

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
577.15
G739i
TES/MEU

Identificação e Caracterização de ATPase de Gavinha de
***Passiflora* sp.**

Edilge Maria de Gouveia

Uberlândia - Minas Gerais

SISBI/UFU



400000417

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Identificação e Caracterização de ATPase de Gavinha de
***Passiflora* sp.**

Aluna: Edilge Maria de Gouveia

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

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

2000

FOLHA DE APROVAÇÃO

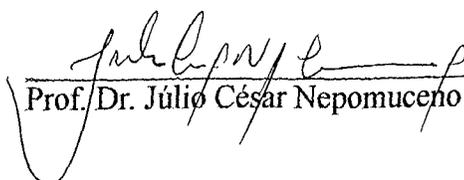
Dissertação defendida e aprovada, em 05 de setembro de 2000, pela banca examinadora:



Prof. Dr. Milton Vieira Coelho
Orientador



Prof. Dr. Fernanda Mani



Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Agradecimentos

Apóio Financeiro:

- ❖ **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**
- ❖ **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**
- ❖ **Universidade Federal de Uberlândia**

Agradecimentos à Instituição

- ❖ Ao Reitor da Universidade Federal de Uberlândia – **Dr. Gladstone Rodrigues da Cunha Filho.**
- ❖ Ao Diretor do Instituto de Genética e Bioquímica – **Prof. Drº. Malcon Antônio Manfred Brandeburgo.**
- ❖ À Coordenadora do curso de pós – graduação em Genética e Bioquímica – **Prof. Dr. Ana Maria Bonetti.**

Agradecimento Especial

- ❖ Ao Prof. Dr. **Milton Vieira Coelho** pela difícil tarefa de conciliar o pouco tempo aos resultados desejados, de maneira tão séria, compreensiva e segura. E ainda, pela sua aceitação em trabalhar com tecidos vegetais, mesmo com as dificuldades operacionais do laboratório que possui uma realidade mais apropriada para trabalhar com tecidos animais.

Agradecimentos Gerais

- ❖ Aos **professores** do Instituto de Genética e Bioquímica pela experiência e ensinamentos demonstrados
- ❖ À amiga **Ana Maria da Silva Gonçalves** pela colaboração e apoio rotineiro.

- ❖ À amiga **Maria de Fátima Rodrigues Silva** pela participação direta em minha vida e indiretamente na realização deste trabalho.
- ❖ **Sr. Paulo Roberto Moderno** pela rotineira disposição em colaborar.
- ❖ Aos **colegas** de laboratório pela convivência enriquecedora.
- ❖ À amiga **Carla Mônica Pinheiro** pelo companheirismo inabalável de todas as horas.
- ❖ Ao amigo **Morum Bernardino Neto** pela acessoria gráfica.
- ❖ À amiga **Maura M^a. de Jesus** primeiramente pela sua amizade sincera e também pelo seu incansável esforço de manter a ordem e a limpeza do material do laboratório, de maneira a proporcionar segurança e confiança nos resultados.
- ❖ À amiga **Maria Marlene Macedo** pela afabilidade e espírito de colaboração incomensuráveis
- ❖ À Sr^a. **Maria Madalena Barbosa Puccinelli** que com espírito de cooperação e carinho muito colaborou para a execução desta importante tarefa.
- ❖ Às mais recentes amigas: **Cleuber, Maria Aparecida Fontoura e Sebastiana Abadia Inácio**“Tianinha”.
- ❖ Ao secretário **Gérson Fraissat Mamed Filho** pela sua cooperação administrativa.
- ❖ A **Maria Salete de Freitas Pinheiro** pela especial dedicação ao seu trabalho e pela intensa participação na citação bibliográfica.

- ❖ Ao colega **Jair Pereira Cunha Júnior** por sua cooperação inicial que muito contribuiu para a execução desta tarefa.
- ❖ À “irmã” **Claudinha** por todas as horas digitadas, médias alcançadas, enfim, pelo enorme incentivo direto e indireto na execução de todo este trabalho.

- ❖ À minha prima **Daniela Reis Franco** pela constante colaboração em minha vida.

- ❖ À amiga **Gislaine Silva (Gigi)** pela amizade, intensa cooperação e apoio gráfico.

- ❖ E a todos que não foram listados, porém que jamais poderão ser esquecidos pela dedicação e amizade, sentimentos que muito contribuem para o sucesso de quaisquer tarefas.

Agradecimentos Especiais

À **Deus** pela minha existência e por ter permitido que mesmo depois de uma longa espera, eu tenha alcançado este caminho, e acima de tudo, pela sua constante presença. Bem sei que esteve sempre presente, mesmo quando tudo parecia estar dando errado, no início do trabalho e muitas vezes, nas horas avançadas da noite, onde o único ruído que se ouvia era o borburino dos tubos de ensaio no agitador vórtex, pois naquelas horas, o prédio já estava quase totalmente vazio. Obrigada Senhor por ter permitido a realização de mais uma importantíssima tarefa.

- ❖ Aos meus amantíssimos pais: **João Maria de Gouveia e Maria Sebastiana de Gouveia**, pelo o especial carinho, paciência, dedicação e amor , sentimentos que fazem parte constante de nossas vidas.

- ❖ À minha adorável mamãe: por participar ativamente de mais uma experiência maravilhosa de minha vida. Por me transmitir tanto amor e confiança, incentivos que ninguém poderia saber usá-los tão acertadamente em tempo hábil, a não ser uma pessoa coroada de bênçãos como é a senhora. Não é possível agradecê-la quanto é o seu merecimento, mas que Jesus permita que esta luz de amor que da senhora reflete possa ser interminável e que ela possa atingir a todos ao seu redor.

- ❖ Aos meus queridos, **Hélio José de Gouveia e Marisa de Fátima Resende Gouveia** e aos adoráveis sobrinhos **Pietro R. Gouveia e Enrico R. Gouveia** pelo carinho e incentivo rotineiros, e que colaboraram muitíssimo em mais uma etapa de minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Citoesqueleto	11
1.2	Motores Moleculares	12
1.2.1	Miosinas	13
1.2.2	Dineínas	14
1.2.3	Cinesinas	16
1.3	Motores moleculares de plantas	18
1.4	Maracujá	20
1.3.1	Aspectos Gerais	20
1.3.2	Características da família <i>Passifloraceae</i>	21
1.3.3	Características do gênero <i>Passiflora</i>	21
1.3.4	Características da família e do gênero <i>Passiflora</i>	21
1.3.5	Espécie estudada	22
1.3.6	Considerações finais	22
2	OBJETIVOS	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Coleta e acondicionamento de gavinha de <i>Passiflora</i> sp.	25
3.2	Preparação de ATPase de <i>Passiflora</i> sp - Método I	25
3.3	Preparação de ATPase de <i>Passiflora</i> sp – Método II	28
3.4	Fracionamento de S ₄ em Q – Sepharose	29
3.5	Dosagem de Proteína	32
3.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	32

3.7 Determinação da Atividade Adenosina Trifosfatásica de gavinha de <i>Passiflora</i> sp	33
4 – RESULTADOS	35
4.1 Caracterização da fração S ₃ de gavinha de <i>Passiflora</i> sp.	37
4.1.1 Atividade Mg – ATPásica e Ca – ATPásica de S ₃	37
4.1.2 Efeito da força iônica na atividade Mg – ATPásica de S ₃	37
4.1.3 Efeito de fluoreto de alumínio na atividade Mg – ATPásica de S ₃	37
4.1.4 Efeito de alguns efetores sobre a atividade ATPásica de S ₃	38
4.1.5 Atividade Mg – ATPásica e K/EDTA-ATPásica de S ₃	38
4.2 Fracionamento de S ₄ em Q – Sepharose	45
4.3 Atividade ATPásica de <i>Passiflora</i> sp é estimulada por um fator endógeno	48
4.3.1 Efeito da diálise sobre a atividade Mg – ATPásica de S ₃	48
4.3.2 Efeito de S ₃ fervido na atividade ATPásica de S ₃ dialisado	48
4.3.3 Efeito do fator termoestável na ATPase parcialmente purificada	48
5 – DISCUSSÃO	52
6 – CONCLUSÃO	54

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SUMMARY

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADP = adenosina difosfato

ATP = adenosina 5' - trifosfato

ATPase = adenosina trifosfatase

BSA = soro albumina bovina

C – terminal = carboxi – terminal

DTT = ditioneitol

EDTA = ácido etilendiaminotetracético

KDa = kilodaltons

KIF = kinesin superfamily protein

MAP = proteína associada a microtúbulo

N – terminal = amino terminal

Pi = ortofosfato inorgânico

PMSF = fluoreto de fenil metil sulfonila

SDS = dodecil sulfato de sódio

SDS - PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Tris = tris (hidroxi – metil) amino metano

TTP = timidina 5' trifosfato

UTP = uridina 5' trifosfato

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE ATPASE DE GAVINHA DE *PASSIFLORA* SP

Gavinhas são estruturas altamente dinâmicas, cujo movimento de espiralamento é dependente de ATP, o que sugere o envolvimento de ATPases neste processo. Neste trabalho nosso objetivo foi isolar ATPase de gavinha de *Passiflora* sp. As gavinhas de *Passiflora* sp foram homogeneizadas em tampão Imidazol 50mM pH 8.5 contendo inibidores de proteases (EDTA e PMSF) e centrifugado a 40.000g por 40 minutos. Após acertar o pH da fração sobrenadante para 4.5, este foi tratado com sulfato de amônia e a fração sobrenadante 40% de sulfato de amônia foi dialisada e submetida à caracterização enzimática. Esta fração apresentou tanto atividade Ca – ATPásica como Mg – ATPásica, sendo a primeira 60% maior que a segunda, porém na presença de Ca e Mg as atividades não foram somadas, sugerindo não ser ATPases distintas. A atividade Mg – ATPásica foi inibida cerca de 30% na presença de alta força iônica (NaCl 0,3M e KCl 0,3M). O fluoreto de alumínio não inibiu a atividade Mg – ATPásica da fração solúvel, porém o íon fluoreto inibiu cerca de 33% da atividade Mg – ATPásica. A atividade Mg – ATPásica apresentou redução crescente em presença de vanadato em concentrações de 50, 200 e 1000 μ M, com respectivamente 32, 61 e 78% de redução. A azida 1mM e triton X 100 praticamente não alteraram atividade sugerindo, respectivamente que F1 ATPase e dineína não estão presentes nesta preparação. A ausência de atividade K/EDTA – ATPase sugere que miosina, também não está presente em nossa preparação. A diálise da fração ATPase causa uma sensível redução na sua atividade Mg – ATPásica, essa atividade foi restaurada quando a fração solúvel dialisada foi incubada com a fração solúvel fervida.

A nossa fração ATPase foi centrifugada e aplicada em coluna de Q – Sepharose. A coluna foi lavada com NaCl 0,2M e subseqüentemente, a atividade ATPásica foi eluída com NaCl 0,5M . O principal polipetídeo observado nesta fração , através de SDS – PAGE apresenta mobilidade relativa de aproximadamente 29 KDa. A atividade Mg –ATPásica dessa fração é estimulada pela fração solúvel fervida.

Assim obtemos, neste trabalho, uma ATPase de fração solúvel de gavinha de *Passiflora* sp que é estimulada por um fator termoestável endógeno.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 CITOESQUELETO

O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica, altamente organizada, formada por filamentos protéicos que confere às células eucarióticas uma extensa variabilidade de morfologias e capacidade de executar movimentos direcionados e coordenados, como a contração muscular, o transporte de organelas citoplasmáticas e a segregação cromossômica na divisão celular. O citoesqueleto é constituído por três tipos de filamentos protéicos: microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários.

Os microtúbulos são estruturas polares, formados por monômeros de tubulina, que é uma proteína heterodimérica constituída por duas subunidades, α e β . Os microtúbulos possuem duas extremidades, sendo: a extremidade menos (-) ligada ao centro organizador de microtúbulos (o centrossomo) e a extremidade mais (+) em direção a borda da célula. Os microtúbulos participam de vários processos celulares, tais como: transporte intracelular de organelas, crescimento e divisão celular e também manutenção da forma celular. Os microtúbulos, em conjunto com suas proteínas associadas, estão envolvidos ativamente em vários aspectos da mitose (Vallee & Sheetz, 1996) mostrado pela despolimerização de microtúbulos que bloqueia a segregação de cromossomos.

Os filamentos de actina ou microfilamentos são formados por actina, uma proteína globular monomérica. A cadeia polipeptídica da actina é constituída por aproximadamente 375 resíduos de aminoácidos e sua seqüência e propriedades químicas são bastante conservadas (revisão em Kabsch & Vanderkerckhove, 1992). Estes microfilamentos compõem redes bidimensionais ou feixes lineares que, semelhante aos microtúbulos, confere estrutura de sustentação (suporte mecânico) às células. Os microfilamentos participam na geração de tensão, como na contração do músculo e no dobramento, na extensão da membrana plasmática, no transporte de vesículas e organelas.

Filamentos intermediários são estruturas fibrilares em forma de cordão constituídos por um grupo de proteínas heterogêneas, são mais diversos que os microfilamentos. Existem cinco classes de filamentos intermediários, que são morfologicamente similares, pois suas subunidades contém um núcleo central conservado. Eles foram descritos conforme sua origem celular: a - filamentos de vimentina em células de origem mesenquimal ou em meningiomas; b - desmina, predominantemente encontrada em células miogênicas (miócitos cardíacos); c - proteínas fibrilares gliais em células astrogliais; d - neurofilamentos encontrados em células neuronais; e - citoqueratinas ou tonofilamentos que surgem em células epiteliais, desmossomos (para revisão Carraway & Carraway, 1989).

1.2 MOTORES MOLECULARES

Os motores moleculares são responsáveis pelo movimento das células através de um substrato, pela emissão de projeções de membrana e, também, pelo transporte intracelular. A característica comum dos motores moleculares é que são proteínas que hidrolisam a molécula de ATP e usam parte da energia química liberada, para realizar trabalho mecânico. Estas proteínas constituem um componente gerador de força para a célula e também são de fundamental importância em diversos processos celulares, como a fagocitose, o transporte de vesículas e organelas, a migração de cromossomos durante a divisão celular e a citocinese (para revisão em Endow & Titus, 1992 e Clark & Spudich, 1977).

Os motores moleculares estão reunidos dentro de três famílias de proteínas: miosinas, cinesinas e dineínas. Motores moleculares da família das miosinas ligam-se aos filamentos de actina, enquanto cinesinas e dineínas ligam-se aos microtúbulos, usando a energia proveniente da hidrólise do ATP para se deslocarem ao longo destes filamentos (revisão em Cheney & Mooseker, 1992; Walter & Sheetz, 1993).

1.2.1 MIOSINAS

As miosinas são enzimas motoras que utilizam filamentos de actina como trilhos para se translocar. Caracterizam-se pela habilidade de interagirem fortemente com a F-actina na ausência de ATP e possuem atividade adenosina trifosfatase estimulada por esta, sob condições fisiológicas (Korn e Hammer, 1988; Cheney et al., 1993). As miosinas estão presentes tanto em células musculares como também não musculares. São mecanoenzimas que utilizam a energia oriunda da hidrólise da molécula de ATP e os filamentos de actina para promover a movimentação celular (Hasson & Mooseker, 1995). Possuem estruturalmente três domínios, presentes em sua cadeia pesada: a - cabeça ou motor – é um domínio N-terminal bastante conservado o qual define sua classificação e que pode ligar-se à actina, hidrolisar o ATP e translocar ao longo de filamentos de actina; b- domínio pescoço – regulatório no qual se ligam as cadeias leves ou proteínas regulatórias; c – domínio cauda – é a região menos conservada entre as diversas classes de miosinas (Cheney & Goodson, 1993; Cheney & Mooseker, 1992; revisão em Mooseker & Cheney, 1995).

