

**Michelle Bueno de Moura Pereira**

**MECANISMO DE ATIVAÇÃO DA  
H<sup>+</sup>-ATPase DE MEMBRANA PLASMÁTICA DA  
LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* POR  
AGENTES DESPOLARIZANTES**

Ouro Preto  
Abril/2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal de Ouro Preto  
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

# Mecanismo de Ativação da $H^+$ -ATPase de Membrana Citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae* por Agentes Despolarizantes

**Michelle Bueno de Moura Pereira**

Orientador: Dr. Luciano Gomes Fietto  
Co-Orientador: Dr. Rogelio Lopes Brandão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia Molecular.

Ouro Preto  
Abril, 2006

Este trabalho tem sido desenvolvido com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP.

**“Sê tu a minha habitação forte, à qual possa recorrer continuamente. Deste um madamento que me salva, pois tu és a minha rocha e a minha fortaleza”.**

**Salmo 71-3**

**Ao meus amados avós  
Vô João e Vô Dodô**

## **Agradecimentos**

A transformação só acontece com sabedoria, perseverança e principalmente paciência, agradeço a Deus por estar ao meu lado e me dar forças para acreditar.

Ao meu orientador Dr. Luciano, pela minha formação profissional, por me ensinar a amar a ciência, pelas dúvidas mesmo que banais sempre esclarecidas, pela amizade acima de tudo e pelo exemplo de competência, simplicidade e alegria.

Ao Dr. Rogelio pela co-orientação sempre segura e agradável, pela convivência, pelos conselhos e ensinamentos, meu muito obrigado.

Ao Dr. Ieso de Miranda Castro pelo exemplo de dedicação,

À minha querida amiga Zezé, sem você este projeto não seria possível, você é indispensável não apenas para nós (turma da H<sup>+</sup>-ATPase), mas para todos do LBCM.

À Juliana pelo aprendizado não apenas científico, mas aprendizado de vida, muito obrigado.

À todos do LBCM Maristela, Jú Boechat, Kátia, Pilar, Michelle Barbi, Tiago, Fernanda, Raquel, Giovana, Matheus, Totola, Val, Lis, Aninha, Xisto, Murilo, Mônica, Lucas, Dani Mel, Ramon, Patrick, Ronny, Renata, Juliana e Sr. Brás, vou sentir saudades...

A Anamaria (Aninha), que se tornou uma grande amiga, confidente nos momentos difíceis, e principalmente minha professora particular de H<sup>+</sup>-ATPase.

A Mônica pela ajuda essencial na execução deste trabalho.

A todos do mestrado 2004, em particular Yara e Arlete que conheci em tão pouco tempo e aprendi a admirar e respeitar.

A Cida pela disponibilidade em ajudar, por sua alegria contagiante, pelo seu carinho por todos da pós-graduação.

A todos meus familiares, vó Fiinha, vó Rita, tios, primos. Hoje tenho a plena consciência que os grandes exemplos muitas vezes não estão tão distantes de nós, mas ao nosso lado, na nossa família.

Às minhas irmãs de alma Dani e Pat's, o que vivemos juntas nem o tempo e a distância podem apagar, amo muito vocês. E as minhas duas novas irmãs Iara e Lu, vocês já fazem parte da minha vida.

A todos que contribuíram na minha formação acadêmica, científica e pessoal, muitíssimo obrigado.

Ao meu irmão André, pelas risadas, pelas piadas, por fazer do ambiente de trabalho um local alegre e prazeroso, por tudo, jamais te esquecerei, mesmo na USP vê se não esquece de mim, sinto muitas saudades.

Aos meus amados pais (Nilson e Sirene), minhas irmãs (Carol e Pri), meus sobrinhos queridos (Matheus, Gabriel e Amanda), alicerce da minha caminhada, amo todos vocês.

Ao João, luz do meu caminho, companheiro da minha estrada, amor da minha vida.

# Índice

<b>Abstract</b>	<b>X</b>
<b>Resumo</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>XII</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>XV</b>
<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos gerais	2
1.2 Transdução de sinal	3
1.3 Transdução de Sinal em Leveduras	4
1.3.1 A via principal de repressão por glicose	5
1.3.2 A via Ras-adenilato ciclase induzida por glicose	6
1.3.3 A via fosfatidilinositol induzida por glicose	7
1.3.4 A via Pkc MAP Quinase	8
1.4 Mecanismo de ação do Ca <sup>++</sup> em leveduras	9
1.5 H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.5.1 Estrutura da H <sup>+</sup> -ATPase	12
1.5.2 Função da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática	13
1.5.3 Regulação transcricional da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática	16
1.5.4 Regulação pós-transcricional da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática	19
1.6 Possíveis vias envolvidas na ativação da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática de <i>S. cerevisiae</i>	21
1.6.1 Via Ras-adenilato ciclase	21
1.6.2 Via fosfatidilinositol	23
1.7 Mecanismo proposto para a ativação da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática induzida por glicose	24
1.8 Ativação da H <sup>+</sup> -ATPase por agentes despolarizantes	26

<b>Objetivos</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
<b>Materiais e Métodos</b>	<b>30</b>
3.1 Microrganismos utilizados nos experimentos	31
3.2 Meio de cultura e condições de crescimento	32
3.3 Atividade H <sup>+</sup> -ATPásica	33
3.3.1 Ativação “ <i>in vivo</i> ” e coleta de amostras	33
3.3.2 Coleta de amostras na presença de agente quelante – EGTA	33
3.3.3 Obtenção das membranas citoplasmáticas	34
3.4 Ensaio da atividade H <sup>+</sup> - ATPásica	34
3.5 Dosagem de proteína	37
3.6 Medida de cálcio citosólico livre (sinal de cálcio)	37
<b>Resultados</b>	<b>38</b>
4.1 Efeito dos agentes despolarizantes na ativação da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática de <i>S. cerevisiae</i>	39
4.2 Envolvimento da proteína quinase C na ativação da H <sup>+</sup> -ATPase por agentes despolarizantes	40
4.3 Envolvimento da proteína Gpa2 na ativação da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática de <i>S. cerevisiae</i> por agentes despolarizantes	40
4.4 Envolvimento da proteína Plc1 na ativação da H <sup>+</sup> -ATPase por agentes despolarizantes	45
4.5 O papel do Cálcio no processo de ativação da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática por agentes despolarizantes	45
4.6 Envolvimento do canal de Cálcio externo de alta afinidade, Mid1p, na ativação da H <sup>+</sup> -ATPase por agentes despolarizantes	50
4.7 Envolvimento do canal de Cálcio externo de baixa afinidade, Fig1 p, na ativação da H <sup>+</sup> -ATPase por agentes despolarizantes	50
4.8 Participação do Inositol-3,4,5-Fosfato na ativação da H <sup>+</sup> -ATPase por agentes despolarizantes	53

4.9 Participação da bomba de cálcio vacuolar, Pmc1 p, na ativação da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática por agentes despolarizantes	53
4.10 Envolvimento da enzima fosfoglucomutase, Pgm2 p, na ativação da H <sup>+</sup> -ATPase por agentes despolarizantes	57
4.11 Envolvimento do sensor de glicose, Snf3 p, no mecanismo de ativação da H <sup>+</sup> -ATPase por agentes despolarizantes	58
4.12 A ativação da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática induzida por agentes despolarizantes ocorre através de uma via única	62
<b>Discussão</b>	<b>65</b>
<b>Conclusões</b>	<b>73</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>77</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>79</b>

## **Abstract**

The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a proton pump that plays an essential role in the yeast physiology. The activity of this enzyme is regulated at both transcriptional and post-translational levels and a remarkable characteristic is the fact that it is activated by glucose, low pH and depolarizing agents. The H<sup>+</sup>-ATPase activation pathway by depolarizing agents is still unknown. In this work we suggest that a phosphatidylinositol type signaling pathway is involved in the H<sup>+</sup>-ATPase activation by carbolnyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. In this pathway this compound would activate the enzyme phospholipase C that would promote the hydrolysis of the phosphatidylinositol biphosphate in two components, diacylglycerol and inositol tri-phosphate. The inositol triphosphate generated would be promoting the calcium mobilization. The increase in the levels of cytosolic calcium together with the diacylglycerol formation could be causing the activation of the protein kinase C, that once activated would be phosphorylating the H<sup>+</sup>-ATPase in two amino acids residues essentials for the conformational changes of the enzyme, turning it activated.

## Resumo

A  $H^+$ -ATPase de membrana citoplasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma bomba de prótons que possui um papel essencial na fisiologia da levedura. A atividade desta enzima é regulada tanto a nível transcricional quanto a nível pós-transcricional e uma importante característica é o fato desta enzima ser ativada por glicose, baixo pH e por agentes despolarizantes. A via de ativação da  $H^+$ -ATPase por agentes despolarizantes ainda não é conhecida. Neste trabalho sugerimos uma via de transdução de sinal semelhante a do fosfatidil inositol como parte do mecanismo de ativação ATPásica pelo Cianeto carbonil m-clorofenilhidrazona. Nesta via esta droga ativaria a enzima fosfolipase C que hidrolisaria o fosfatidilinositol-bifosfato em dois componentes, diacilglicerol e inositol tri-fosfato. O inositol trifosfato gerado estaria desencadeando a mobilização de cálcio extracelular e de estoques intracelulares. O aumento dos níveis de cálcio livre citosólico, juntamente com a formação de diacilglicerol, poderia estar levando a ativação da proteína quinase C, que uma vez ativa, estaria fosforilando a  $H^+$ -ATPase em dois resíduos de aminoácidos essenciais para a mudança conformacional da enzima, tornando-a ativa.

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Modelo do fluxo de $\text{Ca}^{++}$ intracelular em células de leveduras.....	11
<b>Figura 2:</b> Modelo topológico da $\text{H}^+$ -ATPase de membrana plasmática de fungos.	15
<b>Figura 3:</b> Modelo da regulação transcricional da $\text{H}^+$ -ATPase de membrana citoplasmática de <i>S. cerevisiae</i> por glicose.....	18
<b>Figura 4:</b> Modelo da regulação pós-transcricional da $\text{H}^+$ -ATPase de membrana citoplasmática, induzido por glicose.....	20
<b>Figura 5:</b> Mecanismo hipotético de ativação induzida por glicose da $\text{H}^+$ -ATPase de membrana citoplasmática da levedura <i>S. cerevisiae</i> , via Proteína quinase dependente de AMPc (PKA).....	22
<b>Figura 6:</b> Modelo hipotético da ativação, induzida por carboidrato, da $\text{H}^+$ -ATPase de membrana citoplasmática mediada por íons cálcio, via Pkc1 p.....	25
<b>Figura 7:</b> Curva de tempo para atividade enzimática da $\text{H}^+$ -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/ Etanol 9% em cepas de <i>S. cerevisiae</i> selvagem (W303).....	42
<b>Figura 8:</b> Curva de tempo para atividade enzimática da $\text{H}^+$ -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas <i>pkc1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> , tendo como background genético a cepa W303.....	43
<b>Figura 9:</b> Curva de tempo para atividade enzimática da $\text{H}^+$ -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas <i>gpa2Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> , tendo como background genético a cepa W303.....	44
<b>Figura 10:</b> Curva de tempo para atividade enzimática da $\text{H}^+$ -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas <i>plc1 Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> , tendo como background genético a cepa WT 3700.....	47
<b>Figura 11:</b> Sinal de cálcio induzido por CCCP em uma cepa selvagem (WT3700) e mutante ( <i>plc1Δ</i> ).....	48
<b>Figura 12:</b> Atividade ATPásica em função do tempo, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas selvagem WT3700. Efeito do agente quelante (EGTA-12mM) e efeito do agente quelante + $\text{Ca}^{++}$ .....	49

<b>Figura 13:</b> Curva de tempo para atividade enzimática da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas <i>mid1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> , tendo como background genético a cepa Sc252.....	51
<b>Figura 14:</b> Curva de tempo para atividade enzimática da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas <i>fig1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> , tendo como background genético a cepa BY4742.....	52
<b>Figura 15:</b> Curva de tempo para atividade enzimática da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas <i>arg82Δ</i> e <i>arg82Δ/plc1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> , tendo como background genético a cepa PJ692a.....	55
<b>Figura 16:</b> Curva de tempo para atividade enzimática da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas <i>pmc1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> , tendo como background genético a cepa BY4742.....	56
<b>Figura 17:</b> Curva de tempo para atividade enzimática da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas <i>pgm2Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> , tendo como background genético a cepa BY4742.....	60
<b>Figura 18:</b> Curva de tempo para atividade enzimática da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana plasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas <i>snf3Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> , tendo como background genético a cepa BY4742.....	61
<b>Figura 19:</b> Comparação de diferentes agentes indutores da atividade H <sup>+</sup> -ATPásica no mesmo background genético (BY4742).....	63
<b>Figura 20:</b> Perfil de ativação da H <sup>+</sup> -ATPase na cepa selvagem BY4742 <i>Painel A:</i> Atividade enzimática inicialmente induzida por CCCP e em seguida sob ação de glicose (tempo 5 min); <i>Painel B:</i> Atividade enzimática inicialmente induzida por glicose e em seguida sob ação de CCCP (tempo 5 min).....	64
<b>Figura 21:</b> Mecanismo hipotético de ativação da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - via PKC1.....	76

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>31</b>
---	-----------

## Lista de abreviaturas

<b>AMPC</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>Ansa</b>	1 - Amino - 2 - hidroxí - 4 - ácido naftaleno-sulfônico
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BAPTA</b>	Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetracético
<b>Bck1 p</b>	Proteína quinase envolvida na via de síntese da parede celular
<b>BCY1</b>	Gene que codifica para duas subunidades regulatórias da proteína quinase A
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub></b>	Concentração de cálcio livre citosólico
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>CAT1/SNF1</b>	Conjunto de genes que codificam para a proteína quinase Snf1 p
<b>CCCP</b>	Cianeto carbonil m-clorofenilhidrazona
<b>CDC25</b>	Gene que codifica proteínas que estimulam a mudança de GDP para GTP nas proteínas Ras
<b>cels</b>	Células
<b>Co<sup>3+</sup></b>	Íon cobalto
<b>C-terminal</b>	Carboxi terminal
<b>Da</b>	Daltons
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DNP</b>	Dinitrofenol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EGTA</b>	Ácido etilenoglicol-bis-b-aminoetiléter-N'-N'-N'-N'-tetracético
<b>Fks2 p</b>	Fator de transcrição que controla a subunidade do complexo glucano sintase
<b>Glc-1P</b>	Glicose-1 fosfato
<b>Glc-6P</b>	Glicose-6 fosfato
<b>Glk1 p</b>	Glicoquinase I
<b>Gln3</b>	Fator de transcrição possivelmente responsável pelo aumento da expressão da H <sup>+</sup> -ATPase sob condições de jejum por nitrogênio.
<b>GPA2</b>	Gene que codifica para proteína de membrana citoplasmática Gpa2 p
<b>GPCR</b>	Sistema receptor (Gpr1 p) acoplado a proteína G (Gpa2 p)

<b><i>GPR1</i></b>	Gene que codifica para um receptor para glicose de membrana citoplasmática (Gpr1 p)
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>Hxk1 p</b>	Hexoquinase I
<b><i>HXK2</i></b>	Gene que codifica para a enzima hexoquinase II
<b><i>HXT3</i></b>	Gene que codifica para o transportador de glicose
<b>Ins-(1,4,5) P<sub>3</sub></b>	Inositol-1, 4, 5-trifosfato
<b>IP<sub>4</sub></b>	Inositol-tetra-fosfato
<b>IP<sub>5</sub></b>	Inositol-penta-fosfato
<b>IP<sub>6</sub></b>	Inositol-hexa-fosfato
<b>Ipk1 p</b>	Proteína quinase que fosforila IP <sub>5</sub> em IP <sub>6</sub>
<b><i>IRA1</i></b>	Gene que codifica proteínas que estimulam a atividade GTPase intrínseca das proteínas Ras
<b><i>IRA2</i></b>	Gene que codifica proteínas que estimulam a atividade GTPase intrínseca das proteínas Ras
<b>Kda</b>	Quilo Daltons
<b>Km</b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>LACS</b>	Sistema de influxo de cálcio de baixa afinidade
<b>M</b>	Molar
<b>MAP quinases</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MAPKK</b>	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno
<b>MAPKKK</b>	Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno
<b><i>MID1</i></b>	Gene que codifica para o receptor protéico de alta afinidade para cálcio
<b>Mig1 p</b>	Fator transcricional que em presença de glicose, reprime a expressão de vários genes
<b>min</b>	Minuto
<b>Mkk1 p</b>	Proteína quinase envolvida na via de síntese da parede celular
<b>Mkk2 p</b>	Proteína quinase envolvida na via de síntese da parede celular
<b>mg</b>	Miligramma
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Íon magnésio
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>ml</b>	Mililitro

<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	Íon manganês
<b>Mpk1 p</b>	Proteína quinase envolvida na via de síntese da parede celular
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>Msn5 p</b>	Exportina envolvida na translocação do fator Mig1 p
<b>N</b>	Normal
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Azida sódica
<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>p/v</b>	Peso por volume
<b><i>PGM1</i></b>	Gene que codifica para a enzima fosfoglucomutase
<b><i>PGM2</i></b>	Gene que codifica para a enzima fosfoglucomutase
<b>Pi</b>	Fosfato livre
<b>Pka p</b>	Proteína quinase dependente de AMPc
<b>Pkc p</b>	Proteína quinase dependente de cálcio
<b><i>PKC1</i></b>	Gene que codifica para a proteína quinase C
<b>Plc p</b>	Fosfolipase C
<b><i>PMA1</i></b>	Gene que codifica para H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática
<b><i>PMA2</i></b>	Gene da H <sup>+</sup> -ATPase de membrana citoplasmática
<b>PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
<b>Ras</b>	Proteína ativadora da adenilato ciclase
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>s</b>	Segundo
<b>Ser</b>	Aminoácido serina
<b>Snf3 p</b>	Proteína que atua com sensor de alta afinidade para glicose codificada pelo gene <i>SNF3</i>
<b>TECC</b>	Elevação transitória de cálcio citosólico
<b>Thr</b>	Aminoácido treonina
<b><i>TPK1/2/3</i></b>	Genes que codificam para as duas subunidades catalíticas da proteína quinase A
<b>UAS<sub>1</sub><i>PMA1</i></b>	Seqüência consenso que antecede o gene <i>PMA1</i>
<b>UAS<sub>2</sub><i>PMA1</i></b>	Seqüência consenso que antecede o gene <i>PMA1</i>
<b>UAS<sub>RPG</sub></b>	Seqüência consenso que controla a expressão de vários genes que codificam para proteínas ribossomais

<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>V<sub>máx</sub></b>	Velocidade máxima
<b>μl</b>	Microlitros
<b>μmoles</b>	Micromoles

## **Introdução**

---

## 1.1 - Aspectos Gerais

Os fungos, em geral, são amplamente utilizados como modelo de estudos, já que estes organismos embora eucariotas apresentam uma maquinaria bioquímica mais simplificada que àquelas encontradas em mamíferos. Além disto, a facilidade de manuseio, de crescimento e de manutenção em laboratório são características que ampliam as pesquisas com estes microrganismos. Em particular, o fungo leveduriforme *Saccharomyces cerevisiae* é alvo de muitos estudos, uma vez que seu genoma foi totalmente seqüenciado, sendo que este contém cerca de 6000 genes, entre os quais 38% das proteínas codificadas por estes genes se assemelham às proteínas de mamíferos (Goffeau et cols., 1997).

