



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

**Caracterização de Fração ATPase de Glândula  
Parótida de Rato**

**Gabriel Costa Nunes da Cruz**

UBERLÂNDIA – MG  
JUNHO DE 2004

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

**Caracterização de Fração ATPase de Glândula  
Parótida de Rato**

Gabriel Costa Nunes da Cruz

Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para a  
obtenção do grau de bacharel em Ciências  
Biológicas.

UBERLÂNDIA – MG  
JUNHO DE 2004

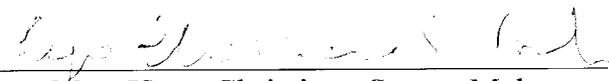
## Caracterização de Fração ATPase de Glândula Parótida de Rato

Aprovado pela banca examinadora em 28/06/2004

Nota 1000

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Milton Vieira Coelho  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fábio de Oliveira  
(Conselheiro)

  
\_\_\_\_\_  
Msc. Hugo Christiano Soares Melo  
(Conselheiro)

Uberlândia, 28 de junho de 2004.

*Aos meus pais, Jasmir Nunes  
da Cruz e Maria Olinda Costa  
Nunes, pelo total apoio,  
incentivo, educação e tudo que  
me proporcionaram na  
realização do meu trabalho.  
Ao mestre, Prof. Dr. Milton  
Vieira Coelho, pela  
orientação, paciência,  
dedicação e conhecimentos  
oferecidos, que foram de  
fundamental importância na  
realização desse trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, seus docentes e funcionários, pelo contínuo esforço no desenvolvimento de pesquisa e da ciência.

Aos amigos de laboratório, Decivaldo (Vicentim), Rogério, Vinícius, Hugo, Ademilton e Dona Maura, pela amizade e apoio de sempre.

Aos grandes amigos, Leonardo, André (Andrezão), Rodrigo Volpi, Paulo Emílio, Alexandre, Ulisses (Tim), Carlos André (Simpatko), Fernando, Juliana, Lívia, Karine, Cynthia, Cynara, Helise, Lilian, Kelly, Maria Clara, Mariana, Leonora, e ao meu irmão Lucas.

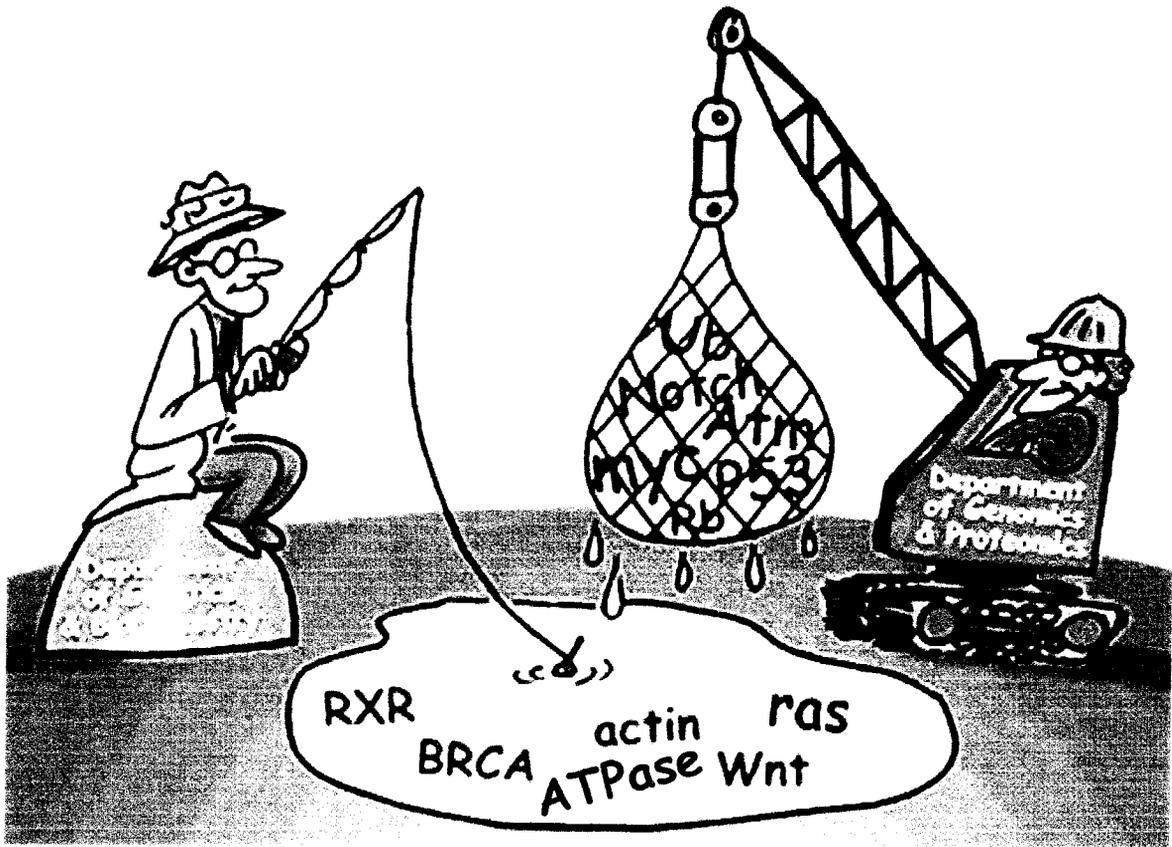
A todos os professores do Curso de Ciências Biológicas, pelo conhecimento passado que permitiram a formação acadêmica e a iniciação científica, imprescindíveis para a realização desse trabalho.

A todos os amigos de faculdade e instituto, grandes companheiros nestes anos de formação.

À Vallée, por ter gentilmente fornecido os animais para a realização deste estudo.

À natureza, por sua perfeição e seus mistérios.

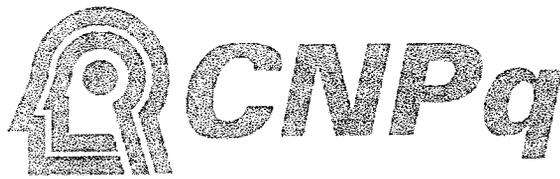
HUMOR



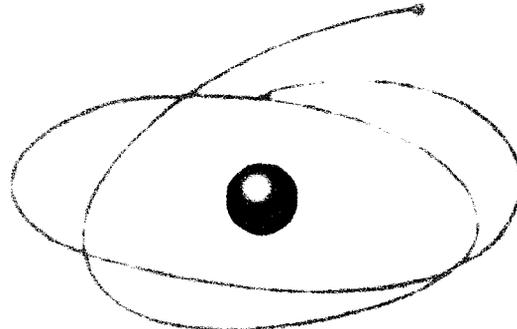
APOIO

**FAPEMIG**

Fundação de Amparo à Pesquisa do  
Estado de Minas Gerais



*Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico*



C A P E S



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
BSA	Soro albumina bovina
CaM	Calmodulina
CTP	Citidina 5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Etileno glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter) N,N,N',N'-ácido tetracético
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
kDa	Kilodaltons
P <sub>i</sub>	Ortofosfato inorgânico
PP <sub>i</sub>	Pirofosfato
SDS	Dodecil sulfato de sódio (Lauril sulfato)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
Tris (Trizma-base)	Tris(hidroximetil)aminometano
TTP	Timidina 5'-trifosfato
UTP	Uridina 5'-trifosfato

## RESUMO

ATPases são enzimas que hidrolisam o ATP, liberando energia para realização de diversos trabalhos celulares. Buscamos caracterizar uma fração enriquecida em atividade ATPásica obtida de glândula parótida de rato. O homogeneizado de glândulas foi centrifugado a 40.000g/40' e o sobrenadante congelado a -20 °C. Após descongelamento, a fração foi novamente centrifugada nas mesmas condições, sendo o precipitado resultante homogeneizado em tampão contendo NaCl 0,5 M e centrifugado nessas condições. A fração precipitada apresentou alta atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica (fração ATPase). Verificamos em gel SDS-PAGE dois polipeptídeos principais, um com ~205 kDa e outro de ~45 kDa. Nossa fração apresentou uma baixa atividade  $K^+$ /EDTA-ATPásica e atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica similar à  $Mg^{2+}$ -ATPásica. Não foi observada estimulação por  $Ca^{2+}$  nem por  $Ca^{2+}$ /Calmodulina. Inibidores de ATPases como vanadato, fluoreto de alumínio e azida não apresentaram substancial alteração na atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica da fração. Contudo, Triton X-100 inibiu totalmente a atividade de nossa fração ATPase. Verificamos que a fração hidrolisa tanto ATP quanto GTP e possui atividade ADPásica cerca de metade da ATPásica. Esses resultados sugerem a ausência de miosinas, cinesinas e dineínas, podendo tratar-se de uma E-ATPase.

**Palavras-chave:** ATPase, parótida, rato

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
Introdução	4
1.1. Miosinas	9
1.2. Cinesinas	11
1.3. Dineínas	13
1.4. E-NTPases	14
1.5. Estudos preliminares	14
1.6. Objetivo	
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	15
Material e Métodos	15
2.1. Reagentes	15
2.2. Preparação da fração ATPase	16
2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	17
2.4. Dosagem de proteínas	17
2.5. Determinação da atividade adenosina trifosfatásica	
<b>3. RESULTADOS</b>	19
Resultados	19
3.1. Preparação da fração ATPase	22
3.2. Atividade K <sup>+</sup> /EDTA-ATPásica	23
3.3. Atividade Mg <sup>2+</sup> -ATPásica e Ca <sup>2+</sup> -ATPásica	24
3.4. Efeito de Cálcio e Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina na Atividade Mg <sup>2+</sup> -ATPásica	25
3.5. Efeito de Vanadato de Sódio sobre a Atividade Mg <sup>2+</sup> -ATPásica	26
3.6. Efeito de Fluoreto de Alumínio na Atividade Mg <sup>2+</sup> -ATPásica	27
3.7. Efeito de Triton X-100 e Azida Sódica sobre a Atividade Mg <sup>2+</sup> -ATPásica	28
3.8. Especificidade de Substrato	
<b>4. DISCUSSÃO</b>	30
Discussão	
<b>5. CONCLUSÃO</b>	35
Conclusão	
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	36
Referências bibliográficas	

## 1. INTRODUÇÃO

Energia é um fator fundamental para o desenvolvimento e manutenção da vida. A vida celular depende de movimento, trabalho realizado devido ao dispêndio de energia armazenada em moléculas como a de adenosina trifosfato (ATP). Enzimas que hidrolisam o fosfato terminal ( $\gamma$ ) da molécula de ATP e usam a energia liberada nesse processo para a realização de trabalho celular são denominadas ATPases. A contração muscular, o batimento de cílios e flagelos, o transporte de organelas e de vesículas, emissão de pseudópodes em amebas, fagocitose, migração de cromossomos na divisão celular e citocinese são alguns exemplos do papel desempenhado pelas ATPases celulares (CLARKE & SPUDICK, 1977; ENDOW & TITUS, 1992; HIROKAWA, 1998; KARCHER et al., 2002).

Além das ATPases, há outras proteínas fundamentais na motilidade celular. Diversos tipos de filamentos de proteínas formam uma malha tridimensional que se estende pelo citoplasma da célula, visível ao microscópio eletrônico, o citoesqueleto, que corresponde aos trilhos por onde as cargas são transportadas. Estes filamentos citoplasmáticos são de três tipos: microfilamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários, que se diferem em espessura (de 6 a 22 nm), composição e função, porém todos promovem estruturação e organização do citoplasma e modelam a célula. Os microfilamentos de actina (de 6 a 7 nm de

diâmetro) são formados pela polimerização de monômeros de actina, uma proteína globular de aproximadamente 43 kDa, enquanto que os microtúbulos (~22 nm de diâmetro) são polímeros de tubulinas  $\alpha$  e  $\beta$ , que possuem cerca de 54 kDa. Os filamentos intermediários apresentam diâmetros intermediários (de 8 a 10 nm) entre filamentos de actina e microtúbulos, e são formados por diferentes tipos de proteínas monoméricas. Todos estes filamentos não são estruturas permanentes, sofrendo constantes desmontagens nas suas subunidades monoméricas e novas reorganizações em filamentos, assim como sua localização celular também não é fixa (NELSON & COX, 2000).