As miosinas foram inicialmente classificadas em dois grupos, a - convencionais e b - não convencionais. A primeira proteína motora descoberta na família das miosinas é a miosina II (convencional ou clássica de músculo). Ela é assim denominada por possuir duas cadeias polipeptídicas pesadas com aproximadamente 200KDa cada uma. Essas duas cadeias pesadas estão unidas através de seus domínios caudas enrolados um ao outro, originando uma α -hélice dupla filamentosa (Warrick & Spudich, 1987). A cauda tem capacidade de interagir com as caudas de outras moléculas de miosinas para formar filamentos bipolares (Warrick & Spudich, 1987; Hammer III, 1991). Os domínios cabeça exibe atividade Mg-ATPásica, estimulada por filamentos de actina (Warrick & Spudich, 1987; Hammer, 1991).

A primeira miosina não convencional descoberta, a miosina I, que possui uma única cadeia pesada e portanto um único domínio motor. Foi isolada de *Acanthamoeba catellanii* (Pollard & Korn, 1973). A Miosina I é constituída por uma única cadeia polipeptídica pesada de aproximadamente 130 KDa e 1 a 6 cadeias leves que pode ser a calmodulina em vertebrados (Hasson & Mooseker, 1995). A cadeia pesada possui uma cauda menor que as de miosina II e são incapazes de formar filamentos bipolares (Pollard et al., 1991). A

comparação entre as seqüências de miosinas I indicam que há pelo menos 4 subclasses destas proteínas (Morgan. N.S., et al. 1994).

Um grande número de novas miosinas foram descobertas, tornando insuficiente a classificação em apenas dois grupos. Assim é feita uma nova classificação baseada na análise filogenética das miosinas, realizada mediante a comparação da estrutura primária do domínio motor das miosinas, por ser o mais conservado entre elas (Cheney et al., 1993 b; Goodson & Spudich, 1993; Mooseker & Cheney, 1995). Nesta nova classificação, as miosinas convencionais constituem a classe II que correspondem às miosinas clássicas de tecidos musculares e análogas. As miosinas da classe I correspondem as miosinas similares àquelas da *Acanthamoeba castellani* (Pollard & Korn, 1973) e constituem a classe I. As demais classes de miosinas foram denominadas de classes: III, IV, V, etc., conforme a ordem cronológicas de suas descobertas (Cheney et al., 1993 b). Atualmente existem 17 classes de miosinas descritas (Hodge & Cope, 2000).

De maneira geral, as miosinas apresentam as seguintes características enzimáticas: a) - alta atividade ATPásica na ausência de cátions bivalentes e alta concentração de K (K/EDTA-ATPase); b) - baixa atividade ATPásica em presença de Mg^{2+} (Pollard, 1982); c) - atividade ATPásica na presença de íons cálcio (Ca-ATPásica) maior que a atividade Mg-ATPásica; d) - Atividade Mg-ATPásica estimulada por actina sob condições fisiológicas (Pollard, 1992).

1.2.2 DINEÍNAS

Dineínas são proteínas motoras que se deslocam ao longo dos microtúbulos em direção a extremidade menos, ou seja, em direção ao centrossomo (revisão em Lane et al., 1992 e Reis et al., 1994). Elas estão envolvidas com o transporte de organelas e a divisão celular.

As dineínas possuem duas classes funcional e estrutural: a - dineína axonemal, responsável pelo batimento de cílios e flagelos; b - a dineína citoplasmática (Vallee &

Sheetz, 1996). Estudos de microscopia eletrônica mostraram que dineína citoplasmática possui estrutura similar a dineína axonemal (Vallee et al., 1989), mas diferem quanto à especificidade de nucleotídeos usados como substrato. Enquanto dineína axonemal usa preferencialmente a molécula de ATP (Shpetner et al., 1988) como substrato, a dineína citoplasmática, CTP, GTP, UTP, ITP e TTP melhor que o ATP (Shpetner et al., 1988; Collins & Vallee, 1989). Apesar de possuir a capacidade de hidrolisar os nucleotídeos trifosfatados citados anteriormente, somente a hidrólise da molécula de ATP é estimulada pelos microtúbulos e produz a força motriz para realização do movimento ao longo destes microtúbulos (Ley et al., 1987; Paschal et al., 1987).

A primeira dineína citoplasmática identificada é extraída de cérebro de bezerro (Paschal et al., 1987b). Ela promove deslizamento ao longo dos microtúbulos e tem sua atividade ATPásica estimulada por estes microtúbulos. As dineínas de cérebro têm habilidade de produzirem força em direção a extremidade (-) de microtúbulos, de onde originou sua função no transporte axonal retrógrado (Vallee, 1991). Ela possui peso molecular de aproximadamente 2000 KDa sendo formada por multisubunidades constituídas por duas cadeias pesadas de aproximadamente 530KDa, três cadeias intermediárias de 74 KDa e quatro cadeias leves intermediárias de aproximadamente 55KDa (Paschoal et al., 1987; Schroer et al., 1989).

Em adição às suas cadeias intermediárias e intermediárias leves, dineína citoplasmática está associada a proteína dinactina, formando múltiplos complexos (revisão Gill et al., 1991). Estes complexos discriminam entre diferentes cargas e funções celulares, como a segregação cromossômica, formação do fuso, migração nuclear, posicionamento do complexo de Golgi, endocitose e transporte retrógrado de membranas em direção à extremidade menos (revisão em Hirokawa et al., 1998; Vallee & Sheetz, 1996 e Ogawa & Mohri, 1996).

As dineínas estão amplamente distribuídas em diversos tecidos e organismos, estão presentes em cérebro de vertebrados, culturas epiteliais, fibroblastos, em nematódeos (Vallee, 1991), *Dictyostelium discoideum* (Koonce et al., 1992) e *Saccharomyces cerevisiae* (Eshel et al., 1993).

A dineína citoplasmática de cérebro de rato apresenta atividade Mg-ATPásica estimulada por microtúbulo em concentrações fisiológicas (Paschal et al., 1987; Vallee et al., 1989). A atividade enzimática desta dineína é dependente de cátions bivalentes (cálcio ou magnésio) sendo maior na presença de magnésio do que de cálcio (Pratt et al., 1984; Shepetner et al., 1988).

1.2.3 CINESINAS

São proteínas motoras associadas aos microtúbulos envolvidas na divisão celular, no transporte de organelas e vesículas. O transporte ao longo destes microtúbulos, são processos dependentes da energia química liberada da hidrólise do ATP. O nome cinesina é proposto a partir da purificação de uma proteína translocadora (motora) em ensaios com axoplasma e lóbulo óptico de lula, *in vitro* (Vale et al., 1985). A proteína apresentava alta afinidade em formar complexos com microtúbulos na presença de AMP-PNP (Adenilil Imidodifosfato), um análogo do ATP. Apresentava ainda, peso molecular de aproximadamente 600KDa e polipeptídeos de 110- 120 e 60 - 70 KDa. O comportamento enzimático e o peso molecular foram diferentes aos dos demais motores moleculares, miosina e dineína, o que sugeriu ser uma nova classe de moléculas geradoras de força motriz, denominando-a cinesina (Vale et al.; 1985c). Essa cinesina se move ao longo do microtúbulo em direção à extremidade (+).

Uma cinesina similar à cinesina de lóbulo óptico de lula foi identificada em cérebro bovino por Brady em 1985, e posteriormente, foi isolada de uma grande variedade de organismos e tecidos, entre outros, ovos de ouriço do mar (Scholey et al., 1985), embrião de *Drosophila* (Cole et al., 1994), fígado de rato (Hirokawa, 1996), *Acanthamoeba* (Vallee & Shpetner, 1990), *Dictyostelium* (Mc Caffrey & Vale, 1989).

Atualmente sabe-se que a cinesina é constituída por duas cadeias pesadas e várias cadeias leves. Cada cadeia pesada possui uma cabeça globular, conservada, que liga ao ATP e uma cauda constituída de domínios enfileirados em forma de bastão. As duas

cabeças, apresentam atividade ATPásica e se ligam a componentes celulares específicos, definindo assim, a carga transportada pela proteína.

Os membros da superfamília das cinesinas são conhecidos por KIFs e apresentam uma vasta árvore filogenética. A primeira cinesina é seqüenciada por Yang et al., 1989 e sendo que este sequenciamento, serviu como base para descoberta de outras proteínas similares, através de análise genética molecular de mutantes em vários organismos. Membros dessa família de motores moleculares estão associadas ao retículo endoplasmático, complexo de golgi, mitocôndrias, endossomos e lisossomos (Bloom & Endow, 1995).

Atualmente as cinesinas são identificadas de acordo com a posição de seu domínio motor em: a) NH₂ – terminal; b) meio (médio) e c) COOH-terminal. Cada uma delas realizam movimentos ao longo dos microtúbulos em direção a extremidade distinta. As tipo amino-terminal em direção à extremidade (+), as tipos médio-terminal e carboxi-terminal em direção à extremidade (-).

As cinesinas podem atuar em diferentes estágios da divisão celular de forma cooperativa ou antagonicamente ao movimento subcelular como na formação das fibras do fuso e na separação e segregação do centróssomo (revisão em Moore & Endow, 1996). Algumas cinesinas atuam também na polimerização e despolimerização de microtúbulos.

A atividade ATPásica das cinesinas pode ser regulada de várias maneiras, dependendo da heterogeneidade de suas cadeias leves. As cinesinas dependem de cátions bivalentes (Mg²⁺ e Ca²⁺) para sua atividade ATPásica (Kuznetsov & Gelfand, 1986; Cohn et al 1987; revisão: Vallee & Shpetner, 1990). Apresentam baixa atividade Mg-ATPásica (Vallee & Sheetz, 1996), porém pode ter esta atividade aumentada pela presença de microtúbulo (Kuznetsov & Gelfand, 1986; Mc Caffrey & Vale, 1989). Na ausência de microtúbulos, as cinesinas possuem atividade Ca-ATPásica maior que a atividade Mg-ATPásica (Kuznetsov & Gelfand, 1986).

1.3 MOTORES MOLECULARES DE PLANTAS

Membros pertencentes às três famílias de motores moleculares já foram identificadas em plantas, principalmente em tubo polínico (Pierson & Cresti, 1992; Pierson, 1988; Heslop-Harrison et al., 1988 e Lancelle et al., 1987).

O tubo polínico é uma estrutura de condução, agindo como canais biológicos por onde é conduzido o material genético masculino (células espermáticas) até o gametófito feminino. Ele possui constituintes do citoesqueleto, os filamentos de actina (Taylor, 1989 e Pierson, 1988) citados anteriormente e os microtúbulos (Heslop - Harrison et al., 1988). Segundo Pierson e Cresti, 1992, microtúbulos de células vegetativas poderiam exercer uma função no movimento intracelular de organelas durante a elongação do tubo polínico.

Miosina e filamentos de actina contribuem para a organização do sistema de transdução de energia que parece ter um papel ativo no processo de transporte durante a germinação e crescimento do tubo polínico (revisão ver Pierson & Cresti, 1992). Os filamentos de actina são distribuídos em todo o citoplasma do tubo polínico de Angiospermas, enquanto moléculas de miosinas estão localizadas principalmente próximo da superfície das células deste mesmo tubo.

O tubo polínico exibe uma movimentação bidirecional de organelas e de eventos de transporte citoplasmático, que contribuem para estabelecer a organização citoplasmática e para promover o crescimento do tubo (Pierson & Cresti, 1992).

Microtúbulos em tubo polínico de *Nicotiana tabacum*, são distribuídos tanto em citoplasma de células generativas quanto em vegetativas (Pierson & Cresti, 1992; Del Casino et al., 1993). A despolimerização dos microtúbulos parece participar no transporte do material genético masculino, regulando a engrenagem de entrada de células somáticas dentro do tubo polínico (Åstrom et al., 1995).

Em tubo polínico de *Nicotiana tabacum* é identificado dois polipeptídeos relacionados à cadeia pesada de dineína (DHC), porém com coeficientes de sedimentação diferentes (Moscatelli et al., 1995). Um apresenta coeficiente de sedimentação de 22S e o outro de 12S. Isto sugere que estes polipeptídeos, DHC de tubo polínico, podem apresentar um papel na translocação de organelas dependentes de microtúbulos. Ambos polipeptídeos foram identificados e caracterizados bioquimicamente como proteínas que interagem com

microtúbulos em uma maneira dependente de ATP. No momento nada é conhecido sobre a localização destes DHC na célula do tubo (Moscatelli et al., 1995).

Gavinha é uma outra estrutura muito dinâmica em plantas. As gavinhas são ramos modificados que formam-se na axila das folhas e servem como elemento de fixação de espécies de trepadeiras a um substrato (Ferreira, A.B.H, 1999). O movimento de espiralamento das gavinhas de ervilhas é um processo dependente de ATP (Jaffe e Galston, 1966).

Estas estruturas possuem elementos do citoesqueleto e, também, motores moleculares. O pouco que se sabe a respeito dessas proteínas é obtido de estudos com ervilhas. Segundo Yong e Lung, 1989, actina de gavinha de *Pisum sativum* L. (ervilha) possui 43 KDa e é semelhante a actina de músculo esquelético de coelho. O peso molecular de miosina nativa de gavinha de *Pisum sativum* L. é de aproximadamente 440 KDa e possui duas cadeias pesadas de peso molecular aproximado de 165 KDa e dois pares de cadeias leves de 17 KDa e 15 KDa (Yong & Lung, 1989). Em alta força iônica a atividade ATPase dessa miosina é ativada por EDTA e Ca^{2+} e inibida por Mg^{2+} . Em baixa força iônica sua atividade Mg^{2+} -ATPase é ativada por F-actina de músculo esquelético de coelho (Yong & Lung, 1989).

1.4 MARACUJÁ

1.4.1 Aspectos Gerais

Os maracujás pertencem à família *Passifloraceae*. Esta família apresenta cerca de 650 espécies e é largamente distribuída nos trópicos e regiões temperadas quentes, principalmente regiões da América e África (Cronquist, 1981). Na América ocorrem 5 gêneros e quase 400 espécies (Escobar, 1988). Os gêneros mais conhecidos são: *Dilkea*, com 5 espécies, *Mitostemma* com 2 espécies, o gênero *Passiflora* apresentando aproximadamente 115 espécies, e *Tetrastylis* (monotípico) ocorrem no Brasil com o número aproximado de 125 espécies (* Dr. Luís C. Bernacci, comunicação pessoal).

1.4.2 Características da família *Passifloraceae*

Trepadeiras herbáceas ou lenhosas, com gavinhas axilares, ou subarbustos a árvores pequenas, homóicas ou dióicas ou andromonóicas. Folhas com ou sem ocelos, alternas, simples (lobadas, palmatipartidas ou inteiras) ou compostas; pecíolo com ou sem nectários; estípulas presentes, geralmente decíduas, ou ausentes. Inflorescências axilares, cimosas ou racemosas, ou reduzidas a 1-2 flores por nó. Flores períginas, raro hipóginas, actinomorfas; sépalas carnosas, membranáceas a cartáceas, (3-)5(-8), imbricadas, livres a unidas na base; pétalas membranáceas, (3-)5(-8), imbricadas, livres a unidas na base, ou ausentes; hipanto aplanado até tubular; corona extraestaminal com 1-muitas séries de filamentos, membranas ou escamas; opérculo e límen presentes ou ausentes; estames (4-)5(-10), alternos às pétalas, filetes livres ou unidos parcialmente em tubo, inseridos no androginóforo ou no hipanto, anteras bitecas, rimosas, dorsifixas; ovário (2-)3(-5)-carpelar, 1-locular; óvulos ca. 10 a até mais de 100, parietais; estiletes tantos quantos os carpelos, livres ou unidos na base, ou único. Fruto baga ou cápsula, 3-4-valvar; sementes comprimidas, ariladas, testa óssea, embrião grande, endosperma nuclear, oleaginoso (Bernacci & Vita, 1999).