Para se conhecer o funcionamento bioquímico, fisiológico e molecular dos fungos, em particular *S. cerevisiae*, bem como de todas as células, se faz necessário conhecer como ocorre a percepção das modificações no meio extracelular e como este sinal é transmitido para o interior da célula levando a uma adaptação às condições do meio em que vivem. Esta percepção ocorre através de receptores presentes na membrana citoplasmática ou receptores intracelulares e é transmitida e amplificada pela célula até a etapa final de adaptação por mecanismos chamados de transdução de sinais que culminam com a mudança da expressão gênica na célula e/ou a mudança na atividade de diferentes enzimas.

A  $H^+$ -ATPase da levedura *S. cerevisiae* é a proteína mais abundante da membrana citoplasmática e é indispensável para a sobrevivência deste microrganismo (Kotyck, et cols., 2003). Vários componentes presentes no meio ambiente parecem ativar esta enzima, entre estes se destaca a glicose como um dos principais agentes indutores da atividade de  $H^+$ -ATPase. Vários estudos vem sendo realizados com o intuito de elucidar o mecanismo de ativação ATPásica por glicose (Brandão et cols., 1994; Cocetti et cols., 1998; Souza et cols., 2001). Além da função regulatória importante que a glicose exerce sobre as células de levedura, ela possui também um papel nutricional importante, o que muitas vezes acarreta problemas na interpretação dos efeitos gerados pelo açúcar, deixando sempre dúvidas se o efeito observado é devido ao seu papel regulatório (Transdução de sinais) ou ao seu papel nutricional (aumento das concentrações de ATP, de metabólitos, etc...). Em paralelo, alguns agentes químicos sintéticos como agentes despolarizantes (DNP, CCCP) também promovem a ativação ATPásica, (Brandão et cols., 1992). O uso destes compostos para estudar o

processo de ativação da ATPase é muito importante já que elimina os efeitos nutricionais da glicose, sendo muito útil para mapear componentes protéicos diretamente envolvidos no processo, contudo este mecanismo ainda é muito pouco explorado. Com isso, este trabalho visa compreender o mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae* por agentes despolarizantes, como o CCCP.

## 1.2- Transdução de Sinal

A transdução de sinais consiste na transmissão de um sinal externo para o interior da célula visando uma adaptação ao seu ambiente. Este ramo da ciência é amplamente estudado, uma vez que todos os fenômenos biológicos envolvem uma sinalização ou pelo menos são afetados por ela. Os componentes dos processos de transdução de sinais presentes na maioria das células são: molécula sinalizadora; receptores de membrana; enzimas e/ou proteínas associadas aos receptores; componentes de amplificação do sinal; sinalizadores internos ou mensageiros secundários; componentes de propagação do sinal, como por exemplo, cascatas de fosforilação intracelular e componentes-alvo sujeitos a regulação induzida pelo sinal externo (Alberts et cols., 1999).

Uma das formas mais estudadas de transdução de sinal é aquela que desencadeia reações em cascata de fosforilações protéicas. Estas reações são altamente reguladas e culminam com a ativação e/ou inativação de enzimas, bem como com a modulação de fatores transcricionais alterando assim a expressão gênica da célula e, conseqüentemente, o seu comportamento (Alberts et cols., 1999).

É importante salientar que a resposta celular a estímulos externos pode se dar através da combinação de sinais e não por um único sinal atuando sozinho. Assim, uma célula pode integrar a informação proveniente de sinais isolados a fim de construir uma resposta apropriada: viver ou morrer; proliferar ou permanecer em repouso. E essa integração parece depender das interações entre as diversas cascatas de fosforilação protéicas, que como se sabe, são ativadas por diferentes sinais extracelulares e/ou intracelulares (Alberts et cols.,1999).

Em organismos multicelulares, a maior parte das vias de sinalização é usada para a comunicação entre as células. Os mensageiros extracelulares iniciam as vias de transdução de sinal modificando o metabolismo, proliferação e desenvolvimento em células alvo. Já microrganismos

utilizam basicamente nutrientes como agentes extracelulares sinalizadores que também vão afetar o metabolismo, proliferação e desenvolvimento (Thevelein, 1994).

Devido ao papel dos nutrientes como moléculas sinalizadoras em microrganismos, têm sido sugerido que estes recursos são as vias primárias de sinalização, e que posteriormente, essas vias foram duplicadas e/ou modificadas para servir a propósitos mais sofisticados, como a sinalização na presença de feromônios, condições de estresses, dentre outras. Assim pode-se deduzir que, as vias de transdução de sinal de células de mamíferos têm sua origem evolucionária em vias de transdução de sinal induzida por nutrientes (Thevelein, 1994).

As células de leveduras possuem vias de transdução de sinal similares àquelas encontradas em células de mamíferos. A maior diferença parece ser que as vias de sinalização são utilizadas com outros propósitos, isto é, o sinal primário e o(s) alvo(s) são diferentes (Thevelein, 1994). Como por exemplo, a via do tipo fosfatidilinositol, que em células de mamíferos é desencadeada pela presença de feromônios e já em células de leveduras é desencadeada pela presença de glicose. No entanto, existem muitas vias de sinalização típicas que são encontradas em todas as células eucarióticas, como a via AMPc dentre outras.

## **1.2 - Transdução de Sinal em Leveduras**

Formatados: Marcadores e numeração

A glicose é uma das moléculas que atua como mensageiro primário e está envolvida em diferentes vias de sinalização em leveduras. A adição de glicose, a nível pós-transcricional leva a ativação e/ou inativação de várias proteínas, enquanto a nível transcricional, genes são reprimidos ou induzidos. Um dos principais efeitos regulatórios da glicose é a mudança do metabolismo gliconeogênico/respiratório para o metabolismo fermentativo (Thevelein, 1994).

Em leveduras várias vias de sinalização já foram demonstradas, sendo que as vias mais intensamente estudadas são a via principal de repressão por glicose e a via Ras-adenilato ciclase (Thevelein, 1994). Além destas, vários componentes de uma via de sinalização do tipo fosfatidilinositol induzida por glicose, similar àquela encontrada em mamíferos, foram descritos (Kaibuchi et cols., 1986; Flick e Thorner, 1993; Cocetti et cols., 1998) e também vias de transdução de sinais, que ativam proteínas quinases homólogas àquelas ativadas por mitógenos em mamíferos (MAP quinases). Uma das vias MAP quinases, tem a participação da proteína quinase C que é codificada pelo gene *PKC1* em *S. cerevisiae* (Levin et cols., 1994).

### 1.3.1 – A via principal de repressão por glicose

Uma das vias regulatórias mais bem estudadas em células de leveduras é a via principal de repressão por glicose. A presença de glicose durante o crescimento de células de leveduras faz com que o metabolismo seja essencialmente fermentativo mesmo em condições aeróbicas. Este fenômeno ocorre devido à repressão de genes envolvidos no ciclo de Krebs, na cadeia de transporte de elétrons e também genes envolvidos na gliconeogênese, no ciclo do glioxilato, bem como no transporte e no catabolismo de fontes de carbono alternativas, como galactose, maltose, sacarose. Além disso, o metabolismo fermentativo é fortalecido pela indução de genes envolvidos na fermentação (Holzer et cols., 1976).

Vários genes envolvidos na via principal de repressão por glicose já foram identificados. Eles podem ser divididos em dois tipos principais: genes que são requeridos para repressão, dos quais *HXX2* (que codifica para a hexoquinase II) é provavelmente o exemplo mais proeminente, e genes necessários para a liberação da repressão sendo *CATI/SNF1* o exemplo mais importante (Thevelein, 1994).

A enzima Hxk2 p parece possuir duas funções fisiológicas em células de leveduras, sendo a primeira relacionada com a fosforilação do açúcar internalizado para o início da cascata de reações glicolíticas, e um segundo papel que se refere ao envolvimento na repressão de diferentes genes por glicose. Esta última função não é compartilhada pelas outras duas enzimas, também presentes em leveduras, que fosforilam a glicose internalizada, a hexoquinase I (Hxk1p) e a glicoquinase I (Glk1 p) (Gancedo, 1998).

Para a liberação da repressão tem-se um grupo de genes essenciais conhecidos como *CATI/SNF1*. O produto desses genes é um complexo protéico com função quinase (proteína quinase Snf1) que tem como alvo principal inibir a ação de um repressor denominado Mig1 p. Este fator transcricional é uma proteína que possui motivos dedos de zinco composta por 504 resíduos de aminoácidos e que em presença de glicose se liga a sítios específicos ricos em GC na região promotora de muitos genes como *SUC1*, *GALI*, *GAL4* e *FBP1* reprimindo a transcrição destes (Nehlin & Ronne, 1990). Evidências sugerem que a repressão de genes por glicose é regulada pela fosforilação da proteína Mig1. A proteína Mig1 é rapidamente transportada para o núcleo na presença de glicose, e é removida do núcleo quando a glicose é retirada do meio. O transporte de Mig1 p do núcleo para o citoplasma é regulado por sua fosforilação, catalisada pela proteína quinase Snf1. Esta fosforilação promove uma interação

entre Mig1 p e a exportina Msn5 p favorecendo a sua exportação para o citoplasma e desta maneira, permitindo a transcrição de vários genes (De Vit & Jonhston, 1997).

### 1.3.2 - A via Ras-adenilato ciclase induzida por glicose

A adição de glicose em células de *S. cerevisiae* elevam transitoriamente o nível de AMPc (Eraso e Gancedo, 1987). Trabalhos sugeriram que os mecanismos pelos quais a adição de glicose promove a elevação do nível de AMPc eram a despolarização da membrana citoplasmática ou a acidificação intracelular. Estes indícios foram sustentados, uma vez que a presença de compostos despolarizantes/acidificantes como DNP, azida e CCCP, também causam elevações nos níveis de AMPc em células de *S. cerevisiae* (Caspani et cols., 1985).

No entanto, posteriormente, foram obtidas evidências contra ambos os mecanismos, demonstrando uma via de transdução de sinal específica, com o envolvimento de outros elementos, chamada de via Ras-adenilato ciclase, como sendo a desencadeadora do sinal de AMPc induzido por glicose (Thevelein, 1991). As proteínas Ras são pertencentes à classe de proteínas Gs, as quais são ativas na forma ligada a GTP e inativas na forma ligada a GDP, estas proteínas se encontram na membrana citoplasmática das células de leveduras. A atividade GTPase intrínseca das proteínas Ras são estimuladas pelos produtos dos genes *IRA 1* e *IRA 2*, os quais atuam como inibidores da via. O produto do gene *CDC 25* estimula a mudança de GDP para GTP nas proteínas Ras e assim, atua como ativador da via. Ambos Ras e Cdc 25 são requeridos para manter um nível adequado de AMPc na célula (Camonis et cols., 1988; Thevelein, 1994).

Outros componentes já têm sido propostos para a ativação da síntese de AMPc induzido por glicose, como a presença de um sistema receptor acoplado a proteína G (GPCR), o qual consiste do receptor Gpr1 e da proteína G, Gpa2 (Kraakman et cols., 1999; Xue et cols., 1998; Beullens et cols., 1988; Rolland et cols., 2000).

O alvo intracelular do AMPc assim produzido é uma proteína quinase AMPc dependente (Proteína quinase A - Pka), a qual amplifica o sinal extracelular através da ativação e/ou inativação de várias enzimas e fatores transcricionais. A Pka p é composta por duas subunidades catalíticas, codificadas pelos genes *TPK1*, *TPK2* e *TPK3* e duas subunidades regulatórias, codificadas pelo gene *BCY1*. A deleção dos três genes *TPK* é letal, enquanto a deleção do gene *BCY1* causa um fenótipo muito severo associado com alta atividade da Pka p

(Thevelein, 1994). A Pka p está envolvida ainda na regulação pós-transcricional de uma variedade de proteínas como as enzimas chaves da gliconeogênese e da glicólise, no controle transcricional de genes para proteínas ribossomais e genes envolvidos na resposta geral ao estresse (Neuman-Silberberg et cols., 1995; Ruis & Schüller, 1995).

A importância da via Ras-adenilato ciclase na fisiologia da levedura tem sido amplamente demonstrada na literatura. Estudos em *S. cerevisiae* demonstram a necessidade dessa via para o controle do ciclo celular e também na detecção de açúcares fermentáveis em concentrações apropriadas para fermentação (Thevelein & Beullens, 1985; Thevelein, 1991; Thevelein, 1992).

Trabalhos desenvolvidos por Ulaszewski et cols., (1989), demonstraram uma possível relação da ativação da via AMPc com a subsequente ativação da enzima H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae*. Entretanto, Becher dos Passos et cols., (1992) trabalhando com inibidores e mutantes da via AMPc demonstraram que a ativação da ATPase induzida por glicose não era mediada pela proteína quinase AMPc dependente.

### 1.3.3 - A via fosfatidilinositol induzida por glicose

Em células de mamíferos, em presença de feromônios, a fosfolipase C hidrolisa o fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PtdInsP<sub>2</sub>) presente na membrana citoplasmática em dois componentes, diacilglicerol (1,2-DAG) e inositol (1,4,5) trifosfato (Ins P<sub>3</sub>). Diacilglicerol permanece na membrana e serve como mensageiro secundário para ativação da proteína quinase C e Ins P<sub>3</sub> também atua como mensageiro secundário para mobilização de Ca<sup>++</sup> a partir de estoques intracelulares (Wera et cols., 2001; Kaibuchi et cols., 1986).

Embora todos estes componentes estejam presentes em células de leveduras, a via na qual eles interagem ainda permanece obscura. A fosfolipase C de leveduras, em presença de glicose, hidrolisa PtdIns (4,5)P<sub>2</sub> em 1,2-DAG e Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>. Já foi proposto que Plc1 p controla via 1,2-DAG a proteína quinase C de leveduras, no entanto, a possível relação do Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> no controle dos níveis de Ca<sup>++</sup> não está bem estabelecida, já que o genoma de leveduras não apresenta nenhum receptor homólogo aos receptores para Ins-(1,4,5)P<sub>3</sub> encontrados em mamíferos. Evidências que comprovam esta relação estão limitadas a estudos *in vitro* com vacúolos isolados de leveduras (Wera et cols., 2001; Belde et cols., 1993).

Contudo, já foi demonstrado a geração e manutenção de um gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em *Neurospora crassa*, através da liberação deste íon de vesículas vacuolares pela ligação de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  em um provável receptor na membrana desta organela (Lorelei, et cols., 2002). Este achado sustenta a hipótese da existência de um possível receptor para  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  em fungos, muito embora nenhum registro da presença destes receptores tenha sido indicado em *S. cerevisiae*.

Desta maneira, o papel de  $\text{IP}_3$  em *S. cerevisiae*, ainda é alvo de muitas especulações, o conhecimento atual é que após sua formação o  $\text{IP}_3$  é rapidamente convertido em polifosfatos de inositol (York et cols., 1999; Saiardi et cols., 2000). A formação de  $\text{IP}_4$  e  $\text{IP}_5$  é realizada por uma proteína quinase, denominada Arg82 p. Uma outra quinase, Ipk1p, fosforila  $\text{IP}_5$  em  $\text{IP}_6$ , sendo que este produto parece estar envolvido na exportação de RNAs mensageiros do núcleo para o citoplasma (Wera et cols., 2001). Resultados recentes (Tisi et cols., 2003) demonstraram que a deleção do gene *ARG82* em leveduras acarreta um aumento dos níveis celulares de  $\text{IP}_3$  e também um aumento nos níveis citosólicos de cálcio indicando uma relação entre estes dois eventos.

#### 1.3.4 - A via *Pkc MAP Quinase*

A existência de vias de transdução de sinais, que ativam proteínas quinases homólogas às proteínas quinases ativadas por mitógenos em mamíferos (MAP quinases), são amplamente encontradas em eucariotos superiores e também tem sido descritas em leveduras (Marshall, 1994).

Entre as vias homólogas às MAP quinases já descritas, uma tem a participação da proteína quinase C que é codificada pelo gene *PKC1* em *S. cerevisiae*. Nesta via existe uma ativação seqüencial na qual Pkc1 p fosforila a Bck1 p (uma MAP quinase quinase quinase), que por fosforilação ativa duas MAP quinases quinases, Mkk1 p e Mkk2 p, e estas também por processos de fosforilação ativam a Mpk1 p (uma MAP quinase). Um dos alvos desta via é o fator de transcrição que controla a síntese de Fks2 p que é uma subunidade do complexo glucano sintase, importante componente para a síntese de parede celular em leveduras (Levin et cols., 1994).

Mutações em alguns dos componentes desta via resultam em lise das células, já que ocorre uma deficiência na construção da parede celular. A adição de estabilizadores osmóticos (sorbitol ou NaCl) ao meio de cultura compensa este defeito permitindo a proliferação dos mutantes. Entretanto, no mutante *pkc1Δ* ocorre um maior comprometimento das células, sugerindo uma possível

bifurcação ao nível de Pkc1 p e que esta quinase provavelmente possui alguns outros alvos em levedura (Levin et cols., 1994).

#### 1.4- Mecanismo de ação do $\text{Ca}^{++}$ em leveduras

Vários estudos têm demonstrado que a adição de glicose a uma cultura de leveduras está também diretamente ligada a homeostase de cálcio, sendo importante para ativar vias que induzem a captação, seqüestro e a liberação deste íon dos seus compartimentos intracelulares (Eilam & Othman, 1990; Eilam et cols., 1990; Nakajima-Shimada et cols., 1991; Thevelein & Hohman, 1995 e Fu et cols., 2000). Íons  $\text{Ca}^{++}$  presentes no interior de todas as células eucarióticas são importantes mensageiros secundários na transdução de sinais biológicos. Em células de mamíferos, por exemplo, a liberação de  $\text{Ca}^{++}$  a partir de estoques intracelulares através da abertura de canais sensíveis a  $\text{IP}_3$  é requerida para a sinalização de vários eventos celulares (Denis & Cyert, 2002).

Os mecanismos básicos presentes em células de mamíferos e em células de leveduras e que estão envolvidos na sinalização de  $\text{Ca}^{++}$  são similares nos seguintes aspectos: a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre citosólico  $[\text{Ca}^{++}]_{\text{cit}}$ , é extremamente baixa, em torno de 50 - 200 nM (Aiello et cols., 2002); glicose como indutor natural do influxo de  $\text{Ca}^{++}$  (Eilam et cols., 1990); expressão do mesmo repertório de moléculas sinalizadoras (calmodulina, proteínas quinases e fosfatases dependentes de cálcio e calmodulina) (Cunningham & Fink, 1994). No entanto, as vias de sinalização induzidas por este íon parecem ser diferenciadas nestes dois organismos.

