

L-2

MON
546.351.348
P 32.20
TES/MEN

ELIANA VALÉRIA PATUSSI

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA FRAÇÃO ENRIQUECIDA
EM ATIVIDADE ATP/GTPase OBTIDA A PARTIR DE TESTÍCULO
DE COELHO.**

Dissertação de Mestrado apresentada
no Curso de Pós Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

DIRBI - UFU UMU 00297/97



1000175503

Uberlândia

1996

CDD 574.872

PATUSSI, Eliana Valéria

Caracterização parcial de uma fração enriquecida em atividade ATP/GTPase obtida a partir de testículo de coelho / Eliana Valéria Patussi; Uberlândia: UFU, 1996.

81 p.: il.

1. Citoesqueleto. 2. Miosina.
3. Dineína. 4. Cinesina. 5. Dinamina.

78200

Aos meus pais,
Seilda e Geraldo Patussi.

À
minha irmã Débora,
meu irmão Adriano e família,
minha amiga Adriana.

"Tua é, ó SENHOR, a grandeza, e o poder,
a glória, a vitória e a majestade, porque tu é
tudo quanto há no céu e na terra, tu é, ó SENHOR,
o reino, e tu te exaltaste como chefe sobre todos.
Tanto riquezas como honra vêm de ti, tu dominas
sobre tudo, e na tua mão há força e poder; na tua mão
está o engrandecer e o dar força a tudo.
Agora, pois, ó nosso DEUS, graças te damos, e
louvamos o teu glorioso nome."

I Crônicas 29: 11 a 13

AGRADECIMENTOS.

O mais sincero agradecimento ao meu orientador Prof. Dr. Milton Vieira Coelho e ao meu co-orientador Prof. Dr. Foued Salmen Espindola pela amizade e orientação concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

À coordenação do Curso de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas desta Universidade pelo apoio e atenção dedicados no decorrer deste trabalho.

Aos professores do laboratório de Bioquímica pela amizade e colaboração direta ou indireta na realização deste trabalho.

Ao CEBIM e à FUNDAP pelo fornecimento dos animais necessários neste trabalho.

À funcionária Sebastiana (Tiana) pela amizade e cooperação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao funcionário Cleuber pelo auxílio e orientação na digitação deste trabalho.

À Paula Mendes de Freitas pela amizade e apoio necessário muitas vezes no decorrer deste trabalho.

Aos colegas: Ana Graci, Céci, Ricardo e Veridiana pelo apoio e amizade desenvolvidos no decorrer deste período.

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

Coordenadora de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq).

ABREVIATURAS UTILIZADAS:

AMP-PNP - adenil 5' - imidodifosfato

ATP - adenosina 5'- trifosfato

ATPase - adenosina trifosfatase

BSA - soro albumina bovina

C-terminal - carboxi-terminal

CaM - calmodulina

CaM quinase II - proteína quinase II dependente de Ca/calmodulina

CTP - citosina 5' - Trifosfato

D.O. - densidade óptica

DEAE - dietil amino etil

DTT - ditiotreitol

EDTA - ácido etileno diamino tetra acético

EGTA - ácido etileno glicol-bis(β-amino etil éter) N,N,N,N-tetracético

EHNA - eritro (-2- hidroxi -3 nonil) adenina

GDP - guanosina 5' - difosfato

GTP - guanosina 5'- trifosfato

GTPase - guanosina trifosfatase

MAP - proteína associada à microtúbulo

N-terminal - amino terminal

NEM - N-etilmaleimida

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

PC - fosfocelulose

PGA - ácido poliglutâmico

Pi - ortofosfato inorgânico

PMSF - fenil metil sulfonil fluoreto

SDS - dodecil sulfato de sódio

TEMED - N,N,N,N- tetrametil etileno diamino

TRIS - tris(hidroxi-metil) amino metano

TTP - timidina 5' - Trifosfato

U.V - ultra-violeta

UTP - uridina 5' - Trifosfato

ÍNDICE:

1. Introdução	01
1.1. Citoesqueleto.....	01
1.2. Motores Moleculares.....	04
1.2.1. Miosinas.....	04
1.2.2. Dineínas: Citoplasmática e Axonemal.....	07
1.2.3. Cinesinas	11
1.2.4. Dinamina	14
1.3. Testículos	17
1.4. Motores Moleculares em Testículo	19
1.4.1. Miosinas.....	19
1.4.2. Dineínas	21
1.4.3. Cinesinas	22
1.4.4. Dinaminas	23
2. Objetivo Geral.....	24
3. Material e Métodos	25
3.1. Preparação de Proteínas.....	25
3.1.1. Preparação de Sobrenadante de Testículo de Coelho	25
3.1.2. Fracionamento de S1 em Coluna de Fosfocelulose.....	25
3.1.3. Fracionamento de S1' em Coluna de DEAE-Sepharose	27
3.1.4. Fracionamento "pool" DEAE em Coluna de Fosfocelulose	28
3.1.5. Fracionamento da Fração PC em Coluna de GTP-Agarose.....	30
3.2. Métodos de Análise.....	32
3.2.1. Dosagem de Proteínas	32
3.2.2. Determinação da Atividade Nucleotidase Trifosfatásica.....	34

3.2.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).....	36
3.2.4. Determinação do Peso Molecular de Proteínas em SDS-PAGE.....	38
3.2.4.1. Preparação da Curva de Calibração	38
3.2.4.2. Determinação do Peso Molecular do Polipeptídeo de Interesse.....	38
4. Resultados.....	40
4.1. Fracionamento de Sobrenadante de Testículo de Coelho em Coluna de Fosfocelulose	40
4.2. Fracionamento de S1' em Coluna de DEAE-Sepharose	43
4.3. Fracionamento do "pool" DEAE em Coluna de Fosfocelulose.....	43
4.4. Efeito de Cálcio e Calmodulina na Atividade ATPase da Fração PC	49
4.5. Atividade GTPase da Fração PC.....	49
4.6. Efeito de Inibidores na Atividade GTP/ATPase da Fração PC	54
4.7. Fracionamento da Fração PC em Coluna de GTP-Agarose	54
4.8. Atividade MgATPase da Fração "flow through" da Coluna de GTP-Agarose.....	57
5. Discussão.....	62
6. Sumário RESUMO.....	67
7. Summary	69
8. Referências Bibliográficas	71

1. INTRODUÇÃO.

O movimento coordenado é uma característica central da vida. As células eucarióticas possuem no seu citoplasma um complexo conjunto de proteínas filamentares, denominado de citoesqueleto. Este permite que as células transportem vesículas, sofram mudanças conformacionais e migrem. Um processo altamente regulado pela célula (revisões Wallin & Stromberg, 1995; Kabsch & Vandekerckhove, 1992).

A contração muscular é feita pelo deslizamento de filamentos de miosina e microfilamentos interdigitados. O batimento de cílios e flagelos dependem da interação da dineína com os microtúbulos. A cinesina realiza transporte de organelas e contas recobertas de látex ao longo de microtúbulos. Estes processos celulares sómente podem ser realizados devido as ATPases mecanotransdutoras, enzimas que acoplam a energia de hidrólise do ATP a algum sistema que requer energia. A miosina acopla a energia de hidrólise do ATP à contração muscular, a dineína realiza este processo no batimento de cílios e flagelos, e a cinesina no transporte de organelas e vesículas. Estes são exemplos de ATPases associadas com o citoesqueleto (revisões Vallee & Shpetner, 1990; Marston, 1995).

1.1. Citoesqueleto:

As células eucarióticas apresentam três classes principais de fibras do citoesqueleto: microtúbulos (constituído por α e β tubulina), microfilamentos (constituído por F-actina) e filamentos intermediários.

Microtúbulos são estruturas encontradas em todas as células eucarióticas. Eles apresentam um papel crítico na organização intracelular, no transporte axonal e de grânulos de pigmentos dos cromatóforos, no movimento de cílios e flagelos, e na segregação dos cromossomos durante a mitose e meiose. A estrutura dos microtúbulos é similar em todas as células

eucarióticas, eles são estruturas longas com cerca de 100 μm , em forma de tubos compostos de tubulina, com diâmetro interno e externo de cerca de 15 e 25 nm, respectivamente (revisão Wallin & Stromberg, 1995).

Tubulina é um heterodímero constituído por duas proteínas relacionadas mas não idênticas, α e β tubulina, com tamanho de 4 x 8 nm. Dímeros de tubulina formam a "coluna dorsal" dos microtúbulos, e seu alinhamento longitudinalmente é chamado protofilamento, geralmente 13 protofilamentos formam um microtúbulo. Microtúbulos são polímeros dinâmicos que continuamente polimerizam e despolimerizam nas células e *in vitro*, esta propriedade é chamada de instabilidade dinâmica (revisão Cassimeris et al, 1987).

Existe um grupo heterogêneo de proteínas associadas à microtúbulos, estas proteínas podem ser divididas em 2 grupos distintos:

- a) aquelas que possuem atividade ATPásica (GTPásica) ativadas por microtúbulos, tais como: cinesina, dineína e dinamina,
- b) e aquelas como MAP-1, MAP-2, MAP-4 (microtubule associated proteins) e τ (tau), que são conhecidas por estimularem a polimerização e estabilização dos microtúbulos na célula, a dinâmica dos microtúbulos de mamíferos é modulada pelas MAPs e τ (revisão Wallin & Stromberg, 1995).

Microfilamentos possuem entre 6-7 nm de diâmetro, são constituídos por filamentos de actina arranjados em forma de dois cordões de contas torcidos um em torno do outro. A actina abundante nas células eucarióticas é uma proteína globular (G-actina) de 45 kDa, que se polimeriza formando filamentos helicoidais não covalentes (F-actina). O controle da polimerização-despolimerização da actina é muito importante em muitos processos celulares tais como: modificações morfológicas, divisão celular e outros. Este controle é exercido por proteínas que se ligam aos filamentos de actina estabilizando-os, e outras que favorecem a nucleação. Algumas proteínas ligam-se à G-actina,

mantendo mais de 50% da actina citoplasmática na forma de monômeros, e respondem a sinais extracelulares liberando G-actina, que então se polimeriza (revisão Hennessey et al, 1993).

A actina consiste de uma única cadeia polipeptídica com cerca de 375 resíduos de aminoácidos cuja sequência e propriedades bioquímicas são altamente conservadas evolutivamente. Actina foi primeiramente caracterizada em músculo, sendo F-actina o principal componente das miofibrilas. Nestas estruturas, filamentos espessos formados pela mecanoenzima miosina, associam-se a filamentos finos de actina e através de uma mudança conformacional, dissociam-se da F-actina, em um processo cíclico que resulta no deslizamento de um filamento em relação ao outro, produzindo a contração muscular. No músculo estriado, a actina em forma de filamentos finos compõe a organização estrutural do sarcômero. Nas células não musculares, no entanto, a organização estrutural da actina pode ser modificada em resposta à estímulos extra ou intracelulares. Estas estruturas são variações no tema de organização dos filamentos, tais como: rede de filamentos individuais no citoplasma, feixes de filamentos na interfase nos fibroblastos, feixes curtos de actina nas microvilosidades, e outras (revisão Kabsch & Vandekerckhove, 1992).

Todas as proteínas dos filamentos intermediários apresentam um centro estrutural comum com aproximadamente 310 resíduos de aminoácidos, que é predominantemente em super hélice de α hélice. As extremidades de cada lado deste núcleo comum são hipervariáveis, o que confere a estas proteínas uma variedade de peso molecular. Estudos da estrutura primária demonstraram que existem pelo menos 5 tipos distintos de filamentos intermediários, são eles: tipo I e II constituídos de queratina, encontrados nas células epiteliais; tipo III constituídos pela vimentina, desmina, etc; tipo IV são os filamentos neuronais ou neurofilamentos; tipo V são as lamininas (revisão Steinert & Liem, 1990).

1.2. Motores Moleculares.

Motores moleculares são proteínas caracterizadas por algumas propriedades comuns, tais como: a) ligação a microtúbulos ou F-actina sensível a ATP (ou outro nucleotídeo); b) possuir atividade ATPase (ou outra nucleotidase) ativada por microtúbulos ou actina e c) apresentar capacidade de produzir força (revisão Vallee & Shpetner, 1990).

Os motores moleculares são compostos por grupos de proteínas: a superfamília miosina, a superfamília cinesina e as dineínas axonemal e citoplasmáticas. As miosinas utilizam filamentos de actina como "trilhos" para realizar movimento, enquanto as cinesinas e dineínas movem-se ao longo de trilhos de microtúbulos (revisão Sawin & Scholey, 1991). A dinamina é uma nova proteína descoberta (Shpetner & Vallee, 1989) e potencial candidata a compor os motores moleculares como mais nova família a utilizar microtúbulos.

1.2.1. Miosinas.

O primeiro motor molecular descoberto nesta família foi a miosina II, esta denominação deve-se ao fato da molécula apresentar duas cadeias polipeptídicas, que possuem nas suas extremidades N-terminal duas porções globulares, que destacam-se do restante da molécula, que é formado por um longo bastão em super hélice de α hélice (revisão Warrick & Spudich, 1987). Esta miosina foi intensamente estudada, devido ao seu fundamental papel na contração muscular. A partir do início da década de 70, várias miosinas II não musculares foram encontradas em diferentes células (revisão Warrick & Spudich, 1987). Proteínas relacionadas com miosina muscular também foram descobertas, uma em *Acanthamoeba* (Pollard & Korn, 1973), outra na borda

em escova das células epiteliais do intestino de vertebrados (Collins & Borysenko, 1984) e também em *Dictyostelium* (Titus et al, 1989). Apesar, destas proteínas apresentarem características de miosina II, estas não possuíam as duas porções globulares como a miosina muscular. Houve então a necessidade de separar estas proteínas em duas classes: a) a classe das miosinas II ou convencionais, onde ficaram todas as miosinas com duas porções globulares (cabeças) e cauda em super hélice de α hélice; e b) a classe das miosinas I ou miosinas não convencionais, onde ficaram as que não possuíam duas cabeças (revisão Hammer III, 1991; Pollard et al, 1991).

Novas miosinas foram descobertas através da análise genética de mutantes, tais como: o gene *nina C* de *Drosophila* (Montell & Rubin, 1988), o gene *dilute* de camundongo (Mercer et al, 1991) e MYO2 de levedura (Johnston et al, 1991). Estudos bioquímicos também conduziram à identificação de uma nova miosina: uma proteína ligante de CaM em cérebro de vertebrados, denominada inicialmente de p190 (Larson et al, 1986; Larson et al; 1988; Larson et al, 1990; Espindola et al, 1992 e Espreafico et al, 1992). Estas novas miosinas não enquadram-se nem como miosina I e nem como miosina II, a classificação em apenas dois grupos não era apropriada, pois a diversidade destas miosinas não permitia tal agrupamento (Cheney & Mooseker, 1992; Espreafico et al, 1992). Na tentativa de classificar e organizar melhor a família das miosinas, alguns pesquisadores propuseram um estudo comparativo da sequência dos resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal ou domínio motor, região mais conservada da molécula. Os pesquisadores observaram que esta proposta era vantajosa, pois as miosinas com caudas semelhantes ficaram na mesma classe (Cheney & Mooseker, 1992; Espreafico et al, 1992; Goodson & Spudich, 1993 e Mooseker, 1993). Atualmente a superfamília miosina está agrupada em 11 classes distintas (revisão Mooseker & Cheney, 1995).

Apesar da significativa variabilidade das miosinas isoladas de músculo esquelético, liso e células não musculares, de modo geral elas apresentam as seguintes características enzimáticas: a) elevada atividade ATPásica na presença de EDTA e alta concentração de potássio (K-EDTA/ATPase) ou na presença de Ca⁺⁺ (CaATPase); b) relativamente baixa atividade na presença de Mg⁺⁺ (MgATPase) e c) estimulação da atividade MgATPase pela actina (Pollard, 1982). Uma excessão, é a miosina V (p190) de vertebrados, que não apresenta atividade (K-EDTA)ATPase considerável (Espindola et al, 1992).

As miosinas conhecidas possuem pelo menos uma cadeia pesada, composta por uma região N-terminal globular (ou domínio motor) onde estão os sítios de ligação à actina e ATP, uma região C-terminal (ou domínio cauda) que é classe específica, e entre estas duas regiões está o domínio pescoço (ou regulatório) no qual ligam-se as cadeias leves (revisão Mooseker & Cheney, 1995). Com a determinação da estrutura primária da p190 (Espreafico et al, 1992) descobriu-se que o domínio pescoço desta é caracterizado por 06 repetições de uma sequência conservada de aproximadamente 23 resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, conforme o motivo estrutural IQ (IQXXXRGXXXRK) que constituem potenciais sítios de ligação para a calmodulina (Espreafico et al, 1992). Os produtos do gene *dilute* de camundongo (Mercer et al, 1991) e MYO2 de levedura (Johnston et al, 1991) também apresentam em sua estrutura primária os mesmos 6 motivo estrutural IQ. Todas as miosinas possuem um domínio pescoço, cujo tamanho varia de 1 - 6 motivo estrutural IQ (revisão Mooseker & Cheney, 1995). Seguindo o domínio pescoço, cada classe de miosina possue alguma forma de domínio cauda específico. Nos últimos tempos tem sido surpreendente o alto grau de variação do domínio cauda nas diferentes miosinas, parece que esta variação esteja fortemente relacionada com a função específica que cada classe realiza. Várias são as atribuições do domínio cauda; algumas miosinas não

convencionais possuem habilidade de interagir com membranas, seja diretamente ligando-se à fosfolipídeos, ou hipotéticamente através de receptores proteicos; outras possuem diferentes domínios: SH3; quinase; PH e ativadores de GTPase (GAP), todos comumente associados com transdução de sinal (revisão Mooseker & Cheney, 1995).

Uma questão crítica e sem resolução ainda é o elevado e diversificado número de genes que codificam miosina num determinado organismo. Em *Dictyostelium*, já foram total ou parcialmente sequenciados 10 genes, onde 09 parecem ser de miosinas não convencionais (Titus et al, 1994). Estudos demonstraram que uma única célula de vertebrado pode expressar mRNA ou proteína de pelo menos 11 miosinas, onde somente 02 eram convencionais (Bement et al, 1994). Resultados similares foram encontrados em tecidos de rã (Solc et al, 1994) e foram evidenciadas 08 miosinas em plantas (Kinkema et al, 1994). Este grau de diversidade da superfamília miosina levanta questões sobre o papel biológico das mesmas, muitas das quais são distribuídas em diferentes células e tecidos.

1.2.2. Dineínas: Citoplasmática e Axonemal.

Na década de 60, uma série de estudos sobre motilidade de cílios e flagelos, permitiram a purificação e caracterização da primeira proteína com atividade ATPase estimulada por microtúbulos, a dineína (revisão Gibbons, 1981). A dineína flagelar da alga unicelular, biflagelada *Chlamydomonas* é uma das formas mais estudada, esta possui 3 cadeias pesadas de 500 kDa (α , β e γ); 2 cadeias intermediárias de 78 e 70 kDa e várias cadeias leves de 10 a 34 kDa (revisão Mitchell, 1994).

Existe um grupo heterogêneo de proteínas citoplasmáticas associadas à microtúbulos, denominadas MAP, estas são proteínas de alto peso molecular,

conhecidas por estimularem a polimerização e estabilização dos microtúbulos na célula (Olmsted, 1986). Estudos destas proteínas associadas à microtúbulos demonstraram que estas eram divididas em dois grupos: MAP-1 e MAP-2. Nas preparações de MAP-1 de cérebro de rato, foram detectadas 3 bandas polipeptídicas distintas, denominadas de MAP-1A, MAP-1B e MAP-1C (Bloom et al, 1984).

Uma preparação de cérebro de rato altamente enriquecida em MAP-1C, apresentou atividade ATPase estimulada por microtúbulos e a capacidade de translocar microtúbulos e as duas atividades co-purificaram com a MAP-1C (Paschal et al, 1987). Estas atividades indicavam algum papel para esta proteína na motilidade citoplasmática. A MAP-1C apresentou mobilidade eletroforética similar à cadeia β de dineína flagelar de *Chlamydomonas* e o mesmo coeficiente de sedimentação (Paschal et al, 1987). Na presença de ATP, microtúbulos aplicados em uma superfície revestida com MAP-1C deslizaram contínua e unidirecionalmente (Paschal & Vallee, 1987). MAP-1C produziu movimento no mesmo sentido realizado pela dineína flagelar de *Chlamydomonas*, ou seja, em direção a extremidade (-) do microtúbulo. Esse movimento corresponde ao transporte axonal retrógrado, ou seja, da periferia para o centro da célula (Paschal & Vallee, 1987). Estudos de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que MAP-1C era estruturalmente equivalente a dineína axonemal e sem dúvida um análogo citoplasmático desta enzima (Vallee et al, 1988). Assim sendo, MAP-1C passou a ser denominada, dineína citoplasmática.

A atividade enzimática das dineínas citoplasmática e axonemal é dependente de Mg^{++} ou Ca^{++} (Shpetner et al, 1988) e a atividade MgATPase da dineína citoplasmática é consideravelmente mais sensível a estimulação por baixas concentrações de microtúbulos que a dineína axonemal (Shpetner et al, 1988). Entretanto, dineínas citoplasmática e axonemal diferem quanto a

especificidade de nucleotídeos. O ATP é o substrato preferencial para dineína axonemal e os nucleotídeos CTP, TTP e GTP foram melhores substratos do que o ATP para dineína citoplasmática, contudo, sómente ATP é utilizado para translocação de microtúbulos (Shpetner et al, 1988).