1.4.3 Características do gênero *Passiflora*

Plantas homóicas ou excepcionalmente andromonóicas; ramos (sub)cilíndricos, raramente angulados ou achatados. Lâmina foliar de margem inteira, subinteira, denticulada, serrada ou crenada, às vezes glandular; estípulas membranáceas ou subcoriáceas, às vezes cedo-decíduas. Pedicelo articulado próximo à base do hipanto ou excepcionalmente não articulado; brácteas 3, dispersas abaixo da articulação ou verticiladas, à altura dela, às vezes, cedo-decíduas; sépalas 5, pétalas 5 ou ausentes; opérculo raramente ausente; límen membranáceo e bem desenvolvido ou carnoso e pouco desenvolvido a ausente; estames 5(-8); ovário 3(-5)-carpelar; estiletos tantos quantos os carpelos, livres ou unidos na base. Fruto baga ou cápsula carnosa 3-valvar.

1.4.4 Características da família *Passifloraceae* e do gênero *Passiflora*.

As plantas da família *Passifloraceae* e do gênero *Passiflora* normalmente apresentam gavinhas, que representam nosso objeto de estudo. As gavinhas são o órgão de fixação das plantas sarmentosas ou trepadeiras, com o qual elas se prendem a outras ou a um suporte (estacas). Estas gavinhas estão sempre presentes, exceto quando as plantas são subarbustos ou árvores, em vez de trepadeiras. Espécies arbóreas, lembrando um mamoeiro, não ocorrem no Brasil, apenas nos Andes. Um exemplo de planta arbustiva, portanto também sem gavinha, é *Passiflora clatratha* Mast., conhecida como maracujá-rasteiro, que ocorre nos cerrados dos estados de Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás (* Dr. Luís C. Bernacci, comunicação pessoal).

1.4.5 Espécie Estudada

As gavinhas (Figura – 1) utilizadas para este estudo é de *Passiflora quadrangularis* L, espécie que possui pecíolos 4-6 glandulares: estípulas maiores que 1cm. Folhas de 10-20cm de comprimento por 8-15 cm de largura; coroa de 5 séries de filamentos angulosos; fruto oblongo-ovóide de 20 –30 cm de comprimento por 12 – 15 cm de diâmetro. Este representante é também conhecido no Brasil pelos nomes: maracujá-açu, maracujá-uaçu, maracujá-de-garapa, maracujá-melão ou maracujá-mamão, maracujá-igapó e maracujá-cascudo. Esta espécie é nativa do estado da Bahia e requer clima quente e úmido, solos semi-drenados e terrenos argiloso-arenosos (* Dr. Luís C. Bernacci, comunicação pessoal). É uma trepadeira vigorosa, glabra, de hastes 4-angulares e os ângulos conspicuamente alados. Folhas inteiras, cordadas, de 10 a 20 x 8 a 15 cm, inteiras nas margens. Flores grandes, axilares, até 12 cm de diâmetro. Baga oblongo-ovóide, grande, de 20-30 x 13-15cm, cilíndrica ou longitudinalmente 3-sulcada, verde-amarelada na maturação. Sementes envoltas em massa doce-acidulada. Para garantir uma boa produção, é necessário polinização manual. Os frutos maduros apresentam polpa levemente ácida e açucarada, utilizada in-natura ou processada.

1.4.6 Considerações Finais

Apesar do elevado número de espécies que formam o gênero *Passiflora*, apenas algumas são de importância econômica devido à qualidade de seus frutos ou sua adaptabilidade como trapadeiras ornamentais, ou ainda, pelas suas propriedades medicinais. Desde 1939, segundo Hoehne, as sementes de todas as espécies de *Passiflora* são conhecidas como venenosas, sendo utilizadas, bem trituradas, como anti-helmínticas.

* Dr. Luís C. Bernacci – Instituto Agronômico de Campinas – São Paulo.



Figura – 1 Fotografia de gavinha de *Passiflora quadrangularis* L.

2 - OBJETIVOS:

- ◆ Identificar ATPases de gavinhas de *Passiflora* sp.

- ◆ Isolar e caracterizar ATPases de gavinhas de *Passiflora* sp.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Coleta e acondicionamento de gavinha de *Passiflora* sp.

Todas as gavinhas de *Passiflora* usadas, foram coletadas de plantas jovens do canteiro-1, situado na área Experimental do Instituto de Ciências Agrárias do Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia.

As gavinhas foram cortadas dos ramos apicais e subapicais, cortando apenas a parte apical de cada ramo, ou seja, a porção espiralada. É utilizada tesoura metálica limpa e seca e luvas afim de evitar contaminações na manipulação. Imediatamente após o corte, as gavinhas foram depositadas em solução salina, em banho de gelo, de maneira que ficassem totalmente submergidas e, então, levadas ao laboratório. No laboratório, foram rapidamente distribuídas em porções de 10 e 20 gramas e congeladas em nitrogênio líquido (em caixa de isopor). Após estarem totalmente congeladas, foram retiradas com espátula de metal limpa e seca, acondicionadas em envelopes de papel alumínio, devidamente fechados e rotulados e, então, estocados em freezer (-18°C), permanecendo até o momento de serem usadas nas preparações.

As coletas foram realizadas sempre no período de 9 às 10 horas da manhã durante 01 hora de coleta ininterrupta.

3.2 Preparação de ATPase de *Passiflora* sp (Método I)

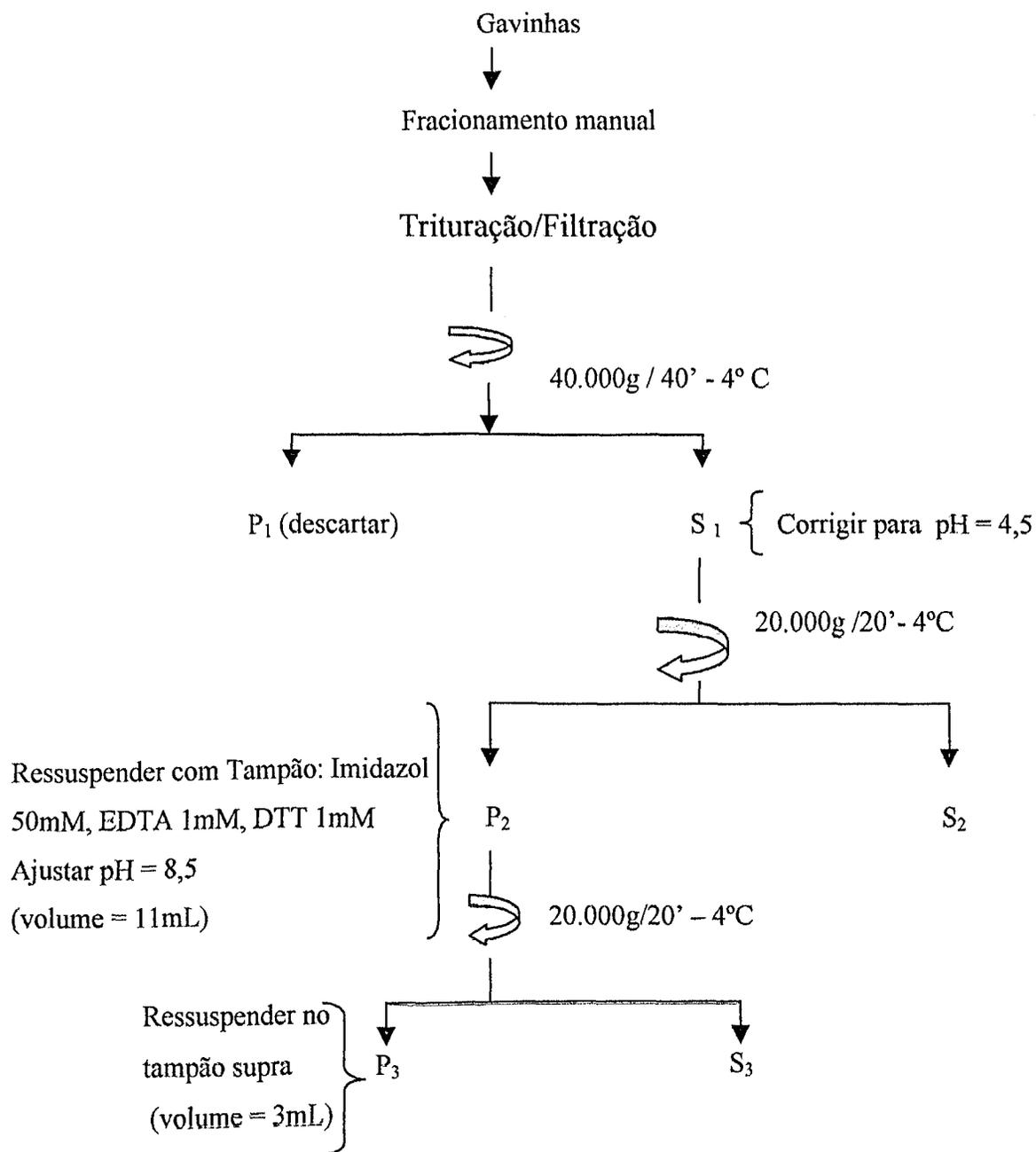
Conforme o fluxograma de preparação de ATPases de gavinha de *Passiflora* sp. (Método – I), o pacote contendo 10g de gavinhas congeladas foi retirado do freezer imediatamente antes do uso. As gavinhas congeladas foram fracionadas grosseiramente, com tesoura metálica, em frações menores para facilitar e tornar o processo de trituração

mais rápido e eficiente. As gavinhas ainda congeladas foram divididas em quatro porções menores e cada porção foi colocada em um tubo de polietileno com 20mL de tampão de extração (Imidazol 50 mM, EDTA 10mM, DTT 1mM e PMSF 0,3 mM em pH=8,5). Este material foi triturado e homogeneizado em homogeneizador (Marconi, modelo TE 102) com pistilo de metal conectado a um motor elétrico de 220v, utilizando velocidade 6. Este procedimento ocorreu em 2 ciclos consecutivos, em alguns casos, dependendo da resistência das gavinhas, foi necessário mais alguns ciclos para que todo material fosse totalmente triturado e devidamente homogeneizado.

Após a trituração, o macerado era então filtrado sobre 17cm de gaze hidrófila (8 dobras, 9 fios /cm²) em béquer de vidro (250mL) em banho de gelo. O filtrado foi distribuído em tubos de polietileno rosqueados com tampa e, então, submetidos à centrifugação de 40.000g por 40 minutos sob refrigeração a 4°C. Decorrido este tempo, o sobrenadante (fração S₁) foi submetido a correção de pH para 4,5 e o precipitado (fração P₁) descartado. A fração S₁ pH=4,5 foi distribuída em tubos de polietileno, rosqueados com tampa e submetida a centrifugação a 20.000g por 20 min. a 4°C.

A fração S₂ resultante foi estocada em erlenmeyer de vidro sob refrigeração a 4°C, e a fração precipitada (P₂) foi ressuspensa em 11mL de Tampão de ressuspensão (Imidazol 50mM, EDTA 1mM e DTT 1mM em pH=8,5) e homogeneizado em frasco potter. Após ajustar o pH dessa fração para 8,5, ela foi centrifugada a 20.000g/20min a 4°C em tubos (como os anteriormente utilizados para a fração S₁) resultando as frações P₃ e S₃. Foi retirado de cada fração, uma alíquota de 1mL que era mantida sob refrigeração a 4°C até o momento de preparar as amostras para gel e teste de atividade ATPase.

3.2 – Fluxograma 1 - Preparação de ATPases de gavinha de *Passiflora* sp. (Método I)



 = Centrifugação

3.3 Preparação de ATPase de *Passiflora quadrangularis* L.sp. (Método II)

Conforme o fluxograma de preparação de ATPase de gavinha de *Passiflora quadrangularis* L. (Método II) , o pacote contendo 20g de gavinhas congeladas foi retirado do freezer imediatamente antes do uso. As gavinhas foram fracionadas grosseiramente, com tesoura metálica, em frações menores para facilitar e tornar o processo de trituração mais rápido e eficiente. As gavinhas ainda congeladas foram divididas em quatro porções menores e cada porção foi colocada em um tubo de polietileno com 20mL de tampão de extração (Imidazol 50 mM, EDTA 10mM, DTT 1mM e PMSF 0,3 mM em pH=8,5). Este material foi levado ao homogeneizador (Marconi, modelo TE 102) com pistilo de metal conectado a um motor elétrico de 220v com velocidade 6. Este procedimento ocorreu em 4 ciclos consecutivos, em alguns casos, dependendo da resistência das gavinhas, foi necessário mais alguns ciclos para que todo material fosse totalmente triturado e devidamente homogeneizado. Após a homogeneização, foram depositadas sobre 17cm de gaze hidrófila (8 dobras, 9 fios /cm²) e, então, filtrado o macerado de gavinhas em béquer de vidro (250mL) em banho de gelo.

O filtrado foi distribuído em tubos de polietileno rosqueados com tampa que foram então, submetidos à centrifugação a 40.000g por 40 minutos sob refrigeração à 4°C. Decorrido este tempo, a precipitada (fração P₁) foi descartada e a sobrenadante (fração 1) foi submetida a correção de pH para 4,5. A fração S₁ pH=4,5 foi distribuída em tubos de polietileno, rosqueados com tampa e submetido a centrifugação a 20.000g por 20 min. a 4°C.

A fração S₂ resultante foi estocada em erlenmeyer de vidro sob refrigeração à 4°C e a fração precipitada (P₂) foi ressuspensa em 21mL de solução de sulfato de amônia 40% e homogeneizada em frasco potter, em seguida 2mL dessa fração foram dialisados contra tampão (Imidazol 25mM, EDTA 0,1mM e DTT 0,1mM em pH=8,5) com duas trocas sucessivas e o restante de P₂ (19mL) foi centrifugado a 20.000g/20min à 4°C em tubos anteriormente mencionados.

A fração P₃ resultante foi ressuspensa em 11mL de tampão de ressuspensão (Imidazol 50mM, EDTA 1mM e DTT 1mM em pH=8,5), homogeneizado em frasco potter e submetido a diálises com duas trocas no tampão supra. A fração S₃ foi também dialisada contra o mesmo tampão de diálise já mencionado e obedecendo o mesmo procedimento da

fração P₃. Após dialisadas, as frações P₃ e S₃ foram retornadas aos tubos (citados anteriormente) e centrifugados a 40.000g/20min/4°C.

As frações oriundas de P₃ foram denominadas de S₄ e P₄, e as provenientes de S₃, S'₄ e P'₄. Sendo que a P₄ e P'₄ foram ressuspensas em tampão de ressuspensão (já mencionado), homogeneizadas em frasco potter e estocadas em frasco de vidro sob refrigeração a 4°C e o mesmo procedimento de estocagem é obedecido para todas as demais frações. A fração P₄ foi ressuspensa em 6mL e P'₄ em 2mL do mesmo tampão de ressuspensão, mencionado anteriormente.