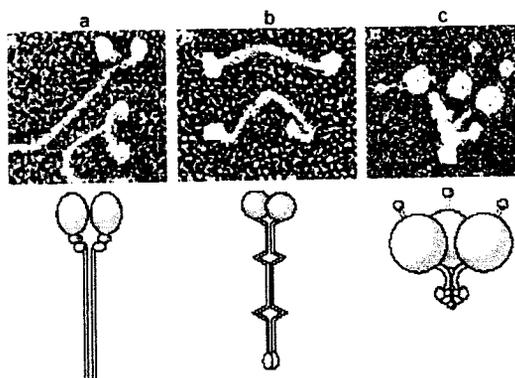
A miosina II de músculo (miosina convencional) acopla a quebra do ATP ao processo de contração muscular através da interação com filamentos de actina (HUXLEY, 1969). Outras enzimas como cinesina e dineína acoplam a quebra do ATP aos processos de transporte de vesículas no interior celular, através da interação com microtúbulos, bem como a movimentação de cílios e flagelos (HIROKAWA, 1998; VALE, 1999; VALE, 2003, SCHLIWA & WOHLKE, 2003). A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase que é uma proteína integral de membrana utiliza a energia da hidrólise para o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana celular (LINGREL & KUNTZWELER, 1994; WOO et al., 1999).

Um outro grupo de enzimas hidrolisam tanto o fosfato  $\gamma$  como o  $\beta$  do ATP, mas elas não usam a energia liberada para realizar trabalho. Essas enzimas são referidas como E-NTPases e apresentam distribuição ubíqua em seres eucariotos (PLESNER, 1995). Segundo Komoszynski e Wojtczak (1996), estas 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. A maior parte das E-NTPases identificadas até o momento também são proteínas integrais de membrana, mas parece que alguns membros desse grupo de enzimas são solúveis (ZIMMERMANN, 1999).

ATP difosfohidrolase (apirase, ATPDase) é uma enzima que catalisa a conversão de nucleotídeos di e trifosfatos a monofosfato e fosfato inorgânico na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  (WINK et al., 2000). Todavia, a purificação das E-NTPases é dificultada pela sua co-purificação com outras proteínas, inibição da atividade enzimática por detergentes que normalmente solubilizam proteínas ligadas à membrana, como Triton X-100, sua baixa concentração, além da falta de especificidade de substrato e cátions bivalentes (PLESNER, 1995).

Miosina, cinesina e dineína, constituem a principal família de enzimas denominadas de motores moleculares, sendo as principais ATPases solúveis (MERMALL et al., 1998;

HIROKAWA, 1998; VALE, 1999). Atualmente são conhecidas 18 classes de miosinas, dez diferentes classes de cinesinas e duas classes de dineínas (SCHLIWA & WOHLKE, 2003). Os motores moleculares, assim como outras ATPases, requerem cátions bivalentes para sua atividade. Existem enzimas que utilizam o íon cálcio para sua atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica e outras o íon magnésio para atividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica. As miosinas têm a característica própria de exibir, além destas, uma alta atividade na presença de KCl (0,6 M) e ausência de cátions bivalentes (atividade  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPásica) (POLLARD, 1982). A Figura 1 ilustra exemplos de membros comuns da família dos motores moleculares.



**Figura 1:** Representação dos principais motores moleculares. **a.** Miosina II; **b.** Cinesina convencional; **c.** Dineína ciliar. As ilustrações acima mostram micrografias eletrônicas de alta resolução. Domínios motores estão em amarelo, proteínas associadas em marrom e domínios espiralados estão representados por linhas pretas paralelas (extraído de Schliwa & Woehlke, 2003).

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, presentes tanto na membrana plasmática como em sistemas membranosos intracelulares, estão envolvidas na regulação intracelular de cálcio (MARÍN et al., 1999; CARAFOLI, 2002).  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática é constituída por uma única cadeia polipeptídica de ~134 kDa, com domínio de ligação à calmodulina na extremidade C-terminal (CARAFOLI, 1997).

O complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina estimula a atividade de ATPases como miosinas (I e V) e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (ESPÍNDOLA et al., 1992).

Existem alguns agentes como o vanadato, azida, alta força iônica, fluoreto de alumínio e Triton que podem inibir diferentemente estes tipos de atividade, o que pode servir de apoio para a caracterização de ATPases quanto aos diversos tipos.

Estas enzimas comumente utilizam o ATP como substrato, mas outros nucleotídeos trifosfato como o GTP, TTP, UTP, CTP também podem ser hidrolisados. Por exemplo, as

cinesinas e dineínas axonemais utilizam preferencialmente o ATP, já a dineína citoplasmática hidrolisa mais o GTP, TTP, UTP, CTP e enquanto as dinaminas hidrolisam especificamente o GTP. A dinamina é uma GTPase envolvida em processos de endocitose mediadas por clatrina e reciclagem de vesículas sinápticas (SCHMID et al., 1998). As dinaminas possuem propriedades mecanoquímicas utilizadas para “tubular” e separar membranas, e têm sido implicadas em muitos processos envolvendo actina-membrana. Possuem um domínio GTPase amino-terminal, um domínio PH (pleckstrin homology) que liga lipídios fosfatidilinositol, o qual promove a ligação com membranas, e um domínio carboxi-terminal rico em prolina/arginina (PRD) que direciona a ligação aos domínios SH3 (Src homology-3) de muitas proteínas associadas com actina (ORTH & MCNIVEN, 2003).

A  $F_1F_0$ -ATP sintase sintetiza ATP a partir de ADP e fosfato, utilizando um gradiente eletroquímico transmembrânico (BOYER, 1997). É constituída por dois complexos protéicos:  $F_0$  integrado à membrana e um complexo  $F_1$  ligado a ele. Sendo que o complexo  $F_1$  quando isolado do  $F_0$ , age exclusivamente hidrolisando o ATP, uma ATPase tipo F (REYNAFARJE & PEDERSEN, 1996; WEBER & SENIOR, 1997).

## 1.1. MIOSINAS

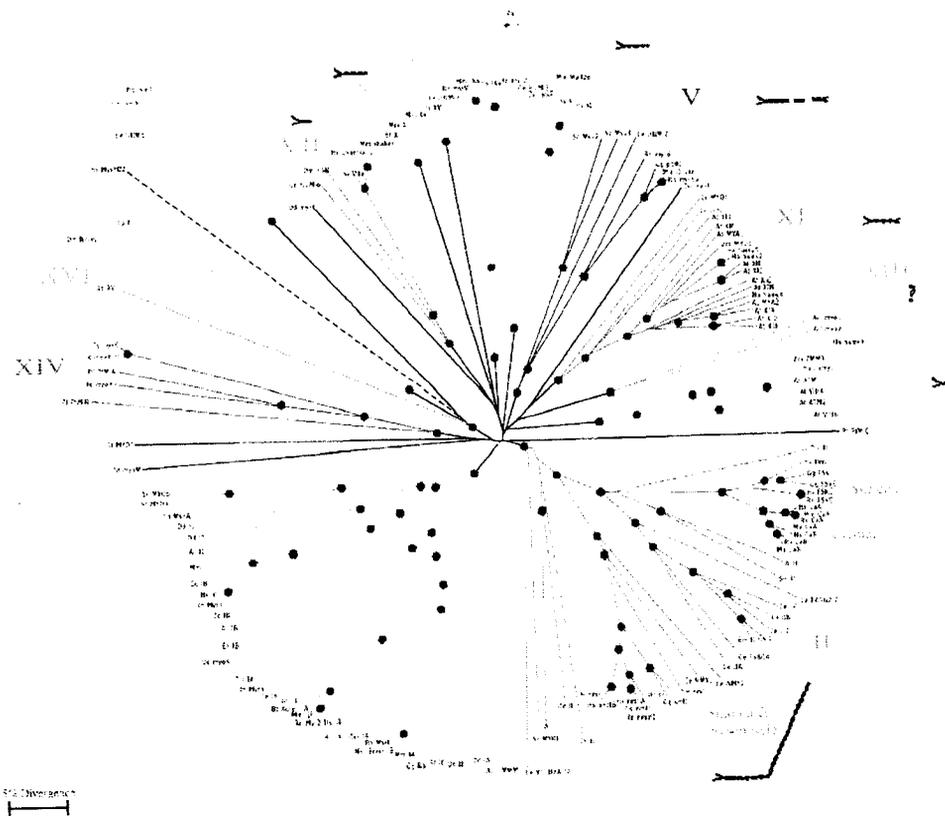
Miosinas constituem uma superfamília de proteínas motoras que se movimentam sobre filamentos de actina através da hidrólise do ATP, e desta maneira elas constituem um conjunto crítico nos processos de contração e motilidade celular (HOMMA et al., 2000). Os filamentos de actina, que fazem parte do citoesqueleto, 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, assim como a miosina IIA e a miosina IIB, expressas em cérebro de vertebrados (SIMONS et al., 1991). 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 (ESPREAFIGO et al., 1992; MOOSEKER, 1993).

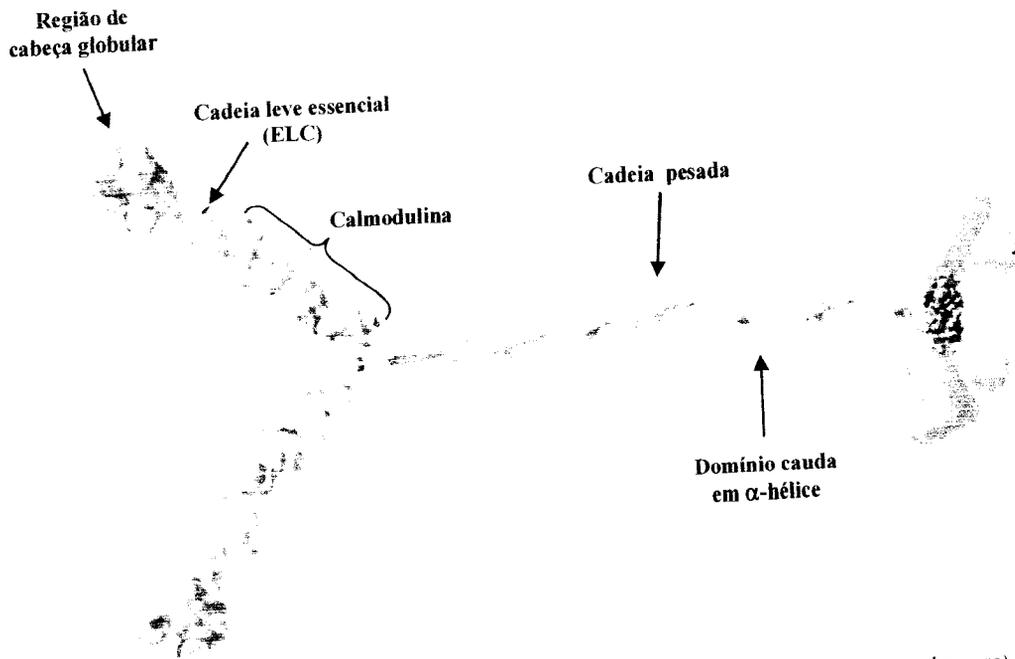
Durante as últimas décadas tem sido encontradas inúmeras proteínas com características de miosinas, por vez as miosinas estão, atualmente, sistematizadas em 18 classes, baseadas em análises filogenéticas de seqüências de domínio cabeça localizada na porção amino terminal do polipeptídeo (CHENEY & MOOSEKER, 1992; HASSON & MOOSEKER, 1996; THOMPSON & LANGFORD, 2002). A Figura 2 mostra as diferentes classes de miosinas atualmente conhecidas. Algumas dessas ATPases já se encontram bioquimicamente bem caracterizadas como as miosinas I, II, V e VI (HASSON & MOOSEKER, 1996; SELLERS, 2000).

A primeira proteína motora a ser descoberta nesta família foi a miosina de músculo, também denominada miosina da classe II ou miosina convencional. Os membros dessa classe são enzimas hexaméricas compostas por duas cadeias pesadas de massa entre 171 e 244 kDa e dois pares de cadeias leves (SELLERS, 2000). As miosinas são enzimas que se caracterizam por apresentarem três subdomínios funcionais: um domínio N-terminal globular (denominado cabeça, ou domínio motor), que pode ligar-se à actina, hidrolisar o ATP e translocar-se ao longo deste filamento; um domínio pescoço (ou regulatório), que se constitui de uma seqüência ligante de cadeias leves ou calmodulina, formando os motivos IQ, e por último uma região C-terminal (domínio cauda) disposto em  $\alpha$ -hélice (CHENEY & MOOSEKER, 1992; SELLERS, 2000). O domínio cauda da miosina II tem capacidade de interagir com caudas de outras moléculas de miosinas para formar filamentos bipolares (SELLERS, 2000).



