

## SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Efeito de Íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  em Atividade Ca-ATPásica Isolada de Larvas de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae)

DECIVALDO S. DIAS E MILTON V. COELHO

Instituto de Genética e Bioquímica, Univ. Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Bloco 2E-39b, Av. Pará, 1720, 38405-320, Uberlândia, MG, mvcoelho@ufu.br

*Neotropical Entomology* 36(1):065-069 (2007)

Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  Ions in Ca-ATPase Activity Isolated from *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae) Larvae

**ABSTRACT** - ATPases, an important target of insecticides, are enzymes that hydrolyze ATP and use the energy released in that process to accomplish some type of cellular work. *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) larvae possess an ATPase, that presents high Ca-ATPase activity, but no Mg-ATPase activity. In the present study, the effect of zinc and copper ions in the activity Ca-ATPase of that enzyme was tested. More than 90% of the Ca-ATPase activity was inhibited in 0.5 mM of copper ions or 0.25 mM of zinc ions. In the presence of EDTA, but not in the absence, the inhibition by zinc was reverted with the increase of calcium concentration. The inhibition by copper ions was not reverted in the presence or absence of EDTA. The Ca-ATPase was not inhibited by treatment of the ATPase fraction with copper, suggesting that the copper ion does not bind directly to the enzyme. The results suggest that zinc and copper ions form a complex with ATP and bind to the enzyme inhibiting its Ca-ATPase activity.

**KEY WORDS:** ATPase, inhibition, EDTA, zinc, copper

**RESUMO** - As ATPases, um importante alvo de inseticidas, são enzimas que hidrolisam o ATP e utilizam a energia liberada no processo para realizar algum tipo de trabalho celular. A larva de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) possui uma ATPase que apresenta alta atividade Ca-ATPásica, mas não expressa atividade Mg-ATPásica. Nesse trabalho, foi testado o efeito de íons zinco e cobre na atividade Ca-ATPásica dessa enzima. Mais de 90% da atividade Ca-ATPásica foi inibida em 0,5 mM de íons cobre ou 0,25 mM de íons zinco. Na presença de EDTA, mas não na sua ausência, a inibição por zinco foi revertida pelo aumento da concentração de cálcio. A inibição por íons cobre, não foi revertida nem na presença e nem na ausência de EDTA. O tratamento da fração ATPase com cobre, previamente ao ensaio de atividade ATPásica, não inibiu a atividade Ca-ATPásica sugerindo que o íon cobre não liga diretamente a enzima. Os resultados sugerem que íons zinco e cobre formam complexo com o ATP e se ligam à enzima inibindo sua atividade Ca-ATPásica.

**PALAVRAS-CHAVE:** ATPase, inibição, EDTA, zinco, cobre

Larvas de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) atacam várias espécies vegetais dentre as quais a palmeira babaçu (*Orbygnia* spp.). Essa palmeira é um dos principais recursos oleíferos nativos do mundo e um dos principais produtos extrativos do Brasil. Ela ocupa cerca de 18 milhões de ha no país e desempenha um papel importante na vida de milhares de pessoas, principalmente, nas regiões Norte, Nordeste e Centro do país (May *et al.* 1985).

ATPases são enzimas que hidrolisam o ATP e utilizam a energia liberada nesse processo para realizar algum tipo de trabalho celular. O complexo formado pelo ATP e um cátion bivalente, em geral o magnésio, constitui o substrato dessas enzimas. Algumas ATPases são proteínas integrais de

membrana como a Na/K-ATPase (Lingrel & Kuntzweiler 1994) e a Ca-ATPase (Carafoli 1997), enquanto outras se encontram no citoplasma como os motores moleculares miosina (Krendel & Mooseker 2005) e cinesina (Sablin 2000).