Foram retiradas alíquotas de 1mL de cada fração sobrenadante e precipitado para posteriores análises de atividade ATPase e em gel de poliacrilamida, exceto da fração P₁ que foi totalmente descartado.

3.4 - FRACIONAMENTO DE S'₄ EM COLUNA DE Q-SEPHAROSE

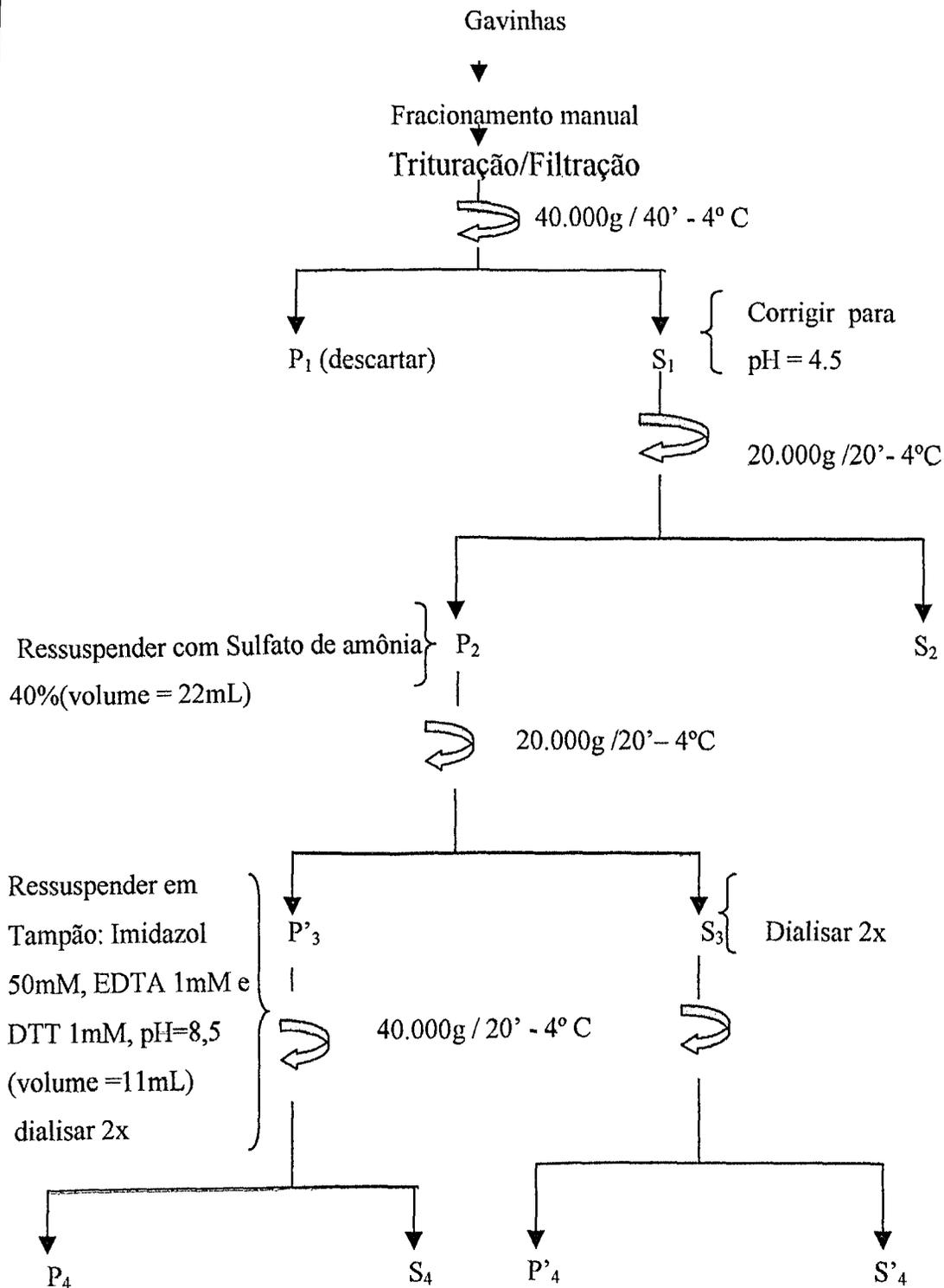
A cromatografia em coluna de Q - Sepharose ocorreu em temperatura ambiente (temperatura média de 20° C) e o perfil cromatográfico é acompanhado através da absorvância a 280nm.

Uma coluna com capacidade máxima de 10 mL, foi usada com apenas 6 mL de resina. Esta coluna foi previamente equilibrada com 60 mL de tampão de equilíbrio (Imidazol - HCl 20 mM, pH=8.5; EDTA 0,1 mM). Após aplicar 25 mL da fração sobrenadante S'₄ utilizando um fluxo contínuo de aproximadamente 12 gotas/mL, a coluna foi lavada com 60 mL do mesmo tampão de equilíbrio, também através de fluxo contínuo de 12 gotas/mL.

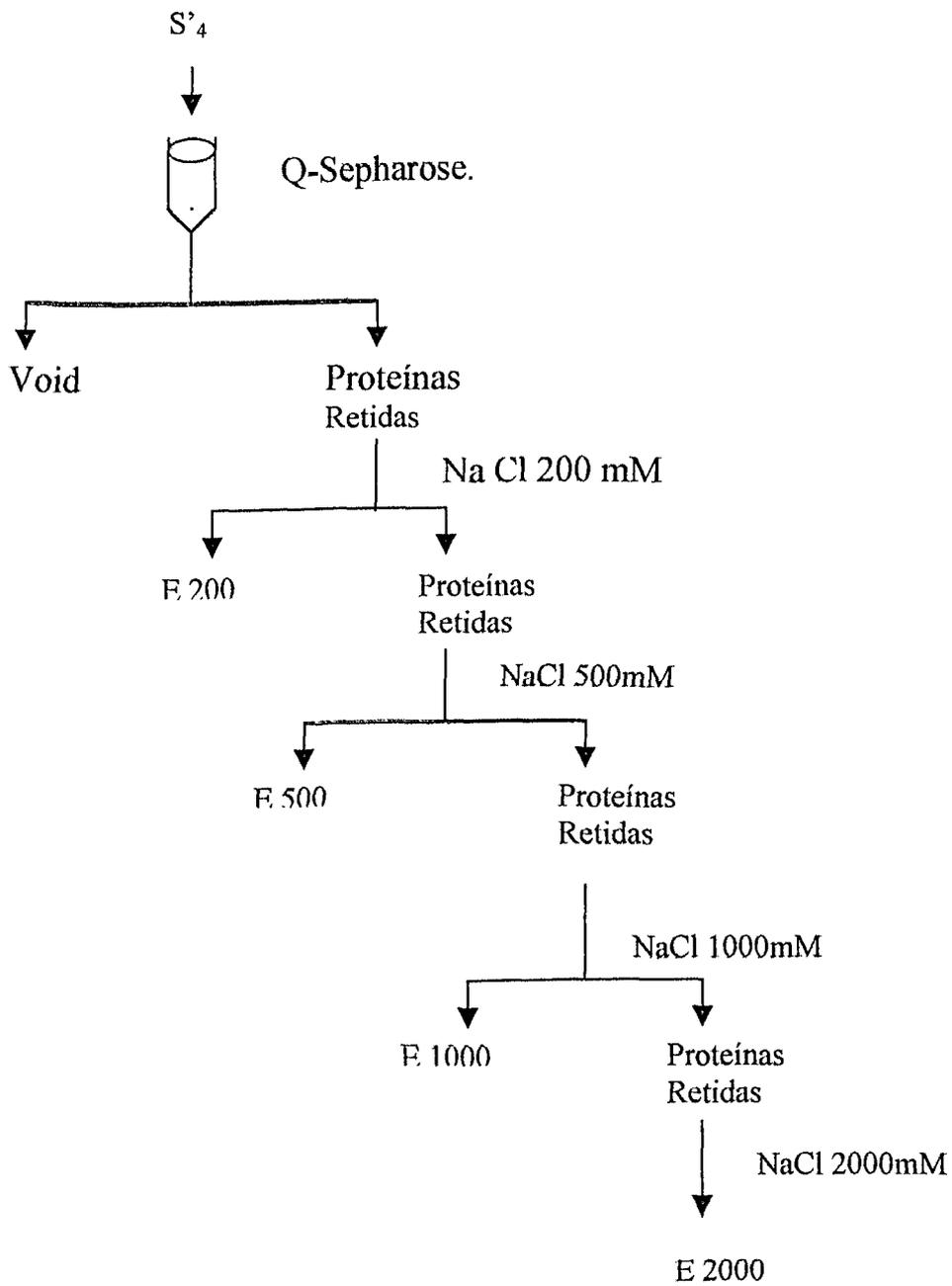
As proteínas retidas foram eluídas sucessivamente com NaCl 200, 500, 1000 e 2000 mM. Além do sal, cada tampão de eluição continha: Imidazol - HCl 20 mM, pH=8.5; EDTA 1 mM e DTT 0,2 mM. A eluição ocorreu em fluxo igual ao mencionado acima, usando 20mL de cada tampão de eluição. De cada eluição foi coletada uma fração única (Fluxograma - 3).

Subseqüentemente, todas as frações obtidas, exceto o lavado, foram preparadas para gel. Em seguida, foram analisadas as atividades Mg-ATPásicas de cada fração.

Fluxograma 2 Preparação de ATPases de gavinha de *Passiflora quadrangularis* L. (Método II)



Fluxograma – 3 Fracionamento de S'₄ em Q - Sepharose



3.5 - Dosagem de Proteína

A concentração de proteínas nas frações solúveis de gavinha de *Passiflora* sp foi determinada pelo Método de Bradford (1976) tendo como padrão a soro albumina bovina (BSA). Neste método, uma alíquota de cada amostra foi diluída para 100 mL com água deionizada e adicionado 3,0 mL de Reagente de Bradford seguido de agitação. Para preparar o reagente de Bradford, foram dissolvidos 100 mg de comassie blue G em 50 mL de etanol 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85% e posteriormente esta solução é diluída em água deionizada até completar um litro e, então, filtrada em papel de filtro.

As determinações foram realizadas em duplicatas e absorvância foi medida a 595nm contra um branco (água deionizada). Paralelamente à dosagem de proteínas das frações solúveis de gavinha, perfazendo o total de nove amostras, foi feita uma curva padrão de soro albumina bovina com concentração de 5 a 30 μg que está na faixa de linearidade do método (Figura 2 - curva padrão de BSA).

3.6 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

Para analisar o perfil dos polipeptídeos das frações solúveis de gavinha de *Passiflora* sp, foi utilizado o Método de eletroforese em gel SDS - PAGE, poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (Laemmli, 1970). Géis em concentração 5 - 16% foram preparados entre placas de vidro conforme escrito por Studier (1973).

As amostras foram preparadas assepticamente (para não permitir contaminações por fontes externas), em tubos de polietileno com tampa, na proporção de 100 μl de amostra para 10 μl de tampão de amostra (TrisHCl pH=6,8 - 2,0mM; SDS 1%; Azul de bromofenol 0,25%; glicerol 10% e 10 μl de β - mercaptoetanol 143mM). Em seguida, os tubos foram fervidos durante 2 minutos, resfriados naturalmente em temperatura ambiente e estocados em freezer até o momento de ser aplicado em gel.

Os tubos foram retirados do freezer, descongelados naturalmente e as amostras foram aplicadas nos pocinhos dos géis utilizando microseringa (Hamilton) com capacidade máxima de 10 μl . Foram aplicados de cada amostra 8 μl e 2 μl do padrão SDS-6H -

Sigma que foi utilizado como referência de peso molecular relativo: miosina (205.000); β -galactosidase (116.000); fosforilase-b (97.400); albumina bovina (66.000); ovalbumina (45.000) e anidrase carbônica (29.000). A eletroforese foi iniciada ligando-se a cuba de eletroforese (Biorad – Power/Pac 1000 –110Volts) a uma fonte elétrica de 110Volts usando corrente de 25mA.

Após a corrida, os géis foram retirados cuidadosamente das placas e corados por 20 minutos com Comassie Blue R 0,1% em solução de metanol 50% e ácido acético 10%. Logo a seguir, foi realizado o processo de descoloração, onde os géis foram submergidos em solução descorante (metanol 30% e ácido acético 10%) por 30 minutos ou mais dependendo da necessidade de obtenção de géis mais claros.

Descorados, os géis foram colocados entre duas folhas de papel celofane, previamente embebidas em água. Estas folhas foram estendidas em bastidores, tomando o cuidado para ficarem bem esticados, para obtenção de melhor resultado. Após a secagem em temperatura ambiente, os géis totalmente secos foram recortados às margens de cada um, retirando o excesso de papel celofane, e então, cuidadosamente acondicionados em álbum de fotografias para evitar quaisquer danos ou destruição dos mesmos.

3. 7 - Determinação da Atividade Adenosina Trifosfatásica (ATPase) de gavinha de *Passiflora* sp

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

A reação foi realizada em tubos de ensaio de vidro codificados individualmente sendo que em cada um deles foi utilizado: 40 μ l de meio de reação (estoque) ao qual foi adicionado 90 μ l de água deionizada e 50 μ l de amostra. A reação foi iniciada pela adição de 20 μ l de ATP 10mM e incubada a 37°C durante 20 minutos.

Para interromper a reação, transcorrido o tempo de incubação, foi acrescentado 2 mL de solução AAM (Acetona P.A, Ácido Sulfúrico 5N e Molibdato de Amônia 10mM, nas proporções em volume, de 2:1:1, respectivamente), e daí agitado por 15 segundos em

agitador do tipo vórtex. Imediatamente em seguida, adicionou-se 200 μ l de ácido cítrico 1N e agitou-se novamente por mais 15 segundos.

É feito um branco para cada amostra. Ambos, amostras e brancos, foram feitos em duplicatas, aumentando o número de amostragem proporcionando melhores resultados.

Ao branco é adicionado os 20 μ l de ATP, imediatamente antes de interromper a reação com solução AAM. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Hitachi 2000) e as absorvâncias medidas a 355nm utilizando cubetas de quartzo.

Uma curva padrão de fosfato inorgânico (figura 3) é feita compreendendo uma faixa de 0 a 250 nmoles de ortofosfato, nesta faixa a absorvância em 355nm varia linearmente com a concentração de ortofosfato.