**Figura 2:** Árvore filogenética baseada no alinhamento de 139 membros da superfamília das miosinas (extraído de Hodge & Cope, 2000).

Os motivos IQ, localizados entre o domínio motor e o domínio cauda, servem como sítio ligante de calmodulina nas miosinas não convencionais de vertebrados. Esses podem variar de zero a seis nas diferentes classes de miosinas (HASSON & MOOSEKER, 1996; SELLERS, 2000). A região C-terminal, que é específica para cada classe de miosina (MERMALL et al., 1998), pode atuar como “âncora” para o posicionamento do domínio cabeça na interação com actina. Essa região também parece ter função regulatória e/ou de direcionamento da miosina com sua carga (CHENEY & MOOSEKER, 1992; HASSON & MOOSEKER, 1996; MERMALL et al., 1998). Alguns dos motivos responsáveis por estas funções, como domínios SH3 (Src homology-3), domínios GAP (GTPase-activating protein), domínios FERM (band 4.1 protein, ezrin, radixin, moesin) e domínios PH (pleckstrin homology) podem ser encontrados na região da cauda de miosinas (SELLERS, 2000; INOUE & IKEBE, 2003). Uma molécula de miosina V está representada na figura 3, com a visualização das cadeias leves essenciais (ELCs), moléculas de calmodulina ligadas no domínio pescoço e o domínio cauda regulatório.



**Figura 3:** Representação da molécula de miosina V. Em destaque o domínio motor (azul escuro). as cadeias leves, com moléculas de calmodulina ligadas aos motivos IQ (azul claro) e a região de cadeias pesadas em  $\alpha$ -hélice com o domínio cauda (lilás), que promove a interação da miosina com sua carga. Figura construída a partir de análises 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, divisão celular, no transporte de organelas e de RNA mensageiro, exocitose, endocitose, diferenciação de leucócitos, manutenção da arquitetura celular e transdução de sinal (MERMALL et al., 1998; WU et al., 2000). Alterações da atividade destes motores muitas vezes podem levar a desordens neurológicas e neurosensoriais (HASSON & MOOSEKER, 1997; LANGFORD & MOLYNEAUX, 1998). Diferentes funções celulares exercidas pelas miosinas estão representadas na Figura 4, em uma célula imaginária, como o papel da miosina I na endocitose, fagocitose ou exocitose (4, 6, 7, 9), no transporte de vesículas de melanossomos, retículo endoplasmático liso ou RNA por miosina V (8, 10, 11, 12).

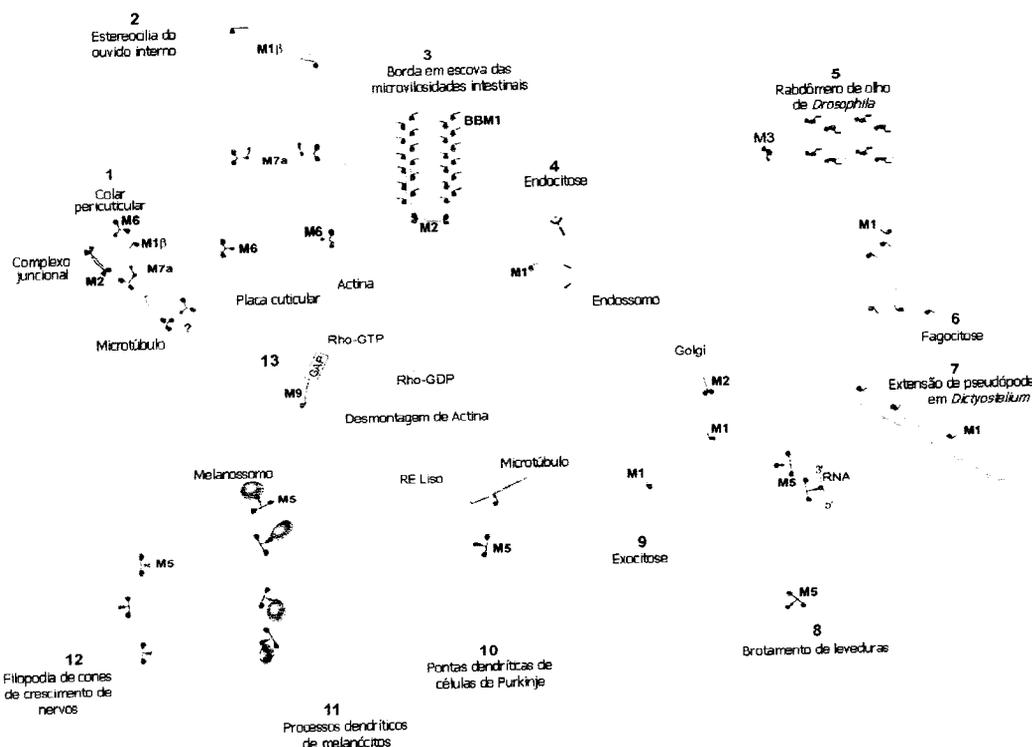


Figura 4: Representação das diferentes funções celulares das miosinas: endocitose, transporte de RNA, fagocitose, transporte de vesículas, exocitose, etc (modificado de Mermall et al., 1998).

As miosinas também apresentam como característica a capacidade de terem suas atividades mecanoquímicas reguladas pela presença de certas substâncias (COZELMAN & MOOSEKER, 1987). Fluoreto de alumínio, por formar um complexo com ADP, adquirindo estrutura semelhante ao fosfato  $\gamma$  do ATP, pode ter efeito inibitório na atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica desses motores moleculares (TROULLIER et al., 1992; FAÇANHA & OKOROKOVA-FAÇANHA, 2002). Vanadato, por possuir estrutura análoga a do fosfato 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 uma alta atividade ATPásica em soluções contendo elevadas concentrações de potássio e na ausência de cátions bivalentes, pela presença de EDTA (atividade  $K^+$ /EDTA-ATPásica) (COZELMAN & MOOSEKER, 1987).

Miosinas I, constituídas por cadeia pesada única de 110 a 140 kDa, apresentam alta atividade específica  $Ca^{2+}$ -ATPásica e  $K^+$ /EDTA-ATPásica, quando comparadas à atividade

Mg<sup>2+</sup>-ATPásica (COZELMAN & MOOSEKER, 1987; BARYLKO et al., 1992). A atividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica na presença de actina é estimulada por Ca<sup>2+</sup> em concentrações de 5 a 10 µM, e tanto na presença de Ca<sup>2+</sup> como Mg<sup>2+</sup> não há especificidade para nucleotídeos trifosfatos como ATP, GTP, UTP, CTP e ITP (COZELMAN & MOOSEKER, 1987). As miosinas II apresentam atividade K<sup>+</sup>/EDTA-ATPásica, mas são mais ativas como Ca<sup>2+</sup>-ATPases, apresentando baixa atividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica, estimulada por actina (MARUTA & KORN, 1977).

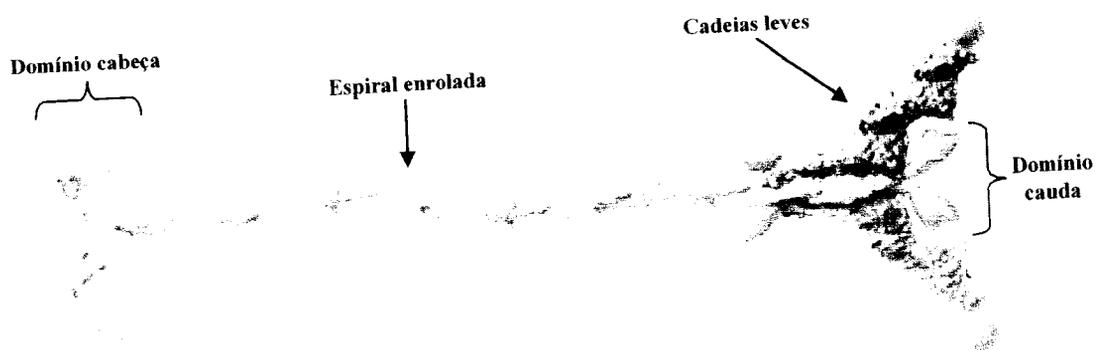
Larson et al. (1988) descreveu originalmente a miosina V como uma proteína de 190 kDa ligante de calmodulina, presente em preparações de actomiosina de cérebro, apresentando atividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica na presença de actina comparável à atividade das miosinas II, porém a miosina V se liga mais fortemente à actina, sendo ativada mesmo por baixas concentrações da mesma (NASCIMENTO et al., 1996). Entretanto, no trabalho de Espíndola et al. (1992), a miosina V não apresentou atividade K<sup>+</sup>/EDTA-ATPásica considerável, sendo sua atividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica na presença de actina estimulada por Ca<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>/calmodulina.

## 1.2. CINESINAS

O transporte intracelular é fundamental para a morfogênese e funcionamento celular. Proteínas motoras podem transportar cargas para destinos particulares no citoplasma por simultânea ligação com outras macromoléculas, como membranas, complexos de proteínas ou outros filamentos. As cinesinas constituem uma superfamília de ATPases associadas a microtúbulos e hidrolisam o ATP usando um centro catalítico altamente conservado, sendo sua atividade ATPásica estimulada por microtúbulos (SABLIN, 2000). Cinesina convencional foi identificada a partir de axoplasma de lula e cérebro de mamífero como proteínas que geram movimento baseado em microtúbulos *in vitro*, por Vale et al. (1985).

O domínio motor das cinesinas é dividido em duas partes. O núcleo catalítico globular é conservado por toda a superfamília e sua estrutura terciária tem sido concluída. O domínio pescoço, adjacente ao núcleo catalítico, é conservado apenas em certas classes de cinesinas e parece trabalhar em conjunto com o núcleo catalítico na produção de movimento. Além do domínio motor, muitas cinesinas possuem um longo domínio espiralado de  $\alpha$ -hélice, denominado haste. Um domínio globular é geralmente presente na extremidade deste domínio

espiralado, a cauda, que liga cadeias leves e o motor à sua carga específica (VALE & FLETTERICK, 1997). A cinesina isolada de vários tecidos é geralmente um tetrâmero ( $\alpha_2\beta_2$ ) que consiste de duas cadeias  $\alpha$  pesadas e duas  $\beta$  leves. As cadeias pesadas possuem entre 110-113 kDa, estando os domínios motores localizados na sua extremidade N-terminal (SABLIN, 2000). As duas cadeias leves possuem cerca de 64 kDa cada (VALE et al., 1985). Sequências conservadas no domínio cauda podem estar envolvidas na geração de uma conformação dobrada, auto-inibida e/ou na conexão com a carga (COY et al., 1999; SEILER et al., 2000). A Figura 5 representa uma molécula de cinesina com o domínio cabeça, a porção helicoidal da cadeia pesada e o domínio cauda com as cadeias leves aderidas a ele.



**Figura 5:** Cinesina convencional, evidenciando as cadeias pesadas com o domínio cabeça (azul escuro), domínio cauda (lilás) que faz o acoplamento com a carga, e as cadeias leves (verde). 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 (movimento anterógrado, em direção à periferia da célula), enquanto outros realizam o transporte para a extremidade (-) de microtúbulos (algumas do tipo C) (HIROKAWA, 1998; SABLIN, 2000). Cinesinas convencionais de metazoários estão envolvidas no transporte de vários tipos de cargas incluindo mitocôndria, lisossomo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi,

melanossomos; na divisão celular e dinâmica de microtúbulos (HIROKAWA, 1998; HARA et al., 2000).

