



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37

38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE  
EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

1 - TÍTULO DA TESE: Purificação e caracterização parcial de ATPase de encéfalo de rata

2 - ALUNO: Ana Cecília Silva Santos

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Milton Vieira Coelho

4 - DATA: 30/ 06/ 97

5 - BANCA EXAMINADORA:

Titular Milton Vieira Coelho

Titular Foued Salmen Espíndola

Titular Luiz Claudio Cameron

Suplente Enilza Maria Espreáfico

Suplente Carlos Alberto de Oliveira

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 14:05 Término - 14:48

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 14:48 Término - 17:05

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:

1º Membro da Banca A

2º Membro da Banca A

3º Membro da Banca A

Conceito Final: A

9 - OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

Milton Vieira Coelho  
Foued Salmen Espíndola  
Luiz Claudio Cameron

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

**ANA CECÍLIA SILVA SANTOS**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE  
ATPase DE ENCÉFALO DE RATA**

**UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS  
1997**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE  
ATPase DE ENCÉFALO DE RATA**

ANA CECÍLIA SILVA SANTOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS  
1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
 DIRETORIA DO SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Procedência: \_\_\_\_\_

Valor: R\$: Doação

Recebido em: 1998

O. P. D. \_\_\_\_\_

N.F./Fatur: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Registro: 04379/98 Data: 14,04,98

Volume: \_\_\_\_\_ Exemplar: 1

FU-00009615-1

Santos, Ana Cecília Silva, 1967

Purificação e caracterização parcial de ATPase de encéfalo de rata

- Uberlândia: 1997

94 folhas , 24 figuras

Milton Vieira Coelho

Dissertação de (mestrado) Universidade Federal de Uberlândia.

Coordenação de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui Bibliografia

1. Motores Moleculares - Teses. 2. Miosina - Teses. 3. Cinesina - Teses. Universidade Federal de Uberlândia. Coordenação de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

CDU 581.169



MOU  
577.1  
5237 P  
TES/MEM

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE  
ATPase DE ENCÉFALO DE RATA**

Aluno: Ana Cecília Silva Santos  
Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

**DIRBI/UFU**



1000184045

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS  
1997

**Aos meus pais,  
Milton e Cibeli.  
pelo apoio e incentivo  
proporcionado na realização  
deste trabalho.**

**e**

**a meus irmãos  
Ana Roberta e Fernando Augusto  
e cunhados Reinaldo e Marília pelo  
carinho e amizade dado.**

## **Agradecimento Especial**

A minha grande amiga **Paula Mendes de Freitas** pela ajuda, compreensão, apoio e dedicação no decorrer deste trabalho, bem como em todos os momentos difíceis durante os experimentos e, como não poderia deixar de lembrar sua grande atenção para comigo no início do meu estágio no laboratório de Bioquímica ensinando-me todas as técnicas de laboratório sempre com amizade e boa vontade.

**É através dos pequenos obstáculos da vida que conhecemos o nosso grande potencial, onde nos tornamos mais fortes para superar os problemas e crescermos como seres humanos. Tudo o que de uma forma ou de outra temos que passar faz parte do nosso aprendizado aqui na Terra. Devemos a cada dia agradecer por tudo o que passamos pois só assim conseguimos nos tornar pessoas mais resistentes e maduras para poder superar todas as barreiras que são impostas pela vida.**

## **Agradecimentos**

O meu sincero agradecimento ao meu orientador **Prof. Dr. Milton Vieira Coelho** pela amizade, orientação e dedicação concedida , bem como na obtenção de materiais e reagentes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola** pelo fornecimento de materiais e reagentes necessários, bem como pela amizade e orientação concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Luis Ricardo Goulart Filho** pela ajuda proporcionada no esclarecimento de dúvidas, pela amizade e dedicação concedida, bem como no empréstimo de materiais e reagentes necessários para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Genética e Bioquímica desta universidade através de seus docentes e membros deste departamento que de alguma forma ajudaram para a realização deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica pela amizade e colaboração para a realização deste trabalho.

À **Eliana Valéria Patussi** pela amizade e apoio necessário muitas vezes no decorrer deste trabalho.

Ao **Jair Pereira Cunha Júnior** pela amizade e colaboração necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Maria de Fátima Rodrigues** pela amizade e ajuda durante todo o decorrer deste trabalho.

À **Ana Graci Brito** pela amizade, compreensão e apoio durante todo este nosso tempo de convívio sempre dando força para conseguir obter o melhor deste trabalho.

À funcionária **Sebastiana (Tiana)** pela sua amizade, incentivo e cooperação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao funcionário **Cleuber** pelo auxílio, cooperação, amizade e orientação na parte de digitação deste trabalho.

Ao funcionário **Hélio** do Laboratório de Biofísica pela cooperação oferecida quando necessária para a execução deste trabalho.

Ao **Gerson** secretário do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pela amizade, auxílio e orientação para a confecção deste trabalho.

Ao **CEBIM**, à **FUNDAP** e ao **VALLÉE** pelo fornecimento dos animais necessários para este trabalho.

Aos colegas de laboratório: Veridiana, Fábio, Alessandra, Elaine, Márcia Aguiar, Márcia Borges, Regildo, Christiane Belele, Gismar, Robson, Maurício, Juarez, Marcelo e Adailton pelo apoio e amizade prestados no desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais amigos que durante este trabalho deram-me forças para conseguir superar os problemas existentes motivando a continuar e alcançar o objetivo final que foi a realização desta dissertação de mestrado.

**Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:**

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica



## ABREVIATURAS UTILIZADAS:

ADP - adenosina difosfato

AEBSF - 4-(-2 amino etil) benzeno-Sulfonil Fluoreto

AMPc - monofosfato de adenosina cíclico

AMP-PNP - adenil 5' - imidodifosfato

ATP - adenosina 5' - trifosfato

ATPase - adenosina trifosfatase

BSA - soro albumina bovina

C-terminal - carboxi-terminal

CaM - calmodulina

CTP - citosina 5' - trifosfato

DEAE - dietil amino etil

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etileno diamino tetra acético

EGTA - Ácido etileno glicol-bis ( $\beta$ - amino etil éter) N,N,N,N-tetracético

EHNA - 9-eritro (- 2 - hidroxí - 3 nonil) adenina

GDP - guanosina 5' - difosfato

GTP - guanosina 5' - trifosfato

GTPase - guanosina trifosfatase

MAP - proteína associada a microtúbulo

Mr - mobilidade relativa

N-terminal - amino terminal

NEM - N-etilmaleimida

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

Pi - ortofosfato inorgânico

PMSF - fenil metil sulfonil fluoreto

PPi - pirofosfato

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

## INDICE

<b>Lista de Tabelas</b>	i
<b>Lista de figuras</b>	ii
<b>1- Introdução</b>	01
1.1- Citoesqueleto	01
1.2- Motores Moleculares	05
1.3- Miosinas	06
1.4- Cinesinas	10
1.5- Dineínas axonemal e citoplasmática	15
<b>2- Objetivo</b>	20
<b>3- Materiais e Métodos</b>	21
3.1- Métodos de análise das amostras	21
3.1.1- Dosagem de Proteínas	21
3.1.2- Purificação de Calmodulina	22
3.1.3- Determinação da atividade adenosina trifosfatásica	23
3.1.4- Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil sulfato de sódio	26
3.1.5- Aplicação das amostras	27
3.1.6- Coloração, soluções fixadoras e secagem de géis	27
3.1.7- Determinação do Peso Molecular em SDS-PAGE	27
<b>4- Resultados</b>	29
4.1- Preparação da fração solúvel de cérebro de rata	29

4.1.1- Preparação de ATPase da fração S1 de cérebro de rata	30
4.1.2- Recuperação da atividade ATPásica	34
4.2- Efeito de cátions na atividade ATPásica da fração PC	39
4.3- Atividade K-EDTA ATPásica e efeito da actina na atividade MgATPásica da fração PC	42
4.4- Atividade enzimática da fração PC utilizando outros substratos	42
4.5- Caracterização farmacológica da atividade ATPásica da fração PC	46
4.6- Estabilidade da atividade MgATPásica da fração PC	50
4.7- Efeito da concentração de ATP na atividade MgATPásica da fração PC	50
<b>5- Discussão</b>	<b>53</b>
<b>6- Conclusão</b>	<b>57</b>
<b>7- Resumo</b>	<b>58</b>
<b>8- Summary</b>	<b>60</b>
<b>9- Referências Bibliográficas</b>	<b>61</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 01:</b> Meios de reação para atividade ATPásica	25
<b>Tabela 02:</b> Purificação de atividade ATPásica de sobrenadante (S1) de cérebro de rata	36
<b>Tabela 03:</b> Resposta da atividade ATPásica da fração PC a efetores e inibidores	47

## Lista de Figuras

<b>Figura 01:</b> Estrutura dos microtúbulos	01
<b>Figura 02:</b> Esquema da actina F	04
<b>Figura 03:</b> Molécula de miosina II	07
<b>Figura 04:</b> Motilidade da cinesina ao longo do microtúbulo	10
<b>Figura 05:</b> Diagrama esquemático da cinesina	11
<b>Figura 06:</b> Esquema mostrando os movimentos de que participa a cinesina, sendo movido a ATP, sobre trilhos de microtúbulos	12
<b>Figura 07:</b> Diagrama das possíveis estruturas de vários membros da superfamília de cinesina	14
<b>Figura 08:</b> Esquema da estrutura de uma axonema	16
<b>Figura 09:</b> Estrutura da dineína	17
<b>Figura 10:</b> Curva-padrão de BSA	22
<b>Figura 11:</b> Curva-padrão de Fosfato Inorgânico	24

<b>Figura 12:</b> Curva de calibração	28
<b>Figura 13:</b> SDS-PAGE da preparação de ATPase de cérebro de rata	35
<b>Figura 14:</b> Perfil cromatográfico e atividade ATPásica das frações eluídas da coluna de fosfocelulose	37
<b>Figura 15:</b> SDS-PAGE do fracionamento de S3 em coluna de fosfocelulose	38
<b>Figura 16:</b> Atividade ATPásica da fração PC é dependente de $Mg^{++}$	40
<b>Figura 17:</b> Efeito da calmodulina na atividade MgATPásica da fração PC	41
<b>Figura 18:</b> Efeito da actina, na presença e ausência de calmodulina, na atividade MgATPásica da fração PC	43
<b>Figura 19:</b> Atividade K-EDTA ATPásica da fração PC	44
<b>Figura 20:</b> Atividade enzimática da fração PC frente à outros substratos	45
<b>Figura 21:</b> Efeito de sais na atividade MgATPásica da fração PC	48

- Figura 22:** Variação da atividade MgATPásica da fração PC com o pH 49
- Figura 23:** Estabilidade da atividade ATPásica da fração PC 51
- Figura 24:** Curva da atividade mgATPásica da fração PC X concentração de ATP 52

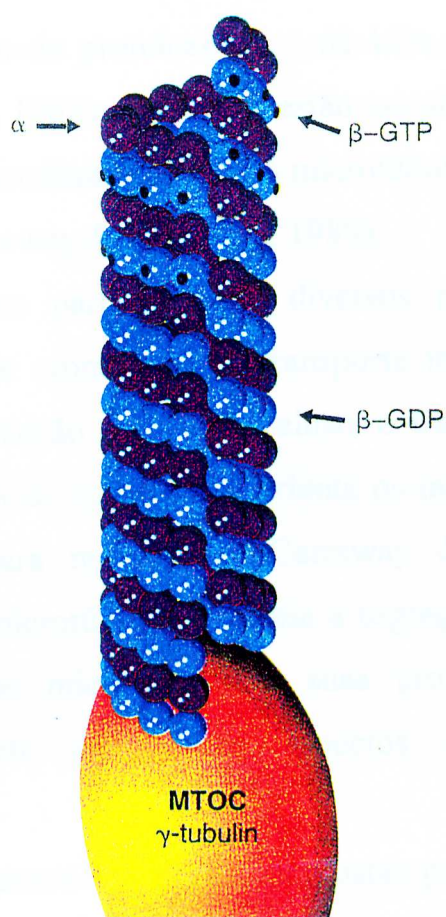


## 1- Introdução

### 1.1- Citoesqueleto

Células eucarióticas possuem uma estrutura interna, chamada de citoesqueleto, que lhes dá formas distintas. O citoesqueleto pode ser definido como sendo uma rede citoplasmática de estrutura fibrilar com papel na manutenção da morfologia celular, transporte intracelular, motilidade para a célula, mitose e meiose. Essa estrutura dinâmica é formada por três classes de fibras do citoesqueleto: microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989; Niggli & Burger, 1987).

Os microtúbulos possuem uma estrutura similar em todas as células eucarióticas (Artvinli, 1987). São estruturas longas com cerca de 100  $\mu\text{m}$  em forma de tubos e apresentam diâmetro interno e externo de cerca de 15 e 25 nm, respectivamente (para revisão ver Wallin & Strömberg, 1995). Os microtúbulos são constituídos por duas proteínas relacionadas mas não idênticas,  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina, com tamanho de 4 x 8 nm (para revisão ver Wallin & Strömberg, 1995).



**Figura 01: Estrutura dos microtúbulos (Mandelkow et al, 1995)**

Em cílios e flagelos, os microtúbulos encontram-se em estruturas altamente organizadas possuindo nove pares externos de microtúbulos ao redor de dois microtúbulos isolados. Sua organização, a qual é mantida por várias proteínas associadas, está envolvida em movimentos gerados por cílios e flagelos usando a energia liberada da hidrólise de ATP por uma ATPase associada a microtúbulo, a dineína. Os microtúbulos são polímeros dinâmicos que continuamente polimerizam e despolimerizam nas células e *in vitro*, esta propriedade é denominada de instabilidade dinâmica (Mitchison & Kirschner, 1984; Saxton et al, 1984; Wadsworth & Salmon, 1986; Cassimeris et al, 1987; Sammak & Borisy, 1988).

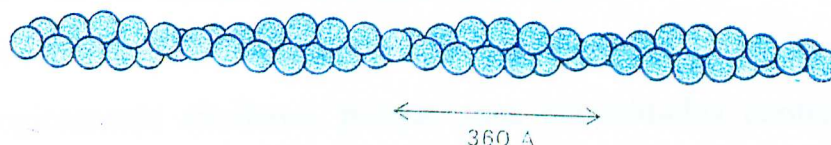
Existem duas classes de proteínas associadas a microtúbulos: as MAPs, “microtubule associated proteins”, que são grandes polipeptídeos (>

250 kDa) e um grupo de proteínas de ~ 60 kDa, proteína tau (Olmsted, 1986; Hirokawa et al, 1988). As MAPs estão envolvidas na associação dos microtúbulos com microfilamentos e dos microtúbulos com neurofilamentos (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989).

Os microtúbulos participam de diversos processos celulares tais como: movimentos de cromossomos, transporte intracelular de organelas, crescimento e manutenção da forma celular e transdução sensorial. Eles formam uma estrutura de suporte que orienta os movimentos das organelas dentro da célula (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989). A depolimerização de microtúbulos bloqueia a segregação de cromossomos e há evidência que os microtúbulos e suas proteínas associadas estão envolvidas ativamente em muitos aspectos da mitose (Vallee & Sheetz, 1996).

Os microfilamentos são fibras compostas por subunidades de actina em homopolímeros lineares de aproximadamente 7 nm de diâmetro. A actina consiste de um única cadeia polipeptídica com cerca de 375 resíduos de aminoácidos, sua sequência e propriedades bioquímicas são bem conservadas (para revisão ver Kabsch & Vandekerckhove, 1992). Está presente em todas as células eucarióticas e participa de vários processos de motilidade celular. É uma proteína globular (actina G) de peso molecular 42 kDa, a qual polimeriza formando filamentos (actina F) para realizar muitas de suas funções biológicas (para revisão ver Hennessey et al, 1993). A actina F é um dos principais componentes do citoesqueleto (para revisão ver Hennessey et al, 1993). O controle da polimerização-despolimerização da actina F é muito importante para muitos processos de modificações morfológicas e movimentos intracelulares (Bamburg & Bernstein, 1990; para revisão ver Hennessey et al, 1993). Análises de cristalografia com raio X mostram que a actina é constituída de dois domínios globulares e tem dimensões aproximadas de 30x40x70Å. *In vitro*, em condições fisiológicas,

a actina G polimeriza-se formando a forma fibrosa, actina F, a qual se assemelha muito aos filamentos finos. A actina F aparece em micrografias eletrônicas como dois cordões de contas torcidos um em torno do outro (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989).



**Figura 02: Esquema da actina F (Stryer, 1992).**

Frequentemente, os microfilamentos formam uma teia imprecisa abaixo da membrana celular e possuem uma função de suporte mecânico como os microtúbulos (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989). Os microfilamentos participam na geração da tensão: na contração do músculo e no dobramento ou extensão da membrana celular. Estudos de ultraestrutura sugerem que os microfilamentos são abundantes na região cortical subjacente a membrana plasmática axonal e possuem um papel importante na arquitetura do seu citoesqueleto interno (Fath & Lasek, 1988).

Os filamentos intermediários são estruturas fibrilares de 10 nm de diâmetro sendo mais diversas que os microfilamentos. Todas as proteínas destes filamentos apresentam um centro estrutural com aproximadamente 310 resíduos de aminoácidos, que é predominantemente em super hélice de  $\alpha$  hélice. Cinco classes de filamentos intermediários foram descritas baseado na origem da célula, são estas: 1) filamentos de vimentina com subunidades de 54 KDa, são encontradas em células de origem mesenquimal ou células em cultura (meningiomas); 2) desmina, encontrada predominantemente em

células miogênicas (miócitos cardíacos) possuindo subunidades de 52 KDa; 3) proteínas fibrilares gliais com subunidades de 50 KDa encontradas em células astrogliais; 4) neurofilamentos, compostos por proporções variáveis de três subunidades: 70, 140 e 200 KDa sendo encontrados em células neuronais; 5) citoqueratinas ou tonofilamentos, com subunidades heterogêneas de 40-70 KDa e aparecem em células epiteliais, desmossomos, (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989).

Todas estas classes de filamentos intermediários são morfológicamente similares, porque suas subunidades contém um núcleo central conservado. Em células eucarióticas, os filamentos intermediários servem como integradores mecânicos no espaço celular (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989).

## **1.2- Motores Moleculares**

A motilidade celular é uma característica central dos seres vivos. As células possuem uma estrutura dinâmica a qual possibilita o seu movimento através de um substrato, a emissão de projeções de membrana e uma diversidade de movimentos intracelulares que são essenciais ao seu desenvolvimento e crescimento. Esta variedade de movimentos celulares exige a participação de uma diversidade de motores moleculares (para revisão ver Endow & Titus, 1992).

A característica comum dos motores moleculares é que são proteínas que tem a habilidade de hidrolisar o ATP convertendo parte de sua energia química em trabalho mecânico. Portanto, essas proteínas constituem um componente gerador de força para a célula e possuem um papel essencial em muitos processos celulares tais como: contração muscular, fagocitose, emissão de pseudópodos, transporte de vesículas e organelas, migração de

cromossomos durante o processo de divisão celular e citocinese (para revisão ver Endow & Titus, 1992; Clarke & Spudich, 1977).