A atividade foi expressa em nanomoles de fosfato inorgânico liberado por mililitro de amostra por minuto (nmoles Pi/mL./ min)

4 - RESULTADOS

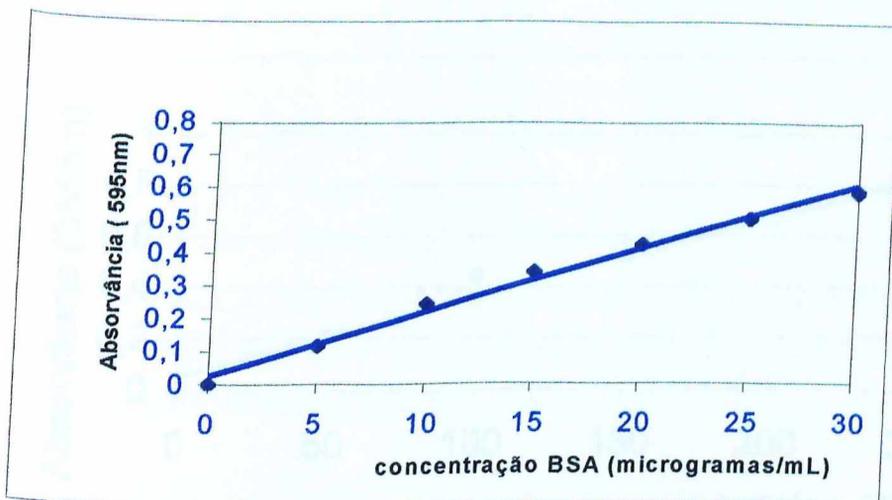


Figura - 2 - Curva Padrão de Dosagem de Soro Albumina Bovina

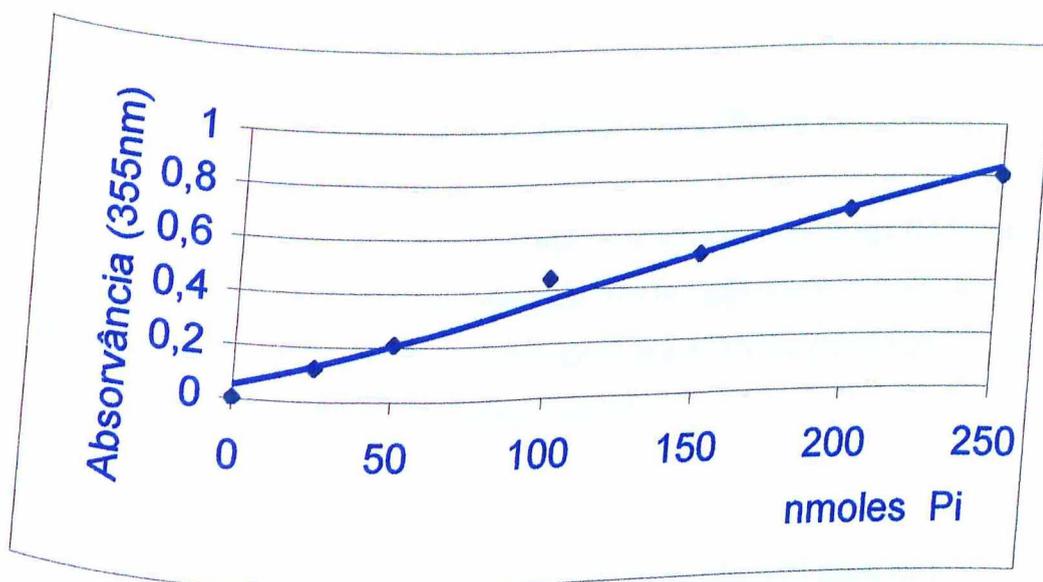


Figura - 3 - Curva de Dosagem de Fosfato

4.1 Caracterização da fração S₃ de gavinha de *Pasiflora* sp

4.1.1 – Atividade Mg-ATPásica e Ca-ATPásica de S₃

Os motores moleculares, assim como certas ATPases requerem cátions divalentes para expressar sua atividade, alguns destes motores apresentam maior atividade em presença de cálcio e outros em presença de magnésio. Conforme está mostrado na figura -4, a fração S₃ apresentou atividade Ca-ATPásica 60% maior que a atividade Mg-ATPásica. Na presença de Mg e Ca não ocorre a soma das atividades ATPásicas, sendo a atividade (Mg + Ca)-ATPásica cerca de 40% inferior à atividade Ca-ATPásica e 20% superior à atividade Mg-ATPásica.

4.1.2 - Efeito da força iônica na atividade Mg-ATPásica de S₃

A atividade Mg-ATPásica da fração S₃ é testada em presença de cloreto de sódio ou cloreto de potássio 300mM, apresentando uma redução de aproximadamente 28% em presença de cloreto de sódio em sua atividade Mg-ATPásica e cerca de 37% em presença de cloreto de potássio conforme apresenta a figura 5.

4.1.3 – Efeito de fluoreto de alumínio na atividade Mg-ATPásica de S₃

O alumínio pode ser considerado altamente tóxico para sistemas vegetais. Ele pode diminuir a proliferação celular e reduzir o crescimento. É responsável pela alteração da permeabilidade da membrana plasmática a íons divalentes, devido à sua altíssima afinidade pelos sítios ligantes de cálcio. O alumínio pode, também inibir a despolimerização de microtúbulos ativado por cálcio. O alumínio pode ainda, formar complexo com o fluoreto e esse complexo inibe diversas ATPases.

Conforme está mostrando a figura 6, o íon fluoreto quando testado isoladamente inibiu em 33% a atividade Mg-ATPásica de S_3 . Porém quando testado conjuntamente, íon alumínio ($AlCl_3$) e íon fluoreto (NaF), praticamente não alteraram a atividade Mg-ATPásica dessa fração. Isoladamente, o íon alumínio também não alterou a atividade Mg-ATPásica de S_3 .

4.1.4 - Efeito de alguns efetores sobre a atividade ATPásica de S_3

A atividade Mg-ATPásica é testada em presença de alguns efetores de atividade enzimática tais como: azida, triton x - 100 e vanadato de sódio. O triton x-100 é um estimulador de atividade ATPásica de dineína citoplasmática e a azida é um inibidor de F_1 -ATPase mitocondrial. A atividade Mg-ATPásica de S_3 , praticamente não é inibida por triton x -100 (0,2%) e nem por azida (1mM), como mostra a figura - 7.

O vanadato de sódio apresenta algumas semelhanças com o íon fosfato, sendo considerado um seu análogo e, é capaz de inibir a atividade enzimática de algumas ATPases. O vandato de sódio provocou na fração S_3 , inibição de aproximadamente 32% na atividade Mg-ATPásica em presença de $50\mu M$, 61% em $200\mu M$ e 78% de redução em presença de $1000\mu M$, como mostra a figura - 8.

4.1.5 – Atividade Mg-ATPásica e K / EDTA-ATPásica de S_3

Uma das características enzimáticas da maioria das miosinas é ser estimulada em ausência de cátions divalentes, por altas concentrações de íons potássio. A atividade Mg-ATPásica de S_3 não é estimulada na ausência de cátions divalentes pelo potássio em concentração de 600mM, como está apresentado na figura 9.

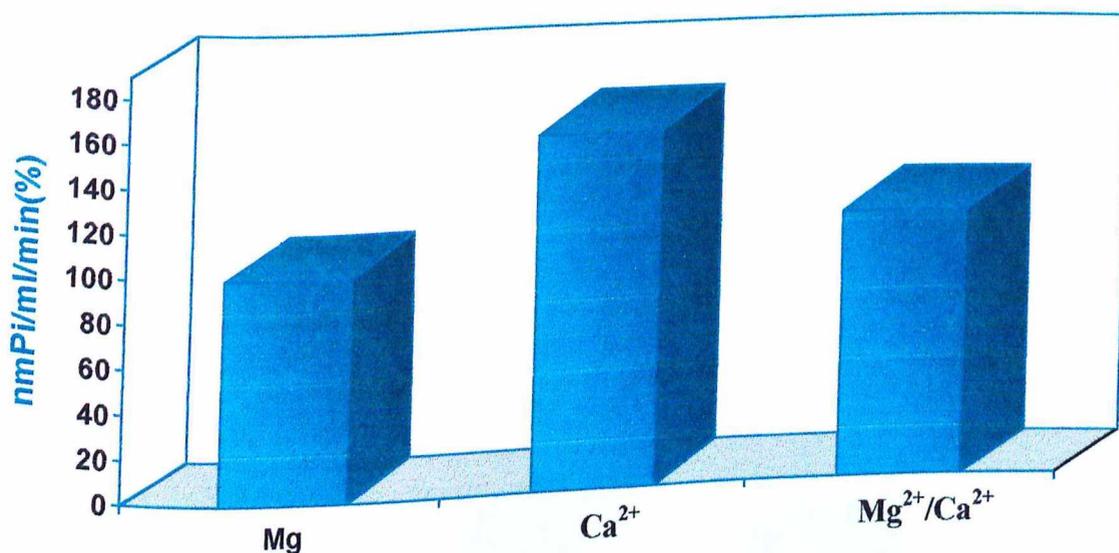


Figura – 4 Atividade Mg - ATPásica e Ca - ATPásica de S₃
50mL da fração S₃ é incubado em Meio de Reação I (Imidazol 25mM pH=7.5, DTT 1mM, EDTA 1mM, KCl 60mM) contendo onde indicado MgCl₂ 4mM e/ou CaCl₂ 2mM. As reações foram iniciadas com a adição de ATP 1mM (concentração final), incubadas a 37°C durante 20 minutos e interrompidas com 2mL da solução de dosagem. A atividade Mg-ATPásica é considerada 100%. Os valores representam a média da duplicata de 1 experimento, porém foram encontrados resultados similares em outro experimento em duplicata.

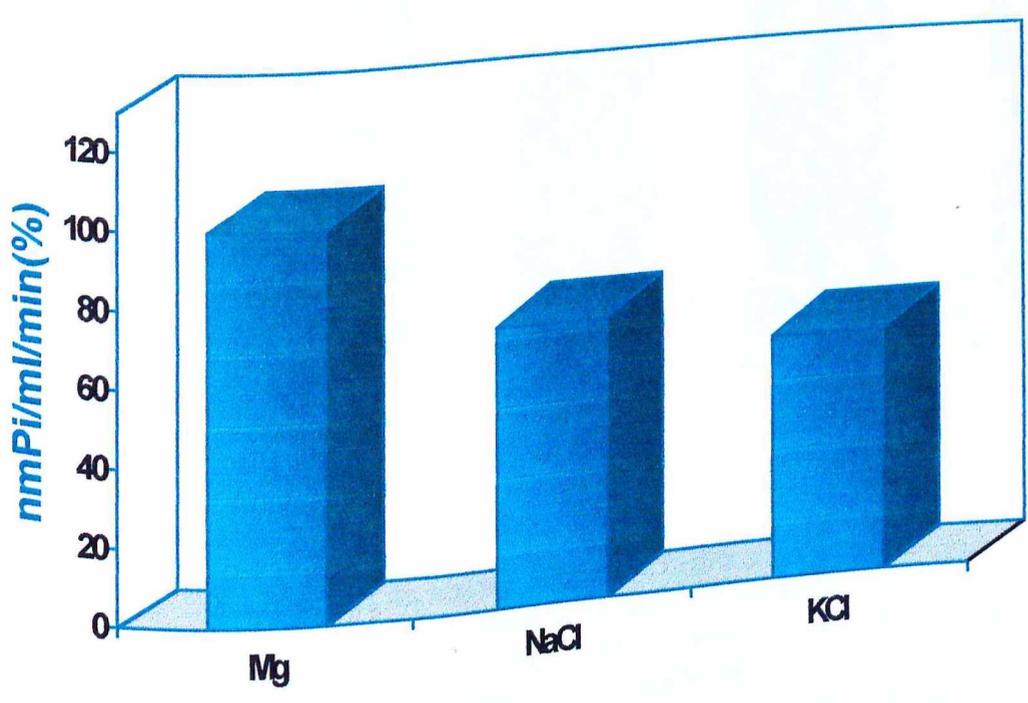


Figura – 5 Efeito de força iônica na atividade Mg – ATPásica de S₃
50mL da fração S₃ é incubado em Meio de Reação I (Imidazol 25mM pH=7.5, DTT 1mM, EDTA 1mM, KCl 60mM) contendo MgCl₂ 4mM e onde indicado NaCl ou KCl 0,3M. As reações foram iniciadas com a adição de ATP 1mM (concentração final), incubadas a 37°C durante 20 minutos e interrompidas com 2mL de solução de dosagem. A atividade Mg-ATPásica é considerada 100%. Os valores representam a média da duplicata de 1 experimento, porém foram encontrados resultados similares em outro experimento.

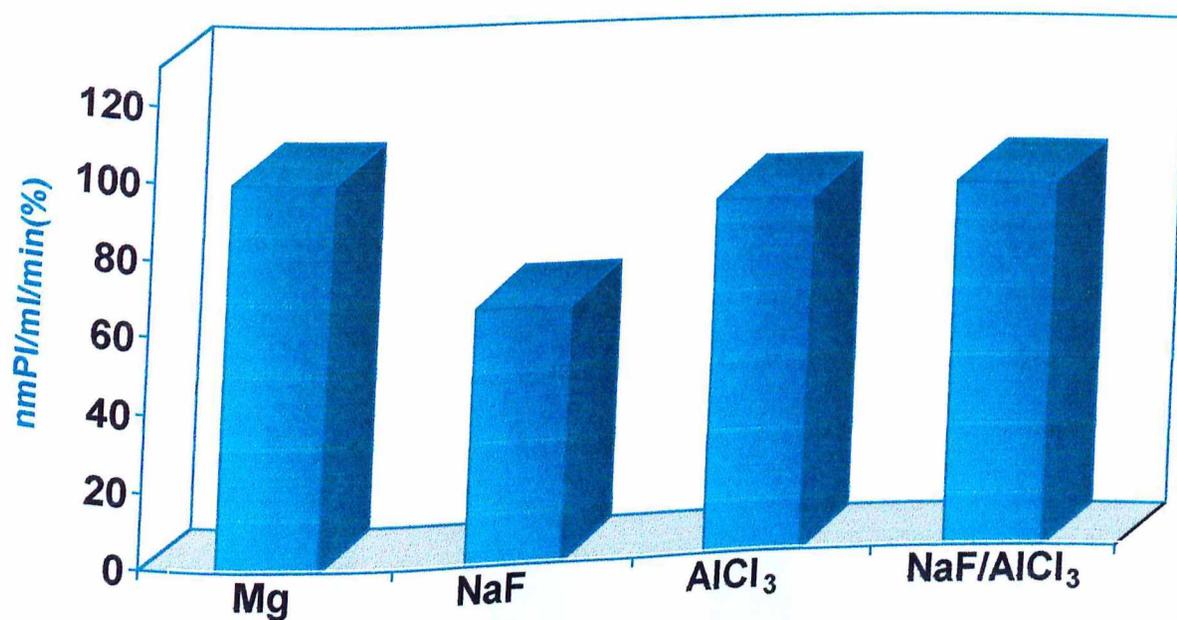


Figura – 6 Efeito da AlF_3 na atividade Mg – ATPásica de S_3
50mL da fração S_3 é incubado em Meio de Reação I (Imidazol 25mM pH=7.5, DTT 1mM, EDTA 1mM, KCl 60mM) contendo $MgCl_2$ 4mM e onde indicado $AlCl_3$ 0,5mM e/ou NaF 2,5mM. As reações foram iniciadas com a adição de ATP 1mM (concentração final), incubadas a 37°C durante 20 minutos e interrompidas com 2mL da solução de dosagem. Atividade Mg-ATPásica é considerada 100%. Os valores representam a média da duplicata de 1 experimento, porém foram encontrados resultados similares em 2 outros experimentos.