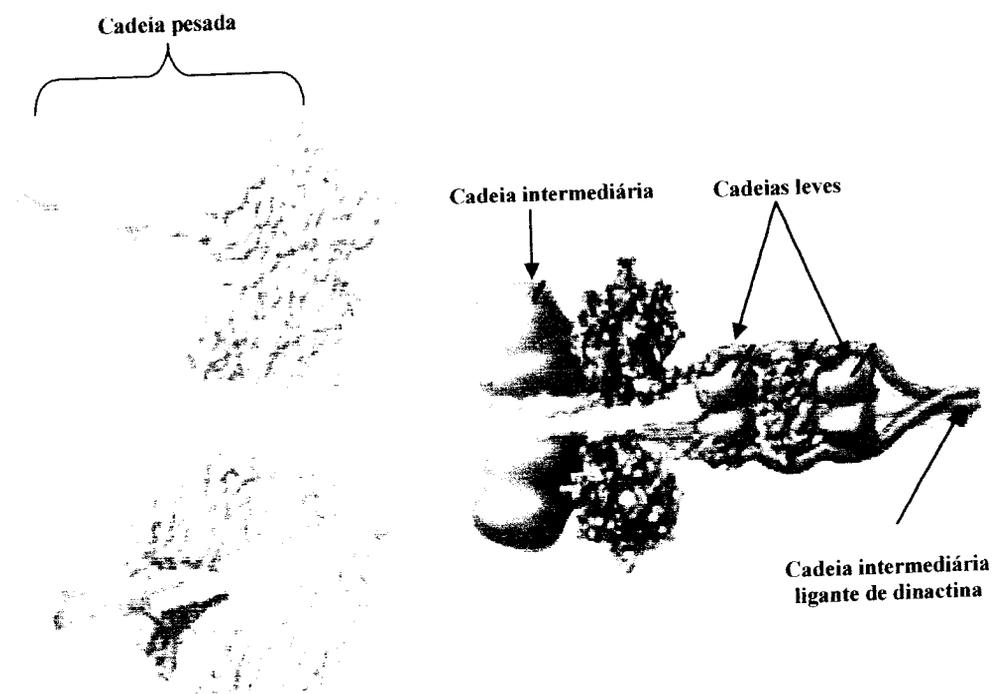
As cinesinas têm sua atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica estimulada na presença de microtúbulos, entretanto na ausência destes apresentam uma atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica mais elevada (KUZNETSOV & GELFAND, 1986; KACHAR et al., 1987). Na presença de alta força iônica e N-etilmaleimida, as cinesinas têm sua atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica inibida (KACHAR et al., 1987), bem como na presença de inibidores de movimento como vanadato e AMP-PNP, as 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). As cadeias leves de cinesinas (KLCs) podem regular a atividade ATPásica das cadeias pesadas (KHCs), a qual é maior em KHCs isoladas que quando complexadas com KLCs (HIROKAWA, 1998).

### 1.3. DINEÍNAS

Dineína foi originalmente identificada como uma ATPase geradora de força para o batimento de cílios e flagelos em *Tetrahymena cilia* (GIBBONS & ROWE, 1965), e a dineína citoplasmática foi descoberta depois como um motor direcionado à extremidade (-) do microtúbulo, em células não ciliadas (PASCHAL et al., 1987). A forma citoplasmática da dineína, isolada inicialmente de tecido cerebral, foi considerada como o motor molecular responsável pelo transporte axonal retrógrado de organelas, bem como o transporte centrípeto de endossomos, lisossomos e elementos do complexo de Golgi nas células em geral. Esta família de motores moleculares encontra-se amplamente distribuída na natureza (PASCHAL & VALLEE, 1987). Dineína axonemal e citoplasmática são morfologicamente similares, sendo a forma citoplasmática relacionada, mas não idêntica a dineína axonemal (HOLZBAUR & VALLEE, 1994), e ambas são capazes de conduzir o deslizamento de microtúbulos *in vitro* (PASCHAL, et al., 1987).

A dineína citoplasmática, isolada de cérebro bovino, é composta de duas cadeias pesadas 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). 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). Um complexo de subunidades protéicas, denominado dinactina, é requerido para a maioria das atividades mediadas por dineína e fornece indícios da diversidade funcional dessas moléculas (KARKI & HOLZBAUR, 1999). A Figura 6 ilustra uma molécula de dineína citoplasmática, as cadeias pesadas com os domínios motores globulares, as cadeias intermediárias ligadas às cadeias pesadas, cadeias leves e cadeias intermediárias ligantes de dinactina.



**Figura 6:** Dineína citoplasmática, evidenciando as cadeias pesadas (azul escuro), cadeias intermediárias, cadeias leves e cadeias intermediárias ligantes de dinactina (verde). 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).

Embora dineína hidrolise outros nucleotídeos trifosfato, apenas a atividade ATPásica é estimulada por microtúbulos e suporta movimento (PASCHAL et al., 1987). Em contraste com outras dineínas, a enzima de cérebro hidrolisa CTP, TTP e GTP em taxas mais altas que ATP (SHPETNER et al., 1988). A dineína citoplasmática não mantém o transporte baseado em microtúbulos por nucleotídeos diferentes de ATP, sua atividade ATPásica é alterada na presença de detergente iônico e requer cátions bivalentes, sendo maior na presença de  $Mg^{2+}$  do que  $Ca^{2+}$  (SHPETNER et al., 1988). Dineína citoplasmática, na presença de Triton X-100, um detergente não iônico, não sofre inibição de sua atividade ATPásica, 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 e a atividade estimulada por microtúbulos é extremamente sensível a mudanças de força iônica e agentes redutores, como DTT 1 mM (SHPETNER et al., 1988).

#### **1.4. E-NTPASES**

Estas enzimas, também denominadas ecto-ATPases, ecto-apirases ou E-ATPases, hidrolisam nucleotídeos trifosfato ou tanto nucleotídeos di e trifosfato, apresentando distribuição ubíqua em seres eucariotos (PLESNER, 1995; KACZMAREK et al., 1996). As E-NTPases são fundamentais em alguns processos fisiológicos onde ATP e/ou ADP estão envolvidos, como 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'-nucleotidase e adenilato ciclase (KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996).

De acordo com suas propriedades catalíticas, a família das E-NTPases pode ser dividida em ectonucleotídeo-difosfohidrolases (ecto-ATPDases), que hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatos e ectonucleotídeo-trifosfatases (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 e 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 de apirase" (HANDA & GUIDOTTI, 1996).

Nem todos os membros da família de E-NTPases são ecto-enzimas. Existem vários membros solúveis destas enzimas (HANDA & GUIDOTTI, 1996; SMITH et al., 1997). 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).

A inibição por azida de 10 a 20 mM é usada como critério para distinguir as ecto-ATPDases das ecto-ATPases, sendo as primeiras inibidas pelo composto. Porém outras E-NTPases, como a purificada de oviduto de galinha, pode não sofrer inibição de sua atividade  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica, na presença de inibidores de ATPases de membrana como azida (KNOWLES & NAGY, 1999). Assim também, na presença de Triton X-100 as E-NTPases podem não sofrer inibição de sua atividade ATPásica (SMITH et al., 1997).

## **1.5. ESTUDOS PRELIMINARES**

Nosso laboratório tem se dedicado à caracterização de ATPases como uma abordagem preliminar para identificar motores moleculares em tecidos de mamíferos. Obtivemos em estudos recentes, frações enriquecidas em atividade ATPásica a partir de cérebro de rato (SOARES MELO, 2003; DIAS, 2003; PINHEIRO, 2001). Uma nova fração ATPase foi obtida a partir de glândula parótida de rato, a qual procuramos caracterizar quanto a algumas propriedades que nos permitem identificá-la.

## **1.6. OBJETIVO**

Caracterizar a fração ATPase parcialmente purificada a partir da fração solúvel congelada de glândula parótida de rato.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. REAGENTES**

Os reagentes ATP, Trizma-base, imidazol, EDTA, EGTA, DTT, inibidores de proteases, sacarose, acrilamida, glicina, cloreto de potássio, ortovanadato de sódio e pirofosfato tetrasódico foram obtidos da Sigma®. Os demais reagentes usados são de grau analítico.

### **2.2. PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ATPASE**

Ratos Wistar adultos foram anestesiados com éter e sacrificados, sendo as glândulas parótidas imediatamente removidas, lavadas em solução de KCl 150 mM, em seguida colocadas em tampão de extração (imidazol 20 mM pH 7,5 contendo Sacarose 250 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, DTT 0,5 mM, Aprotinina 1%, Benzamidina 1 mM, Calpastatina 1  $\mu$ L/mL), fatiadas com tesoura e homogeneizadas manualmente em

homogeneizador de vidro tipo Potter, Pyrex<sup>®</sup>. O material homogeneizado obtido foi centrifugado a 40.000<sub>x</sub>g durante 40 minutos a 4 °C em centrífuga Sigma<sup>®</sup> 3K30. O precipitado (P1) foi descartado e a fração protéica solúvel S1 foi congelada a -20 °C por aproximadamente dois meses. Após descongelamento, essa fração foi novamente centrifugada a 40.000<sub>x</sub>g durante 40 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante S2 mantido para posteriores análises enquanto a fração precipitada P2 ressuspensa em 4 mL de tampão imidazol 20 mM pH 8,0, EDTA 2 mM e DTT 1 mM contendo NaCl 0,5 M e uma nova centrifugação foi realizada a 40.000<sub>x</sub>g durante 40 minutos a 4 °C. A fração S3 obtida foi mantida para análises posteriores e a fração protéica precipitada P3 foi ressuspensa em 2 mL de tampão T, denominada fração ATPase.

### **2.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)**

O perfil de polipeptídeos das frações protéicas foi analisado em SDS-PAGE usando o sistema descontínuo de Laemmli & Favrre (1973) e o sistema de placas empregado por Studier (1973).

Os mini-géis foram preparados a 8% de acrilamida. Os géis foram montados entre placas de vidro e alumina de 10 x 7,5 x 0,06 cm.

As amostras protéicas foram preparadas adicionando-se 90 µL de amostra a 10 µL de tampão Tris 187 mM pH 6,8 contendo β-mercaptoetanol 28,8 mM, SDS 6%, EDTA 6 mM pH 7,5, Glicerol 27,6% e azul de bromofenol 0,05 g. Antes da aplicação, as amostras foram colocadas em água em ebulição por 2 minutos.

Utilizando micro-seringa de vidro Hamilton<sup>®</sup>, as amostras foram aplicadas ao gel, devidamente montado em cuba Hoefer<sup>®</sup> SE 250. A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida em tampão Tris 25 mM pH 8,5, EDTA 2 mM, Glicina 0,2 M, SDS 2,5 mM, sob corrente constante de 30 mA e 200 V utilizando fonte Bio-Rad<sup>®</sup> Power Pac 1000. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant blue-R 0,125% em metanol 50% e ácido acético 10% e descorados em solução de metanol 10% e ácido acético 12,5%.

O padrão SDS-6H Sigma<sup>®</sup>, cadeia pesada de Miosina II, 205 kDa, β-Galactosidase, 116 kDa, Fosforilase-b, 97,4 kDa, Albumina bovina, 66 kDa, Ovoalbumina, 45 kDa e

Anidrase carbônica, 29 kDa, foi utilizado para comparar o deslocamento dos polipeptídeos no gel.

## 2.4. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração protéica das amostras foi determinada segundo o método quantitativo de Bradford (1976).

O volume de 20  $\mu$ L das frações obtidas durante o preparo da fração ATPase foi adicionado a 80  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q em tubos de ensaio. A cada tubo foram adicionados 3 mL de solução de Bradford (Coomassie blue G-250 0,01% em etanol 4,7% e ácido fosfórico 8,5%). As reações foram realizadas em duplicatas e a absorbância foi medida em espectrofotômetro Hitachi® U-2000 à luz visível em 595 nm, usando cubetas de acrílico, sendo lavadas com álcool (80%) e água Milli-Q.

Paralelamente a dosagem protéica das frações, uma curva padrão de dosagem de soroalbumina bovina (BSA) foi preparada. A curva é linear entre 0 e 30  $\mu$ g de BSA. 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 nova curva padrão.

## 2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ADENOSINA TRIFOSFATÁSICA

A dosagem colorimétrica do ortofosfato inorgânico liberado durante a reação de hidrólise do substrato foi realizada segundo o método de Heinonen & Lahti (1981).

A cada tubo de ensaio foram adicionados 40  $\mu$ L do meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5; DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo MgCl<sub>2</sub> 4 mM ou CaCl<sub>2</sub> 2 mM para dosagem da atividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica ou Ca<sup>2+</sup>-ATPásica, respectivamente. O meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5; DTT 1 mM, EDTA 1 mM contendo KCl 60 ou 600 mM, foi utilizado para dosagem da atividade K<sup>+</sup>/EDTA-ATPásica.