Os motores moleculares estão reunidos dentro de três famílias de proteínas: as miosinas, as cinesinas e as dineínas. As miosinas utilizam filamentos de actina como trilhos para movimento, enquanto as cinesinas e as dineínas movem-se ao longo de trilhos de microtúbulos (para revisão ver Endow & Titus, 1992).

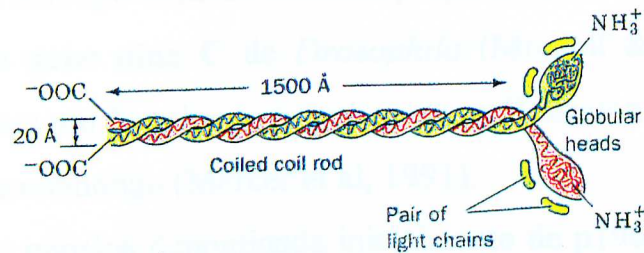
### 1.3- Miosinas

Miosinas são enzimas que caracterizam-se por apresentar um domínio N-terminal globular conservado de ~ 80 kDa (denominado cabeça) que pode ligar-se à actina, hidrolisar o ATP e translocar ao longo de filamentos de actina (para revisão ver Warrick & Spudick, 1987 ); contém uma região C-terminal (domínio cauda) que é específica para cada classe das miosinas, e entre estas duas regiões está o domínio pescoço (ou regulatório) no qual ligam-se as cadeias leves (Cheney & Mooseker, 1992, para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995).

A primeira proteína motora a ser descoberta nesta família foi a miosina II (miosina convencional ou miosina clássica de músculo), denominada desta forma por possuir duas cadeias pesadas (de aproximadamente 200 kDa) e possuir na extremidade N-terminal de cada cadeia uma porção globular. As duas cadeias pesadas estão unidas por um longo bastão em  $\alpha$  hélice super espiralada denominada cauda (Warrick & Spudich, 1987). A cauda tem a capacidade de interagir com as caudas de outras moléculas de miosinas para formar filamentos bipolares (Warrick & Spudich, 1987; Hammer III, 1991). Os domínios globulares cabeça contém sítios ligantes para ATP, actina e cadeias leves de miosina e exibe atividade



Mg-ATPásica estimulada por filamentos de actina (Warrick & Spudich, 1987; Hammer III, 1991).



**Figura 03: Molécula de miosina II (Voet & Voet, 1990)**

Proteínas relacionadas com a miosina muscular foram descobertas em outros sistemas como a identificada por Pollard & Korn em 1973, em *Acanthamoeba*. Essa miosina possui uma única cadeia pesada (uma única cabeça) com peso molecular de 110 kDa e não forma filamentos (Warrick & Spudich, 1987). Posteriormente, proteínas relacionadas com essa miosina também foram encontradas em outras espécies de eucariotos inferiores, como em *Dictyostelium* (Titus et al, 1989) e em borda em escova de células epiteliais do intestino de vertebrados (Collins & Borysenko, 1984; Mooseker et al, 1991, para revisão ver Wolenski, 1995). Devido ao fato destas proteínas apresentarem 01 cadeia pesada, houve a necessidade de separar estas proteínas em uma nova classe, denominada de miosina I ou miosina não convencional (Pollard et al, 1991).

Estes motores moleculares estão envolvidos em vários tipos de motilidades celulares incluindo citocinese (Goldman et al, 1976), função contrátil nos vacúolos (Warrick & Spudich, 1987), secreção (Warrick & Spudich, 1987; Hasson & Mooseker, 1995), fagocitose (Fukui, 1993 a,b; Hasson & Mooseker, 1995), formação de pseudópodos (Fukui, 1993 a,b) tráfego vesicular (Warrick & Spudich, 1987; Wolenski, 1995), transporte de

organelas (Hasson & Mooseker, 1995) e estão amplamente distribuídas em células eucarióticas (Clarke & Spudich, 1977; Korn, 1978; para revisão ver Korn & Hammer III, 1988).

Análise de fenótipo mutante também propiciou a descoberta de outras miosinas como o **gene nina C** de *Drosophila* (Montell & Rubin, 1988), **MYO2** de levedura em *Saccharomyces cerevisiae* (Johnston et al, 1991) e o **gene dilute** de camundongo (Mercer et al, 1991).

Uma nova miosina denominada inicialmente de p190 foi identificada em encéfalo de mamíferos através de estudos bioquímicos e imunológicos (Larson et al, 1986; Larson et al, 1988; Larson et al, 1990; Larson, 1996). Esta proteína apresenta características distintas de miosina II convencional e miosina I de borda em escova de células epiteliais intestinais, sendo bastante enriquecida em cérebro (Espreáfico et al, 1992; Espíndola et al, 1992; Larson et al, 1988). É encontrada em muitos vertebrados como galinhas, ratos, camundongos e humanos (para revisão ver Wolenski, 1995; Larson, 1996). Esta classe de miosina possui, além do domínio cabeça e cauda, um longo domínio pescoço composto por 6 "IQ motif" que são sítios ligantes de calmodulina (Larson, 1996; Cheney et al, 1993).

Como um grande número de novas miosinas foram descobertas, a simples divisão de miosinas dentro de duas classes, I e II, não era mais apropriado. Alguns pesquisadores propuseram a construção de uma árvore filogenética onde a família das miosinas foram subdivididas em classes tendo como base a estrutura primária do domínio motor, que é a região conservada dessas moléculas (Espreáfico et al, 1992; para revisão ver Mooseker, 1993; Cheney et al, 1993; Goodson & Spudich, 1993; para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995). Esta classificação reflete na relação filogenética entre as miosinas e seus domínios estruturais (para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995). Manteve-se a denominação de miosina I e II para as miosinas monoméricas (com uma única cabeça globular) e diméricas



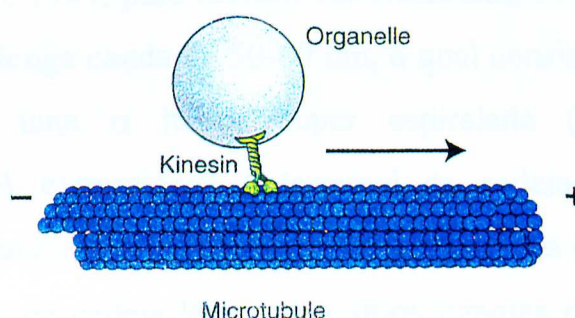
(com duas cabeças globulares), respectivamente e ordenou as demais de acordo com sua ordem cronológica de descoberta (Cheney et al, 1993). Atualmente já foram identificadas 12 classes de miosinas (para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995).

Todas as cadeias pesadas de miosina que se conhece consistem de uma região motora N-terminal ou domínio cabeça, um domínio pescoço (ou regulatório) que é um sítio ligante de cadeia leve, e um domínio cauda na região C-terminal específica de cada classe. O domínio cabeça, embora seja conservado entre todas as miosinas, tem características específicas de cada classe que podem ser importante para definir propriedades funcionais de miosinas (para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995).

As miosinas de um modo geral apresentam as seguintes características enzimáticas: a) baixa atividade ATPásica na presença de Mg, MgATPásica, (Pollard, 1982); b) Atividade ATPásica na presença de íons  $\text{Ca}^{++}$  (CaATPase) superior a MgATPásica; c) Elevada atividade ATPásica na ausência de cátions divalentes e alta concentração de  $\text{K}^+$ (K-EDTA ATPásica) e d) atividade MgATPásica estimulada por actina em condições fisiológicas (Pollard, 1982). Miosina V e miosina I de borda em escova de células epiteliais usam a calmodulina como cadeia leve, ligam-se a calmodulina na ausência de cálcio e a estimulação da sua atividade MgATPásica por actina depende de  $\text{Ca}^{++}$  / CaM (Espíndola et al, 1992; Cheney et al, 1993).

## 1.4- Cinesina

A cinesina foi primeiramente purificada de axônios gigantes de lulas (Brady, 1985; Vale et al, 1985). Transporte axonal rápido e experimentos de motilidade demonstram que de modo geral a cinesina é uma proteína motora que realiza movimento *in vitro* somente em direção a extremidade (+) do microtúbulo, ou seja, do centro da célula para a periferia (Vale et al, 1985).

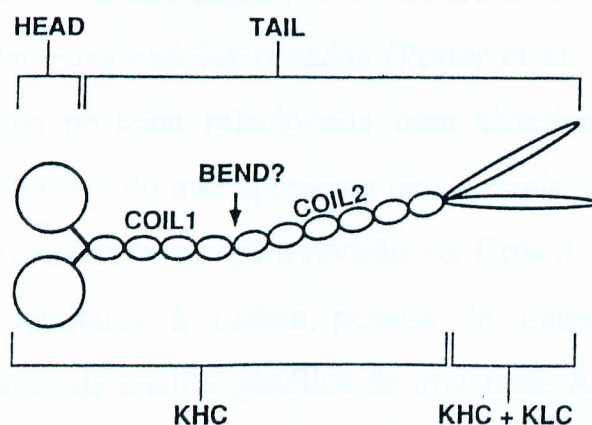


**Figura 04: Motilidade da cinesina ao longo do microtúbulo.**  
(Salmon, 1995).

Cinesina isolada de uma variedade de tecidos e organismos como cérebro bovino (Vale et al, 1985; Kuznetsov & Gelfand, 1986), medula adrenal bovina (Murofushi et al, 1988), ovos de ouriço do mar (Scholey et al, 1985), embrião de *Drosophila* (Cole et al, 1994), fígado de rato (Hirokawa, 1996), *Acanthamoeba* (Valle & Shpetner, 1990), *Dictyostelium* (McCaffrey & Vale, 1989) entre outros são geralmente compostos por um tetrâmero ( $\alpha_2\beta_2$ ) consistindo de duas cadeias pesadas idênticas  $\alpha$  (KHC) de 110-135 kDa e duas cadeias leves idênticas  $\beta$  (KLC) de 60-80 kDa (Kuznetsov et al, 1988; Vallee & Shpetner, 1990; Brady, 1991; Block, 1995; para revisão ver Cole & Scholey, 1995; Goldstein, 1991; Haimo, 1995). A cinesina purificada de cérebro bovino apresenta um

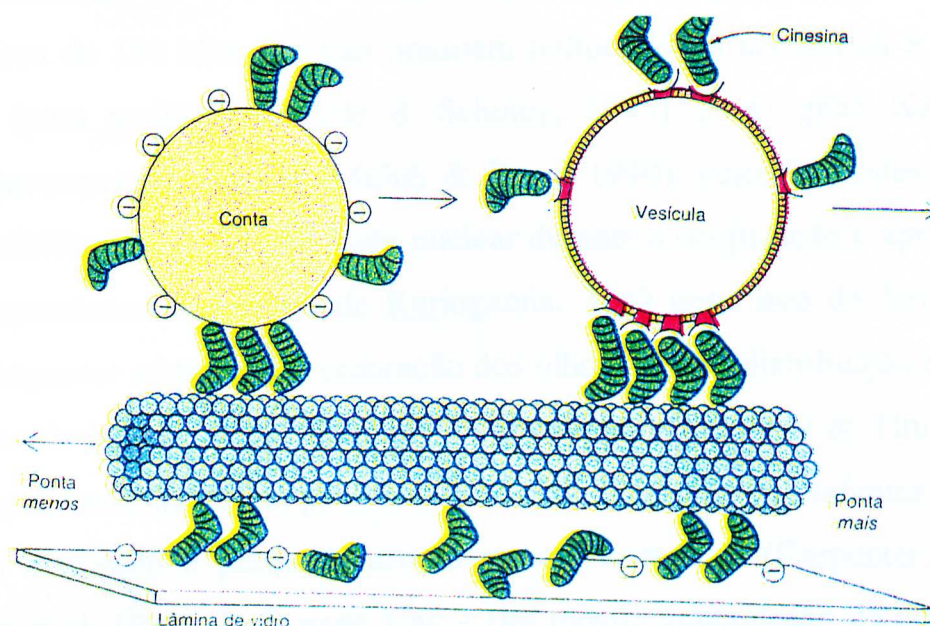
complexo de dois polipeptídeos de 120 kDa, cadeia pesada, e dois polipeptídeos de 62 kDa, cadeia leve (Bloom et al, 1988; Kuznetsov et al, 1988).

A molécula de cinesina consiste de três domínios maiores. Na extremidade N-terminal de cada cadeia pesada, encontra-se o domínio motor globular ou cabeça com aproximadamente 450 aminoácidos e com cerca de 40 kDa (para revisão ver Cole & Scholey, 1995); esta região contém sítios para hidrólise de ATP e uma região de ligação ao microtúbulo (Hirokawa, 1989; Scholey et al, 1989; para revisão ver Goldstein, 1991). Presa a cabeça globular está uma longa cauda de 50-60 nm, a qual consiste de uma “haste”, cuja estrutura é uma  $\alpha$  hélice super espiralada (para revisão ver Goldstein, 1991). A extremidade C-terminal da cadeia pesada, dobra-se formando uma segunda região globular. Acredita-se que esta região contém tanto sítios ligantes de cadeia leve como sítios ligantes para membranas da “carga” a ser transportada (para revisão ver Goldstein, 1991; Cole & Scholey, 1995), como também pode se ligar a organelas e a outras estruturas celulares (Hirokawa et al, 1989; Yang et al, 1989).



**Figura 05: Diagrama esquemático da cinesina. (Goldstein, 1991).**



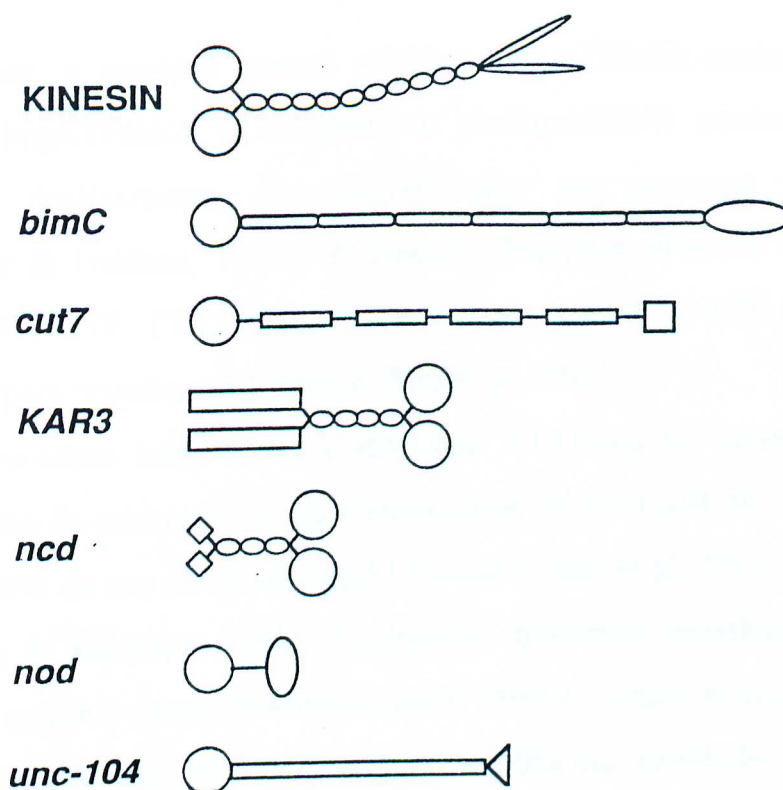


**Figura 06: Esquema mostrando os movimentos de que participa a cinesina, sendo movido a ATP, sobre trilhos de microtúbulos (Stryer, 1992).**

Cinesina de *Acanthamoeba* e ovos de ouriço do mar contém uma cadeia pesada de 130 kDa e ainda não foi determinado se cadeias leves são complexadas com estas cadeias pesadas (Porter et al, 1987; McCaffrey & Vale, 1989). Uma proteína relacionada com cinesina obtida de cérebro bovino e ovos de ouriço do mar apresenta um complexo homodimérico ( $\alpha_2$ ) com ausência de cadeias leves (para revisão ver Cole & Scholey, 1995).

Proteínas similares à cadeia pesada de cinesina também foram identificadas através da análise genética de mutantes. Alguns exemplos são: 1) o **gene bim C** de *Aspergillus nidulans* (Enos & Morris, 1990) que parece ter um papel importante na formação e manutenção da divisão mitótica (Cole et al, 1994). A proteína KRP-130 de *Drosophila* foi o primeiro membro desta subfamília a ser isolado de um tecido nativo. É um

homotetrâmero de 500 kDa composto por 04 polipeptídeos aparentemente idênticos de 130 kDa que não possuem polipeptídeos acessórios e cadeias leves (para revisão ver Cole & Scholey, 1995). 2) O **gene KAR3** de *Saccharomyces cerevisiae* (Meluh & Rose, 1990), cujos mutantes exibem uma eficiência reduzida na fusão nuclear durante a conjugação e apresentam conseqüentemente defeitos de Kariogamia. 3) O **gene ncd** de *Drosophila melanogaster* afeta tanto a coloração dos olhos como a distribuição meiótica cromossômica em *Drosophila led* (para revisão ver Endow & Titus, 1992). 4) O **gene nod** que afeta predominantemente a troca cromossômica e causa a não disjunção e perda de cromossomos na meiose (Carpenter, 1973 ; Zhang et al, 1990). 5) O **gene Unc - 104** mostra acumulação de numerosas vesículas no corpo celular neuronal como em *C. elegans*, (Otsuka et al, 1991); 6) o **gene Cut 7** é um mutante sensível a temperatura que mostra anormalidades na formação dos spins mitóticos com possíveis duplicações em sua estrutura (Hagan & Yamagida, 1990) 7) o **gene pal**, com perda especificamente de cromossomos derivados paternalmente em embriões (Backer, 1975) entre outros mutantes.



**Figura 07: Diagrama das possíveis estruturas de vários membros da superfamília de cinesina (Goldstein, 1991).**

A atividade ATPásica da cinesina pode ser regulada de diversas formas dependendo da heterogeneidade de suas cadeias leves. Cadeias leves de algumas cinesinas são proteínas ligantes de calmodulina. Tanto as cadeias leves como as cadeias pesadas podem ser fosforiladas *in vitro* e *in vivo* pela proteína quinase dependente de AMPc e proteína quinase C. Tanto calmodulina como a fosforilação parecem regular a atividade ATPásica da cinesina (Matthies et al, 1993).