A cinética de inibição pelo vanadato demonstrou que este atua como análogo do fosfato, formando um complexo relativamente estável, que atua bloqueando o sítio de ligação de γ -fosfato do ATP (Gibbons et al, 1978). A dineína citoplasmática é inibida por NaVO_3 sendo necessário de 5-10 μM para inibição de 50% de sua atividade ATPase, enquanto que para dineína axonemal são necessárias aproximadamente 2 μM (Shpetner et al, 1988). Vanadato também é utilizado como um agente fotosensível nos estudos da estrutura da cadeia pesada da dineína. A exposição da dineína à irradiação UV (365 nm) em baixa concentração de NaVO_3 e MgATP (μM), resulta na clivagem da cadeia pesada das dineínas citoplasmática e axonemal em um sítio específico, com uma paralela perda da atividade ATPase (Gibbons et al, 1987; Paschal et al, 1987). O eritro(-2-hidroxi -3 nonil) adenina (EHNA), é um inibidor menos potente que o NaVO_3 , porém mais específico. EHNA 1 mM em alta força iônica (0.6 M) inibiu 85% da atividade da dineína citoplasmática e totalmente a dineína axonemal (Shpetner et al, 1988).

As dineínas possuem entre 1000 e 2000 kDa e contêm 2 ou 3 cadeias pesadas, onde encontram-se as regiões produtoras de força. A extremidade N-terminal de 35 kDa de cada cadeia pesada possue a sequência consenso denominada "P-loop", elemento indicativo de ligação e hidrólise do nucleotídeo, que representa a região motora da molécula (revisão Vallee, 1993). A dineína axonemal possui subunidades acessórias que variam de 14 a 120 kDa, enquanto que na dineína citoplasmática estas variam de 53 a 74 kDa. Devido ao tamanho das dineínas e sua composição complexa, definir sua estrutura tem sido um trabalho exaustivo (revisão Vallee, 1993).

Estudo de microscopia eletrônica utilizando anticorpos anti-70 kDa da dineína flagelar de *Chlamydomonas*, demonstraram que este polipeptídeo está localizado na base do complexo dineína flagelar (King & Witman, 1990), estritamente associado com a subfibra A do axonema (Goodenough & Heuser, 1984). Sugerindo que o papel desta é produzir uma região não catalítica ligante de microtúbulos (Paschal et al, 1992). A dineína citoplasmática de rato possui um proeminente polipeptídeo de 74 kDa, que embora relativamente distante, apresenta uma clara homologia com a cadeia intermediária de 70 kDa da *Chlamydomonas* (Paschal et al, 1992). Papel análogo foi proposto para o polipeptídeo de 74 kDa da dineína citoplasmática de rato, com função de ligação a organelas, cinetocoros ou microtúbulos (Paschal et al, 1992; revisão Vallee, 1993).

Dineína citoplasmática encontra-se amplamente distribuída em diversos organismos. Esta foi purificada de *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium*, fígado, testículo e cérebro de rato (revisão Vallee & Shpetner, 1990). Estudo imunohistoquímico de diferentes tecidos de rato demonstrou que dineína citoplasmática e axonemal co-existem na mesma célula, como por exemplo no epitélio brônquico. A diferente distribuição entre as dineínas citoplasmática e axonemal sugere que uma forma de dineína não pode mudar para outra forma (Yoshida et al, 1992).

Dineína citoplasmática parece participar no transporte axonal retrógrado nos neurônios (Paschal & Valle, 1987). Nas células epiteliais a dineína parece estar envolvida no transporte da superfície apical para basolateral, na distribuição e redistribuição de endossomos, lisossomos e elementos do complexo de Golgi (Lin & Collins, 1992). Dineína também pode estar envolvida no movimento do cromossomo em direção ao pólo mitótico na Prometafase/ Anafase A, no transporte de vesículas nos pólos e na organização do fuso mitótico (revisão Sawin & Scholey, 1991).

1.2.3. Cinesinas.

Cinesina foi primeiramente detectada em estudos do transporte axonal rápido em lula. A incubação de axoplasma de lula com AMP-PNP e microtúbulos, induziu a ligação da cinesina aos microtúbulos, sendo esta interação o primeiro passo para a purificação da cinesina (Vale et al, 1985). A cinesina, é referida de modo geral, como uma proteína motora que realiza movimento em direção a extremidade (+) do microtúbulo, ou seja, do centro da célula para a periferia, movimento centrífugo (Vale et al, 1985).

Na ausência de microtúbulos, a cinesina apresenta atividade CaATPase maior do que a MgATPase, porém, não foi observado deslizamento dos microtúbulos na presença de CaATP, embora ambas as atividades sejam estimuladas por microtúbulos (Kuznetsov & Gelfand, 1986). Estudo recente demonstrou que a atividade ATPase da cinesina pode ser regulada de várias maneiras, dependendo da heterogeneidade das cadeias leves contidas na preparação. Certas cadeias leves de cinesina são proteínas ligantes de calmodulina e ambas cadeias leves e pesadas podem ser fosforiladas diferentemente pela proteína quinase dependente AMPc e proteína quinase C, reduzindo a atividade ATPase estimulada por microtúbulos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Matthies et al, 1993). Os nucleotídeos ATP, GTP, TTP, UTP e CTP foram hidrolizados pela cinesina, no entanto, MgATP é o substrato preferido (revisão Vallee & Shpetner, 1990).

A cinesina é menos sensível ao NaVO₃ quando comparada à dineína, foram necessárias 50-60 μ M de NaVO₃ para uma inibição de 50% da atividade MgATPase da cinesina. Ela apresenta resistência aos agentes oxidantes como N-etilmaleimida (NEM) sendo requeridos de 3-5 mM deste, para uma inibição entre 20 a 50% da atividade MgATPase (revisão Vallee & Sheptner, 1990).

Cinesina é um tetrâmero ($\alpha_2\beta_2$) composto de 02 cadeias pesadas α e duas cadeias leves β (ver Cole & Scholey, 1995). As cadeias pesadas são comumente de 110-134 kDa e as cadeias leves de 60-80 kDa. Na extremidade N-terminal de cada cadeia pesada, encontra-se o domínio motor globular ou cabeça com cerca de 40 kDa, região de ligação ao microtúbulo e hidrólise de ATP. Ligada a cabeça globular está uma longa cauda de 50-60 nm, cuja estrutura é em super hélice de α hélice. A extremidade C-terminal da cadeia pesada, dobra-se formando uma segunda região globular, acredita-se que nesta região estejam os sítios de ligação das cadeias leves e da "carga" a ser transportada (revisões Goldstein, 1991; Cole & Scholey, 1995).

A análise de células mutantes possibilitou a descoberta de várias proteínas relacionadas com cinesina, as primeiras foram a KAR3 de *Saccharomyces cerevisiae* (Meluh & Rose, 1990) e bim C de *Aspergillus nidulans* (Enos & Morris, 1990). A ncd de *Drosophila melanogaster* foi detectada em mutantes com falha na segregação dos cromossomos na meiose e mitose (Endow et al, 1990). E a análise de outros mutantes permitiram a detecção de mais proteínas relacionadas com cinesina, a Cut 7 (Hagan & Yamagida, 1990); nod (Zhang et al, 1990); unc-104 (Otsuka et al, 1991) e outras.

Estudos recentes de várias cinesinas nativas sugerem que a diversidade de sequências em seu domínio cauda sejam importantes para as variadas estruturas quaternárias, bem como as diversas "cargas" a serem transportadas (ver Cole & Scholey, 1995). Cinesina isolada de uma variedade de tecidos, tais como: axoplasma de lula, cérebro bovino, ovos de ouriço-do-mar e embrião de *Drosophila*, apresentam a composição tetramérica ($\alpha_2\beta_2$) como descrita anteriormente. Interessantemente, uma proteína relacionada com cinesina obtida de cérebro bovino e ovos de ouriço-do-mar, apresenta complexo homodimérico (α_2) sem cadeias leves (ver Cole & Scholey, 1995). Uma

proteína de 300 kDa, também relacionada a cinesina, foi purificada de ovos de ouriço-do-mar. Esta possui dois polipeptídeos similares (85 e 95 kDa), que formam um heterodímero com estrutura em super hélice de α hélice entre seus domínios cauda, onde encontra-se uma terceira subunidade de aproximadamente 115 kDa, que pode desempenhar papel similar ao das cadeias leves de cinesina (Cole et al, 1993).

A subfamília bim C de cinesina está presente em tecidos em divisão de um grande número de organismos. A proteína KPP-130 de *Drosophila*, o primeiro membro desta subfamília a ser isolado, é um homotetrâmero de 500 kDa composto aparentemente por 4 polipeptídeos de 130 kDa relacionados à cinesina que não possuem cadeias leves ou polipeptídeos acessórios (Cole et al, 1994).

Através da expressão de um gene de cérebro murino em *Baculovirus* foi possível purificar uma proteína monomérica, que semelhante a cinesina move-se ao longo de microtúbulos em direção a extremidade (+). Esta é uma proteína de 144 kDa cuja a extremidade N-terminal é globular com uma curta região cauda. Esta é a primeira evidência bioquímica de que a cinesina monomérica existe *in vivo* (Nangaku et al, 1994).

Cinesina encontra-se distribuída em uma ampla variedade de organismos e tipos celulares. Esta foi identificada bioquimicamente em ovos de ouriço-do-mar (Cole et al, 1993); embrião de *Drosophila* (Cole et al, 1994); fígado de rato (Marks et al, 1994); glândula adrenal bovina (Murofushi et al, 1988); cérebro bovino (Kuznetsov & Gelfand, 1986); *Dictyostelium* (McCaffrey & Vale, 1989); *Saccharomyces cerevisiae* (Middleton & Carbon, 1994); axoplasma de lula (Vale et al, 1985) e outros.

Apesar da caracterização da estrutura e propriedades enzimáticas da cinesina, sua função na célula permanece incerta. Cinesina é capaz de induzir a translocação de contas de látex ao longo de microtúbulos (Vale et al, 1985).

Esta propriedade levanta a possibilidade desta proteína ser um motor para transporte de organelas membranosas na célula. Estudo *in vitro* evidenciou o papel da cinesina no movimento de grânulos pigmentosos do centro para a periferia dos melanóforos (Rodionov et al, 1991). A preparação e caracterização de diferentes frações subcelulares (complexo de Golgi, vesículas secretórias, mitocôndrias, lisossomos, endossomos, retículo endoplasmático e outros) de figado de rato e análises de imunoblot forneceram fortes evidências que cinesina está associada com vesículas secretórias, principalmente no complexo de Golgi (Marks et al, 1994). Os resultados sugerem que cinesina esteja envolvida em múltiplas rotas vesiculares nos hepatócitos e fornecem novas evidências da interação da cinesina com o complexo de Golgi (Marks et al, 1994).

1.2.4. Dinamina.

Dinamina foi inicialmente identificada em cérebro bovino como uma ATPase estimulada por microtúbulos, que induzia a polimerização destes na presença de nucleotídeos (Shpetner & Vallee, 1989).

A dinamina de cérebro de rato é estruturalmente relacionada com a crescente família de proteínas ligantes de GTP (Obar et al, 1990) e também com o produto do gene *shibire* de *Drosophila* (van der Bliek & Meyerowitz, 1991). A clonagem e o sequenciamento do gene para a dinamina em mamíferos demonstraram que pelo menos dois genes distintos codificam esta proteína. As duas dinaminas exibem diferenças marcantes em relação a sua distribuição e regulação tecidual. Dinamina I é expressa quase exclusivamente no Sistema Nervoso Central. Por outro lado, dinamina II apresentou níveis de expressão similares em todos os tecidos testados, incluindo o cérebro (Sontag et al,

1994). Estes dados sugerem uma especialização nas funções da dinamina em tecidos neuronais e não neuronais em mamíferos.

A dinamina possui em sua estrutura primária sequência de resíduos de aminoácidos consistentes com regiões ligantes de GTP (Obar et al, 1990). Foram realizados ensaios para caracterizar a especificidade de substrato da proteína purificada. Estes demonstraram que dinamina é uma GTPase, pois a hidrólise do GTP pela dinamina é mais intensa ($> 126 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), enquanto que outros nucleotídeos são pouco hidrolisáveis $< 13 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Shpetner & Vallee, 1992). A hidrólise de GTP é estimulada por microtúbulos e não é inibida por ATP em concentrações fisiológicas. Esta hidrólise foi inibida por AlF_3 (2.4 mM NaF/ 0.1 mM AlCl_3), N-etilmaleimida (0.2 mM) e alguns análogos sintéticos do GTP, mas não foi inibida pelo GDP (0.5 mM), NaVO_3 (1 mM), NaN_3 (1 mM) ou AMP-PNP (0.5 mM). A proteína MAP-2 inibe fortemente a estimulação da dinamina por microtúbulos, enquanto outros biopolímeros aniónicos como: actina, filamentos de vimentina e o ácido poliglutâmico (PGA), não alteraram apreciavelmente a estimulação da dinamina (Shpetner & Vallee, 1992). A atividade GTPase da dinamina I obtida por transfecção em células COS e devidamente purificada é estimulada pela fosforilação da proteína quinase C, mas dinamina II não (Sontag et al, 1994).

Ensaios recentes indicaram a necessidade de no mínimo duas moléculas de dinamina associadas para a ativação GTPase máxima, estes resultados sugerem que interações de cooperação entre moléculas de dinamina são responsáveis pela ativação da GTPase e que aparentemente estão envolvidas na função da dinamina *in vivo* (Tuma & Collins, 1994).

Dinamina é uma proteína de 100 kDa, que possui na sua extremidade N-terminal cerca de 300 resíduos de aminoácidos que formam os três sítios de ligação do GTP, região mais conservada entre a crescente família GTPase. Na

extremidade C-terminal estão localizados 100 resíduos de aminoácidos extremamente básicos e ricos em prolina (33%). Dinamina também possue o domínio PH (Pleckstrin Homology), domínio este encontrado em proteínas envolvidas nas vias transdutoras de sinal, e uma curta região com alta probabilidade de formar estrutura em super hélice de α hélice (ver Vallee & Okamoto, 1995).

Estudos utilizando neurônios do hipocampo de ratos e células N1E-115 de neuroblastoma murino demonstraram que o nível de dinamina aumenta em correlação direta com a formação dos neurônios (Torre et al, 1994). As culturas de neurônios hipocampal de rato foram tratadas com dois diferentes oligonucleotídeos antisense dinamina. Os níveis de dinamina nos neurônios diminuiram 95% aproximadamente, resultando numa redução significativa no número e comprimento dos neuritos (Torre et al, 1994). Estes dados, são consistentes com a afirmação que dinamina representa algum papel na formação dos neuritos, mas qual a função específica da dinamina em todo este processo permanece a ser esclarecido.

O papel da dinamina como um translocador de organelas *in vivo* ainda permanece desconhecido, mas algumas linhas de evidências indicam que esta proteína participa na endocitose, reciclando membranas. A análise ultraestrutural dos tecidos afetados dos mutantes do gene *shibire* de *Drosophila* tem revelado um aumento das vesículas revestidas por clatrina e uma depleção das vesículas sinápticas, compatíveis com um defeito na endocitose (Kosaka & Ikeda, 1983). A transfecção das sequências correspondentes aos domínios ligantes de GTP da dinamina de cérebro de rato, em células COS (Herskovits et al, 1993a) e de cérebro humano, em células HeLa (van der Bliek et al, 1993), resultaram na inibição da endocitose mediada por receptores. Esta foi bloqueada em algum estágio intermediário durante o

revestimento da vesícula em formação, fornecendo suporte para a participação da dinamina nas vias de transporte vesicular mediado por clatrina.

Estudos bioquímicos mostraram que esta proteína pode ligar-se e ser ativada por alguns componentes celulares envolvidos no transporte de vesículas tais como: membranas de organelas (Tuma et al, 1993) e proteínas contendo o domínio SH3 (Src Homology 3), domínio este, também, encontrado em proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal (Herskovits et al, 1993b).

1.3. Testículos.

Os testículos são estruturas pares, ovóides, que desempenham a dupla função de produção de gametas e secreção de hormônios esteróides. A formação de espermatozóides ocorre ao longo de toda a extensão dos túbulos seminíferos, os quais perfazem cerca de 80% da massa do testículo adulto. Os túbulos seminíferos são formados por um epitélio complexo, composto por múltiplos clones de células espermatoxenicas que se tornarão os espermatozóides, distribuídos entre as altamente ramificadas células de sustentação ou células de Sertoli. Abaixo deste epitélio, está a parede do túbulo composta de matrix extracelular e células peritubulares ou células mióides (Vogl & Soucy, 1985). As células mióides são células escamosas simples situadas adjacentes a lámina basal do túbulo seminífero. Nestas células os feixes de actina estão orientados de modo geral em duas direções: paralelos e perpendiculares ao longo eixo da parede do túbulo (Vogl & Soucy, 1985).

As células de Sertoli são células grandes, de forma irregular que estão ligadas a lámina basal por hemidesmossomos rudimentares, e estende-se entre as células germinativas para alcançar o lúmen tubular, criando assim um ambiente adequado para espermatoxenese ou interações entre células

germinativas (revisão Guraya, 1995). As células germinativas testiculares dependem grandemente das células de Sertoli, para suprir todas as suas necessidades. Uma única célula de Sertoli pode estar em contacto com diversas células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento (Byers & Graham, 1990).

São funções das células de Sertoli: a) suporte mecânico e nutricional das células em desenvolvimento; b) translocação das células germinativas; c) regulação parácrina e regulação da proliferação e diferenciação das células germinativas pela secreção de proteínas regulatórias, incluindo fatores de crescimento e hormônios; d) fagocitose de corpos residuais; e) metabolismo de hormônios esteróides (revisões Boekelheide et al, 1989; Guraya, 1995).

O citoesqueleto da célula de Sertoli é supostamente crítico na realização de cada uma destas funções. A forma celular, a localização intracelular de organelas e as junções intercelulares da célula de Sertoli, sofrem um período cíclico de reorganização em associação com a maturação das células germinativas (revisão Boekelheide et al, 1989).

Filamentos citoplasmáticos de vários tamanhos e formas estão distribuídos geralmente ao redor do núcleo na base da célula de Sertoli até o citoplasma apical e em associação com junções (revisão Boekelheide et al, 1989). Microfilamentos ou filamentos de actina estão principalmente localizados na região cortical, e formando agregados nas especializações ectoplásmicas, que são bastante desenvolvidas nos mamíferos (revisão Guraya, 1995). As especializações ectoplásmicas são compostas por uma densa banda de filamentos de actina, que está localizada entre a membrana plasmática da célula de Sertoli e o retículo endoplasmático (revisão Guraya, 1995). Estas especializações conferem rigidez à região "cabeça" da espermátide, formando uma estrutura para movimento direcional das células germinativas, que ocorre durante a maturação celular (revisões Boekelheide et al, 1989; Guraya, 1995).

Os microtúbulos são abundantes, estão distribuídos predominantemente paralelos ao longo do eixo das células de Sertoli em feixes compactos e são uniformemente polarizados e orientados com sua extremidade (-) voltada para a periferia da célula (revisão Guraya, 1995). Os microtúbulos aparecem como colunas no citoplasma da célula em associação com as espermátides arredondadas, mas não parecem circundar as células germinativas. Aparentemente, existe uma interação entre especializações ectoplásmicas e microtúbulos, o que levanta a hipótese de que os microtúbulos estejam associados com o movimento das espermátides (revisão Boekelheide et al, 1989).

1.4. Motores Moleculares em Testículo:

1.4.1. Miosinas.

A detecção de miosina II em túbulo seminífero foi realizada através da imunofluorescência, utilizando-se antisoro contra miosina de plaquetas humanas. Verificou-se a distribuição de miosina nas células intersticiais dos vasos sanguíneos, nas células mióides e nas células endoteliais dos vasos linfáticos. Não foi observado marcação nas especializações ectoplasmicas da célula de Sertoli (Vogl & Soucy, 1985). Utilizando-se um modelo apropriado para indução de contração verificou-se que as células mióides são capazes de produzir força contrátil na presença de ATP ou ATP/Ca⁺⁺ exógenos (Vogl & Soucy, 1985).

Estudos bioquímicos e de clonagem molecular, possibilitaram a identificação de uma nova miosina I em rato, denominada myr 1 (myosin-I from rat). A myr 1 existe em três isoformas: myr 1a, myr 1b e myr 1c (Ruppert et al, 1993). Análises de imunoblot, para verificar a distribuição de myr 1 em

diferentes tecidos, demonstraram que myr 1a foi expressa proeminentemente em tecidos cerebrais embriônicos e em tecidos adultos de várias regiões do cérebro e em testículos. Todos os anticorpos utilizados reconheceram fortemente um polipeptídeo de 130 kDa (Ruppert et al, 1993). Análise de Northern blot, para verificar o padrão de expressão das isoformas de myr 1 em tecidos de rato adulto, revelaram três transcritos (4 a 6.5 Kb), que foram proeminentes em vários tecidos, inclusive testículos (Sherr et al, 1993).

A miosina VII é um recente membro da superfamília miosina (Cheney et al, 1993), que foi preliminarmente detectado em *Drosophila* (Chen et al, 1991). Estrutura primária parcial de miosina VII foi obtido de células epiteliais de porco e de humanos (Bement et al, 1994), bem como de rã (Solc et al, 1994). Esta miosina corresponde ao produto do gene *shaker-1*, cuja mutação recessiva leva à surdez em camundongos (Gibson et al, 1995) e em humanos à Síndrome de Usher tipo 1B, uma doença hereditária caracterizada pela surdez congênita, disfunção vestibular e retinite pigmentosa (Weil et al, 1995).

A análise de imunoblot para verificar a distribuição de miosina VIIa em vários tecidos de rato revelou a presença de um polipeptídeo de 240 kDa, principalmente em testículos (Hasson et al, 1995), estes dado são consistentes com a análise de Northen blot que demonstrou a presença de um transcrito de 9.5 Kb proeminente em testículos (Gibson et al, 1995).