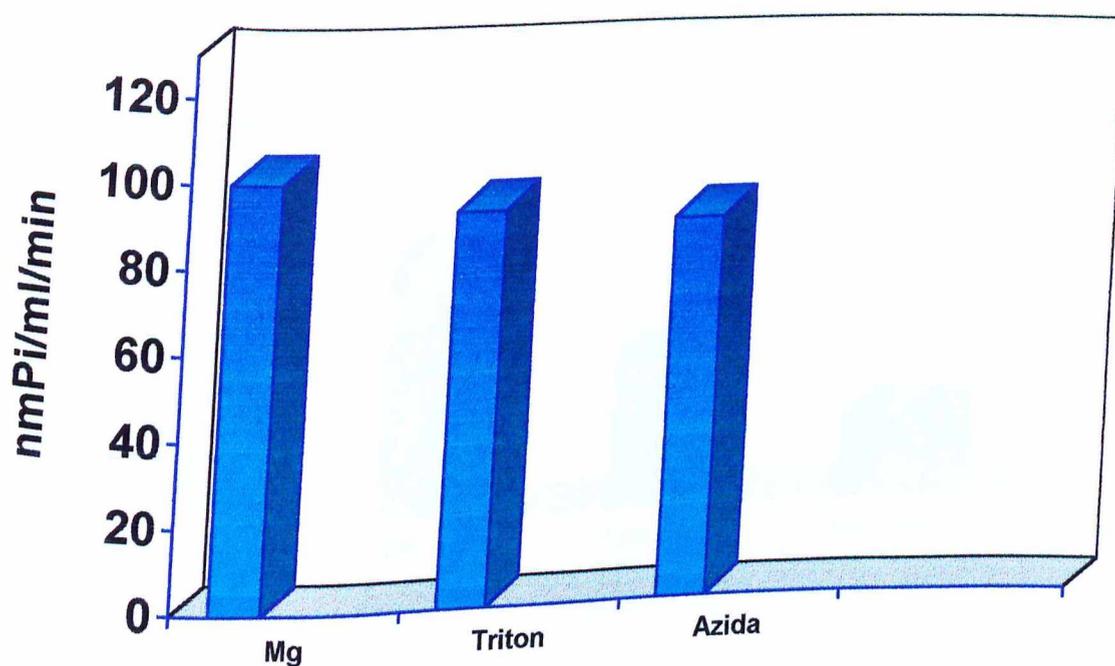


Figura – 7 Efeito de Triton e Azida sobre atividade ATPásica de S₃. 50µl da fração S₃ é incubado em Meio de Reação I (Imidazol 25mM pH=7.5, DTT 1mM, EDTA 1mM, KCl 60mM) contendo MgCl₂ 4mM e onde indicado Triton 0,2% ou Azida 1,0mM. A reação é iniciada com a adição de ATP 1mM (concentração final), incubada a 37°C durante 20 minutos e interrompida com 2mL da solução de dosagem. O magnésio é considerado como basal de 100%. Os valores representam a média da duplicata de 1 experimento, porém foram encontrados resultados similares em 2 outros experimentos.

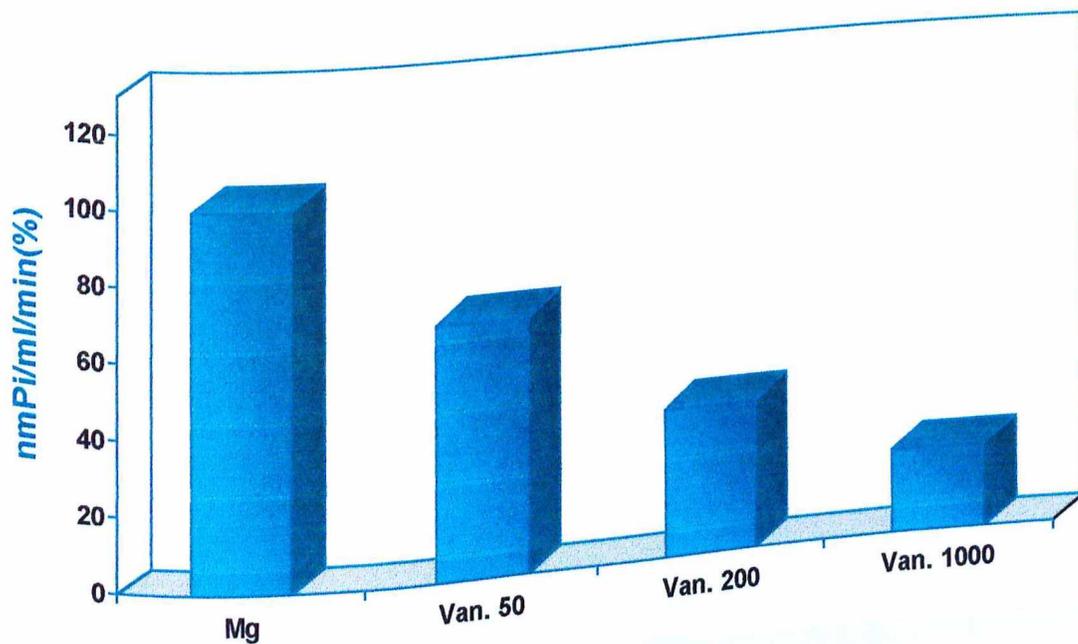


Figura – 8 Efeito de Vanadato na atividade Mg – ATPásica de S_3
50mL da fração S_3 é incubado em Meio de Reação I (Imidazol 25mM pH=7.5, DTT 1mM, EDTA 1mM, KCl 60mM) contendo $MgCl_2$ 4mM e onde indicado vanadato em suas concentrações de: 50, 200 e 1000 μ M. A reação é iniciada com a adição de ATP 1mM (concentração final), incubada a 37°C durante 20 minutos e interrompida com 2mL da solução de dosagem. A atividade Mg-ATPásica é considerada 100%. Os valores representam a média da duplicata de 1 experimento, porém foram encontrados resultados similares em 2 outros experimentos.

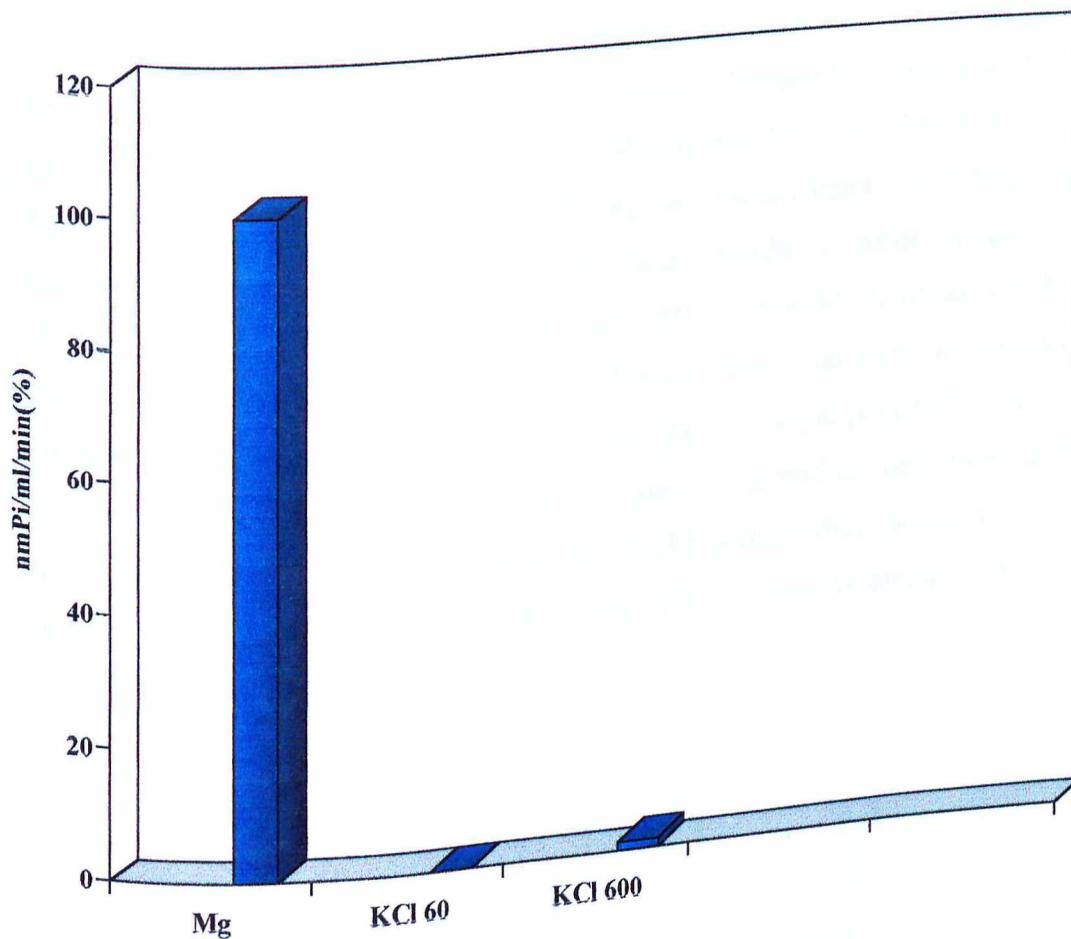


Figura -9 Atividade Mg - ATPásica e K/EDTA-ATPásica de S_3 .
50 μ l de S_3 é incubado em Meio de Reação I (Imidazol 25mM pH=7.5, DTT 1 mM, EDTA 1mM, KCl 60mM) contendo $MgCl_2$ 4mM ou em Meio de Reação II (Imidazol 25mM pH=7.5, EDTA 1mM, DTT 1mM) adicionado quando indicado KCl 60 ou 600 mM (concentrações finais). A reação é iniciada com adição de ATP 1mM (concentração final), incubada a 37°C durante 20 minutos e interrompida com 2mL de solução de dosagem. O magnésio é considerado como basal de 100%. Os valores representam a média da duplicata de 1 experimento, porém é encontrado resultados similares em outro experimento.

4.2 – Fracionamento de S₄ em Q – Sepharose

A fração sobrenadante S₄ obtida de gavinha de *Passiflora*, usando precipitação em baixo pH e fracionamento com sulfato de amônio (Método II), é aplicada em coluna de Q – Sepharose. A fração void e as frações eluídas com 200, 500, 1000 e 2000 mM de NaCl, foram analisadas quanto a atividade Mg - ATPásica (figura 10). A fração eluída com 500mM apresentou, dentre as demais frações eluídas, a maior atividade Mg – ATPásica, seguida pelas frações eluídas com 200 e 1000mM. A fração eluída com 2000mM não apresentou atividade Mg – ATPásica. Quanto ao perfil de polipeptídeos em SDS-PAGE (figura 11), pode ser observado que o principal polipeptídeo da fração eluída com 500mM apresenta peso relativo próximo ao da anidrase carbônica (29KDa). A fração eluída com 200mM apresenta duas bandas polipeptídicas próximas à anidrase carbônica, uma de baixo peso molecular e uma outra de aproximadamente 55KDa.

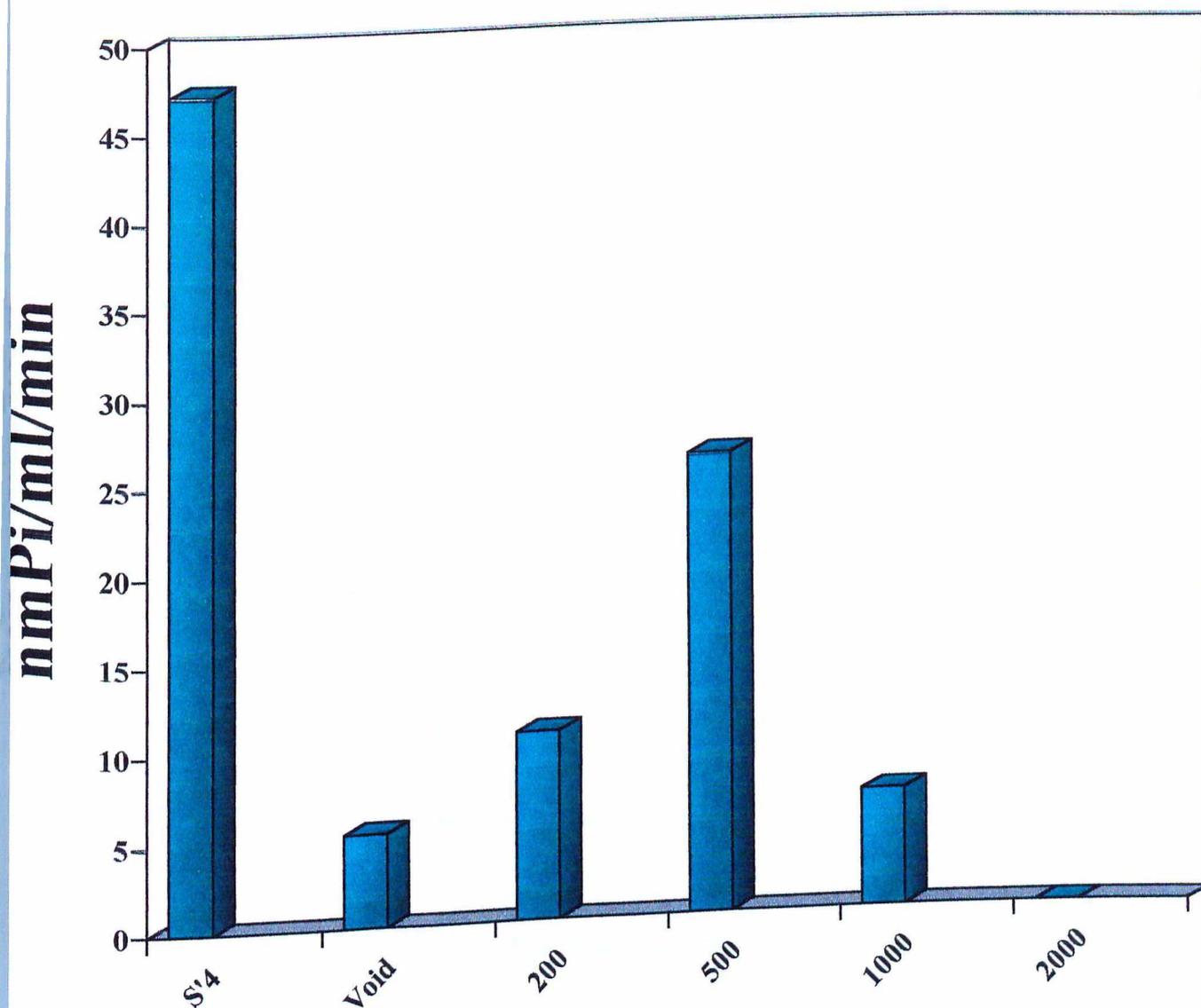


Figura - 10 Atividade Mg - ATPásica das frações da coluna de Q - Sepharose
50 μ l das frações da coluna de Q - Sepharose foram incubados em Meio de Reação I (Imidazol 25mM pH=7.5, DTT 1mM, EDTA 1mM, KCl 60mM) contendo MgCl₂ 4mM. A reação é iniciada com adição de ATP 1mM (concentração final), incubada a 37°C durante 20 minutos e interrompida com 2mL de solução de dosagem.

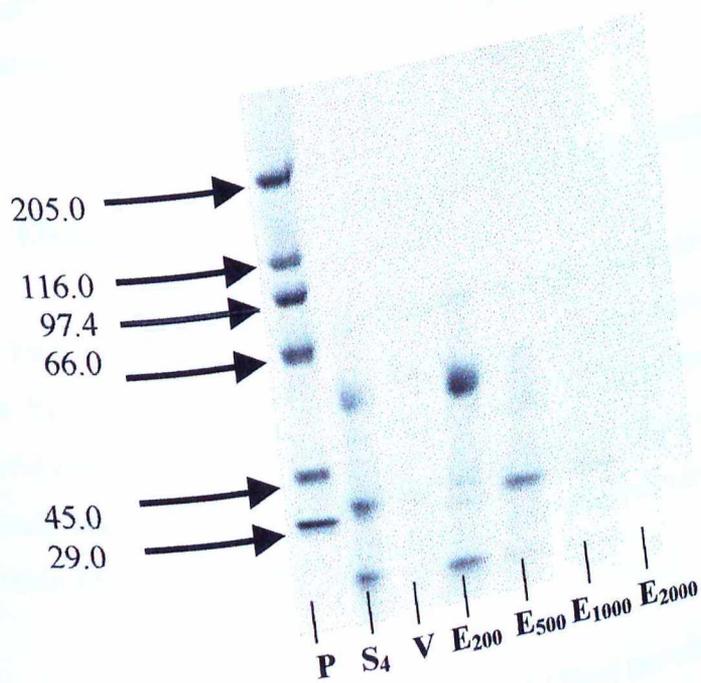


Figura - 11 SDS-PAGE das frações da coluna de Q-Sepharose
 No gel, foram aplicados $10\mu\text{l}$ de cada fração e $2\mu\text{l}$ de padrão em gel de poliacrilamida (5 - 6%) corado em comassie blue R e foi usado como padrão de referência de peso molecular relativo as seguintes proteínas: miosina (205.000); β -galactosidade (116.000); fosforilase-b (97.400); albumina bovina (66.000); ovalbumina (45.000) e anidrase carbônica (29.000).