As cinesinas necessitam de cátions divalentes para sua atividade ATPásica (Kuznetsov & Gelfand, 1986; Cohn et al, 1987; para revisão ver Vallee & Shpetner, 1990). Apresentam baixa atividade MgATPásica (Vallee & Sheetz, 1996) sendo esta atividade ativada por microtúbulo (Kuznetsov & Gelfand, 1986; Cohn et al, 1987; McCaffrey & Vale, 1989). Na ausência de

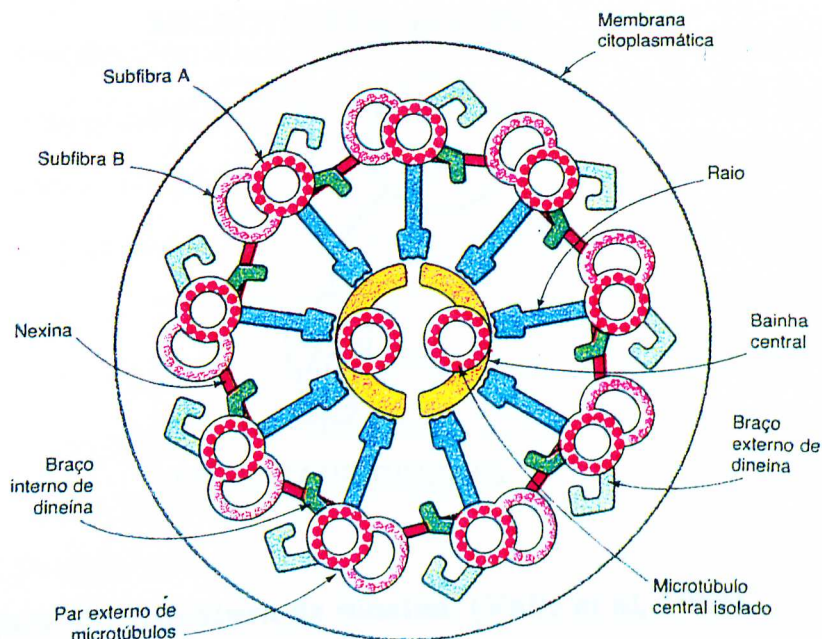
microtúbulos, a cinesina possui atividade CaATPásica maior do que a atividade MgATPásica (Kuznetsov & Gelfand, 1986) contudo, não foi observado deslizamento dos microtúbulos na presença de CaATP (Kuznetsov & Gelfand, 1986). A cinesina hidrolisa diversos nucleotídeos como o ATP, GTP, TTP, UTP, CTP e ITP, no entanto, o ATP é o substrato preferido (para revisão ver Vallee & Shpetner, 1990).

O vanadato inibe tanto a atividade ATPásica da cinesina como o deslizamento de microtúbulo. São necessários 50 a 60  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaVO}_3$  para inibir de 50% da sua atividade MgATPásica (Cohn et al, 1987; para revisão ver Vallee & Shpetner, 1990). A cinesina apresenta resistência a agentes oxidantes sulfidril como N-etilmaleimida (NEM) sendo requeridos de 3-5 mM deste, para uma inibição entre 20 a 50% da atividade MgATPásica (Vale et al, 1985; Porter et al, 1987; Kuznetsov & Gelfand, 1986; revisão Vallee & Sheptner, 1990).

### **1.5- Dineína Citoplasmática e Axonemal.**

Microtúbulos foram primeiro observados por eletromicroscopia durante a década de 50 como elementos estruturais compreendendo os axonemas de cílios e flagelos (Vallee, 1991). As dineínas foram descritas como braços internos e externos presente em microtúbulos de cílios e axonemas flagelares (Gibbons, 1965). Estes braços são ATPases responsáveis pelo movimento de deslizamento entre microtúbulos que são fundamentais para a motilidade ciliar e flagelar. Os nove microtúbulos duplos externos suportam os braços da dineína que são presos em um anel por ligações entre os pares de ligações chamados de nexina. Em muitos casos, este anel está ao redor de um núcleo central de dois microtúbulos formando a estrutura característica 9 + 2 do axonema (Gibbons, 1981).





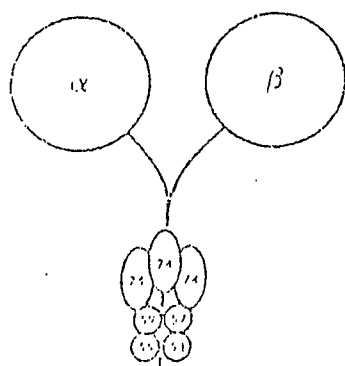
**Figura 08: Esquema da estrutura de um axonema. (Stryer, 1992).**

Dois classes funcional e estrutural de dineína foram identificadas: a dineína axonemal, envolvendo o movimento de cílios e flagelos, e a dineína citoplasmática (Vallee & Sheetz, 1996). Dineína citoplasmática e dineína flagelar e ciliar possuem uma região relativamente conservada, a cabeça, envolvida na produção de força ao longo de microtúbulos (Vallee et al, 1989). Estudos feitos em microscopia eletrônica mostraram que a dineína citoplasmática possui uma estrutura similar a dineína axonemal sendo um análogo desta enzima (Vallee et al, 1988).

As dineínas possuem um alto peso molecular que varia de 1000 a 2000 kDa e contém de 02 a 03 cadeias pesadas, onde encontram-se as regiões produtoras de força. Na extremidade N-terminal de 35 kDa de cada cadeia pesada há uma sequência consenso denominada de "P-loop", correspondendo a sítios potenciais de atividade nucleotidase (Vallee & Scheetz, 1996), que representa a região motora da molécula (Vallee, 1993).



## MICROTUBULE BINDING



## MEMBRANE BINDING

**Figura 09: Estrutura da dineína. (Valle et al, 1989).**

As dineínas tem um número altamente variável de cadeias leves e acessórias. A dineína axonemal contém subunidades acessórias que variam de 14 a 120 kDa e possui cadeias leves de 6 e 20 kDa (Vallee, 1991), enquanto que a dineína citoplasmática contém diferentes polipeptídeos acessórios variando de 53 a 74 kDa (Vallee et al, 1988; Paschal et al 1987 a,b; Valle, 1993). A dineína flagelar de *Clamydomonas* é uma das formas mais estudadas, ela possui 03 cadeias pesadas distintas de 500 kDa ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ); 02 cadeias intermediárias de 70 e 78 kDa, e 08 cadeias leves que variam de 10 a 22 kDa (Valle, 1993; Michell, 1994).

Dineína citoplasmática de cérebro possui 02 cadeias pesadas de 532 kDa, 03 cadeias intermediárias de 74 kDa e 04 cadeias leves de 59, 57, 55 e 53 kDa apresentando similaridades em tamanho com as dineínas flagelar e ciliar (Vallee et al, 1989; para revisão ver Holzbaur & Vallee, 1994).

As dineínas axonemal e citoplasmática são capazes de conduzir o deslizamento de microtúbulos *in vitro* (Paschal et al, 1987 a,b; Vale & Toyoshima, 1988) e ambas enzimas geram força na direção (-) do microtúbulo (Paschal & Vallee, 1987; Vale & Toyoshima, 1988; Holzbaur & Vallee, 1994). A habilidade da dineína citoplasmática de cérebro produzir

força em direção a extremidade (-) de microtúbulos sugeriu seu papel no transporte axonal retrógrado (Vallee, 1991).

Dineínas citoplasmática e axonemal são inibidas por reações fotoquímicas não usuais, onde o vanadato media a fotólise da cadeia pesada de dineína por luz UV (Vallee, 1991). O uso desta reação em sistemas com motilidade de organelas foi reconstituído *in vitro* indicando inativação preferencial do movimento retrógrado. Em muitos casos o movimento retrógrado pode ser reconstituído pela adição de dineína citoplasmática purificada (Vallee, 1991).

As dineínas estão presentes em vários tecidos e organismos como: cérebro de vertebrados, fígado, testículo, culturas epiteliais, fibroblastos, células de Sertori, nematódeos, ciliares (Vallee, 1991), *Dictyostelium discoideum* (Koonce et al, 1992) e *Saccharomyces cerevisiae* (Eshel et al, 1993). As dineínas estão envolvidas em muitas formas de motilidade citoplasmática incluindo transporte axonal (Paschal & Vallee, 1987; Vallee et al, 1989), localização centrípeta das vesículas de Golgi (Corthésy-Theulaz et al, 1992) e mitose (Pfarr et al, 1990; Steuer et al, 1990). Em células epiteliais a dineína parece estar envolvida na distribuição e redistribuição de endossomos, complexo de Golgi e lisossomos (Lins & Collins, 1992) e também parece estar implicada com a migração nuclear em eucariotos inferiores e humanos (Vallee & Scheetz, 1996).

As dineínas citoplasmática e axonemal diferem-se quanto a sua especificidade de nucleotídeos. Além do ATP, a dineína citoplasmática hidroliza diversos substratos como: CTP, GTP, UTP, ITP e TTP. Inclusive, ela hidroliza esses substratos melhor que o ATP (Shpetner et al 1988; Collins & Vallee, 1989). A dineína axonemal por sua vez, utiliza preferencialmente o ATP como substrato para sua hidrólise (Shpetner et al, 1988).

Em preparações de cérebro de rato a dineína citoplasmática se encontra bem enriquecida no citosol e possui atividade MgATPásica estimulada por microtúbulo em concentrações fisiológicas (Paschal et al, 1987; Vallee et al, 1989). A atividade enzimática desta dineína é dependente de cátions divalentes ( $Mg^{++}$  ou  $Ca^{++}$ ) sendo reduzida em sua ausência (Shpetner et al, 1988). A atividade ATPásica é mais alta na presença de magnésio do que na presença de cálcio (Pratt et al, 1984; Shpetner et al, 1988).

O vanadato inibi a dineína citoplasmática sendo necessário de 5 a 10  $\mu M$  para inibição de 50% de sua atividade ATPásica (Shpetner et al, 1988). A dineína de cérebro é inibida por 9-eritro(-2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA), um análogo de adenosina (Shpetner et al, 1988; Paschal & Vallee, 1987; Gibbons et al, 1978). EHNA 1,0 mM, em alta força iônica (0,6M KCl), inibe 85% da atividade da dineína citoplasmática e totalmente a atividade da dineína axonemal (Shpetner et al, 1988; Penningroth et al, 1985). EHNA é um inibidor menos potente que o metavanadato ( $NaVO_3$ ), porém é um inibidor mais específico (Shpetner et al, 1988). EHNA inibi especificamente o transporte axonal retrógrado (Vallee et al, 1989; Vallee, 1991). A ativação da dineína citoplasmática é fortemente afetada pela força iônica e pela presença de agentes redutores durante a purificação (Shpetner et al, 1988).

A dineína citoplasmática purificada de *Caenorhabditis elegans* transloca microtúbulos em direção oposta à das outras dineínas e sua atividade MgATPásica é estimulada por 0,2% de Triton X 100. (Shpetner et al, 1988).

## 2-Objetivo

Utilizamos atividade ATPásica como uma forma preliminar de caracterizar motores moleculares. Uma fração enriquecida em atividade ATPásica estimulada por  $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$  foi obtida a partir de citosol de cérebro usando coluna de fosfocelulose (Coelho, 1988). Recentemente, em nosso laboratório obteve-se uma fração enriquecida em atividade Mg/Ca nucleotidase trifosfatásica de testículo de coelho, também usando coluna de fosfocelulose (Patussi, 1996). Assim, o objetivo deste trabalho foi obter a partir de sobrenadante de cérebro de rato uma fração enriquecida em atividade ATPásica usando coluna de fosfocelulose.

04379/98

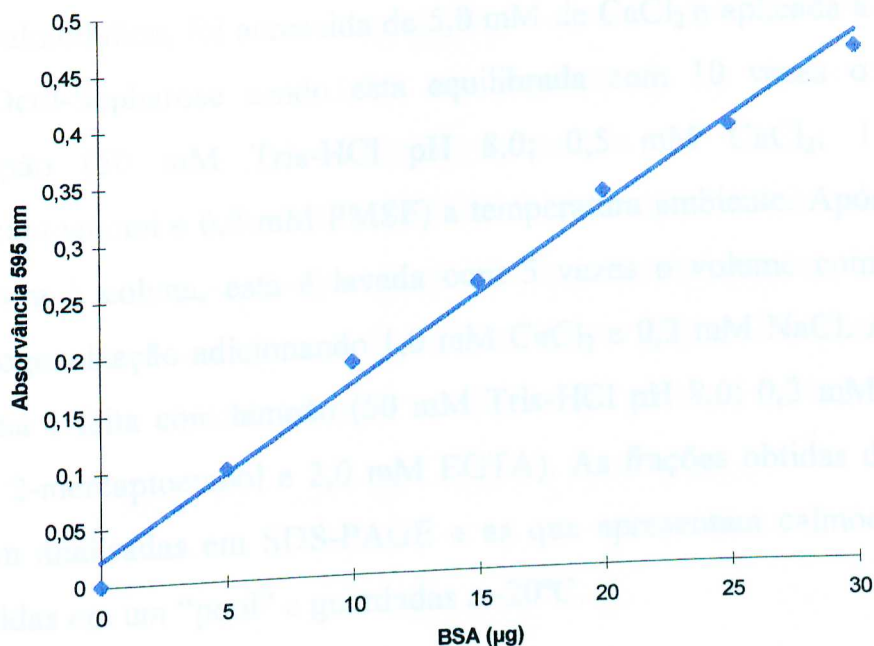
### **3- Materiais e métodos**

#### **3.1- Métodos de análises das amostras**

##### **3.1.1- Dosagem de Proteína**

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

As determinações foram feitas em duplicatas e a absorvância foi medida a 595 nm. Paralelamente à dosagem de proteínas das frações foi feita uma curva - padrão de soro albumina bovina, cuja concentração (5 a 30  $\mu\text{g}$ ) está na faixa de linearidade do método (Figura 10). A concentração de proteínas em mg/ml da amostra foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão.



**Figura 10: Curva - padrão de BSA .**

### **3.1.2- Purificação de Calmodulina.**

A calmodulina foi purificada de cérebro bovino pelo método de Gopalakrishna & Anderson (1982). O cérebro bovino é homogeneizado em tampão de homogeneização (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 1,0 mM 2- mercaptoetanol e 0,3 mM PMSF). Após a homogeneização, este é centrifugado a 15.000 g por 40 minutos. O precipitado é descartado e ao sobrenadante é adicionado ácido acético 5 M sob agitação moderada até atingir o pH 4,3. Quando atinge este pH ocorre a precipitação da calmodulina. Este sobrenadante fica em agitação por 60 minutos e, em seguida é centrifugada a 15.000 g por 30 minutos. O precipitado é ressuspenso em tampão de homogeneização e deixado em repouso por 30 minutos, sendo que antes deve-se acertar o pH para 7,2. Em seguida, faz-se

nova centrifugação a 15.000 g por 30 minutos e o sobrenadante é aquecido a uma temperatura de 90°C em água em ebulição por 10 minutos, resfriado em gelo e centrifugada a 15.000 g por 30 minutos. A fração solúvel, enriquecida em calmodulina, foi acrescida de 5,0 mM de CaCl<sub>2</sub> e aplicada a uma coluna de Octil-Sepharose sendo esta equilibrada com 10 vezes o volume de Tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,0 mM 2-mercaptoetanol e 0,2 mM PMSF) a temperatura ambiente. Após a aplicar a amostra à coluna, esta é lavada com 5 vezes o volume com tampão de homogeneização adicionando 1,0 mM CaCl<sub>2</sub> e 0,3 mM NaCl. A eluição da coluna é feita com tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,3 mM PMSF; 1,0 mM 2-mercaptoetanol e 2,0 mM EGTA). As frações obtidas desta eluição foram analisadas em SDS-PAGE e as que apresentam calmodulina foram reunidas em um "pool" e guardadas a -20°C.

### **3.1.3- Determinação da Atividade Adenosina Trifosfatásica**

As atividades ATPásicas foram determinadas pela medida do fosfato inorgânico liberado da hidrólise do ATP. Este fosfato liberado foi dosado espectrofotometricamente pelo método de Heinonen & Lahti (1981).

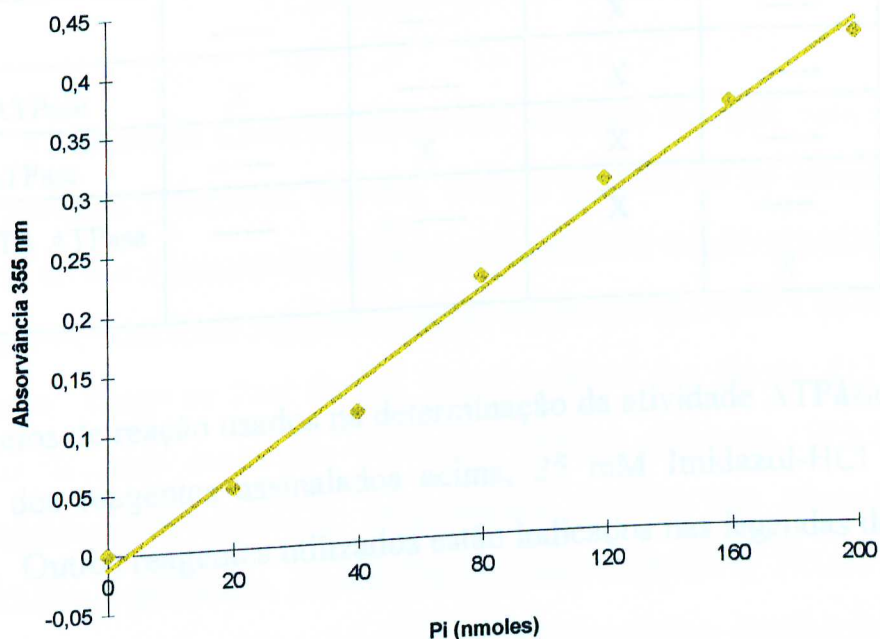
Para os ensaios de atividade ATPásica foram utilizados meios de reação específicos conforme descritos na Tabela 01.

A reação foi iniciada pela adição de 20 µl de ATP 10 mM (concentração final 1,0 mM) e incubada a 37°C por um período de tempo pré-determinado. O volume do meio de incubação era de 200 µl. Para interromper a reação, foram acrescentados aos 200 µl do meio de incubação 2 ml de solução AAM (2 volumes de acetona, 1 volume de 10 mM de molibdato de amônia e 1 volume de 5N de ácido sulfúrico) e agitado por 15

segundos. Em seguida adicionou-se 0,2 ml de ácido cítrico 1 N e agitou por mais 15 segundos.

Cada amostra possui seu próprio “branco”, no qual o ATP é adicionado imediatamente antes de interromper a reação com solução AAM. Todas as reações foram feitas em duplicatas e as absorvâncias foram medidas a 355 nm utilizando cuvetas de quartzo.

Uma curva padrão de fosfato foi feita compreendendo uma faixa de 0 a 200 nmoles de ortofosfato. Nesta faixa a absorvância em 355 nm varia linearmente com a concentração de ortofosfato (Figura 11). Paralelamente à toda dosagem, foi determinada um ponto (80 nmoles) da curva padrão de fosfato.



**Figura 11: Curva - padrão de Fosfato Inorgânico**



As leituras obtidas foram utilizadas para o cálculo da atividade específica através da seguinte fórmula:

$$AE = \frac{\text{leitura amostra}}{\text{leitura padrão}} \times 80 \text{ nmoles} \times \frac{1}{\text{tempo}} \times \frac{1}{[\text{prot}] \text{ (mg)}}$$

Todos os resultados foram expressos em nmoles de Pi liberado / minuto / mg de proteína.