A miosina IX foi identificada através da análise de cDNA em leucócitos e figado humanos e em células epiteliais de porco, como duas formas distintas, denominadas A e B (Bement et al, 1994). Uma miosina homóloga a miosina IX-B foi preliminarmente sequenciada em tecidos de rato, denominada myr 5 (fifth unconventional myosin from rat). Análise de imunoblot para detecção de myr 5 em tecidos de rato, revelou a presença de um polipeptídeo de 225 kDa em vários tecidos, inclusive em testículos (Reinhard et al, 1995).

A porção cauda da myr 5 e miosina IX-B são 69% idênticas e ambos os segmentos são relativamente ricos em prolina. Este domínio é seguido por um segundo, rico em cisteína similar a estrutura dos domínios ligantes de zinco e fosfolipídeos para proteína quinase C. O terceiro domínio é homólogo ao das proteínas ativadoras de GTPase (GAP), que regulam a família rho/rac e outras (revisões Mooseker & Cheney, 1995; Chant & Stowers, 1995).

1.4.2. Dineínas.

Uma proteína de alto peso molecular associada à microtúbulos foi obtida de homogeneizado de testículo de rato (Neely & Boekelheide, 1988). Esta proteína apresentou mobilidade eletroforética similar a outras MAPs, no entanto, não apresentou reatividade frente aos anticorpos específicos para MAPs. Assim, a proteína de testículo foi denominada HMW-2, esta é uma ATPase estimulada por microtúbulos, é constitutiva e independente do estágio de desenvolvimento das células germinativas (Neely & Boekelheide, 1988). Semelhante a dineína citoplasmática de cérebro, a proteína HMW-2 apresentou inibição da atividade ATPase pelo vanadato (50 μ M) e eritro(-2-hidroxi -3 nonyl) adenina (EHNA) e fotoclivagem UV dependente de vanadato (Neely & Boekelheide, 1988).

HMW-2 é uma proteína complexa composta de 2 cadeias pesadas de 460 kDa, 2 cadeias intermediárias de 90 kDa e 4 cadeias leves 63, 48, 45 e 40 kDa (Neely et al, 1990). A cadeia pesada e a cadeia intermediária da HMW-2 possuem a mesma mobilidade eletroforética dos polipeptídeos correspondentes à MAP-1C (Neely & Boekelheide, 1988). Imagens de microscopia eletrônica da HMW-2 revelaram uma estrutura com duas cabeças esféricas reunidas. Indicando que a estrutura completa e dimensões da HMW-2 são muito similares a estrutura de outras dineínas citoplasmáticas (Neely et al, 1990).

Estudo imunohistoquímico de testículo de rato para verificar a distribuição de motores associados à microtúbulos, demonstrou que dineína citoplasmática foi imunolocalizada no citoplasma da célula de Sertoli durante todos os estágios da espermatogênese, no entanto, o citoplasma apical da célula de Sertoli exibiu sua mais intensa marcação durante os períodos de pico de atividade secretória das células de Sertoli, estágios IX-XIV (Hall et al, 1992). Nesses estágios dineína citoplasmática foi evidente nas especializações ectoplásmicas das espermátides. Assim, dineína citoplasmática representa um importante papel estágio-dependente na célula de Sertoli e encontra-se em maior concentração nos períodos de pico de atividade secretória das células de Sertoli (Hall et al, 1992).

1.4.3. Cinesinas.

Estudo de imunolocalização de motores associados à microtúbulos em testículo de rato demonstrou cinesina nas "manchettes", estas são estruturas formadas por microtúbulos paralelos, encontradas no núcleo da espermátide desde o início do processo de maturação até sua translocação através do epitélio seminífero (Hall et al, 1992).

1.4.4. Dinaminas.

Inicialmente análises de imunoblot de vários tecidos indicavam que dinamina era restrita à tecidos neurais (Shpetner & Vallee, 1989; Scaife & Margolis, 1990), mas isto não estava de acordo com o papel proposto para a dinamina na célula, a endocitose (Herskovits et al, 1993a; van der Bliek, 1993).

Estudo da expressão e distribuição da dinamina em rato demonstrou que pelo menos dois genes distintos codificam esta proteína, exibindo diferenças marcantes em relação a distribuição e regulação tecidual. A dinamina I é expressa quase exclusivamente no sistema nervoso central e a dinamina II apresentou níveis similares em todos os tecidos testados, incluindo o cérebro (Sontag et al, 1994).

Em estudo recente foi sequenciado um gene de fígado de rato (Dyn 2), que apresenta 75% de homologia ao gene de dinamina de cérebro e 79% de identidade ao produto desse gene (Cook et al, 1994). A maior homologia entre os dois produtos está na primeira metade da proteína, que corresponde aos sítios de ligação para o GTP, região mais conservada das dinaminas. O gene Dyn 2 foi detectado em vários tecidos de rato como dois transcritos cuja expressão maior foi em testículos (Cook et al, 1994). A hibridização *in situ* revelou a expressão de dinamina especificamente nos túbulos seminíferos, inclusive naqueles depletados das células germinativas (Nakata et al, 1993).

2. OBJETIVO GERAL.

Uma fração enriquecida em atividade ATPase estimulada por cálcio e calmodulina foi obtida a partir de citosol de cérebro de rato usando coluna de fosfocelulose (Coelho, 1988). Semelhante ao cérebro, o testículo é rico em calmodulina (Roger et al, 1979), apresenta células assimétricas com múltiplos processos celulares, secreta ativamente muitas substâncias e apresenta arranjo morfológico dos microtúbulos qualitativamente muito semelhantes (ver Bloom et al, 1984 e Boekelheide et al, 1989).

Assim, nosso objetivo inicial neste trabalho foi obter a partir de testículo de coelho uma fração com atividade ATPase usando coluna de fosfocelulose e compará-la com a atividade ATPásica isolada de citosol de cérebro de rato.

3. MATERIAL e MÉTODOS.

3.1. Preparação de Proteínas.

3.1.1. Preparação de Sobrenadante de Testículo de Coelho.

Coelhos adultos pesando entre 3.0-3.5 Kg, foram decaptados e em seguida seus testículos foram removidos, lavados com salina gelada e colocados em tampão de extração TE (Imidazol-Cl 50 mM pH 6.9, EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, DTT 1.0 mM, Benzamidina 1.0 mM e PMSF 0.3 mM). Após reunirmos 08 testículos (peso médio 3.0 g) procedíamos a homogeneização, usando 15 ml de tampão para cada testículo. A homogeneização foi realizada em rotação máxima, em três momentos, usando microtriturador Tecnal modelo TE 102, conectado a motor elétrico do tipo Marconi. O homogeneizado foi colocado em tubos de poliestireno com capacidade para 25 ml cada, e centrifugados a 15.000 g x 40 minutos, numa centrífuga IEC, CENTRA MP4R, refrigerada à 4 °C. O sobrenadante de cada tubo, após filtrado em compressa de gaze dobrada, foi reunido em uma proveta mantida no gêlo (fração S1). O precipitado foi descartado (esquema 01).

3.1.2. Fracionamento de S1 em Coluna de Fosfocelulose.

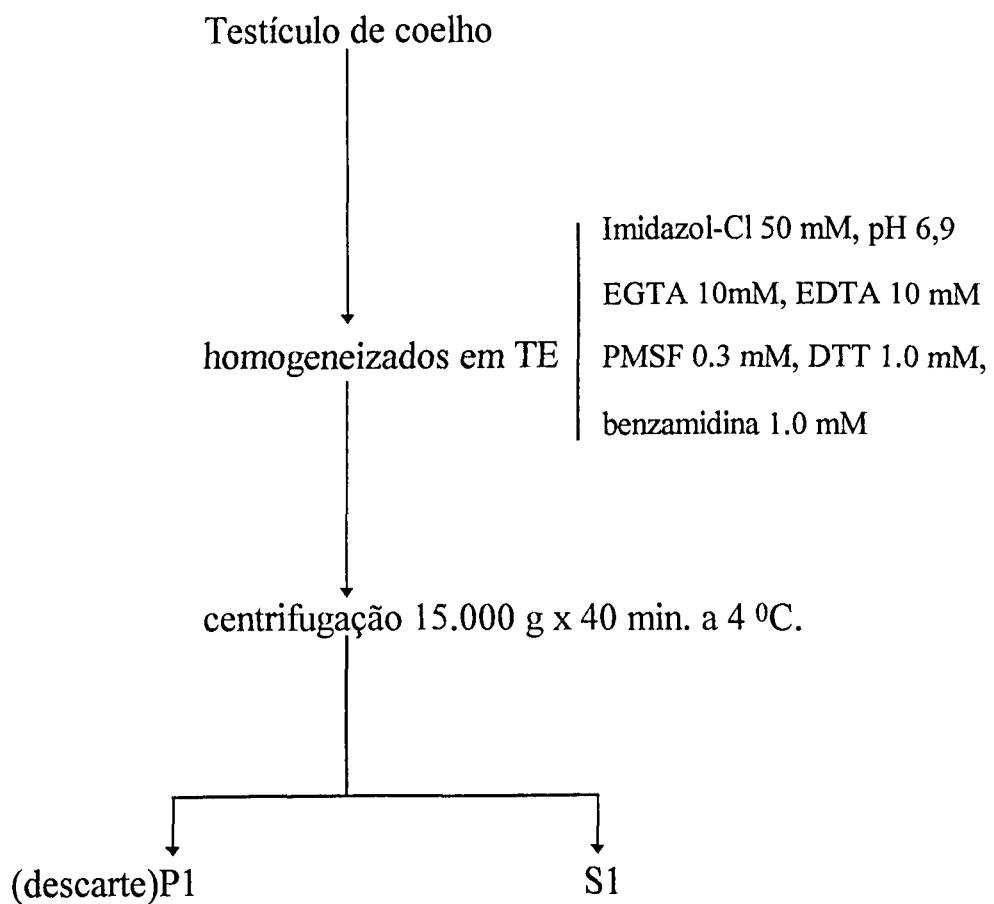
A cromatografia em coluna de fosfocelulose granular (Sigma) foi realizada na câmara fria (4 a 8 °C) e o perfil cromatográfico de proteínas foi acompanhado através da D.O. a 280 nm, espectrofotômetro HITACHI U-2000.

O sobrenadante de testículo foi imediatamente aplicado na coluna de fosfocelulose (5.5 x 1.6 cm) com um fluxo de 12 gôtas/min.. A coluna foi previamente equilibrada com 10 volumes de tampão I pH 6.9 (Imidazol-Cl 50

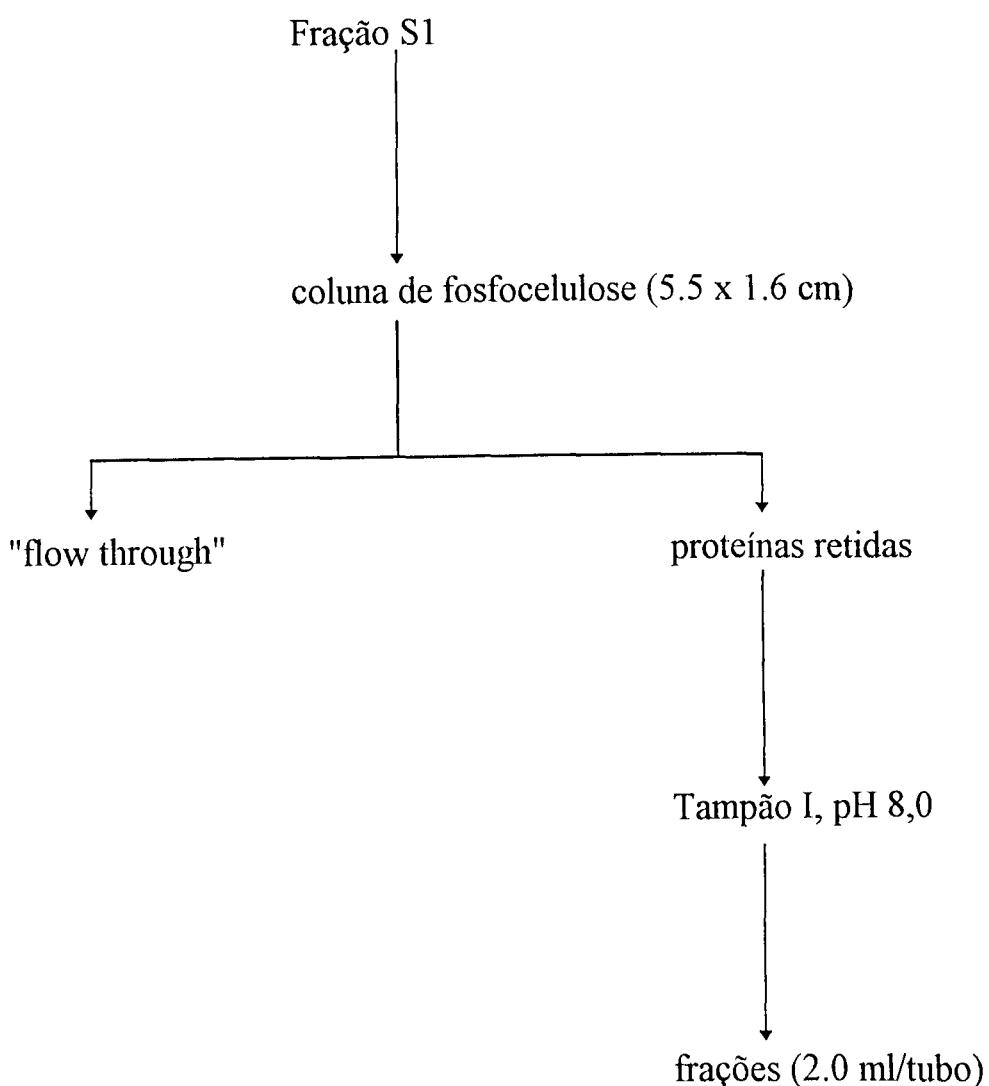
mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.2 mM) e após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão I pH 6.9 até que a D.O. a 280 nm < 0.005.

Proteínas retidas foram eluídas com tampão I pH 8.0 e foram coletadas frações de 2.0 ml., usando-se um coletor de frações BIO RAD Modelo 2110. (esquema 02)

Esquema 01: Preparação de Sobrenadante de Testículo de Coelho.



Esquema 02: Fracionamento de S1 em Coluna de Fosfocelulose.



3.1.3. Fracionamento de S1' em Coluna de DEAE-Sepharose.

A fração S1' de testículo foi obtido da mesma maneira como descrito no item 3.1.1, com excessão do tampão TE que foi alterado de 6.9 para pH 8.5 (esquema 01).

A cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose foi realizada em câmara fria (4 a 8 °C) e o perfil cromatográfico foi acompanhado através da D.O. a 280 nm em espectrofotômetro HITACHI U-2000.

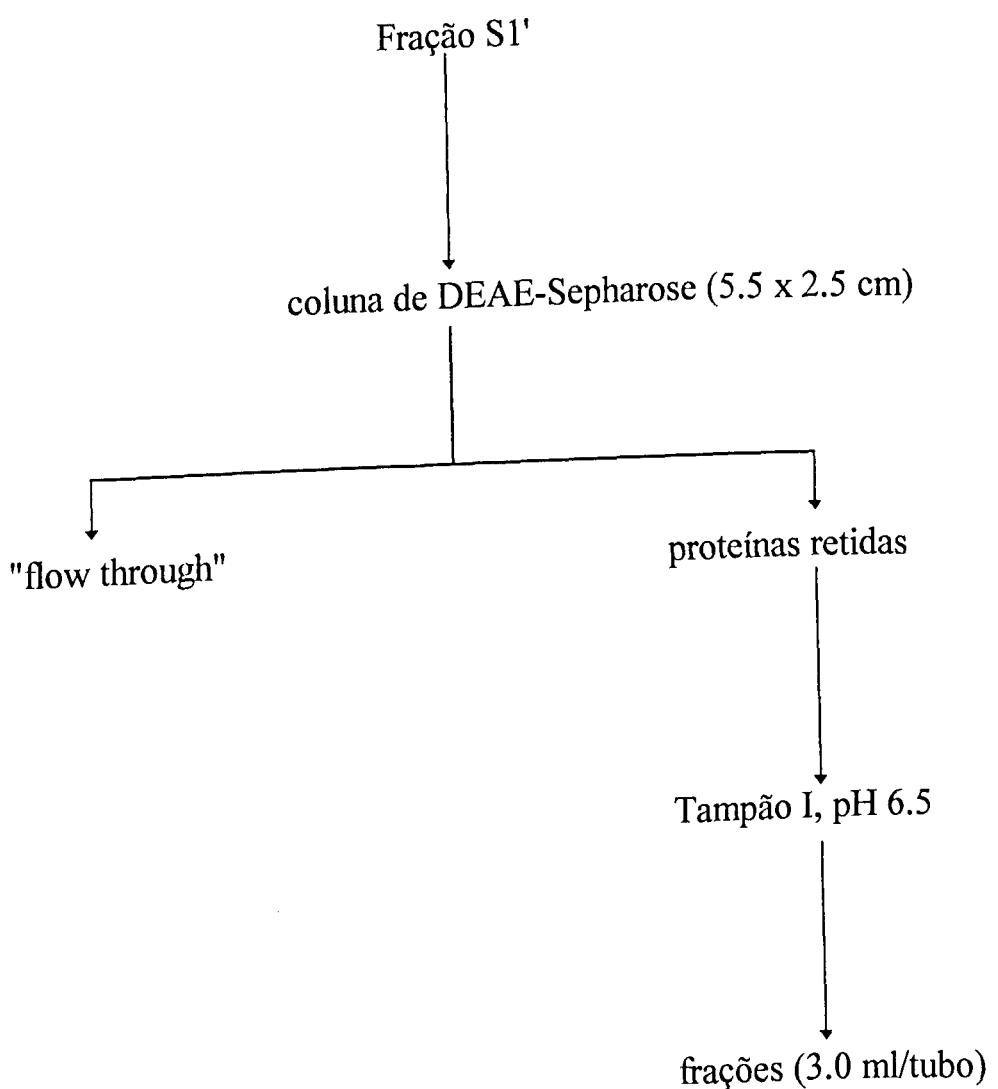
A fração S1' foi aplicada em coluna de DEAE-Sepharose (5.5 x 2.5 cm) com um fluxo de 10 gôtas/min. A coluna foi previamente equilibrada com 10 volumes de tampão I pH 8.5 e após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até que a D.O. a 280 nm < 0.005. Proteínas retidas foram eluídas com tampão I, pH 6.5 em frações de 3.0 ml, utilizando-se um coletor de frações BIO RAD Modelo 2110. Nesta eluição a concentração de Imidazol foi de 100 mM (esquema 03).

3.1.4. Fracionamento do "Pool" DEAE em Coluna de Fosfocelulose.

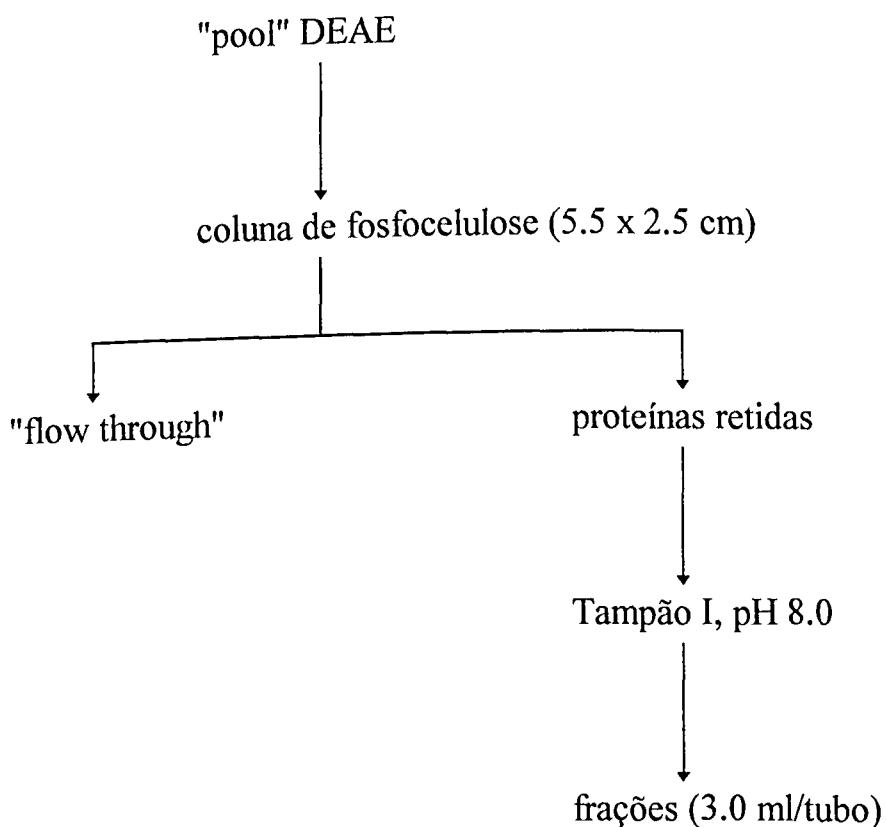
A cromatografia na coluna de fosfocelulose granular foi realizada na câmara fria (4 a 8 °C) e o perfil cromatográfico foi acompanhado através da D.O. a 280 nm.

As frações eluídas na etapa anterior, com D.O. a 280 nm > 0.10 foram reunidas formando a fração "pool DEAE". Esta foi aplicada em coluna de fosfocelulose (5.5 x 2.5 cm) com fluxo de 10 gôtas/min.. A coluna foi previamente equilibrada com 10 volumes de tampão I pH 6.5 e após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão I pH 6.5 até que a D.O a 280 nm < 0.005. Proteínas retidas foram eluídas com tampão I pH 8.0 em frações de 3.0 ml, utilizando-se um coletor de frações BIO RAD Modelo 2110. Neste passo a concentração de Imidazol foi de 100 mM (esquema 04).

