

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA
ATPase DE CITOSOL DE ENCÉFALO
DE RATO**

Aluna

Carla Mônica Pinheiro

Orientador

Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

SISBI/UFU



1000201942

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
577/112
P654C
TES/MEM

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA
ATPase DE CITOSOL DE ENCÉFALO
DE RATO**

Aluna: CARLA MÔNICA PINHEIRO

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte das exigências do curso
de Pós-graduação em Genética e
Bioquímica para obtenção do título de
Mestre em Genética e Bioquímica.

Uberlândia
Janeiro de 2001

0070-66560

D

SISBI/UFU

201942 *lx.1*

Universidade Federal de Uberlândia
BIBLIOTECA

FU-00012413-7

FICHA CATALOGRÁFICA

P654c Pinheiro, Carla Mônica, 1976
Caracterização parcial de uma ATPase de citosol de encéfalo de rato /
Carla Mônica Pinheiro. - Uberlândia, 2001.
79f. : il.
Orientador: Milton Vieira Coelho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Curso
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Bibliografia: f. 56-69.
1. Proteínas - Teses. 2. Adenosina trifosfatase - Purificação - Teses. 3.
Inibidores enzimáticos - Teses. I. Universidade Federal de Uberlândia.
Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. II. Título.

CDU: 577.112(043)

Aos meus pais, *AGUIDAR* e
EURIDES, meu refúgio de
compreensão, humildade e
exemplo de 45 anos de
amor verdadeiro.

Chegar, neste momento, se revela em vários rumos para partir.

Carla

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Milton Vieira Coelho**, por ter acreditado em mim e proporcionado tantas oportunidades que não se restringiram a ensinamentos bioquímicos mas também, lições de coerência e justiça.

A **Jadir**, que sempre foi mais que irmão, sendo amigo e cúmplice em todos os momentos da vida, dividindo comigo os sorrisos e lágrimas das conquistas e derrotas. Ao casal **Izaura e Zizinho** pelo carinho e apoio de sempre. A todos os meus outros irmãos que de alguma forma, contribuíram para que eu prosseguisse em minha caminhada.

Ao amigo **Marcelo** pela confiança, apoio e aplausos.

A todos amigos e colegas de laboratório: **Maura, Hugo, Edilge, André, e Morum.**

Aos amigos **Andréia, Pablo e Maria de Fátima** pelo apoio e companheirismo.

A todos os **funcionários, amigos e colegas** do Instituto de Genética e Bioquímica que colaboraram para realização deste trabalho.

APOIO:

- Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq)
- VALLÉE.

Abreviaturas Utilizadas

ADP	Adenosina-5'-difosfato
AMP-PNP	Adenil 5'-imidodifosfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
BSA	Soro albumina bovina
CaM	Calmodulina
CM	Carboxi-metil
C-terminal	Carboxi-terminal
CTP	Citosina-5'-trifosfato
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
GTPase	Guanosina trifosfatase
kDa	Kilodaltons
NEM	N-etilmaleimida
N-terminal	Amino-terminal
P-celulose	Fosfo-celulose
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPi	Pirofosfato
S-300	Sephacryl 300 HR

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de
SP	dodecil sulfato de sódio Sulfopropil
TEMED	N, N, N', N'-tetrametilenodiamino
TRIS	Tris-(hidroximetil)aminometano
UTP	Uridina-5'- trifosfato

Sumário

1. Introdução	01
2. Objetivos	04
3. Revisão de Literatura	05
3.1. E-NTPases	07
3.2. Miosinas	10
3.3. Cinesinas	13
3.4. Dineínas	15
4. Material e Métodos	18
4.1. Preparação da Fração ATPase	18
4.2. Método de Dosagem de Proteínas	22
4.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio	23
4.4. Determinação da Atividade Adenosina Trifosfatásica	25
5. Resultados	27
5.1. Preparação da Fração ATPase	27
5.2. Atividade Mg^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ATPásica da Fração ATPase	30

5.3. Atividade K^+ /EDTA-ATPásica	30
5.4. Efeito do Fluoreto de Alumínio sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica	33
5.5. Efeito de Vanadato de Sódio sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica	33
5.6. Efeito de Triton X-100 e Azida sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica	36
5.7. Efeito da Força Iônica sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica	36
5.8. Especificidade do Substrato	40
5.9. Efeito da Concentração do substrato sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica	40
6. Discussão	43
7. Conclusão	51
8. Resumo	52
9. Abstract	54
10. Referências Bibliográficas	56

1. Introdução

Em trabalhos recentes realizados neste laboratório foi isolada e caracterizada parcialmente uma ATPase de citosol de encéfalo de rato (CUNHA, 1999; FREITAS, 1997; SANTOS, 1997).

Segundo SANTOS (1997), a ATPase parcialmente purificada apresenta as seguintes propriedades: - a atividade ATPásica é bem maior que a atividade GTPásica e ADP e PPI não são usados como substratos; - alta atividade ATPásica na presença de Mg^{2+} e atividade praticamente nula na presença de Ca^{2+} ou na ausência de cátions bivalentes; - a atividade Mg^{2+} -ATPásica não é estimulada por Ca^{2+} ou Ca^{2+} /calmodulina;

- a atividade Mg^{2+} -ATPásica não é estimulada por actina e não há atividade K^+ /EDTA-ATPásica;
- a atividade Mg^{2+} -ATPásica não é inibida por azida ou vanadato de sódio, mas apresenta inibição por alumínio, fluoreto, Triton X-100 e alta força iônica;
- a atividade Mg^{2+} -ATPásica é maior em pH ácido.

O principal polipeptídeo presente na fração foi mostrado ser fodrina, uma proteína do citoesqueleto submembranoso, que não apresenta atividade ATPásica (FREITAS, 1997).

O fracionamento em colunas de P-celulose e CM-Sepharose proporcionou a separação entre fodrina e um polipeptídeo de alta massa molecular, acima de fodrina. O polipeptídeo de alta massa molecular co-purificou com a atividade ATPásica, mas maior parte da atividade estava na fração não retida nestas colunas.

De acordo com a sua mobilidade relativa em SDS-PAGE, a massa molecular aparente do polipeptídeo é de 270 kDa e, através de gel filtração, a massa molecular da proteína nativa é aproximadamente 630 kDa (CUNHA, 1999).

O polipeptídeo de 270 kDa foi isolado utilizando resina de DEAE-Sepharose, SP-Sepharose e filtração em Sephacryl 400; aparentemente, a atividade ATPásica não estava associada a este polipeptídeo. Em ensaios com CaM-Agarose, o polipeptídeo se ligou à resina, na presença de Ca^{2+} . Com o objetivo de verificar se era alvo de proteases Ca^{2+} -dependentes, o polipeptídeo foi incubado na presença de calpaína e Ca^{2+} , ocorrendo

clivagem por esta protease. Estes resultados evidenciaram que o polipeptídeo é uma proteína ligante de calmodulina que aparentemente não catalisa a hidrólise do ATP (CUNHA, 1999).

Quando o sobrenadante 50.000 x g /40' foi aplicado sucessivamente em colunas de DEAE-, SP- e Octil-Sepharose, constatou-se que a maior parte da atividade ATPásica estava na fração não retida nestas resinas (MOTA et al., 1999).

Estes resultados levaram ao estudo dos polipeptídeos da fração que não interagiu com as resinas de troca iônica e hidrofóbica, e que estão associados à alta atividade ATPásica.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a atividade ATPásica da fração que não interagiu com colunas de troca iônica frente a efetores e inibidores específicos de ATPases.

3. Revisão de Literatura

ATPases são enzimas que hidrolisam ATP em ADP e ortofosfato; a energia liberada é utilizada em processos metabólicos, transporte de íons através da membrana, movimento e transporte intracelular (KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996; PEDERSEN & CARAFOLI, 1987; VALE & GOLDSTEIN, 1990). A função biológica do ATP não se restringe ao suprimento energético, agindo também como substância sinalizadora extracelular (CHEN et al., 1995).

Dentre as ATPases transportadoras de íons, devem ser destacadas as ATPases de membrana tipo P e tipo F (PEDERSEN & CARAFOLI, 1994).

Durante a catálise, as ATPases tipo P são transitoriamente fosforiladas num resíduo aspartato presente no sítio catalítico; estas ATPases apresentam inibição por vanadato e incluem, entre outras enzimas, Ca^{2+} -ATPases e Na^+/K^+ -ATPase (MOLLER et al., 1996).

Ca^{2+} -ATPases estão envolvidas na regulação da concentração intracelular de Ca^{2+} e estão presentes tanto na membrana plasmática como em sistemas membranosos intracelulares, como o retículo sarcoplasmático (MARIN et al., 1999; MOLLER et al., 1996). Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática é constituída por uma única cadeia polipeptídica de ~134 kDa, com domínio de ligação à calmodulina na extremidade C-terminal (CARAFOLI, 1997).

Na^+/K^+ -ATPases formam uma família de isoenzimas responsáveis pelo transporte ativo de sódio e potássio através da membrana plasmática de células eucarióticas superiores (LINGREL & KUNTZWELER, 1994; WOO et al., 1999; SWEADNER, 1989). São constituídas por subunidade α de ~113 kDa e subunidade β de ~35 kDa que sofre glicosilação, apresentando 54 kDa; associações variadas entre os polipeptídeos α e β resultam em diferentes isoenzimas. A atividade ATPásica dependente de Na^+ e K^+ é inibida por ouabaína e digitonina (LINGREL & KUNTZWEILER, 1994; SWEADNER, 1989).

A ATPase tipo F, F_1F_0 -ATP sintase, sintetiza ATP a partir de ADP e fosfato, utilizando um gradiente eletroquímico transmembrânico (BOYER, 1997). A enzima está presente na membrana plasmática de bactérias,

membranas de tilacóides dos cloroplastos e nas cristas mitocondriais (JUNGE et al., 1997); é constituída por dois complexos protéicos: F_o integrado à membrana, formado pelas subunidades ab_2c_9-12 de 30,17 e 8 kDa, respectivamente e um complexo ligado a F_o , F_1 , constituído pelas subunidades $(\alpha\beta)_3\gamma\delta\epsilon$ de respectivamente, 55, 50, 31, 19 e 14 kDa, estando os sítios catalíticos localizados nas subunidades β (ABRAHAMS et al, 1994; JUNGE et al.,1997; WEBER & SENIOR, 1997). O complexo F_1 quando isolado do complexo F_o , age exclusivamente hidrolisando ATP (REYNAFARJE & PEDERSEN, 1996; WEBER & SENIOR, 1997).

Um enfoque principal neste estudo será dado a famílias de ATPases que apresentam enzimas solúveis como as E-NTPases ou ecto-ATPases, responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatos extracelulares (ZIMMERMANN, 1999) e os motores moleculares como miosinas, cinesinas e dineínas, que convertem a energia de hidrólise do ATP em força e movimento linear ao longo do citoesqueleto (VALE & GOLDSTEIN, 1990).

3.1 E-NTPases

Essas enzimas, também denominadas ecto-ATPases, ecto-apirases ou E-ATPases, hidrolisam nucleotídeos trifosfatos ou tanto nucleotídeos di e

trifosfatos, apresentando distribuição ubíqua em seres eucariotos (KACZMAREK et al., 1996; PLESNER, 1995).

Segundo KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK (1996), E-NTPases estão relacionadas aos processos fisiológicos onde ATP e/ou ADP estão envolvidos. Dentre estes processos, podem ser citados a neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação da pressão sangüínea, permeabilidade de membranas celulares e transporte de macromoléculas e também na reciclagem de nucleotídeos, regulando as atividades de 5'-nucleotidase e adenilato ciclase.