**Tabela 01: Meios de reação para atividade ATPásica**

Atividade	MgCl <sub>2</sub> 5,0mM	CaCl <sub>2</sub> 3,2 mM	KCl 0,06M	KCl 0,6 M	EDTA 1,0 mM
-	-----	-----	X	-----	-----
Mg / ATPase	X	-----	X	-----	X
Ca / ATPase	-----	X	X	-----	X
K-EDTA ATPase	-----	-----	X	----- X	-----

Os meios de reação usados na determinação da atividade ATPásica, contém além dos reagentes assinalados acima, 25 mM Imidazol-HCl e 0,2 mM DTT. Outros reagentes utilizados estão indicados nas legendas das figuras.

### **3.1.4 -Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio**

A análise do perfil de polipeptídeos foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE) usando o sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970) e o sistema de placas de vidro descrito por Studier (1973).

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita em placas de vidro de dimensões de 10 x 10 x 0,06 cm. As amostras para SDS - PAGE foram preparadas utilizando 100µl da fração, 50µl de solução STOP (Tris - HCl 62,5 mM pH 6,8; glicerol 10%; SDS 1%; bromofenol blue 0,025%) e 10 µl de 2- mercaptoetanol (concentração final de 0,7%) e, antes de aplicadas no gel, foram fervidas por 2 minutos em água em ebulição.

### **3.1.5- Aplicação das amostras**

As amostras foram aplicadas nos pocinhos dos géis com o auxílio de microseringas (Hamilton, 80300), onde a quantidade de amostra aplicada variava de 2 a 12µl. Após aplicar as amostras em todos os pocinhos, a cuba foi ligada a uma fonte regulada para 40 miliampères. Após a corrida, quando a "frente" chega ao final do gel, este é retirado das placas. Foi utilizado o padrão de peso molecular SDS-6H, SIGMA (miosina, 205.000 Da;  $\beta$  galactosidase, 116.000 Da; fosforilase-B, 97.400 Da; albumina bovina, 66.000 Da; ovalbumina, 45.000 Da; anidrase carbônica, 29.000 Da) como referência de massa molecular relativa. A calmodulina purificada de cérebro bovino foi adicionada ao padrão de referência de peso molecular (SDS - 6H).

### 3.1.6- Coloração, soluções fixadoras e secagem dos géis

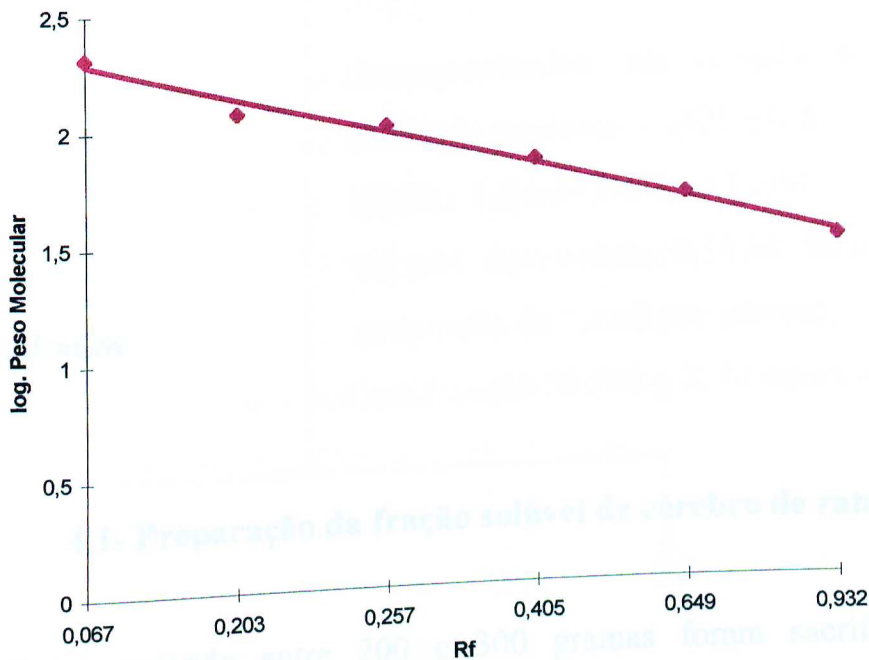
Após a eletroforese, o gel foi corado por aproximadamente 10 minutos com 0,2% de Coomassie Blue R - 250 dissolvido em metanol 50% e ácido acético 10%. Em seguida, o gel foi descorado em Metanol 30% e ácido acético 10%. Para a secagem, o gel é colocado entre duas folhas de papel celofane umedecidas em água e presos em bastidores de madeira. Caso os géis não sejam secos em seguida da sua descoloração, estes podem ser conservados em solução de ácido acético 7%.

### 3.1.7- Determinação do Peso Molecular em SDS -PAGE

O peso molecular dos polipeptídeos de interesse foram determinados utilizando marcadores com peso molecular conhecidos. Foram calculados os valores de migração relativa (Rf) dos polipeptídeos padrões, através da fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distância de migração do polipeptídeo à partir da origem do gel}}{\text{distância de migração da origem do gel até a frente de bromofenol}}$$

A construção da curva de calibração foi feita plotando valores de mobilidade relativa (Rf) de cada polipeptídeo padrão, eixo X, versus o logaritmo (log) de seu peso molecular, eixo Y, (Figura 12). Através da mobilidade relativa do polipeptídeo de interesse calcula-se o logaritmo de seu peso molecular e, posteriormente, seu peso molecular.



**Figura 12:** Curva de calibração

1. Preparação da fração solúvel de cérebro de rato

20 ratos pesando entre 200 e 250 gramas foram sacrificados por decapitação e seus cérebros extraídos rapidamente e colocados em solução saline gelada. Posteriormente, os cérebros foram homogeneizados em Tampão de Extração (50 mM Imidazol - HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 0,3 mM 4-2 AEBSP; 1,0 mM Aprotinina; 0,25 M Sacarose) usando um homogeneizador (Marconi, modelo TR 102) com pistão de metal em velocidade a um motor elétrico. Em cada experimento foram utilizados 20 cérebros, os quais foram homogeneizados de 10 em 10 utilizando 7,0 ml de tampão para cada cérebro. Para evitar a degradação das proteínas, além de utilizar inibidores de proteases, as soluções e o homogeneizado foram preservados em gelo. O tempo para a extração e homogeneização dos 20 cérebros foi de aproximadamente 45 minutos.

O homogeneizado foi colocado em tubos de polietileno e centrifugado a 38.000 x por 40 minutos em uma centrífuga refrigerada a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante (fração S1) foi filtrado em gaze e o precipitado (fração P1) foi descartado (Fluxograma 01).

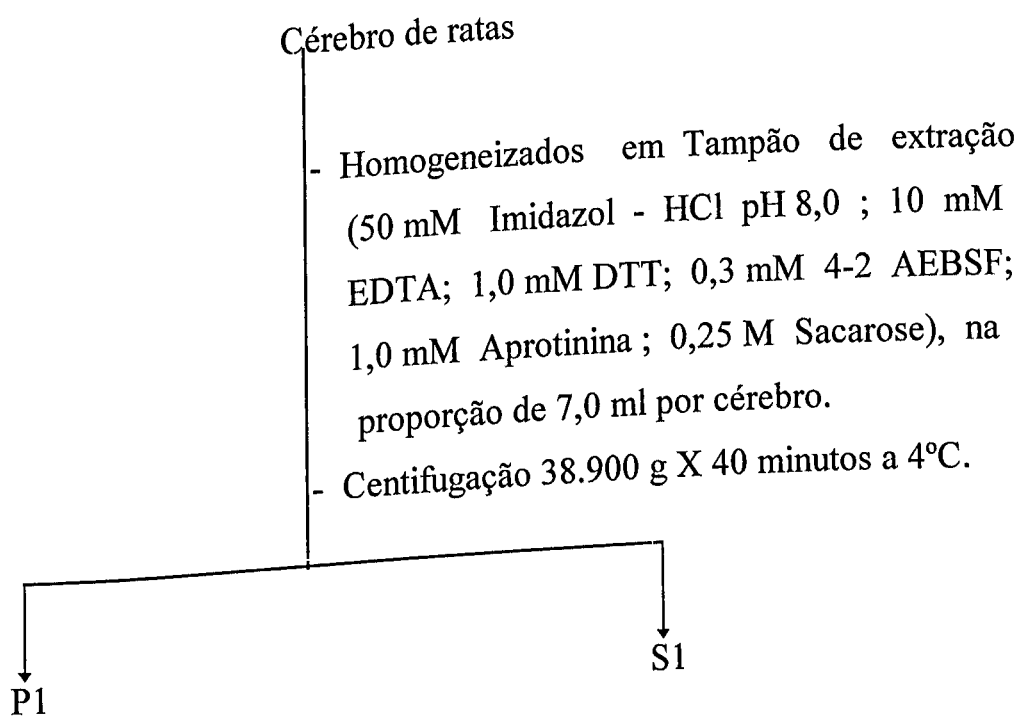
## 4- Resultados

### 4.1- Preparação da fração solúvel de cérebro de rata

Ratas pesando entre 200 e 300 gramas foram sacrificadas por decapitação e seus cérebros extraídos rapidamente e colocados em solução salina gelada. Posteriormente, os cérebros foram homogeneizados em Tampão de Extração (50 mM Imidazol - HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 0,3 mM 4-2 AEBSF; 1,0 mM Aprotinina; 0,25 M Sacarose) usando um homogeneizador (Marconi, modelo TE 102) com pistilo de metal conectado a um motor elétrico. Em cada experimento foram utilizados 20 cérebros, os quais foram homogeneizados de 10 em 10 utilizando 7,0 ml de tampão para cada cérebro. Para evitar a degradação das proteínas, além de utilizar inibidores de proteases, as soluções e o homogeneizado foram preservados em gelo. O tempo para a extração e homogeneização dos 20 cérebros foi de aproximadamente 40 minutos.

O homogeneizado foi colocado em tubos de polietileno e centrifugado a 38.900 g por 40 minutos em uma centrífuga refrigerada a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante (fração S1) foi filtrado em gaze e o precipitado (fração P1) foi descartado (Fluxograma 01).

## Fluxograma 01: Preparação da fração solúvel de cérebro de rata



### 4.1.1-Preparação de ATPase da fração S1 de cérebro de rata

A fração S1 foi aplicada a uma coluna de troca iônica de DEAE-Sepharose (2,9 X 4,9 cm ; de 25 ml), previamente equilibrada com 10 vezes o volume da coluna com Tampão A (50 mM Imidazol - HCl; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM DTT) pH 8,0 utilizando um fluxo de 0,4 ml / minuto. Após aplicar a fração S1, a coluna foi lavada com 30 ml de Tampão A (0,5 ml / minuto). Foi coletado o "Flow Through" e a este foi adicionado lentamente sulfato de amônia com agitação constante e moderada até atingir 35% de saturação. Este "Flow Through" foi centrifugado a 20.300 g por 20 minutos a 4°C, onde se obteve uma fração precipitada (fração P2) que foi ressuspendida em 30 ml de Tampão A (apresenta um aspecto leitoso) e uma fração solúvel (fração S2) de aspecto róseo. As frações P2 e S2 foram dialisadas, separadamente, a 4°C contra 1 litro de Tampão de diálise (50

mM Imidazol - HCl pH 6,8; 0,5 mM EDTA; 1,0 mM 2-mercaptoetanol) durante um período de 16 horas sendo necessários 3 trocas durante este período.

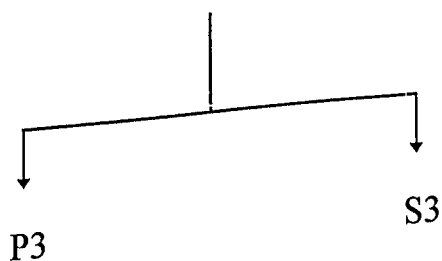
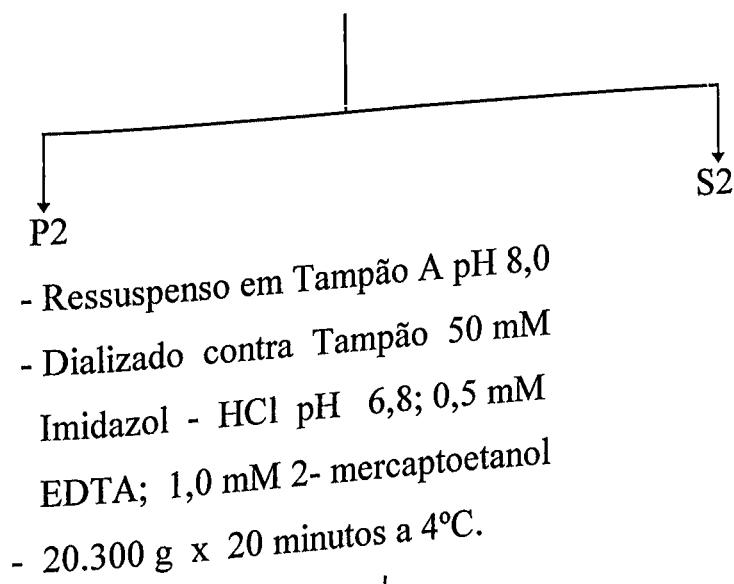
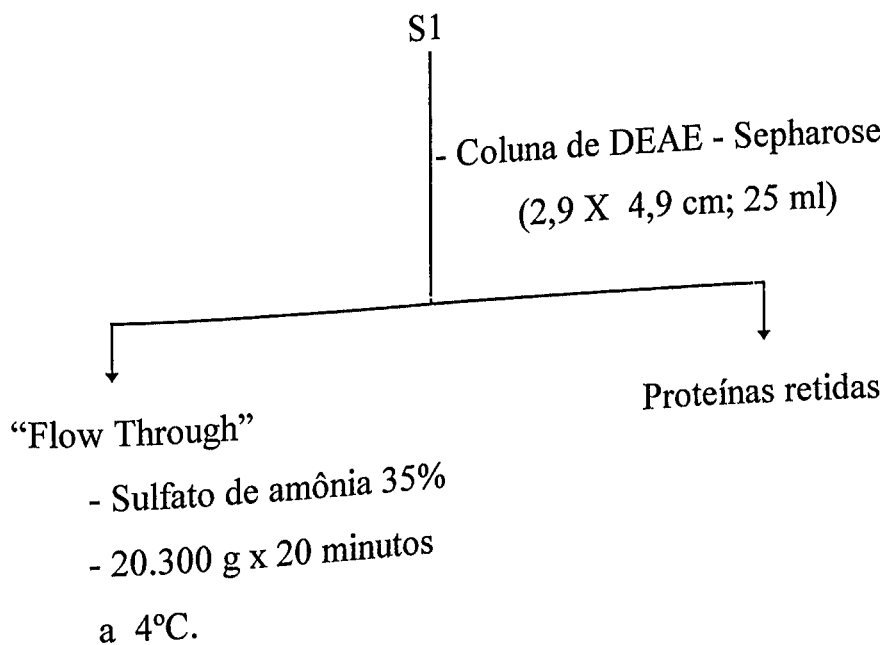
Após a diálise, a fração P2 foi submetida novamente a uma centrifugação com a mesma rotação utilizada no passo anterior, para a obtenção de um novo precipitado, fração P3, e uma nova fração solúvel, fração S3 de mesmo aspecto que P2 (Fluxograma 02).

Observa-se na fração S3 a presença de alguns polipeptídeos principais acima de 205 kDa e em torno de 150; 66; 50 e 40 kDa (Figura 13). Esta fração foi aplicada a uma coluna de Fosfocelulose (1,8 X 6,9 cm; 14 ml), a qual foi previamente equilibrada com 10 vezes o volume da coluna com Tampão A pH 6,8 com um fluxo de 0,4 ml / minuto. Após aplicar a amostra, a coluna foi lavada com 30 ml de Tampão A pH 6,8 (0,5 ml / minuto) monitorando por absorvância a 280 nm. Quando a absorvância atingiu a linha de base, a coluna foi eluída com 50 ml de Tampão B (50 mM Imidazol - HCl pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 0,3 mM AEBSF; 1,0 mM Benzamidina) com um fluxo de 0,4 ml / minuto. Foram coletadas frações de 3,0 ml (Fluxograma 03).

Foram analisadas a atividade MgATPásica e o perfil de polipeptídeos das frações em SDS-PAGE. Posteriormente, algumas frações com atividade MgATPásica foram reunidas (~5 frações) e denominadas de **Fração PC**.

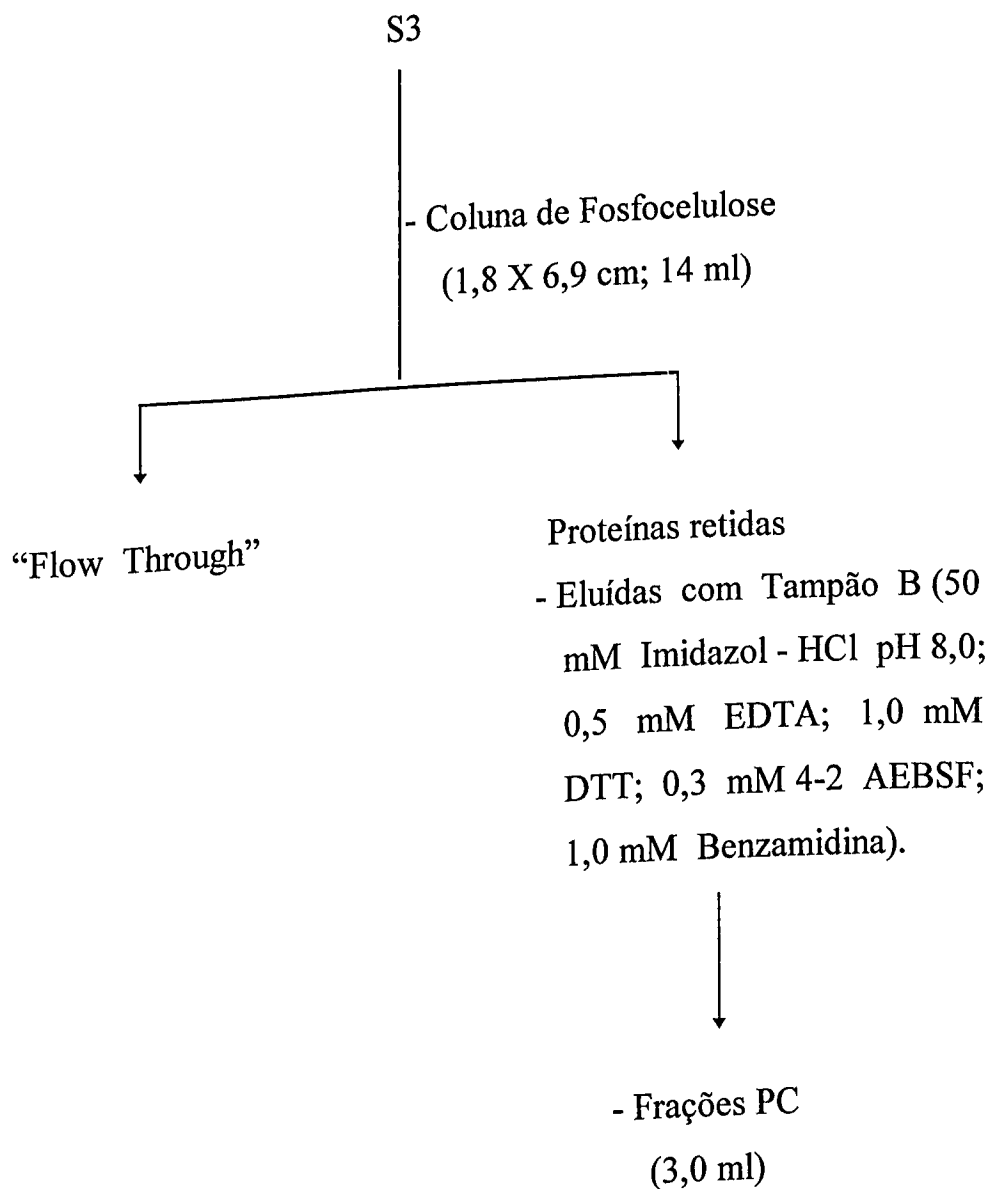
O principal polipeptídeo das frações eluídas da coluna de fosfocelulose e enriquecidas em atividade ATPásica apresentam mobilidade um pouco inferior à cadeia pesada de miosina II. Observa-se também um polipeptídeo de alto peso molecular situado logo acima do polipeptídeo principal e várias bandas de menor peso molecular entre 40 e 60 kDa (Figura 15).