Volumes pré-determinados de amostras das frações protéicas foram adicionados aos tubos e o volume final de 200  $\mu$ L foi completado com adição de H<sub>2</sub>O Milli-Q.

A reação foi iniciada com adição do respectivo nucleotídeo substrato (concentração final de 1 mM), seguida de incubação a 37 °C durante 10 a 15 minutos. Após este tempo, a reação foi interrompida com adição de 2 mL de solução de dosagem AAM (acetona 100%, molibdato de amônio 10 mM e ácido sulfúrico 5 N numa proporção de 2:1:1, respectivamente) e submetida à agitação. Após 15 segundos, 200  $\mu$ L de ácido cítrico 1 M foram adicionados mantendo-se a agitação por mais 10 segundos. Foram preparadas reações controle para cada amostra, nas quais a incubação se procedeu sem a adição de substrato, o qual foi adicionado imediatamente antes de interromper a reação com solução de dosagem.

As reações foram realizadas em duplicata e a absorbância medida em 355 nm em espectrofotômetro Hitachi® U-2000, utilizando cubetas de quartzo. Paralelamente foi feita uma curva padrão de ortofosfato inorgânico, que é linear entre 0 e 250 nmols de ortofosfato. A quantidade de ortofosfato das amostras (em nmols) foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão. Sendo feita uma curva padrão para cada dosagem de fosfato.

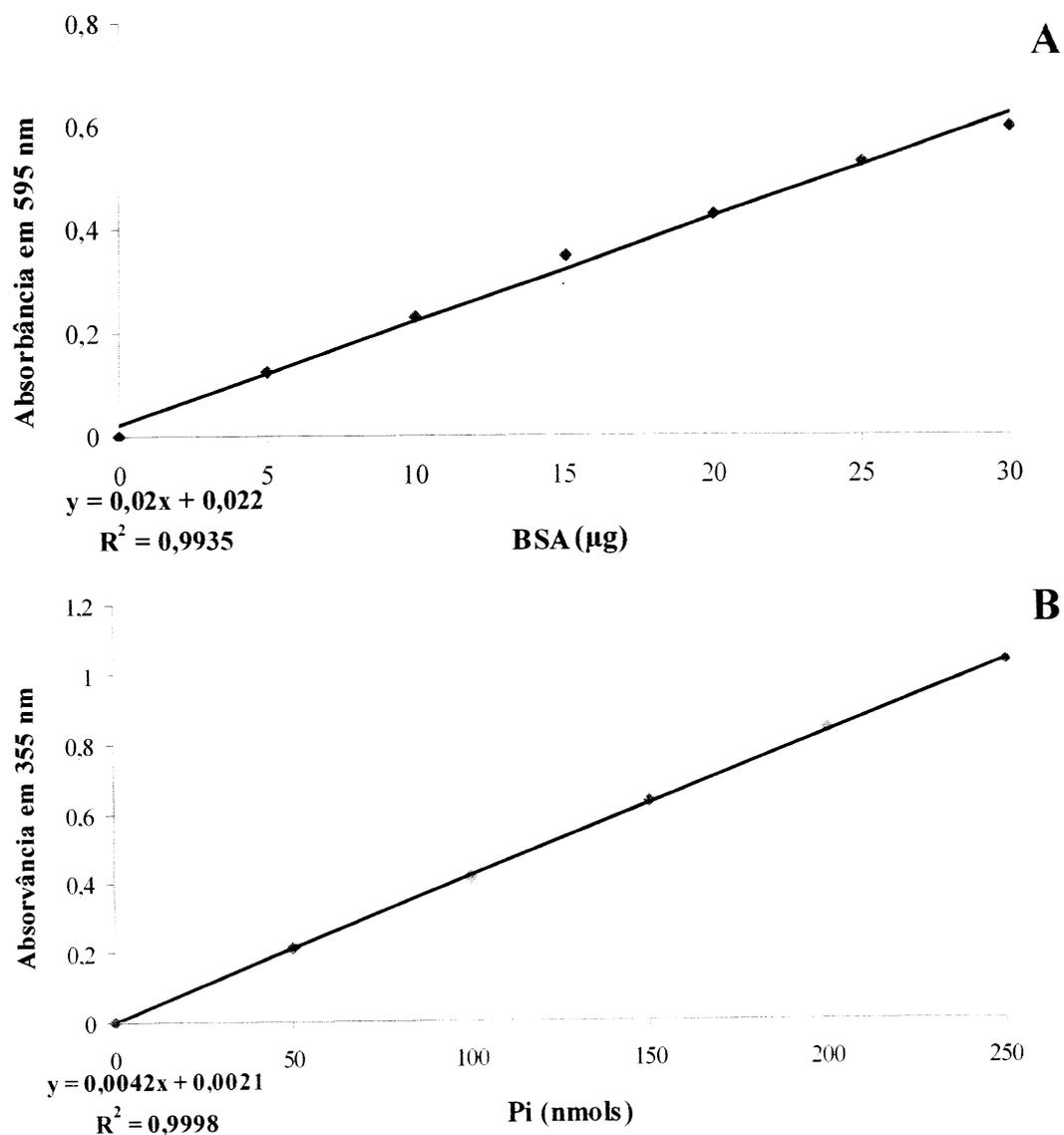
A atividade específica das amostras foi expressa em nmols de fosfato inorgânico (P<sub>i</sub>) por mg de proteína por minuto. Sendo a atividade total para cada amostra o produto de sua atividade específica pela quantidade de proteína total da amostra.

### **3. RESULTADOS**

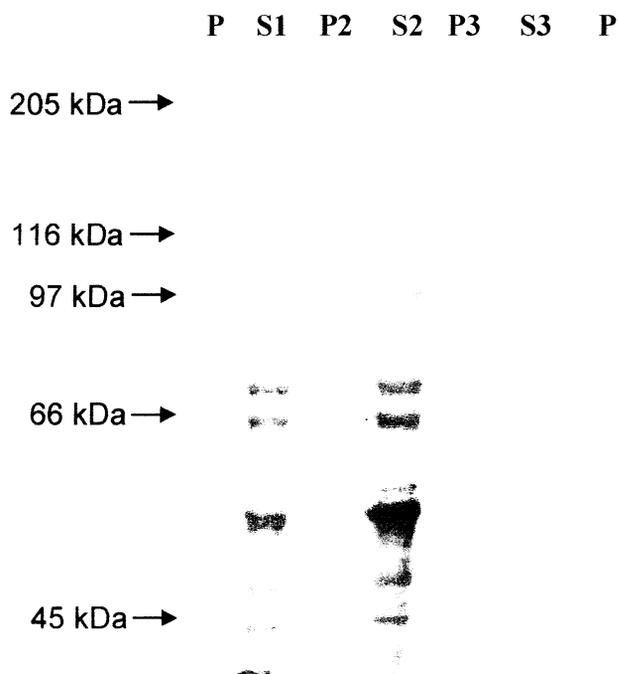
#### **3.1. PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ATPASE**

A dosagem protéica de cada fração foi determinada como descrito em material e métodos, utilizando como padrão uma curva plotada com diferentes concentrações de BSA, linear entre 0 e 30  $\mu\text{g}$  (Figura 7A). Para a determinação da atividade ATPásica de cada fração foi dosada a quantidade de fosfato inorgânico liberado na reação de hidrólise do substrato, e calculado pela regressão linear da curva de  $\text{P}_i$  (Figura 7B).

A preparação feita a partir do fracionamento do homogeneizado de glândulas parótidas de rato para a obtenção da fração ATPase foi analisada em SDS-PAGE, a fim de observar o perfil eletroforético dos polipeptídeos (Figura 8). Observa-se uma maior quantidade de um polipeptídeo de aproximadamente 205 kDa e um polipeptídeo bem definido com cerca de 45 kDa.



**Figura 7: Exemplos de curvas padrões para dosagem de proteínas e de atividade ATPásica.** As respectivas equações e coeficientes de linearidade estão representados. (A) Curva padrão de soroalbumina bovina (BSA). (B) Curva padrão de ortofosfato inorgânico ( $P_i$ ).



**Figura 8: SDS-PAGE da preparação da fração ATPase.** Gel de poliacrilamida a 8%. Foram aplicados 6,7  $\mu\text{g}$  do sobrenadante da primeira centrifugação (S1); 5  $\mu\text{g}$  do precipitado da segunda centrifugação (P2); 12  $\mu\text{g}$  do sobrenadante da segunda centrifugação (S2); 5,5  $\mu\text{g}$  do precipitado da terceira centrifugação (P3 – fração ATPase); 5,2  $\mu\text{g}$  do sobrenadante da terceira centrifugação (S3). P – Padrão SDS 6H.

A fração P3, denominada fração ATPase, apresentou alta atividade ATPásica específica ( $480,2 \pm 110,7$  nmols de  $P_i$ /mg/min.  $n = 5$ ), com uma purificação de mais de oito vezes em relação à fração S1 (Tabela 1).

**Tabela 1: Purificação da fração ATPase.**

A atividade foi determinada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  das amostras ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo  $\text{MgCl}_2$  4 mM. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM, incubada a 37  $^\circ\text{C}$  durante 10 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. A dosagem protéica das frações foi feita como citado em material e métodos.

Fração	Proteínas (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Atividade Total (nmols $P_i$ /min)	Atividade Específica (nmols $P_i$ /mg/min)	Purificação (x)	Rendimento (%)
S1	1,83	69,48	3448	$56,7 \pm 16,2$	1,00	100,00
S2	1,58	53,73	2135	$39,5 \pm 3,0$	0,70	77,33
P2	0,58	2,33	782	$334,6 \pm 16,4$	5,90	3,35
S3	0,37	0,84	76	$85,8 \pm 41,6$	1,51	1,21
P3	0,32	0,69	269	$480,2 \pm 110,7$	8,47	1,00

### 3.2. ATIVIDADE $K^+$ /EDTA-ATPÁSICA

A atividade  $K^+$ /EDTA-ATPásica é usada como uma maneira de caracterizar a atividade específica de miosinas, que em meio livre de cátions bivalentes apresentam alta atividade ATPásica em presença de altas concentrações de potássio. A fração ATPase foi incubada em meio sem cátions bivalentes na presença de KCl 60 ou 600 mM.

A atividade detectada na fração ATPase apresentou-se em torno de 13% da atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica (Figura 9).

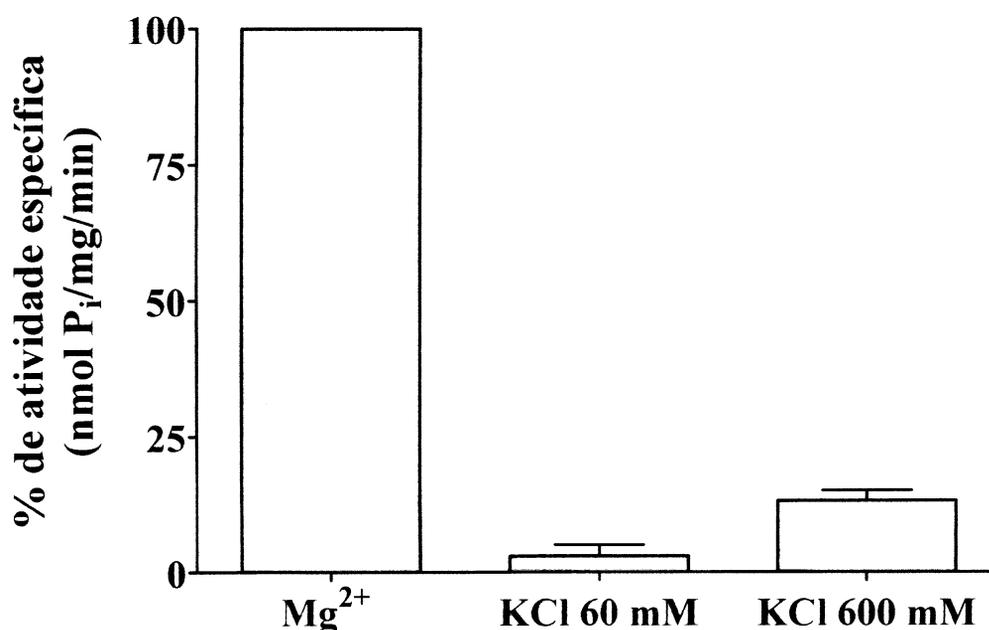
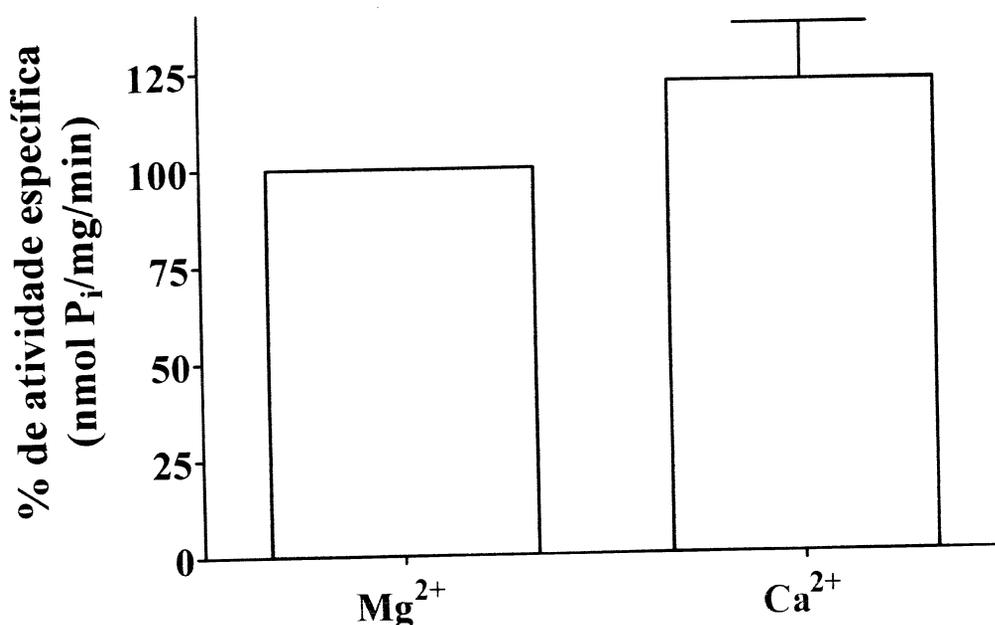