Esquema 03: Fracionamento de S1' em Coluna de DEAE-Sepharose.



Esquema 04: Fracionamento do "Pool" DEAE em Coluna de Fosfocelulose.

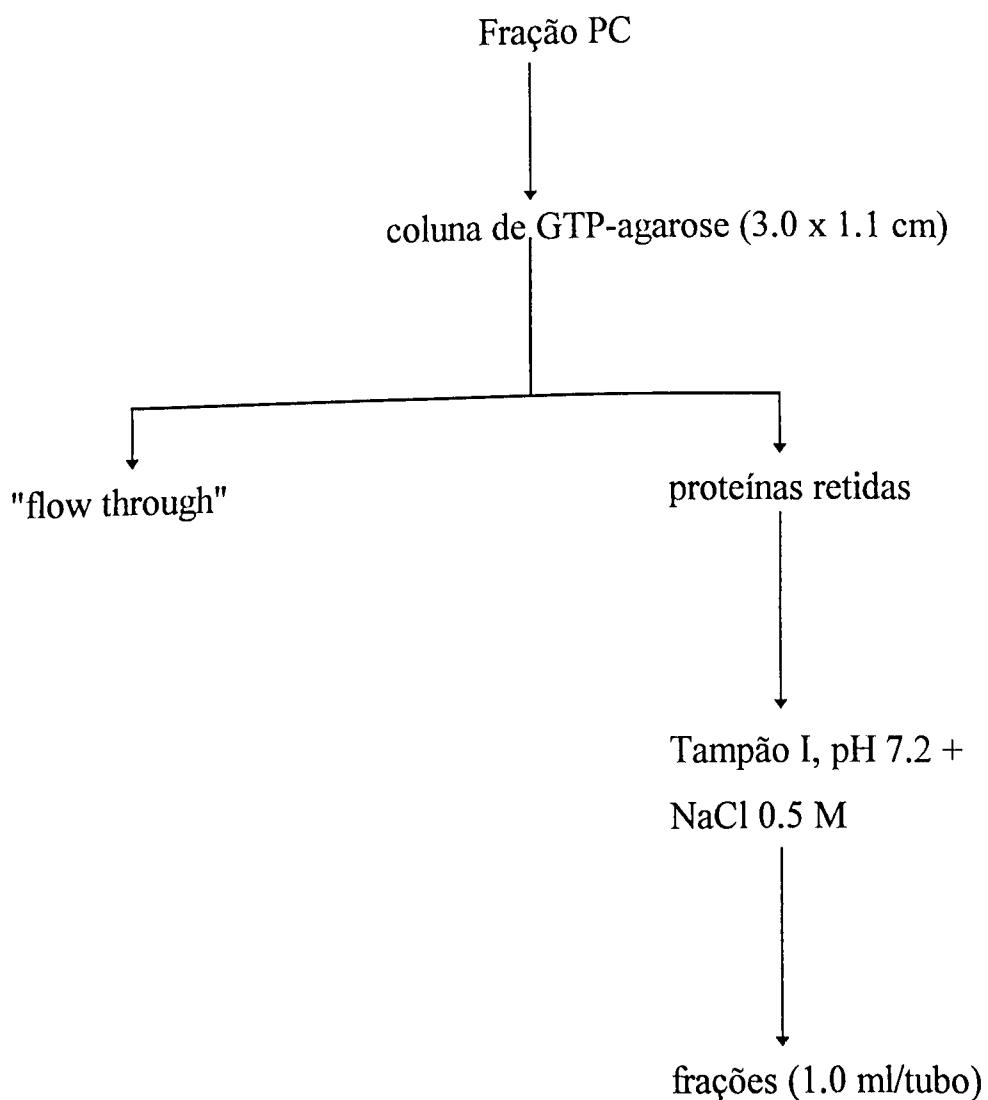


3.1.5 Fracionamento da Fração PC em Coluna de GTP-Agarose.

As frações com atividade ATPase eluídas na etapa anterior foram reunidas constituindo a fração PC. Esta foi aplicada em coluna de GTP-agarose (3.0 x 1.1 cm) com fluxo de 6 gôtas/min. A coluna foi previamente equilibrada com 10 volumes de tampão I, pH 8.0 e após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio até que a D.O. a 280 nm < 0.005. Proteínas retidas foram eluídas com tampão I, pH 7.2

contendo NaCl 0.5 M e foram coletadas frações de 1.0 ml, utilizando-se um coletor de frações BIO RAD Modelo 2110 (esquema 05).

Esquema 05: Fracionamento da Fração PC em Coluna de GTP-Agarose.



3.2. Métodos de Análise.

3.2.1. Dosagem de Proteínas:

A concentração de proteínas nas frações foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando como padrão soro albumina bovina (Sigma).

As dosagens foram realizadas em duplicatas e para cada experimento fez-se uma curva padrão. A quantidade de proteína (5 a 30 μ g) utilizada para a construção da curva padrão está dentro da faixa de linearidade do método. A concentração proteica das amostras foi determinada a partir da regressão linear dos valores da curva padrão (Figura 01).

Embora, para cada experimento tenha sido feito uma nova curva padrão com reagentes novos, observamos que o reagente de Bradford armazenado por uma semana não perdeu a linearidade, porém diminuiu a sensibilidade (Figura 02).

Para cada dosagem foram utilizados: 100 μ l distribuídos entre amostra e água desionizada e 3.0 ml do reagente de Bradford (dissolver 100 mg de Coomassie G (Sigma) em 50 ml de etanol 95% (Merck) e sob agitação acrescentar 100 ml de ácido fosfórico 85% (Reagen) completando o volume para um litro com água desionizada e posterior filtração). A absorbância foi medida a 595 nm após 3 minutos e antes de 1 hora, contra o branco que contém o mesmo tampão da amostra.

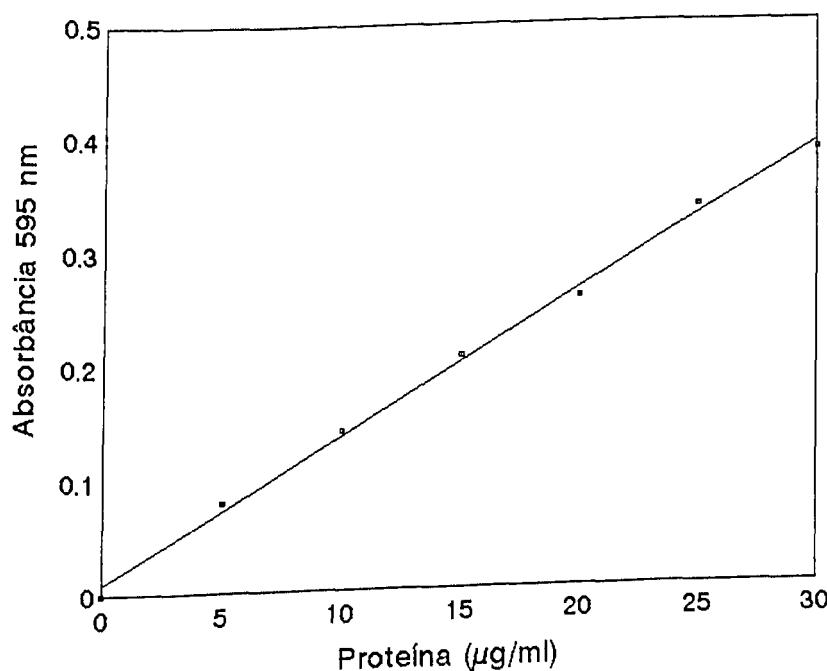


Figura 01: Curva padrão de soro albumina bovina (BSA).

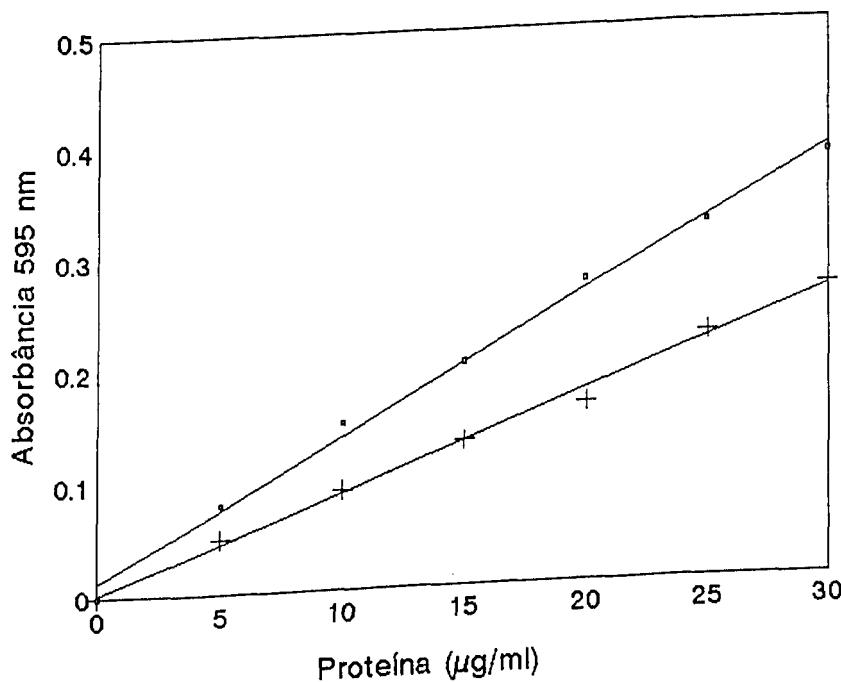


Figura 02: Curva padrão de BSA mostrando queda na sensibilidade do reagente de Bradford com o tempo. -- Preparado no dia, + Armazenado uma semana.

3.2.2. Determinação da Atividade Nucleotidase Trifosfatásica.

A atividade nucleotidase foi determinada pela dosagem do ortofosfato inorgânico (Pi) liberado no meio de reação em consequência da hidrólise do ATP ou GTP (substrato). A quantificação deste fosfato foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Heinonen e Lahti (1981).

Execução da reação e determinação do fosfato inorgânico liberado:

1- Meios de reação foram preparados e armazenados em frascos de vidro âmbar, 40 μ l deste meio foi pipetado em cada tubo de ensaio. Estes meios estão definidos na tabela 01.

2- A esses tubos contendo o meio de reação, foram adicionados de 20 a 50 μ g de proteína (cuja atividade ATPásica ou GTPásica deseja-se saber).

3- A reação iniciava-se com a adição de 20 μ l de uma solução de ATP ou GTP 50 mM (concentração final de 5mM). A incubação foi feita a 37 °C por tempo pré-determinado. O volume final no tubo de reação foi de 0.2 ml.

4- Após transcorrer o tempo de incubação, as reações foram interrompidas adicionando-se com o auxílio de pipetador automático 2.0 ml da própria solução de dosagem AAM: 01 volume de Molibdato de Amônio 10 mM, 01 volume de Ácido Sulfúrico 5M e 02 volumes de Acetona P.A, agitou-se o tubo por 15 segundos num agitador vórtex, em seguida adicionou-se 0.2 ml de ácido cítrico 1M agitando-se por mais 10 segundos.

5- Sempre foi feito um branco para cada amostra, neste caso o ATP ou GTP sómente foi adicionado ao tubo de reação imediatamente antes da adição da solução AAM. Esta solução foi preparada de 15 a 30 minutos antes de iniciar a dosagem.

6- O item 5 foi repetido para todos os tubos respeitando o tempo de reação pré-determinado.

- 7- A seguir foi realizada a leitura da absorbância a 355 nm num espectrofotômetro HITACHI U-2000. Foram utilizadas cubetas de quartzo.
- 8- A curva padrão (Figura 03) foi construída utilizando-se uma solução padrão de KH_2PO_4 cuja concentração compreendeu a faixa de 0 a 200 nmoles de ortofosfato. Nesta faixa a absorbância em 355 nm varia linearmente com a concentração de ortofosfato inorgânico. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas.
- 9- Para cada ensaio de atividade ATP/GTPase fez-se em duplicata um tubo contendo a solução de KH_2PO_4 cujo valor de absorbância e concentração de Pi foram utilizados para os cálculos, conforme equação abaixo.
- 10- A atividade específica foi determinada pela seguinte equação:

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

- 11- A atividade específica foi expressa em nmoles de Pi/ minuto/ mg de proteína.

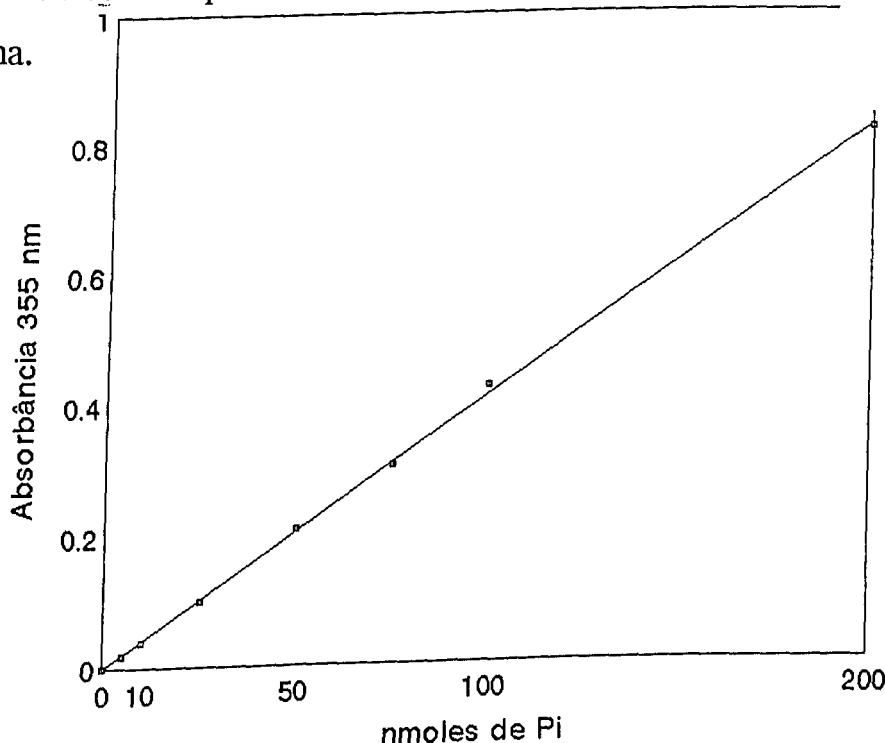


Figura 03: Curva padrão de fosfato inorgânico KH_2PO_4 .

Tabela 01: Meios de reação para Atividade Nucleotidase Trifosfatásica.

Atividade	MgCl ₂	CaCl ₂	CaM	NaCl	KCl	KCl	EDTA
Nucleotidase	5 mM	2 mM	2.5 µg	0.3 M	0.06M	0,6M	2 mM
Mg ⁺⁺	X						
Ca ⁺⁺		X					
Mg ⁺⁺ /Ca ⁺⁺	X	X					
Mg ⁺⁺ /Ca ⁺⁺ /CaM	X	X	X				
(K/EDTA)ATPase						X	X
					X		X
(Na/K)ATPase	X			X	X		

Meio de reação utilizado para a atividade Nucleotidase, além dos componentes citados acima, contém: Imidazol-Cl 25 mM; DTT 0.2 mM e EGTA 1.0 mM.

3.2.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).

O perfil de proteínas foi analisado em gel de poliacrilamida com SDS utilizando o sistema tampão descontínuo (Laemmli & Favre, 1973) e o sistema de placas empregado por Studier (1973).

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em placa de vidro, as dimensões do gel foram de 10 x 10 x 0.06 cm (mini-gel). O gel de separação foi preparado com as seguintes soluções: Tris-HCl 375 mM pH 8.8, EDTA 2 mM, Acrilamida:Bisacrilamida na proporção de 30 : 0,8, respectivamente, TEMED 0.05% e Persulfato de Amônio 0.35%. O volume da solução acrilamida:bisacrilamida foram determinadas conforme a concentração desejada para o gel. As concentrações dos géis estão indicadas na legenda das figuras.

O gel de empilhamento foi preparado com Tris-HCl 125 mM pH 6.8, EDTA 2 mM, SDS 0.1%, acrilamida:bisacrilamida 5%, TEMED 0.125% e persulfato de amônio 0.125%. As placas foram montadas em cubas apropriadas contendo o tampão eletrodo (Tris-Cl 100 mM pH 8.3, EDTA 7.8 mM, glicina 0.77M e SDS 0.3%).

As amostras foram preparadas mantendo-se a proporção de 100 μ l de amostra para 50 μ l de tampão STOP (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 1%, bromofenol 0.25%, glicerol 10%) e 10 μ l de β -mercaptoetanol, após a mistura, a amostra foi aquecida por dois minutos em água fervente.

Em cada poçinho, aplicou-se de 5 a 10 μ l de amostra com o auxílio de microseringa Hamilton. Após aplicar todas as amostras, ligava-se a fonte BIO RAD Modelo 1000/500. A eletroforese foi iniciada com 20 mA, corrente esta que foi mantida até a entrada da frente de bromofenol no gel de separação. Em seguida, a corrente foi aumentada para 25 mA. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie (R-250) e para retirar o excesso de corante do gel, usou-se uma solução de etanol 30% e ácido acético 10%.

Após coloração, o gel foi colocado entre duas folhas de papel celofane (previamente mergulhados em água destilada) e presos com bastidores de madeira e deixados a temperatura ambiente para secarem.

O padrão de peso molecular relativo ($Mr \times 10^{-3}$) utilizado foi o SDS-6H (Sigma) que contém: cadeia pesada de miosina (205), β -galactosidase (116), fosforilase-b (97), albumina bovina (66), ovoalbumina (45) e anidrase carbônica (29).

3.2.4. Determinação do Peso Molecular de Proteínas em SDS-PAGE.

3.2.4.1. Preparação da Curva de Calibração:

- 1) Calcular o logaritmo (log) correspondente a cada peso molecular do padrão (eixo y).
- 2) Medir a distância de migração de cada uma das bandas do padrão comercial SDS-6H (Sigma).
- 3) Calcular o valor de migração relativa (Rf) das bandas do padrão (eixo x).

$$Rf = \frac{\text{distância que a proteína migrou à partir da origem do gel.}}{\text{distância da origem até o "front" do gel.}}$$

- 4) Construção da curva de calibração: os valores de migração relativa (Rf) das bandas do padrão foram plotados no eixo x e o logaritmo (log) correspondente a cada peso molecular no eixo y.

3.2.4.2. Determinação do Peso Molecular do Polipeptídeo de Interesse.

- 1) Medir a distância de migração do polipeptídeo de interesse.
- 2) Calcular a Rf deste polipeptídeo, conforme fórmula anterior (valor de x).
- 3) Calcular a equação da reta, conforme $y = a + bx$
- 4) Encontrar o valor de y, conforme equação anterior.
- 5) Calcular o anti log y, encontrando assim a massa relativa do polipeptídeo de interesse.

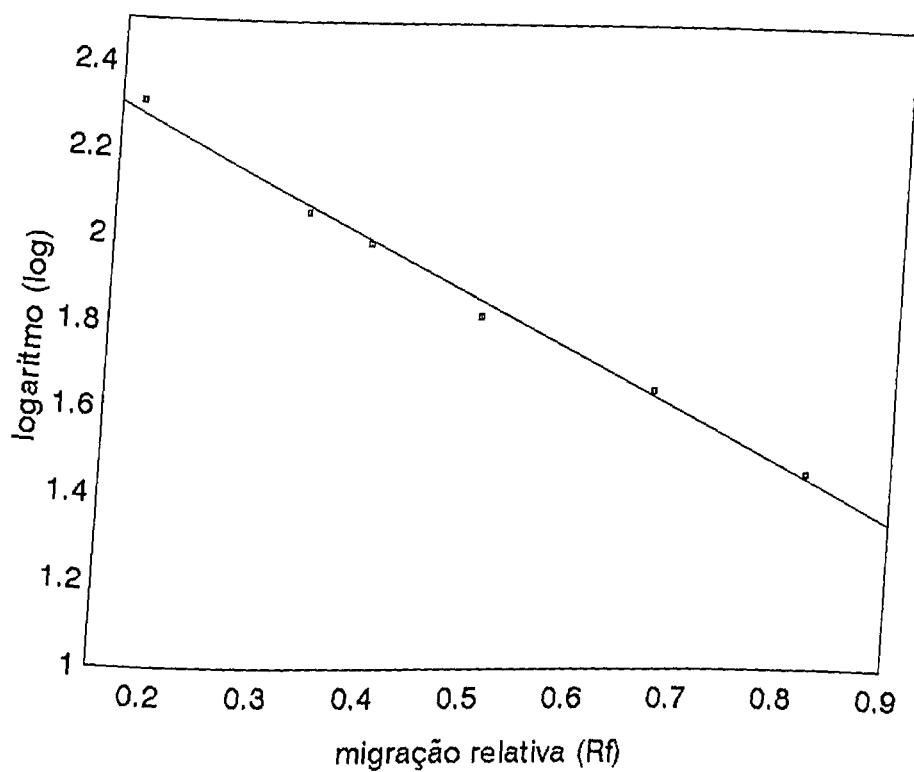


Figura 04: Curva de calibração dos polipeptídeos do padrão SDS-6H.

4. RESULTADOS.

4.1. Fracionamento de Sobrenadante de Testículo de Coelho em Coluna de Fosfocelulose.

O sobrenadante 15.000g x 40 min. de testículo (fração S1) obtido conforme descrito em Material e Métodos, possui uma coloração avermelhada.