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-trifosfatases (ecto-ATPases) que hidrolisam apenas nucleotídeos trifosfatos (PLESNER, 1995), mas ambas as classes são enzimas glicosiladas com pelo menos um domínio transmembrânico; a estrutura primária apresenta ~55 kDa e 70-80 kDa para proteína glicosilada (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 & KIRLEY, 1999). De acordo com HANDA & GUIDOTI (1996), estas enzimas apresentam uma seqüência altamente conservada denominada ACR ("apyrase conserved regions").

Os produtos gênicos humanos das E-NTPases foram nomeados CD39 e CD39L₁-L₄ (ZIMMERMANN, 1999) baseado na CD39, uma proteína de superfície dos linfócitos, que foi primeiramente sequenciada e identificada

como uma ecto-ATPDase, já que hidrolisa tanto ATP como ADP (KACZMAREK et al., 1996; WANG & GUIDOTI, 1996).

Nem todos os membros da família de E-NTPases são ecto-enzimas; existem formas solúveis destas proteínas como a ATPdifosfohidrolase de tubérculos de batata (HANDA e GUIDOTI, 1996), isoformas de E-NTPases de *Toxoplasma gondii* (ASAI et al., 1995; BERMUDES et al., 1994) e *Tetrahymena thermophila* (SMITH et al., 1997). Algumas características das ecto-enzimas CD39L₂ e CD39L₄ clonadas, sugerem que sejam proteínas solúveis (ZIMMERMANN, 1999). Outras formas solúveis de E-NTPases de mamíferos podem ser secretadas após estimulação da inervação simpática, como demonstrado por TODOROV et al. (1997).

Segundo PLESNER (1995), a baixa concentração de E-NTPases, a co-purificação com outras proteínas, a inibição da atividade enzimática por detergentes que normalmente solubilizam proteínas ligadas a membrana, como Triton X-100, além da falta de especificidade de substrato e cátions bivalentes, são problemas experimentais que dificultam a purificação das E-NTPases.

A inibição por azida 10-20 mM é usada como critério para distinguir as ecto-ATPDases das ecto-ATPases, visto que ecto-ATPDases são inibidas por azida, variando a inibição com a concentração do substrato, íons bivalentes e pH (KNOWLES & NAGY, 1999; PLESNER, 1995; STROBEL et al., 1996).

3.2. Miosinas

Miosinas são proteínas motoras que se deslocam ao longo dos filamentos de actina de maneira dependente de ATP (BAKER & TITUS, 1998).

As miosinas são constituídas pelo domínio motor N-terminal ligado ao domínio cauda através de uma região pescoço que possui sítios de ligação para cadeias leves (VOLKMANN & HANEIN, 2000).

Distintas classes de miosinas foram identificadas em adição à classe de miosinas convencionais ou miosinas II (HASSON et al., 1996). As classes são definidas baseando-se na comparação de seqüências do domínio motor, também denominado cabeça, bem conservado entre as classes de miosinas (MOOSEKER & CHENEY, 1995).

A superfamília das miosinas está envolvida em várias funções celulares como no transporte de organelas e RNA mensageiro, contração muscular, divisão celular, exocitose, manutenção da arquitetura celular e transdução de sinal (WU et al., 2000). Alterações da atividade destes motores muitas vezes levam a desordens neurológicas e neurosensoriais (HASSON & MOOSEKER, 1997; LANGFORD & MOLYNEAUX, 1998).

O domínio cauda da cadeia pesada de várias classes de miosinas contém motivos estruturais encontrados em outras proteínas, sugerindo funções regulatórias e/ou direcionamento da interação de uma dada miosina com sua carga (MERMALL et al., 1998). Dentre estes motivos podem ser citados o domínio GAP ("GTPase-activating protein"), presente em miosinas IX, domínio ph ("plecstrin homology") de miosinas X e domínio SH3 em miosinas de classe I e IV (HASSON & MOOSEKER, 1996) (figura 1). O domínio AF-6 ("AF-6/canoe homology") e o sítio PEST – seqüência rica em prolina, glutamato, serina e treonina- são encontrados em miosinas da classe V (RECK-PETERSON et al., 2000).

Miosinas purificadas exibem diferenças em suas propriedades mecanoquímicas como atividade ATPásica e velocidade de deslocamento nos filamentos de actina, que são reguladas de maneiras diversas. Miosinas I, constituídas por cadeia pesada única de 110-140 kDa, apresentam alta atividade específica Ca^{2+} -ATPásica e K^+ /EDTA-ATPásica, quando comparadas à atividade Mg^{2+} -ATPásica (CONZELMAN & MOOSEKER, 1987; BARYLKO et al., 1992). A atividade Mg^{2+} -ATPásica na presença de actina é estimulada por Ca^{2+} em concentrações de 5-10 μM ; tanto na presença de Ca^{2+} como Mg^{2+} não há especificidade para nucleotídeos trifosfatos como ATP, GTP, UTP, CTP, ITP (CONZELMAN & MOOSEKER, 1987).

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 (MARUTA & KORN, 1977).

Miosina V foi originalmente descrita por LARSON et al. (1988), como uma proteína de 190 kDa ligante de calmodulina, presente em preparações de actomiosina de cérebro, que apresenta atividade Mg^{2+} -ATPásica na presença de actina comparável à atividade das miosinas II, mas miosina V se liga mais fortemente à actina, sendo ativada mesmo por baixas concentrações da mesma (NASCIMENTO et al., 1996). Diferente das miosinas I e II, a miosina V não apresenta atividade K^+ /EDTA-ATPásica considerável. A atividade Mg^{2+} -ATPásica de miosina V na presença de actina é estimulada por Ca^{2+} e Ca^{2+} -calmodulina (ESPINDOLA et al., 1992).

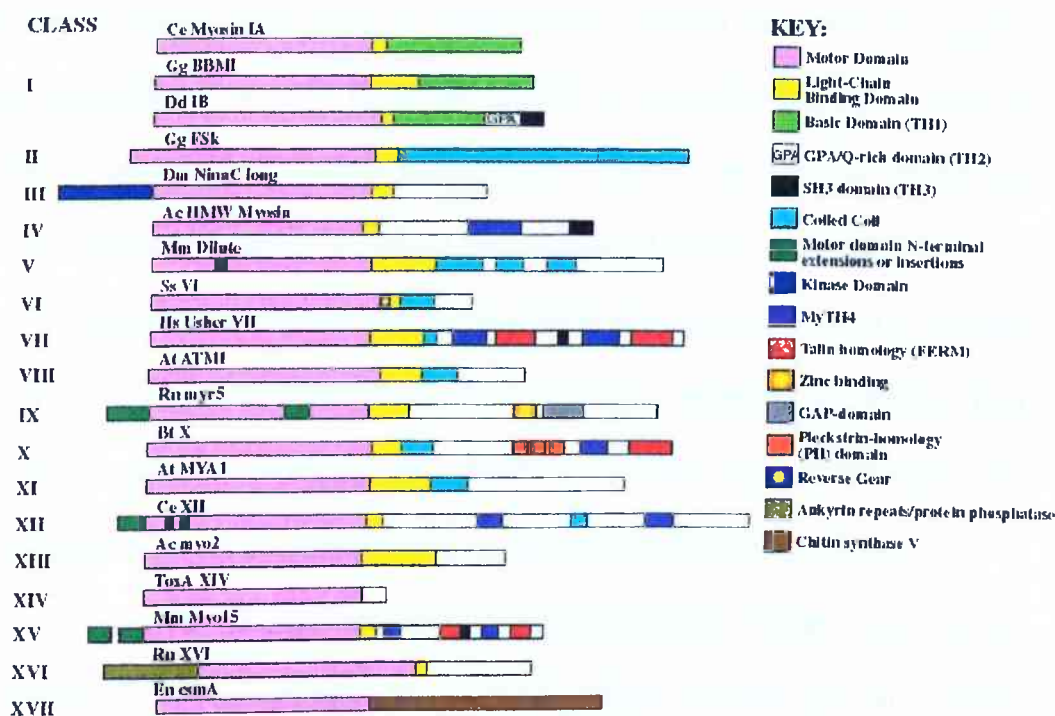


Figura 1: Diagrama esquemático mostrando a diversidade estrutural das miosinas ([http:// www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin](http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin)).

3.3 Cinesinas

Constituem uma superfamília de ATPases associadas a microtúbulos que realizam diversas funções nas células (HIROKAWA et al., 1998).

A molécula de cinesina axoplasmática consiste de duas cadeias pesadas de 110-120 kDa e duas cadeias leves de 64 kDa (HIROKAWA, 1998, VALE et al., 1985). Apresentam 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 as 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).

Diferentes cinesinas são subdivididas baseando-se na sua direção de movimento (para extremidade mais ou para extremidade menos dos microtúbulos), na posição do domínio motor, na composição de subunidades ou na combinação de cadeias leves (SABLIN, 2000).

Transporte de organelas em neurônios, divisão celular, dinâmica de microtúbulos e transporte de melanossomos (HARA et al., 2000; HIROKAWA, 1997; HIROKAWA et al., 1998), são exemplos das atividades celulares onde há envolvimento de cinesinas (figura 2).

As cinesinas apresentam atividade Mg^{2+} -ATPásica estimulada por microtúbulos, mas na ausência destes, a atividade Ca^{2+} -ATPásica é mais elevada (KACHAR et al., 1987; KUZNETSOV & GELFAND, 1986)

A atividade Mg^{2+} -ATPásica das cinesinas sofre inibição por força iônica e NEM (KACHAR et al., 1987). Inibidores de movimento das cinesinas, como vanadato e AMP-PNP, diminuem a atividade ATPásica estimulada por microtúbulos (COHN et al., 1987). Segundo VALE (1987), uma característica das cinesinas é sua forte ligação a microtúbulos na presença de AMP-PNP.

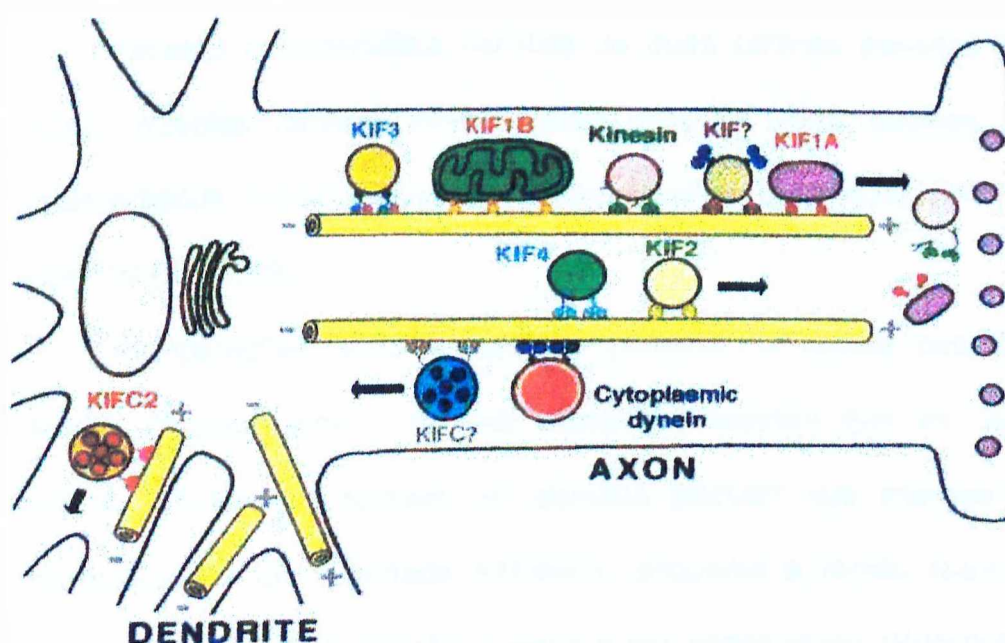


Figura 2: Esquema representativo do transporte de organelas e vesículas pela dineína citoplasmática e cinesinas em células nervosas (HIROKAWA, 1998).