Recentemente, foi obtida uma fração enriquecida em atividade ATPase a partir de larva de *P. nucleorum*. A enzima de *P. nucleorum* expressa alta atividade Ca-ATPásica, mas praticamente não apresenta atividade Mg-ATPásica, que é apenas 6% da atividade Ca-ATPásica (Cruz & Coelho submitted). Não está claro, ainda, qual a enzima é a responsável pela atividade ATPase dessa fração, mas algumas propriedades da atividade enzimática indicam a participação de algum membro da família das miosinas. A fração ATPase exhibe, por exemplo, atividade

K/EDTA-ATPase (Cruz & Coelho in press), uma atividade expressa apenas por membros da família das miosinas (Ostlund *et al.* 1978, Pollard 1982a). De modo semelhante a enzima isolada de *P. nucleorum*, as miosinas não expressam atividade Mg-ATPásica na ausência de F-actina e algumas apresentam alta atividade Ca-ATPásica. A baixa sensibilidade da atividade enzimática dessa fração ao vanadato também é característica de miosinas. Enquanto ATPases, como Na/K-ATPase (Cantley *et al.* 1977), Ca-ATPase (Marín *et al.* 1999), dineína (Gibbons *et al.* 1978, Shpetner *et al.* 1988, Yokota & Mabuchi 1994) e cinesina (Kuznetsov & Gelfand 1986), apresentam 50% de inibição em concentrações de vanadato inferiores a 50  $\mu\text{M}$ , a ATPase isolada de *P. nucleorum* apresentou apenas 30% de inibição por vanadato a 200  $\mu\text{M}$  (Cruz & Coelho in press).

A atividade Ca-ATPásica da enzima isolada de *P. nucleorum* é sensivelmente inibida por cátions, sendo que o magnésio a 0,25 mM inibe cerca de 50% de sua atividade (Cruz & Coelho in press). No intuito de caracterizar melhor a Ca-ATPase de *P. nucleorum*, este trabalho foi conduzido para analisar o efeito de cobre e zinco na atividade Ca-ATPásica dessa enzima. Como ATPases de insetos são alvo de inseticidas (Clark & Matsumura 1982, Luo & Bodnaryk 1988, Al-Rajhi 1990) inclusive inseticida natural (Ping *et al.* 2004), a caracterização dessas enzimas pode ser útil para o aprimoramento dos programas de controle de insetos.

## Material e Métodos

**Reagentes.** ATP, imidazol, EDTA, EGTA,  $\beta$ -mercaptoetanol e inibidores de proteases foram obtidos da Sigma Chemical Co. Os sais  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$  foram obtidos da Merck S.A. Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

**Preparação de ATPase de *P. nucleorum*.** A fração ATPase de *P. nucleorum* foi obtida conforme descrito por Cruz & Coelho (2006). Sucintamente, larvas recém extraídas do fruto de babaçu foram lavadas com água Milli-Q e imediatamente dissecadas para a retirada do sistema digestório. Os tecidos restantes foram homogeneizados em solução tampão contendo: imidazol 50 mM pH 7,5, sacarose 250 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, aprotinina 2  $\mu\text{g/ml}$  e benzamidina 1 mM. Os tecidos foram homogeneizados por 10 min usando 0,1 g/ml de solução tampão. Foi usado homogeneizador elétrico ESGE<sup>®</sup> de duas rotações e em seguida foi usado homogeneizador tipo potter. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g por 30 min a 4°C. A fração precipitada (P1) foi recuperada e homogeneizada em solução tampão contendo: imidazol 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, benzamidina 0,1 mM e Triton X-100 a 0,2% (v/v). A fração P1 foi deixada em repouso por 20 min em temperatura ambiente, então foi centrifugada a 15.000 g por 30 min a 4°C. A fração precipitada (P2) foi homogeneizada em solução tampão contendo: imidazol 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, benzamidina 0,1 mM e pirofosfato 50 mM, e centrifugada a 45.000 g por 30 min a 4°C. A fração precipitada (P3) foi homogeneizada em solução tampão contendo: imidazol 20 mM pH 7,5, EDTA

0,1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM e benzamidina 0,1 mM. Esse homogeneizado foi denominado fração ATPase. Todas as frações precipitadas foram homogeneizadas em igual volume do homogeneizado de larvas.

**Tratamento da ATPase com cobre.** A fração P3 foi incubada na ausência ou presença de cobre 0,5 mM por 10 min e então centrifugada a 45.000 g por 30 min a 4°C. A fração precipitada (P4) foi recuperada e homogeneizada em solução tampão contendo: imidazol 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM e benzamidina 0,1 mM, e novamente centrifugada a 45.000 g por 30 min a 4°C. A fração precipitada na ausência de cobre foi denominada P5 e na presença de cobre foi denominada P5'. As frações foram homogeneizadas em igual tampão e utilizada para ensaio de atividade de ATPase.