Uma possível ação de proteases e peptidases no homogeneizado foram minimizadas pela presença de PMSF (0.3mM); benzamidina (1.0mM) e alta concentração de quelantes EDTA/EGTA (10mM), além da baixa temperatura (0 a 4 °C) das soluções e a rapidez na remoção e homogeneização dos testículos.

A fração S1 (60 ml) foi aplicada em coluna de fosfocelulose conforme Material e Métodos. Proteínas retidas na coluna foram eluídas com 2.5 volumes de tampão I pH 8.0 e foram coletadas frações de 2.0 ml. Observou-se que as proteínas eluídas juntamente com a atividade ATPase foram detectadas à partir de 6 ml de eluição (fração 03). Quando a fração S1 foi aplicada na coluna de fosfocelulose houve o empacotamento da resina, isto levou a um "arraste" de proteínas ao longo da eluição, dificultando o processo cromatográfico (Figura 05).

No gel observa-se vários polipeptídios: 147, 100, 79, 62, 48, 42, 40 e 16 kDa que foram eluídos juntos com a atividade ATPase (Figura 06).

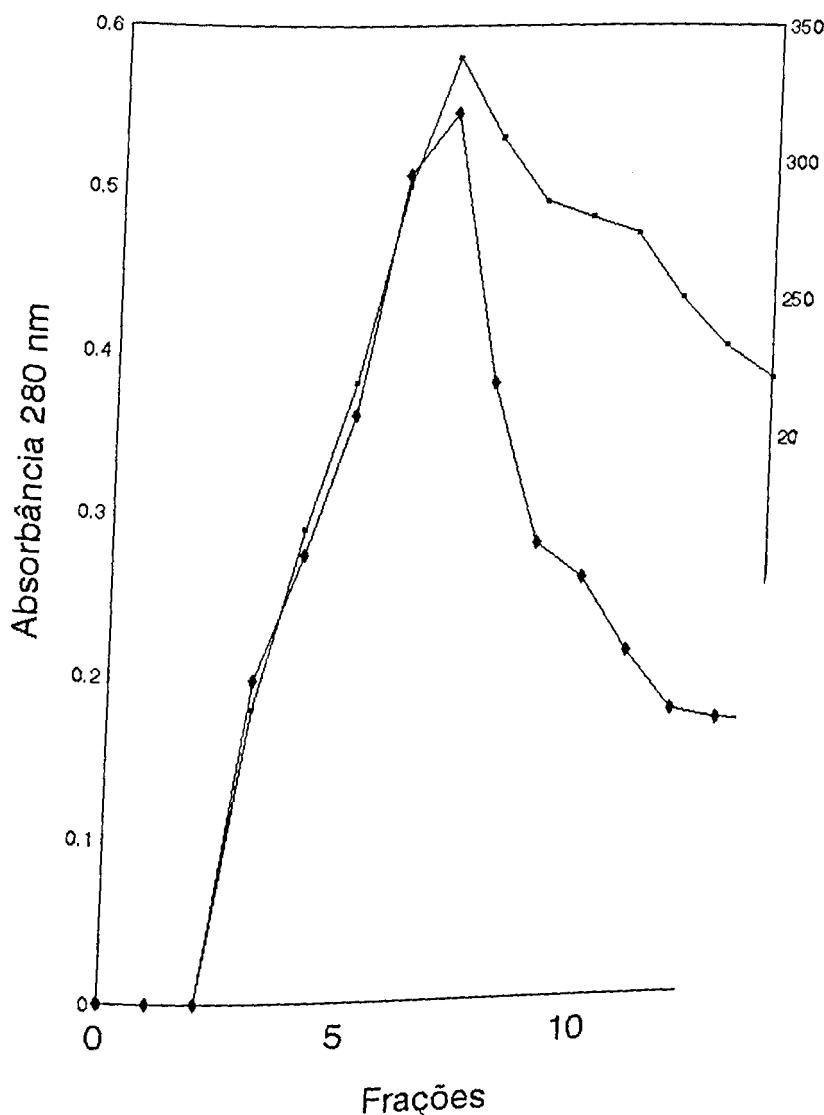


Figura 05: Atividade ATPase das frações eluídas da coluna de fosfocelulose. As frações foram pré incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo: Imidazol 25 mM, pH 7.0; KCl 60 mM; $MgCl_2$ 5.0 mM; EGTA 1.0 mM e DTT 0.2 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP (concentração final 5mM) e após 20 minutos a 37 °C foi interrompida com a própria solução de dosagem. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. \blacksquare Absorbância a 280 nm, \blacktriangle Atividade ATPase.

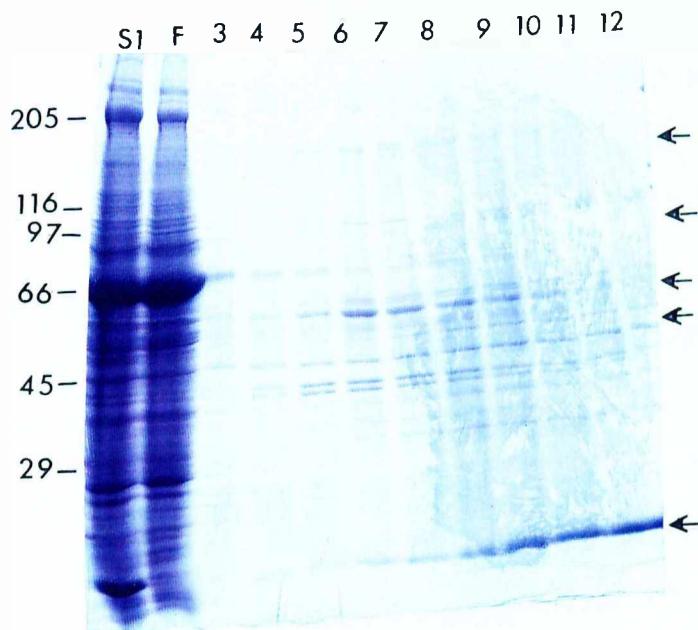


Figura 06: SDS-PAGE do S1 e das frações eluídas da coluna de fosfocelulose. Proteínas de S1 retidas na coluna de fosfocelulose foram eluídas com tampão I pH 8.0 e foram coletadas frações de 2.0 ml. Foram aplicados no gel (8 a 17%) 153 µg do "flow through" (F) e 1.7; 3.3; 3.5; 4.0; 3.7; 3.3; 3.1; 2.9; 2.7; 2.5 µg de proteínas, que correspondem as frações 03 a 12, respectivamente. O gel foi corado com Coomassie blue G. As setas indicam polipeptídeos: 147, 100, 62, 48 e 16 kDa. Padrões de peso molecular ($Mr \times 10^{-3}$): cadeia pesada de miosina, β -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.

4.2. Fracionamento de S1' em Coluna de DEAE-Sepharose.

Semelhante a fração isolada de citosol de cérebro de rato (Coelho, 1988), foi obtido em coluna de fosfocelulose frações com atividade ATPase a partir de sobrenadante de testículo de coelho. No entanto, conforme citado anteriormente o processo cromatográfico foi prejudicado devido ao empacotamento da resina em contacto com a fração S1. Assim, com o objetivo de melhorar o perfil cromatográfico da fosfocelulose, resolvemos primeiramente aplicar o sobrenadante extraído com pH 8.5 na coluna de DEAE-Sepharose, eluí-la com tampão I, pH 6.5 e então aplicar este eluado na coluna de fosfocelulose.

O sobrenadante 15.000g x 40 min. de testículo (fração S1') possui cerca de 910 mg de proteínas. A fração S1' foi aplicada em coluna de DEAE-Sepharose conforme descrito em Material e Métodos. Nas condições usadas cerca de 40% das proteínas foram retidas pela coluna e o restante passou direto no "flow through" (527 mg). Proteínas retidas foram eluídas com 05 volumes de tampão I, pH 6.5 e as frações cuja a D.O. > 0.10 foram reunidas, constituindo o "pool" DEAE (Figura 07). No gel pode-se notar que os principais polipeptídeos do "pool" DEAE são: 238, 100, 74, 66, 48 e 16 kDa entre outros (Figura 08).

4.3. Fracionamento do "Pool" DEAE em Coluna de Fosfocelulose.

A fração "pool" DEAE (90 mg) foi aplicado na coluna de fosfocelulose (5.5 x 3.0 cm) pH 6.5. Nas condições utilizadas cerca de 35% das proteínas foram retidas pela coluna, a maior parte das proteínas apareceram na fração "flow through" (58 mg). Proteínas retidas foram eluídas com tampão I pH 8.0 e foram coletadas frações de 3.0 ml.(Figura 09).

Em geral, detectou-se proteínas a partir de 27 ml de eluição e apenas verificou-se atividade MgATPase em duas frações. Na fração pico e outra ao lado. A atividade MgATPase na fração pico variou de 33 a 45 nmoles de Pi/min/ mg e a concentração de proteínas foi de 0.23 a 0.30 mg/ml (Figura 09).

Comparando-se a figura 09 com a figura 05 podemos observar que a utilização primeiramente da coluna de DEAE-Sepharose e depois a de fosfocelulose melhorou o processo cromatográfico.

No gel pode-se observar que o polipeptídeo de 66 kDa passou direto pela coluna e aparece na fração "flow through" (F). Nas duas frações com atividade MgATPase observa-se os seguintes polipeptídeos: 160, 100, 74, 48, 42, 40, 32 e 16 kDa dentre outros polipeptídeos, que também estão presentes nas demais frações (Figura 10)

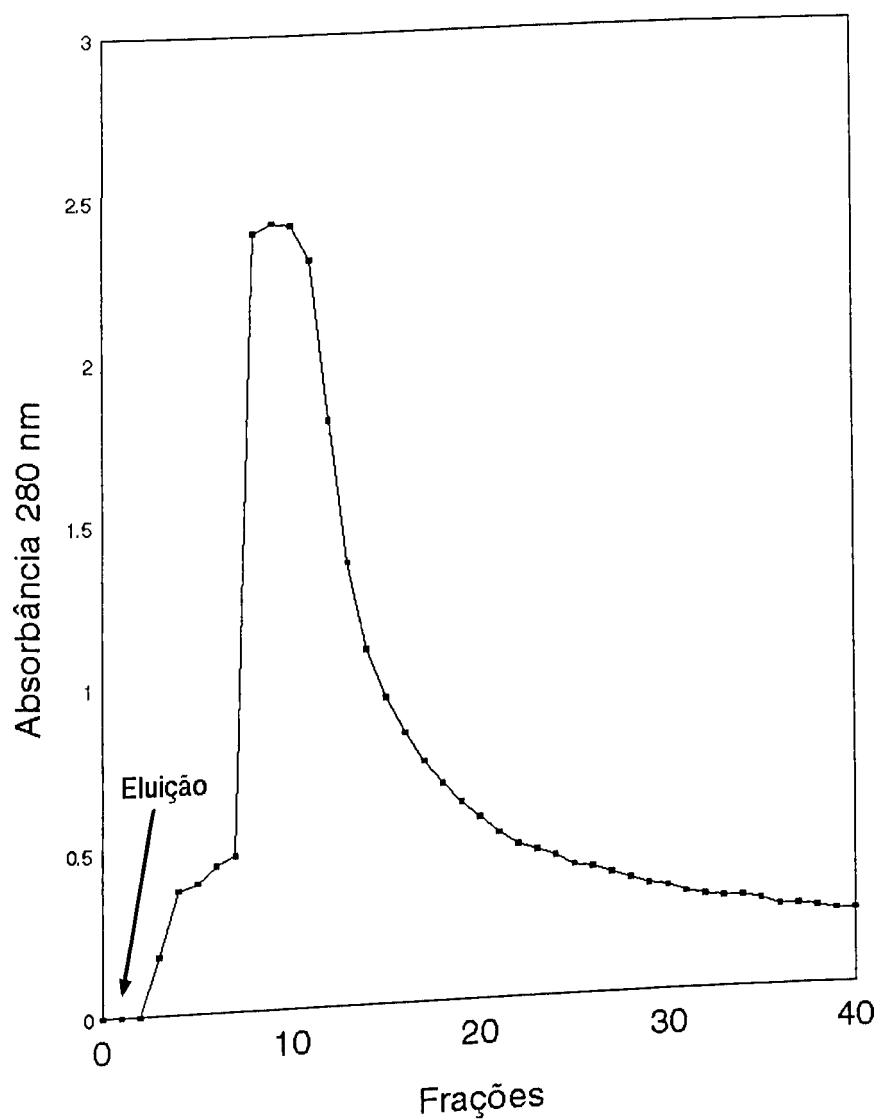


Figura 07: Cromatografia da fração S1' em coluna de DEAE-Sepharose.
A fração S1' foi aplicada em coluna de DEAE-Sepharose (5.5 x 2.5 cm) pH 8.5. Proteínas retidas foram eluídas com tampão I pH 6.5 e foram coletadas frações de 3.0 ml. A eluição foi realizada a 4 °C e acompanhada com D.O. a 280 nm. A seta indica o início da eluição.

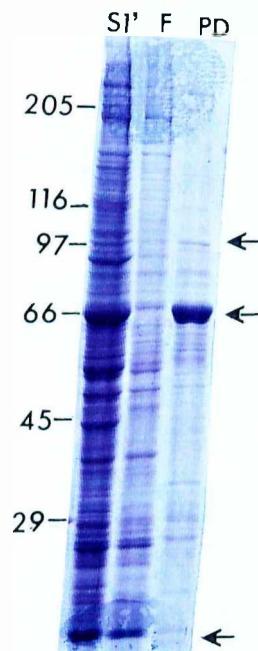


Figura 08: SDS-PAGE das frações S1', "flow through" e "pool" DEAE. As frações cuja a D.O. a 280 nm > 0.10 foram reunidas formando o "pool" DEAE. Foram aplicados no gel (12%) 23 µg da fração S1'; 6 µg da fração "flow through" (F) e 4 µg da fração "pool" DEAE (PD). O gel foi corado com Coomassie blue G. As setas indicam os polipeptídeos de 100, 66 e 16 kDa. Padrões de peso molecular ($Mr \times 10^{-3}$): cadeia pesada de miosina, β -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.

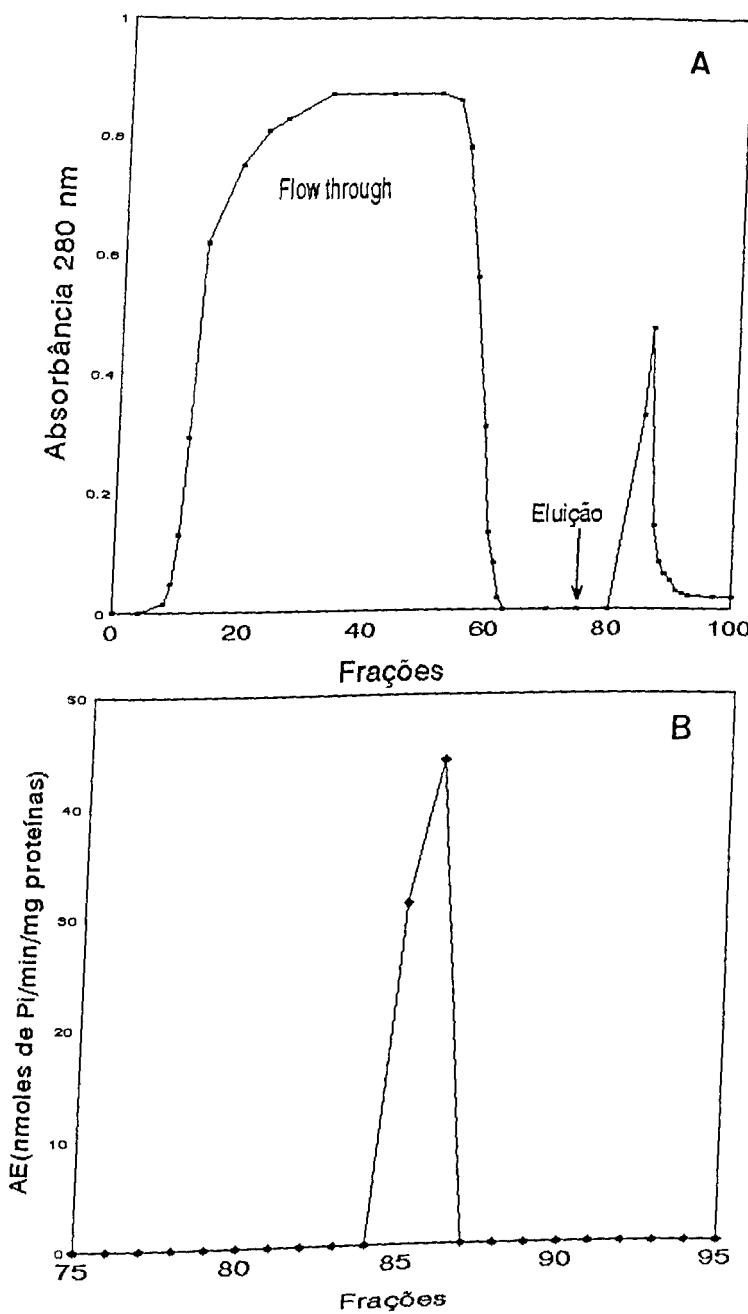


Figura 09 - A) Perfil cromatográfico do "pool" DEAE em coluna de fosfocelulose. A fração "pool DEAE" foi aplicada em coluna de fosfocelulose (5.5 x 2.5 cm) pH 6.5. Proteínas retidas foram eluídas com tampão I pH 8.0 e foram coletadas frações de 3.0 ml. Todo o processo cromatográfico foi realizado a 4 °C e acompanhado com D.O. a 280 nm. A seta indica início da eluição. **B)** Atividade MgATPase das frações eluídas da coluna de fosfocelulose. As frações foram pré incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo: Imidazol 25 mM, pH 7.0; KCl 60 mM; MgCl₂ 5.0 mM; EGTA 1.0 mM; DTT 0.2 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP (concentração final 5 mM) e após 20 minutos a 37 °C foi interrompido com a própria solução de dosagem. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. Outras 04 preparações foram realizadas mostrando perfil enzimático similar.

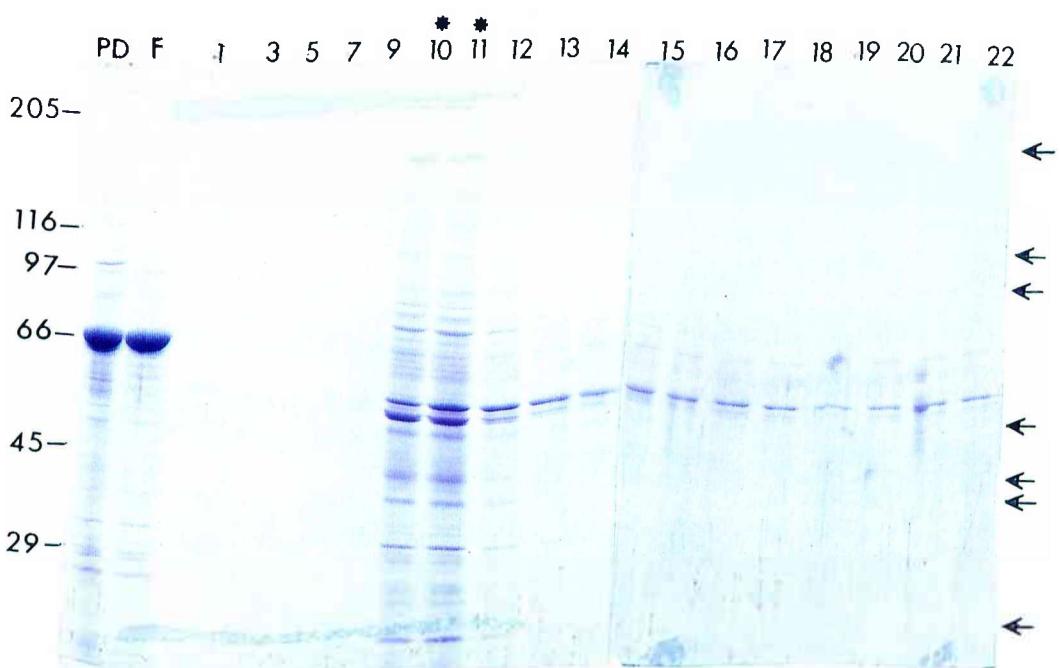


Figura 10: SDS-PAGE do "pool" DEAE, "flow through" e das frações eluídas da coluna de fosfocelulose. Foram aplicados no gel (12%) 4 µg do "pool DEAE" (PD); 2.5 µg do "flow through" (F) e 1.6; 2; 1.5; 1.4; 1.3; 1.2; e 1.1 µg de proteínas que correspondem as frações 10 a 16, respectivamente. O gel foi corado com Coomassie blue G. Os asteriscos, indicam as frações que apresentaram Atividade Nucleotidase Trifosfatásica. As setas indicam polipeptídeos 160; 100; 74, 48, 42, 40 e 16 kDa. Padrões de peso molecular ($Mr \times 10^{-3}$): cadeia pesada de miosina, β -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.

4.4. Efeito de Cálcio e Calmodulina na Atividade ATPase da Fração PC.

As duas frações que apresentaram atividade MgATPase e perfil em SDS-PAGE semelhantes (Figuras 09 e 10) foram reunidas, constituindo a fração PC, cuja concentração de proteínas variou de 0.2 a 0.25 mg/ml.