3.4 Dineínas

Dineína foi primeiramente identificada como uma ATPase que desempenha funções essenciais no batimento de cílios e flagelos (GIBBONS & ROWE, 1965); posteriormente dineína citoplasmática foi purificada (LYE et al., 1987; PASCHAL et al., 1987) e mostrou estar envolvida no transporte axonal retrógrado de organelas, ou seja, em direção à extremidade menos dos microtúbulos (HIROKAWA et al., 1990; PASCHAL & VALLE, 1987).

Dineína citoplasmática consiste de duas cadeias pesadas (~500 kDa), múltiplas cadeias intermediárias (~70-74 kDa), cadeias leves intermediárias (~53-59 kDa) e cadeias leves (~8-22 kDa) (KARKI & HOLZBAUR, 1999).

Comparações entre a estrutura primária da cadeia pesada de dineína citoplasmática e dineína axonemal mostram que as regiões central e C-terminal formam um domínio globular que interage com microtúbulos e tem atividade ATPásica, enquanto a região N-terminal compreende o sítio de ligação à carga a ser transportada (HIROKAWA, 1998).

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) (figura 3).

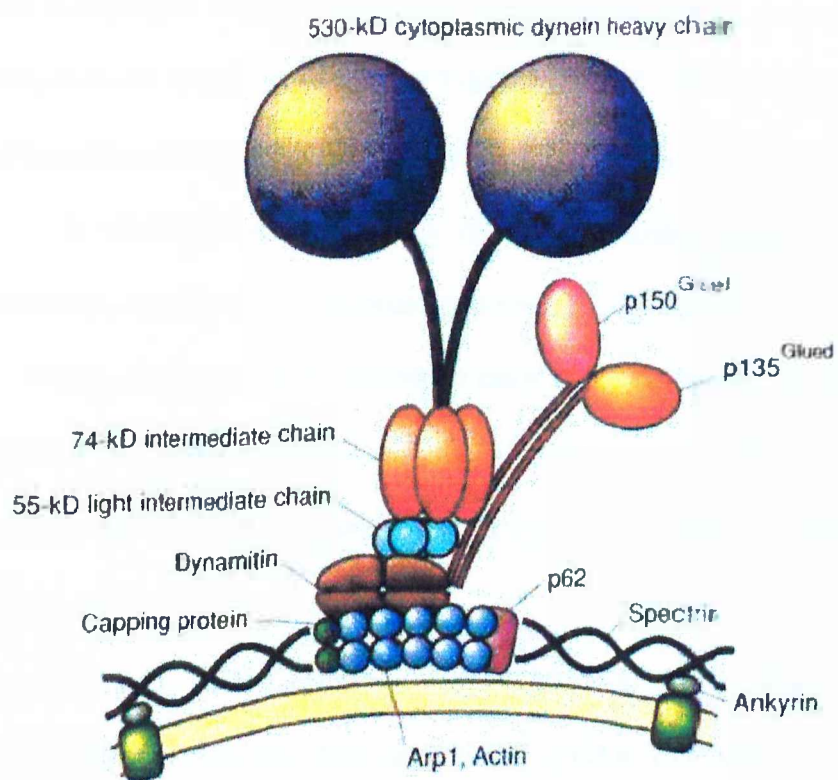


Figura 3: Representação esquemática do complexo dinactina e dineína citoplasmática (HIROKAWA, 1998).

O complexo dineína-dinactina distingue diferentes cargas e realiza diversas funções celulares como segregação cromossômica, formação do fuso e migração nuclear (KARKI & HOLZBAUR, 1999), posicionamento do complexo de Golgi (LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 1998), transporte axonal retrógrado e endocitose (HIROKAWA, 1998) (figura 2).

A atividade ATPásica da dineína citoplasmática requer cátions bivalentes, sendo maior na presença de Mg^{2+} do que Ca^{2+} (SHPETNER et al., 1988), similar ao que acontece com a forma axonemal (GIBBONS & FRONK, 1979). Vanadato 10 μM e NEM 1 mM inibem em 50 % a atividade da dineína citoplasmática (LYE et al., 1987; SHPETNER et al., 1988).

Segundo SHPETNER et al. (1988), dineína citoplasmática de cérebro distingüe-se por hidrolisar GTP, CTP, e TTP com maior atividade do que ATP, mas o transporte baseado em microtúbulos não é mantido por nucleotídeos diferentes de ATP (PASCHAL & VALLE, 1987). A atividade ATPásica estimulada por microtúbulos é fortemente afetada por força iônica e a presença de agentes redutores durante a purificação, como DTT 1 mM, também afetam a atividade ATPásica da dineína citoplasmática de cérebro (SHPETNER et al., 1988).

4. Material e Métodos

4.1. Preparação da Fração ATPase

Ratos Wistar adultos foram sacrificados e os encéfalos imediatamente removidos, lavados em solução salina gelada e congelados em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os encéfalos foram estocados em temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cerca de 15 g de encéfalos foram colocados em 50 mL de tampão de extração (Imidazol 50 mM pH 8.0 contendo Sacarose 250 mM, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, Aprotinina 1%, Benzamidina 1 mM, PMSF 0,3 mM e Calpastatina 1 $\mu\text{L/mL}$) e homogeneizados manualmente em

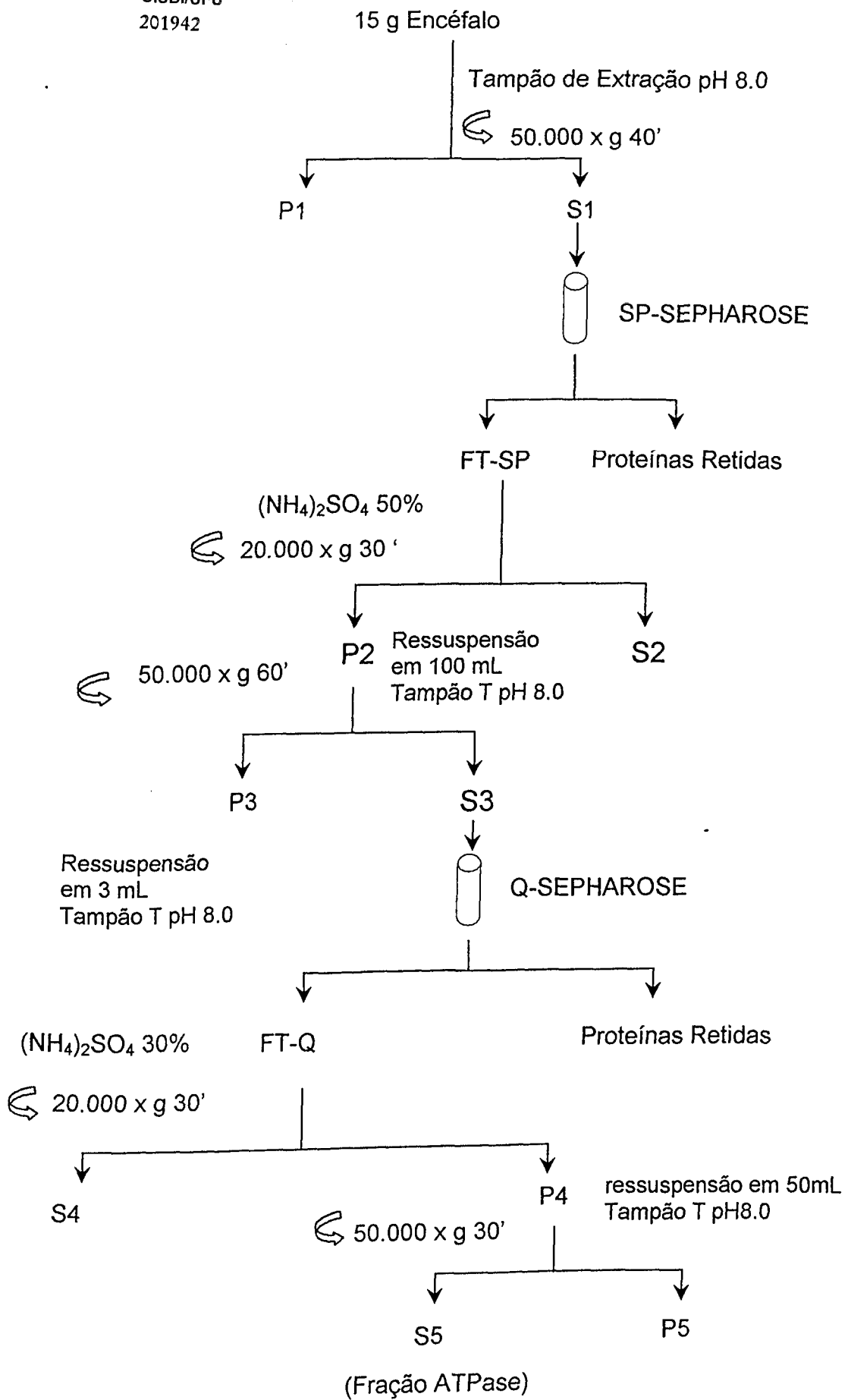
homogeneizador de vidro tipo Potter (fluxograma I). O material obtido foi centrifugado a 50.000 x g durante 40 minutos a 4 °C em centrífuga Beckman Avanti J-25.

A fração precipitada P1 foi descartada e a fração protéica solúvel S1 foi aplicada a uma coluna de SP-Sepharose (6,0 x 2,5 cm; 25 mL) com um fluxo de 700 µl/min. A coluna de SP-Sepharose foi previamente equilibrada com tampão Imidazol 20 mM pH 8.0 contendo EDTA 0,1 mM e DTT 0,1 mM e lavada com este mesmo tampão de equilíbrio. A fração protéica que, nestas condições, não ficou retida `a coluna de SP-Sepharose ("Flow Through") foi coletada e denominada FT-SP.

Após precipitação com sulfato de amônio 50 % de saturação, a fração protéica FT-SP foi centrifugada a 20.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. A fração solúvel obtida, S2, foi mantida para análises posteriores enquanto a fração precipitada, P2, foi ressuspensa em 100 mL de tampão T (tampão Tris 20 mM pH 8.0 contendo EDTA 0,1 mM e DTT 0,1 mM) e uma nova centrifugação foi realizada a 50.000 x g durante 1 h a 4 °C.

A fração protéica precipitada P3 foi ressuspensa em 3 mL de tampão T pH 8.0 e mantida para análises posteriores. A fração solúvel S3 foi aplicada a uma coluna de Q-Sepharose (10 x 1,5 cm; 25 mL) a um fluxo de 700 µl/min. A coluna foi previamente equilibrada com tampão T pH 8.5 e lavada com o mesmo tampão. A fração protéica que não ficou retida `a coluna de Q-Sepharose nestas condições (FT-Q) foi coletada e precipitada com sulfato de amônio 30 % de saturação, sendo submetida a centrifugação a 20.000 x g durante 30 minutos a 4 °C (Fluxograma I).

A fração S4 obtida foi mantida para posterior análise. A fração P4 foi ressuspensa em 50 mL de tampão T pH 8.0 e centrifugada a 50.000 x g por 30 minutos a 4 °C, resultando em uma fração precipitada, P5, ressuspensa em 2 mL de tampão T pH 8.0 e uma fração solúvel S5 denominada fração ATPase.



Fluxograma I: Preparação da Fração ATPase

4.2. Método de Dosagem de Proteínas

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

O volume de 10 μl das frações obtidas durante o preparo da fração ATPase foi adicionado a 90 μL de H_2O em tubos de vidro. 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. A absorvância foi medida em 595 nm.

Paralelamente à dosagem protéica das frações, uma curva padrão de dosagem de soroalbumina bovina (BSA) foi preparada. A curva mostrou linearidade entre 0 e 25 μg de BSA.