Em leveduras, apesar da inexistência de receptores similares para  $\text{IP}_3$  em seu genoma (Goffeau et cols., 1996), vários componentes relacionados com a homeostase de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular já foram identificados, entre eles estão:

- 1) Vcx1 p, um antiporter vacuolar  $\text{H}^+ / \text{Ca}^{++}$  de baixa afinidade que troca íons  $\text{Ca}^{++}$  presente no citoplasma por íons  $\text{H}^+$  presente no vacúolo;
- 2) Pmc1 p, uma  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase de alta afinidade, requerida para a manutenção de  $[\text{Ca}^{++}]_{\text{cit}}$  através do seqüestro de íons  $\text{Ca}^{++}$  em excesso presente no citosol para dentro do vacúolo;
- 3) Pmr1 p, bomba de  $\text{Ca}^{++}$  localizada no Complexo de Golgi, apresenta a mesma função de Pmc1p;
- 4) Yvc1 p, canal de  $\text{Ca}^{++}$  vacuolar que medeia a liberação de  $\text{Ca}^{++}$  para o citoplasma, mediante estresse hiperosmótico (Cunningham & Fink, 1994; Denis & Cyert, 2002) (Figura 1).

Além destes componentes acima, trabalhos recentes com células de *S. cerevisiae* crescidas em glicose têm demonstrado uma relação da resposta TECC – elevação transitória de cálcio citosólico, importante mensageiro secundário para diversas vias de transdução de sinais - e o produto de hidrólise da fosfolipase C - Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>, sendo que o cálcio extracelular parece ser o mediador da resposta TECC. Estes dados vem de encontro com a descoberta de um transportador de Ca<sup>++</sup> de alta afinidade (Cch1/Mid1), presente na membrana citoplasmática de *S. cerevisiae*, que poderia ser o elo de ligação entre o influxo de cálcio extracelular e a resposta TECC em células de leveduras. O mecanismo de abertura deste canal de cálcio em células de leveduras parece ser voltagem-dependente (Tókes-Fusézi et cols., 2002). Além disso, o complexo protéico Gpa2/Gpr1/Plc1 é essencial para a ocorrência do evento TECC, sendo também necessária a fosforilação do açúcar internalizado (Tisi et cols., 2002; Miseta et cols., 2002).

Apesar de tais evidências, Kellermayer, et cols. (2004) demonstraram a importância das bombas e do canal de Ca<sup>++</sup> presentes no vacúolo e no Complexo de Golgi (Vcx1, Pmc1 e Pmr1) para o controle da resposta TECC em células de *S. cerevisiae* submetidas a glicose, sugerindo que além do cálcio externo os estoques intracelulares deste íon são importantes para o evento.

Desta maneira, há muitas controvérsias sobre como ocorre o controle da homeostase do Ca<sup>++</sup> em leveduras e, em particular, em células de *S. cerevisiae*, crescidas em glicose. De acordo com os componentes já estabelecidos para a homeostase de Ca<sup>++</sup> e àqueles envolvidos na ativação ATPásica já descritos na literatura, uma conexão pode ser sugerida já que as vias possuem muitos componentes em comum.

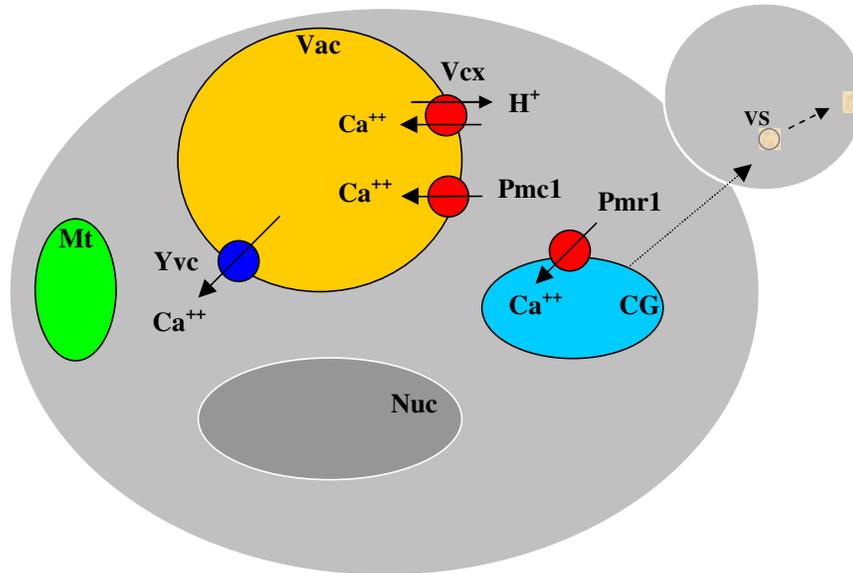


Figura 1: Modelo do fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular em células de leveduras. As setas inteiras indicam o movimento de  $\text{Ca}^{++}$  através das membranas catalisadas por bombas (Pmr1 p e Pmc1 p) ou antiporter  $\text{H}^+/\text{Ca}^{++}$  vacuolar (Vcx) e canais de  $\text{Ca}^{++}$  (Yvc1 p) . As setas tracejadas representam o tráfego de proteínas mediadas por vesículas secretórias. Vac, vacúolo; Mt, mitocôndria; Nuc, núcleo; CG, Complexo de Golgi; VS, vesículas secretórias.  
 Fonte: Cunningham, 1994.

## 1.5 - H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.5.1 - Estrutura da H<sup>+</sup>-ATPase.

A primeira purificação de uma ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae* ativa foi realizada há quase 30 anos (Duffor & Goffeau, 1977). As principais informações descritas então foram:

- pH ótimo em torno de 6,0 e totalmente específica para ATP, com um Km próximo a 1mM para Mg-ATP;
- A atividade ATPásica requer Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ou Co<sup>3+</sup> como cofatores enzimáticos, sendo o íon Mg<sup>2+</sup> o mais efetivo;
- Inibidores competitivos: antibiótico Dio-9, suloctidil ou miconazol, inibidores não competitivos como vanadato ou diciclohexilcarbodiámid (DCCD), e inibidores irreversíveis como *p*- hidroximercuriobenzoato;
- Apenas uma subunidade de aproximadamente 100 KDa ancorada na membrana citoplasmática.

Após a descoberta de uma ATPase de membrana citoplasmática em *S. cerevisiae*, muitos estudos foram intensificados com o objetivo de se elucidar a estrutura e função desta enzima crucial para o metabolismo da levedura.

Através de experimentos de reconstituição em lipossomos, demonstrou-se que a ATPase é uma bomba de próton dependente de ATP; além disto, estudos paralelos com o fósforo radioativo mostraram a formação de uma ligação intermediária beta-aspartil-fosfato como parte essencial do ciclo de reação. Estas duas características, acompanhadas por sensibilidade a concentrações micromolares de ortovanadato inorgânico, classificaram a H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática de fungos no grupo das ATPases-tipo P (Malpartida & Serrano, 1980; Bowman et cols., 1981)

As ATPases tipo P são fosforiladas em um resíduo de aspartato na posição 378 em uma seqüência invariável DKTGT. Estas enzimas têm sido identificadas em quase todos os organismos estudados e possuem uma variedade de substratos como K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e fosfolipídeos. Também apresentam domínios altamente conservados, sendo que estas regiões estão envolvidas na comunicação entre a hidrólise do ATP e mudança conformacional da enzima, ligação dos cofatores e ligação do ATP (Axelsen & Palmgren, 1998). Além disso, estudos da estrutura

secundária e de cristalização protéica sugerem uma estrutura consenso com dois amplos domínios hidrofílicos e 10 segmentos transmembranares em todas as ATPases tipo P. Os domínios N-terminal e C-terminal estão localizados no lado citosólico da membrana citoplasmática (Scarborough, 2003) (Figura 2).

Geneticamente bem caracterizadas, as  $H^+$ -ATPases de *S. cerevisiae* e de *Schizosacharomyces pombe* são codificadas pelo gene *PMA1* (Serrano et cols., 1986). Um segundo gene, *PMA2*, codificando para a  $H^+$ -ATPase e mostrando alta homologia com *PMA1*, está presente em ambos os microrganismos, no entanto, a Pma2 p é expressa em níveis muito baixos e sua função fisiológica ainda não está bem estabelecida (Portillo, 2000).

### 1.5.2 – Função da $H^+$ -ATPase de membrana citoplasmática

A funcionalidade e as propriedades particulares desta enzima podem ser apresentadas da seguinte maneira: uma bomba de prótons que tem como função básica criar um gradiente eletroquímico; importante para a captação de nutrientes e regulação do pH intracelular (Dufour & Goffeau, 1980).

Além disso, apresenta vários domínios funcionais: na região N-terminal temos o domínio de atividade fosfatásica; o domínio de fosforilação, que a difere das ATPases presentes no vacúolo (ATPases-V) e nas mitocôndrias (ATPases-F), pois contém um resíduo de aspartato presente na posição 378 que é fosforilado durante a catálise; o domínio de ligação do ATP e de atividade quinase e o domínio regulatório na região C-terminal (Serrano & Portillo, 1990).

Um grande avanço no estudo desta enzima foi aferido quando genes *PMA1* que codificam para as  $H^+$ -ATPases de leveduras e de *Neurospora crassa* foram clonados e suas seqüências de aminoácidos deduzidas foram comparadas com as  $Ca^{++}$ -ATPases de retículo sarcoplasmático e com as  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPases de membrana citoplasmática de células renais (Serrano et cols., 1986; Hager et cols., 1986; Addison, 1986). Analisando estas seqüências, observou-se que todas as enzimas apresentavam um modelo topológico comum. A região central estende-se dentro do citoplasma e contém motivos altamente conservados para a ligação do ATP e para a fosforilação (Ambesi et cols., 1999). Uma evidência incisiva destes dados veio de trabalhos desenvolvidos por Ogawa et cols. (2000), que cristalizaram a  $Ca^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático de coelho. As imagens cristalográficas mostraram que a enzima possui um largo “capacete” citoplasmático conectado a

região transmembranar por um curto segmento e que o “capacete” parece dividir o domínio de ligação do cálcio na membrana. Além disso, esta técnica mostrou a estrutura da bomba de cálcio presente no retículo sarcoplasmático com dois íons cálcio ligados aos sítios transmembranares com 2,6 Å de resolução. A estrutura cristalina da Ca<sup>2+</sup>-ATPase de retículo confirmou a topologia geral das ATPases tipo P.

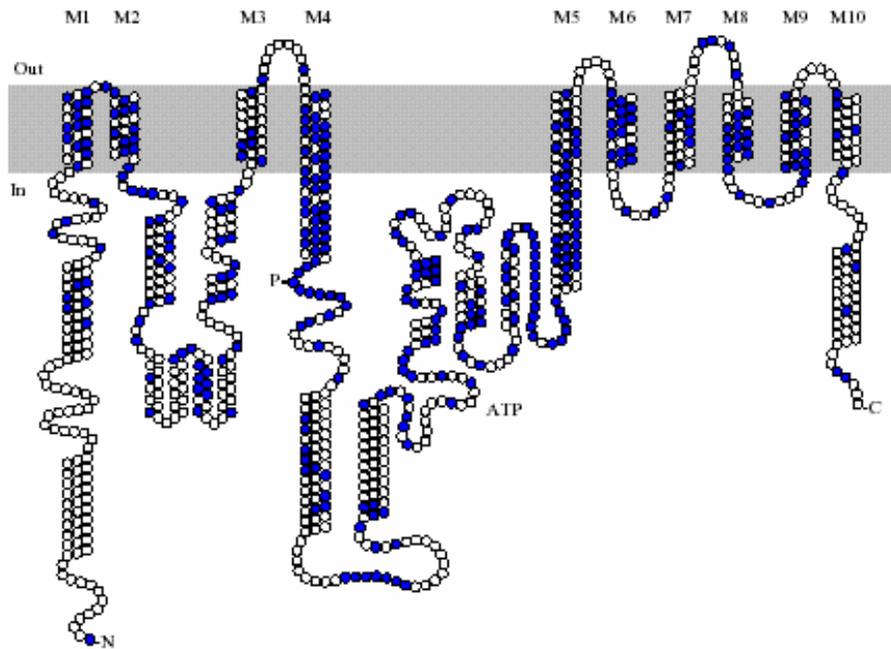


Figura 2: Modelo topológico da  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática de fungos. Resíduos marcados em azul estão presentes nas ATPases *PMA1* e *PMA2* de *S. cerevisiae*. M1-M10: são as extensões segmentares ao longo da membrana; P: representa o sítio de fosforilação; ATP: mostra o sítio de ligação do ATP na enzima.

Fonte: Ambesi, (1999).

1.5.3- Regulação transcricional da  $H^+$ -ATPase de membrana citoplasmática

Excluído: ¶

A nível transcricional, a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae* ocorre através do aumento da síntese de mRNA de *PMAI*, através de um mecanismo controlado por glicose (Rao et cols., 1993).

Capieaux et cols. (1989), demonstraram duas seqüências que antecedem o gene *PMAI*, denominadas UAS1<sub>*PMAI*</sub> e UAS2<sub>*PMAI*</sub>, os quais são requeridos para a expressão de *PMAI*. Essas duas regiões compartilham nove pares de bases repetidas, a qual é homóloga a UAS<sub>*RPG*</sub>, uma seqüência consenso que controla a expressão de vários genes que codificam para proteínas ribossomais (Leer et cols., 1985; Huet et cols., 1985). A transcrição destes genes é regulada por um fator de ligação ao DNA, chamado TUF/RAP1/GRF1, o qual já foi demonstrado também se ligar às regiões UAS1 e UAS2 de *PMAI* (Capieaux et cols., 1989). O fator de ligação ao DNA (TUF) possui um papel secundário relacionado ao controle de genes envolvidos no crescimento celular, incluindo transcrição, tradução, glicólise, transporte e diferenciação celular. O sinal desencadeador para ativar este fator parece ser a glicose (Rao et cols., 1993).

A ativação transcricional induzida por glicose de vários genes para proteínas ribossomais (Herruer et cols., 1987) e a enzima glicolítica enolase (Cohen et cols., 1987; Machida et cols., 1988), são mediadas pela seqüência consenso UAS<sub>*RPG*</sub>. Com isso, é possível sustentar a hipótese que a regulação da expressão da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por glicose é mediada pelo fator de ligação ao DNA, Tuf p, o qual é modulado positivamente pelo açúcar internalizado e fosforilado (Rao et cols., 1993). Este fator, uma vez ativado pela presença da glicose internalizada e fosforilada, parece adquirir a capacidade de se ligar a região *UAS*, que então promove o aumento da transcrição gênica e conseqüentemente o aumento da síntese protéica. A H<sup>+</sup>-ATPase, assim produzida é direcionada a membrana citoplasmática da levedura pelo Complexo de Golgi (Figura 3). Além disso, Garcia-Arranz et cols., (1994), isolaram e caracterizaram um gene, *APAI*, que controla a expressão de *PMAI*, de maneira independente da regulação já descrita para o fator transcricional TUF/RAP1/GRF1, possivelmente, atuando em uma via de sinalização por glicose, já que deleções nesse gene afetam drasticamente a expressão de genes induzidos por glicose (*PMAI*), bem como genes reprimidos por glicose (*SNF3*, *HXT3*). A função detalhada do produto gênico, *APAI*, ainda é desconhecida, contudo, a regulação da expressão da H<sup>+</sup>-ATPase por glicose é mais uma vez fortalecida com a descoberta desse gene. Goossens et cols., (2000) descreveram um fator de transcrição - Gln3 - que seria responsável pelo aumento da expressão da H<sup>+</sup>-ATPase sob condições

de jejum por nitrogênio. Esta proteína, Gln3, pertence à família de fatores com motivos dedos de zinco e se liga a seqüências GATAA únicas.

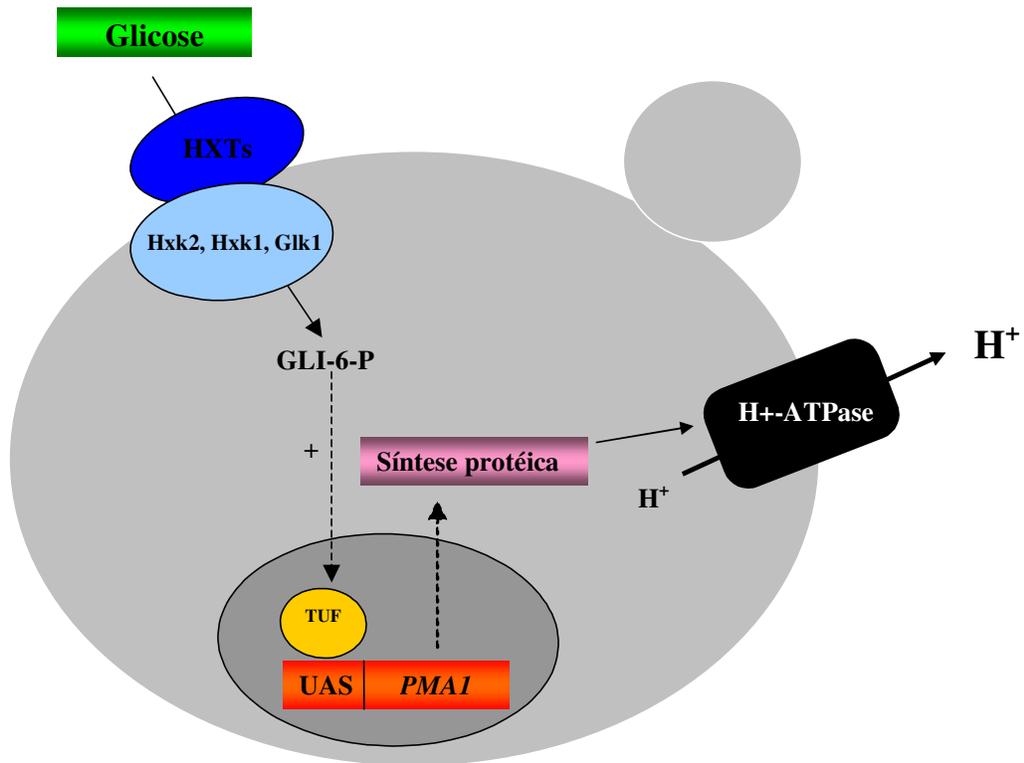


Figura 3: Modelo da regulação transcricional da  $H^+$ -ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae* por glicose. HXTs – transportadores de glicose; Hxk1, Hxk2, Glk1 - quinases que fosforilam a glicose quando internalizada; MP-membrana citoplasmática.  
 Fonte: Rao (1993).

#### *1.5.4- Regulação pós-transcricional da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática*

A nível pós-transcricional a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase parece ocorrer através da eliminação de uma interação inibitória da região C-terminal da enzima com o seu sítio ativo. Em leveduras, a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase é regulada pelo estado fisiológico da célula, aumentando sua atividade durante o metabolismo em presença de glicose e pH ácido (Serrano, 1983), além de outros agentes externos, como situações de estresse desencadeadas pela presença de etanol (Sá-Correia & Monteiro, 1997), presença de ácidos orgânicos (Viegas & Sá-Correia, 1991) e choque térmico (Piper et cols., 1997) também são capazes de promover um aumento da atividade enzimática.

Dois mecanismos parecem estar envolvidos no processo de ativação pós-transcricional: fosforilação direta da enzima (Chang & Slayman, 1991; Eraso & Portillo, 1994; Goossens et cols., 2000) e/ou degradação proteolítica de uma proteína inibitória hipotética do processo de ativação (de la Fuente et cols., 1997).

