao valor obtido para a fração FT/Q.

A aplicação de V2 em coluna de Blue-Sepharose mostrou a retenção dos dois principais polipeptídeos, que aparecem densamente corados em SDS-PAGE e que foram citados como possíveis responsáveis pela atividade Mg^{2+} -ATPásica da fração por ela estudada. Os mesmos foram recuperados mediante o uso de alta concentração de imidazol (Fig. 11). A fração E1 eluída com imidazol 1 M, contendo o polipeptídeo de 160 kDa mostrou ausência do polipeptídeo de 54 kDa, que apareceu isolado na fração E2 eluída com imidazol 2,5 M, e também livre da presença do polipeptídeo de 160 kDa (Fig. 11), mostrando uma nítida separação dos dois polipeptídeos com o uso de coluna Blue-Sepharose. Nos ensaios para E1 e E2 não foi detectada atividade Mg^{2+} -ATPásica relacionado com a presença desses polipeptídeos.

A determinação da atividade total foi utilizada como um dado comparativo da retenção da atividade ATPase presente na fração aplicada (V2) e a atividade recuperada na fração V3. Notou-se que a atividade ATPásica total, da fração ATPase investigada, permaneceu quase que inteiramente na fração V3, com recuperação de cerca de 90% da atividade Mg^{2+} -ATPásica (Fig. 12). E como visto na figura 11, na fração V3 não foi detectada a presença dos polipeptídeos de 160 e 54 kDa. O fato de ter ocorrido recuperação de uma fração considerável da atividade total da fração V2 em V3, não implica em ausência de atividade em E1 ou E2,

visto que a fração V2 consistia de uma fração contendo vários outros polipeptídeos que aparecem fracamente corados em gel.

A ausência de atividade ATPásica pelos polipeptídeos poderia estar ocorrendo por necessitar de suas interações para expressão de atividade ATPásica como sugeriu Pinheiro (2001). Com a perspectiva de que a ausência de atividade ATPásica, para os polipeptídeos, estivesse ocorrendo devido a necessidade de interação dos mesmos para expressão de atividade, foi conduzido ensaio com associação das frações E1 e E2 para observar o efeito da interação dos polipeptídeos (Fig. 13). A associação das frações mostrou ser insuficiente no restabelecimento de alguma atividade ATPásica e, quando confrontados com a condição de não associação, observou-se uma atividade menor para a associação de E1 e E2.

As elevadas concentrações de imidazol sob as quais os polipeptídeos foram recuperados poderiam estar influenciando na expressão de atividade. Tal suposição, levou-nos a condução de ensaio para verificar a influência de alta concentração de imidazol na atividade Mg^{2+} -ATPásica da fração V2. Foi conduzido ensaio (Fig. 14), usando imidazol nas concentrações de 1 ou 2 M. Os resultados, para o efeito de imidazol na fração V2, mostraram perda de atividade enzimática em meio à alta concentração de Imidazol, com uma redução de cerca de 40% da atividade para 1 M de imidazol e cerca de 60% para 2M.

Na tentativa de minimizar o efeito de alta concentração de imidazol nas frações E1 e E2, foi realizada diálise com amostras de E1 e E2 isolados ou associados. Os ensaios de atividade Mg^{2+} -ATPásica mostraram ser a diálise insuficiente no restabelecimento de atividade ATPásica pelos polipeptídeos, P160 e P54, embora tenha sido possível observar um leve aumento nos valores das atividades dos polipeptídeos após diálise, em comparação com a condição de não dialisados (Fig. 15). Visto também que E1 e E2 dialisados juntos, ou a associação de E1 e E2 após diálise, expressaram valores menores de atividade.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem fortemente que os polipeptídeos de 160 e 54 kDa não são os responsáveis pela atividade ATPásica da fração ATPase caracterizada por Pinheiro (2001).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.
- CHENEY, R. E. & MOOSEKER, M. S. Unconventional myosins. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 4, p. 27-35. 1992.
- CLARKE, M.; SPUDICK, J. A. Nonmuscle contractile proteins: the role of Actin and Myosin in cell motility and shape determination. **Ann. Review Biochemistry**, v. 46, p. 797-822, 1977.
- COHN, S. A.; INGOLD, A. L.; SCHOLEY, J. M. Correlation between the ATPase and microtubule translocation activities of sea urchin egg kinesin. **Nature**, v. 328, p. 160-63, 1987.
- COLLINS, J. H. & BORYSENKO, C. W. The 110.000-dalton actin-and calmodulin-binding protein from intestinal brush border is a myosin-like ATPase. **J. Biol. Chem.** v. 259, p. 14128-135, 1984.
- COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem molecular**. Tradução: Junior, I. S. V. et al. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 712 p.
- COZELMAN, K. A. & MOOSEKER, M. S. The 110-kD protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an actin-activated MgATPase. **J. Cell. Biol.**, v. 105, p. 313-24 1987.
- COTE, G. P. et. al. Purification from *Dictyostelium discoideum* of a low-molecular-weight myosin that resembles myosin I from *Acanthamoeba castellanii*. **J. Biol. Chem.** v. 260, p. 4543-46, 1985.