Semelhante a fração isolada de citosol de cérebro de rato em fosfocelulose (Coelho, 1988), a fração PC possui atividade ATPase basal tanto na presença de Mg^{++} (MgATPase) como de Ca^{++} (CaATPase) (Figura 11). A atividade CaATPase é cerca de 20% maior do que a atividade MgATPase, mas isto não significa que esta fração possui mais de uma ATPase, pois estas atividades não são somadas quando a fração PC é incubada na presença de Mg^{++} e Ca^{++} (Figura 12). Estes cátions podem agir como cofator e, também, podem fazer parte do substrato na forma de Mg-ATP ou Ca-ATP. Diferentemente da fração isolada de citosol de cérebro de rato em fosfocelulose (Coelho, 1988), a fração PC de sobrenadante de testículo não apresentou estimulação na presença de Ca^{++}/CaM (Figura 12).

4.5. Atividade GTPase da Fração PC.

Semelhante à fração isolada de citosol de cérebro de rato em coluna de fosfocelulose (Coelho, 1988), a fração PC de testículo de coelho hidroliza de 2 a 2.5 vezes mais o GTP do que o ATP (Figura 13). É interessante notar que a fração PC hidroliza preferencialmente o GTP em concentrações maiores (mM) e indistintamente em baixas concentrações (μM) (Tabela 02).

A fração PC também possui atividade GTPase basal tanto na presença de Mg^{++} (MgGTPase) como de Ca^{++} (CaGTPase) (Figura 14) sendo que a atividade CaGTPase é cerca de 2 vezes maior do que a MgGTPase. A

atividade GTPase também não é somada quando a fração PC é incubada na presença de Mg^{++} e Ca^{++} (Figura 14). A atividade GTPase não é estimulada na presença de Ca^{++}/CaM (Figura 14).

Tabela 02: Comparação da Atividade GTP/ATPase da Fração PC (nmoles de Pi/ min/ mg de proteínas).

[] substrato (mM)	ATPase	GTPase	GTPase/ATPase (%)
0.1	17	16	94
0.5	22	29	132
1.0	28	44	157
2.0	34	ND *	ND
5.0	33	75	227

No meio de reação contendo: Imidazol 25 mM, pH7.0; KCl 60 mM; $MgCl_2$ 5.0 mM; EGTA 1.0 mM; DTT 0.2 mM, foram acrescentadas as diferentes concentrações dos substratos. A reação foi iniciada com a adição de 28 μ g de proteínas da fração PC e após 20 minutos a 37 °C foi interrompida com a própria solução de dosagem. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. Os valores acima são de uma preparação. Outras 02 preparações foram realizadas mostrando perfil enzimático similar. * não determinado.

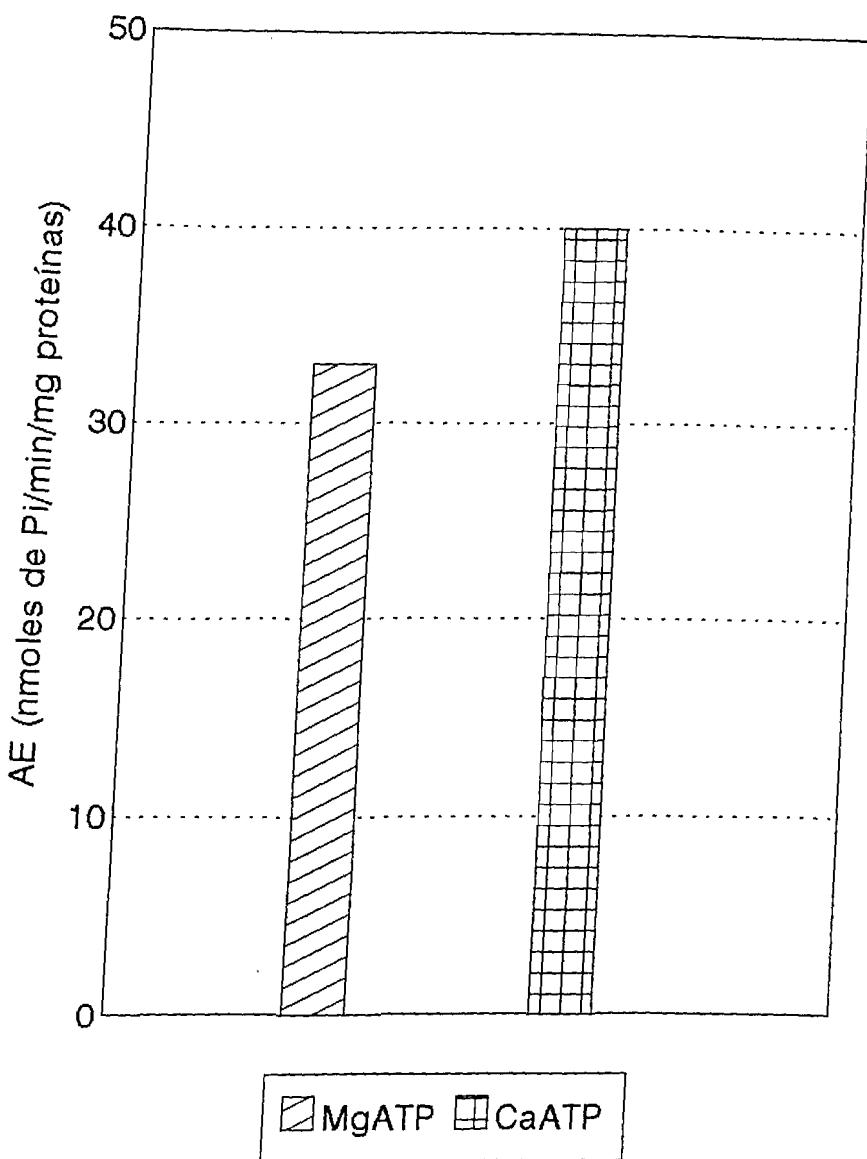


Figura 11: Atividade MgATPase e CaATPase da fração PC. 28 μ g da fração PC foram pré incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo: Imidazol 25 mM, pH 7.0; KCl 60 mM; EGTA 1.0mM; DTT 0.2 mM. A atividade MgATPase foi determinada acrescentando-se 5 mM de $MgCl_2$ e a CaATPase acrescentando-se 2.0 mM de $CaCl_2$. A reação foi iniciada com a adição de ATP (concentração final 5 mM) e após 30 minutos a 37 °C foi interrompida com a própria solução de dosagem. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas. Os valores acima são de uma única preparação. Outras 05 preparações foram realizadas, mostrando perfil enzimático similar. A atividade MgATPase variou de 30 a 40 nmoles de Pi/min/mg de proteínas e a CaATPase de 40 a 52 nmoles de Pi/min/mg de proteínas.

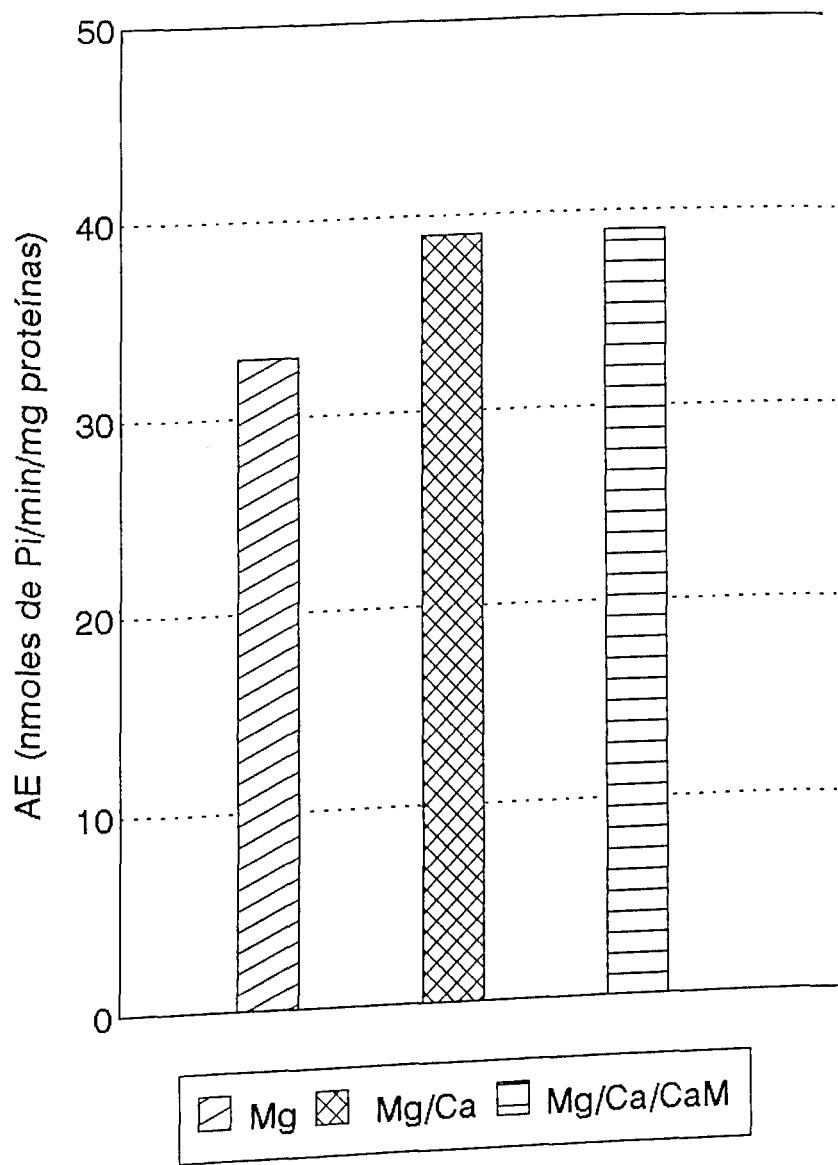


Figura 12: Efeito de cálcio e calmodulina na atividade MgATPase da fração PC. 28 μ g da fração PC foram pré incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo: Imidazol 25 mM, pH 7.0; KCl 60 mM; $MgCl_2$ 5.0 mM; EGTA 1.0 mM; DTT 0.2 mM) e onde indicado foi acrescentado $CaCl_2$ 2.0 mM e calmodulina 2.5 μ g/reAÇÃO. A reação foi iniciada com a adição de ATP (concentração final 5mM) e após 30 minutos a 37 °C foi interrompida com a própria solução de dosagem. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas. Os valores acima são de uma preparação. Outras 05 preparações, foram realizadas mostrando o perfil enzimático similar. A MgATPase variou de 30 a 40 nmoles de Pi/ min/ mg de proteínas.

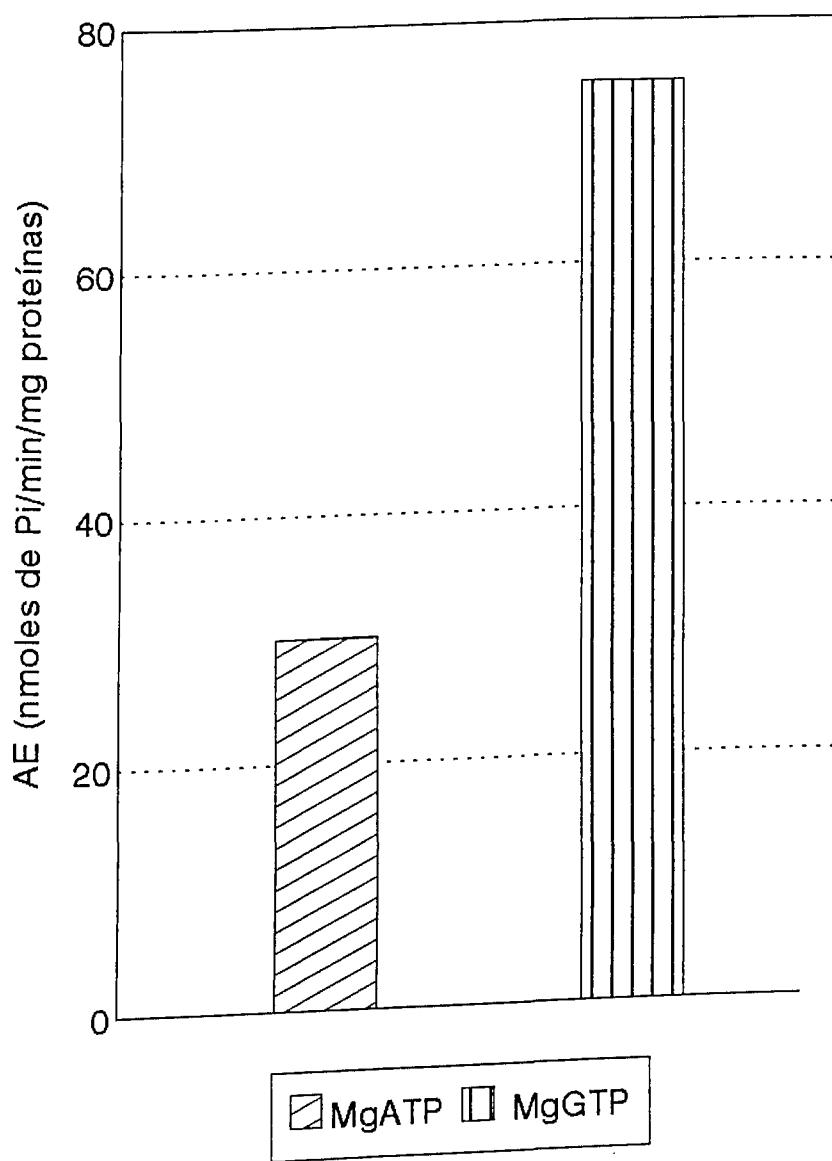


Figura 13: Comparação das atividades MgATPase e MgGTPase da fração PC. 28 µg da fração PC foram pré incubadas por 10 minutos em meio de reação, contendo: Imidazol 25 mM, pH 7.0; KCl 60 mM; MgCl₂ 5.0 mM; EGTA 1.0 mM; DTT 0.2 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP ou GTP (concentração final 5 mM) e após 30 minutos a 37 °C foi interrompida com a própria solução de dosagem. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas. Os valores acima são de uma preparação. Outras 03 preparações, foram realizadas mostrando perfil enzimático similar. A atividade MgATPase variou de 30 a 40 nmoles de Pi/ min/ mg de proteínas e a MgGTPase de 57 a 80 nmoles de Pi/ min/ mg de proteínas.

4.6. Efeito de Inibidores na Atividade GTP/ATPase da Fração PC.

Vários efetores como: azida, ouabaína, oligomicina, vanadato, Ca^{++} , EGTA, NaF, alta concentração de sal e temperatura tem sido usados para caracterizar várias ATPases. A atividade GTP/ATPase da fração PC foi testada na presença de alguns desses efetores (Tabela 03). Semelhante a fração isolada de citosol de cérebro de rato em fosfocelulose (Coelho, 1988), a atividade ATPase da fração PC de testículo não apresentou inibição na presença de azida e permaneceu relativamente estável uma semana em baixa temperatura (4°C / 7 dias). Ela perdeu a atividade quando aquecida ($75^{\circ}\text{C}/5\text{min}$) ou congelada ($-20^{\circ}\text{C}/2\text{h}$) (Tabela 03). Diferentemente da fração isolada de citosol de cérebro (Coelho, 1988), a fração PC de testículo não apresentou estimulação da atividade MgATPase na presença de alta concentração de KCl ou NaCl (0.3 M). A fração PC não apresentou atividade (K-EDTA)ATPase e foi ligeiramente inibida na presença de NaF 5 mM (35%) (Tabela 03).

4.7. Fracionamento da Fração PC em Coluna de GTP-Agarose.

Como a fração PC apresenta alta atividade GTPase (Figura 13), utilizamos uma coluna de afinidade a GTP (3.0 x 1.1 cm) para purificá-la. Nas condições utilizadas cerca de 5 % das proteínas foram retidas pela coluna, a maior parte das proteínas passaram no "flow through" (1.5 mg). Proteínas retidas foram eluídas com tampão I, pH 7.2 contendo NaCl 0.5 M e foram coletadas frações de 1.0 ml (Figura 15). Na eluição detectou-se proteínas sólamente em três frações (Figura 15), contudo não detectou-se atividade MgGTPase nestas frações. No gel observa-se que os polipeptídeos de 160,

100, e 48 kDa apareceram no "flow through" (F) junto com a atividade ATPase e no eluato (E) observa-se apenas dois polipeptídeos: 32 e 16 kDa (Figura 16).

Tabela 03: Resposta da Atividade Nucleotidase da Fração PC a Efetores.

Meio de Reação	ATPase (%)	GTPase (%)
Mg ⁺⁺	100	100
Azida 1 mM	102	89
NaCl 300 mM	84	ND *
KCl 300 mM	94	ND
NaF 5 mM	66	90
Geladeira (4-8 °C/7 dias)	72	ND
Aquecimento (75 °C/5')	0	ND
Congelamento (-20 °C/2h)	0	ND
KCl 60 mM	0	ND
KCl 600 mM	0	ND

29 µg de proteínas da fração PC foram pré incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo: Imidazol 25 mM, pH 7.0; KCl 60 mM; EGTA 1.0 mM; DTT 0.2 mM. A atividade MgATPase foi determinada acrescentando-se ao meio 5 mM de MgCl₂ e CaATPase acrescentando-se 2.0 mM de CaCl₂. A atividade (K-EDTA)ATPase foi determinada no meio de reação: Imidazol 25 mM, pH 8.0; EDTA 2.0 mM; DTT 0.2 mM e conforme apropriado foi acrescentado 0.06 M ou 0.6 M de KCl. A reação foi iniciada com a adição de ATP ou GTP (concentração final 5 mM) e após 20 minutos à 37 °C foi interrompida com a própria solução de dosagem. Os valores em porcentagem foram calculados tomando-se como 100% a atividade basal (MgATPase 33 nmoles de Pi/ min/ mg de proteínas e MgGTPase 75 nmoles de Pi/ min/ mg de proteínas). Todas as reações foram realizadas em duplicatas. Os valores acima são de uma preparação. Outras 03 preparações foram realizadas cuja atividade MgATPase variou de 30 a 40 nmoles de Pi/ min/ mg de prot. e MgGTPase de 57 a 80 nmoles de Pi/ min/ mg de proteínas. * não determinado.

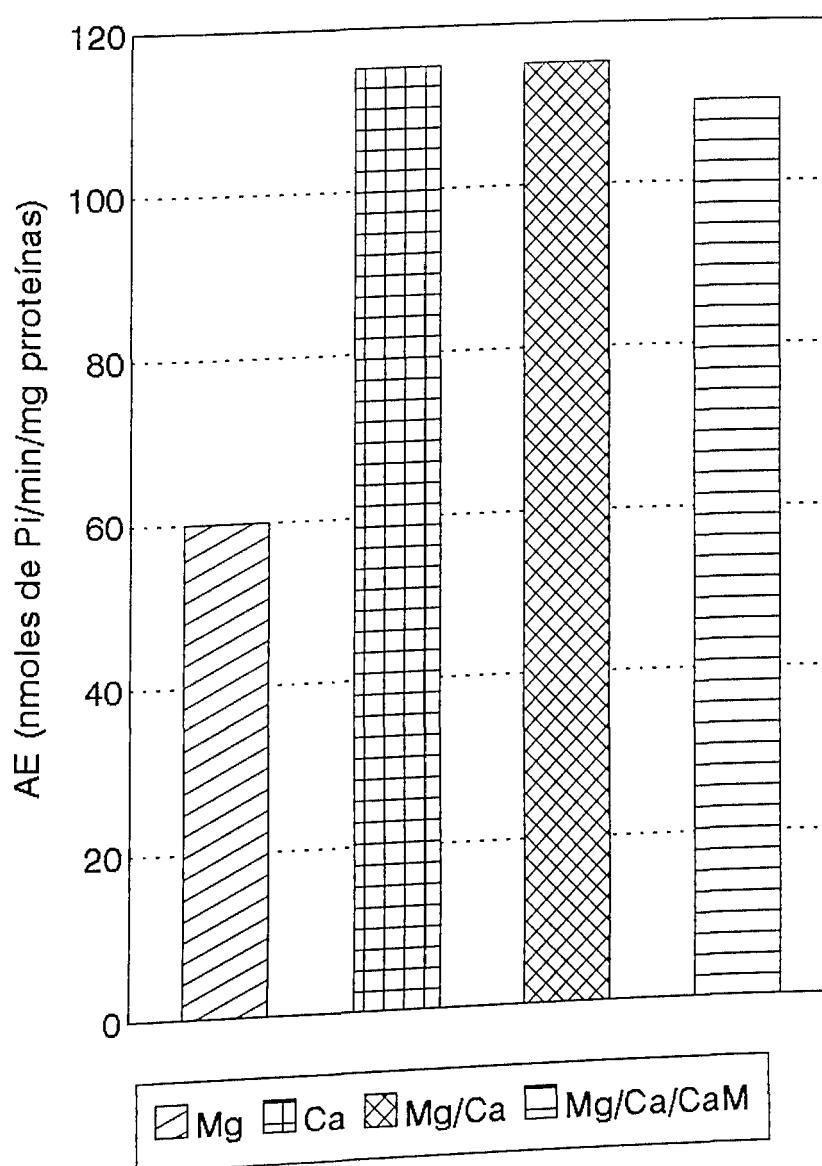


Figura 14: Atividade GTPase da fração PC. 20 μ g da fração PC foram pré incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo: Imidazol 25 mM, pH 7.0; EGTA 1.0 mM; KCl 60 mM; DTT 0.2 mM e onde indicado foi acrescentando 5 mM de $MgCl_2$, 2.0 mM de $CaCl_2$ e calmodulina 2.5 μ g/reação. A reação foi iniciada com a adição GTP (concentração final 5 mM) e após 30 minutos a 37 °C foi interrompida com a própria solução de dosagem. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas. Os valores acima são de uma preparação. Outras 03 preparações foram realizadas mostrando semelhante perfil de atividade. A atividade MgGTPase variou de 57 a 80 nmoles de Pi/ min/ mg de proteínas.