**Atividade ATPásica.** A atividade ATPásica foi determinada pela medida do fosfato inorgânico ( $\text{P}_i$ ) liberado do ATP usando o método de Heinonen & Lathi (1981). A reação foi realizada em duplicatas a 37°C e o volume final foi de 200  $\mu\text{l}$ . A atividade Ca-ATPásica foi ensaiada em tampão imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1,0 mM, KCl 60 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,0 mM e ATP 1,0 mM. O ensaio para efeito de zinco e cobre na atividade Ca-ATPásica foi realizada em igual meio de reação contendo ou não EDTA 1,0 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP e interrompida com a adição de 2 ml de solução de dosagem de  $\text{P}_i$ . A Solução de dosagem foi preparada com acetona (PA), ácido sulfúrico 5 N e molibdato de amônio 10 mM na proporção volumétrica de 2:1:1, respectivamente.

**Dosagem de proteínas.** A quantificação protéica das frações foi realizada através do método de Bradford (1976). Uma curva padrão de soroalbumina bovina (BSA) foi preparada para cada análise.

## Resultados e Discussão

A ATPase isolada de larva de *P. nucleorum* apresentou alta atividade Ca-ATPásica, mas não apresentou atividade Mg-ATPásica (Cruz & Coelho in press). Além do cálcio, a enzima obtida de larva de *P. nucleorum*, também, apresentou atividade ATPásica na presença de 2 mM de manganês, mas não na presença de outros cátions bivalentes, como cobre, cobalto, zinco ou ferro, na concentração de 2 mM (Cruz & Coelho in press). Em outras concentrações (0,1 a 5,0 mM) de cobre (Fig. 1C) ou zinco (Fig. 1B), a ATPase de larva de *P. nucleorum* também, praticamente, não apresentou atividade ATPásica. Observou-se apenas uma leve atividade com zinco 1 mM, que corresponde a menos de 8% da atividade Ca-ATPásica (Figs. 1A e B).

Para verificar o efeito de cobre e zinco na atividade Ca-ATPásica da enzima de larva de *P. nucleorum*, a fração ATPase foi incubada em meio de reação contendo cálcio 2 mM e diferentes concentrações desses cátions. A atividade Ca-ATPásica foi inibida em baixas concentrações desses cátions sendo mais sensível ao cobre do que ao zinco (Fig. 2). Cobre a 0,1 e 0,25 mM inibiu, respectivamente 80% e 95% da atividade Ca-ATPásica (Fig. 2B). Aproximadamente, 95% de inibição da atividade Ca-ATPásica também foi alcançada com zinco a 0,5 mM sendo que 0,25 mM desse cátion inibiu