¹ Referências segundo a NBR 6023, 2002.

COY, D. L.; HANCOCK, W. O.; WAGENBACH, M.; HOWARD, J. Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. **Nat. Cell. Biol.**, v. 1, p. 288-92 1999.

ENDOWS, A.; TITUS, M. A. Genetic approaches to molecular molecular motors. **Ann. Rev. Inc.**, v. 8, p. 29-65, 1992.

ESPINDOLA, F. S. et al. Biochemical and imunological characterization of P190-calmodulin complex from vertebrate brian: a novel calmodulin-binding myosin. **J. Cell. Biol.**, v. 118, p. 360-68, 1992.

ESPREADICO, E. M. et al, Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains **J. Cell. Biol.**, v. 119, p. 1541-57, 1992.

FAÇANHA, A. R. & OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L. Inhibition of phosphate uptake in corn roots by aluminum-fluoride complexes. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1763-72, 2002.

GIBBONS, I. R. Chemical dissection of the cilia. **Arch Biol (Liège)**, v. 76, p. 317-52, 1965.

GIBBONS, I. R. & FRONK, E. A latent adenosine triphosphatase form of dynein 1 from sea urchin sperm flagella. **J. Biol. Chem.** v. 254, p. 187-96, 1979.

GOODSON, H. V. & SPUDICH, J. A. Molecular evolution of the myosin family: relationships derived from comparisons of amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 659-63, 1993.

GOLDSTEIN, L. S. B. The kinesin superfamily: tails of functional redundancy. **Trend. Cell. Biol.** v. 1, p. 93-8, 1991.

HAMMER, J. A. Novel myosins. **Trend. Cell. Biol.** v. 1, p. 50-6, 1991.

HANDA, M. & GUIDOTTI, G. Purification and cloning of soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 218, p. 916-23, 1996.

HARA, M. et al. Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. **J. Invest. Dermatol.** v. 114, p. 438-43, 2000.

HASSON, T. & MOOSEKER, M. S. Vertebrate unconventional myosins. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 16431-434, 1996.

HASSON, T. & MOOSEKER, M. S. The growing family of myosin motors and their role neurons and sensory cells. **Curr. Opin. Neurobiol.** v. 7, p. 615-23, 1997.

HEINONEN, JK. LAITTI, RJ. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry**, v. 113, p. 313-17, 1981.

HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**, v. 279, p. 519-26, 1998.

HOMMA, K.; SAITO, J. IKEBE, R. IKEBE, M. Ca^{2+} -dependent regulation of the motor activity of myosin V. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 31766-71, 2000.

HOLZBAUR, E. L. & VALLEE, R. B. Dyneins: molecular structure and cellular function. **Annu. Rev. Cell Biol.** v. 10, p. 339-72, 1994.

KACHAR, B. et al. Extensive purification from *Acanthamoeba castellanii* of a microtubule-activated Mg^{2+} -ATPase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 16180-85, 1987.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD 39/vascular ATP diphosphohydrolase. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 33116-22, 1996.

KEGEL, B. et al. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 1189-1200, 1997.