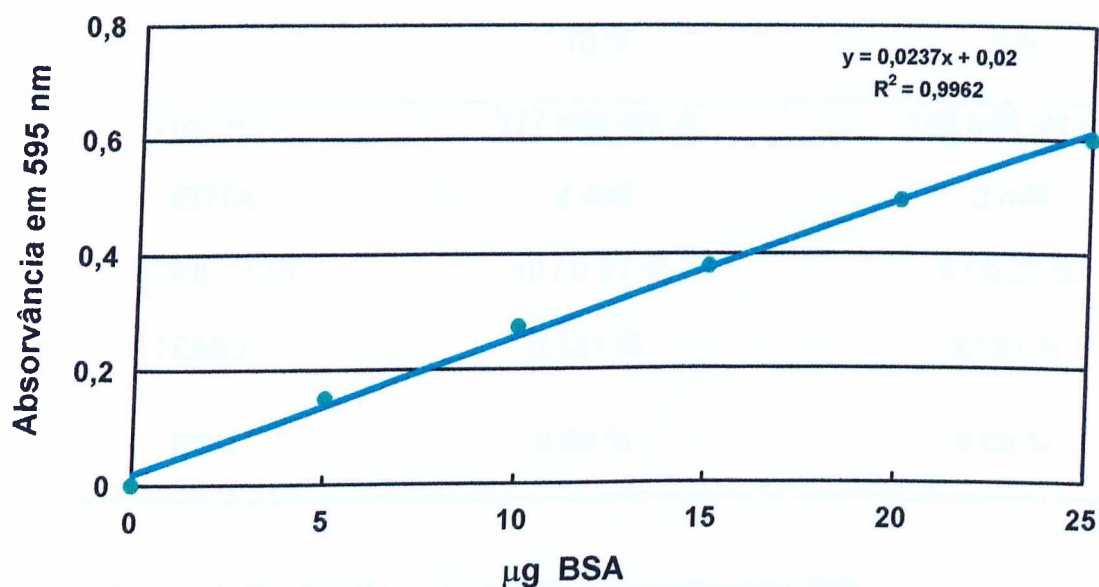


Figura 4 : Exemplo de uma curva padrão de dosagem de BSA

4.3. 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 tampão descontínuo de Laemmli e Favre (1973) e o sistema de placas empregado por Studier (1973).

Os mini-géis foram preparados em concentração de 10 % de acrilamida (gel de separação) utilizando os reagentes listados na tabela I, que indica suas respectivas concentrações finais. Os géis foram montados entre placas de vidro e alumina de 10 x 10 x 0,06 cm.

	SEPARAÇÃO	EMPILHAMENTO
	10 %	5 %
Tris-HCL	377 mM pH .8	125 mM pH 6,8
EDTA	2 mM	2 mM
ACRIL / BIS	10 / 0.27 %	5 / 0.27 %
TEMED	0,121 %	0,121 %
PSA	0.06 %	0.09 %

Tabela I: Protocolo para gel de poliacrilamida 10%

As amostras protéicas foram preparadas adicionando-se 90 μ l de amostra a 10 μ l de tampão Tris 0,05 M pH 6,8 contendo β -mercaptoetanol 10 %, SDS 8,75 %, EGTA 0,11 M, Sacarose 20 % e azul de bromofenol 0,25 %. Antes da aplicação, as amostras foram colocadas em H₂O em ebulição por 2 minutos.

Utilizando microseringa de vidro Hamilton[®], as amostras foram aplicadas ao gel, devidamente montado em cuba Hoefer[®] SE 250.

A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida em tampão Tris 25 mM pH 8,3, EDTA 2 mM, Glicina 0,2 M, SDS 2,5 mM, sob corrente constante de 25 mA utilizando fonte BIO-RAD Power Pac 1000.

Os géis foram corados com Coomassie brilliant blue-R 0,25 % em metanol 50 % e ácido acético 10 % e descorados em solução de metanol 30 % e ácido acético 10 %.

O padrão SDS-HMW Amersham Pharmacia Biotech foi utilizado como referência de massa molecular relativa : miosina-212 kDa, α_2 macroglobulina-170 kDa, β -galactosidase-116 kDa, transferrina-76 kDa e glutamato desidrogenase-53 kDa.

4.4. 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 e Lahti (1981).

A cada tubo de ensaio foram adicionados 40 μ L do 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 para dosagem da atividade Mg^{2+} -ATPásica ou Ca^{2+} -ATPásica, respectivamente. O meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 2 mM contendo KCl 60 ou 600 mM, foi utilizado para dosagem de atividade K^+ /EDTA-ATPásica.

Volumes pré-determinados de amostras das frações protéicas foram adicionados aos tubos e o volume final de 200 μ l foi completado com adição de H_2O .

A reação foi iniciada com adição de substrato, seguida da incubação a 37° C durante 20 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 a agitação. Após 15 segundos, 200 μ l de ácido cítrico 1 M foram adicionados mantendo-se a agitação por mais 15 segundos. Foram preparadas reações controle para cada amostra, nas quais a incubação se procedeu sem a adição de

substrato, adicionado imediatamente antes de interromper a reação com solução de dosagem AAM.

As reações foram realizadas em duplicata e a absorvância medida em 355 nm. Paralelamente foi feita uma curva padrão de ortofosfato inorgânico, que se mostrou linear entre 0 e 250 nmols de ortofosfato.

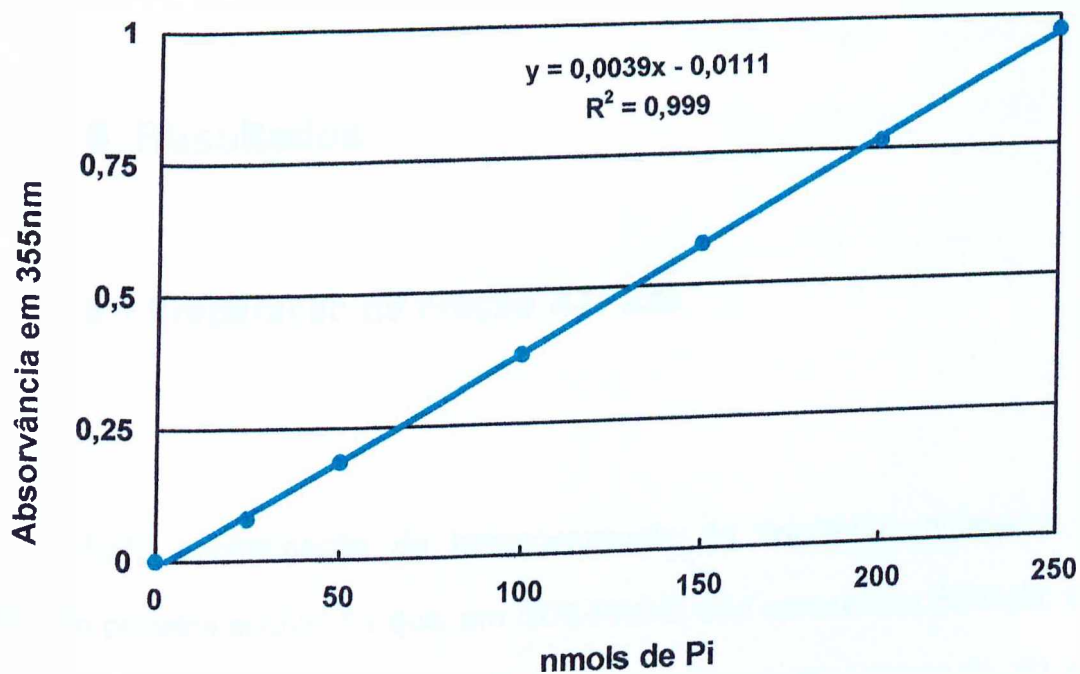


Figura 5: Exemplo de uma curva padrão de dosagem de Pi

5. Resultados

5.1 Preparação da Fração ATPase

Após centrifugação do homogeneizado de encéfalos, obteve-se a fração protéica solúvel S1 que, em SDS-PAGE, não apresentou definição de bandas polipeptídicas devido à alta concentração protéica (figura 6). P1 se apresentou bastante particulado e foi descartado. Foi detectada alta atividade ATPásica na fração que não interagiu com a resina SP-Sepharose e que, em SDS-PAGE, mostrou um arraste protéico.

A fração P2, obtida da precipitação de FT-SP com sulfato de amônio 50%, mostrou a presença de uma banda polipeptídica mais enriquecida de

54 kDa e uma banda mais definida de 160 kDa. A atividade ATPásica específica da fração P2 foi de 37,71 nmols de Pi/ mg prot/ min (tabela II).

Do fracionamento de S3 em resina de Q-Sepharose resultou uma fração protéica que não interagiu com a resina, e em SDS-PAGE mostrou os polipeptídeos de 160 kDa e 54 kDa, referidos anteriormente. A fração S3 continha 155 mg de proteínas; após fracionamento em Q-Sepharose, FT-Q apresentou 54 mg de proteínas; embora tenha havido perda protéica considerável, não houve alteração significativa na atividade total.

Após precipitação com sulfato de amônio 30% alcançou-se uma purificação de 70 vezes na fração S5, denominada fração ATPase. Nesta fração constatou-se a co-purificação dos polipeptídeos de 160 e 54 kDa.

	Proteínas (mg/mL)	Atividade Específica (nmolsPi/mgprot/min)	Purificação (x)
S1	10	1.39	1
FT/ SP	7	11.86	8.5
P2	1.85	37.71	27
S3	1.63	30.09	22
FT/ Q	0.54	98.64	71
P4	0.8	95.17	68.5
S5	1.0	97.67	70

Tabela II : Purificação da Fração ATPase

100 μ L das frações 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 com a adição de ATP 1 mM (concentração final), incubada a 37 °C durante 20 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. Proteínas foram dosadas pelo método de Bradford.

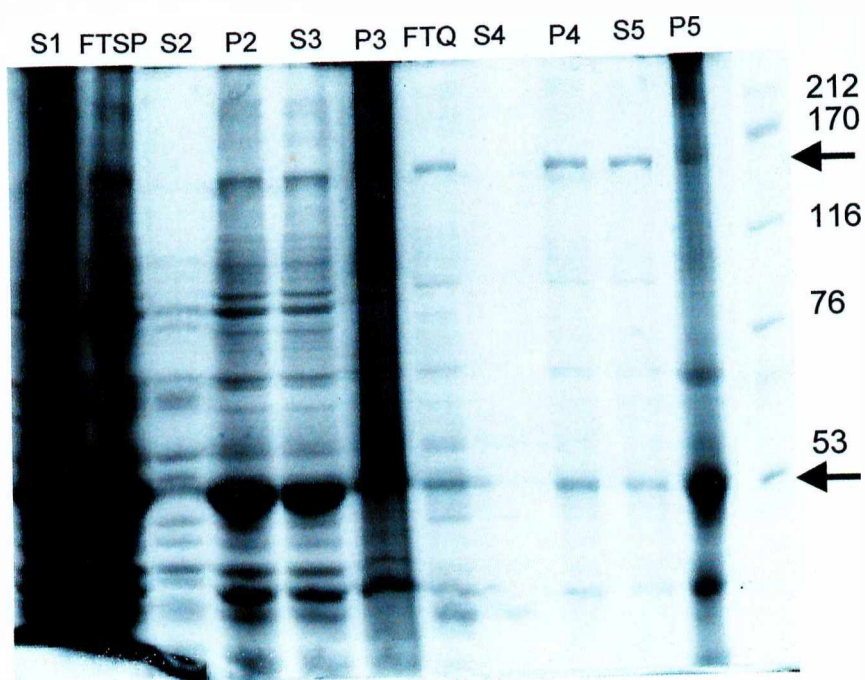


Figura 6: SDS-PAGE das frações da preparação da ATPase

Foram aplicados 5 μ L de amostra das frações em gel de poliacrilamida 10 %. O gel foi corado com Coomassie Blue R. Os valores e as setas à direita indicam padrões de peso molecular e o polipeptídeo de 160 e 54 kDa, respectivamente.