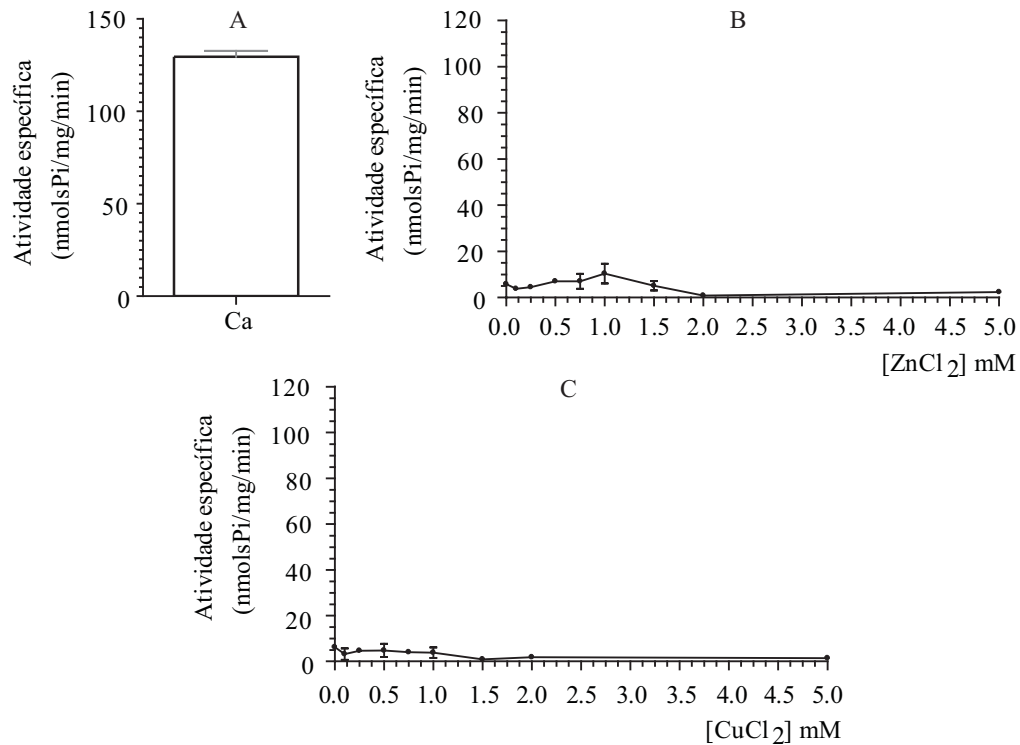


Fig. 1. Atividade ATPase da fração P3. A fração P3 (130  $\mu$ g) foi incubada por 10 min. a 37°C em meio de reação (imidazol-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60) contendo CaCl<sub>2</sub> 2 mM (A), ou as concentrações indicadas de ZnCl<sub>2</sub> (B), ou CuCl<sub>2</sub> (C). A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Os dados representam a média de três experimentos distintos.

mais de 60% da atividade (Fig. 2A).

A inibição da atividade Ca-ATPásica causada por 0,5 mM de zinco foi bloqueada, quando EDTA 1 mM foi adicionado ao meio de reação, mas o EDTA não bloqueou a inibição causada por 0,5 mM de cobre (Fig. 3) e em 0,1 mM de cobre também não ocorreu reversão da inibição (dados não mostrados). Na ausência de EDTA, o aumento da concentração de cálcio no meio de reação não reverteu a inibição da atividade Ca-ATPásica causada por zinco ou cobre na concentração de 0,5

mM (Fig. 4). Portanto, a atividade Ca-ATPásica de larva de *P. nucleorum* é sensivelmente inibida por cobre ou zinco e, enquanto a inibição pelo cobre não foi reversível pelo cálcio, a inibição pelo zinco pôde ser revertida por cálcio, quando EDTA estava presente no meio de reação. Para verificar se a inibição pelo cobre é devido à sua ligação diretamente à enzima, a fração ATPase foi incubada por 20 min com 0,5 mM de cobre e centrifugada a 45.000 g por 30 min. O precipitado foi homogeneizado em tampão imidazol e novamente

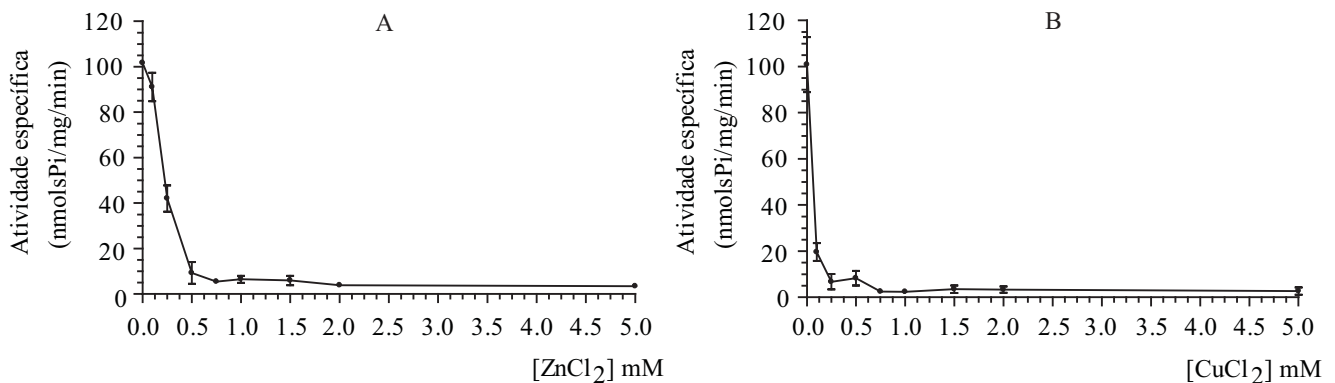


Fig. 2. Efeito de zinco e cobre na atividade ATPase da fração P3. A fração P3 (130  $\mu$ g) foi incubada por 10 min a 37°C em meio de reação (Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5, DTT 1mM, KCl 60 e CaCl<sub>2</sub> 2 mM), contendo ZnCl<sub>2</sub> (A) ou CuCl<sub>2</sub> (B) nas concentrações indicadas. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Os dados representam a média de três experimentos distintos.