Acredita-se que a ativação por glicose poderia desencadear uma modificação da região C-terminal, liberando a inibição, permitindo à enzima adotar uma conformação ativa. Esta ativação é mediada por fosforilação de resíduos de serina e/ou treonina por intermédio de uma proteína quinase cuja identidade é ainda desconhecida, embora diferentes sítios de fosforilação consenso para diferentes quinases já tenham sido descritos (Diffley, 1992; Portillo, 2000; Mason et cols., 1998).

Eraso & Portillo (1994) demonstraram que dois sítios de fosforilação envolvendo os resíduos de Serina 899 e Treonina 912, localizados na região C-terminal, no domínio regulatório da enzima, são essenciais para o decréscimo de Km e aumento de Vmax respectivamente, no processo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por glicose (Figura 4).

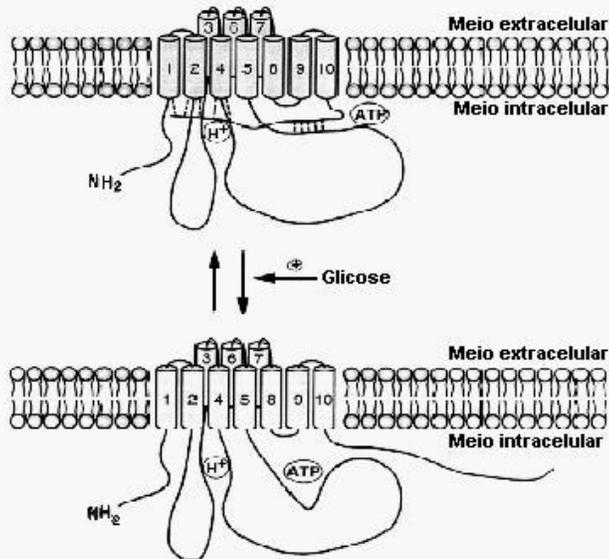


Figura 4: Modelo da regulação pós-transcricional da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática, induzido por glicose. A adição de glicose desencadeia um processo de fosforilação dos resíduos serina-899 e treonina-912 causando, respectivamente redução do K<sub>m</sub> por ATP e elevação do V<sub>max</sub>, resultando em aumento da atividade específica da enzima.  
 Fonte: Portillo, 2000.

## **1.6 - Possíveis vias envolvidas na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae***

### *1.6.1- Via Ras-adenilato ciclase*

A via de sinalização mediada pela Pka parecia estar envolvida no processo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por glicose, uma vez que células submetidas a glicose mostram um aumento dos níveis de AMPc, bem como uma elevação da atividade ATPásica. Nesse mecanismo, a adição de glicose promoveria a elevação dos níveis endógenos de AMPc, o que ativaria a proteína quinase A e esta por fosforilação ativaria a H<sup>+</sup>-ATPase. Evidências favoráveis a este mecanismo vieram de trabalhos de Ulaszewski et cols. (1989) (Figura 5).

Entretanto, Becker dos Passos et cols., (1992) utilizando diversas cepas contendo mutações na via Ras-Adenilato ciclase, demonstraram que a ativação da ATPase induzida por glicose não era mediada pela proteína quinase AMPc dependente. Por outro lado, e baseado na existência na região C-terminal da ATPase de sítios consenso para fosforilação por caseína quinase I e proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina, essas enzimas foram consideradas participantes no processo regulatório (Kolarov et cols., 1988; Kemp & Pearson, 1990; Estrada et cols., 1996).

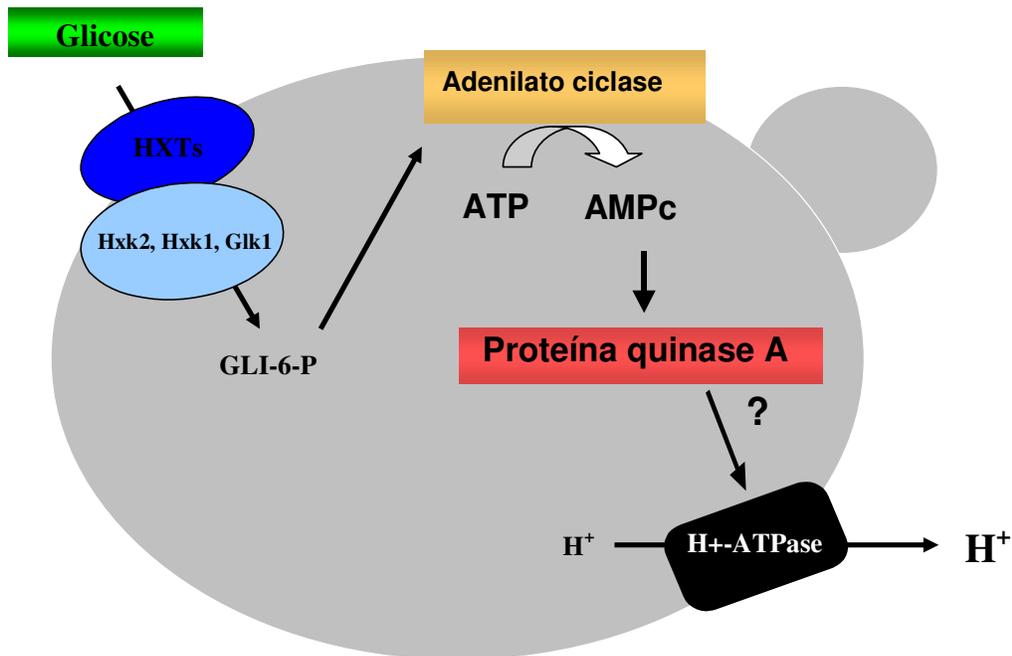


Figura 5: Mecanismo hipotético de ativação induzida por glicose da  $H^+$ -ATPase de membrana citoplasmática da levedura *S. cerevisiae*, via Proteína quinase dependente de AMPc (PKA).

Considerando que glicose também estimula em células de leveduras o “turnover” do fosfatidilinositol (Kaibuch et cols., 1986; Francescotti et cols., 1990 e Flick & Thorner, 1993), Brandão et cols., (1994) decidiram estudar o possível envolvimento deste processo na regulação da H<sup>+</sup>-ATPase. Assim, trabalhando com inibidores e ativadores da proteína quinase C, bem como inibidores da proteína quinase dependente de Ca<sup>++</sup>/ calmodulina e da fosfolipase C, foram encontradas evidências sugerindo a existência de uma via de sinalização semelhante à via fosfatidilinositol de mamíferos com a provável participação da Pkc1 p na ativação induzida por glicose da H<sup>+</sup>-ATPase de levedura. De fato, o envolvimento de fosfolipídeos encontrados na membrana citoplasmática controlando a atividade da ATPase foi descrito anteriormente por Patton & Lester (1992).

Souza et cols. (2001) além de demonstrar a participação da proteína G Gpa2 p, do sensor de alta afinidade de glicose Snf3 p e a necessidade da entrada e fosforilação da glicose no processo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase, confirmaram ainda o envolvimento da proteína quinase C na via de sinalização que resulta na ativação da enzima, utilizando pela primeira vez cepas com mutações nos genes da via PKC MAP quinase.

Curiosamente, a via que participa da homeostase do cálcio apresenta muitas similaridades com o mecanismo que regula a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase em células de leveduras. Embora nem todos os componentes desta via tenham sido identificados, sabe-se que a presença de glicose promove uma elevação transitória de cálcio citosólico (conhecido como resposta TECC), provavelmente através da abertura de canais de Ca<sup>++</sup> presentes na membrana citoplasmática (CCh1/Mid1) e com o subsequente influxo de Ca<sup>++</sup> extracelular. Para a ocorrência deste evento também se faz necessário o transporte e fosforilação da hexose, bem como a participação da fosfolipase C e da proteína G, Gpa2 p (Tisi et cols., 2001, Tökes-Füzési et cols., 2002). Tudo isto sugere uma conexão entre estas duas vias de sinalização, e que, de alguma maneira, o metabolismo do cálcio poderia ser o evento integrativo envolvido na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por glicose.

## 1.7 – Mecanismo proposto para a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática induzida por glicose

De acordo com todos os trabalhos relatados na literatura que procuram evidenciar o papel da glicose no mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática em células de *S. cerevisiae* e baseando-se nos trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório foi proposto o seguinte modelo hipotético: Primeiramente a glicose seria internalizada e fosforilada o que geraria um sinal, provavelmente relacionado a um balanço entre os níveis de glicose-1-P e glicose-6-P, que seria detectado pelo domínio C-terminal do sensor de glicose Snf3 p. Esta proteína, uma vez estimulada promoveria a inibição da Ca<sup>++</sup>-ATPase presente no vacúolo (Pmc1 p) e conseqüentemente alteraria os níveis de Ca<sup>++</sup> citosólico. Em paralelo, e atuando em uma via independente a Snf3 p, a proteína Gpa2 p responderia a presença do açúcar fosforilado (glicose-6-P?) estimulando a ativação da enzima Plc1. Esta enzima, uma vez ativada atuaria hidrolisando o Ptdn-4,5-P gerando DAG e IP<sub>3</sub>. O inositol-1,4,5-trifosfato por sua vez atuaria sobre canais de cálcio presentes na membrana citoplasmática e/ou na membrana de organelas intracelulares, o que acarretaria uma elevação dos níveis de cálcio livre no citosol. Esta elevação seria resultado de dois mecanismos: um com o envolvimento de Snf3 p e outro com o envolvimento de Gpa2 p. A presença dos dois mensageiros secundários, DAG e cálcio, promoveria a ativação da proteína quinase C (Pkc1 p), culminando com a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática por glicose (Cardoso, 2006) (Figura 6).

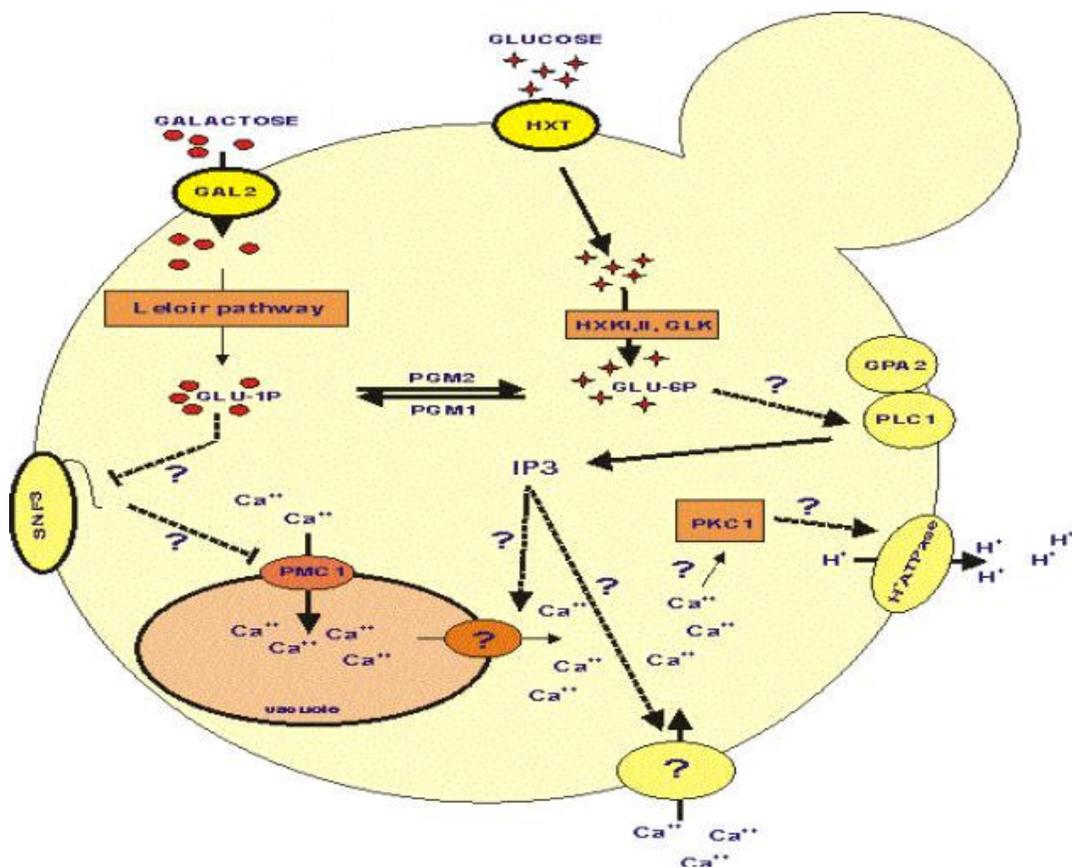


Figura 6: Modelo hipotético da ativação, induzida por carboidrato, da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática mediada por íons cálcio, via Pkc1 p.

Fonte: Trópia, 2006

## 1.8 - Ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes

Trabalhos desenvolvidos por Ulaszewski et cols., (1989), demonstraram uma possível relação entre a ativação da via AMPc com a subsequente ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae*. Neste trabalho eles demonstraram que os mesmos indutores (glicose ou acidificação intracelular) ativam tanto a via AMPc como a H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática.

Mais tarde, Becher dos Passos et cols. (1992) utilizando mutantes deficientes na via do AMPc confirmaram que a adição de açúcares fermentáveis ou protonóforos em células de *S. cerevisiae* causam uma elevação da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase independente desta via. Os protonóforos apresentam a capacidade de despolarizar a membrana de uma célula quando são submetidos a um meio ácido tornando-se protonados. Neste estado, conseguem transitar livremente pela membrana citoplasmática da célula e uma vez internalizados e expostos a um meio mais alcalino (interior da célula), liberam os íons H<sup>+</sup> e acidificam o meio intracelular, acarretando assim a despolarização da membrana citoplasmática.

Em paralelo a estes achados, Brandão et cols. (1992) demonstraram que a adição de glicose ou agentes despolarizantes (DNP e/ou CCCP em pH 5,0) em células de *Fusarium oxysporum* var. *lini* também promovem um aumento acentuado da atividade H<sup>+</sup>-ATPásica, bem como um aumento dos níveis intracelulares de AMPc. E neste caso, uma possível relação do aumento dos níveis de AMPc e o aumento da atividade ATPásica foi considerada, uma vez que, a presença de um potente inibidor (“acridine orange”) da síntese *in vivo* de AMPc levou a redução da atividade ATPásica. Diante de tantas controvérsias e sabendo-se da dificuldade na produção de mutantes para o fungo *Fusarium oxysporum* var. *lini* e também aos intensos estudos que vem sendo realizados com o processo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por glicose em *S. cerevisiae*, estamos trabalhando com diferentes cepas mutantes de *S. cerevisiae* a fim de desvendar os mecanismos que levam a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes.

Além disso, Eilam et cols. (1990) demonstraram que a acidificação intracelular artificial induzida pela exposição a ácido isobutírico ou CCCP causa uma elevação no influxo de Ca<sup>++</sup> em células de *S. cerevisiae*. Estes dados são coerentes com aqueles demonstrados com glicose, tornando um importante ponto para a investigação do papel dos agentes despolarizantes no mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase e sua possível conexão com a via de sinalização do Ca<sup>++</sup>.

Por fim, o mecanismo de ativação da  $H^+$ -ATPase de membrana citoplasmática por glicose é mais complexo que àquele desencadeado por agentes despolarizantes, pois glicose é o principal recurso energético dos seres vivos, e por isso afeta inúmeras vias de sinalização, dificultando assim, a verdadeira compreensão dos efeitos regulatórios do açúcar sob uma via específica. Já os compostos artificiais, como os agentes despolarizantes, apresentam um efeito mais direto, o que possibilita uma grande vantagem no estudo de vias de sinalização específicas.

## **Objetivos**

---

## 2.1 - Objetivo Geral

Examinar o processo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática por adição de agentes despolarizantes (CCCP), comparando-o com a ativação induzida por glicose.

## 2.2 - Objetivos Específicos

- a) Avaliar o envolvimento da Proteína Quinase C no mecanismo bioquímico de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae* por agentes despolarizantes;
- b) Verificar a participação do cálcio extracelular e intracelular no processo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por agentes despolarizantes;
- c) Estudar o processo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase desencadeada por agentes despolarizantes utilizando cepas mutantes em genes sabidamente envolvidos no processo de ativação por glicose.

## **Materiais e Métodos**

---

### 3.1-Microrganismos utilizados nos experimentos

Em nossos experimentos foram utilizadas cepas com mutações em diferentes genes para a determinação da atividade da enzima H<sup>+</sup>-ATPase desencadeada por agentes despolarizantes. A tabela 1 mostra todas as cepas utilizadas nos experimentos

**Tabela 1** - *Cepas de Saccharomyces cerevisiae*

<b>Cepas</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Procedência</b>
W303	<i>MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100 GAL mal SUC2</i>	Johan Thevelein, Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium
<i>LBCM 394</i>	W303-1A <i>MATa gpa2::LEU</i>	Ieso de Miranda Castro, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil
YSH 850	W303-1A <i>MATa pkc::HIS3</i>	Stefan Hohmann, CMB/Microbiology, Goteborg University, Sweden
3700	<i>MATα ura 3-52 his 3-11,15 trp1 -Δ901 ade2-101</i>	Johan Thevelein, Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium
3703	<i>MATa ura 3-52 his 3-11,15 trp1 -Δ901 ade2-101 plc1::URA</i>	Johan Thevelein, Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium
YM6217	<i>MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-903 leu2-3,112 tyr1-501 MET?</i>	Joab Trajano Silva, Laboratório de Genética e Biologia Celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
YM6175	YM6217 <i>MATa snf3::HIS3</i>	Joab Trajano Silva, Laboratório de Genética e Biologia Celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Sc252 (SJ21R)	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 ade1 MEL</i>	David Bedwel, Departament of Microbiology, The University of Alabama at Birmingham, USA

YDBO384	Sc252 mid1::LEU2	David Bedwel, Department of Microbiology, The University of Alabama at Birmingham, USA
PJ69-2a	MAT $\alpha$ trp-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4 $\Delta$ gal80 $\Delta$ LYS::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ	Enzo Martegani, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Italy
PJ69-4a 1	PJ69-2a Arg82::KanMX2	Enzo Martegani, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Italy
LBCM 502	PJ692aarg82: KanMX2plc1: :URA2	Fernanda Machado de Carvalho, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil
BY4742	MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lis2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0	Coleção de Cepas Euroscarf
YGL006w	BY4742 pmc1:: KanMX2	Coleção de Cepas Euroscarf
YDL194w	BY4742 snf3::KanMX4	Coleção de Cepas Euroscarf
YMR105c	BY4742 pgm2::KanMX4	Coleção de Cepas Euroscarf
YER020w	BY4742 gpa2::KanMX4	Coleção de Cepas Euroscarf
YDR173c	BY4742 arg82::KanMX4	Coleção de Cepas Euroscarf
YBR040w	BY4742 fig1::Kan MX4	Coleção de Cepas Euroscarf

### 3.2 - Meio de cultura e condições de crescimento

O meio de cultura utilizado foi o YP composto por extrato de levedura 1% (p/v), bacto-peptona 2% (p/v), ágar 1,5% (meio sólido – p/v), tanto no meio líquido como no meio sólido. Para a cepa *pkc1*  $\Delta$ , foi incluído ainda sorbitol 1M. As fontes de carbono utilizadas foram as seguintes: glicose 2% (YPD), galactose 2% (YPGAL) ou glicerol 3% (YPGLY) que foram autoclavadas separadamente e acrescentadas assepticamente ao meio em capela de fluxo laminar.