5.2. Atividade Mg^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ATPásica da fração ATPase:

De acordo com a figura 7, na presença de $CaCl_2$ 2 mM, a atividade Mg^{2+} -ATPásica sofreu um aumento de aproximadamente 10 %. A fração não apresentou atividade Ca^{2+} -ATPásica.

5.3. Atividade K^+ /EDTA-ATPásica:

Atividade K^+ /EDTA-ATPásica foi usada como uma maneira de caracterizar atividade específica de miosinas que, em meio livre de cátions bivalentes, apresentam atividade ATPásica estimulada por alta concentração de sal.

A fração ATPase foi incubada em meio deficiente em cátions bivalentes, na presença de KCl 60 ou 600 mM. A atividade se mostrou nula tanto em alta quanto baixa concentração de KCl (figura 8).

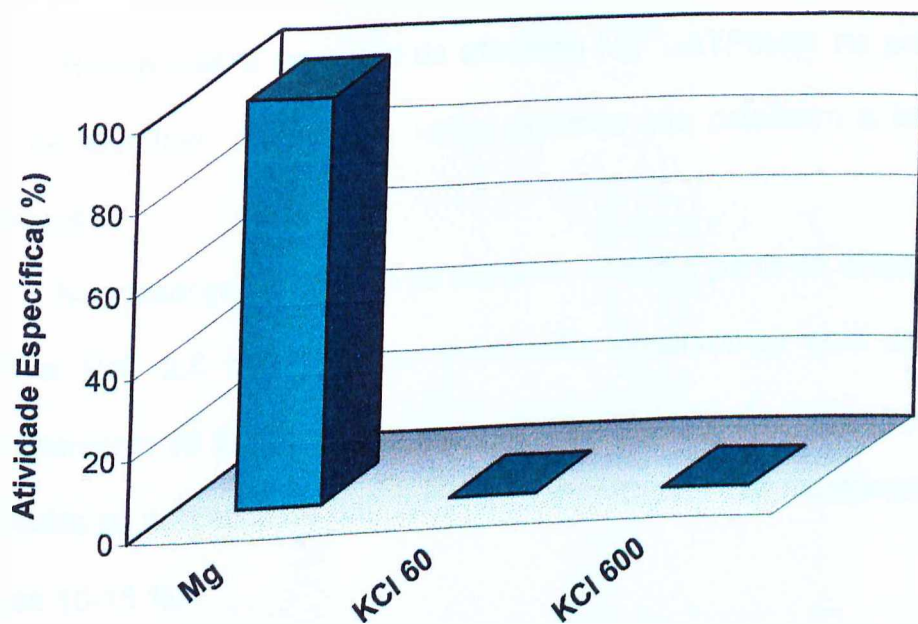


Figura 8: Atividade K^+ /EDTA-ATPásica

A atividade K^+ /EDTA-ATPásica foi determinada em meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 2 mM contendo KCl 60 ou 600 mM, conforme indicado. Para determinação da atividade Mg^{2+} -ATPásica, a fração ATPase foi incubada a 37 °C durante 20 minutos em meio de reação Imidazol 25 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, contendo $MgCl_2$ 4 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM (concentração final), incubada a 37 °C durante 20 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

5.4. Efeito do Fluoreto de Alumínio sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica:

Realizou-se a dosagem da atividade Mg^{2+} -ATPásica na presença de fluoreto de alumínio, inibidor de várias enzimas que catalizam a hidrólise de nucleotídeos.

Na presença de fluoreto de alumínio, obtido a partir da adição de $AlCl_3$ 0,5 mM e NaF 2,5 mM ao meio de reação, observou-se uma redução de aproximadamente 30 % na atividade Mg^{2+} -ATPásica da fração ATPase (tabela III). As atividades na presença de NaF 2,5 mM ou de $AlCl_3$ 0,5 mM mostraram redução de apenas 10-15 %.

5.5. Efeito de Vanadato de Sódio sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica:

Vanadato é estruturalmente similar ao fosfato e tem ação inibitória sobre diversas ATPases. Algumas ATPases se mostram mais sensíveis, sendo inibidas em baixas concentrações de vanadato.

A fração ATPase na presença de vanadato de sódio 1 mM mostrou inibição de aproximadamente 30 % em sua atividade Mg -ATPásica. A inibição foi menor em concentração 50 μ M de vanadato (figura 9).

	Atividade Específica (%)
Mg/ATP	100
Fluoreto de Sódio 2,5 mM	86
Cloreto de Alumínio 0,5 mM	92
Fluoreto de Alumínio	70

Tabela III: Efeito do Fluoreto de Alumínio sobre a Atividade Mg-ATPásica
50 μ 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, $AlCl_3$ 0,5 mM e/ou NaF 2,5 mM foram adicionados como indicado. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM (concentração final), incubada a 37 °C durante 20 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

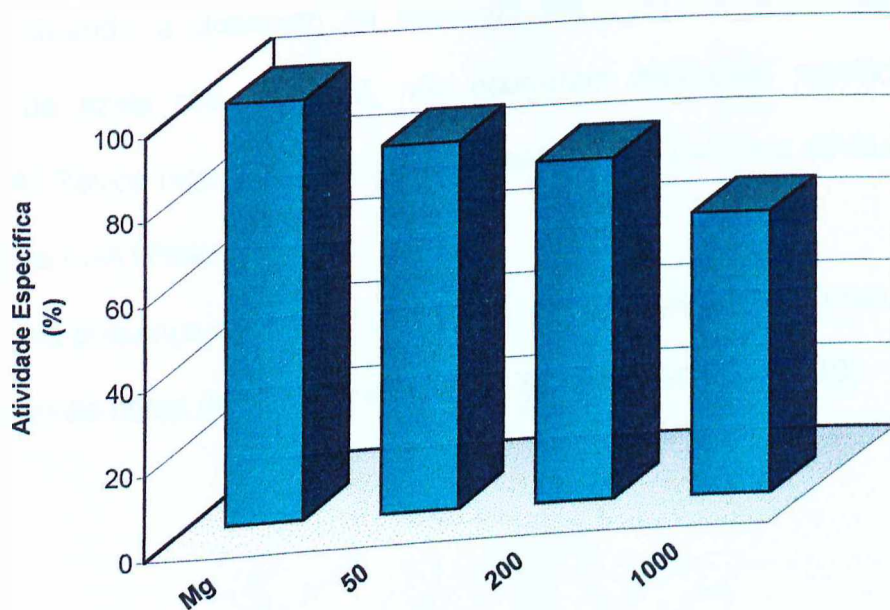


Figura 9: Efeito do Vanadato de Sódio sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica
50 μ L da fração ATPase foram adicionados ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo $MgCl_2$ 4 mM e Vanadato de Sódio nas concentrações indicadas (μ M). A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM (concentração final), incubada a 37 °C durante 20 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

5.6. Efeito de Triton X-100 e Azida sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica:

Quando a dosagem da atividade Mg^{2+} -ATPásica foi realizada na presença de azida sódica 1 mM, não ocorreram alterações significativas na atividade ATPásica (figura 10). Azida tem efeito inibitório sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de F_1 -ATPase.

Na presença de Triton X-100 0,2 %, um detergente não-iônico, notou-se uma redução de cerca de 65 % da atividade Mg^{2+} -ATPásica (figura 10)

5.7. Efeito da força iônica sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica:

A adição de NaCl ou KCl 0,3 M ao meio de reação mostrou, em ambas as reações uma diminuição de cerca de 60 % da atividade Mg^{2+} -ATPásica (figura 11).

Para verificar a inibição dependente da concentração de sais na atividade da fração ATPase, a reação foi realizada em diferentes concentrações de KCl como mostra a figura 12. Na presença de KCl 75 mM, ocorreu diminuição de 10 % da atividade Mg^{2+} -ATPásica, atingindo em 600 mM uma redução de 75 %.

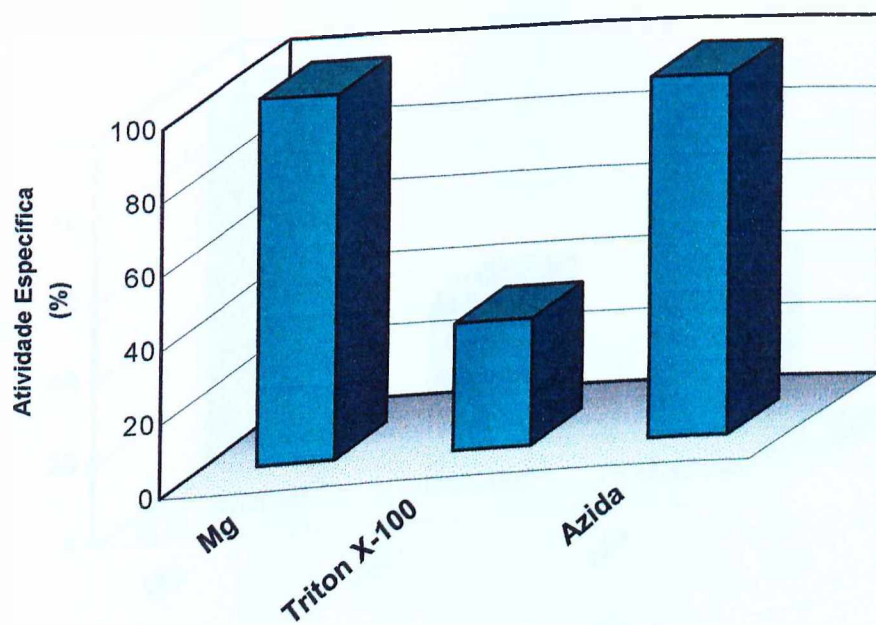


Figura 10: Efeito de Triton X-100 e Azida sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica
Adicionou-se 80 μ L da fração ATPase ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo $MgCl_2$ 4 mM. Triton X-100 0,2 % e Azida 1 mM foram adicionados onde indicado. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM (concentração final), incubada a 37 °C durante 20 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

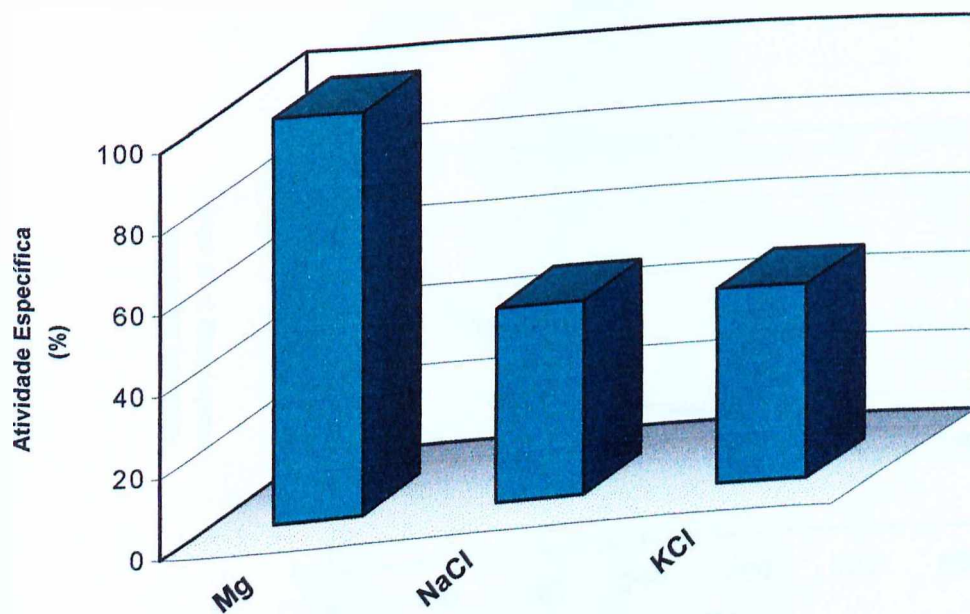


Figura 11: Efeito da força iônica sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica
Adicionou-se 80 μ L da fração ATPase ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 4 mM. NaCl ou KCl 0,3 M foram adicionados como indicado. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM (concentração final), incubada a 37 °C durante 20 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