4.3 – Atividade ATPásica de *Passiflora* sp é estimulada por um fator endógeno.

4.3.1 – Efeito da diálise sobre a atividade ATPase de S₃.

Na tentativa de eliminar o pigmento de cor amarelo-esverdeado da fração S₃, conforme fluxograma 1 (método I), esta fração foi submetida a 2 diálises com duas trocas consecutivas no seguinte tampão: Imidazol 25 mM pH=8.5, EDTA 0,1mM e DTT 0,1mM, sob refrigeração (4°C). Observou através da figura 12 que a atividade Mg - ATPásica é quase totalmente perdida. A diálise diminuiu a intensidade de cor do pigmento.

4.3.2 – Efeito S₃ fervida na atividade ATPásica de S₃ dialisada.

Para verificar se o fator de baixo peso molecular envolvido na atividade ATPásica da fração S₃ era termoestável, a fração S₃ é fervida durante 5 minutos e submetida à centrifugação de 40.000g/30min.4°C. A fração S₃ dialisada é incubada em meio de reação contendo Mg, na ausência e presença de S₃ fervida. Observou através da Figura - 13 que a atividade Mg – ATPásica de S₃ dialisada aumentou quando testada com S₃ fervida.

4.3.3 – Efeito do fator termoestável na ATPase parcialmente purificada

O fator termoestável é testado também, na fração ATPase parcialmente purificada em coluna de Q – Sepharose (fração com 500mM de NaCl). Essa fração e a fração S₃ dialisada foram incubadas na presença e ausência da fração S₃ fervida (figura 14). Observou que as atividades Mg – ATPásicas de S₃ dialisada, assim como a fração eluída com 500mM (coluna de Q – Sepharose) foram aumentadas quando testadas com o fator termoestável.

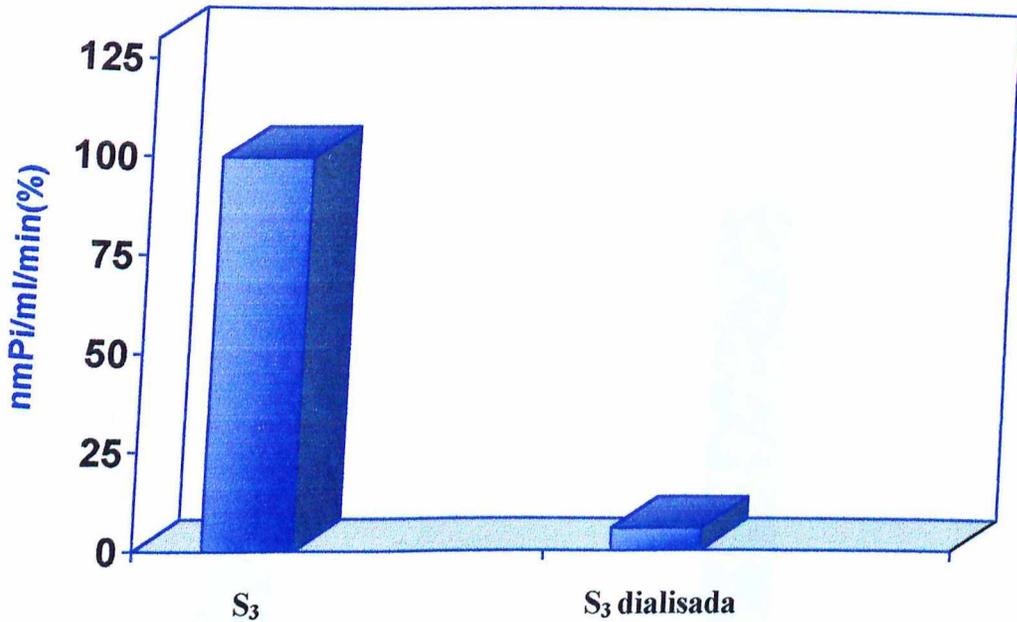


Figura – 12 Efeito da diálise sobre a atividade Mg – ATPásica de S₃
10µl da fração S₃ ou S₃ dialisada, foram incubados em Meio de Reação I (Imidazol 25mM pH=7.5, DTT 1mM, EDTA 1mM, KCl 60mM) contendo MgCl₂ 4mM. As reações foram iniciadas com adição de ATP 1mM (concentração final), incubadas a 37°C durante 20 minutos e interrompidas com 2mL de solução de dosagem. A atividade de S₃ foi considerada 100%.

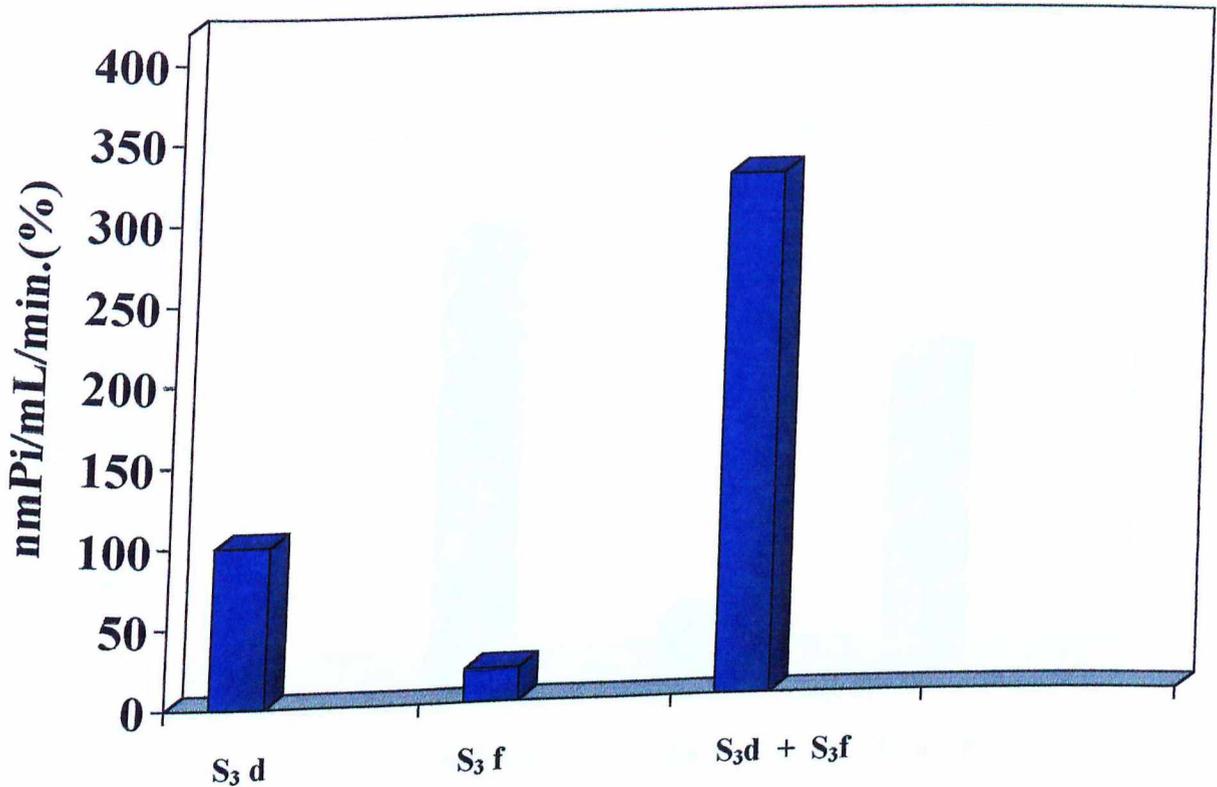


Figura -13 Efeito S₃ fervido na atividade ATPásica de S₃ dialisado. 10 μ l da fração S₃ dialisado foram incubados em Meio de Reação I (Imidazol 25mM pH=7.5, DTT 1mM, EDTA 1mM, KCl 60mM) contendo MgCl₂ 4mM na presença ou ausência de 10 μ l de S₃ fervido. No controle, 10 μ l de S₃ fervido foram incubados com 1mM de ATP, no mesmo meio de reação. As reações foram iniciadas com adição de ATP 1mM (concentração final), incubadas a 37°C durante 20 minutos e interrompidas com 2mL de solução de dosagem. A atividade de S₃ dialisado é considerada 100%.

5 - DISCUSSÃO

As gavinhas apresentam um movimento de curvatura que é um processo dependente da hidrólise da molécula do ATP (Jafe e Galston, 1966). Yong - Zé e Lung - Fei, 1989, identificaram actina e miosina em gavinha de ervilha, *Pisum sativum* L., sugerindo que a miosina é a ATPase responsável pelo evento de curvatura desta estrutura e esse movimento é dependente do sistema actomiosina.

Aqui neste trabalho foi obtido, a partir da fração solúvel de gavinha de *Passiflora* sp, utilizando precipitação em baixo pH, uma fração S₃ altamente enriquecida em atividade ATPásica. As ATPases em geral, necessitam de cátions divalentes para sua atividade. Algumas são mais ativas na presença de Mg²⁺, enquanto outras apresentam maior atividade na presença de Ca²⁺. A fração S₃, em presença de cálcio, apresentou atividade ATPásica 60% superior à atividade em presença de magnésio. Quando testados juntos, cálcio e magnésio, observou - se que as atividades Mg e Ca - ATPases não foram somadas. Há até uma leve inibição da atividade Ca - ATPásica pelo magnésio. Isto sugere que as atividades Mg - ATPásica e Ca - ATPásica não são devidas à ATPases distintas.

A alta força iônica, que inibe sensivelmente algumas ATPases como dineína de cérebro (Shpetner et al., 1988), inibiu cerca de 30% da atividade Mg - ATPásica da fração S₃, essa inibição ocorreu tanto com NaCl como KCl 300mM, portanto dineína não está presente em nossa preparação.

Fluoreto de alumínio, azida e triton X - 100, também são conhecidos por afetar diferentes ATPases. A azida inibe tanto a F1 - ATPase mitocondrial (Murphy et al., 1983) como apirases (Knowles & Nagy, 1999). O triton X- 100 é um estimulador da atividade ATPásica de dineína citoplasmática e o fluoreto de alumínio inibe a dinamina (Sheptner & Vallee, 1992) e também outras ATPases. A ATPase da fração S₃ não foi inibida por nenhum desses fatores (figuras: 6 e 7), sugerindo que F1 ATPase e dinamina também não estão presentes em nossa preparação.

O vanadato é um oxiânion com estrutura similar ao ion fosfato, por isso, ele é um forte inibidor de várias ATPases. A utilização de vanadato de sódio em concentrações

próximas a $5\mu\text{M}$ provoca completa inibição da motilidade ciliar e flagelar, representando um potente inibidor de dineínas (Gibbons et al., 1978 e 1987). Sabe-se também que as cinesinas são inibidas cerca de 50 – 60% quando tratadas em presença de $60\mu\text{M}$ deste efector (Vallee e Sheptner, 1990). A fração S_3 apresentou inibição crescente da atividade Mg – ATPásica com o aumento da concentração de vanadato de sódio (Figura 8). A inibição de apenas 30% da atividade Mg – ATPásica com vanadato $50\mu\text{M}$ também sugere que dineína não está presente em nossa fração.

A fração S_3 é avaliada quanto a presença de atividade K/EDTA – ATPase, uma atividade característica das miosinas. Essas ATPases motoras apresentam atividade K/EDTA – ATPásica bem superior à atividade Mg – ATPásica. Para verificar a atividade K/EDTA – ATPásica compara-se a atividade ATPásica na presença de baixa e alta concentração de potássio, KCl 60 e 600mM respectivamente, em meio de reação contendo EDTA (ausência de cátions divalentes). A figura 9, mostra que a fração S_3 , praticamente não apresenta atividade K/EDTA – ATPásica. Isto sugere a ausência de miosinas em nossa preparação.

A fração S_3 de gavinha de *Passiflora* sp, possui um fator endógeno, que estimula a sua atividade ATPásica. Este fator é perdido quando a fração S_3 é dialisada, ou seja, esse fator possui baixo peso molecular. Esse processo de diálise é acompanhado por uma grande perda da atividade ATPásica. Grande parte da atividade ATPásica perdida é recuperada, quando a fração S_3 dialisada é incubada com a fração S_3 fervida. Isto mostra que o fator estimulador da ATPase de gavinha de *Passiflora* sp é um fator termoestável.

A fração ATPase S'_4 obtida usando precipitação em baixo pH e fracionamento com sulfato de amônio 40% (fluxograma 2- Método II) é separada em coluna de Q – Sepharose. Nesse processo, observa-se que a maior parte da atividade ATPásica é recuperada na fração eluída com 500mM de NaCl. A atividade Mg – ATPásica dessa fração também é estimulada pelo fator termoestável. Parte da atividade ATPásica foram recuperadas nas frações 200 e 1000mM. O principal polipeptídeo da fração eluída com 500mM, apresenta mobilidade relativa próxima a da anidrase carbônica. Isto sugere que a ATPase de nossa fração possui cerca de 29Kda. Dois polipeptídeos com mobilidade relativa similar à anidrase carbônica também estão presentes na fração eluída com 200mM de NaCl. Nessa fração observa - se

também um polipeptídeo de baixo peso molecular e uma outra banda polipeptídica de aproximadamente 55KDa.

6 – CONCLUSÕES

Fração solúvel de gavinha de *Passiflora* sp possui uma ATPase que apresenta propriedades distintas de dineína, miosinas, F1 – ATPase mitocondrial e apirase

Fração solúvel de gavinha de *Passiflora* sp possui um fator termoestável e de baixo peso molecular, que estimula atividade ATPásica endógena

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅSTROM, H., SORRI, O RAUDASKKOSKI, M. Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and generative cell in tobacco pollen tubes. *Sex Plant Reprod.* v.8, p.61 - 69, 1995.
- BAKER, J. P., TITUS, M. A. Myosins: matching functions with motors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.10, p.80-86, 1998.
- BERNACCI, L.C. **Passifloraceae**. In: SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente. *Espécies da flora ameaçadas de extinção no Estado de São Paulo*. São Paulo, 1998.
- BERNACCI, L.C., VITTA, F.A. *Flora Fanerogâmica da reserva do parque estadual das fontes do Ipiranga*. São Paulo, *Hoehnea*. v.26, n.2, p. 1-13, 1999.
- BLOCK, S. M. Kinesin: What Gives? *Cell.*, v.93, p. 5-8, 1998.
- BOCKELMANN, C., LISS, H., WEILER E. W. Evidence for a functional P-Type H⁺ - ATPase at the rough endoplasmic reticulum of *Bryonia dioica* Jacq. tendrils. *J. Plant Physiol.*, v.152, p. 194-198, 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.*, v.72, p. 248-254, 1976
- BRADY, S. T. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor - *Cell.*, v.40, p 559-569, Mar. 1985.
- CARRAWAY, K.L., CARRAWAY, C. AC. Membrane - cytoskeleton interactions in animal cells. *Biochimica et Biophysica Acta.*, v.988, p. 147-171, 1989.