KNOWLES, A. F. & NAGY, A. K. Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. **Eur. J. Biochem.** v. 262, p. 349-57, 1999.

KOMOSZYNSKI, M; WOJTCZFAK, A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, E.C.3.6.1.5): function and relationship to ATPases. **Biochem Biophys Acta**, v. 1310, p. 233-41, 1996.

KORN, E. D. & HAMMER, J. A. Myosins of nonmuscle cells. **Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.**, v. 17, p. 23-45, 1988.

LANGFORD, G. M.; MOLYNEUAUX, B. J. Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defectes. **Brain Reser. Rev.** v. 28, p. 1-8, 1998.

LAEMMLI, U. K. & FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. **J. Mol. Biol.** v. 80, p. 575-99, 1973

LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T. Na⁺/K⁺-ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 19659-62, 1994.

MERMALL, V.; POST, P. L; MOOSEKER, M. S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. **Science**, v. 279, p. 527-33, 1998.

MOOSEKER, M. A multitude of myosins. **Curr. Biol.** v. 3, p. 245-48, 1993.

PASCHAL, B. M. & VALLEE, R. B. Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. **Nature**, v. 330, p. 181-83, 1987.

PASCHAL, B. M; SHPETENER, H. S.; VALLEE, R. B. MAP 1C is a microtubule-activated protein which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. **J. Cell. Biol.**, v. 105, p. 1273-82, 1987.

PINHEIRO, C. M. **Caracterização parcial de uma ATPase de citosol de encéfalo de rato.** 2001. 69 f. Dissertação (mestrado em Genética e Bioquímica). Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **Int. Rev. Cytol.** v. 158, p. 4682-90, 1995.

POLLARD, T. D. & KORN, E. D. *Acanthamoeba* myosin. **J. Biol. Chem.**, v. 248, p. 4682-90, 1973.

SABLIN, E. P. Kinesins and microtubules: their structures and motor mechanisms. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, p. 35-41, 2000.

SCHLIWA, M. & WOHLKE, G. Molecular motors. **Nature**, v. 422, p. 759-65, 2003.

SELLERS, R. J. Myosins: a diverse superfamily. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1496, p. 03-22, 2000.

SHPETNER, H. S.; PASCHAL, B. M.; VALLEE, R. B. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). **J. Cell. Biol.**, v. 107, p. 1001-9, 1988.

SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L.; HENNESSEY, T. M. A soluble ecto-ATPase from *Tetrahymena thermophila*: purification and similarity to the membrane-bound ecto-ATPase of smooth muscle. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 337, p. 351-59, 1997.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabgels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-48, 1973.

THOMPSON, R. F. & LANGFORD, G. M. Myosin superfamily evolutionary history. **Anatomical Record**, v. 268, p. 276-89, 2002.

TODOROV, L. D. et al. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. **Nature**, v. 387, p. 76-9, 1997.

TROULLIER, A. et al. Fluoroaluminate complexes are bifunctional analogues of phosphate in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22821-29, 1992.

VALE, R. D.; REESE, T. S. SHEETZ, M. P. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. **Cell**, v. 42, p. 39-50, 1985.

VALE, R. D. Intracellular transport using microtubule-based motors. **Ann. Rev. Cell Biol.** v.3 , p. 347-78, 1987.

_____. Millennial musings on molecular motors. **Trends Cell Biol**, v. 9, p. M38-M42, 1999.

_____. The molecular motor toolbox for intracellular transport. **Cell**, v. 112, p. 467-80, 2003.

VALLEE, R. B.; WALL, J. S.; PAXCHAL, B. M.; SHPETENER, H. S. Microtubule associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. **Nature**, v. 332, p. 561-63, 1988.

WOO, A. L., JAMES, P. F., LINGREL, J. B. Characterization of the fourth α isoform of the Na^+/K^+ -ATPase. **J. Membrane Biol.**, v. 169, p. 34-44, 1999.

WU, J. SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. **Mol. Cell. Biol.** v. 20, p. 23-33, 2000.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structure, catalytic properties and a search for function. **Trends Pharmacol Sci**, v. 20, p. 231-36, 1999.