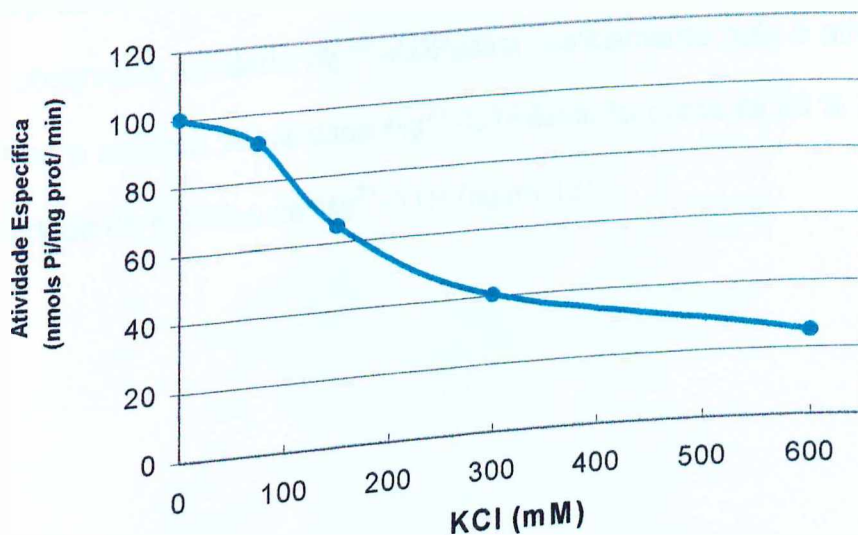


Figura 12: Curva de Inibição KCl
Adicionou-se 100 μ l da fração ATPase ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo $MgCl_2$ 4 mM. KCl foi adicionado nas concentrações indicadas. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM (concentração final), incubada a 37 $^{\circ}$ C durante 20 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

5.8. Especificidade do Substrato:

Com o objetivo de verificar a hidrólise de outros nucleotídeos pela fração ATPase, as reações foram dosadas frente a GTP, PPI, ou ADP em concentrações de 1 mM.

Foi observada atividade Mg^{2+} -ADPásica praticamente nula e atividade pirofosfatásica ausente. A atividade Mg^{2+} -GTPásica foi cerca de 85 % menor que a atividade de hidrólise de Mg^{2+} -ATP (figura 13).

5.9. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica:

A atividade específica da fração ATPase quando verificada na presença de concentrações diferentes de ATP aumenta com o aumento da concentração de substrato, até 2,5 mM de ATP (figura 14). Em concentrações superiores a 5 mM ocorreu decaimento da atividade enzimática que, em 20 mM ATP, apresentou-se bem menor que a atividade apresentada em concentrações 2,5 a 5 mM de ATP.

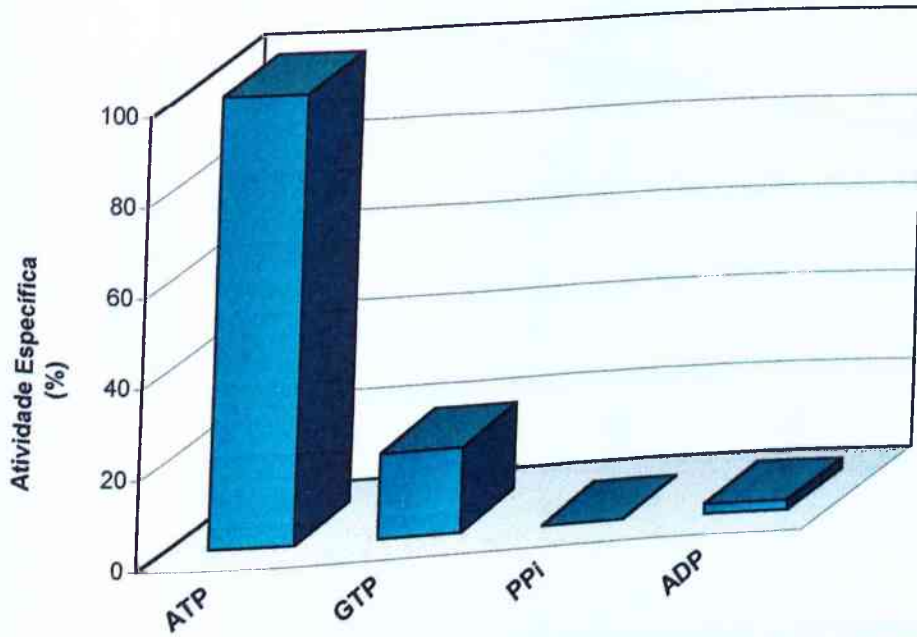


Figura 13: Especificidade de Substrato
50 μ L da fração ATPase foram adicionados ao meio de reação Imidazol 25 mM 50 μ L da fração ATPase foram adicionados ao meio de reação Imidazol 25 mM 50 μ L da fração ATPase foram adicionados ao meio de reação Imidazol 25 mM 50 μ L da fração ATPase foram adicionados ao meio de reação Imidazol 25 mM 50 μ L da fração ATPase foram adicionados ao meio de reação Imidazol 25 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP, GTP, ADP ou PPI 1 mM (concentrações finais), iniciada com a adição de ATP, GTP, ADP ou PPI 1 mM (concentrações finais), iniciada com a adição de ATP, GTP, ADP ou PPI 1 mM (concentrações finais), iniciada com a adição de ATP, GTP, ADP ou PPI 1 mM (concentrações finais), iniciada com a adição de ATP, GTP, ADP ou PPI 1 mM (concentrações finais), incubadas a 37 $^{\circ}$ C durante 20 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

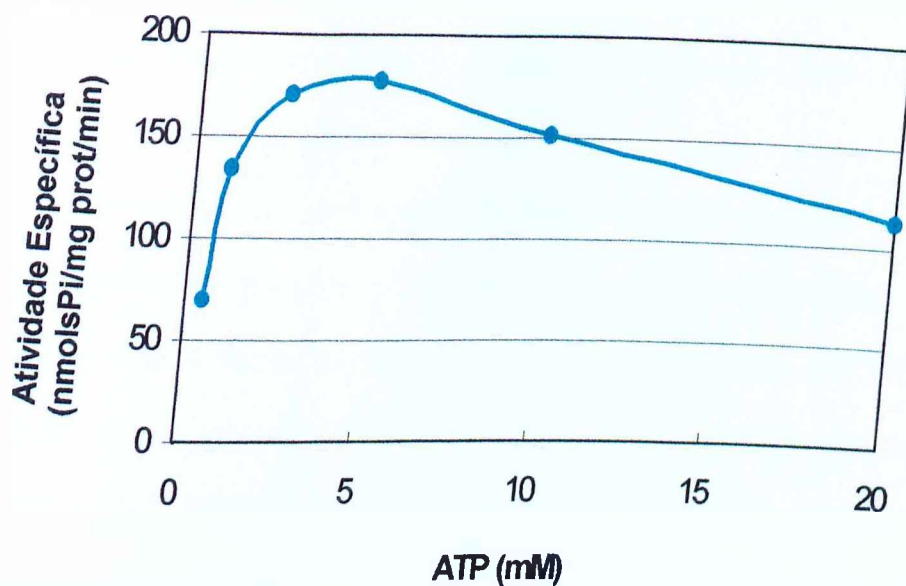


Figura 14: Efeito da Concentração do Substrato sobre a Atividade Mg^{2+} -ATPásica
Adicionou-se 100 μ l da fração ATPase ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo $MgCl_2$ 4 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10 ou 20 mM (concentração final), como indicado, incubada a 37 °C durante 20 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

6. Discussão

Os resultados do presente trabalho mostram a obtenção de uma fração enriquecida em atividade ATPásica a partir de citosol de encéfalo de rato. A fração que não interagiu com as colunas de troca iônica utilizadas sempre mostrou, em SDS-PAGE, a presença de dois polipeptídeos principais, de 160 e 54 kDa, que co-purificavam com a atividade ATPásica. Utilizando resina de filtração em gel, S-300, esperava-se que os polipeptídeos fossem eluídos em frações distintas, mas co-purificaram-se nas primeiras frações obtidas (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que ocorra interação entre os referidos polipeptídeos.

O polipeptídeo de 54 kDa apresentou maior enriquecimento nas frações P2 e S3 (figura 6). A aplicação de S3 em Q-Sepharose

possibilitou um aumento considerável da atividade específica da fração que não interagiu com as colunas de troca iônica. A fração FT-Q mostrou em SDS-PAGE uma banda polipeptídica de 54 kDa menos densa, mas a purificação de 21 vezes aumentou para 70 e a atividade total não sofreu alteração considerável nesta etapa (Tabela II).

Ao tampão de extração não foram adicionados agentes para solubilização de proteínas de membrana como detergentes. Assim espera-se que a fração S1, obtida a partir de centrifugação a 50 000 x g durante 40 minutos, não contenha ATPases de membrana como Na⁺/K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase ou F₁F₀-ATPase. A mobilidade relativa dos polipeptídeos da fração ATPase, S5, se distinguem das subunidades de outras ATPases conhecidas. Na⁺/K⁺-ATPase é constituída por subunidade α de 113 kDa e subunidade β de 35 kDa (LINGREL & KUNTZWEILER, 1994); Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática apresenta ~134 kDa (MOLLER et al., 1996); F₁F₀-ATPase apresenta o complexo F₀ constituído por subunidades a, b₂, c₉₋₁₂, de 30, 17 e 8 kDa, respectivamente; a porção F₁ é constituída das subunidades α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ , de 55, 50, 31, 19 e 14 kDa, respectivamente (BOYER, 1997). Como observado, o complexo F₁ é constituído por subunidades de 55 e 50 kDa que se apresentam em proporção de 1:1. Em nossas condições de ensaio, provavelmente não haveria separação entre estas subunidades. A fração ATPase não apresenta um polipeptídeo de 50 kDa na mesma proporção referida para as subunidades do complexo F₁.

A atividade Mg²⁺-ATPásica da fração ATPase de encéfalo, quando dosada na presença de íons Ca²⁺, não sofreu alterações e a atividade

Ca^{2+} -ATPásica foi nula, contrastando com ATPases como cinesinas de cérebro, que apresenta atividade Ca^{2+} -ATPásica maior que a Mg^{2+} -ATPásica quando na ausência de microtúbulos (KUTZNETSOV & GELFAND, 1986); dineínas e ecto-ATPases solúveis apresentam atividade Mg^{2+} -ATPásica maior que a Ca^{2+} -ATPásica, mas ambas ATPases apresentam atividade na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} (SHPETENER, 1988; SMITH et al., 1997). A fração ATPase também apresenta comportamento distinto de miosinas frente a cátions bivalentes; miosinas I e II apresentam atividade Ca^{2+} -ATPásica maior que a atividade Mg^{2+} -ATPásica (CONZELMAN & MOOSEKER, 1987; MARUTA & KORN, 1977).