As células da levedura *S. cerevisiae* foram crescidas em dois tubos de ensaio contendo 4 ml de meio de cultura YP glicose 2% com ou sem sorbitol 1M, durante 24 horas, a 28° C e sob agitação

constante. Após o intervalo de tempo necessário, o pré inóculo foi transferido para um erlenmeyer contendo 50 ml do mesmo meio por mais 24 horas e sob agitação, a 200 rpm em agitador New Brunswick modelo G25. Em seguida, foram inoculadas em 1000 ml de meio de cultura YPGLY, YPGAL ou YPD, a 28° C, sob agitação constante nas mesmas condições já descritas para o pré-inóculo, por 24 ou 48 horas, dependendo da fonte de carbono utilizada.

### **3.3 - Atividade H<sup>+</sup>-ATPásica**

#### *3.3.1 - Ativação “in vivo” e coleta de amostras*

As células da levedura *S. cerevisiae* crescidas em meio YPGLY/YPD/YPGAL, foram coletadas por centrifugação a 1000g, por cinco minutos e lavadas duas vezes em tampão de incubação (Mes 100mM pH 5,0 ajustado com Tris Base). Cerca de 3,0 g (peso úmido) dessas células foram transferidas para erlenmeyers distintos, contendo 32 ml do tampão de incubação (um para o experimento com CCCP e outro para o experimento controle com etanol). As células foram incubadas em banho-maria a 30° C, sob agitação constante, por 10 minutos. Nos dois erlenmeyers pré-incubados coletou-se em tempos diferentes uma primeira amostra de 5 ml da suspensão de células, sem a adição de CCCP/Etanol (tempo 0). O etanol foi utilizado como controle, uma vez que, serve como solvente para CCCP. As amostras foram filtradas a vácuo, sendo as células acondicionadas em papel alumínio e imediatamente transferidas para nitrogênio líquido. Após a adição de 3 ml de CCCP (concentração final - 0,5 mM) no primeiro erlenmeyer e 3 ml de etanol no segundo erlenmeyer, foram coletadas outras amostras correspondendo a 5ml da suspensão, em tempos pré-determinados (tempos 2, 5, 10 minutos). As massas celulares obtidas foram tratadas como descrito acima.

#### *3.3.2 – Coleta de amostras na presença de agente quelante - EGTA*

A uma suspensão de células, preparadas como descrito no item anterior, adicionou-se EGTA em uma concentração final de 12 mM. Após incubação por 5 minutos procedeu-se incubação com 0,5mM de CCCP (concentração final) e a coleta das amostras a serem analisadas. Para os experimentos com células incubadas com EGTA 12 mM e cálcio 12 mM, preparou-se uma solução

estoque de  $\text{CaCl}_2$  6 M, em tampão MES 100 mM, pH 5,0 ajustado com Tris Base e desta solução estoque foram retirados alíquotas correspondentes a uma concentração de 12mM de  $\text{CaCl}_2$

### 3.3.3 - *Obtenção das membranas citoplasmáticas*

As amostras congeladas foram transferidas para tubos de ensaio (0,5 mm de diâmetro), contendo 1,5 g de pérolas de vidro, 0,5 ml de tampão de extração (Tris 0,1 M, EDTA 5 mM,  $\beta$  mercaptoetanol 1mM, pH 8,0) e homogenizadas em vórtex duas vezes por 90 segundos com intervalos de resfriamento em gelo como descrito por Becher dos Passos et cols., (1992). Em seguida, foi adicionado 1 ml de tampão de extração. E as amostras foram novamente homogenizadas por 30 segundos. Desta forma uma boa parte das células foram rompidas, possibilitando assim o isolamento de frações de membranas encontradas no organismo celular.

Para a separação das membranas citoplasmáticas de todo o restante de partículas ressuspensas foi feito uma centrifugação fracionada do homogenato: inicialmente, 1000g por 3 minutos, sendo o sobrenadante resultante centrifugado a 15000g por 30 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensão em 1ml de tampão glicerol (Glicerol 20 %, Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM,  $\beta$  mercaptoetanol 1 mM, pH 7,5).

Para a etapa seguinte fez-se um gradiente de sacarose em tubos de centrífuga apropriados adicionando-se: 3 ml de sacarose 53,5% + 6 ml sacarose 43,5 %. O sedimento ressuspensão foi colocado neste gradiente e centrifugado a 100000g por 2 horas. Sabe-se que a membrana citoplasmática da levedura fica retida na interface das duas fases de sacarose (Serrano, 1983). A interface do gradiente foi coletada, sendo esta fração diluída em água Mili-Q a 4<sup>o</sup> C e homogenizada em seguida. Esta nova suspensão foi centrifugada a 100000g por 30 minutos. O sedimento final obtido, contendo a membrana citoplasmática, foi ressuspensão em 300 $\mu$ l de tampão glicerol, sendo utilizado para determinação da atividade  $\text{H}^+$ -ATPásica (Becher dos Passos et cols., 1992).

### 3.4 - Ensaio da atividade H<sup>+</sup>- ATPásica

A determinação da atividade H<sup>+</sup>- ATPásica foi realizada da seguinte forma: as amostras contendo frações de membrana citoplasmática relativas aos diferentes tempos de incubação foram testadas com relação a atividade H<sup>+</sup>-ATPásica, fazendo-se duplicatas para cada uma delas, um controle correspondente a cada amostra, controle colorimétrico em triplicata para o substrato (controle ATP) e um controle geral.

No controle geral foram adicionados todos os reagentes da reação, exceto as amostras e o substrato da enzima (solução de ATP 25mM), nos controles correspondentes às amostras foram adicionados todos os reagentes e as amostras relativas aos diferentes tempos de incubação, exceto o substrato da reação – ATP, nos controles ATP foram adicionados todos os reagentes, exceto as amostras e o ATP foi adicionado após a interrupção da reação. Todos estes controles foram necessários para otimizar a reação de atividade enzimática e também para evitar possíveis resultados alterados por contaminação de Pi livre presente em produtos de limpeza utilizados para a lavagem do material. Assim a reação iniciou pela pré incubação com o tampão de incubação (Hepes 50mM, NaN<sub>3</sub> 10mM - que inibe a ATPase mitocondrial e molibdato de amônio 5mM – que inibe fosfatases ácidas , pH 6,5). Como já foi descrito por Dufour & Goffeau, 1978, a atividade ATPásica requer Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ou Co<sup>3+</sup> como cofatores enzimáticos, sendo o íon Mg<sup>2+</sup> o mais efetivo, desta forma, foram adicionados aos tubos, e em seguida finalmente foram adicionados 40 µl das amostras, nos testes correspondentes e nos brancos das amostras.

Estas soluções foram pré-incubadas a 30° C, em banho-maria por 5 minutos. Em seguida, iniciou-se a reação pela adição de ATP 25 mM (concentração final 1 mM). Após este período de incubação a reação foi interrompida com 250 µl de ácido tricloroacético 10% (TCA-p/v). E nos tubos controles ATP foram adicionados 20µl de solução ATP 25 mM. Cerca de 450 µl de molibdato de amônio 5 mM em HCl 0,8 N (Fixador do fosfato liberado durante a reação de hidrólise de ATP e inibidor da atividade de fosfatases ácidas) foram adicionados em todos os tubos, seguidos da adição de 50 µl de reativo de cor (preparado no momento de sua utilização na reação constituído de Ansa 2,5 mg, Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 1,5g, Na<sub>2</sub> SO<sub>3</sub> 50 mg, 10 ml de água milli-Q). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos e, posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro (Beckman DU-68) a 710 nm (Becher dos Passos et al.,1992). Como padrão de medida de PO<sub>4</sub><sup>-</sup> utilizou-se Na<sub>3</sub>HP0<sub>4</sub>.

A atividade específica expressa em  $\mu\text{moles Pi}/\text{min.}/\text{mg}$  proteína foi calculada por meio da seguinte equação:

$$\text{Ativ.enz.específica } (\mu\text{moles Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}) = \frac{\left[ \frac{\text{Abs. 710nm} - a_1}{b_1} \right] \times 4 \times 6,25}{\left[ \frac{\text{Abs. 546nm} - a_2}{b_2} \right] \times 20 \times 10} \times 1000$$

Sendo que:

- a) Abs. 710nm = Valor da absorbância relativa a hidrólise de ATP.
- b)  $a_1$  = Intercepto da curva padrão de fosfato.
- c)  $b_1$  = Inclinação da curva padrão de fosfato.
- d) 4 = Fator de correção ( $\mu\text{g fosfato}/250\mu\text{l} \rightarrow \mu\text{g fosfato}/\text{ml}$ ) desde que proteína foi expressa em mg/ml.
- e) 6,25 = Fator de diluição da amostra (40  $\mu\text{l}$  da amostra diluídos para 250  $\mu\text{l}$  final do tampão de incubação).
- f) Abs. 546nm = Valor em absorbância referente à dosagem de proteínas.
- g)  $a_2$  = Intercepto da curva padrão de proteínas.
- h)  $b_2$  = Inclinação da curva padrão de proteínas.
- i) 20 = Fator de diluição da amostra para dosagem de proteínas (20  $\mu\text{l}$  da amostra + 380  $\mu\text{l}$  de água).
- j) 10 = Tempo de reação.

### **3.5 - Dosagem de proteína**

A dosagem de proteínas foi feita de acordo com o método de Lowry modificado (Lowry et cols., 1951), utilizando soro albumina bovina como padrão.

### **3.6- Medida de cálcio citosólico livre (sinal de cálcio)**

A concentração de cálcio citosólico livre foi medida pelo uso do método Aequorina (Tisi et cols., 2002). As cepas selvagem contendo o plasmídeo pYX012-AEQ e *plc1Δ* contendo o plasmídeo pYX012-kanMX4-AEQ, foram crescidas em meio rico (YP) suplementados com 2% de glicose (YPD), até a fase exponencial ( $3-8 \times 10^6$  cels/ml). As células foram então coletadas, lavadas por filtração e ressuspensas em tampão Mes/Tris 0.1M pH 5,0. Após incubação de duas horas, em temperatura ambiente, as células foram tratadas com coelenterazina, um substrato do aequorina e que compete com os íons cálcio pelo sítio de ligação da aequorina como descrito por Tisi et cols., 2002. Para medir a captação de cálcio induzida por CCCP a luminescência da aequorina foi medida no luminômetro Berthold Lumat LB 9501/16 em intervalos de 10 s, por 1 min antes e por pelo menos 6 min após a adição de 0,5mM do agente despolarizante. Estes experimentos foram realizados pelo Dr. Enzo Martegani e a Dra. Renata Tisi no Departamento de Biotecnologia e Biociências da Università degli Studi di Milano-Bicocca, em Milão, Itália.

## **Resultados**

---

#### 4.1 – Efeito dos agentes despolarizantes na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae*

As descobertas sobre o processo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por glicose servem como modelo para o estudo do processo de ativação desencadeado por agentes despolarizantes. Assim, nosso trabalho visa compreender e comparar estes dois mecanismos de ativação da enzima dando ênfase àquele desencadeado pelos agentes despolarizantes.

O agente despolarizante utilizado nos experimentos é uma substância solúvel em etanol, contudo já foi demonstrado que o etanol pode agir como indutor da atividade ATPásica. Sá-Correia & Rosa (1990) demonstraram que células de *S. cerevisiae* cultivadas em etanol (3 a 10% v/v) apresentam uma atividade ATPásica mais elevada que àquelas cultivadas na ausência deste composto. Este fenômeno também foi observado posteriormente por Sá-Correia & Monteiro (1997). Em ambos os trabalhos as células foram crescidas na presença de etanol, promovendo assim uma ativação enzimática a nível transcricional, ou seja, aumento da expressão do gene *PMAI*. O etanol utilizado em nossos experimentos foi adicionado pouco tempo antes da determinação da atividade ATPásica, dessa maneira seu efeito a nível transcricional pode ser ignorado. Mesmo assim, experimentos controles foram realizados com o solvente etanol para demonstrar que este solvente não têm efeito sobre a atividade ATPásica nas nossas condições de trabalho.

Para padronizar nossos experimentos, trabalhamos inicialmente com a cepa selvagem W303, com a qual já foi demonstrado uma acentuada ativação H<sup>+</sup>-ATPásica induzida por glicose (Souza et cols., 2001). A figura 7 demonstra uma ativação de 130 % da enzima pelo agente despolarizante utilizado (CCCP), não havendo alteração da atividade com a adição de etanol, sendo considerado o tempo 0 (sem adição do agente despolarizante ou etanol) como 100% de atividade enzimática e os tempos seguintes após a adição do indutor (2, 5, 10 min), relacionados ao aumento ou a permanência da quantidade de fosfato livre na reação (indicativo da atividade enzimática). A partir desse ponto iniciamos as análises experimentais com cepas mutantes em diferentes genes.

#### **4.2 – Envolvimento da proteína quinase C na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes**

A atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de leveduras é regulada por um grande número de fatores ambientais, sendo a glicose o sinal externo mais intensamente investigado.

A necessidade de fosforilações em resíduos de aminoácidos específicos (Ser/Thr) para a atividade enzimática, já está bem consolidado na literatura, contudo, a identidade da proteína quinase responsável por este evento ainda é alvo de muitas controvérsias.

Em 1994, Brandão et cols. demonstraram um possível envolvimento da proteína quinase C na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática por glicose. Mais tarde, Souza et cols. (2001) confirmaram o envolvimento de Pkc1p no processo de ativação desta enzima.

A fim de verificar se a Pkc1 p também participa da ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes, o processo de ativação ATPásica por CCCP foi estudado em cepas deletadas no gene *PKC1*. Nossos resultados indicam uma participação dessa quinase na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes e de uma maneira indireta reduz as possibilidades de uma possível conexão entre a via de sinalização AMPc e o processo de ativação ATPásica por CCCP. Como pode ser visto na figura 8 a adição de CCCP não alterou a atividade enzimática na cepa *pkc1Δ*, enquanto que a adição deste composto elevou em 130 % a atividade ATPásica na cepa selvagem W303.

#### **4.3 - Envolvimento da proteína Gpa2 na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae* por agentes despolarizantes**

Como demonstrado por Kraahman et cols.,(1999) e Ansari et cols., (1999), a proteína Gpa2 faz parte de um complexo protéico envolvendo o receptor Gpr1p e a enzima Plc1 p, sendo que, possivelmente a Gpa2 p atua como proteína de integração do sinal intracelular gerado pela glicose, estimulando a elevação dos níveis de AMPc através da adenilato ciclase. Estudos prévios do nosso laboratório, demonstram a participação da proteína Gpa2 na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de *S. cerevisiae* por glicose (Souza et cols., 2001).

Sabendo-se que a proteína Gpa2 está relacionada com o aumento dos níveis de AMPc e na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por glicose, esta proteína se tornou primordial para estudos com agentes despolarizantes, já que Brandão et cols., (1992) demonstraram uma possível relação entre o aumento dos níveis de AMPc e a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por agentes

despolarizantes em células de *Fusarium oxysporum var. lini*. Na figura 9, estão mostrados os resultados obtidos nos experimentos com a cepa *gpa2Δ*. O resultado mostra, que diferentemente do que ocorre com a ativação por glicose, a proteína Gpa2 não está envolvida no processo de ativação desencadeado por agentes despolarizantes. Conforme pode ser visto a adição de CCCP elevou em 170% (após 5 minutos de adição do agente despolarizante) a atividade enzimática no mutante *gpa2Δ*, resultado similar àquele demonstrado para a cepa selvagem. Os resultados obtidos, juntamente com àqueles demonstrados para o mutante *pkcΔ* reforçam a inexistência de uma relação entre o aumento das níveis de AMPc e a ativação ATPásica em células de *S. cerevisiae* por CCCP.

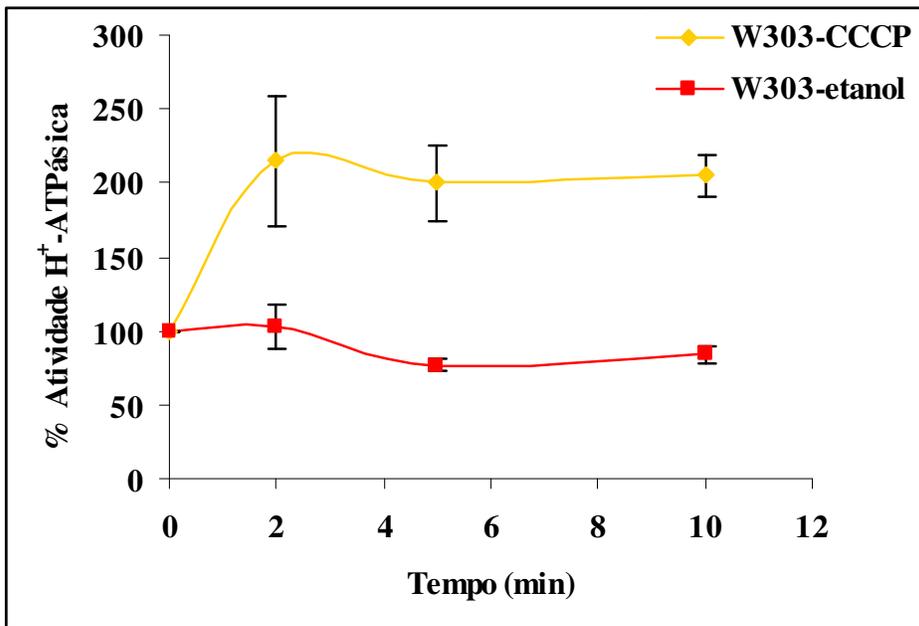


Figura 7: Curva de tempo para atividade enzimática da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/ Etanol 9% em cepas de *S. cerevisiae* selvagem (W 303). Neste experimento obteve-se em média 0,084  $\mu\text{moles de PO}_4^-$ /min/mg de proteína no nível basal que foi considerado 100% de atividade enzimática (tempo 0).