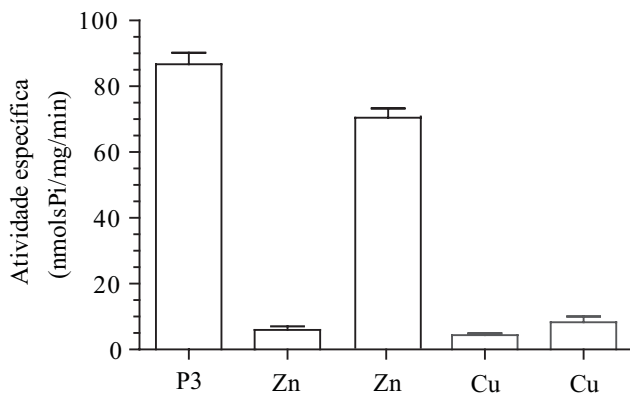


Fig. 3. Efeito de EDTA na inibição da atividade ATPásica da fração P3. A fração P3 (130  $\mu\text{g}$ ) foi incubada na ausência ou presença (área hachurada) de EDTA 1 mM por 10 min a 37°C em meio de reação (Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5, DTT 1mM, KCl 60,  $\text{CaCl}_2$  2 mM), contendo  $\text{CuCl}_2$  0,5 mM ou  $\text{ZnCl}_2$  0,5 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Os dados representam a média de três experimentos distintos.

centrifugado nas mesmas condições anteriores. A incubação da enzima com o cobre sozinho não causou nenhuma inibição da atividade Ca-ATPásica (Fig. 5), ou seja, o cobre não ligou de maneira irreversível à enzima e causou a inibição de sua atividade Ca-ATPásica. Possivelmente, esse cátion faz complexo com o ATP e tal complexo é reconhecido pelo sítio ativo da enzima e não é deslocado pelo complexo cálcio/ATP, mesmo que EDTA esteja presente no meio de reação.

A Ca-ATPase de larva de *P. nucleorum* descrita nesse trabalho, apresenta propriedades distintas de Ca-ATPases de membrana plasmática e retículo endoplasmático. Enquanto essas Ca-ATPases são estimulada por magnésio (Rega & Garrahan 1975), a enzima de *P. nucleorum* é inibida por esse cátion (Cruz & Coelho in press). Uma outra característica de Ca-ATPase é sua estimulação por calmodulina (Carafoli 1991), uma proteína ligante de cálcio de aproximadamente 17 kDa (Wilson & Brunger 2000). A Ca-ATPase de larva de *P. nucleorum* não foi estimulada por essa proteína (dados não mostrados). Motores moleculares da família das miosinas expressam atividade Mg-ATPásica apenas na presença de F-actina (Pollard 1982b) e, semelhante a ATPase de larva de *P. nucleorum*, alguns membros dessa família de motores moleculares apresentam alta atividade Ca-ATPásica (Maruta & Korn 1977, Collins & Borysenko 1984, Conzelman & Mooseker 1987) e possuem algumas propriedades similares à da enzima de larva de *P. nucleorum* (Cruz & Coelho in press), mas não há relatos na literatura a respeito da inibição da atividade Ca-ATPásica de miosinas por cobre ou zinco como mostrado neste trabalho e nem por magnésio como mostrado anteriormente (Cruz & Coelho in press).

ATPases são alvo de inseticidas (Ghiasuddin & Matsumura 1981, Al-Rajhi 1990, Ping *et al.* 2004) e a caracterização dessas enzimas em insetos pode ser de grande importância, pois a identificação de propriedades distintas entre ATPases de insetos e mamíferos pode propiciar o desenvolvimento de drogas mais específicas e que, conseqüentemente, sejam menos prejudiciais ao ser humano e a outros organismos.