Figura 9: Dosagem da atividade  $Mg^{2+}$  e  $K^+$ /EDTA-ATPásica. A atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica foi determinada em meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM. KCl 60 mM, contendo  $MgCl_2$  4 mM. Para determinação da atividade  $K^+$ /EDTA-ATPásica, a fração ATPase foi incubada a 37 °C durante 15 minutos em meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, contendo KCl 60 ou 600 mM, conforme indicado. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. Estes experimentos foram realizados 4 vezes.

### 3.3. ATIVIDADE $Mg^{2+}$ -ATPÁSICA E $Ca^{2+}$ -ATPÁSICA

A atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica da fração ATPase apresentou-se pouco elevada e não significativamente superior à observada na presença de magnésio, considerando-as similares entre si (Figura 10).



**Figura 10: Dosagem da atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica e  $Ca^{2+}$ -ATPásica.** Adicionou-se 20  $\mu$ L da respectiva fração ATPase ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7.5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo  $MgCl_2$  4 mM ou  $CaCl_2$  2 mM como indicado. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM, incubada a 37 °C durante 15 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. Estes experimentos foram realizados 4 vezes.

### 3.4. EFEITO DE CÁLCIO E $\text{Ca}^{2+}$ /CALMODULINA NA ATIVIDADE $\text{Mg}^{2+}$ -ATPÁSICA

A atividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica foi caracterizada na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, sendo que algumas ATPases têm sua atividade estimulada por tais compostos, como miosinas e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. Contudo não foi observada nenhuma estimulação por tais compostos (Figura 11).

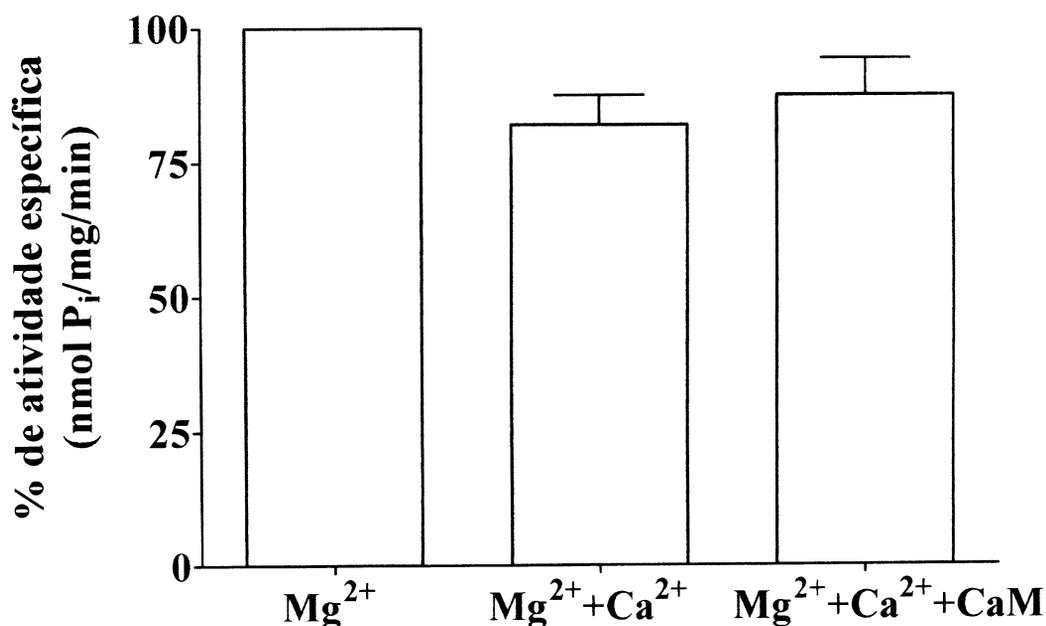


Figura 11: Efeito de  $\text{Ca}^{2+}$  e Calmodulina na Atividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica. Adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  da fração ATPase ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM. KCl 60 mM contendo  $\text{MgCl}_2$  4 mM e onde indicado  $\text{CaCl}_2$  2 mM e calmodulina (CaM) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM. incubada a 37 °C durante 15 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. Estes experimentos foram realizados 4 vezes.

### 3.5. EFEITO DE VANADATO DE SÓDIO SOBRE A ATIVIDADE $Mg^{2+}$ -ATPÁSICA

Realizou-se a dosagem da atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica na presença diferentes concentrações de vanadato de sódio, que é estruturalmente similar ao fosfato do ATP e tem ação inibitória sobre diversas ATPases. Nossa fração não apresentou uma inibição relevante, sendo inibida em apenas 5% para vanadato 200  $\mu M$  e 1 mM (Figura 12).

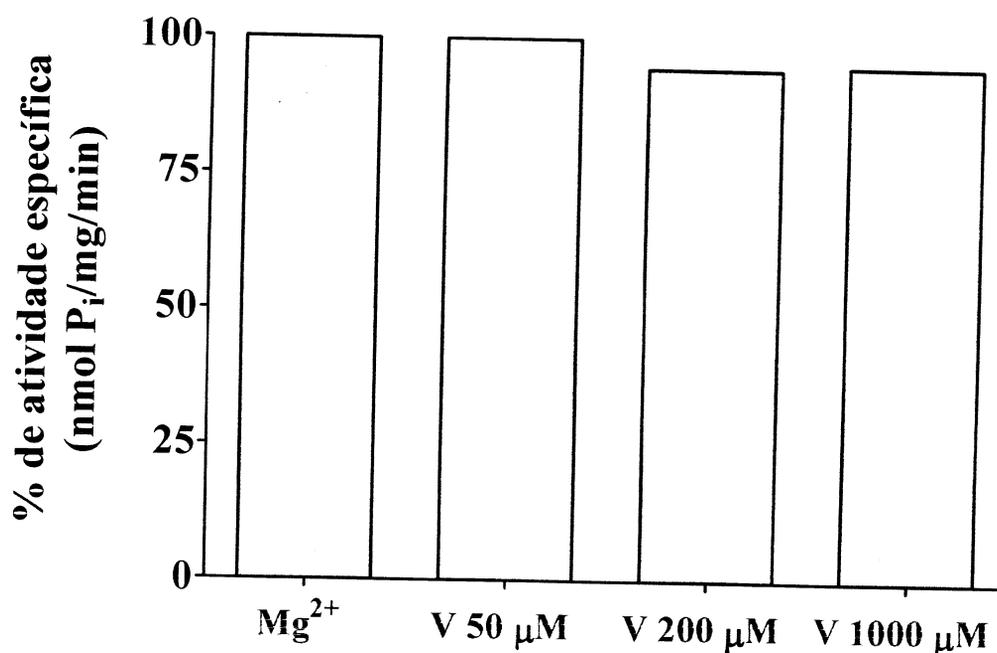
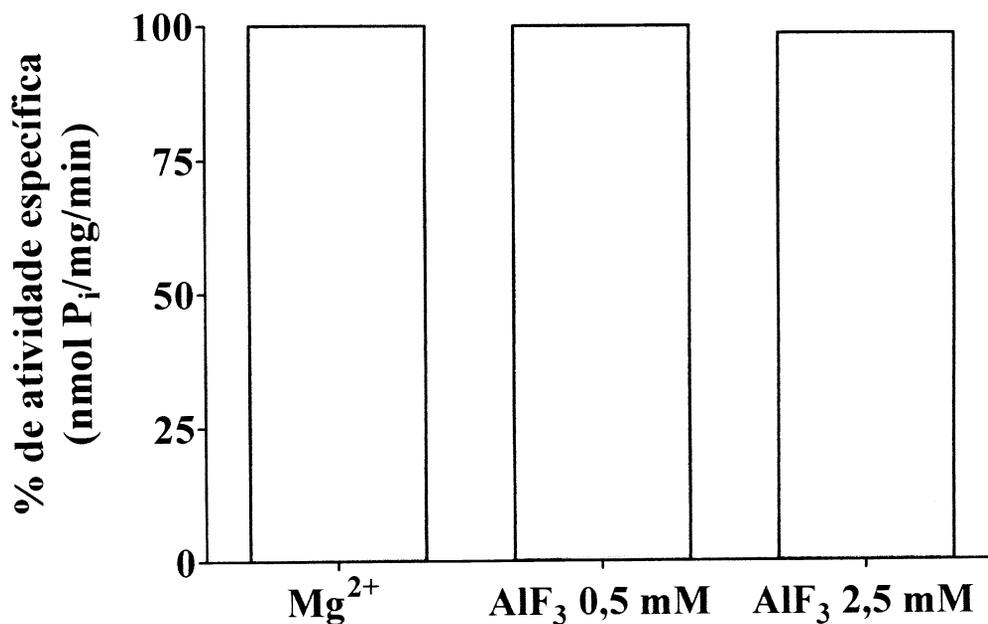


Figura 12: Efeito de vanadato de sódio sobre a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica. Adicionou-se 20  $\mu L$  da fração ATPase ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7.5. DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo  $MgCl_2$  4 mM e vanadato de sódio nas concentrações indicadas. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM. incubada a 37  $^{\circ}C$  durante 15 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

### 3.6. EFEITO DE FLUORETO DE ALUMÍNIO NA ATIVIDADE $Mg^{2+}$ -ATPÁSICA

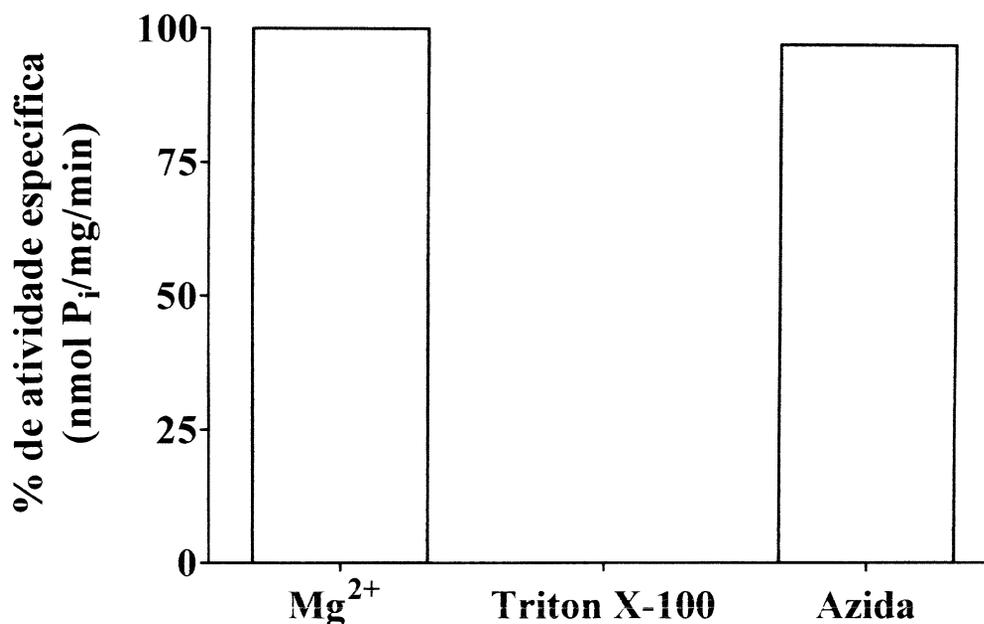
A atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica foi dosada na presença de fluoreto de alumínio, um inibidor de várias enzimas que catalisam a hidrólise de nucleotídeos, em concentrações de 0,5 mM e 2,5 mM. Praticamente nenhuma inibição foi observada na atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica (Figura 13).