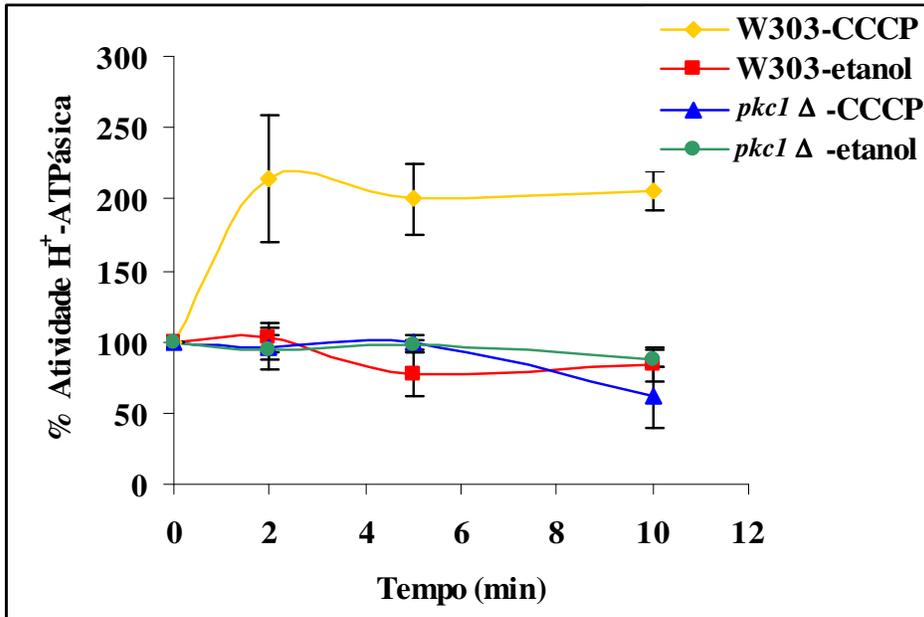


Figura 8: Curva de tempo para atividade enzimática da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas *pkc1*Δ de *S. cerevisiae*, tendo como background genético a cepa W303. Neste experimento obteve-se em média 0,054 μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/min/mg de proteína como nível basal de atividade.

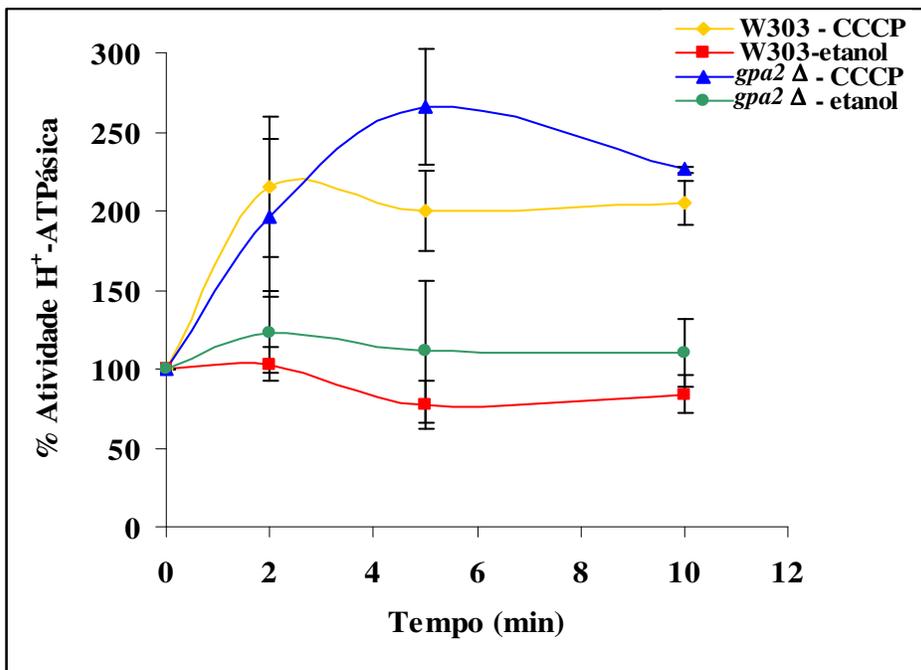


Figura 9: Curva de tempo para atividade enzimática da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas *gpa2*Δ de *S. cerevisiae*, tendo como background genético a cepa W303. Neste experimento obteve-se em média 0,044μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup> / min/mg (CCCP) e 0,042 μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/min/mg (Etanol) (*gpa2*Δ) de proteína como nível basal de atividade.

#### **4.4 – Envolvimento da proteína Plc1 na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes**

Como sugerido por Brandão et cols. (1994), a enzima Plc1 p (fosfolipase C) presente na membrana citoplasmática parece participar na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por glicose, bem como no “turnover” do fosfatidilinositol. Além disso, Cocetti et cols. (1998) demonstraram a participação de Plc1 p no mecanismo de ativação ATPásica induzido por glicose.

A Plc1 p encontra-se inserida na membrana citoplasmática ligada ao receptor protéico Gpr1, que se encontra acoplado a proteína Gpa2, formando um complexo protéico de membrana (Ansari et cols.,1999). Para verificar se existe uma ação conjunta desse complexo protéico (Gpa2p/Gpr1p/Plc1p), testes experimentais com cepas mutantes no gene que codifica para a enzima fosfolipase C (Plc1p) foram realizados. Contrariamente ao que foi observado em relação à proteína Gpa2, a proteína Plc1 parece atuar na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes, já que no mutante *plc1Δ* não foi observado uma elevação da atividade enzimática pelo CCCP. A cepa selvagem apresentou uma clara ativação da atividade ATPásica induzida pelo agente despolarizante (Figura 10). Dessa forma, os resultados mostram que os componentes Gpa2 p e Plc1 p do complexo protéico de membrana não atuam de forma conjunta, mas que apenas Plc1 p participa deste processo. Experimentos com mutantes no gene que codifica para Gpr1 não foram realizados, uma vez que, Souza et cols. (2001) não observaram uma relação deste sensor e a atividade ATPásica induzida por glicose.

#### **4.5 - O papel do Cálcio no processo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática por agentes despolarizantes**

Em 2002, Tisi et cols., demonstraram a participação da fosfolipase C (Plc1) no aumento da concentração de cálcio citosólico induzido por glicose em células de *S. cerevisiae*. Além disso, evidenciaram a participação do complexo protéico de membrana Gpr1/Gpa2 e a necessidade da glicose ser internalizada e fosforilada nesta via. Diferentemente das células de mamíferos, a elevação transitória de cálcio em leveduras parece ser, principalmente, devido ao influxo de cálcio externo através de um canal de cálcio presente na membrana citoplasmática denominado, Cch1/Mid1 (Tökés-Füzesi et cols, 2002). Contudo, muito pouco é conhecido sobre o mecanismo que promove a sinalização do cálcio em leveduras.

De acordo com estes achados, foi colocada a possibilidade de uma conexão entre a via que ativa a H<sup>+</sup>-ATPase e a via de sinalização do cálcio, já que ambas as vias compartilham os mesmos componentes até então estabelecidos. Para evidenciar esta possível conexão, investigamos se a elevação transitória de cálcio citoplasmático é também induzida por CCCP em cepas selvagem e *plc1Δ*. Assim, trabalhando com o método aequorina-coelenterazina evidenciamos em nossos resultados que de maneira similar àquela observada na medida da atividade específica da H<sup>+</sup>-ATPase, a sinalização de Ca<sup>++</sup> é induzida por CCCP na cepa selvagem WT-3700 e está afetada na cepa mutante *plc1Δ* (Figura 11).

Além disso, buscando reforçar a hipótese que sugere a conexão das vias de Ca<sup>++</sup> com a ativação ATPásica, o efeito do agente quelante de Ca<sup>++</sup> (EGTA) foi estudado. Os resultados mostraram que a adição de EGTA impediu o processo de ativação por CCCP e que a adição de Ca<sup>++</sup> restabeleceu o processo de ativação (figura 12). Estes dados sugerem uma provável relação entre a disponibilidade de cálcio extracelular e a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de leveduras por agentes despolarizantes.

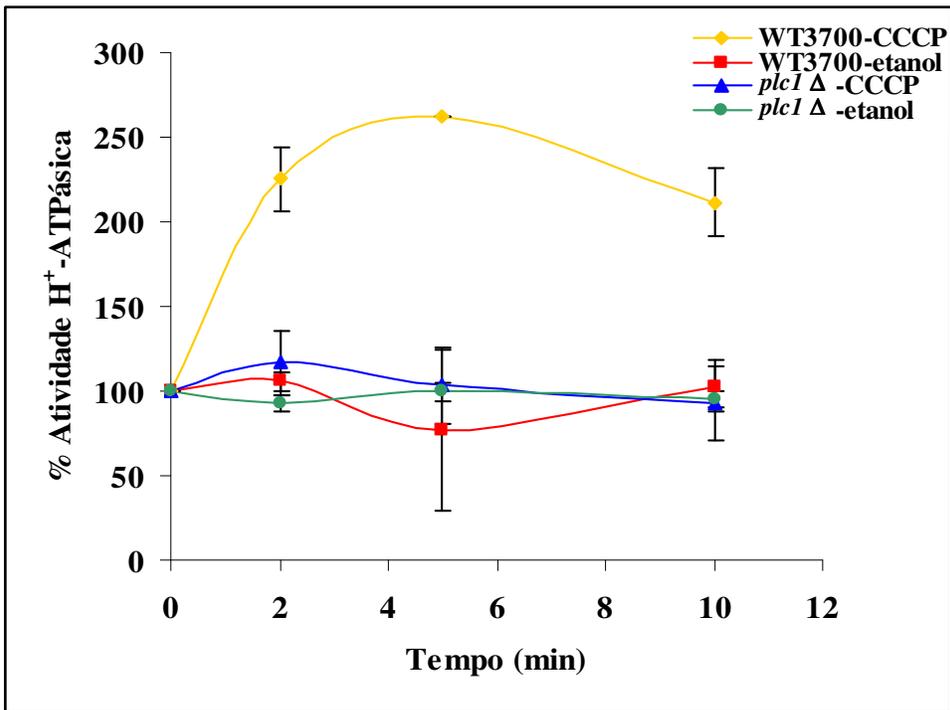


Figura 10: Curva de tempo para atividade enzimática da  $H^+$ -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas *plc1*  $\Delta$  de *S. cerevisiae*, tendo como background genético a cepa WT 3700. Neste experimento obteve-se em média 0,061  $\mu\text{moles PO}_4^- / \text{min/mg}$  (CCCP) e 0,055  $\mu\text{moles PO}_4^- / \text{min/mg}$  (Etanol) (WT 3700) e 0,065  $\mu\text{moles PO}_4^- / \text{min/mg}$  (CCCP) e 0,073  $\mu\text{moles PO}_4^- / \text{min/mg}$  (Etanol) (*plc1*  $\Delta$ ) de proteína como nível basal de atividade.

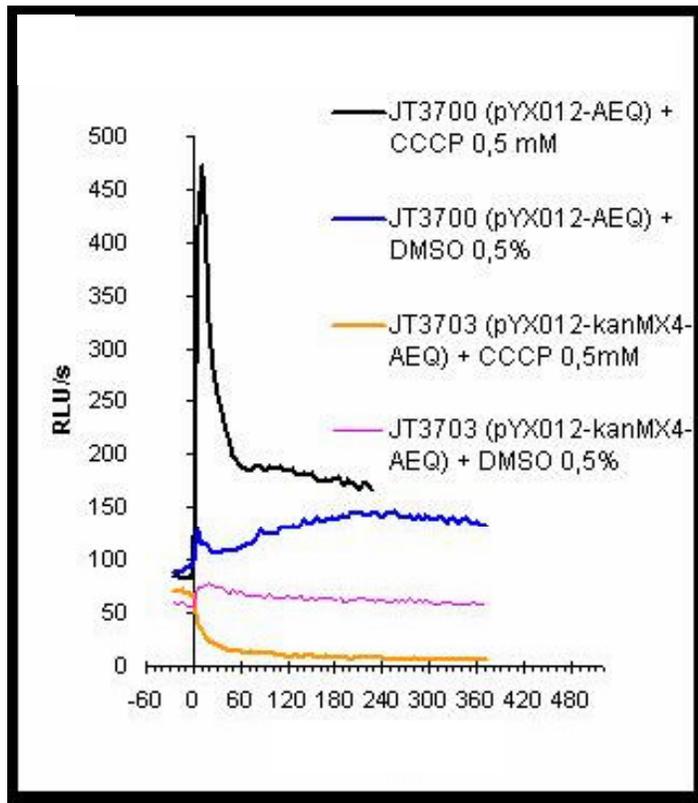


Figura 11: Sinal de cálcio induzido por CCCP em uma cepa selvagem (JT3700) e mutante (*plc1Δ*).  
 DMSO – Solvente do agente despolarizante CCCP  
 RLU/s – Unidade Relativa de Luminescência por segundo

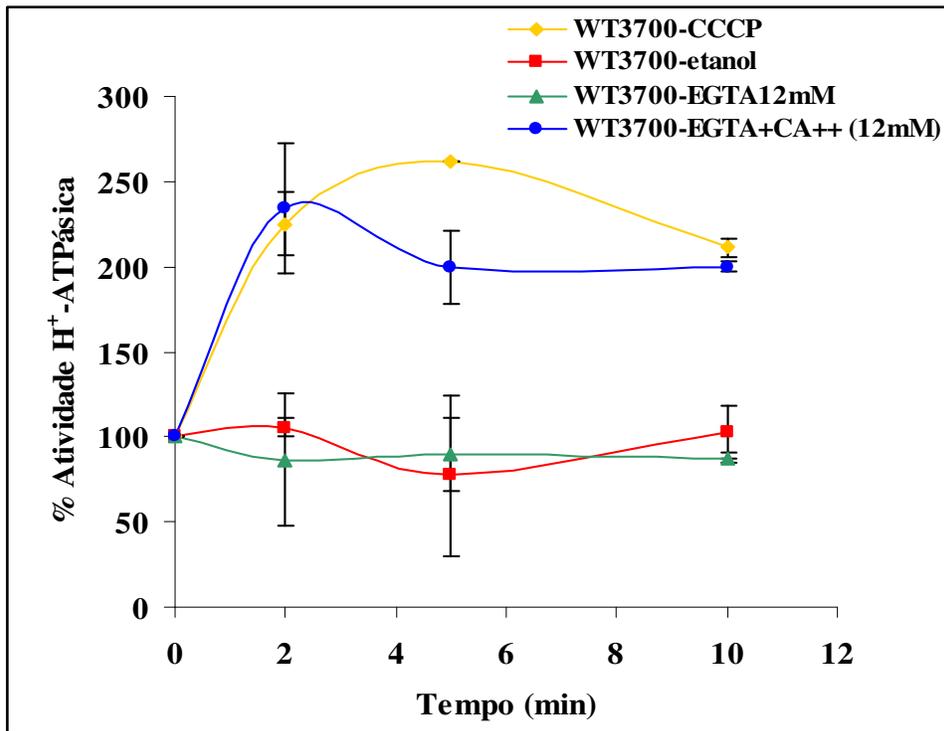
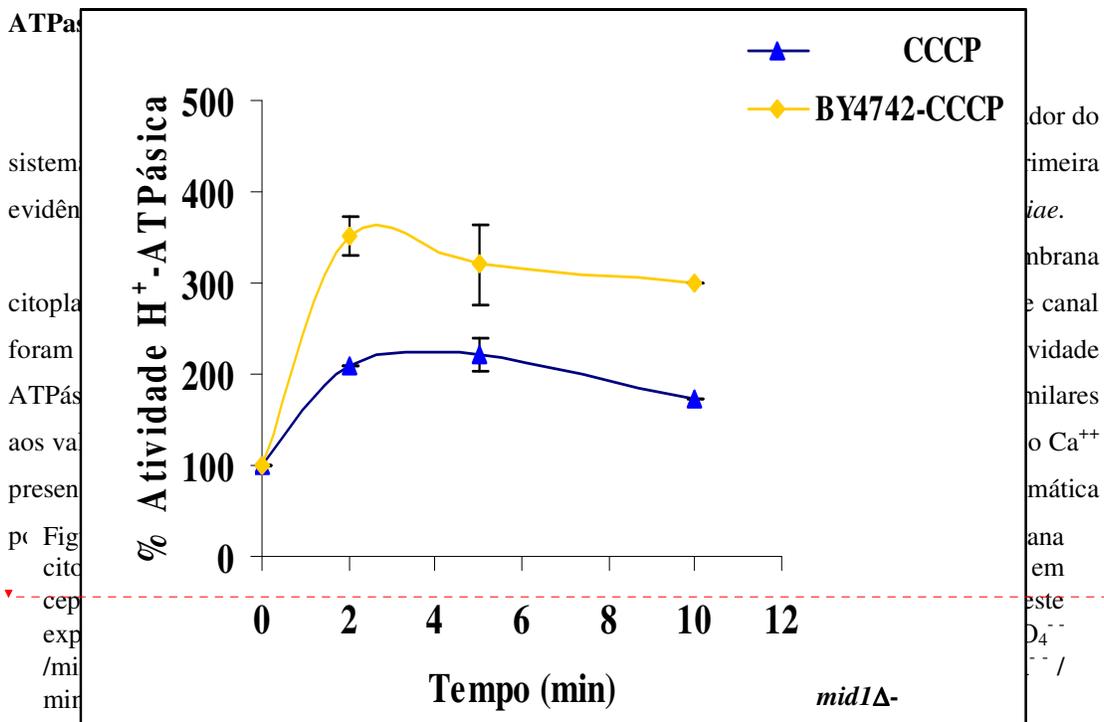


Figura 12: Curva de tempo para atividade enzimática da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas selvagem WT3700. Efeito do agente quelante (EGTA-12mM). Neste experimento obteve-se em média 0,061 μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup> / CCCP e 0,055 μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup> / Etanol (WT 3700) e 0,102 μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup> / EGTA-CCCP e efeito do agente quelante + Ca<sup>++</sup>. Neste experimento obteve-se em média 0,061 μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup> / CCCP e 0,055 μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup> / Etanol (WT 3700) e 0,087 μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup> / EGTA+ Ca<sup>++</sup>-CCCP.

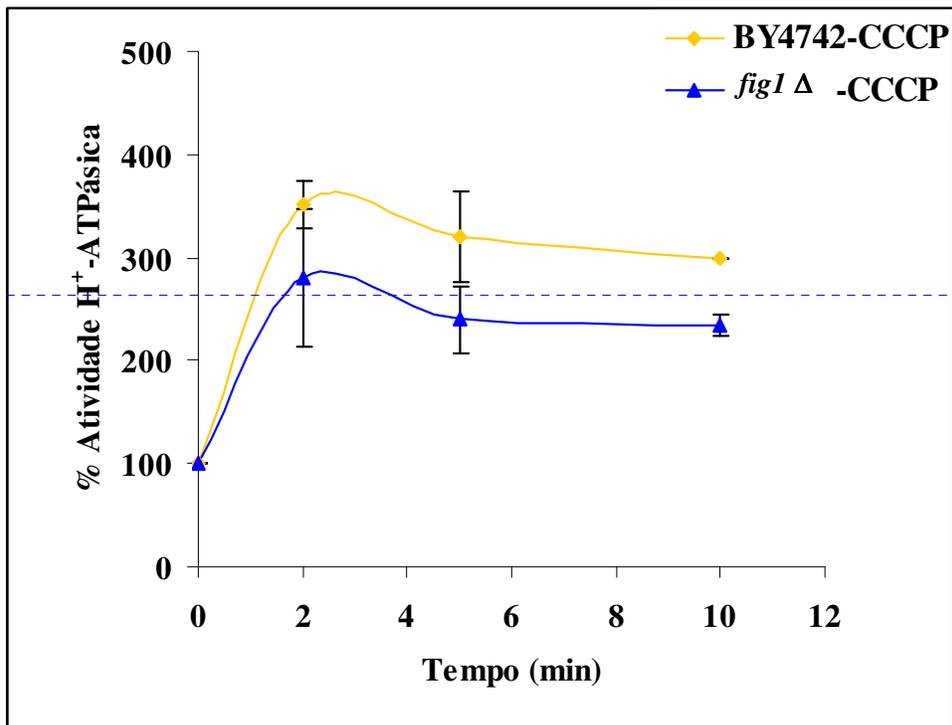
#### 4.6 – Envolvimento de canal de Cálcio de alta afinidade Mid1 p na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes

De acordo com os resultados obtidos utilizando o agente quelante EGTA, e baseando-se em dados da literatura que relatam a necessidade da presença de um canal de cálcio de alta afinidade, denominado Cch1/Mid1, para a ocorrência de uma elevação transitória de cálcio citosólico (TECC) na presença de glicose em células de *S. cerevisiae* (Tökés-Füzesi et cols., 2002), o papel de Mid1 no processo de ativação ATPásica por CCCP foi investigado. Além disso, há evidências de que este canal de cálcio (Mid1/Cch1) é voltagem-dependente, o que reforça a necessidade de investigações do papel deste componente no processo de ativação enzimática, pois o CCCP causa uma despolarização da membrana e possivelmente interfere no mecanismo de abertura e/ou fechamento deste canal (Iida et cols. 1990b; Locke et cols. 2000). Para tal, experimentos com o mutante *mid1Δ* foram realizados. O resultado apresentado na figura 13 sugere que diferentemente do esperado o canal de cálcio de alta afinidade, Mid1 p, possui um papel apenas parcial no processo de ativação H<sup>+</sup>-ATPásica induzida por agentes despolarizantes, portanto a adição de CCCP deve ocasionar outros eventos de sinalização de Ca<sup>++</sup> em *S. cerevisiae*, provavelmente a mobilização de Ca<sup>++</sup> a partir de reservatórios internos ou através de outros canais presentes na membrana da levedura .