4.8. Atividade MgATPase da Fração "Flow Through" da Coluna de GTP-Agarose.

A grande maioria dos polipeptídeos da fração PC passaram direto pela coluna de GTP-agarose aparecendo na fração "flow through" (Figura 16) e a fração F também apresentou atividade MgATPase similar ao da fração PC (Figura 17). Estas características similares à fração PC indicam que os polipeptídeos: 32 e 16 kDa retidos pela coluna de GTP-agarose não interferiram na atividade MgATPase da fração. A atividade MgATPase da fração F foi testada frente a alguns efetores (Tabela 04), detectou-se maior inibição na presença de AlF_3 (79%) e leve inibição na presença de $NaVO_3$ 1 mM (35%). A fração F não sofreu alteração significativa na presença de azida, Triton X-100 e NaF (Tabela 04).

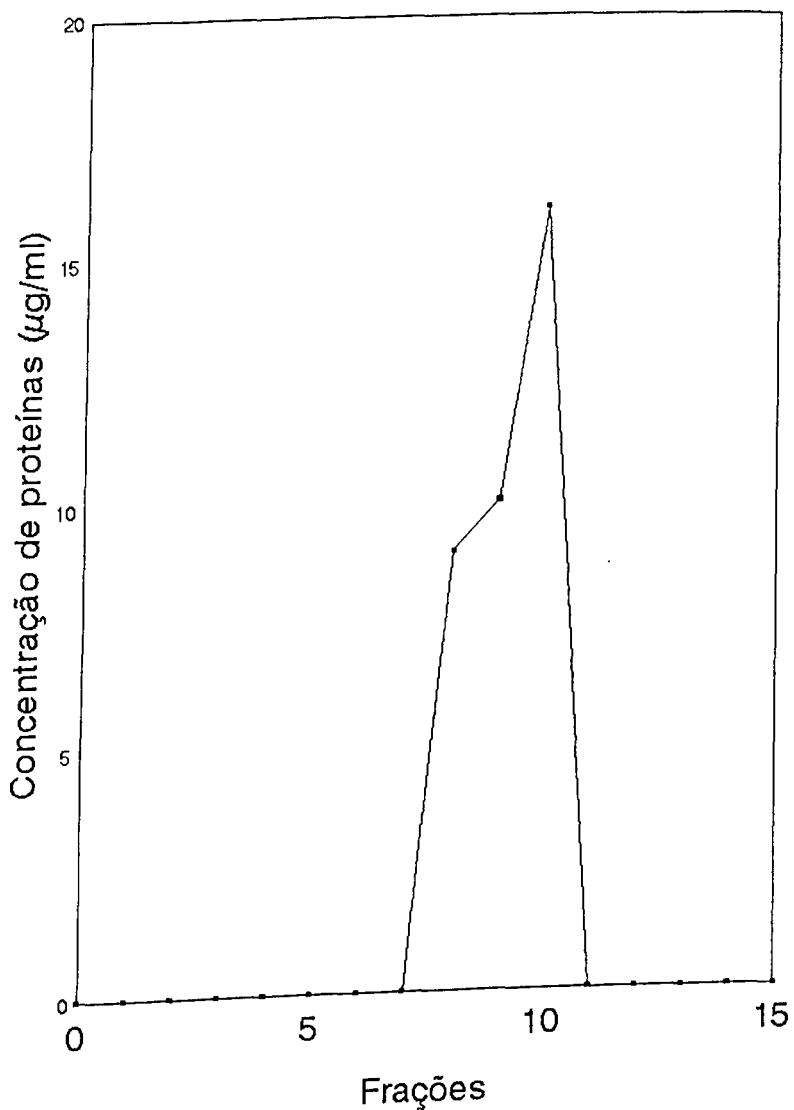


Figura 15: Cromatografia da fração PC em coluna de GTP-agarose. A fração PC foi aplicada em coluna de GTP-agarose (3.0 x 1.1 cm) pH 8.0. Proteínas retidas foram eluídas com tampão I, pH 7.2 contendo NaCl 0.5 M e foram coletadas frações de 1.0 ml. As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford descrito em Material e Métodos.

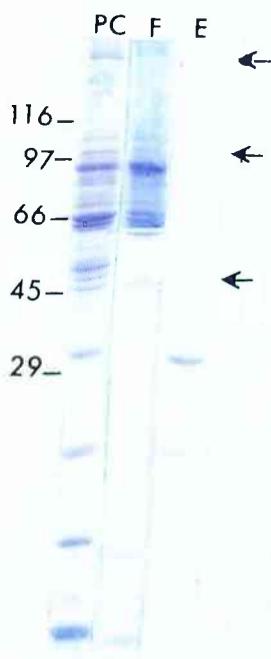


Figura 16: SDS-PAGE da fração PC, "flow through" e eluato da coluna de GTP-agarose. Foram aplicados no gel (12%) 12 µg da fração PC (PC), 5 µg do "flow through" (F) e 3 µg do eluato da coluna (E). O gel foi corado com Coomassie blue G. As setas indicam polipeptídeos 160, 100 e 48 kDa. Padrões de peso molecular ($Mr \times 10^{-3}$): β -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.

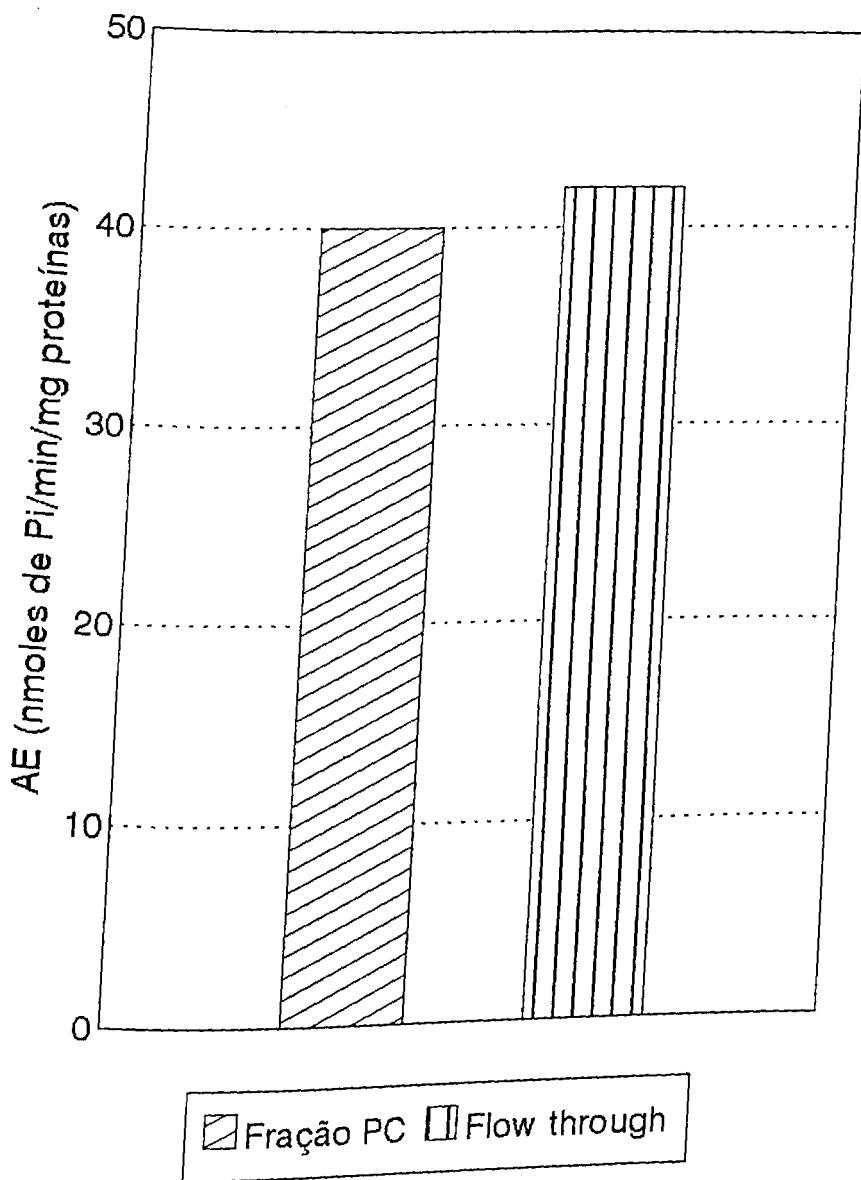


Figura 17: Comparação da atividade ATPase da fração PC e da fração "flow through" da coluna de GTP-agarose. 47 µg da fração PC e 20 µg do "flow through" foram pré incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo: Imidazol 25 mM, pH 7.0; KCl 60 mM; EGTA 1.0 mM; MgCl₂ 5.0 mM; DTT 0.2 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP (concentração final 5 mM) e após 30 minutos a 37 °C foi interrompida com a própria solução de dosagem. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas. Os valores acima são de uma preparação.

Tabela 04: Efeito de Inibidores na Atividade MgATPase da Fração "Flow Through" da Coluna de GTP-Agarose.

Meio de reação	Atividade Específica (%)
Mg ⁺⁺	100
NaVO ₃ 250 µM	96
NaVO ₃ 1 mM	65
KCl 600 mM/ NaVO ₃ 1 mM	79
Azida 1 mM	98
Triton X-100 0.2%	108
NaF 2.4 mM	88
NaF 2.4 mM/ AlCl ₃ 0.1 mM	21

20 µg da fração "flow through" foram pré incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo: Imidazol 25 mM, pH 7.0; KCl 60 mM; MgCl₂ 5.0 mM; EGTA 1.0 mM; DTT 0.2 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP (concentração final 5 mM) e após 30 minutos a 37 °C foi interrompida com a própria solução de dosagem. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. Os valores acima são de uma preparação. A atividade basal (MgATPase) utilizada para os cálculos foi de 42 nmoles de Pi/ min/ mg de proteínas.

5. DISCUSSÃO.

Os resultados apresentados aqui mostram a obtenção de uma fração enriquecida em atividade ATPase a partir de testículo de coelho usando coluna de fosfocelulose. Diferente do citosol de cérebro de rato (Coelho, 1988) o sobrenadante 15.000g x 40 min. de testículo de coelho, quando aplicado diretamente na coluna de fosfocelulose, causou acentuado empacotamento da resina. Por isso, optamos em fazer um pré-fracionamento do sobrenadante de testículo em coluna de DEAE-Sepharose. Este procedimento melhorou sensivelmente o processo cromatográfico na fosfocelulose (Figura 08). Comparando-se o perfil de polipeptídeos das frações eluídas da fosfocelulose, quando o sobrenadante de testículo foi aplicado diretamente nesta coluna (Figura 06) e quando o sobrenadante foi pré-fracionado em coluna de DEAE-Sepharose (Figura 08) observamos várias bandas polipeptídicas com mobilidade relativa semelhantes, comuns às duas preparações.

Semelhante a fração isolada de citosol de cérebro de rato em fosfocelulose, PC cérebro (Coelho, 1988), a fração isolada de sobrenadante 15.000g x 40 min. de testículo de coelho (PC testículo) possui tanto atividade MgATPase como CaATPase (Figura 11). A atividade CaATPase da fração de testículo é cerca de 20% maior do que a MgATPase, propriedade que difere ligeiramente da fração isolada de citosol de cérebro de rato. A atividade MgATPase não foi estimulada por $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ (Figura 12).

A fração PC cérebro apresentou atividade ATPase e de proteína-quinase reguladas pelo complexo $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$. Verificou-se que juntamente com a atividade proteína quinase foram co-purificados um polipeptídeo de alto peso molecular e outros dois polipeptídeos principais cuja mobilidade relativa correspondia às subunidades de CaM quinase II: 49 e 62 kDa (Coelho, 1988). Semelhante a CaM quinase II, a fração PC cérebro apresenta atividade de proteína-quinase, os polipeptídeos 49/62 kDa sofrem fosforilação endógena na

presença de Ca/CaM e o polipeptídeo de 49 é reconhecido por um anticorpo específico para subunidade α de CaM quinase II (Coelho, 1995).

Supostamente, o mecanismo de estimulação da atividade ATPase por Ca⁺⁺/CaM envolvia a presença de CaM quinase II, ou seja, Ca⁺⁺/CaM ativa a CaM quinase II e esta quinase por sua vez estimula a atividade ATPase da fração (Coelho, 1988). Diferentemente da fração PC cérebro, a fração PC testículo não possui CaM quinase II visto que esta não está presente em testículos (Lin et al, 1987). Este fato explicaria a ausência de estimulação da atividade MgATPase da fração de testículo de coelho na presença de Ca⁺⁺/CaM (Figura 12).

Semelhante a fração PC cérebro (Coelho, 1988) outra propriedade que caracterizou a atividade nucleotidase da fração de testículo foi sua alta atividade GTPase (Figura 13). Em altas concentrações (mM) de substrato, ela hidrolizou cerca de duas vezes mais o GTP do que o ATP (Tabela 02). A fração também apresentou atividade CaGTPase cerca de 2 vezes maior do que a atividade MgGTPase (Figura 14). Em baixas concentrações a fração de testículo hidrolizou ATP e GTP indistintamente (Tabela 02).

A atividade GTP/ATPase da fração PC testículo apresenta algumas propriedades distintas de outras ATPases conhecidas.

A dineína axonemal hidrolisa especificamente o ATP, é muito sensível ao NaVO₃ (2 μ M) e sua atividade ATPase é estimulada na presença de Triton X-100 0.2% (Shpetner et al, 1988). Ao contrário desta dineína, a fração isolada de testículo apresentou hidrólise mais intensa de GTP (Figura 13), não apresentou inibição na presença de NaVO₃ (250 μ M) e sua atividade MgATPase não foi estimulada na presença de Triton X-100 0.2% (Tabela 04). A dineína citoplasmática hidrolisa preferencialmente o GTP ao ATP, mas também é muito sensível ao NaVO₃ (5-10 μ M) (Shpetner et al, 1988). A dineína citoplasmática de testículo (HMW-2) é mais resistente ao NaVO₃ do

que as outras dineínas, foram requeridos 50 μM para a inibição semi-máxima (Neely & Boekelheide, 1988). Este valor ainda é muito baixo, quando comparado com a fração PC testículo, que não foi inibida por NaVO_3 250 μM (Tabela 04). A fração PC testículo apresenta vários polipeptídeos cuja mobilidade relativa é similar ao das cadeias intermediárias e leves da HMW-2 (100, 62, 48, 42 e 40 kDa), mas não foi observado polipeptídeo similar a cadeia pesada da HMW-2 (Figura 08).

Cinesina apresenta uma atividade CaATPase significativamente maior do que a MgATPase (Kuznetsov & Gelfand, 1986). Todos os outros nucleotídeos trifosfatos foram hidrolisados pela cinesina, mas ao contrário da fração PC testículo a taxa de hidrólise de GTP foi inferior ao ATP (Kuznetsov & Gelfand, 1986).

A dinamina é uma GTPase de 100 kDa que hidrolisa o GTP mais intensamente do que os outros nucleotídeos. Semelhante a dinamina, a fração isolada aqui foi inibida por AlF_3 (NaF 2.4 mM/ AlCl_3 0.1 mM), mas não por azida 1 mM e apenas levemente por NaVO_3 1mM (Tabela 04). No gel, observa-se que a fração PC testículo possui um polipeptídeo cuja mobilidade relativa é similar a da dinamina, 100 kDa (Figura 08).

As miosinas de modo geral, caracterizam-se por sua alta atividade ATPase em meio de reação desprovido de cátions divalentes e contendo alta concentração de K^+ (K-EDTA)ATPase (Pollard, 1982). Sabe-se, também, que algumas miosinas como a miosina V de vertebrados, não apresenta atividade (K-EDTA)ATPase considerável (Espindola et al, 1992). Semelhante a miosina V de vertebrados, outras miosinas ainda não caracterizadas bioquimicamente podem também não possuir atividade (K-EDTA)ATPase. Assim, a falta de atividade (K-EDTA)ATPase não elimina totalmente a possibilidade da ATPase aqui isolada ser uma miosina (Tabela 03).

A F₁-ATPase mitocondrial difere da atividade ATPase da fração PC testículo com relação a sensibilidade a azida e a estabilidade em baixa temperatura. Enquanto a F₁-ATPase mitocondrial possui uma meia vida de 5 minutos a 4 °C e é quase totalmente inibida por azida 1 mM (Murphy et al, 1983), a fração PC testículo é estável em baixa temperatura e não é inibida por azida 1 mM (Tabela 03).

Como a fração apresentou significativa atividade GTPase, (Figura 13) tentamos purificá-la utilizando uma coluna de GTP-agarose. Observamos que os polipeptídeos: 160, 100, 74 e 48 kDa (Figura 16) juntamente com a atividade MgATPase (Figura 17) apareceram no "flow through" da coluna. No eluato observa-se apenas dois polipeptídeos: 32 e 16 kDa (Figura 16), estes podem corresponder à família das pequenas proteínas G, uma extensa família de pequenas GTPases envolvidas na transdução de sinal nas células. Os polipeptídeos: 32/ 16 kDa não apresentaram atividade GTPase, isto talvez possa ser devido a sensibilidade do método utilizado na dosagem.

As proteínas ligantes de GTP funcionam como "interruptores" moleculares periódicos, entre uma conformação inativa ligada ao GDP e uma ativa ligada ao GTP. De modo geral, essas proteínas são ativadas pelo nucleotídeo guanosina e inativadas através de uma atividade GTPase intrínseca, portanto as diferentes classes de proteínas ligantes de GTP podem conduzir diversas funções regulatórias. A heterotrimérica proteína G, por exemplo, ligada a receptores transmembrana sinalizam moléculas intracelulares clássicas tais como: adenilato ciclase ou fosfolipase C e um segundo mensageiro derivado desta via de transdução de sinal podem afetar o citoesqueleto da célula (revisão Bourne et al, 1990). Nos últimos anos, foram descobertas pequenas proteínas G citoplasmáticas, cujas funções incluem: organização do citoesqueleto de actina e controle do transporte vesicular nas células eucarióticas (revisão Hall, 1994).

A fração PC testículo apresenta algumas características semelhantes a dinamina (atividade GTPase, inibição por AlF_3 e polipeptídeo de 100 kDa). Contudo, observa-se que na fração estão presentes também uma banda polipeptídica de 160 kDa entre outras. Os resultados aqui apresentados mostram a caracterização parcial de uma Mg/Ca nucleotidase trifosfatásica de testículo de coelho e levantam a possibilidade de estudo de proteínas relacionadas as vias de mecanotransdução e transdução de sinal. Mais investigações são necessárias para chegarmos a maiores conclusões sobre a fração isolada de testículo. Um caminho a ser seguido será verificar a resposta da atividade da fração PC na presença de actina e microtúbulos. Outros caminhos poderão ser: separação das diferentes bandas polipeptídicas juntamente com a atividade Nucleotidase de cada preparação e a utilização de anticorpos específicos para classe de motor molecular.

6. SUMÁRIO.
RESUMO

Neste trabalho foi isolado e caracterizado parcialmente uma fração de testículo de coelho em fosfocelulose enriquecida em atividade ATP/GTPase. Os testículos foram homogeneizados em tampão I (Imidazol-Cl 50 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, DTT 1.0 mM, PMSF 0.3 mM e benzamidina 1 mM) pH 8.5 e centrifugado a 15.000g x 40 min. O sobrenadante foi aplicado em coluna de DEAE-Sepharose. Proteínas retidas foram eluídas com tampão Imidazol-Cl 50 mM, pH 6.5 e o eluato foi aplicado em coluna de fosfocelulose. A fração enriquecida em atividade ATPase foi obtida eluindo-se a coluna com tampão Imidazol-Cl, pH 8.0. Esta atividade não foi retida por uma coluna de GTP-agarose.

A fração isolada de testículo de coelho possui as seguintes propriedades: 1) Em altas concentrações (mM) de substrato, a atividade GTPase é maior do que a ATPase. Em baixas concentrações os dois nucleotídeos são hidrolisados indistintamente. 2) Ambas as atividades ocorrem tanto na presença de Mg^{++} como de Ca^{++} . Nos dois casos, a atividade Ca/Nucleotidase foi maior do que a atividade Mg/Nucleotidase. 3) Diferentemente de uma fração correspondente obtida a partir de cérebro de rato (Coelho, 1988), a atividade MgATPase não apresentou estimulação por Ca^{++}/CaM . 4) A atividade ATPase é estável em baixa temperatura ($4^{\circ}C/7$ dias), mas é totalmente perdida quando aquecida ($75^{\circ}C/5'$) ou congelada ($-20^{\circ}C$). 5) Não possui atividade (K-EDTA)ATPase 6) A atividade MgATPase não foi sensível a altas concentrações de sal (NaCl ou KCl 0.3 M), Triton X-100 0.2%, azida 1 mM ou $NaVO_3$ 250 μM . Contudo, foi inibida cerca de 80% por AlF_3 (NaF 2.4 mM/ $AlCl_3$ 0.1 mM) e 35% na presença de $NaVO_3$ 1 mM ou NaF 5 mM.

No gel, observou-se que os polipeptídeos: 160, 100, 74 e 48 kDa apareceram no "flow through" da coluna de GTP-agarose juntamente com a atividade MgATPase que foi semelhante a atividade da fração PC. No eluato detectou-se sómente dois polipeptídeos: 32 e 16 kDa, que não apresentaram

atividade MgGTPase. Estes dois polipeptídeos podem corresponder às pequenas proteínas G citoplasmáticas, que participam na organização do citoesqueleto e controle do transporte vesicular.

Os resultados aqui apresentados mostram a caracterização parcial de uma Mg/Ca nucleotidase trifosfatásica de testículo de mamíferos e levanta a possibilidade de estudo de proteínas relacionadas as vias de mecanotransdução e transdução de sinal.