## Fluxograma 02: Preparação de ATPase de cérebro de rata a partir da fração S1





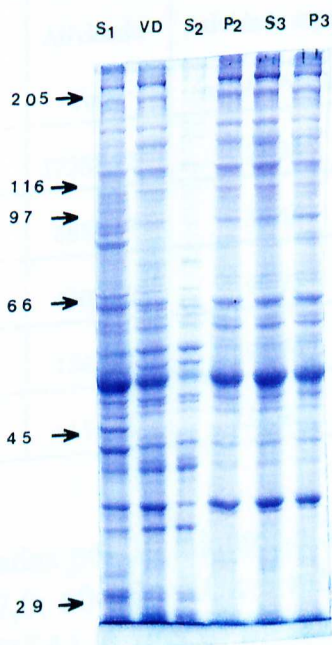
### Fluxograma 03: Fracionamento de S3 em coluna de fosfoceleulose



#### 4.1.2 - Recuperação da atividade ATPásica

A fração S1, obtida pela centrifugação de homogeneizado de cérebro quando aplicada diretamente à coluna de fosfocelulose causava um elevado grau de empacotamento da resina e um arraste de proteínas em seu perfil de eluição. Assim, optamos por aplicar a fração S1 primeiro em uma coluna de DEAE-Sepharose para evitar este empacotamento e, conseqüentemente, melhorar seu perfil cromatográfico. Uma parte das proteínas, aproximadamente 24%, não se ligaram a coluna, ou seja, saíram no "Flow Through", com um índice de purificação de ~ 2 vezes e uma recuperação em torno 23% (Tabela 02). A este "Flow Through" foi adicionado sulfato de amônia 35% e depois foi centrifugado, obtendo uma fração P2 com atividade MgATPásica específica de aproximadamente 4,3 vezes a da fração S1 (Tabela 02). A fração S2 obtida desta centrifugação praticamente era desprovida de atividade MgATPásica. Quando P2 é centrifugado observa-se que sua atividade MgATPásica específica divide-se, com cerca de 50% de sua atividade sendo perdida em P3.

Na eluição da coluna de fosfocelulose observa-se que o pico de proteínas e da atividade ATPásica específica coincidem e estava em torno do quinto tubo (Figura 14). A partir do tubo 11 a atividade ATPásica específica caía sensivelmente. A maior parte das proteínas da fração S3 (90%) e de sua atividade ATPásica saíram no "Flow Through" (Figura 15).

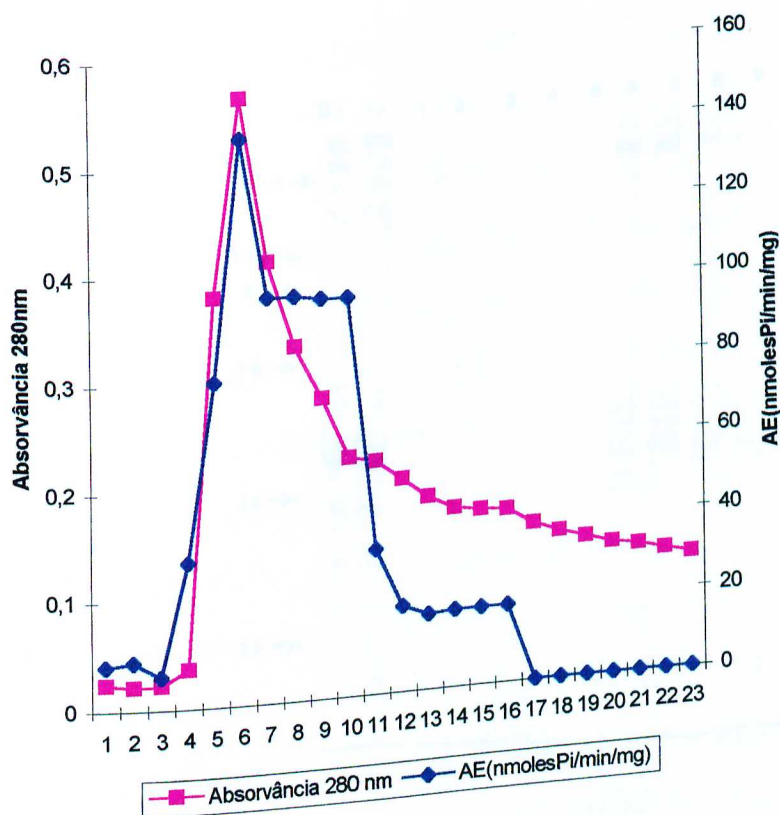


**Figura 13: SDS - PAGE da preparação de ATPase de cérebro de rata**  
 Foram aplicados em gel (10%) 11,31  $\mu\text{g}$  do S1; 10,65  $\mu\text{g}$  do "Flow Through" da coluna de DEAE-Sepharose (VD); 4,58  $\mu\text{g}$  do S2; 7,24  $\mu\text{g}$  do P2; 15,5  $\mu\text{g}$  do S3 e 2,41  $\mu\text{g}$  do P3. O gel foi corado com Coomassie Blue R. À esquerda estão indicados os padrões de peso molecular na ordem decrescente (cadeia pesada de miosina;  $\beta$ -galactosidase, fosforilase B; soroalbumina bovina; ovalbumina e anidrase carbônica) expressos em  $\text{Mr} \times 10^{-3}$ .

**Tabela 02: Purificação de atividade ATPásica de sobrenadante (S1) de cérebro de rata**

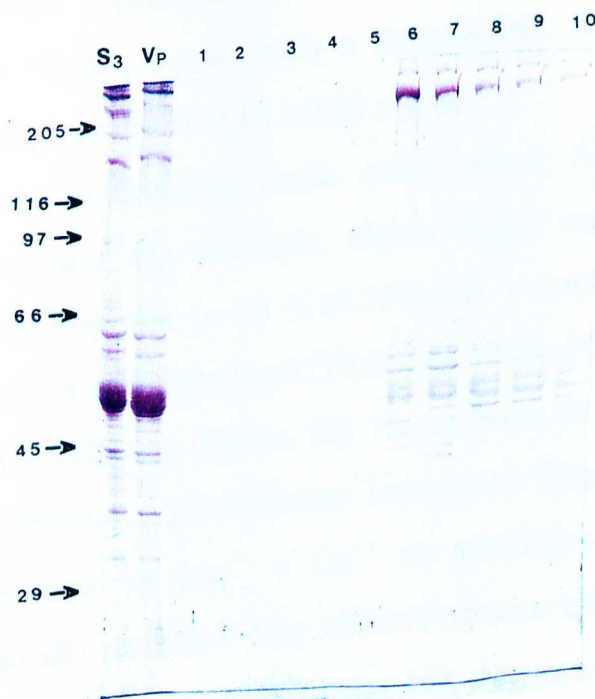
Frações	Proteína Total (mg)	Atividade Total	Atividade específica (nmolesPi/min/mg)	Recuperação (%)	Purificação (X)
S1	792,12	17268,22	21,28	100,0	1,00
Flow Through	187,45	6853,17	36,56	23,0	1,72
P2	42,33	4009,92	90,73	5,0	4,26
S3	19,80	1543,21	94,94	2,5	4,46
Fração PC	1,82	154,03	238,92	0,2	11,23

As frações foram incubadas por 30 minutos a 37°C em meio de reação I (25 mM Imidazol-HCl pH 7,0; 60 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM DTT; 1,0 mM EGTA; 1,0 mM EDTA). A reação foi iniciada pela adição de ATP 1,0 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. Os valores acima são de 01 experimento, sendo encontrado resultados similares em outros experimentos.



**Figura 14: Perfil cromatográfico e atividade ATPásica das frações eluídas da coluna de fosfoceleulose**

Proteínas da fração S3 retidas na coluna de fosfoceleulose em pH 6,8 foram eluídas alterando o pH para 8,0. A eluição foi realizada a temperatura ambiente, monitorada a 280 nm e foram coletadas frações de 3,0 ml. Para a determinação da atividade ATPásica, as frações foram incubadas por 30 minutos a 37°C em meio de reação I (25 mM Imidazol - HCl pH 7,0; 1,0 mM EDTA; 1,0 mM EGTA; 0,2 mM DTT; 60 mM KCl; 5,0 mM MgCl<sub>2</sub>). A reação foi iniciada pela adição de ATP 1,0 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. Estes valores são de 01 experimento sendo que outras preparações mostraram um perfil similar a este. Todas as reações foram realizadas em duplicatas.



**Figura 15: SDS-PAGE do fracionamento de S3 em coluna de Fosfocelulose**

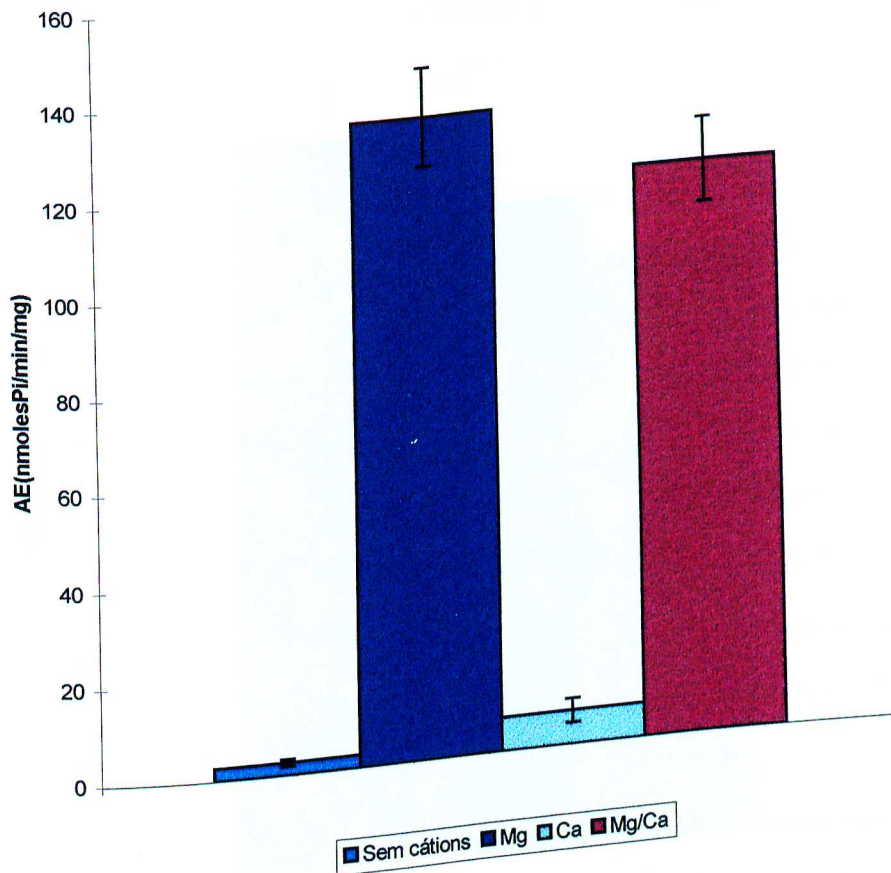
Proteínas da fração S3 retidas na coluna de Fosfocelulose foram eluídas com Tampão B (50 mM Imidazol-HCl pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 0,3 mM 4-2 AEBS; 1,0 mM Benzamidina) e coletadas frações de 3,0 ml. Foram aplicados 4  $\mu$ l da fração S3, 8  $\mu$ l do "Flow Through" da fosfocelulose (VP) e 12  $\mu$ l das frações. O gel foi corado com Coomassie Blue R. À esquerda estão indicados os padrões de peso molecular em ordem decrescente (cadeia pesada de miosina;  $\beta$  galactosidase, fosforilase B; soroalbumina bovina; ovalbumina e anidrase carbônica) expressos em Mr  $\times 10^{-3}$ . No alto estão indicados com números as frações obtidas da coluna de fosfocelulose.

#### 4.2- Efeito de cátions na Atividade ATPásica da fração PC

As frações coletadas da coluna de Fosfocelulose que apresentavam atividade ATPásica específica acima de 100 nmolesPi/min/mg, foram reunidas em um "Pool", constituindo a **Fração PC**. A concentração de proteínas desta fração varia de 0,16 a 0,25 mg/ml.

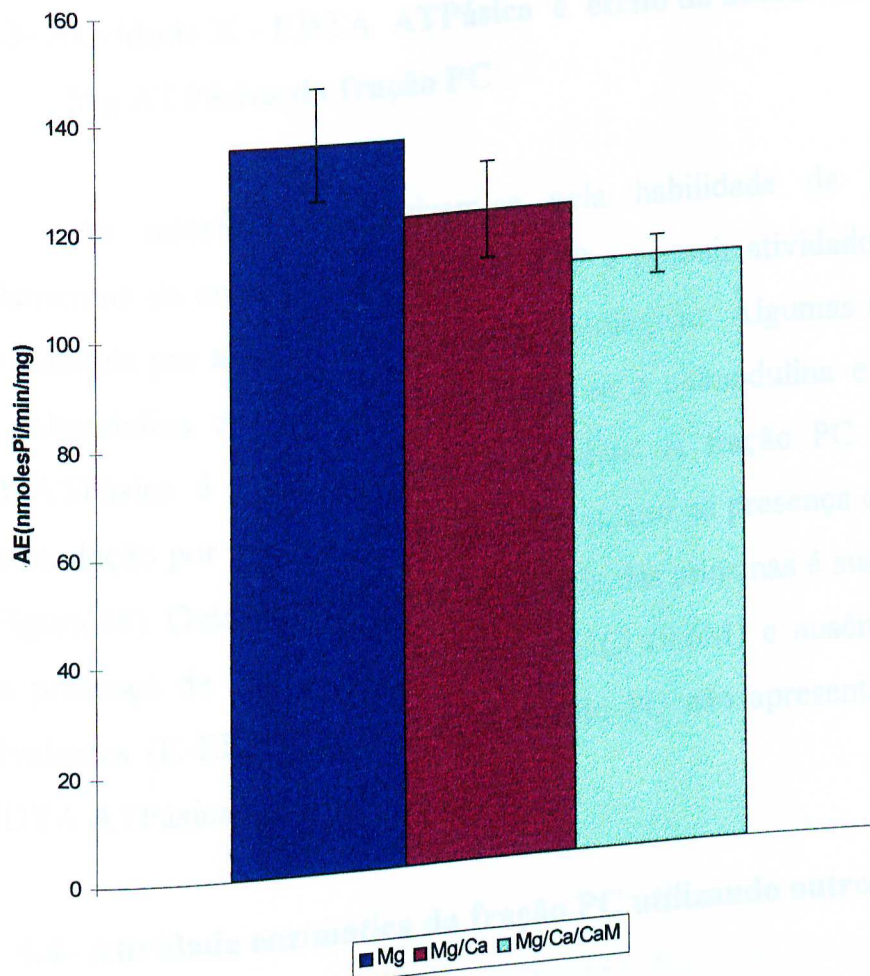
Os motores moleculares, assim como outras ATPases requerem cátions divalentes para sua atividade, alguns destes motores apresentam maior atividade na presença de Ca (CaATPásica) e outros na presença de Mg (MgATPásica). A atividade MgATPásica da fração PC é 20 vezes maior que a atividade CaATPásica (Figura 16). Na ausência de cátions divalentes sua atividade ATPásica é praticamente inexistente (Figura 16) e quando incubada na presença de  $Mg^{++}$  e  $Ca^{++}$  as atividades MgATPásicas e CaATPásicas não são somadas. Não observa-se uma inibição significativa da atividade MgATPásica por  $Ca^{++}$  (Figura 16). Algumas ATPases como a miosina I, V e CaATPase apresentam atividade MgATPásica estimuladas por calmodulina. A atividade MgATPásica da fração PC quando incubada na presença de calmodulina não é estimulada (Figura 17).





**Figura 16: Atividade ATPásica da fração PC é dependente de  $Mg^{++}$**   
 Entre 24 e 47  $\mu g$  da fração PC foram incubadas por 30 minutos a 37°C em meio de reação I (25 mM Imidazol - HCl pH 7,0 ; 5,0 mM  $MgCl_2$ ; 1,0 mM EDTA ; 1,0 mM EGTA; 0,2 mM DTT; 60 mM KCl). Na ausência de cátions é utilizado o mesmo meio de reação I somente aumentando a concentração de EDTA para 5,0 mM e não acrescentar  $MgCl_2$ . A atividade **MgATPase** foi determinada neste meio de reação I e a **CaATPase** acrescentando 3,2 mM de  $CaCl_2$  e sem  $MgCl_2$ . A reação foi iniciada pela adição de ATP 1,0 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. Os valores acima são uma média de 08 experimentos. Todas as reações foram feitas em duplicatas.





**Figura 17: Efeito de calmodulina na atividade MgATPásica da fração PC**

Entre 24 e 47  $\mu\text{g}$  da Fração PC foram incubadas por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  em meio de reação I (25 mM Imidazol - HCl pH 7,0; 0,2 mM DTT; 60 mM KCl; 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1,0 mM EGTA; 1,0 mM EDTA) com a adição de 67,72  $\mu\text{g}$  de calmodulina e 3,2 mM de  $\text{CaCl}_2$  quando indicado na figura. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1,0 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. Os valores acima são uma média de 08 experimentos. Todas as reações foram feitas em duplicatas.