#### 4.7 – Envolvimento do canal de Cálcio externo de baixa afinidade, Fig 1 p, na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase



Excluído: ¶



Excluído: ¶  
¶  
¶

Figura 14: Curva de tempo para atividade enzimática da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas *fig1*Δ de *S. cerevisiae*, tendo como background genético a cepa BY4742. Neste experimento obteve-se em média 0,035 μmoles PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> /min/mg (CCCP) (BY4742) de proteína como nível basal de atividade e 0,155 μmoles PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> / min/mg (CCCP) (*fig1*Δ) de proteína como nível basal de atividade.

#### 4.8 – Participação do Inositol-3,4,5-Fosfato na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes

Já que os resultados obtidos anteriormente, não permitiram eliminar totalmente a hipótese do envolvimento do  $\text{Ca}^{++}$  endógeno no mecanismo de ativação ATPásica por agentes despolarizantes, uma vez que, a participação do  $\text{Ca}^{++}$  extracelular neste mecanismo mostrou-se controverso quando analisamos os resultados obtidos com o EGTA (figura 12) e os obtidos com a cepa *mid1Δ* e *fig1 Δ* (figuras 13, 14), decidimos averiguar a possibilidade do cálcio endógeno ser importante para a ativação ATPásica induzida por CCCP.

Em 2003, Tisi et cols. demonstraram a importância do  $\text{IP}_3$  no aumento de cálcio citosólico em células de leveduras expostas a glicose. Além disso, demonstraram que o  $\text{IP}_3$  formado a partir da hidrólise do  $\text{Ptd-4,5-P}_2$  sofre um processo de fosforilações sucessivas por uma quinase denominada Arg82 p. Esta enzima converte  $\text{IP}_3$  em  $\text{IP}_4$  e  $\text{IP}_5$ , uma outra quinase, Ipk1, fosforila  $\text{IP}_5$  em  $\text{IP}_6$ , que é o produto final da metabolização de  $\text{IP}_3$ . Estes pesquisadores evidenciaram que no mutante *arg82Δ* há acúmulo de  $\text{IP}_3$  e ainda um aumento da concentração de cálcio no citosol da célula. Concomitantemente, observaram que o acúmulo de  $\text{IP}_3$  foi totalmente abolido em células *plc1Δ*.

A partir desses dados, e na tentativa de elucidar um possível papel de  $\text{IP}_3$  na ativação da  $\text{H}^+$ -ATPase por agentes despolarizantes, foram realizados experimentos com a cepa *arg82 Δ* e *arg82Δ/plc1Δ*. Nossos resultados sugerem uma participação do  $\text{IP}_3$  no processo de ativação da  $\text{H}^+$ -ATPase, já que o acúmulo deste composto na célula acentua a atividade enzimática quando comparado com a cepa selvagem correspondente (*arg82 Δ*).e na ausência da enzima capaz de formar  $\text{IP}_3$  a atividade enzimática foi drasticamente reduzida (Figura 15).

#### **4.9 - Participação da bomba de cálcio vacuolar, Pmc1 p, na ativação da $\text{H}^+$ -ATPase de membrana citoplasmática por agentes despolarizantes**

Leveduras apresentam bombas e canais de  $\text{Ca}^{++}$ , principalmente na membrana vacuolar, os quais mantêm os níveis de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico em concentrações adequadas para a manutenção da homeostase celular. Entre essas bombas tem-se a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, denominada Pmc1p, que transporta Cálcio excedente no citosol para dentro do vacúolo (Cunningham & Fink, 1994).

De acordo com nossos resultados anteriores, que denotam uma possível relação entre o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico e a atividade enzimática, via  $\text{Ca}^{++}$  endógeno e  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, também foram realizados experimentos com a cepa *pmc1Δ*, tendo sido verificado um

aumento significativo na atividade ATPásica (Figura 16). Os resultados novamente sugerem uma relação entre a homeostase de  $\text{Ca}^{++}$  e a ativação ATPásica por agentes despolarizantes.

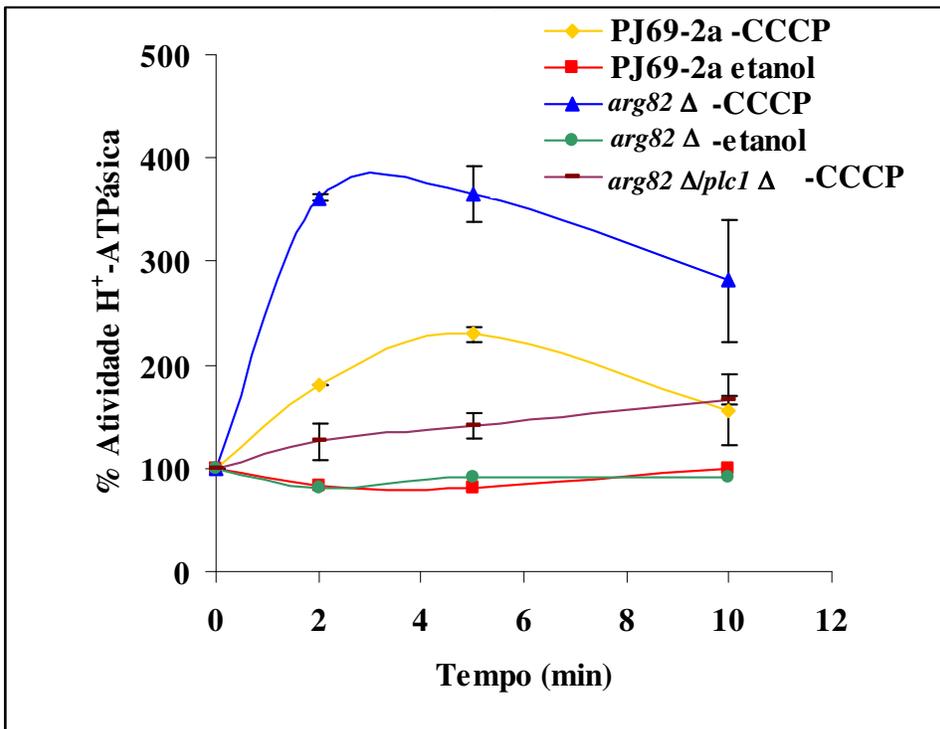


Figura 15: Curva de tempo para atividade enzimática da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas *arg82*Δ e *arg82*Δ*plc1*Δ de *S. cerevisiae*, tendo como background genético a cepa PJ692a. Neste experimento obteve-se em média 0,0 685 μmoles PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> / min/mg (CCCP) e 0,106 μmoles PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> / min/mg (etanol) (PJ69-2 a), 0,009 μmoles PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> / min/mg (CCCP) e 0,0094 μmoles PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> / min/mg (etanol) (*arg82*Δ) e 0,069 μmoles PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> / min/mg (CCCP) (*arg82*Δ*plc1*Δ) de proteína como nível basal de atividade.

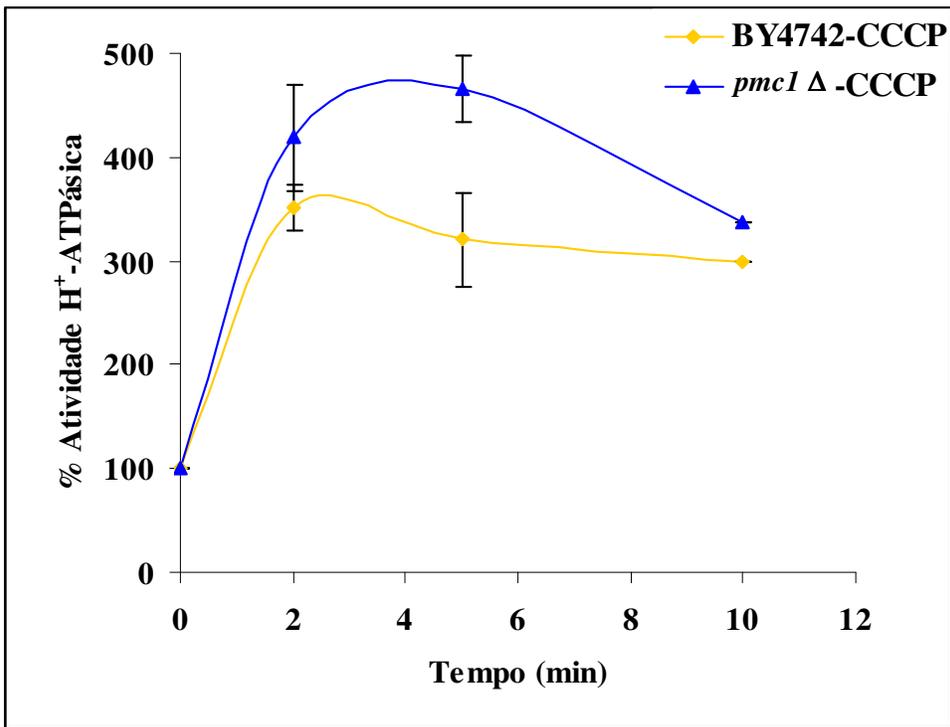


Figura 16: Curva de tempo para atividade enzimática da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas *pmc1*Δ de *S. cerevisiae*, tendo como background genético a cepa BY4742. Neste experimento obteve-se em média 0,033 μmoles PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> / min/mg (CCCP) (*pmc1*Δ) de proteína como nível basal de atividade.

#### 4.10 – Envolvimento da enzima fosfoglucomutase, Pgm2 p, na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes

Como os nossos resultados anteriores demonstram uma provável participação do Ca<sup>++</sup> intracelular na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por CCCP, e baseando-se em trabalhos recentes da literatura (Aiello et cols., 2004), experimentos com um mutante no gene que codifica para a enzima fosfoglucomutase (Pgm p) foram realizados.

*Saccharomyces cerevisiae* possui dois genes que codificam para a enzima fosfoglucomutase (Pgm p), a qual interconverte Glc-1-P e Glc-6-P. O gene *PGM2* codifica a isoforma responsável por aproximadamente 90% da atividade de fosfoglucomutase em células crescidas em galactose, enquanto o produto do gene *PGM1* possui cerca de 10% da atividade. A direção do fluxo metabólico, ou seja, a produção de Glc-1-P ou Glc-6-P é diretamente dependente da fonte de carbono utilizada para o crescimento (Aiello et cols., 2004). Quando glicose é utilizada como fonte de carbono, um baixo nível de atividade de fosfoglucomutase é requerida para manter os níveis de Glc-1-P utilizado como substrato na síntese de derivados nucleotídeos como UDP-glicose. Esta UDP-glicose é necessária para reações anabólicas como síntese de glicogênio e biossíntese da parede celular. No entanto, um alto nível de atividade de fosfoglucomutase é requerida durante o crescimento em meio contendo galactose como fonte de carbono para possibilitar a formação de Glc-6-P e sua utilização na vias glicolítica e pentose fosfato. Consistente com a idéia de uma grande necessidade do fluxo metabólico de Glc-1-P a Glc-6-P, um mutante *pgm2Δ* acumula altos níveis de Glc-1-P quando crescida em meio contendo galactose como única fonte de carbono (Fu et cols., 2000). Além disso tem sido demonstrado que este alto nível de Glc-1-P é acompanhado por uma alta taxa de entrada e acumulação de Ca<sup>++</sup>, sugerindo um possível elo de ligação entre os metabólitos de glicose e a homeostase de Ca<sup>++</sup> em leveduras.

Por outro lado, Aiello et cols., (2004) verificaram uma provável conexão entre as alterações na homeostase de Ca<sup>++</sup> observadas em células *pgm2Δ* crescidas em galactose e a atividade da Ca<sup>++</sup>-ATPase de vacúolo, Pmc1 p. De acordo com esses autores, Glc-1-P de maneira indireta estaria alterando a expressão gênica e a atividade de Pmc1 p. Dessa forma como observamos um aumento da atividade ATPásica no mutante *pmc1Δ* (Figura 16) decidimos verificar a possível relação de Glc-1-P na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por agentes despolarizantes. Para tanto, cepas mutantes no gene que codifica para Pgm2 p foram crescidas em meio contendo galactose como única fonte de

carbono. Os resultados sugerem que os metabólitos de glicose Glc-1-P não possuem relação com a atividade ATPásica induzida por CCCP (Figura 17). Esses dados permitem a colocação de uma hipótese pela qual o mecanismo de ativação ATPásica por agentes despolarizantes ocorra principalmente por uma via única (via enzima fosfolipase C) e que, vias paralelas que também promovem elevação do  $\text{Ca}^{++}$  citoplasmático e subsequente ativação ATPásica por glicose não são estimuladas quando CCCP é utilizado como indutor da atividade  $\text{H}^+$ -ATPásica. Os resultados sugerem ainda que o indutor utilizado (CCCP), sendo um produto não metabolizado pelas células de leveduras, promoveria elevações nos níveis de  $\text{IP}_3$ , que acentuam a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico, através do influxo de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular e/ou de sua mobilização de reservatórios endógenos. Assim, o aumento na  $[\text{Ca}^{++}]_{\text{cit}}$  promovido pelo agente despolarizante é suficiente para desencadear o processo de ativação ATPásica.

#### **4.11 – Envolvimento do sensor de glicose, Snf3 p, no mecanismo de ativação da $\text{H}^+$ -ATPase por agentes despolarizantes**

De acordo com os resultados anteriores e baseando-se em dados da literatura que demonstram a importância da cauda C-terminal do sensor de glicose, Snf3 p, na detecção dos níveis de Glc-6-P (metabólito de glicose) (Dlugai et cols., 2001), bem como a importância de Snf3 no mecanismo de ativação ATPásica por glicose (Souza et cols., 2001), foi proposto em nosso laboratório uma possível relação de Snf3 p na detecção dos níveis de Glc-1-P/Glc-6-P nas células de leveduras crescidas em fontes de carbono que possuem como produto do metabolismo Glc-1-P e/ou Glc-6-P (galactose/glicose). Por outro lado, Aiello et cols., (2004) sugeriram que Glc-1-P de maneira indireta altera a expressão gênica ou a atividade de Pmc1 p. De acordo com esses autores uma proteína ou outro metabólito parece ser necessário na geração da resposta promovida pelo aumento dos níveis de Glc-1-P na célula. Assim, de acordo com resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório, experimentos com o mutante *snf3Δ* foram realizados. Os resultados obtidos demonstram uma possível interferência deste sensor no mecanismo de ativação da  $\text{H}^+$ -ATPase por agentes despolarizantes, já que o mutante apresentou uma elevação da atividade enzimática em torno de 150% e o selvagem correspondente apresentou uma elevação da atividade em torno de 250%.

De acordo com esse resultado acreditamos que a ausência do provável inibidor da bomba de  $\text{Ca}^{++}$ , Pmc1 p, promove uma alteração profunda na homeostase de  $\text{Ca}^{++}$  e que mesmo a presença de um potente indutor da atividade ATPásica não foi capaz de promover uma sinalização de  $\text{Ca}^{++}$  satisfatória para desencadear a ativação completa da  $\text{H}^+$ -ATPase (Figura 18).

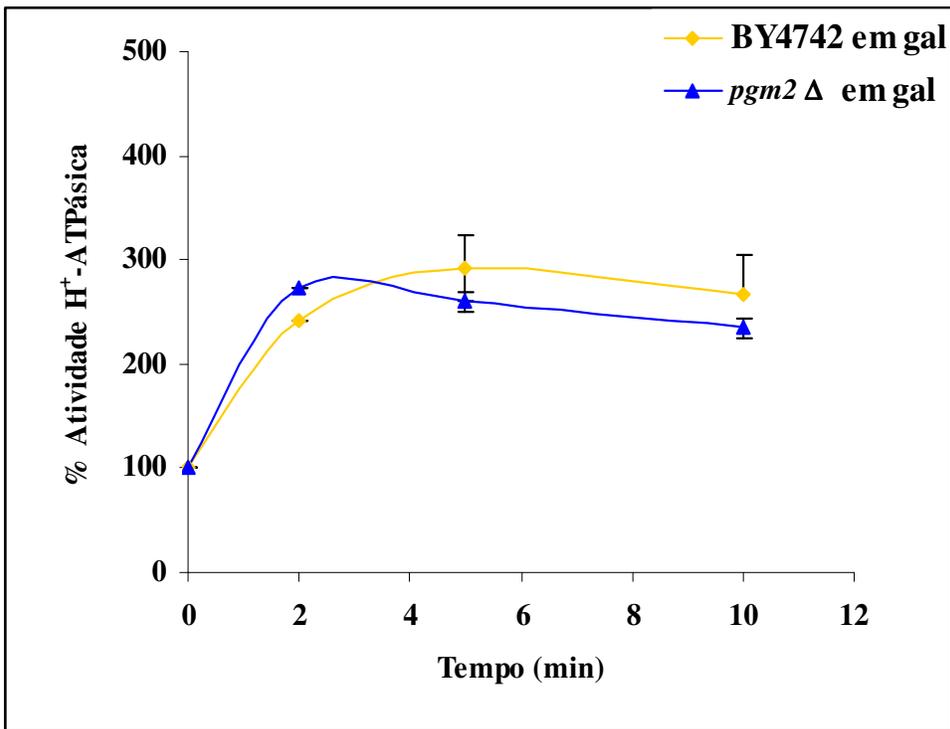


Figura 17: Curva de tempo para atividade enzimática da  $H^+$ -ATPase de membrana citoplasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas *pgm2*Δ de *S. cerevisiae*, tendo como background genético a cepa BY4742. Neste experimento obteve-se em média 0,025  $\mu\text{moles PO}_4^{3-} / \text{min/mg}$  (CCCP) (BY4742) de proteína como nível basal de atividade, 0,017  $\mu\text{moles PO}_4^{3-} / \text{min/mg}$  (CCCP) (*pgm2*Δ) de proteína como nível basal de atividade.