Ensaio em que a atividade ATPásica foi verificada em meio livre de cátions bivalentes, mas na presença de alta força iônica (K^+ /EDTA-ATPase), sugerem a ausência de miosinas na fração ATPase, visto que miosinas I e II apresentam alta atividade K^+ /EDTA-ATPásica (CONZELMAN & MOOSEKER, 1987; MARUTA & KORN, 1977). Miosinas de classe V não apresentam atividade K^+ /EDTA-ATPásica considerável (ESPINDOLA et al., 1992; NASCIMENTO et al., 1996), mas diferem da fração ATPase de encéfalo por serem constituídas de cadeia pesada de 190 kDa e múltiplas cadeias leves de calmodulina de 21 kDa (CHENEY et al., 1993; LARSON et al., 1988). A análise em SDS-PAGE da fração ATPase não mostra polipeptídeos com massas moleculares correspondentes aos referidos acima.

De acordo com CHABRE (1990), em soluções aquosas de fluoreto de sódio, o alumínio forma complexos iônicos com o fluoreto, onde a

espécie de fluoreto de alumínio presente, $\text{AlF}_x^{(x-3)}$, depende do excesso de concentração de íons fluoreto. O fluoreto de alumínio tem alta afinidade para os sítios ligantes de nucleotídeos das ATPases, sendo um análogo do γ -fosfato do ATP. Na presença de NaF 2,5 mM e AlCl_3 0,5 mM, a fração ATPase foi inibida em 30% (Tabela III). F_1 -ATPase apresenta inibição de 70% da sua atividade na presença de NaF 5 mM e AlCl_3 100 μm (LUNARDI et al., 1988). A atividade Mg^{2+} -ATPásica de miosina II é inibida em concentrações de NaF 2,5 mM e AlCl_3 0,5 mM (MARUTA et al., 1993).

Dinamina é uma GTPase envolvida nos processos de endocitose mediados por clatrina e reciclagem de vesículas sinápticas (SCHMID et al., 1993). Foi primeiramente identificada como um polipeptídeo de 100 kDa que estava presente em ensaios de purificação de dineína e cinesina de cérebro (SHPETNER & VALLE, 1989). A enzima é altamente específica para GTP, sendo a atividade GTPásica inibida em 80% por NaF 2,4 mM e AlCl_3 0,1 mM (SHPETNER & VALLE, 1992). A atividade GTPásica da fração de encéfalo é 80% menor que a sua atividade ATPásica, o que mostra a maior especificidade das enzimas da fração por ATP e também sugere que dinamina não seja a responsável pela atividade GTPásica observada.

Vanadato, semelhante ao fluoreto de alumínio, atua como um análogo do γ -fosfato, se ligando ao ADP presente no sítio catalítico e formando uma estrutura pentacovalente semelhante ao γ -fosfato do ATP, durante a hidrólise (CHABRE, 1990). Vanadato inibe ATPases do tipo P, como Na^+/K^+ -ATPase (CANTLEY et al., 1977) e Ca^{2+} -ATPase

(CARAFOLI, 1991) e também outras ATPases. De acordo com SHPETNER et al., 1988, dineína de cérebro sofre inibição de 50% por vanadato 5-10 μM , o mesmo obtido por LYE et al. (1988), onde dineína de *Caenorhabditis elegans* mostra o mesmo perfil de inibição por vanadato 10 μM . Cinesina de cérebro não apresenta inibição considerável por vanadato 10 μM , ocorrendo apenas 27% de inibição (KUTZNETSOV & GELFAND, 1986); em concentrações de 10-200 μM houve inibição de 20% da atividade ATPásica da cinesina purificada de *Acanthamoeba castellanii* (KACHAR et al., 1987). Os resultados obtidos para cinesina estão em acordo com a inibição apresentada pela fração ATPase (Figura 9), que em concentrações de vanadato 200 μM apresentou 30% de inibição e mesmo em concentração de 1 mM foi inibida em menos de 40%. A atividade Mg^{2+} -ATPásica das miosinas é inibida em 50% por vanadato 500 μM , o que mostra sua menor sensibilidade a este inibidor (GOODNO, 1979).

Cinesina purificada de cérebro bovino apresenta aumento da atividade ATPásica na presença de Triton X-100 0,2%, um detergente não iônico (KUTZNETSOV & GELFAND, 1986); diferente do apresentado pela fração ATPase, cuja atividade ATPásica foi inibida em 65%, quando na presença de Triton X-100 0,2% (Figura 10). Triton X-100 0,2% não tem efeito considerável na atividade ATPásica de dineína de cérebro (SHPETNER et al., 1988), embora estimule outras formas de dineína (GIBBONS & FRONK, 1979). Algumas ecto-ATPases solúveis não são inibidas por Triton X-100 1% (SMITH et al., 1997).

Em presença de alta força iônica (KCl ou NaCl 0.3 M), ocorreu inibição de 60% da atividade da fração ATPase como mostrado na figura 11. Dineína citoplasmática apresenta aumento da atividade ATPásica em meio contendo alta força iônica e ausência de microtúbulos (SHPETNER et al., 1988).

Atividade ATPásica da fração ATPase não foi inibida por azida sódica 1 mM. De acordo com MUNHEYUKI et al. (1993), F_1 -ATPase é inibida em 50% por azida 5 μ M. Algumas ecto-ATPDases também são inibidas por azida; a inibição varia com pH, concentração de substrato e cátions bivalentes (KNOWLES & NAGY, 1999).

Ecto-ATPDases são caracterizadas por hidrolisarem nucleotídeos trifosfato e difosfatos e serem inibidas por azida, ao contrário das ecto-ATPases que hidrolisam somente nucleotídeos trifosfatos e não são inibidas por azida (PLESNER, 1995).

De acordo com ASAI et al. (1995), duas formas de ecto-NTPases solúveis de *Toxoplasma gondii* diferem na especificidade de hidrólise de nucleotídeo, sendo que uma das isoformas hidrolisa apenas nucleotídeos trifosfatos, como ATP. Similarmente, a fração ATPase não hidrolisa ADP.

SMITH et al. (1997), purificaram uma ecto-ATPase solúvel de *Tetrahymena thermophila* que, semelhante a nossa fração ATPase de encéfalo, não hidrolisa nucleotídeos difosfatos e a atividade GTPásica é 20% do valor da atividade ATPásica. A ecto-ATPase não é inibida por azida ou vanadato 100-200 μ M e o pH ótimo para sua atividade ATPásica é em torno de 7,5. Em contraste à fração ATPase, a ecto-ATPase de *Tetrahymena* não apresenta especificidade de cátions bivalentes, Ca^{2+} ou

Mg^{2+} , embora a atividade Mg^{2+} -ATPásica apresente maiores valores. A massa molecular da enzima é de 66 kDa.

KEGEL et al. (1997), descreve a expressão de uma ecto-ATPase de cérebro de rato com massa molecular de 54,39 kDa, que hidrolisa ATP. Ecto-ATPase purificada a partir de oviduto de galinha, mostra através de SDS-PAGE e Western blot, a presença dos polipeptídeos de 80 e 160 kDa; o polipeptídeo de 160 kDa representa a forma dimérica do polipeptídeo de 80 kDa que é a forma glicosilada da enzima (STROBEL et al., 1996). Segundo LEWIS-CARL & KIRLEY (1997), a análise em Western blot da ecto-ATPDase purificada a partir de estômago de galinha apresenta, em concordância com STROBEL et al. (1996), um polipeptídeo de 80 kDa na forma glicosilada e que após deglicosilação apresenta 54 kDa.

Segundo VALE et al. (1985), cinesina de cérebro em SDS-PAGE mostra ser constituída por polipeptídeos de 110-120 kDa e 60-70 kDa.

A inibição mostrada pela nossa fração ATPase por Triton X-100 0,2% e concentração de KCl 75-600 mM aponta para uma possível interferência de detergentes e força iônica nas interações químicas entre grupamentos dentro da cadeia polipeptídica, entre subunidades, ou entre proteínas distintas, que interferem na atividade ATPásica da enzima em questão. Não houve interação dos dois polipeptídeos referidos até aqui com colunas de troca aniônica ou catiônica. A co-eluição dos polipeptídeos de 160 e 54 kDa da coluna de filtração em gel utilizada, também sugere uma interação entre estes.

Em ensaios recentes, a fração ATPase foi aplicada a coluna de Octil-Sepharose e houve interação dos polipeptídeos com a resina, mas a eluição só foi possível em condições desnaturantes (uréia 8 M ou etanol 30%) e após diálise das frações, a atividade enzimática não foi reestabelecida (dados não mostrados).

A otimização da eluição dos polipeptídeos da coluna de Octil-Sepharose, ensaios com anticorpos (Western Blot) e o sequenciamento parcial dos polipeptídeos isolados permitirão conclusões mais precisas em relação a identidade da ATPase parcialmente purificada neste trabalho.

7. Conclusões

- ▶ Neste trabalho obteve-se uma fração enriquecida em atividade ATPásica a partir de citosol de encéfalo de rato
- ▶ Os principais polipeptídeos apresentam 54 e 160 kDa
- ▶ A ATPase apresenta propriedades distintas de outras ATPases conhecidas como Ca^{2+} -ATPase, F_1F_0 -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase, miosinas, cinesinas e dineínas.

8. Resumo

Os resultados deste trabalho mostram a obtenção de uma fração enriquecida em atividade ATPásica a partir de citosol de encéfalo de rato. O homogeneizado de encéfalos foi centrifugado a 50 000 x g durante 40 minutos e o sobrenadante aplicado a resina de SP-Sepharose. A fração que não interagiu com a resina foi tratada com sulfato de amônio e aplicada a coluna de Q-Sepharose. A fração que não interagiu com esta resina apresentou alta atividade ATPásica; foi tratada com sulfato de amônio 30% e a atividade recuperada por centrifugação. A fração obtida apresentou atividade Mg^{2+} -ATPásica, mas a atividade Ca^{2+} -ATPásica foi nula. Não foi detectada atividade K^+ /EDTA-ATPásica. Sua atividade Mg^{2+} -ATPásica foi bem maior que a atividade GTPásica; ADP e PPi não foram substratos. Fluoreto de alumínio mostrou inibição de 30% sobre a

atividade ATPásica. Vanadato e azida não tiveram efeito considerável sobre a atividade. Triton X-100 0.2% e alta força iônica inibiram a atividade em torno de 60%. Em SDS-PAGE observou-se a presença de dois polipeptídeos principais de 160 e 54 kDa. A ATPase não interagiu com colunas de troca iônica e sua atividade apresentou propriedades distintas de ATPases conhecidas como Ca^{2+} -ATPase, F_1F_0 -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase, miosinas, cinesinas e dineínas.

9. Abstract

This work presents the obtention of rich ATPase activity fraction from rat encephalon cytosol. The encephalon homogenized was centrifuged $50.000 \times g$ for 40 minutes and the supernatant loaded in SP-Sepharose column. The flow through was treated with ammonium sulfate and loaded in Q-Sepharose column. Its flow through was treated with 30 % ammonium sulfate and ATPase activity was restored by centrifugation. This fraction showed Mg^{2+} -ATPase activity, however, the Ca^{2+} -ATPase activity was zero. No K^+ /EDTA-ATPase activity was detected. The Mg^{2+} -ATPase activity was higher than GTPase activity. Aluminium fluoride inhibited about 30 % ATPase activity. Azide and vanadate had no effective activity; 0,2 % Triton X-100 and high salt concentration inhibited about 60 % activity. The SDS-PAGE analysis showed two evident 160 and 54

polypeptides. This probable ATPase doesn't interact with ionic exchange columns and its activity showed different properties of known ATPases such as Ca^{2+} -ATPase, F_1F_0 -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase, myosins, kinesin and dynein.

10. Referências bibliográficas

ABRAHAMMS, J. P.; LESLIE, A. G. W.; WITTER, R.; WALKER, J. E. Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, Londres, n. 370, p. 621-628, 1994.

ASAI, T. et al. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, n. 270, p. 11391-11397, 1995.

BAKER, J. P. ; TITUS, M. A. Myosins: matching functions with motors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, Filadélfia, n. 10, p. 80-86, 1998.