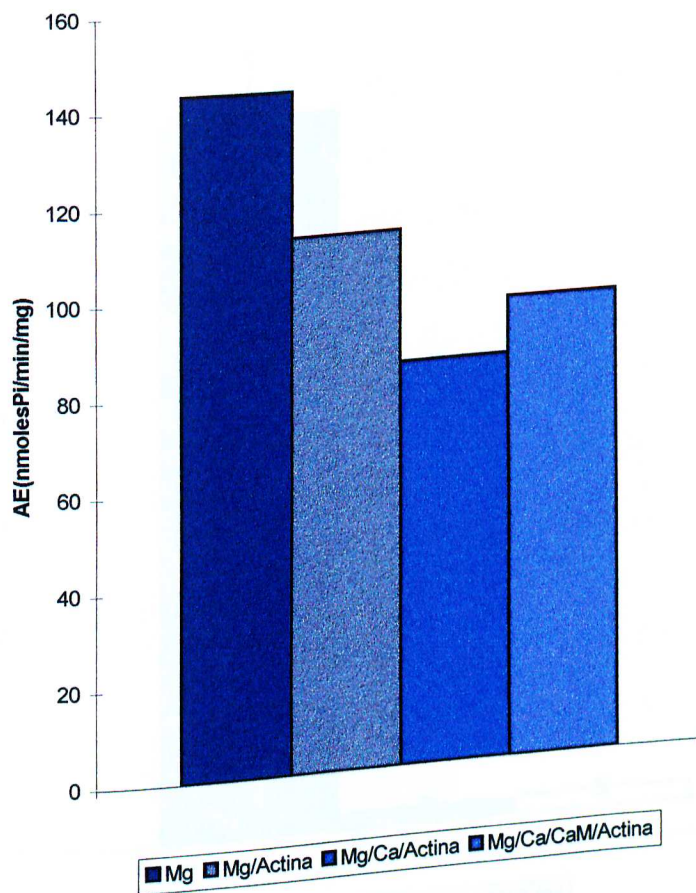
### **4.3- Atividade K - EDTA ATPásica e efeito da actina na Atividade Mg ATPásica da fração PC**

As miosinas caracterizam-se pela habilidade de interagir com filamentos de actina na ausência de ATP e possuir atividade MgATPásica estimulada por actina F sob condições fisiológicas. Algumas miosinas usam a calmodulina como cadeia leve, ligam-se a calmodulina e sua atividade MgATPásica é estimulada por calmodulina. A fração PC não apresenta estimulação por actina tanto na ausência quanto na presença de calmodulina (Figura 18). Outra característica da maioria das miosinas é sua alta atividade na presença de altas concentrações de KCl (0,6M) e ausência de cátions divalentes (K-EDTA ATPásica). A fração PC não apresenta atividade K-EDTA ATPásica (Figura 19).

### **4.4- Atividade enzimática da fração PC utilizando outros substratos**

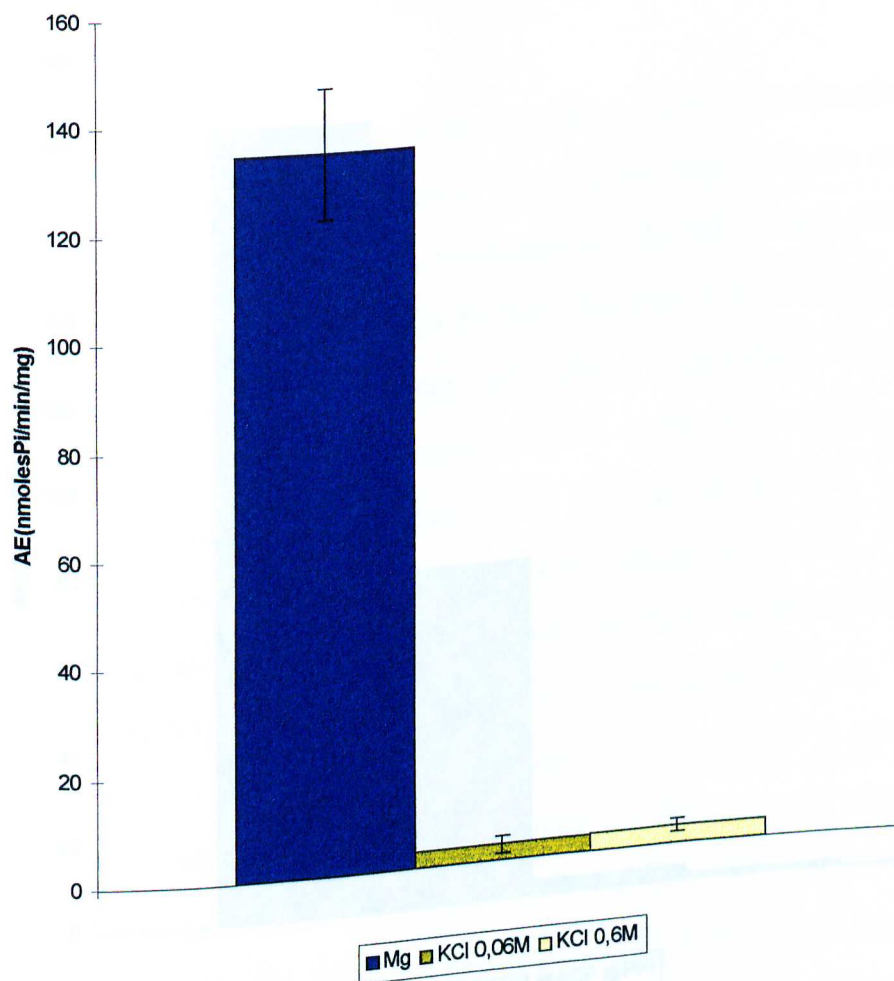
Ao contrário da cinesina e dineína flagelar que preferem utilizar ATP como substrato, a dineína citoplasmática hidrolisa preferencialmente GTP, TTP, UTP, CTP e ITP. Em uma concentração final de 1,0 mM, a fração PC hidrolisa 2,5 vezes mais o ATP do que o GTP (Figura 20).

Diferente das apirases que apresentam como característica enzimática a capacidade de hidrolizar ATP e ADP indistintamente. Foi utilizado o ADP na fração PC com o intuito de verificar se esta proteína possui alguma atividade por apirase e, observou-se que a fração PC não apresenta atividade na presença destes substratos, indicando com isto que não é uma apirase. Também não foi detectada atividade pirofosfatásica (Figura 20).

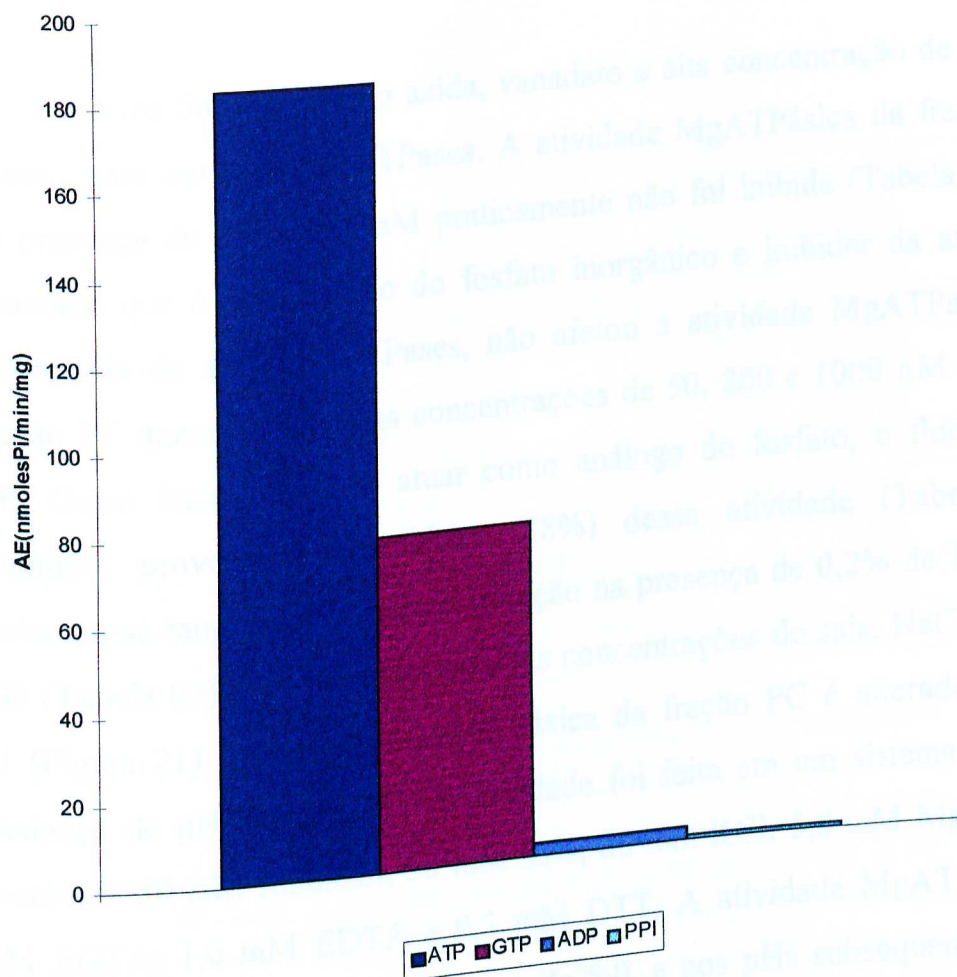


**Figura 18: Efeito da actina, na presença e ausência de calmodulina, na atividade MgATPásica da Fração PC**  
 Entre 24 e 47  $\mu\text{g}$  da fração PC foram incubadas por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  em meio de reação I (25 mM Imidazol - HCl pH 7,0; 60 mM KCl; 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM DTT; 1,0 mM EDTA; 1,0 mM EGTA) e onde indicado acrescentou-se 3,2 mM de  $\text{CaCl}_2$ ; 86  $\mu\text{g}$  de actina e 68  $\mu\text{g}$  de calmodulina. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1,0 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. Os valores são correspondentes a média de 03 experimentos. Todas as reações foram feitas em duplicatas.





**Figura 19: Atividade K - EDTA ATPásica da fração PC**  
 Para as atividades MgATPásica e K-EDTA ATPase foram utilizadas entre 24 e 47  $\mu\text{g}$  da fração PC sendo incubadas por 30 minutos a 37°C. A atividade MgATPásica foi incubada em meio de reação I (25 mM Imidazol - HCl pH 7,0 ; 60 mM KCl; 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$  ; 0,2 mM DTT; 1,0 mM EDTA; 1,0 mM EGTA) e a atividade K - EDTA ATPásica foi incubada em meio de reação II (25 mM Imidazol-HCl pH 8,0; 0,2 mM DTT; 5,0 mM EDTA) e conforme apropriado acrescenta-se 0,06 M ou 0,6 M de KCl. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1,0 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. Os valores acima são uma média de 07 experimentos. Todas as reações foram feitas em duplicatas.



**Figura 20: Atividade enzimática da fração PC frente à outros substratos**  
 Entre 24 e 47  $\mu\text{g}$  da fração PC foram incubadas por 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  em meio de reação I (25 mM Imidazol - HCl pH 7,0; 60 mM HCl; 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM DTT; 1,0 mM EGTA; 1,0 mM EDTA). A reação foi iniciada pela adição dos respectivos substratos (ATP, GTP, ADP e PPI) com uma concentração final de 1,0 mM conforme indicado na figura. A reação foi interrompida com a própria solução de dosagem. Os valores acima representam um experimento sendo que outro experimento mostrou resultados similares. Todas as reações foram feitas em duplicatas.

#### 4.5- Caracterização farmacológica da atividade ATPásica da fração PC

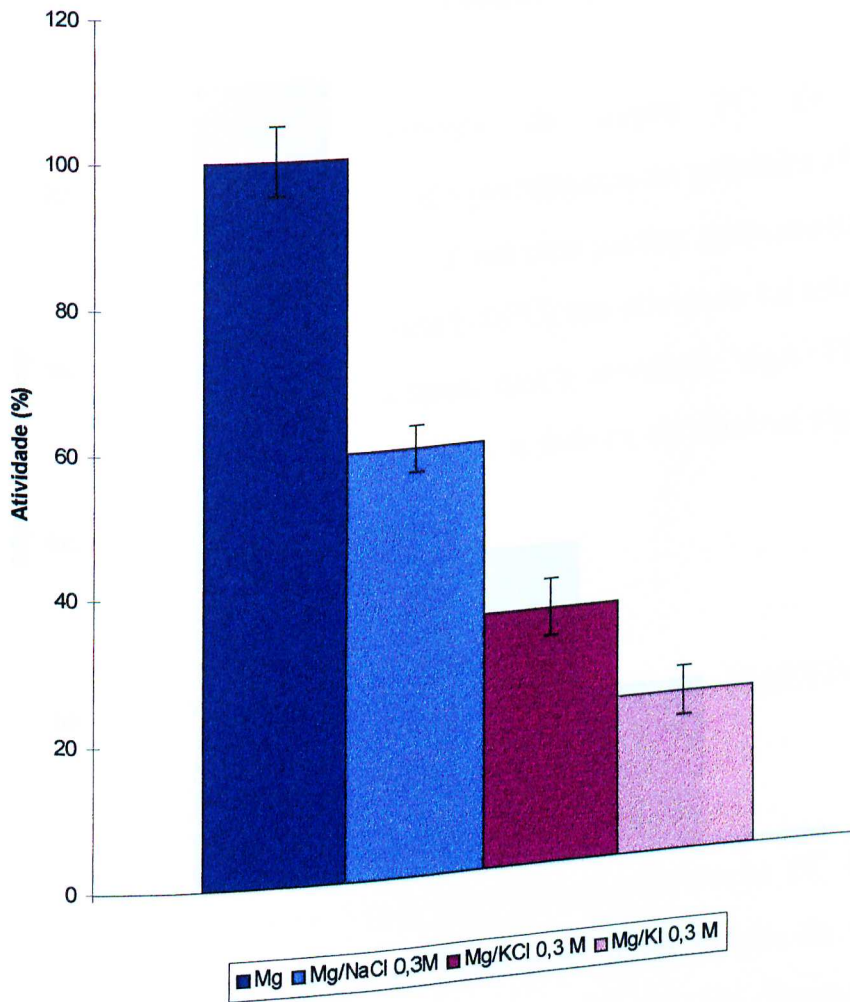
Vários fatores como a azida, vanadato e alta concentração de sal são usados para caracterizar ATPases. A atividade MgATPásica da fração PC na presença de azida 1,0 mM praticamente não foi inibida (Tabela 03). O vanadato que é um análogo do fosfato inorgânico e inibidor da atividade enzimática de algumas ATPases, não afetou a atividade MgATPásica da fração PC quando usado nas concentrações de 50, 200 e 1000  $\mu$ M (Tabela 03). Outro fator que pode atuar como análogo do fosfato, o fluoreto de alumínio, provoca uma inibição (78%) dessa atividade (Tabela 03). Detectou-se também uma grande inibição na presença de 0,2% de Triton X 100 (Tabela 03) e na presença de altas concentrações de sais, NaCl, KCl e KI (Figura 21). A atividade MgATPásica da fração PC é alterada com a mudança de pH (Figura 22). A atividade foi feita em um sistema tampão contendo: 50 mM Imidazol; 50 mM Tris; 60 mM KCl; 5,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,0 mM EGTA; 1,0 mM EDTA e 0,2 mM DTT. A atividade MgATPásica é mais elevada em pH ácido, em torno de 5,0, e nos pHs subsequentes (6,0; 7,0; 8,0 e 9,0) ela cai gradativamente, sendo praticamente nula em pH 9,0 (Figura 22).

**Tabela 03: Resposta da atividade ATPásica da fração PC a efetores e inibidores.**

	Atividade específica em porcentagem
	100 ( 3,56)
Mg	108 (12,85)
Mg/Vanadato (50 $\mu$ M)	113 (15,55)
Mg/Vanadato (200 $\mu$ M)	120 (18,44)
Mg/Vanadato (1,0mM)	95 ( 5,77)
Mg/Azida (1,0mM)	29 ( 7,35)
Mg/Fluoreto (2,5mM)	22 ( 3,48)
Mg/Fluoreto(2,5mM)de alumínio(0,5mM)	21 ( 4,88)
Mg/Alumínio (0,5mM)	23 ( 5,73)
Mg/Triton X 100 (0,2%)	

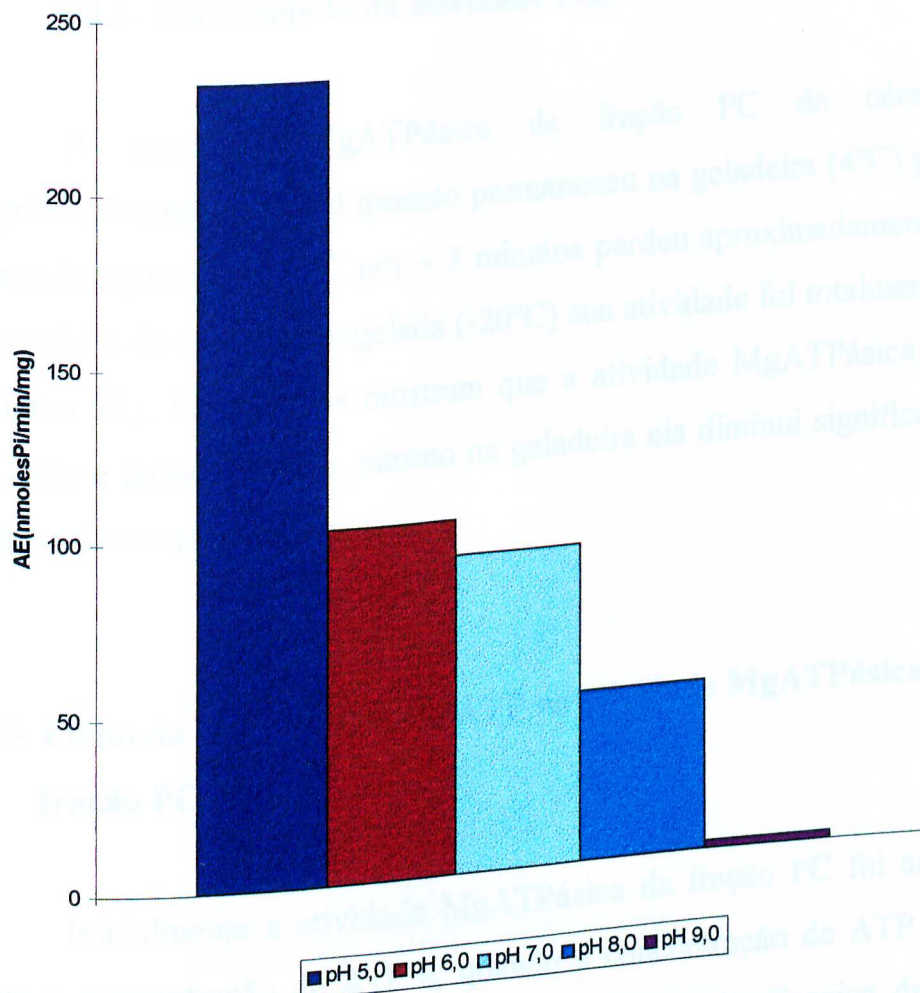
Entre 24 e 47  $\mu$ g da fração PC foram incubadas por 30 minutos a 37°C em meio de reação I (25 mM Imidazol-HCl pH 7,0; 1,0 mM EDTA; 0,2 mM DTT; 5,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 60 mM KCl) e onde indicado foi adicionado os respectivos efetores. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1,0 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. Os valores foram expressos em porcentagem e calculados tomando-se como referencial a atividade Mg - ATPásica (144 nmolesPi/min/mg) como 100%. Os valores acima são correspondentes a média de 06 experimentos. Todas as reações foram feitas em duplicatas. Entre parênteses estão indicados o erros padrão.