7. SUMMARY.

In this work we isolated and partially characterized a fraction of rabbit testis containing the ATPase/GTPase activity by using a phosphocellulose column. Testis was homogenated in 50mM Imidazole pH 8.5 with 10 mM EDTA/EGTA, 1.0 mM DTT, 0.3 mM PMSF, 1.0 mM benzamidine, and then centrifuged by 15.000g for 40 min. The supernatant was loaded in DEAE-Sepharose column. Bound proteins were eluted with 50 mM Imidazole pH 6.5 and the eluate was directly loaded in a phosphocellulose column. The fraction containing ATPase activity was then eluted with 50 mM Imidazole pH 8.0. No proteins were retained in GTP-agarose column.

The isolated fraction presented the following properties. 1) At high concentrations (mM) of ATP or GTP, GTPase larger than ATPase activity. At low substrate concentrations both nucleotides are indistinctly hydrolyzed. 2) Both activities were dependent on the presence of Mg^{++} or Ca^{++} . In both cases, the Ca^{++} -nucleotidase was larger of than Mg^{++} -nucleotidase activity. 3) Differently from the corresponding fraction isolated from rat brain (Coelho, 1988), Mg^{++} ATPase activity presented no stimulation by Ca^{++} -CaM. 4) ATPase activity is well preserved when stored at 4 to 10 °C by one week, but not at 75 °C by 5 minutes or in a freezer at -20 °C. 5) (K^{+} -EDTA)ATPase activity was not detected. 6) Mg^{++} ATPase activity was not sensitive to high salt concentrations (0.3 M KCl or NaCl), 0.2 % Triton X-100, 1.0 mM azide or 250 μ M NaVO₃. However, it was 80% inhibited by AlF₃ (2.4 mM NaF/ 0.1 mM AlCl₃) and 35 % in presence of the 1 mM NaVO₃ or 5 mM NaF.

Some polypeptides not bound to GTP-agarose column were analyzed in SDS-PAGE and characterized as 160, 100, 74 e 48 kDa bands. The column retained just two polypeptides, with 32 and 16 kDa, that didn't exhibited Mg⁺⁺GTPase activity. These two polypeptides can correspond to the small GTP-binding proteins that participate in the cytoskeleton organization and control of the vesicle transport.

The proteins here described may have a participation in mechanotransduction and signalization events, for what they still need more investigation.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

BEMENT, W. N., HASSON, T., WIRTH, J. A., CHENEY, R. E., MOOSEKER, M. S. Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 6549-53, 1994.

BLOOM, G.S., SCHOENFELD, T.A., VALLEE, R.B. Widespread distribution of the major polypeptide component of MAP 1 (Microtubule-associated protein 1) in the nervous system. *J. Cell Biol.*, 98: 320-30, 1984.

BOEKELHEIDE, K., NEELY, M. D., SIOUSSAT, T. M. The Sertoli cell cytoskeleton: a target for toxicant-induced germ cell loss. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 101: 373-89, 1989.

BOURNE, H. R., SANDERS, D. A., McCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348: 125-32, 1990.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72: 248-54, 1976.

BYERS, S. & GRAHAM, R. Distribution of sodium-potassium ATPase in the rat testis and epididymis. *Amer. J. Anat.*, 188: 31-43, 1990.

CASSIMERIS, L. U., WALKER, R. A., PRYER, N. K., SALMON, E. D. Dynamic instability of microtubules. *BioEssays*, 7 (4): 149-54, 1987.

CHANT, J, & STOWERS, L. GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis and more. *Cell*, 81: 1-4, 1995.

CHEN, I. L., EDWARDS, K., LIN, R. C. COATS, L. W., KIEHART, D. P. *Drosophila* myosin heavy chain at 35B,C. *J. Cell Biol.*, 115: 330a (abstr), 1991.

CHENEY, R.E. & MOOSEKER, M.S. Unconventional myosins. *Curr.Op.Cell Biol.*, 4: 27-35, 1992.

CHENEY, R.E; RILEY, M. A., MOOSEKER, M.S. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell Motil. Cytoskelet.*, 24: 215-23, 1993.

COELHO, M. V. Dissertação de Mestrado intitulada "Regulação de ATPase e proteína-quinase por Ca / Calmodulina em citosol de cérebro de rato", FMRP - USP, 1988.

COELHO, M. V. Tese de Doutorado intitulada: " Miosina V é alvo de duas enzimas mediadoras de íons cálcio: calpaína e CaM quinase II", FMRP - USP, 1995.

COLE, D. G. & SCHOLEY, J. M. Structural variations among the kinesins. **Trends Cell Biol.**, 5: 259-62, 1995.

COLE, D. G., CHINN, S. W., WEDAMAN, K. P., HALL, K., VUONG, T., SCHOLEY, J. M. Novel heterotrimeric kinesin-related protein purified from sea urchin eggs. **Nature**, 366: 268-70, 1993.

COLE, D. G., SAXTON, W. M., SHEEHAN, K. B., SCHOLEY, J. M. A "slow" homotetrameric kinesin-related motor protein purified from *Drosophila* embryos. **J. Biol. Chem.**, 269 (37): 22913-6, 1994.

COLLINS, J. & BORYSENKO, C. The 110.000 dalton actin and calmodulin binding protein from intestinal brush border is a myosin-like ATPase. **J. Biol. Chem.**, 259: 14128-35, 1984.

COOK, T.A.; URRUTIA, R.; MCNIVEN, M.A. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. **Proc.Natl.Acad.Sci.**, 91: 644-8, 1994.

ENDOW, S. A., HENIKOFF, S., SOLER-NIEDZIELA, L. Mediation of meiotic and early mitotic chromosome segregation in *Drosophila* by a protein related to kinesin. **Nature**, 345: 81-3, 1990.

ENOS, A. P. & MORRIS, N. R. Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. **Cell**, 60: 1019-27, 1990.

ESPINDOLA, F.S.; ESPREAFICO, E.M.; COELHO, M.V.; MARTINS, A.R.; COSTA, F.R.C.; MOOSEKER, M.S. E LARSON, R.E. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin-binding myosin. **J. Cell Biology**, 118 (2):359-68, 1992.

ESPRAAFICO, E.M.; CHENEY, R.E.; MATTEOLI, M.; NASCIMENTO, A.A.C., DE CAMILLI, P.V.; LARSON, R.E. Primary structure and cellular localization chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. **J. Cell Biol.**, 119 (6): 1541-57, 1992.

GIBBONS, I. R. Cilia and flagella of Eukaryotes. **J. Cell Biol.**, 91 (3): parte 2 (107s-24s), 1981.

GIBBONS, I. R., COSSON, M. P., EVANS, J. A., GIBBONS, B. H., HOUCK, B., MARTINSON, K. H., SALE, W. S., TANG, WEN-JING Y. Potent inhibition of dynein adenosinetriphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 75 (5): 2220-4, 1978.

GIBBONS, I. R., EIFORD, A. L., MOCZ, G., PHILIPSON, C. A., TANG, WEN-JING Y., GIBBONS, B. Photosensitized cleavage of dynein heavy chains. **J. Biol. Chem.**, 262 (6): 2780-6, 1987.

GIBSON, F., WALSH, J., MBURU, P., VARELA, A., BROWN, K. A., et al. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. **Nature**, 374: 62-4, 1995.

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

GOODENOUGH, U. & HEUSER, J. Structural comparison of purified dynein proteins with in situ dynein arms. **J. Mol. Biol.**, 180: 1083-1118, 1984.

GOODSON, H.V. & SPUDICH, J.A. Molecular evolution of the myosin family: Relationships derived from comparisons of aminoacid sequences. **Proc.Natl.Acad.Sci.**, 90: 659-63, 1993.

GURAYA, S. S. The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis. **Inter. Rev. Cytol.**, 160: 163-220, 1995.

HAGAN, I. & YANAGIDA, M. Novel potential mitotic motor protein encoded by fission yeast *cut 7⁺* gene. **Nature**, 347: 563-6, 1990.

- HALL, A. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. **Annu. Rev. Cell Biol.**, 10: 31-54, 1994.
- HALL, E. R., EVELETH, J., JIANG, C., REDENBACH, D. M., BOEKELHEIDE, K. Distribution of the microtubule-dependent motors cytoplasmic dynein and kinesin in rat testis. **Biol. Reprod.**, 46: 817-28, 1992.
- HAMMER III, J. A. Novel myosins. **Trends Cell Biol.**, 1: 50-6, 1991.
- HASSON, T., HEINTZELMAN, M. B., SANTOS-SACCHI, J., COREY, D. P., MOOSEKER, M. S. Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 92: 9815-9, 1995.
- 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.**, 113: 313-17, 1981.
- HENNESSEY, E. S., DRUMMOND, D. R., SPARROW, J. C. Molecular genetics of actin function. **Biochem. J.**, 282: 657-71, 1993.
- HERSKOVITS, J. S., SHPETNER, H. S., BURGESS, C. C., VALLEE, R. B. Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90: 11468-72, 1993b.
- HERSKOVITS, J.S., BURGESS, C.C., OBAR, R. A., VALLEE, R. B. Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. **J. Cell Biol.**, 122 (3): 565-78, 1993a.
- JOHNSTON, R. G., PRENDERGAST, J. A., SINGER, R. A. The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. **J. Cell Biol.**, 113: 539-51, 1991.
- KABSCH, W. & VANDERKERCKHOVE, J. Struture and function of actin. **Annu. Rev.Biophys. Biomol. Struct.**, 21:49-76, 1992.
- KING, S. M. & WITMAN, G. B. Localization of an intermediate chain of outer arm dynein by immunoelectron microscopy. **J. Biol. Chem.**, 265: 19807-11, 1990.

- KINKEMA, M., WANG, H., SCHIEFELBEIN, J. Molecular analysis of the myosin gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol.**, 26: 2239-53, 1994.
- KOSAKA, T. & IKEDA, K. Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the Garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, *shibire*. **J. Cell Biol.**, 97: 499-07, 1983.
- KUZNETSOV, S. A. & GELFAND, V. I. Bovine brain kinesin is a microtubule-activated ATPase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 83: 8530-4, 1986.
- LAEMMLI, U.K. & FAVRE, M. Maturation of the head of Bacteriophage T4. **J. Mol. Biol.**, 80: 575-99, 1973.
- LARSON, R.E., FERRO, J.A., QUEIROZ, E.A. Isolation and purification of actomyosin ATPase from mammalian brain. **J. Neuros. Methods**, 16: 47-58, 1986.
- LARSON, R.E.; PITTA, D.E, FERRO, J.A. A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 21: 213-17, 1988.
- LARSON, R.E., ESPINDOLA, F.S., ESPREAFICO, E. M. Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. **J. Neurochem.**, 54: 1288-94, 1990.
- LIN, C.R., KAPILOFF, M.S., DURGERIAN, S., TATEMOTO, K., RUSSO, A.F., HANSON, P., SCHULMAN, H., ROSENFELD, M.G. Molecular cloning of a brain-specific calcium/calmodulin-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 84: 5962-6, 1987.
- LIN, S. X. & COLLINS, C. A. Immunolocalization of cytoplasmic dynein to lysosomes in culture cells. **J. Cell Sci.**, 101: 125-37, 1992.
- MARKS, D. L., LARKIN, J. M., MCNIVEN, M. A. Association with the Golgi apparatus in rat hepatocytes. **J. Cell Sci.**, 107: 2417-26, 1994.
- MARSTON, S. Ca^{2+} dependent protein switches in actomyosin based contractile systems. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 27 (2): 97-108, 1995.

MATTHIES, H. J. G., MILLER, R. J., PALFREY, H. C. Calmodulin binding to and cAMP-dependent phosphorylation of kinesin light chains modulate kinesin ATPase activity. **J. Biol. Chem.**, 268 (15): 11176-87, 1993.

McCAFFREY, G. & VALE, R. D. Identification of a kinesin-like microtubule-based motor protein in *Dictyostelium discoideum*. **EMBO J.** 8 (11): 3229-34, 1989.

MELUH, P. B. & ROSE, M. D. KAR3, a kinesin-related gene required for yeast nuclear fusion. **Cell**, 60: 1029-41, 1990.

MERCER, J. A., SEPERACK, P. K., STROBEL, M. C., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A. Novel myosin heavy chain encoded by murine *dilute* coat colour locus. **Nature**, 349: 709-13, 1991.

MIDDLETON, K. & CARBON, J. KAR3-encoded kinesin is a minus-end-directed motor that functions with centromere binding proteins (CBF3) on an in vitro yeast kinetochore. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 91: 7212-6, 1994.

MITCHELL, D. R. Cell and molecular biology of flagellar dyneins. **Inter. Rev. Cytol.**, 155: 141-81, 1994.

MONTELL, C. & RUBIN, G. M. The *Drosophila* nina C locus encodes two photorecepator cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. **Cell**, 52: 757- 72, 1988.

MOOSEKER, M. S. A multitude of myosins. **Curr. Biol.**, 3: 245-8, 1993.

MOOSEKER, M. S. & CHENEY, R. E. Unconventional myosins. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, 11: 663-75, 1995.

MUROFUSHI, K., IKAI, A., OKUHARA, K., KOTANI, S., AIZAWA, H., KUMAKURA, K., SAKAI, H. Purification and characterization of kinesin from bovine adrenal medulla. **J. Biol. Chem.**, 263 (25): 12744-50, 1988.

MURPHY, D. B., WALLIS, K. T., HIEBSCH, R. R. Identity and origin of the ATPase activity associated with neuronal microtubules: II. Identification of a 50.000-dalton polypeptide with ATPase activity similar to F-1 ATPase from mitochondria. **J. Cell Biol.**, 96: 1306-15, 1983.

NAKATA, T.; TAKEMURA, R.; HIROKAWA, N. A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. **J. Cell Sci.**, 105: 1-5, 1993.

NANGAKU, M., STO-YOSHITAKE, OKADA, Y., NODA, Y., TAKEMURA, R., YAMAZAKI, H., HIROKAWA, N. KIF1B, a novel microtubule plus end-dereceted monomeric motor protein for transport of mitochondria. **Cell**, 79: 1209-20, 1994.

NEELY, M. D., ERICKSON, H. P., BOEKELHEIDE, K. HMW-2, the Sertoli cell cytoplasmic dynein from rat testis, is a dimer composed of nearly identical subunits. **J. Biol. Chem.**, 265 (15): 8691-98, 1990.

NEELY, M.D. & BOEKELHEIDE, K. Sertoli cell processes have axoplasmic features: An ordered microtubule distribution and an abundant high molecular weight microtubule-associated protein (cytoplasmic dynein). **J. Cell Biol.**, 107: 1767-76, 1988.

OBAR, R. A., COLLINS, C. A., HAMMARBACK, J. A., SHPETNER, H. S., VALLEE, R. B. Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. **Nature**, 347: 256-61, 1990.

OLMSTED, J.B. Microtubule-associated proteins. **Ann. Rev. Cell Biol.**, 2: 421-57, 1986.

OTSUKA, A. J., JEYAPRAKASH, A., GARCIA-ANOVEROS, J., TANG, L. Z., FISK, G., HARSTHORNE, T., FRANCO, R., BORN, T. The *C. elegans* *unc-104* gene encodes a putative kinesin heavy chain-like protein. **Neuron**, 6: 113-22, 1991.

PASCHAL, B. M. & VALLEE, R. B. Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. **Nature**, 330: 181-3, 1987.

PASCHAL, B. M., MIKAMI, A., PFISTER, K. K., VALLEE, R. B. Homology of the 74 kD citoplasmic dynein subunit with a flagellar dynein polypeptide suggests an intracellular targeting function. **J. Cell Biol.**, 118 (5): 1133-43, 1992.

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

POLLARD, T. & KORN, E.D. *Acanthamoeba* myosin I: isolation from *Acanthamoeba castellani* of an enzyme similar to muscle myosin. **J. Biol. Chem.**, 248: 4682-90, 1973.

POLLARD, T.D. Myosin purification and characterization. **Methods Cell Biol.**, 24: 333-71, 1982.

POLLARD, T.D., DOBERSTEIN, S.K., ZOT, H.G. Myosin I. **Ann. Rev. Physiol.**, 53: 653-81, 1991.

REINHARD, J., SCHEEL, A.A., DIEKMAN, D., HALL, A., RUPPERT, C., BÄHLER, M. A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases. **EMBO J.**, 14: 697-704.

RODIONOV, V. I., GYOVA, F. K., GELFAND, V. I. Kinesin is responsible for centrifugal movement of pigment granules in melanophores. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 88: 4956-60, 1991.

ROGER, J. A. GRAND, & PERRY, S. V. Calmodulin-binding proteins from brain and other tissues. **Biochem. J.**, 183: 285-95, 1979.

RUPPERT, C., KROSCHEWSKI, R., BÄHLER, M. Identification, characterization and cloning of myr 1, a mammalian myosin-I. **J. Cell Biol.**, 120 (6): 1393-03, 1993.

SAWIN, K. E. & SCHOLEY, J. M. Motor proteins in cell division. **Trends Cell Biol.**, 1: 122-9, 1991.

SCAIFE, R. & MARGOLIS, R.L. Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles *in vivo* and *in vitro*. **J. Cell Biol.**, 111 (6): 3023-33, 1990.

- SHERR, E. H., JOYCE, M. P., GREENE, L. A. Mammalian myosin I α , I β , e I γ : new widely expressed genes of the myosin I family. **J. Cell Biol.**, 12 (6): 1405-16, 1993.
- SHPETNER, H. S. & VALLEE, R. B. Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. **Nature**, 355: 733-5, 1992.
- SHPETNER, H. S. & VALLEE, R. B. Identificacion of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. **Cell**, 59: 421-32, 1989.
- SHPETNER, H. S., PASCHAL, B. M., VALLEE, R. B. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). **J. Cell Biol.**, 107: 1001-9, 1988.
- SOLC, C. F., DERFLER, B. H., DUYK, G. M., COREY, D. P. Molecular cloning of myosins from the bullfrog saccular macula: a candidate for the hair cell adaptation motor. **Aud. Neurosci.**, 1: 63-75, 1994.
- SONTAG, JEAN-MARIE, FYKSE, E. M., USHKARYOV, Y., LIU, JUN-PING, ROBINSON, P. J., SUDHOFF, T. C. Differential expression and regulation of multiple dynamins. **J. Biol. Chem.**, 269 (6): 4547-54, 1994.
- STEINERT, P.M & LIEN, R.K.H. Intermediate filament dynamics. **Cell**, 60:521-3, 1990.
- STUDIER, F.W. Analysis of Bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J.Mol.Biol.**, 79: 237-48, 1973.
- TITUS, M. A., KUSPA, A., LOOMIS, W. F. Discovery of myosin genes by physical mapping in *Dictyostelium*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 91: 9446-50, 1994.
- TITUS, M.A., WARRICK, H.M., SPUDICH, J.A. Multiple actin-based motor genes in *Dictyostelium*. **Cell. Regulation**, 1: 55-63, 1989.
- TORRE, E., MCNIVENS, M. A., URRITIA, R. Dynamin 1 antisense oligonucleotide treatment prevents neurite formation in cultured hippocampal neurons. **J. Biol. Chem.**, 269 (51): 32411-7, 1994.

- TUMA, P. L. & COLLINS, C. A. Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. **J. Biol. Chem.**, 269 (49): 30842-7, 1994.
- TUMA, P. L., STACHNIAK, M. C., COLLINS, C. A. Activation of dynamin GTPase by acidic phospholipids and endogenous rat brain vesicles. **J. Biol. Chem.**, 268 (23): 17240-6, 1993.
- VALE, R. D., REESE, T. S., SHEETZ, M. P. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. **Cell**, 42: 39-50, 1985.
- VALLEE, R. Molecular analysis of the microtubule motor dynein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90: 8769-72, 1993.
- VALLEE, R. B. & SHPETNER, H. S. Motor proteins of cytoplasmic microtubules. **Annu. Rev. Biochem.**, 59: 909-32, 1990.
- VALLEE, R. B., OKAMOTO, P. M. The regulation of endocytosis: identifying dynamin's binding partners. **Trends Cell Biol.**, 5: 43- 7, 1995.
- VALLEE, R. B., WALL, J. S., PASCHAL, B. M., SHPETNER, H. S. Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. **Nature**, 332: 561-3, 1988.
- VAN DER BLIEK, A. M. & MEYEROWITZ, E. M. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. **Nature**, 351: 411-4, 1991.
- VAN DER BLIEK, A. M., REDELMEIR, T. E., DAMKE, H., TISDALE, E. J., MEYEROWITZ, E., M., SCHID, S. L. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. **J. Cell Biol.**, 122 (3): 553-63, 1993
- VOGL, A. W. & SOUCY, L.J. Arrangement and possible function of actin filament bundles in ectoplasmic specializations of ground squirrel Sertoli cells. **J. Cell Biol.**, 100:814-24, 1985.
- WALLIN, M. & STROMBERG, E. Cold-stable and cold-adapted microtubules. **Inter. Rev. Cytol.**, 157: 01-31, 1995.

WARRICK, H. M. & SPUDICH, J. A. Myosin structure and function in cell motility. **Ann. Rev. Cell Biol.**, 3: 379-421, 1987.

WEIL, D., BLANCHARD, S., KAPLAN, J., GULLFORD, P., GIBSON, F., et al. Defective myosin VII-A gene responsible for Usher Syndrome type 1B. **Nature**, 374: 60-1, 1995.

YOSHIDA, T., TAKANARI, H., IZUTSU, K. Distribution of cytoplasmic and axonemal dyneins in rat tissues. **J. Cell Sci.**, 101: 579-87, 1992.

ZHANG, P., KNOWLES, B. A., GOLDSTEIN, L. S. B., HAWLEY, R. S. A kinesin-like protein required for distributive chromosome segregation in *Drosophila*. **Cell**, 62: 1053-62, 1990.