BARYLKO, B. et al. Purification and characterization of a mammalian myosin I.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, n. 89, p. 490-494, 1992.

BERMUDES, D. et al. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, n. 269, p. 29252-29260, 1994.

BOYER, P. D. The ATP synthase- a splendid molecular machine. *Ann. Rev. Biochem.*, Palo Alto, n.66, p. 717-749, 1997.

CANTLEY et al. Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 252, n. 21, p. 7421-7423, 1977.

CARAFOLI, E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.*, Bethesda, v. 71, n. 1, p. 129-151, 1991.

CARAFOLI, E. Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic. Res. Cardiol.*, Darmstadt, n.92, p. 59-61, 1997. Supl. 1.

CHABRE, M. Aluminofluoride and beryllifluoride complexes: new phosphate analogs in enzymology. *Trends Biochem. Sci.*, Cambridge, n. 15, p.6-10, 1990.

CHEN, Z. P.; LEVY, A.; LIGHTMAN, S. L. Nucleotides as extracellular signalling molecules. *J. Neuroendocrinol.*, Oxford, n.7, p. 83-96, 1995.

COHN, S. A.; INGOLD, A. L.; SCHOLEY, J. M. Correlation between the ATPase and microtubule translocating activities of sea urchin egg kinesin. *Nature*, Londres, n. 328, p. 160-163, 1987.

CONZELMAN, K. A.; MOOSEKER, M. S. The 110-KD protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an actin-activated Mg-ATPase. *J. Cell Biol.*, Nova York, n. 105, p. 313-324, 1987.

COY, D. L. et al. Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nat. Cell Biol.*, n. 1, p. 288-292, 1999.

CUNHA, J. P. Purificação e caracterização parcial de uma proteína ligante de calmodulina obtida a partir de encéfalo de rato. 1999. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica)- INGEB, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 1999.

ESPINDOLA, F. S. et al. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. *J. Cell Biol.*, Nova York, n. 118, p. 359-368, 1992.

FREITAS, P. M. Caracterização parcial dos polipeptídeos de uma fração ATPase isolada de encéfalo de rata. 1997. Dissertação (Mestrado em Genética

e Bioquímica)-Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 1997.

GIBBONS, I. R. et al. Potent inhibition of dynein adenosine triphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 75, n. 5, p. 2220-2224, 1978.

GIBBONS, I. R.; FRONK, E. A latent adenosine triphosphatase form of dynein 1 from sea urchin sperm flagella. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, n. 254, p. 187-196, 1979.

GIBBONS, I. R.; ROWE, A. Dynein: a protein with adenosinetriphosphatase activity from cilia. **Science**, Washington, n.149, p. 424, 1965.

GOODE, B. L., DRUBIN, D. G.; BARNES, G. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. **Curr. Opin. Cell Biol.**, Filadelfia, n. 12, p. 63-71, 2000.

GOODNO, C. C. Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 76, n. 6, p. 2620-2624, 1979.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Nova York, n. 218, p. 916-923, 1996.

HARA, M. et al. Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. **J. Invest. Dermatol.**, Nova York, n. 114, p. 438-443, 2000.

HASSON, T.; MOOSEKER, M. S. The growing family of myosin motors and their role in neurons and sensory cells. **Curr. Opin. Neurobiol.**, Londres, n. 7, p. 615-623, 1997.

HASSON, T.; MOOSEKER, M. S. Vertebrate unconventional myosins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n. 28, p. 16431-16434, 1996.

HASSON, T. et al. Mapping of unconventional myosins in mouse and human. **Genomics**, San Diego, n. 36, p. 431-439, 1996.

HEINONEN, J. K.; LAHTI, R. J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Anal. Biochem**, Nova York, n. 113, p. 313-317, 1981.

HIROKAWA, N. et al. Brain dynein (MAP 1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transport membranous organelles in vivo. **J. Cell Biol.**, Nova York, n. 111, p. 1027-1037, 1990.

HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**, Washington, n. 279, p. 519-526, 1998.

HIROKAWA, N. The mechanisms of fast and slow transport in neurons: identification and characterization of the new kinesin superfamily motors. **Curr. Opin. Neurobiol.**, Londres, n.7, p. 605-614, 1997.

HIROKAWA, N., NODA, Y.; OKADA, Y. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. **Curr. Opin. Cell Biol.**, Filadelfia, n. 10, p. 60-73, 1998.

JUNGE, W., LILL, H.; ENGELBRECHT, S. ATPsynthase: an eletrochemical transduces with rotatory mechanics. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, n. 22, p. 420-423, 1997.

KACHAR, B. et al. Extensive purification from *Acanthamoeba castellanii* of a microtubule- activated Mg^{2+} -ATPase activity. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 262, n. 33, p. 16180-16185, 1987.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD 39/ vascular ATP diphosphohydrolase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n. 51, p. 33116-33122, 1996.

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

KEGEL, B. et al. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 36, n. 9, p. 1189-1200, 1997.

KNOWLES, A. F.; NAGY, A. K. Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. **Eur. J. Biochem.**, Berlim, n. 262, p. 349-357, 1999.

KOMOSZYNSKI, M.; WOJTCZAK, A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, E.C. 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. **Biochim.Biophys.Acta**, Amsterdam, n. 1310, p. 233-241, 1996.

KUZNETSOV, S. A.; GELFAND, V. I. Bovine brain kinesin is a microtubule activated-ATPase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, n. 83, p. 8350-8354, 1986.

LAEMMLI, U. K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T₄. **J. Mol. Biol.**, Londres, n. 80, p. 575-599, 1973.

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

- LARSON, R. E.; PITTA, E. D.; FERRO, J. A. A novel 190KDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, n. 21, p. 213-217, 1988.
- LEWIS-CARL, S.; KIRLEY, T. L. Immunolocalization of the ecto-ATPase and ecto-apyrase in chicken gizzard and stomach. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 272, n. 38, p. 23645-23652, 1997.
- LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T. Na^+/K^+ -ATPase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 31, p. 19659-19662, 1994.
- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Cytoskeletal proteins and golgi dynamics. **Curr. Opin. Cell Biol.**, Filadelfia, n. 10, p.52-59, 1998.
- LUNARDI et al. Inhibition of H^+ -transporting ATPase by formation of a tight nucleoside diphosphate-fluoroaluminate complex at the catalytic site. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, n. 85, p. 8958-8962, 1988.
- LYE, R. J. et al. Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C.elegans*. **Cell**, Cambridge, n. 51, p. 309-318, 1987.
- MACCAFREY, G.; VALE, R. D. Identification of a kinesin-like microtubule-based motor protein in *Dictyostelium discoideum*. **EMBO J.**, Oxford, v. 8, n. 11, p. 3229-3234, 1989.

MANDELKOW, E.; HOENGER, A. Structures of kinesin and kinesin-microtubule interactions. **Curr. Opin. Cell Biol.**, Filadelfia, n. 11, p. 34-44, 1999.

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

MARUTA et al. Formation of the stable myosin-ADP-aluminum fluoride and myosin-ADP-beryllium fluoride complexes and their analysis using ^{19}F NMR. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, n. 10, p. 7093-7100, 1993.

MARUTA, H.; KORN, E. D. Acanthamoeba myosin II. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 252, n. 18, p. 6501-6509, 1977.

MERMALL, V., POST, P. L., MOOSEKER, M. S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. **Science**, Washington, n. 279, p. 527-533, 1998.

MOLLER, J. V., JUUL, B., MAIRE, M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, n. 1286, p. 1-51, 1996.

MOOSEKER, M. S.; CHENEY, R. E. Unconventional myosins. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.**, Palo Alto, n. 11, p. 633-675, 1995.

- MOTA JUNIOR, A. O. et al. Caracterização parcial de uma ATPase isolada de cérebro de rato. In: 14 Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 1999, Caxambu. **Resumos...**20.050, p. 419.1999.
- MURATALIEV, M. B., MILGROM, Y. M.; BOYER, P. D. Characteristics of the combination of inhibitory Mg^{2+} and azide with the F_1 ATPase from chloroplasts. **Biochemistry**, Washington, n. 30, p. 8305-8310, 1991.
- NASCIMENTO, A. A. C. et al. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n. 29, p. 17561-17569, 1996.
- PASCHAL, B. M.; SHPETNER, H. S.; VALLE, R. B. MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. **J. Cell Biol.**, Nova York, n. 105, p. 1273-1282, 1987.
- PASCHAL, B. M.; VALLE, R. B. Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. **Nature**, Londres, n. 330, p. 181-183, 1987.
- PEDERSEN, P. L.; CARAFOLI, E. Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, n. 12, p. 186-189, 1987.
- PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **Int. Rev. Cytol.**, Nova York, n. 158, p. 141-215, 1995.

RECK-PETERSON, S. L. et al. Class V myosins. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, n. 1496, p. 36-51, 2000.

REYNAFARJE, B. D.; PEDERSEN, P. L. ATP syntase. Conditions under which all catalytic sites of the moiety are kinetically equivalent in hydrolyzing ATP. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 271, p. 32546-32550, 1996.

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

SANTOS, A. N. S. Purificação e caracterização parcial de uma ATPase de encéfalo de rata. 1997. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica)- Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 1997.

SHPETNER, H. S.; PASCHAL, B. M.; VALLEE, R. B. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). *J. Cell Biol.*, Nova York, n. 107, p. 1001-1009, 1988.

SHPETNER, H. S.; VALLEE, R. B. Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature*, Londres, n.355, p. 733-735, 1992.

SHEPETNER, H. S.; VALLEE, R. B. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell*, Cambridge, n. 59, p. 421-432, 1989.

SCHMID, S. L.; MCNIVEN, M. A.; DE CAMILLI, P. Dynamamin and its partners: a progress report. **Curr. Opin. Cell Biol.**, Filadelfia, n. 10, p. 504-512, 1998.

SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L.; HENNESSEY, T. M. A soluble ecto-ATPase from *Tetrahymena termophila*: purification and similarity to the membrane-bound ecto-ATPase of smooth muscle. **Arch. Biochem. Biophys.**, Nova York, v. 337, n. 2, p. 351-359, 1997.

STROBEL, R. S. et al. Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase purification and characterization. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n. 27, p. 16323-16331, 1996.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T₇ early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, Londres, n. 79, p. 237-248, 1973.

SWEADNER, K. J. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, n. 988, p. 185-220, 1989.

TODOROV, L. D. et al. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. **Nature**, Londres, n. 387, p. 76-79, 1997.

VALE, R. D.; GOLDSTEIN, L. S. B. One motor, Many Tails: An Expanding Repertoire of Force-Generating Enzymes. **Cell**, Cambridge, n. 60, p. 883-885, 1990.

VALE, R. D. Intracellular transport using microtubule-based motors. **Ann. Rev. Cell Biol.**, Palo Alto, n. 3, p. 347-378, 1987.

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

VOLKMANN, N.; HANEIN, D. Actomyosin: law and order in motility. **Curr. Opin. Cell Biol.**, Filadelfia, n. 12, p. 26-34, 2000.

WANG, T.; GUIDOTTI, G. CD 39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n. 17, p. 9898-9901, 1996.

WEBER, J.; SENIOR, A. E. Catalytic mechanism of F₁-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, n. 1319, p. 19-58, 1997.

WOO, A. L., JAMES, P. F.; LINGREL, J. B. Characterization of the fourth α isoform of the Na,K-ATPase. **J. Membr. Biol.**, Nova York, n. 169, p. 39-44, 1999.

WU, X., JUNG, G.; HAMMER, J. A. Functions of unconventional myosins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, Filadelfia, n. 12, p. 42-51, 2000.

ZIMMERMANN. H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends Pharmacol. Sci.**, Barking, n. 20, p. 231-236, 1999.

FU-00012413-7