**Figura 21 : Efeito de sais na atividade MgATPásica da fração PC**  
 Entre 24 e 47  $\mu\text{g}$  da fração PC foram incubadas por 30 minutos a 37°C em meio de reação I (25 mM Imidazol - HCl pH 7,0; 60 mM KCl; 1,0 mM EDTA; 1,0 mM EGTA; 0,2 mM DTT; 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ) com ou sem adição de 0,3 M de sal conforme indicado na figura. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1,0 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade MgATPásica (135 nmolesPi/min/mg) foi considerada 100%. Os valores são correspondentes a média de 04 experimentos. Todas as reações foram feitas em duplicatas.





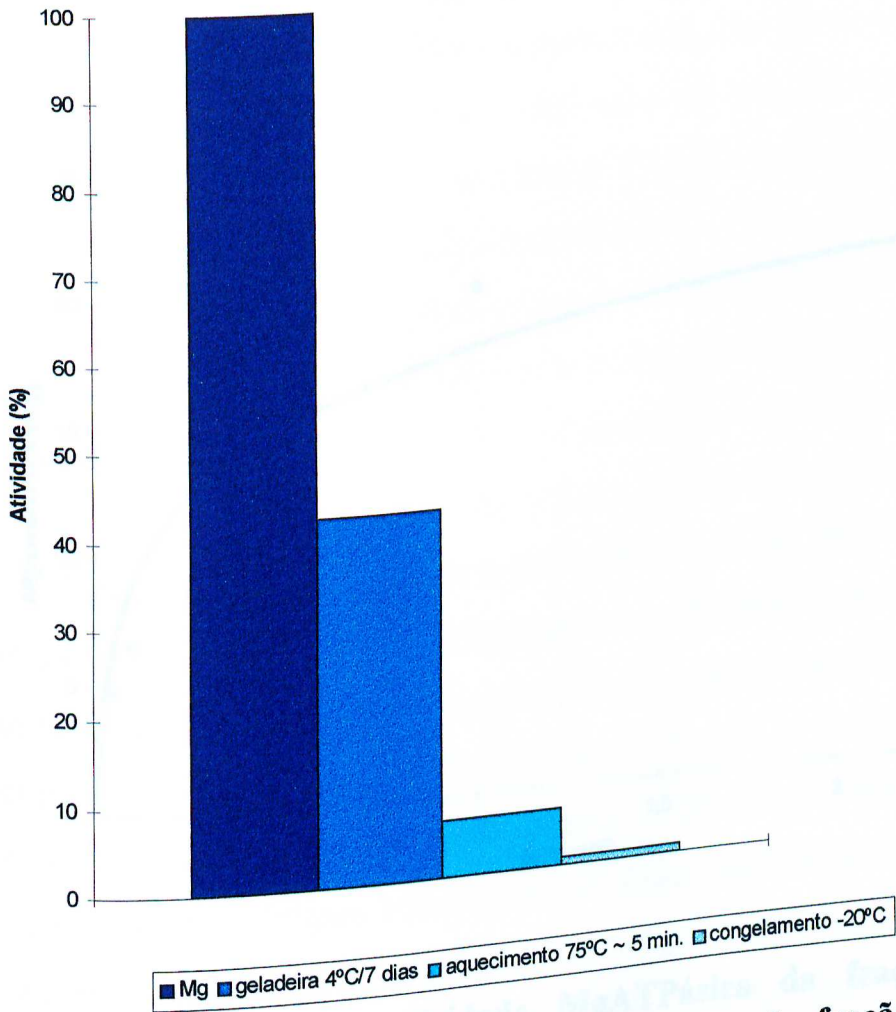
**Figura 22: Variação da atividade MgATPásica da fração PC com o pH**  
 Entre 24 e 47  $\mu\text{g}$  da fração PC foram incubadas por 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  em meio de reação (50 mM Imidazol; 50 mM Tris; 60 mM KCl; 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1,0 mM EDTA; 1,0 mM EGTA; 0,2 mM DTT) e os pHs indicados na figura foram acertados com HCl. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1,0 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. Os valores são de um experimento sendo que outro experimento mostrou resultados similares. Todas as reações foram feitas em duplicatas.

#### **4.6- Estabilidade da atividade MgATPásica da fração PC**

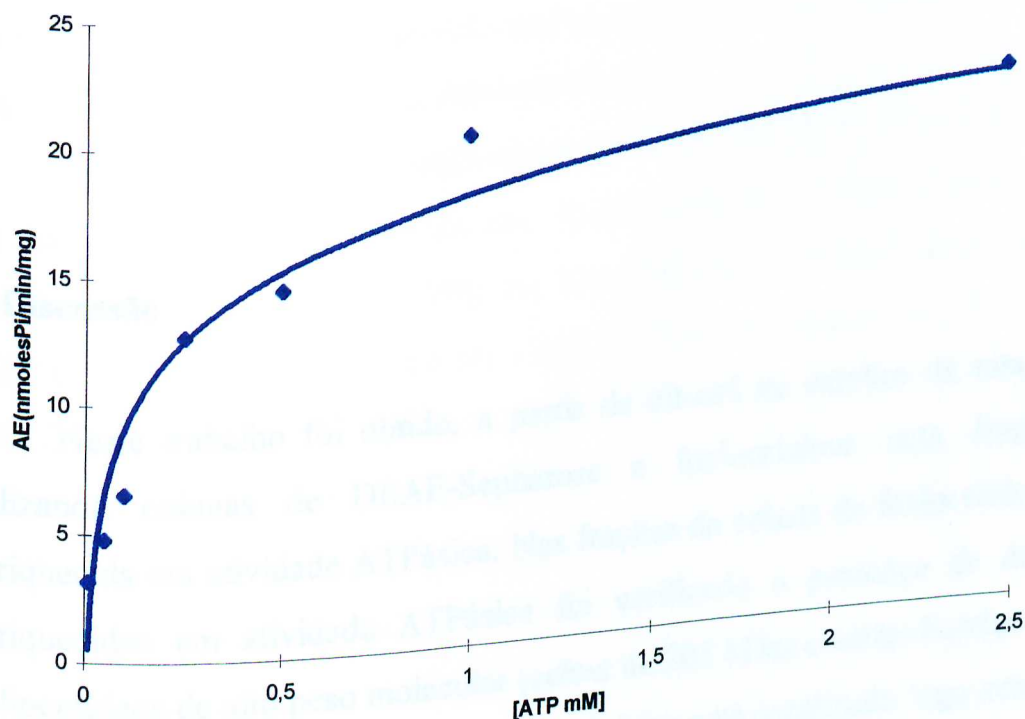
A atividade MgATPásica da fração PC de cérebro caiu significativamente (58%) quando permaneceu na geladeira (4°C) por 7 dias. Quando aquecida a 75°C por ~ 5 minutos perdeu aproximadamente 93% de sua atividade e ao ser congelada (-20°C) sua atividade foi totalmente perdida (Figura 23). Estes dados mostram que a atividade MgATPásica da fração PC não é termoestável e, mesmo na geladeira ela diminui significativamente com o decorrer do tempo.

#### **4.7- Efeito da concentração de ATP na atividade MgATPásica da fração PC**

Inicialmente a atividade MgATPásica da fração PC foi aumentando com a concentração de ATP e, quando a concentração de ATP atinge 1,0 mM iniciava-se um platô de saturação (Figura 24). Ensaios da atividade ATPásica da fração PC foram feitos nesta concentração (1,0 mM), que corresponde ao início do ponto de saturação.



**Figura 23: Estabilidade da atividade MgATPásica da fração PC**  
 Entre 24 e 47  $\mu\text{g}$  da fração PC foram incubadas por 10 minutos a 37°C em meio de reação I (25 mM Imidazol - HCl pH 7,0; 60 mM KCl; 1,0 mM EDTA; 1,0 mM EGTA; 0,2 mM DTT; 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ). A reação foi iniciada pela adição de ATP 1,0 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade MgATPásica (142 nmoles Pi/min/mg) foi considerada 100%. Os valores são de 01 experimento. Todas as reações foram feitas em duplicatas.



**Figura 24: Curva da atividade MgATPásica da fração PC X**  
**concentração de ATP**  
 Entre 24 e 47  $\mu\text{g}$  da fração PC foram incubadas por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$  em meio de reação I (25 mM Imidazol-HCl pH 7,0; 60 mM KCl; 1,0 mM EDTA; 1,0 mM EGTA; 0,2 mM DTT; 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ). A reação foi iniciada pela adição de ATP nas diversas concentrações indicadas na figura e interrompida com a própria solução de dosagem. Os valores são de 01 experimento, outra preparação apresentou resultados similar. Todas as reações foram feitas em duplicatas.

## 5- Discussão

Neste trabalho foi obtido, a partir de citosol de cérebro de rata e utilizando colunas de DEAE-Sepharose e fosfocelulose uma fração enriquecida em atividade ATPásica. Nas frações da coluna de fosfocelulose enriquecidas em atividade ATPásica foi verificado a presença de dois polipeptídeos de alto peso molecular (acima de 205 kDa) e várias bandas de menor intensidade (Figura 15). O principal deles está localizado logo acima da cadeia pesada de miosina II.

Na ausência de cátions divalentes a atividade ATPásica da fração PC é praticamente nula. A atividade MgATPásica da fração PC é 20 vezes maior que a atividade CaATPásica (Figura 16), diferente das miosinas convencionais de um modo geral que apresentam baixa atividade MgATPásica, (Pollard, 1982) e uma elevada atividade CaATPásica (figura 16). A atividade enzimática da fração PC é fortemente inibida (40 a 80%) na presença de sais (NaCl; KCl e KI 0,3M) (Figura 21). A atividade MgATPásica não resiste a alta temperatura e nem ao congelamento. E mesmo na geladeira ela diminui com o decorrer do tempo (Figura 23). A fração PC apresentou uma atividade MgATPásica mais elevada em pH ácido (pH 5,0). À medida que aumentamos o pH (6,0; 7,0 e 8,0) a sua atividade diminuía gradativamente sendo praticamente zero em pH 9,0

(Figura 22). Esta é uma característica divergente das ATPases de modo geral pois o pH ótimo para elas atuarem é em torno de 7,0. Como esta fração possui sua atividade ótima em meio ácido e os ensaios de atividade MgATPásica da fração PC foram realizados em pH 7,0, os valores de atividade específica estão sub-valorizados. Este fato pode explicar o baixo grau de purificação da ATPase da fração PC.

A fração PC hidrolisa preferencialmente o ATP (Figura 20), diferente da fração isolada de cérebro de rato (Coelho, 1988) e fração isolada de testículo de coelho (Patussi, 1996) que hidrolisam cerca de 2 a 3 vezes mais GTP do que ATP. A atividade MgATPásica é inibida na presença de sais (NaCl; KCl e KI 0,3M), diferente dessas ATPases que possuem atividade basal estimulada em cerca de 3 vezes em concentrações de 250 mM de NaCl e KCl (Coelho, 1988) ou não apresenta resposta na presença de alta concentração de KCl ou NaCl 0,3M (Patussi, 1996).

A atividade enzimática da fração PC não é inibida por vanadato (Tabela 02), ao contrário da fração isolada de testículo (Patussi, 1996) e de cérebro (Coelho, 1988) que são inibidas por este análogo do fosfato. Contrário do observado na fração PC, onde o Triton X 100 (0,2%) apresentou uma forte inibição da atividade MgATPásica (Tabela 03), a de testículo (Patussi, 1996) não alterou significativamente sua atividade. A fração PC diferencia-se da fração isolada de testículo (Patussi, 1996) por não ser estável com o decorrer do tempo (Figura 23), sendo esta caracterizada por apresentar uma certa estabilidade a baixa temperatura.

Diferente das miosinas de um modo geral que caracterizam-se por interagir com filamentos de actina na ausência de ATP e possuir atividade MgATPásica estimulada pela actina F (Warrick & Spudich, 1987; Cheney et al, 1993; Goodson & Spudich, 1993), a atividade MgATPásica da fração PC não é estimulada na presença de actina (Figura 18). Diferente da maioria das miosinas como a miosina II de cérebro que possui alta atividade em meio



desprovido de cátions divalentes e contendo altas concentrações de  $K^+$  (Pollard, 1982), a fração PC não apresenta atividade K-EDTA ATPásica (Figura 19). A atividade MgATPásica da fração PC não é estimulada por calmodulina (Figura 17), diferente de algumas miosinas como a miosina I e miosina V que usam a calmodulina como cadeia leve e cuja atividade é estimulada por  $Ca^{++}/CaM$  (Espíndola et al, 1992).

Diferente de cinesina, que na ausência de microtúbulos possui sua atividade CaATPásica bem maior que a atividade MgATPásica (Kuznetsov & Gelfand, 1986), a fração PC apresenta atividade MgATPásica bem superior a atividade CaATPásica (Figura 16). Em relação ao efeito de efetores, a cinesina também comporta-se de uma forma diferente, pois esta necessita de concentrações micromolares (50 a 60  $\mu M$ ) de vanadato para inibir 50 % de sua atividade MgATPásica (Shpetner et al, 1988; Cohn et al, 1987; Collins & Vallee, 1989; revisão Vallee & Shpetner, 1990). A atividade enzimática da fração PC em concentrações de até 1,0 mM de vanadato não é inibida (Tabela 03).

A fração PC difere-se da dineína citoplasmática pois esta hidrolisa melhor outros substratos como o CTP, GTP, UTP, ITP e TTP ao invés do ATP (Sheptner et al, 1988; Collins & Vallee, 1989), algumas também possuem sua atividade MgATPásica estimulada por Triton X 100 (0,2%) (Sheptner et al, 1988), e outras com pequenas concentrações de vanadato (5 a 10  $\mu M$ ) podem inibir 50% a atividade ATPásica da dineína (Shpetner et al, 1988).

As apirases, enzimas envolvidas na neurotransmissão, hidrolizam indistintamente o ATP e o ADP e são inibidas por azida (Komoszynski & Wojtczak, 1996). A enzima da fração PC hidroliza preferencialmente o ATP e não é inibida por azida (Figura 20).

A fração PC foi aplicada a uma coluna de CM-Sepharose com uma separação parcial dos polipeptídeos de alto peso molecular. Em análises

preliminares, observou-se que a atividade ATPásica co-purifica com a banda de alto peso molecular, que aparece em menor intensidade no gel (Cunha, comunicação pessoal, 1997). Contudo, é necessário que se façam mais experimentos para a confirmação destes dados. Esta fração também foi analisada em ensaios de imunoblot mostrando que o polipeptídeo principal situado logo acima de miosina II é fodrina; demonstrando com isto que esta banda não é a responsável pela atividade ATPásica da fração PC (Freitas, 1997).



## 6- Conclusão

- 1) Obteve-se uma fração enriquecida em atividade MgATPásica utilizando coluna de fosfocelulose. Esta fração apresenta um polipeptídeo principal situado logo acima da cadeia pesada de miosina II e outro logo acima deste, bem como alguns polipeptídeos de menor peso molecular entre 50 e 60 kDa.
- 2) A ATPase isolada aqui apresenta propriedades distintas das enzimas da fração isolada de cérebro (Coelho, 1988) e fração isolada de testículo (Patussi, 1996).
- 3) A ATPase isolada aqui apresenta propriedades distintas das várias ATPases descritas na literatura como: miosina, cinesina, dineína, CaATPase e F<sub>1</sub> ATPase de mitocôndria.

## 7- Resumo

Neste trabalho foi purificado e caracterizado parcialmente uma ATPase de cérebro de rata utilizando colunas de DEAE-Sepharose e fosfocelulose. Os cérebros foram homogeneizados em Tampão Imidazol pH 8,0 e centrifugados, a 4°C, a 38.900 g X 40 minutos. O sobrenadante foi aplicado à uma coluna de DEAE-Sepharose e, ao "Flow Through" coletado foi adicionado sulfato de amônia em pó até atingir 35% de saturação. Após centrifugação, o sobrenadante obtido é aplicado em coluna de fosfocelulose em pH 6,8 e proteínas retidas foram eluídas alterando o pH para 8,0. As frações eluídas desta coluna apresentam polipeptídeos acima da cadeia pesada de miosina II e alguns polipeptídeos de menor peso molecular entre 50 e 60 kDa.

A fração enriquecida em atividade ATPásica possui as seguintes características: 1) Na concentração de 1,0 mM de substrato a atividade ATPásica é 2,5 vezes maior do que a atividade GTPásica; 2) Atividade MgATPásica é 20 vezes maior do que a atividade CaATPásica e não é sensível a  $Ca^{++}$  e  $Ca^{++}/CaM$ ; 3) Não apresentou estimulação por actina e não foi detectado atividade K-EDTA ATPásica; 4) É inibida na presença de altas concentrações de sais (NaCl, KCl e KI 0,3 M), fluoreto de alumínio e

Triton X 100 0,2%; 5) Não é inibida pela azida e pelo vanadato; 6) A atividade é maior em pH ácido (pH 5,0).

## 8- Summary

In this work was purified and partially characterized a rat brain ATPase by using a phosphocellulose column. The brains were homogenized in 50 mM Imidazole pH 8,0 and centrifuged, 4°C, by 38.900 g for 40 minuts. The supernatant was loaded in DEAE-Sepharose column and, to the collect "Flow Through" was added amonium sulphate in powdered until it achieved sature of 35%. After centrifuged, the supernatant obtained was loaded in a phosphocellulose column in pH 6,8 and bound protein were eluated changing the pH to 8,0. The eluated fractions this column present polypeptides above heavy chain of myosin II and few polypeptides from minor molecular weight among 50 and 60 kDa.

The fraction containing ATPase activity presents the following properties: 1) In concentration of 1,0 mM the substrate the ATPase activity was 2,5 more than the activity GTPase; 2) MgATPase activity was 20 more than the activity CaATPase and is not sensitive to a  $Ca^{++}$  and  $Ca^{++}/CaM$ ; 3) It did not present stimulation to actin and it was not detected K-EDTA ATPase activity; 4) It is inhibited in the presence of great salt concentrations (0,3 M NaCl; KCl and KI), aluminium fluorete and 0,2% Triton X 100; 5) It is not inhibited by azide and by vanadate; 6) The activity is better in acid pH (pH 5,0).