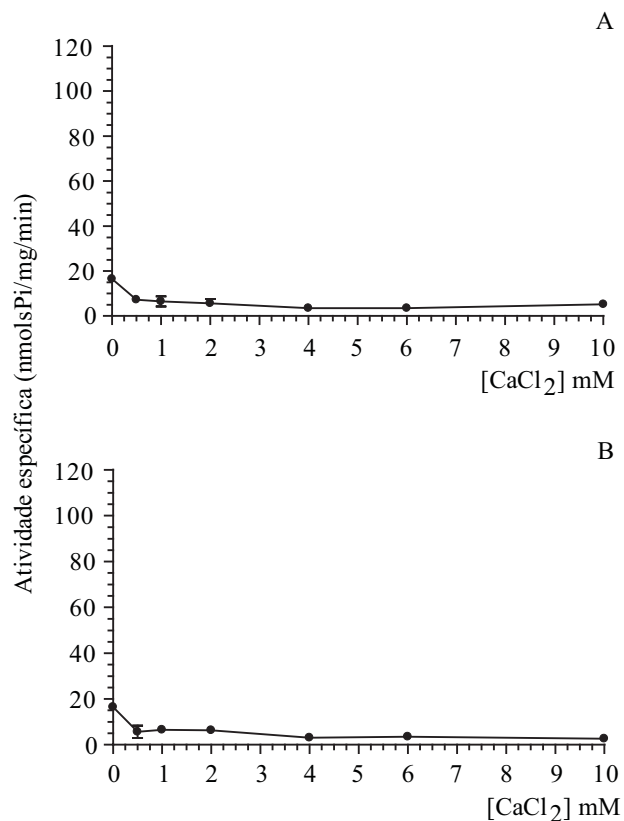


Fig. 4. Efeito da concentração de cálcio na inibição da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica. A fração P3 (130  $\mu\text{g}$ ) foi incubada por 10 min a 37°C em meio de reação (Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5, DTT 1mM, KCl 60) contendo  $\text{CaCl}_2$  nas concentrações indicadas. A)  $\text{ZnCl}_2$  0,5 mM; B)  $\text{CuCl}_2$  0,5 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Os dados representam a média de três experimentos distintos.

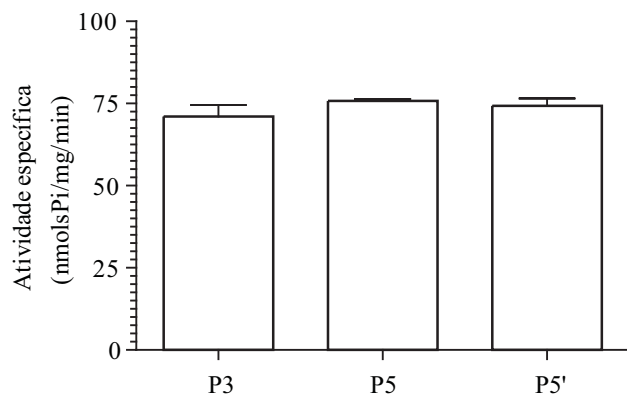


Fig. 5. Efeito da incubação da fração ATPase com cobre. O precipitado P3 (130  $\mu\text{g}$ ), ou os precipitados obtidos pelo tratamento de P3 na ausência P5 (130  $\mu\text{g}$ ) ou presença de cobre P5' (130  $\mu\text{g}$ ) foram incubados por 10 min a 37°C em meio de reação (Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60 e  $\text{CaCl}_2$  2 mM). A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Os dados representam a média de três experimentos distintos.

Milhares de pessoas, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro do país, dependem da palmeira babaçu para a sua subsistência (May *et al.* 1985) e o controle do besouro *P. nucleorum* tem importância econômica na vida dessas pessoas. Dados preliminares indicam, ainda, que larva de *Zabrotes subfaciatus* (Bohemann) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), outro besouro da subfamília Bruchinae, também apresenta atividade ATPásica similar à encontrada em larva de *P. nucleorum*. Esse bruchíneo é uma das principais pragas de feijão armazenado e causa sérios prejuízos econômicos (Southgate 1979). A caracterização da Ca-ATPase de larva de *P. nucleorum* também pode ser importante para controlar essa praga.