**Figura 13: Efeito de fluoreto de alumínio sobre a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica.** 20  $\mu$ L da fração ATPase foram adicionados ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo  $MgCl_2$  4 mM e  $AlF_3$  0,5 mM e 2,5 mM onde indicado. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM, incubada a 37 °C durante 15 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

### 3.7. EFEITO DE TRITON X-100 E AZIDA SÓDICA SOBRE A ATIVIDADE $Mg^{2+}$ -ATPÁSICA

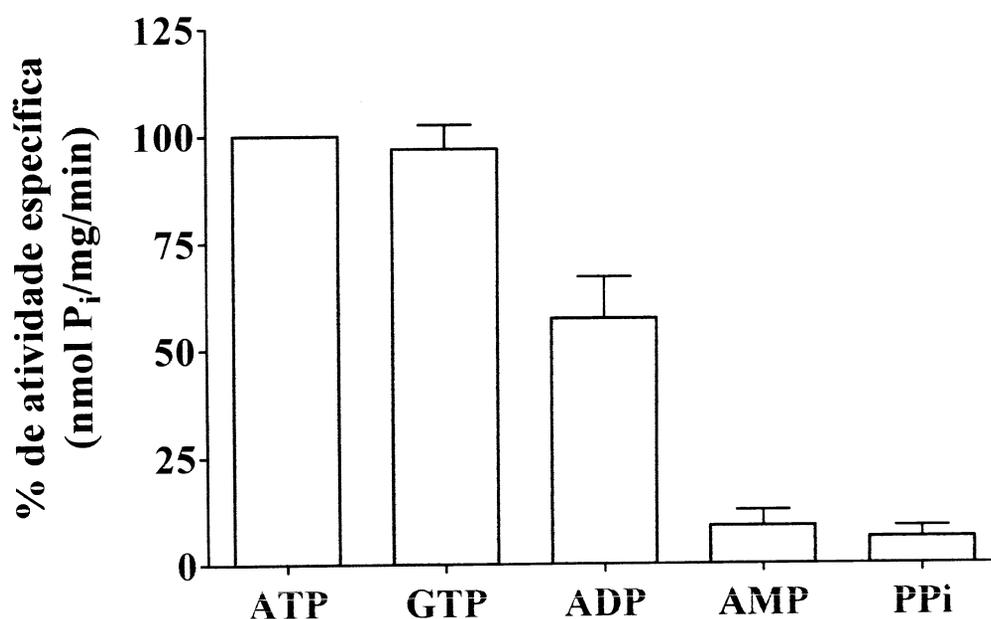
Quando a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica da fração ATPase foi dosada na presença de Triton X-100 0,2%, um detergente não-iônico, observou-se que foi totalmente inibida. Porém na presença de azida sódica 1 mM verificou-se que não ocorreram alterações significativas (Figura 14).



**Figura 14:** Efeito de Triton X-100 e azida sódica sobre a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica. 20  $\mu$ L da fração ATPase foram adicionados ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7.5. DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo  $MgCl_2$  4 mM. Triton X-100 0,2% e Azida 1 mM foram adicionados conforme indicado. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM, incubada a 37  $^{\circ}$ C durante 15 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

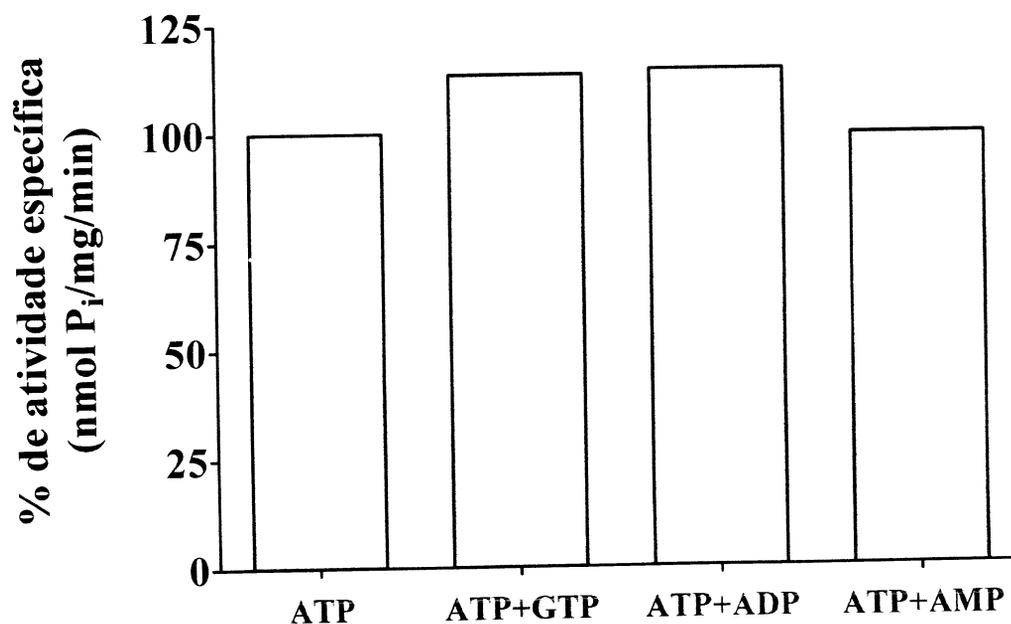
### 3.8. ESPECIFICIDADE DE SUBSTRATO

Verificou-se a capacidade de hidrólise de outros nucleotídeos pela fração ATPase, sendo dosadas as atividades frente a GTP, ADP, AMP ou  $PP_i$  em concentrações de 1 mM. A fração ATPase apresentou uma atividade  $Mg^{2+}$ -GTPásica praticamente igual à atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica, uma atividade  $Mg^{2+}$ -ADPásica de cerca de metade da atividade de hidrólise de  $Mg^{2+}$ -ATP e frente a AMP e  $PP_i$  não foi observada substancial atividade (Figura 15).



**Figura 15: Especificidade de substrato.** Adicionou-se 20  $\mu$ L da fração ATPase ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo  $MgCl_2$  4 mM. A reação foi iniciada com a adição do respectivo substrato a 1 mM, incubada a 37 °C durante 15 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. Estes experimentos foram realizados 4 vezes.

Foi realizada a dosagem da competição por substrato, sendo a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica acrescida de cerca de 14% quando em presença de GTP ou ADP 1 mM, e frente a AMP 1 mM a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica se manteve (Figura 16).



**Figura 16: Efeito de diferentes nucleotídeos na atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica.** 20  $\mu$ L da fração ATPase foram adicionados ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7.5. DTT 1 mM. EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo  $MgCl_2$  4 mM. A reação foi iniciada pela adição de ATP e de GTP, ADP ou AMP nas concentrações finais de 1 mM, incubada a 37 °C durante 15 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

## 4. DISCUSSÃO

Levando-se a cargo que ATPases motoras e citoesqueleto podem desempenhar um importante papel na excitose das células da glândula parótida, procuramos identificar membros que possam estar envolvidos nesse processo. Obtivemos no presente trabalho uma nova fração enriquecida em atividade ATPásica a partir de glândula parótida de rato.

Verificou-se nessa fração a presença de dois principais polipeptídeos, um de alta massa molecular, com mobilidade relativa semelhante à cadeia pesada de miosina II, 205 kDa, e outro com massa molecular de aproximadamente 45 kDa, que pode corresponder a actina.

Nossa fração ATPase apresenta uma alta atividade de hidrólise de ATP e conseqüente liberação de  $P_i$  em presença de  $MgCl_2$  (4 mM). Esta alta atividade não era significativamente diminuída mesmo após cerca de dois meses de congelamento da fração solúvel inicial (S1), a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , a qual mostrou-se menor quando se congelava a glândula íntegra nesta temperatura. Com isso especulou-se que o congelamento do tecido intacto, devido à formação de pequenos cristais e espículas de gelo, quando descongelado permitia a liberação de proteases antes compartimentalizadas em lisossomos. Apesar da presença de inibidores de proteases, observou-se queda da atividade ATPásica das frações.

Foram realizados cinco experimentos, os quais mostraram resultados similares e condizentes apesar do alto valor do desvio padrão obtido para as atividades específicas das amostras. Tal fato se deve aos diferentes tempos de congelamento de cada amostra de fração solúvel do homogeneizado de glândulas (S1) e dos diferentes tempos gastos em cada experimento até a realização da dosagem da atividade e de proteínas.

Vale ressaltar que a dosagem da atividade ATPásica de cada fração e a caracterização da fração ATPase foi realizada em meio de reação contendo EDTA 1 mM, no intuito de quelar cátions bivalentes que poderiam estar presentes como contaminantes no tubo de dosagem da atividade, usando-se então um excesso de cátions de interesse nesta dosagem.

Para se caracterizar essa ATPase de nossa fração usamos agentes específicos que permitem a distinção entre diferentes grupos. Uma característica das miosinas é sua alta atividade na presença de KCl e ausência de cátions bivalentes. A atividade  $K^+/EDTA$ -ATPásica foi dosada utilizando KCl 60 ou 600 mM, sendo o EDTA 1 mM usado para quelar cátions bivalentes. Foi usado KCl em baixa concentração como controle. Uma baixa atividade  $K^+/EDTA$ -ATPásica foi observada na fração, correspondendo a 13% da atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica. Um resultado similar foi apresentado por Espíndola et al. (1992), em que sua fração de miosina V mostrou baixa atividade  $K^+/EDTA$ -ATPásica, não típica de miosinas. Contudo, Nascimento et al. (1996) mostrou que a miosina V de cérebro apresenta atividade ATPásica elevada em presença de KCl 600 mM e ausência de cátions bivalentes. Tais comportamentos distintos, portanto, não nos permite comparar esta atividade de nossa fração com miosina V.

Segundo Maruta e Korn (1977), as miosinas II apresentam atividade  $K^+/EDTA$ -ATPásica, mas são mais ativas como  $Ca^{2+}$ -ATPases, apresentando baixa atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica que é estimulada por actina. A presente fração ATPase apresentou, além de baixa atividade  $K^+/EDTA$ -ATPásica, uma atividade em presença de  $Ca^{2+}$  praticamente similar à atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica. Cinesina possui uma atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica mais elevada que a  $Mg^{2+}$ -ATPásica na ausência de microtúbulos (KUZNETSOV & GELFAND, 1986), contudo não se pode inferir a ausência de microtúbulos em nossa fração ATPase. Este fato também contrasta com a característica da dineína citoplasmática, cuja atividade é maior na presença de  $Mg^{2+}$  do que  $Ca^{2+}$  (SHPETNER et al., 1988). ATP difosfohidrolase apresenta atividade ATPásica e ADPásica tanto em presença de  $Mg^{2+}$  quanto de  $Ca^{2+}$ . A fração ATPase também apresenta comportamento distinto de miosinas; miosinas I e II apresentam atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica maior que a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica (MARUTA & KORN, 1977; CONZELMAN & MOOSEKER, 1987), além de apresentarem alta atividade  $K^+/EDTA$ -ATPásica.

Foram feitos ensaios para se verificar o efeito de cálcio e calmodulina na atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica de nossa fração, contudo não foi observada estimulação por  $Ca^{2+}$  nem pelo complexo  $Ca^{2+}$ /Calmodulina. Este complexo estimula algumas miosinas, como I e V, e  $Ca^{2+}$ -ATPases (ESPÍNDOLA et al., 1992; NASCIMENTO et al., 1996).