### 9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTVINLI, S. (Review) Cytoskeleton, Microtubules, Tubulin and Colchicine: *Cytol.*, 52: 189 - 198, 1987.
- BACKER, B . S . Paternal loss (pal): a meiotic mutant in *Drosophila melanogaster* causing loss of paternal chromosomes. *Genetics.*, 80: 267 - 296, 1975.
- BAMBURG, J . R . & BERNSTEIN , B . W . Actin and actin - binding proteins in neurons. *The Neur. Cytoskeleton*, Wiley Liss Inc., 121 - 159, 1990.
- BLOCK, S . M . Nanometres and piconewtons: the macromolecular mechanics of kinesin. *Trends Cell Biol.*, 5: 169 - 175, 1995.
- BLOOM, G . S ., WAGNER, M . C ., PFISTER, K. K ., BRADY, S . T . Native structure and physical properties of brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. *Biochem.*, 27: 3409 - 3416, 1988.

- BRADFORD, M . M . A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 - 254, 1976.
- BRADY, S . T . A novel brain ATPase with properties expected for a fast axonal transport motor. *Nature*, 317: 73 - 75, 1985.
- BRADY, S . T . Molecular motors in the nervous system. *Neuron.*, 7: 521 - 533, 1991.
- CARPENTER, A . T . C . A meiotic mutant defective in distributive disjunction in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 73: 393 - 428, 1973.
- CARRAWAY, K. L.; & CARRAWAY, C. A . C . (Review) Membrane - cytoskeleton interactions in animal cells. *Bioch. et Biophys. Acta.*, 988: 147 - 171, 1989.
- CASSIMERIS, L . U . , WALKER, R . A . , PRYER, N . K . , SALMON, E . D . Dynamic instability of microtubules. *BioEssays*, 7: 149 - 154, 1987.
- CHENEY, R . E . , O'SHEA, M . K . , HEUSER, J . E . , COELHO, M . V . , WOLENSKI, J . S . , ESPREÁFICO, E . M . , FORSCHER, P . , LARSON, R . E . , MOOSEKER, M . S . Brain myosin - V is a two - headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* , 75: 13 - 23, 1993.

- CHENEY, R. E . & MOOSEKER, M . S . Unconventional myosins. **Curr. Op. Cell Biol.**, 4: 27 - 35, 1992.
- CLARKE, M . & SPUDICH, J . A . Nonmuscle contractile proteins: The role of Actin and Myosin in cell Motility and Shape determination. **Ann. Review Biochemistry**, 46: 797 - 822, 1977.
- COELHO, M . V . Regulação de ATPase e proteína-quinase por Ca / Calmodulina em citosol de cérebro de rato, Dissertação de Mestrado FMRP - USP. 1988.
- COHN, S . A .; INGOLD, A . L ., SCHOLEY, J . M . Correlation between the ATPase and microtubule translocating activities of sea urchin egg kinesin. **Nature**, 328: 160 - 163, 1987.
- COLE, D . G ., SAXTON, W . M ., SHEEHAN, K . B ., SCHOLEY, J . M . A "Slow" homotetrameric kinesin - related motor protein purified from *Drosophila* embryos. **Amer. Soc. Bioch. Mol. Biol.**, 269: 22913 - 22916, 1994.
- COLE, D . G . & SCHOLEY, J . M . (Review) Structural variations among the kinesins. **Trends Cell Biol.**, 5: 259 - 267, 1995.
- COLLINS, C . A . & VALLEE, R . B . Preparation of microtubules from rat liver and testis: cytoplasmatic dynein is a major microtubule associated protein. **Cell Motil. Cytoskeleton**, 14: 491 - 500, 1989.

- 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 - 14135, 1984.
- CORTHÉSY-THEULAZ, I ., PAULOIN, A ., PFEFFER, S . R . Cytoplasmic dynein participates in centrosomal localization of the Golgi complex. **J. Cell Biol.** 118: 1333 - 1345, 1992.
- ENDOWS . A . & TITUS, M . A . Genetic approaches to molecular molecular motors. **Annual Reviews Inc.**, 8: 29 - 65, 1992.
- 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 - 1027, 1990.
- ESHEL, D ., URRESTARAZU, L . A ., VISSERS, S ., JAUNIAUX, J . C ., VAN VLIET-REEDIJK, J . C ., PLANTA, R . J ., GIBBONS, I . R . Cytoplasmatic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90: 11172 - 11176, 1993.
- ESPÍNDOLA, F . S ., ESPREÁFICO, E . M ., COELHO, M . V ., MARTINS, A . R ., COSTA, F . R . C ., MOOSEKER, M . S ., LARSON, R . E . Biochemical and immunological Characterization of p190 - calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin - binding myosin. **J. Cell. Biol.**, 118: 359 - 368, 1992.



- ESPREÁFICO, E . M ., CHENEY, R . E ., MATTEOLI, M ., NASCIMENTO, A . A . C ., CAMILLI, P . V . D ., LARSON, R . E ., MOOSEKER, M . S . Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin - V (p190), na unconventional myosin with calmodulin light chains. **J. Cell. Biol.**, 119: 1541 - 1557, 1992.
- FATH, K . R . & LASEK, R . J . Two classes of actin microfilaments are associated with inner cytoskeleton of axons. **J. Cell Biol.**, 107: 613 - 621, 1988.
- FREITAS, P . M . Caracterização parcial dos polipeptídeos de uma fração ATPase isolada de cérebro de rato, Dissertação de Mestrado apresentada no Curso de Pós - Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 1997.
- FUKUI, Y. Toward a new concept of cell motility: cytoskeletal dynamics in amoeboid movement and cell division. **Int. Rev. Citol.**, 144: 85 - 127, 1993 a .
- FUKUI, Y. Composition, organization and function of the motor systems of free - living *Dictyostelium* amoeba. **Acta. Protozool.**, 32: 201 - 210, 1993 b .
- GIBBONS, I . R . Chemical dissection of the cilia. **Arch. Biol.**, 76: 317 - 352, 1965.

- GIBBONS, I . R . . Cilia and flagella of eucaryotes. **J. Cell Biol.**, 91: 107s - 24s, 1981.
- GIBBONS, I . R . ., COSSON, M . P . ., EVANS, J . A . ., GIBBONS, B . H . ., HOUCK, B . ., MARTINSON, K . H . ., SALE, W . S . ., TANG, W-J, Y. Potent inhibition of dynein adenosinetriphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 75: 2220 - 2224, 1978.
- GOLDMAN, R . ., POLLARD, T . ., ROSENBAUM, J . . Cold spring Harbor conferences on Cell proliferation. **Cell Motility**, 3: Cold spring Harbor, NY. 1976.
- GOLDSTEIN, L . S . B . . (Review) The kinesin superfamily: Tails of functional redundancy. **Trends Cell Biol.**, 1: 93 - 98, 1991.
- GOODSON, H . V . . & SPUDICH, J . A . . Molecular evolution of the myosin family: Relationships derived from comparision of amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90: 659 - 663, 1993.
- GOPALAKRISHNA, R . . & ANDERSON, W . . Ca - induced hidrophobic site on Calmodulin: application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. **Biochem. Biophys. Res. Commum.**, 104: 830 - 836, 1982.
- HAGAN, I . . & YAMAGIDA, M . . Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7<sup>+</sup>* gene. **Nature**, 347: 563 - 566, 1990.

- HAIMO, L . T . Regulation of kinesin - directed movements. Review  
**Trends Cell Biol.**, 5: 165 - 168, 1995.
- HAMMER III, J . A . Novel myosins. **Trends Cell Biol.**, 1: 50 - 56, 1991.
- HASSON, T . & MOOSEKER, M . S . Molecular motors, membrane  
movements and physiology: emerging roles for myosins. **Curr. Opin.  
Cell Biol.** 7: 587 - 594, 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 - 317, 1981.
- HENNESSEY, E . S ., DRUMMOND, D . R ., SPARROW, J . C .  
Molecular genetics of actin function. **Biochem. J.**, 282: 657 - 671, 1993.
- HIROKAWA, N ., PFISTER, K . K ., YORIFUJI, H ., WAGNER, M . C .,  
BRADY, S . T ., BLOOM, G . S . Submolecular domains of bovine  
kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody  
decoration. **Cell**, 56: 867 - 878, 1989.
- HIROKAWA, N ., SHIOMURA, Y ., OKABE, S . Tau proteins: the  
molecular structure and mode of binding on microtubules. **J. Cell Biol.**,  
107: 1449 - 1459, 1988.

- HOLZBAUR, E . L . F . & VALLEE, R . B . Dyneins: Molecular structure and cellular function. **Annu. Rev. Cell Biol.**, 10: 339 - 372, 1994.
- JOHNSTON, G . C ., PRENDERGAST, J . A ., SINGER, R . A . The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. **J. Cell Biology**, 113: 539 - 551, 1991.
- KABSCH, W . & VANDERKERCKHOVE, J . Structure and function of actin. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, 21: 49 - 76, 1992.
- KOMOSZYNSKI, M . & WOJTCZAK, A . Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. **Bioch. et Biophys. Acta.**, 1310: 233 - 241, 1996.
- KOONCE, M . P ., GRISSOM, P . M ., McINTOSH, J . R . Dynein from *Dictyostelium*: Primary structure comparisons between a cytoplasmic motor enzyme and flagellar dynein. **J. Cell Biol.**, 119: 1597 - 1604, 1992.
- KORN, E . D . Biochemistry of actomyosin - dependent cell motility (a review). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 75: 588 - 599, 1978.
- KORN, E . D . & HAMMER, J . A . III. (Review) Myosin of nonmuscle cells. **Annu. Rev. Biophys. Chem.**, 17: 23 - 45, 1988.
- KUZNETSOV, S . A . & GELFAND, V . I . Bovine brain kinesin is a microtubule - activated ATPase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 83: 8530 - 8534, 1986.

- KUZNETSOV, S . A ., VAISBERG, E . A ., SHANINA, N . A ., MAGRETOVA, N . N ., CHERNYAK, V . Y ., GELFAND, V . I . The quaternary structure of bovine brain kinesin. **EMBO J.**,7: 353 - 356, 1988.
- LAEMMLI, U . K . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophago T4. **Nature**, 227: 680 - 685, 1970.
- LARSON, R . E . Myosin - V: a class of unconventional molecular motors. **Braz. J . Med. And Biol. Research**, 29: 309 - 318, 1996.
- LARSON, R . E ., ESPÍNDOLA, F . S ., ESPREÁFICO, E. M . Calmodulin - binding proteins and calcium/calmodulin regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. **J. Neurochem.**, 54: 1288 - 1294, 1990.
- LARSON, R . E ., FERRO, J . A ., QUEIROZ, E . A . Isolation and purification of actomyosin ATPase from mammalian brain. **J. Neuros. Meth.**, 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 - 217, 1988.
- LINS, S . X . H . & COLLINS, C . A . Immunolocalization of cytoplasmatic dynein to lysosomes in cultured cells. **J. Cell Sci.**, 101: 125 - 137, 1992.

- MANDELKOW, E ., SONG, Y-H. & MANDELKOW, E . M. The microtubule lattice - dynamic instability of concepts. **Trends in Cell Biol.** 5: 262 - 266, 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: 11176 - 11187, 1993.
- McCAFFREY, G . & VALE, R . D . (Review) Identification of a kinesin - like microtubule - based motor protein in *Dictyostelium discoideum*. **EMBO J.**, 8: 3229 - 3234, 1989.
- MELUH, P . B . & ROSE, M . D . KAR3, a kinesin - related gene required for yeast nuclear fusion. **Cell**, 60: 1029 - 1041, 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 - 713, 1991.
- MITCHELL, D . R . Cell and molecular biology of flagellar dyneins. **Inter. Rev. Cytol.**, 155: 141 - 181, 1994.
- MITCHISON, T . J . & KIRSCHNER, M . W . Some thoughts on the partitioning of tubulin between monomer and polymer under conditions of dynamic instability. **Cell Biophys.**, 11, 35 - 55, 1984.

- MONTELL, C . & RUBIN, G . M . The *Drosophila* nina C locus encodes two photoreceptor cell specific protein with domains homologous to protein Kinases and the myosin heavy chain head. **Cell**, 52: 757 - 772, 1988.
- MOOSEKER, M . S ., WOLENKI, J . S ., COLEMAN, T . R ., HAYDEN, S . M ., CHENEY, R . E . Structural and functional dissection of a membrane - bound mechanoenzyme: brush border myosin - I. Ordering the Membrane - Cytoskeleton Trilayer. *Current Topics in Membranes*, ed., Mooseker, M . S ., Morrow, J . S ., 38: 31 - 55. New York: Academic, 1991.
- MOOSEKER, M . S . (Review) A multiple of myosins. **Curr. Biol.**, 3: 245 - 248, 1993.
- MOOSEKER, M . S . & CHENEY, R . E . (Review) Unconventional myosins. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, 11: 633 - 675, 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 - 12750, 1988.
- NIGGLI, V . & BURGER, M . M . Interaction of the Cytoskeleton with the plasma membrane. **J. Membr. Biol.**, 100: 97 - 121, 1987 .

- OLMSTED, J . B . Microtubule-associated proteins. **Ann. Rev. Cell Biol.**, 2: 421 - 457, 1986.
- OTSUKA, A . J ., JEYAPRAKASH, A ., GARCIA - ANOVEROS, J ., TANG, L . Z ., FISK, G. The *C. elegans* unc - 104 gene encodes a putative kinesin heavy chain - like protein. **Neuron.**, 6: 113 - 122, 1991.
- PASCHAL, B . M . & VALLEE R . B . Retrograde transport by the microtubule - associated protein MAP - 1C. **Nature**, 330: 181 - 183, 1987.
- PASCHAL, B . M ., KING, S . M ., MOSS, A . G ., COLLINS, C . A ., VALLEE, R . B ., WITMAN, G . B . Isolated flagellar outer arm dynein translocates brain microtubules *in vitro*. **Nature**, 330: 672 - 674, 1987a.
- 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 - 1282, 1987b.
- PATUSSI, E . V . 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 - UFU, 1996.



- PENNINGROTH, S . M ., ROSE, M . P ., CHEUNG, A ., PETERSON, D .  
D ., ROTHACKER, D . Q ., BERSHAK, P . An EHNA - sensitive  
ATPase in unfertilized sea urchin eggs. **Cell Motil.**, 5: 61 - 75, 1985.
- PFARR, C . M ., COUE, M ., GRISSOM, P . M ., HAYS, T . S .,  
PORTER, M . E ., McINTOSH, J . R . Cytoplasmic dynein is localized  
to kinetochores during mitosis. **Nature**, 345: 263 - 265, 1990.
- POLLARD, T . & KORN, E . D . *Acanthamoeba* myosin I: isolation from  
*Acanthamoeba castellani* of an enzyme similar to muscle myosin. **J .  
Biol. Chem.**, 248: 4682 - 4690, 1973.
- POLLARD, T . D .; DOBERSTEIN, S . K ., ZOT, H . G . Myosin - I .  
**Ann. Rev. Physiol.**, 53: 653 - 681, 1991.
- POLLARD, T . D . Myosin purification and characterization. **Methods Cell  
Biol.**, 24: 333 - 371, 1982.
- PORTER, M . E .; SCHOLEY, J . M .; STEMPLE, D . L .; VIGERS, G . P .  
A .; VALE, R . D .; SHEETZ, M . P ., McINTOSH, J . R .  
Characterization of the microtubule movement produced by sea urchin egg  
kinesin. **J. Biol. Chem.**, 262: 2794 - 2802, 1987.
- PRATT, M . M ., HISANAGA, S ., BEGG, D . A . An improved  
purification method for cytoplasmic dynein. **J. Cell Biochem.**, 26: 19 -  
33, 1984.

- SALMON, E . D . VE - DIC light microscopy and the discovery of Kinesin. **Trends in Cell Biol.**, 5: 154 - 157, 1995.
- SAMMAK, P . J . & BORISY, G . G . Direct observation of microtubules dynamics in living cells. **Nature**, 332: 724 - 726, 1988.
- SAXTON, W . M ., STEMPLE, D . L ., LESLIE, R . J ., SALMON, E . D ., ZAVORTINK, M ., McINTOSH, J . R . Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. **J. Cell Biol.**, 99: 2175 - 2186, 1984.
- SCHOLEY, J . M ., HEUSER, J ., YANG, J . T ., GOLDSTEIN L . S . B . Identification of globular mechanochemical heads of kinesin. **Nature**, 338: 355 - 357, 1989.
- SCHOLEY, J ., PORTER, M . E ., GRISSOM, P . M ., McINTOSH, J . R . Identification of kinesin in sea urchin eggs and evidence for its localization in the mitotic spindle. **Nature**, 318: 483 - 486, 1985.
- 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 - 1009, 1988.
- STEUER, E . R ., WORDEMAN, L ., SCROER, T . A ., SHEETZ, M . P . Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores. **Nature**, 345: 266 - 268, 1990.
- STRYER, L . Bioquímica. Editora Guanabara - Koogan. 3º Edição. 1992.

- STUDIER, F . W . Analysis of Bacteriophage T7 early RNAs and protein on slab gels. **J . Mol. Biol.**, 79: 237 - 248, 1973.
- TITUS, M . A . , WARRICK, H . M . , SPUDICH, J . A . Multiple actin - based motor genes in *Dictyostelium*. **Cell Regul.**, 1: 55 - 63, 1989.
- 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.
- VALE, R . D . & TOYOSHIMA, Y . Y . Rotation and translocation of microtubules *in vitro* induced by dyneins from *Tetrahymena cilia*. **Cell**, 52: 459 - 469, 1988.
- VALLEE, R . B . & SHEETZ, M . P . Targeting of Motor Proteins. **Science**, 271: 1539 - 1543, 1996.
- VALLEE, R . B . , WALL, J . S . , PASCHAL, B . M . , SHPETNER, H . Microtubule - associated protein 1C from brain is a two - headed cytosolic dynein. **Nature**, 332: 561 - 563, 1988.
- VALLEE, R . B . , SHPETNER, H . S . , PASCHAL, B . M . The role of dynein in retrograde axonal transport. **TINS**, 12: 66 - 70, 1989.
- VALLEE, R . B . & SHPETNER, H . S . (Review) Motor proteins of cytoplasmic microtubules. **Annu. Rev. Biochem.**, 59: 909 - 932, 1990.

- VALLEE, R . Cytoplasmic dynein: advances in microtubule - based motility (Review). **Trends Cell Biol.**, 1: 25 - 29, 1991.
- VALLEE, R . Molecular analysis of the microtubule motor dynein (Review) **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90: 8769 - 8772, 1993.
- VOET, D & VOET, J . G . Biochemistry. Editora Wiley. 1990.
- WADSWORTH, P . & SALMON, R . D . Analysis of the treadmilling model during metaphase of mitosis using fluorescence redistribution after photobleaching. **J. Cell Biol.** 102: 1032 - 1038, 1986.
- 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.
- WOLENSKI, J . S . (Review) Regulation of calmodulin - binding myosins. **Trends Cell Biol.**, 5: 310 - 316, 1995.
- YANG, J . T ., LAYMON, R . A ., GOLDSTEIN, L . S . B . A three - domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. **Cell**, 56: 879 - 889, 1989.
- 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 - 1062, 1990.