### Referências

- Al-Rajhi, D.H. 1990. Properties of Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>-ATPase from rat brain and its inhibition by pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.* 37: 116-120.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cantley Jr., L.C., L.G. Cantley & L. Josephson. 1977. A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 253: 7361-7368.
- Carafoli, E. 1991. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 71: 129-151.
- Carafoli, E. 1997. Plasma membrane calcium pump: Structure, function and relationships. *Basic Res. Cardiol.* 92 suppl 1: 56-61.
- Clark, M.J. & F. Matsumura. 1982. Two different types of inhibitory effects of pyrethroids on nerve Ca and Ca + Mg-ATPase activity in the squid, *Loligo peaeli*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 18: 180-190.
- Collins, J.H. & C.W. Borysenko. 1984. The 110,000-Dalton actin- and calmodulin-binding protein from intestinal brush border is a myosin like ATPase. *J. Biol. Chem.* 259: 14128-14135.
- Conzelman, K.A. & M.S. Mooseker. 1987. The 110-kDa protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an actin-activated MgATPase. *J. Cell Biol.* 105: 313-324.
- Cruz, G.C.N. & M.V. Coelho. Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase Activity of *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) Larvae. *Biol. Res.* (in press).
- Ghiasuddin, S.M. & F. Matsumura. 1981. DDT inhibition of Ca<sup>2+</sup>-Mg-ATPase from peripheral nerves and muscles of lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 31-37.
- Gibbons, I.R., M.P. Cosson, J.A. Evans, B.H. Gibbons, B. Houck, K.H. Martinson, W.S. Sale & W.J.Y. Tang. 1978. Potent inhibition of dynein adenosinetriphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 2220-2224.
- Heinonen, J.K. & R.J. Lahti. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* 113: 313-317.
- Krendel, M. & M.S. Mooseker. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiol.* 20: 239-251.
- Kuznetsov, S.A. & V.I. Gelfand. 1986. Bovine brain kinesin is a microtubule activated-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 8350-8354.
- Lingrel, J.B. & T. Kuntzweiler. 1994. Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 269: 19659-19662.
- Luo, M. & R.P. Bodnaryk. 1988. The effect of insecticides on (Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>)-ATPase and the ATP-dependent calcium pump in moth brain synaptosomes and synaptosome membrane vesicles from the bertha armyworm, *Mamestra configurata* Wlk. *Pestic. Biochem. Physiol.* 30: 155-165.
- Marín, J., A. Encabo, A. Briones, E.C. Garcia-Cohen & M.J. Alonso. 1999. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: Calcium pumps. *Life Sci.* 64: 279-303.
- Maruta, H. & E.D. Korn. 1977. *Acanthamoeba* myosin II. *J. Biol. Chem.* 252: 6501-6509.
- May, P.H., A.B. Anderson, M.J. Balick & J.M.F. Frazão. 1985. Subsistence benefits from the Babassu palm (*Orbignya martiana*). *Econ. Bot.* 39: 113-129.
- Ostlund, R.E., J.T. Leung & D.M. Kipnis. 1978. Myosins of secretory tissues. *J. Cell Biol.* 77: 827-836.
- Ping, G., L. Yanping & L. Shigui. 2004. Effects of dp-B on ATPase activity of insect plasma membrane. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80: 157-162.
- Pollard, T.D. 1982a. Assays for myosin. *Meth. Enzymol.* 85: 123-130.
- Pollard, T.D. 1982b. Structure and polymerization of *Acanthamoeba* myosin-II filaments. *J. Cell Biol.* 95: 816-825.
- Rega, A.F. & P.J. Garrahan. 1975. Calcium ion-dependent phosphorylation of human erythrocyte membranes. *J. Membr. Biol.* 22, 313-327.
- Sablin, E.P. 2000. Kinesins and microtubules: their structures and motor mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 35-41.
- Shpetner, H.S., B.M. Paschal & R.B. Vallee. 1988. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). *J. Cell. Biol.* 107: 1001-1009.
- Southgate, B.J. 1979. Biology of the Bruchidae. *Annu. Rev. Entomol.* 24: 449- 473.
- Wilson, M.A. & A.T.B. Brunger. 2000. The 1.0 Å crystal structure of Ca<sup>2+</sup>-bound calmodulin: An analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity. *J. Mol. Biol.* 301: 1237-1256.
- Yokota, E. & I. Mabuchi. 1994. C/A dynein isolated from sea urchin sperm flagellar axonemes. *J. Cell Sci.* 107: 353-361.

Received 03/IV/06. Accepted 11/VII/06.