- CERVI, A.C. **Passifloraceae**. In: RIZZO, J.A. *Flora do Estado de Goiás*. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1986. v. p. 1-45. Coleção Rizzo.
- CHENEY, R.E., O'SHEA, M.K., HEUSER, J.E., COELHO, M.V., WOLENSKI, J.S., ESPREÁFICO, E.M., FORSHER, P., LARSON, R.E., MOOSEKER, M.S. Brain myosin - V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell.*, v.75, p. 13-23, 1993a.
- CHENEY, R. E., RILEY, M. A., MOOSEKER, M. S. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell Motil. Cytoskel.*, v.24, p. 215-223, 1993b.
- CHENEY, R. E., MOOSEKER, M. S. Unconventional myosins. *Cur. Opin. Cell Biol.*, v.4, p. 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.*, v.46, p. 797-822, 1977.
- COHN, S. A., INGOLD, A. L., SCHOLEY, J. M. Correlation between the ATPase and microtubule translocating activities of sea urchin eggs kinesin. *Nature (lond.)*, v.328, p. 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.*, v.269, p. 22913-22916, 1994.
- CONDEELIS, J. S. The Identification of F Actin in the pollen tube and protoplast of *Amaryllis belladonna*. *Exp. Cell Res.*, v.88, p.435-438, 1974.

- CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. Ney York: Columbia University, 1262p, 1981
- DEL CASINO, C., LI YQ, MOSCATELLI, A., SCALI, M., TIEZZI, A., CRESTI, M. Distribution of microtubules during the growth of tabacco pollen tubes. *Biol. Cell.*, v.79, p.125 – 132, 1993.
- ENDOW, S. A., TITUS, M. A. Genetic approaches to molecular motors. *Annual Reviews Inc.*, v.8, p. 29–65, 1992.
- ESCOBAR, L. Passifloraceae: *Passiflora* subgêneros *Tacsonia*, *Rathea*, *Manicata* & *Distephana*. *Flora de Colombia.*, . v.10, p. 1-138, 1988
- ESHEL, D., URRESTARAZU, L. A., VISSERS, S., JAUNIAUX, J. C., VAN VLITED-REEDIJK, J. C., PLANTA, R. J., GIBBONS, I. R. Cytoplasmatic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.90, p. 11172-11176, 1993.
- FERREIRA, A. B. H. Novo Aurélio XXI: O dicionário da língua portuques. 3 ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 1999. 2128p. p.977.
- FRIEDMAN, D.S., VALE, R.D. Single-molecule analysis of kinesin motility reveals regulation by the cargo – binding tail domain. *Nature Cell Biology.*, v.1, p. 293–297, 1999
- 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.*, v.75, p. 2220–2224, 1978.

- GIEPMANS, B. N. G., MOOLENAAR, W. H. The gap junction protein connexin 43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens - 1 protein. *Current Biology.*, v.8, p. 931-934, 1998.
- GOLDMAN, Y. E. Wag the Tail: Structural dynamics of actomyosin. *Cell.*, v.93, p. 1-4, Apr. 1998.
- GOODSON, H. V., SPUDICH, J. A. Molecular evolution of the myosin family: relationships derived from comparisons of amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.90, p. 659-663, 1993.
- HAMMER III, J. A. Novel myosins. *Trends Cell Biol.*, v.1, p. 50-56, 1991.
- HASSON, T., MOOSEKER, M. S. Molecular motors, membrane movements and physiology: emerging roles for myosins. *Curr. Biol.*, v.7, p. 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.*, v. 113, p. 313-317, 1981.
- HESLOP - HARRISON, J. e HESLOP - HARRISON, Y. Cytoskeletal elements, cell shaping and movement in the Angiosperm pollen tube. *Journal of Cell Science.*, v.91, p. 49-60, 1988.
- HESLOP - HARRISON, J., HESLOP - HARRISON, Y. Myosin associated with the surfaces of organelles, vegetative nuclei and generative cells in Angiosperm pollen grains and tubes. *Journal of Cell Science.*, v.94, p. 319-325, 1989.
- HIROKAWA, N. Organelle transported along microtubules - the role of KIFs. *Trends in Cell Biology.*, v.6, p. 135-141, 1996

- HIROKAWA, N. Kinesin and Dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science.*, v.279, p. 519-526, Jan.1998
- HIROKAWA, N., NODA, Y. e OKADA, Y . Kinesin and dynein superfamily protein in organelle transport and cell división. *Curr. Biol.*, v.10, p. 60-73, 1998.
- HODE, T., COPE, M. J. T. V. The myosin family tree. *Journal of Cell Science.*, v.113, p.3353-3354, 2000.
- JAFE, M.J., GALSTON, A.W. Physiological studies on pea tendrils II: the role of light and ATPase in contact coiling. *Plant Physiol.*, v.41, p. 1152-1158, 1966.
- KABSCH, K., VANDEKERCKHOVE, J. Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol.Struct.*, v.21, p. 49-76, 1992.
- KINKEMA, M., WANG, H., SCHIEFELBEIN, J. Molecular analysis of the myosin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology.*, v.26, p. 1139-1153, 1994.
- KOONCE, M. P., GRISSOM, P. M., McINTOSH, J. R. Dynein from *Dictyostelium*: primary struture comparisons between a cytoplasmatic motor enzyme and flagellar dynein. *J. Cell. Biol.*, v.119, p. 1597-1604, 1992.
- KORN, E. D., HAMMER, J. A. Myosins of nonmuscle cell. *Annu. Rev. Biohys. Chem.*, v.17, p. 23-45, 1988.
- KUZNETSOV, S. A., GELFAND, V. I. Bovine brain kinesin is a microtubule – activated ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.83, v. 8530-8534, 1986.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.

- LANCELLE, S. A., CRESTI, M., HEPLER, P. K. Ultrastructure of cytoskeleton in freeze – substituted pollen tubes. *Protoplasma*. v. 140, p. 141-150, 1987
- LEY, R. J., PORTER, M. E., SCHOLEY, J. M., McINTOSH, J. R. Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*. *Cell*, v.51, p. 309-318; 1987.
- LINGREL, J. B. , KUNTZWEILER, T. Na^+ , K^+ - ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, v.269, n°, p. 19659–19662, Aug. 1994.
- LUI, G – Q., CAI, G., DEL CASINO, C., TIEZZI, A. E., CRESTI, M. Kinesin – related polypeptide is associated with vesicles from *Corylus avellana* pollen. *Cell Motil. Cytoskeleton*. v.29, p. 155–166, 1994.
- MA, Y-Z., YEN, L-F. Actin and Myosin in Pea Tendrils. *Plant Physiol.*, v.89, p. 586–589, Aug. 1988.
- McAFFREY, G., VALE, R. D. (Review). Identification of a kinesin-like microtubule-based motor protein in *Dictyostelium discoideum*. *EMBO J.*, v.8, p. 3229-3234, 1989.
- MERMALL, V., POST, P. L., MOOSEKER, M. S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. *Science.*, v.279, p. 527–533, Jan. 1998.
- MILLER, D. D., SCORDILIS, S. P., HEPLER, P. K. Identification and localization of three classes of myosins in pollen tubes of *Lilium longiflorum* and *Nicotiana glauca*. *J. Cell Sci.*, v.108, p. 2549–2653, 1995.
- MOOSEKER, M. S., CHENEY, R. E. Unconventional myosins. *Rev. Cll Dev. Biol.*, v.11, p. 633-675, 1985.

- MOSCATELLI, A., DEL CASINO, C., LOZZI, L., CAI, G., SCALI, M., TIEZZI, A., CRESTI, M. High molecular weight polypeptides related to dynein heavy chains in *Nicotiana Tabacum* pollen tubes. *J. Cell Sci.*, v.108, p. 1117–1125, 1995.
- MOSCATELLI, A., CAI, G., LIU, G-Q., TIEZZI, A., CRESTI, M. Dynein – related polypeptides in pollen and pollen tubes. *Sex Plant Reprod.*, v.9, p. 312–317, July, 1996.
- MOSCATELLI, A., CAI, G., CIAMPOLINI, F., CRESTI, M. Dynein heavy chain – related polypeptides are associated with organelles in pollen tubes of *Nicotiana Tabacum*. *Sex Plant Reprod.*, v.11, p. 31–40, Nov. 1997.
- NIXON, R. A. The slow axonal transport of cytoskeletal proteins. *Curr. Biol.*, v.10, p. 97–92, 1998
- OGAWA, K., MOHRI, H. A dynein motor superfamily. *Cell Struct. Funct.*, v.21, p. 343–349, 1996.
- OSTAP, E. M., POLLARD, T. D. Biochemical kinetic characterization of the *Acanthamoeba* myosin – I ATPase. *J. Cell Biol.*, v.132, p. 1053–1060, Mar. 1996.
- 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 (Lond.)*, v.330, p. 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.*, v.105, p. 1273–1282, Sept. 1987.
- PASCHAL, B. M., VALLE, R. B. Retrograde transport by the microtubule associated protein MAP 1C. *Nature.*, v.330, p. 181–183, Nov. 1987.

- PIERSON, E. S., CRESTI, M. Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tube. *Int. Rev. Vytol.*, v.140, p. 73-125, 1992.
- POLLARD, T. D. Myosin purification and characterization. *Methods Cell Biol.*, v.24, p. 333-371, 1982.
- POLLARD, T. D., KORN, E. D. *Acanthamoeba Myosin*. *The Journal of Biological Chemistry.*, v.248, p. 4682 – 4690, July. 1973.
- POLLARD, T. D., DOBERSTEIN, S. K., ZOT, H. G. Myosin I. *Annu. Rev. Physiol.*, v.53, p. 653 – 681, 1991.
- POLLARD, T. D., KORN, E. D. *Acanthamoeba myosin I*. Isolation from *Acanthamoeba castellani* of an enzyme similar to muscle myosin. *J. Biol. Chem.*, v.248, p. 4682-90, 1993.
- PRATT, M. M., HISANAGA, S., BEGG, D. A. An improved purification method for cytoplasmic dynein. *J. Cell Biochem.*, v.26, p. 19-33, 1984.
- REDDY, A. S. N., NARASIMHULU, S. B., SAFADI, F., GOLOKIN, M. A plant kinesin heavy chain – like protein is a calmodulin – binding protein. *Plant J.*, v.10,n.1, p. 9-21, 1996.
- ROBINSON, L. J. E MARTÍN, T. F. Docking and Fusion in Neurosecretion. *Curr. Biol.*, v.10, p. 483-492, 1998.
- SCHMID, S. L., MCNIVEN, M. A., DE CAMILLI, P. Dynamin and its partners: a progress report. *Curr. Cell. Biol.*, v.10, p. 504-512, 1998.

- SCHOLEY, J., PORTER, M. E., GRISSOM, P. M., McINTOSH, J. R. Identification of kinesin in sea eggs and evidence for its localization in the mitotic spindle. *Nature*, v.318, p. 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.*, v.107, p. 1001-1009, 1988.
- SCHROER, T. A., STEUER, E. R., SHEETZ, M. P. Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles. *Cell*, v.56, p. 937-946.
- SHPETNER, H. S., PASCHAL, B. M., VALLEE, R. B. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). *J. Cell Biol.*, v.107, p. 1001-1009, Sept. 1988.
- STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early rna(s) and protein on slab gels. *J. Mol. Biol.*, v.79, p. 237-248, 1973.
- TANG, X., HEPLER, P. K., SCORDILIS, S. P. Immunocytochemical and immunocytochemical identification of a myosin heavy chain polypeptide in *Nicotiana* pollen tubes. *J. Cell. Sci.*, v.92, p. 569-574, 1989.
- TITUS, M. A. Motor Proteins: Myosin V - The multi-purpose transport motor. *Curr. Biol.*, v.10, p. 504-512, 1998.
- VALE, R. D., SCHNAPP, B. J., REESE, T. S. & SHEETZ, M. P. Movement of Organelles Along Filaments Dissociated from the Axoplasm of the Squid Giant Axon. *Cell*, v.40, p. 449-454, Feb. 1985.
- VALE, R. D., REESE, T. S., SHEETZ, M. P. Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility. *Cell*, v.42, p. 39-50,

Aug. 1985.

- VALE, R. D., SCHNAPP, B. J., MITCHISON, T., STEUER, E., REESE, T. S., SHEETZ, M. P. Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell.*, v.43, p. 623-632, Dec. 1985.
- VALLEE, R. B., Sheetz, M. P. Targeting of motor proteins. *Science.*, v.271, p. 1539-1543, 1996.
- VALLEE, R. B., SHPETNER, H. S. (Review). Motor protein of cytoplasmatic microtubules. *Annu. Rev. Biochem.*, v.59, p. 909-932, 1990.
- VALLEE, R. B., SHPETNER, H. S., PASCHAL, B. M. The role of dynein in retrograde axonal transport. *Tins.*, v.12, p. 66-70, 1989.
- VALLEE, R. B. Cytoplasmatic dynein: advances in microtubule-based motility (Review). *Trends Cell Biol.*, v.1, p. 25-29, 1991.
- WALTER, R. B., SHEETZ, M. P. Cytoplasmic microtubule-associated motors. *Ann. Rev. Biochem.*, v.62, p. 429-451, 1993.
- WARRICK, H. M., SPUDICH, J. A. myosin structure and function in cell motility. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, v.3, p. 379-421, 1987.
- YANG, J. T., LAYMOM, R. A., GOLDSTEIN, L. S. B. A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell.*, v.56, p. 879-889, 1989.
- YONG-ZE, M., YEN, L. Actin and myosin in pea tendrils. *Plant Physiol.*, v.89, p. 586-589, 1989.

SUMMARY

Tendrils are highly dynamic structures whose spiral movement is based on ATP-dependent processes, suggesting the involvement of ATPases in this process. In this study, our objective was to isolate ATPase from *Passiflora* sp. The tendril from *Passiflora* sp. was made homogeneous in Imidazole HCl buffer pH 8.5 with protease inhibitors (EDTA and PMSF) and centrifuged (40,000 g/40 min), the ATPase fraction in pH 4.5 and the subsequently treated precipitate with ammonium sulfate and dialysed and characterized enzymatically. This fraction presented Ca-ATPase activity 60 percent bigger than Mg-ATPase activity, but in the presence of Ca²⁺ and Mg²⁺ activity was not plus, suggesting distinct ATPases. The Mg-ATPase activity was inhibited about 30 percent in the presence of high ionic force (NaCl 0.3M and KCl 0.3M). Aluminium fluoride did not modify its Mg-ATPase activity, but the fluoride ion inhibited about 33 percent the Mg-ATPase activity. The Mg-ATPase activity was reduced with vanadate 50, 200 and 1000 µM, with respectively 32, 61 and 78 percent of reduction. The azide and Triton X-100 did not modify its activity suggesting distinct F1 ATPase and dynein was not present in this preparation. The absence of K/EDTA-ATPase suggests myosin was not present in this preparation. The dialysis of the ATPase fraction caused a sensible reduction in the Mg-ATPase activity, this activity was restored when the soluble fraction dialysed was incubated with soluble fraction boiled.

Our fraction was centrifuged and applied to a Q-Sepharose column, which was treated with 0.2M NaCl and subsequently, the ATPase activity was eluted with 0.5M NaCl. The main polypeptide in this fraction with SDS-PAGE presented Mr about 29 kDa. The Mg-ATPase activity of this fraction is stimulated for soluble fraction boiled.

Then we obtained a soluble fraction of ATPase from *Passiflora* sp. tendril that is stimulated for one endogenous factor heat stably.