A presença de vanadato de sódio e fluoreto de alumínio no ensaio mostra o fato de nossa fração ser insensível a esses inibidores. Vanadato é um inibidor não seletivo de ATPases que ciclam por meio de um intermediário fosforilado, inibindo miosina II de músculo, miosina I (CONZELMAN & MOOSEKER, 1987), cinesinas (COHN et al., 1997) e ATPases tipo P, como  $Na^+/K^+$ -ATPase e  $Ca^{2+}$ -ATPase (CANTLEY et al., 1978; CARAFOLI, 1991). Fluoreto de alumínio tem alta afinidade para os sítios ligantes de nucleotídeos de algumas ATPases motoras. Sendo um análogo do fosfato  $\gamma$  do ATP, age como um competidor pelos sítios de hidrólise dos motores moleculares. Sendo assim, a enzima responsável pela atividade de hidrólise de nucleotídeos em nossa fração provavelmente não seja estas supracitadas, já que nenhuma inibição substancial por tais compostos foi verificada na fração ATPase.

Nossa fração tem sua atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica totalmente inibida por Triton X-100 0,2%, um detergente não iônico, o que sugere uma possível interferência nas interações químicas entre grupamentos dentro da cadeia polipeptídica, entre subunidades, ou entre proteínas distintas, que interferem na atividade ATPásica da enzima em questão. Algumas ecto-ATPases solúveis não são inibidas por Triton X-100 1% (SMITH et al., 1997).

Não foi observada nenhuma alteração significativa na atividade ATPásica em presença de azida sódica 1 mM, que tem efeito inibitório sobre a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica de  $F_1$ -ATPase. Ecto-ATPDases são caracterizadas por hidrolisarem nucleotídeos trifosfatos e difosfatos e serem inibidas por azida 10 a 20 mM, ao contrário das ecto-ATPases que hidrolisam somente nucleotídeos trifosfatos e não são inibidas por azida (PLESNER, 1995). Knowles & Nagy (1999) relataram uma ecto-ATPDase de oviduto de galinha que sofre pouca inibição de sua atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica e  $Ca^{2+}$ -ATPásica por azida 20 mM. Todavia a baixa concentração do composto utilizado em nosso estudo não permite uma comparação com tais relatos.

Verificou-se uma alta atividade GTPásica em presença de  $Mg^{2+}$ , similar à atividade ATPásica, sugerindo uma inespecificidade por substrato, como ocorre com dineína citoplasmática. A possível presença de alguma GTPase, como dinamina co-purificada com alguma ATPase, é desconsiderada quando não se observa um sinergismo de atividade de hidrólise em presença de ATP e GTP (Figura 16). Entretanto, dineína citoplasmática tem sua

atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica maior do que a  $Ca^{2+}$ -ATPásica (SHPETNER et al., 1988) e não sofre inibição por Triton X-100 (GIBBONS & FRONK, 1979). Foi também observada uma significativa atividade ADPásica (57%). Observou-se um pequeno acréscimo na atividade ATPásica (14%) quando adicionado GTP ou ADP 1 mM, e nenhuma alteração da taxa de hidrólise do ATP em presença de AMP 1 mM, sugerindo que não há competição pelo sítio catalítico.

Recentemente em nosso laboratório, Soares Melo (2003) obteve uma fração ATPase a partir do congelamento de citosol de cérebro de rato, por método semelhante ao descrito no presente trabalho, que apresentou três principais polipeptídeos (205 kDa, 57 kDa e 45 kDa), perfil similar à nossa fração ATPase. A fração ATPase de cérebro de rato apresentou uma marcação com anticorpo anti-miosina V numa banda polipeptídica de alto peso molecular, semelhante à miosina V. No tratamento da fração protéica precipitada que deu origem à fração ATPase de cérebro com Triton X-100 0,2%, verificou-se a solubilização principalmente do polipeptídeo de 57 kDa, porém a atividade ATPásica da fração ATPase foi fortemente inibida, resultado também verificado na presente fração ATPase. Coincidentemente, nossa fração apresentou outras propriedades similares às observadas para a fração de cérebro de rato (SOARES MELO, 2003). Tal fração também não apresentou atividade  $K^+$ /EDTA-ATPásica significativa nem estimulação por  $Ca^{2+}$  ou por  $Ca^{2+}$ /CaM na atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica, apesar de ser rica em miosina V. Não foi verificada também inibição substancial por vanadato, fluoreto de alumínio ou azida. Essa fração também hidrolisou ADP e GTP em cerca de metade da atividade ATPásica. Essa inespecificidade por substrato também foi observada no presente trabalho. Estes fatos indicam que os métodos utilizados na preparação de fração ATPase a partir do congelamento de citosol do tecido podem levar à purificação e identificação de alguma ATPase comum para cérebro e glândula parótida de rato.

A presente fração ATPase se trata de uma fração protéica precipitada, o que dificulta alguns processos para purificá-la, como cromatografias. Assim, experimentos foram realizados procurando solubilizá-la, nos quais a fração P3 foi incubada com ATP 10 mM, buscando sua ligação em algum sítio de hidrólise ou que provoque mudança de conformação, levando a uma solubilização. Todavia, não detectamos atividade ATPásica substancial na fração solúvel resultante após a centrifugação (S4), permanecendo na fração precipitada (P4) (resultados não mostrados).

Os resultados indicam, portanto, que o polipeptídeo de alto peso observado bastante denso no gel pode não corresponder à miosina II, ou no caso de sua presença, ela não é a

responsável pela atividade de nossa fração ATPase. Assim também, a fração ATPase apresentou propriedades distintas de outras miosinas, cinesinas e dineínas. Provavelmente a enzima responsável pela atividade ATPásica da presente fração parcialmente purificada seja um membro da família das E-NTPases. Estas proteínas não glicosiladas apresentam cerca de 55 kDa, e entre 70 e 80 kDa quando têm açúcar na molécula (ZIMMERMANN, 1999). Contudo, é necessária a intensificação da purificação desta fração e caracterizações mais refinadas para que suas propriedades possam ser mais elucidadas, confirmando os presentes resultados.

## 5. CONCLUSÃO

Verificamos que a fração ATPase obtida no presente trabalho apresenta características de alguma enzima da família das E-NTPases, principalmente por ter sua atividade inibida totalmente por Triton X-100. apresentar atividade ATPásica em presença de  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  e por não apresentar especificidade por um substrato, hidrolisando tanto nucleotídeos trifosfato como difosfato.

Contudo, as técnicas de purificação dessa fração necessitam ser otimizadas, bem como novos ensaios de caracterização e ensaios com anticorpos (Western Blot) devem ser realizados para permitir conclusões mais precisas em relação à identidade da ATPase parcialmente purificada nesse trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

BARYLKO, B. et al. Purification and characterization of a mammalian myosin I. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 490-94, 1992.

BOYER, P. D. The ATP synthase - a splendid molecular machine. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 66, p. 717-49, 1997.

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.

CANTLEY Jr., L. C.; CANTLEY, L. G.; JOSEPHSON, L. A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 20, p. 7361-68, 1978.

CARAFOLI, E. Calcium pump of the plasma membrane. **Physiol. Rev.**, v. 71, n. 1, p. 129-51, 1991.

---

<sup>1</sup> Referências segundo a NBR 6023, 2002.

\_\_\_\_\_. Plasma membrane calcium pumps: structure, function and relationships. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 92, p. 56-61, 1997, supl. 1.

\_\_\_\_\_. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 99, n. 3, p. 1115-22, 2002.

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. 14128-35, 1984.

COTÉ, 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.

COY, D. L. et al. Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. **Nat. Cell. Biol.**, v. 1, p. 288-92 1999.

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.

DIAS, D. S. **Caracterização dos principais polipeptídeos, p160 e p54, de uma fração ATPase de cérebro de rato.** Uberlândia. 33 p. Monografia (Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 2003.

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

ESPÍNDOLA, F. S. et al. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: 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. & FRONK, E. A latent adenosine triphosphatase form of dynein I from sea urchin sperm flagella. **J. Biol. Chem.** v. 254, p. 187-96, 1979.

GIBBONS, I. R. & ROWE, A. J. Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. **Science**, v. 149, p. 424-26, 1965.

HAMMER, J. A. Novel myosins. **Trend. Cell. Biol.** v. 1, p. 50-56, 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. 16431-34, 1996.

\_\_\_\_\_. The growing family of myosin motors and their role neurons and sensory cells. **Curr. Opin. Neurobiol.** v. 7, p. 615-23, 1997.

HEINONEN, J. K. & LAHTI, R. J. 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.

HODGE, T. & COPE, M. J. T. V. A myosin family tree. **J. Cell Sci.** v. 113, p. 3353-54, 2000.

HOMMA, K. et al.  $\text{Ca}^{2+}$ -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.

HUXLEY, H. E. The mechanism of muscle contraction. **Science**, v. 164, p. 1359-66, 1969.

INOUE, A. & IKEBE, M. Characterization of the motor activity of mammalian myosin VIIA. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 7, p. 5478-87, 2003.

KACHAR, B. et al. Extensive purification from *Acanthamoeba castellanii* of a microtubule-activated  $\text{Mg}^{2+}$ -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.

KARCHER, R. L.; DEACON, S. W.; GELFAND, V. I. Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. **Trends Cell Biol.**, v. 12, n. 1, p. 21-27, 2002.

KARKI, S. & HOLZBAUR, E. L. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, n. 1, p. 45-53, 1999.

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. & WOJTCZAK, A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases. EC 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. Chem.** v. 17, p. 23-45, 1988.

KUZNETSOV, S. A. & GELFAND, V. I. Bovine brain kinesin is a microtubule activated-ATPase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 8350-54, 1986.

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.

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

LARSON, R. E.; PITTA, D. E.; FERRO, J. A. A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. **Braz. J. Med. Res.**, v. 21, n. 2, p. 213-17, 1988.

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

MARÍN, J. et al. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. **Life Sci.**, v. 64, n. 5, p. 279-303, 1999.

MARUTA, H. & KORN, E. D. *Acanthamoeba* myosin II. **J. Biol. Chem.**, v. 252, n. 18, p. 6501-9, 1977.

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.

NASCIMENTO, A. A. C. et al. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 29, p. 17561-69, 1996.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3 ed. New York: Worth Publishers, 2000.

ORTH, J. D. & MCNIVEN, M. A. Dynamin at the actin-membrane interface. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, p. 31-39, 2003.

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**. Uberlândia. 69 p. Dissertação de mestrado (Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 2001.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **Int. Rev. Cytol.** v. 158, p. 141-214, 1995.

POLLARD, T. D. Structure and polymerization of *Acanthamoeba* myosin-II filaments. **J. Cell Biol.**, v. 95, p. 816-25, 1982.

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

REYNAFARJE, B. D. & PEDERSEN, P. L. ATP synthase. Conditions under which all catalytic sites of the moiety are kinetically equivalent in hydrolyzing ATP. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 32546-50, 1996.

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.

SCHMID, S. L.; MCNIVEN, M. A.; DE CAMILLI, P. Dynamins and its partners: a progress report. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 10, n. 4, p. 504-12, 1998.

SEILER, S. et al. Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, p. 333-38, 2000.

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.

SIMONS, M. et al. Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. **Circ. Res.**, v. 69, p. 530-39, 1991.

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.

SOARES MELO, H. C. **Caracterização de atividade ATPásica de miosina V de cérebro de rato obtida por congelamento.** Uberlândia. 67 p. Dissertação de mestrado (Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 2003.

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. 76-79, 1997.

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

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.

VALE, R. D. & FLETTERICK, R. J. The design plan of kinesin motors. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 13, p. 745-77, 1997.

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.

VALLEE, R. B. et al. Microtubule associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. **Nature**, v. 332, p. 561-63, 1988.

WEBER, J. & SENIOR, A. E. Catalytic mechanism of  $\text{F}_1$ -ATPase. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1319, p. 19-58, 1997.

WINK, M. R. et al. Effect of protein-modifying reagents on ecto-apyrase from rat brain. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 32, p. 105-13, 2000.

WOO, A. L., JAMES, P. F., LINGREL, J. B. Characterization of the fourth  $\alpha$  isoform of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. **J. Membrane Biol.**, v. 169, p. 39-44, 1999.

WU, X.; JUNG, G.; HAMMER, J.A. Functions of unconventional myosins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, p. 42-51, 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.