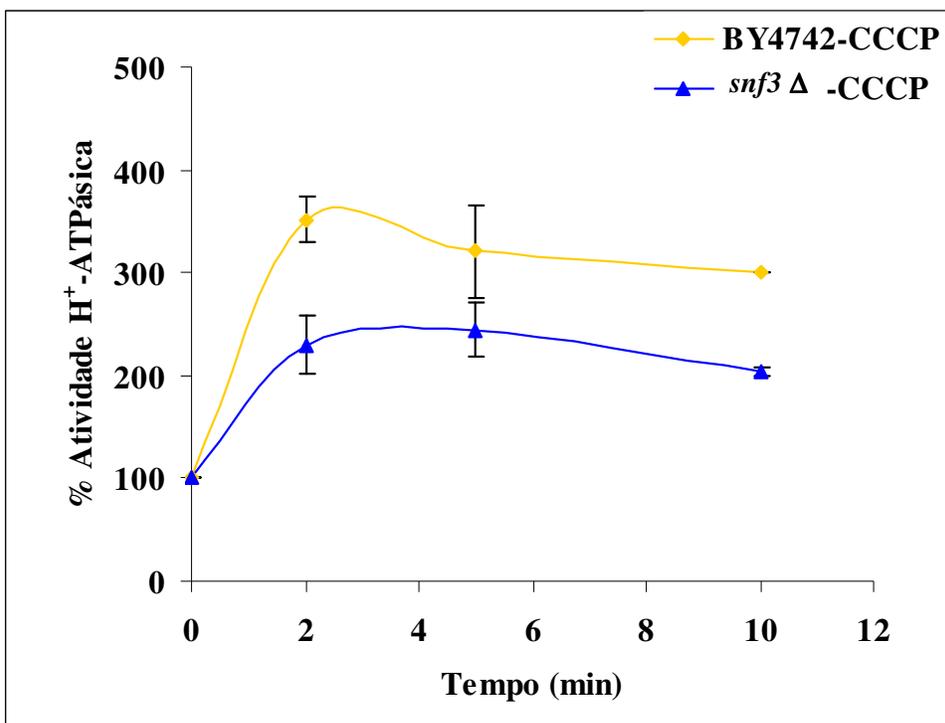


Figura 18: Curva de tempo para atividade enzimática da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática, antes e após a adição do agente despolarizante-CCCP (0,5mM)/Etanol 9% em cepas *snf3*Δ de *S. cerevisiae*, tendo como background genético a cepa BY4742. Neste experimento obteve-se em média 0,035 μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup> / CCCP (BY4742), 0,061 μmoles PO<sub>4</sub><sup>-</sup> / CCCP (*snf3*Δ).

#### **4.12 – A ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática induzida por agentes despolarizantes ocorre através de uma via única**

Delineando todas os componentes estudados no mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por CCCP e comparando com os componentes já estabelecidos no processo de ativação por glicose, sugerimos uma via única, mais simplificada, quando o indutor utilizado é um agente despolarizante. Esta hipótese, vem de encontro, com as observações feitas sobre a capacidade de ativação ATPásica por CCCP. Em todos os experimentos realizados neste trabalho, verificamos uma atividade enzimática sempre inferior àquela observada quando glicose é utilizada como indutor do mecanismo. Para uma comparação dois gráficos do mesmo background genético, sendo um induzido por glicose e o outro induzido por CCCP é mostrado na figura 19.

Além disso, para verificar esta hipótese, realizamos experimentos com os dois indutores (glicose/CCCP – CCCP/glicose), sendo que a figura 20 mostra no painel A, a atividade ATPásica induzida por CCCP ( tempos 2 e 5 minutos) e após 5 minutos adicionamos glicose e medimos a atividade nos tempos 7, 10 e 15 minutos. No painel B temos o mesmo experimento feito nas mesmas condições só que adicionando primeiramente a glicose e após 5 minutos o CCCP. Os resultados mostram um aumento significativo da atividade ATPásica quando glicose foi colocada depois do agente despolarizante (Figura 20). Esse resultado reforça a proposta de uma via única na ativação ATPásica por CCCP e uma via dupla para a ativação por glicose como sugerido por Trópia et cols. 2006.

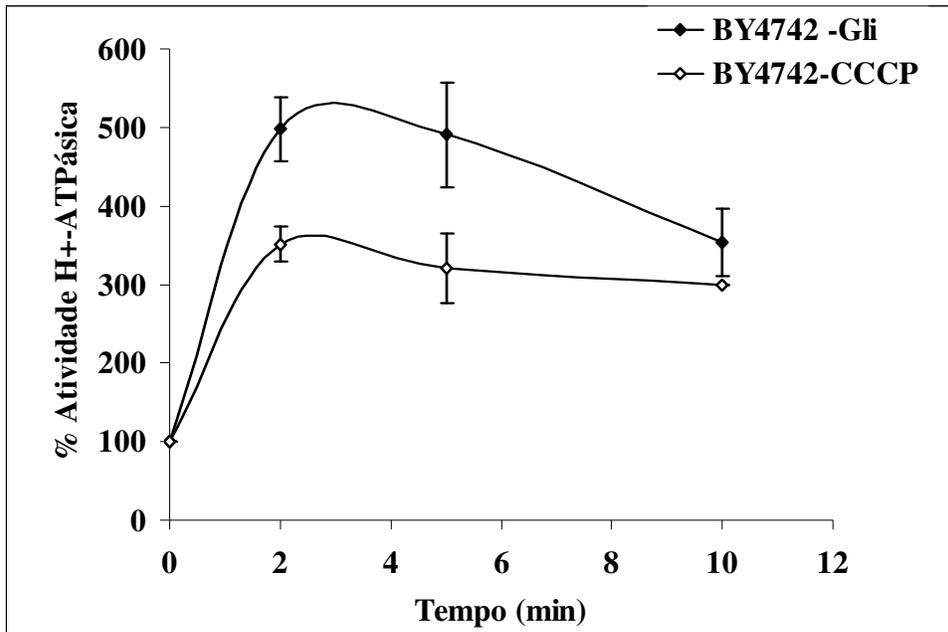


Figura 19: Comparação de diferentes agentes indutores ( CCCP-0,5mM e Glicose-100mM) da atividade H<sup>+</sup>-ATPásica no mesmo background genético (BY4742).

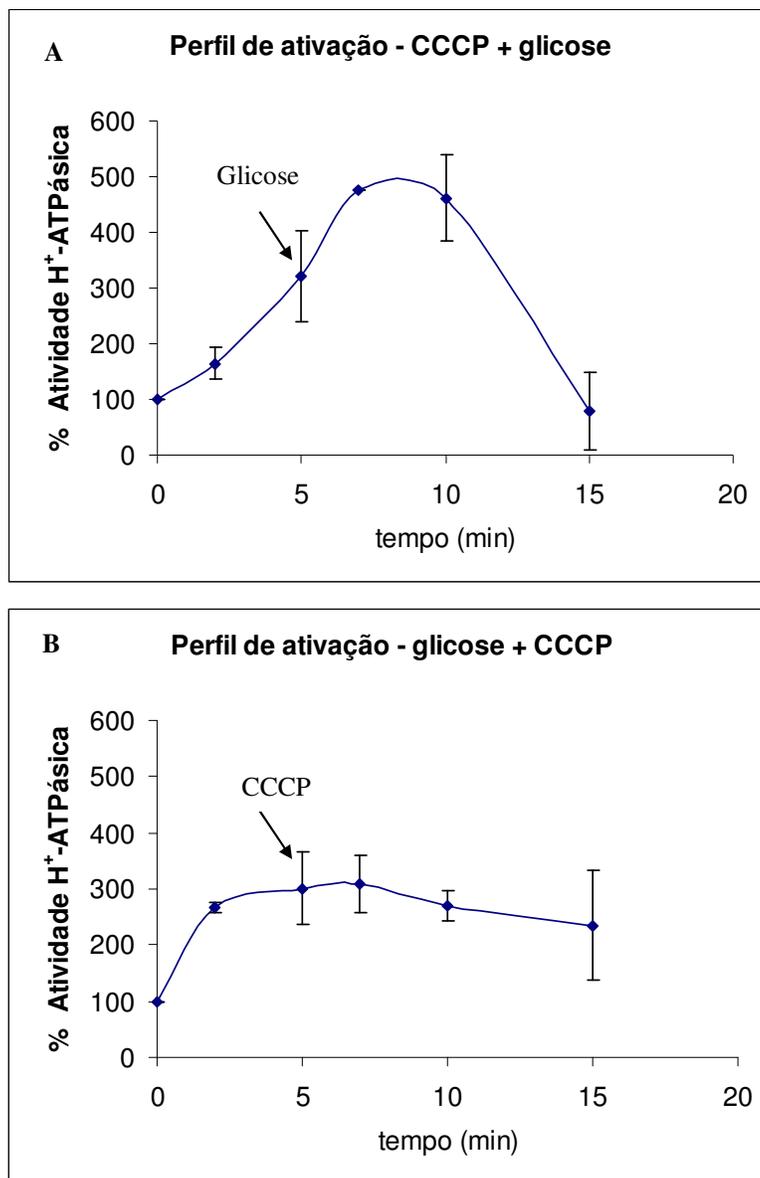


Figura 20: Perfil de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase na cepa selvagem BY4742

**Panel A:** Atividade enzimática inicialmente induzida por CCCP e em seguida sob ação de

**Panel B:** Atividade enzimática inicialmente induzida por glicose e em seguida sob ação de CCCP (tempo 5 min).

## **Discussão**

---

Os resultados apresentados neste trabalho representam uma contribuição para o entendimento do mecanismo de ativação pós-transcricional da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática em células de *S. cerevisiae* expostas à presença de agentes despolarizantes.

Trabalhando com cepas selvagens (W303), demonstramos uma clara ativação da H<sup>+</sup>-ATPase desencadeada pelo agente despolarizante (CCCP), bem como a neutralidade do solvente utilizado (etanol) nesta ativação, pelo menos no período de tempo utilizado nos experimentos. Sá Correia & Monteiro (1997) indicaram que o domínio regulatório C-terminal da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática de *S. cerevisiae* estaria envolvido na ativação enzimática induzida por etanol. No entanto, esta ativação foi observada em células cultivadas em presença de etanol e sob condições aonde a concentração de etanol chegava a 6% (v/v). Em nossos experimentos, o etanol foi utilizado como solvente do agente despolarizante por um período de tempo consideravelmente pequeno (10 minutos); assim mesmo sendo o etanol uma substância capaz de aumentar a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase a nível transcricional, não foi observado um aumento da atividade ATPásica, provavelmente devido ao curto período de exposição das células ao etanol.

Como a H<sup>+</sup>-ATPase é uma das mais importantes e abundantes proteínas de membrana citoplasmática da levedura *S. cerevisiae*, o seu funcionamento e o seu mecanismo de ativação têm sido estudados por diversos grupos. O nosso grupo focaliza seus estudos sobre o mecanismo regulatório desta enzima. Neste contexto trabalhos foram realizados (Brandão et cols. 1992, Becher dos Passos et cols. 1992, Brandão et cols. 1994, Coccetti et cols. 1998, Souza et cols. 2001) tentando identificar não somente a via de sinalização envolvida, como também identificar uma proteína quinase direta ou indiretamente envolvida na regulação desta atividade.

A proteína quinase C (Pkc1 p) tem como principal alvo de ativação a cascata MAP quinase que consiste de Bck1 p (MAPKKK), Mkk1 p e Mkk2 p, duas redundantes MAPKKs e a MAPK, Mpk1 p (Hohmann & Mager, 1997). No entanto, sabe-se que alguns eventos de sinalização requerem Pkc1 p, incluindo repressão da síntese de ribossomos (Nanduri et cols. 1999), realocação transiente de muitas proteínas do citoplasma durante condições de choque hipertônico (Nanduri & Tartakoff, 2001) ou máxima atividade da N-glicosilação (Park & Lennarz, 2000). Todos estes eventos não requerem a via MAP quinase (Perez & Calonge, 2002). Além disso, o fenótipo mutante do gene *PKC1* é mais severo que os mutantes da via MAP quinase. Assim, este evento é consistente com a idéia da existência de uma bifurcação depois de Pkc1 p, sugerindo que esta proteína quinase possui várias funções importantes em leveduras (Levin et cols., 1994).

Em estudos prévios, Brandão et cols., (1994) demonstraram o envolvimento da Pkc1 p na ativação da ATPase induzida por glicose. Além disso, Souza et cols., (2001) confirmaram o envolvimento da Pkc1 p na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por glicose e ainda demonstraram que a via MAP quinase não está envolvida nessa ativação, sugerindo, desta forma, uma bifurcação depois da Pkc1 p, e que esta seria, possivelmente, a quinase envolvida na regulação da atividade ATPásica. Como efeito comparativo também estudamos a relação da Pkc1 p na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase desencadeada por agentes despolarizantes; desta forma, os nossos dados permitem inferir uma provável participação da Pkc1 p na ativação ATPásica também desencadeada por agentes despolarizantes, pois cepas *pkc1 Δ* não apresentaram uma ativação ATPásica induzida por este tipo de substância.

De acordo com esses resultados, e na tentativa de identificar outros componentes envolvidos no mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes, foram realizados ensaios com cepas apresentando mutação no gene que codifica para a proteína de membrana, Gpa2 p. Trabalho anterior do nosso grupo demonstra que esta proteína estaria envolvida na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase (Souza et cols., 2001), além do seu envolvimento no processo de ativação da síntese de AMPc (Kraakman et cols., 1999). Neste contexto, Brandão et cols. (1992) demonstraram uma possível relação do aumento de AMPc nas células de *Fusarium oxysporum* var. *lini* com o aumento da atividade ATPásica, sendo ambos processos induzidos por agentes despolarizantes. Assim, a proteína Gpa2 sendo comum a esses dois processos se tornou um importante alvo de estudo. No entanto foi observado que a proteína G, Gpa2 p, não participa do processo de ativação da ATPase, já que a ausência desta proteína não afetou a atividade enzimática. Esse resultado foi diferente daquele já observado com glicose como indutor do mecanismo de ativação. Assim, podemos admitir que o agente despolarizante age de maneira diferente da glicose para desencadear a ativação ATPásica e também sugerir que a via de ativação síntese do AMPc não está envolvida na via de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase de *S. cerevisiae* induzida por CCCP.

Por sua vez, a fosfolipase C é uma proteína de membrana que faz parte de um complexo protéico composto pela proteína Gpa2 e pelo receptor de membrana Gpr1 p (Ansari et cols., 1999; Kraakman et cols., 1999). Esta proteína é uma fosfatidilinositol PI-específica com alta homologia com o isoforma  $\delta$  PLC de mamíferos (Flick & Thorner, 1993; Payne & Fitzgerald-Hayes, 1993). Já foi demonstrado que a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por glicose ocorre por um mecanismo

semelhante a via do fosfatidilinositol, tendo nesta via a participação da fosfolipase C (Brandão et cols., 1994; Coccetti et cols., 1998).

Utilizando-se cepas mutantes no gene que codifica para Plc1 p verificamos que esta enzima é importante no mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes, sendo que sua atuação na regulação da atividade ATPásica é diferente daquela promovida pela Gpa2 p, ou seja, a atividade ATPásica é fortemente reduzida na ausência de atividade da Plc1 p.

Por outro lado, Tisi et cols., 2002 relataram que a adição de glicose em células de *S. cerevisiae* promove um aumento da concentração de cálcio livre intracelular. Neste trabalho, os pesquisadores observaram que cepas mutantes nos genes que codificam para as proteínas Plc1 p, Gpa2 p e Gpr1 p apresentam uma clara alteração na sinalização de Cálcio citosólico, sendo esta profundamente reduzida em células de *S. cerevisiae*, submetidas à presença de glicose. De acordo com este trabalho, e com resultados obtidos previamente em nosso laboratório sobre o mecanismo de ativação ATPásica por glicose, uma possível conexão entre a via de sinalização de cálcio e a via de ativação ATPásica por glicose começou a ser considerada. Essa hipótese surgiu quando os componentes recém descobertos de ambas as vias se mostraram idênticos. Assim, de acordo com estes indícios e tendo referências que demonstram um aumento do influxo de Ca<sup>++</sup> em células de *S. cerevisiae* expostas ao ácido butírico ou CCCP (agentes despolarizantes) (Eilam et cols., 1990), também averigüamos a possível conexão entre a via de sinalização de cálcio e a ativação ATPásica por agentes despolarizantes. Nossos resultados indicam uma provável participação do cálcio no mecanismo de ativação ATPásica por CCCP, uma vez que o agente despolarizante promove um aumento significativo de cálcio livre citosólico (cepa selvagem) e que na ausência de Plc1 p a sinalização de Ca<sup>++</sup> praticamente desapareceu. Desta maneira, podemos propor que a Plc1 p é essencial no mecanismo de ativação ATPásica por estar agindo direta e/ou indiretamente na homeostase de cálcio livre citosólico em células de *S. cerevisiae*. A modificação da homeostase de cálcio estaria promovendo o aumento da atividade ATPásica e é devido a este fato que não observamos um aumento de atividade, bem como um aumento de sinalização de cálcio em células *plc1Δ*.

Outra consideração importante que tem sido ressaltada é a provável participação do cálcio extracelular no aumento da concentração de cálcio livre citosólico em células submetidas à glicose, uma vez que células pré-incubadas com agentes quelantes de cálcio, tais como BAPTA ou EGTA, não apresentam elevações nos níveis de cálcio citosólico em presença de glicose (Tisi et cols.,

2001). Assim, considerando que tanto a proteína Gpa2 quanto a Plc1 estão envolvidas no controle do influxo de cálcio do meio extracelular após a adição de glicose, sendo ainda envolvidas na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por glicose, e ainda que pelo menos Plc1 p mostrou-se necessária para a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase e a sinalização de cálcio por agentes despolarizantes (este trabalho), decidimos verificar a possível relação do influxo de cálcio com a ativação ATPásica, (Tisi et cols., 2002; Souza et cols., 2001; Trópia et cols., 2006).

Em nossos experimentos observamos uma provável relação do influxo de cálcio extracelular e a atividade ATPásica, pois cepas selvagens (WT-3700) pré-incubadas com um agente quelante de cálcio, EGTA, não apresentaram ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por CCCP.

No entanto, o agente quelante utilizado sendo um ácido poderia estar desestabilizando a estrutura celular e desta forma interferindo na atividade de proteínas/enzimas. A H<sup>+</sup>-ATPase é essencial para a fisiologia celular, mas pode ser inibida por diversos fatores estressantes como: calor, etanol e ácidos fracos/fortes (Sá-Correia & Monteiro et cols., 1997). Para averiguar esta possível interferência do agente quelante na atividade ATPásica, testes experimentais na presença de CaCl<sub>2</sub>+EGTA (ambos 12mM) foram feitos. Em nossos resultados podemos verificar o efeito exclusivo de EGTA como quelante de cálcio, uma vez que cepas selvagens (WT-3700) pré-incubadas com esta solução CaCl<sub>2</sub>+EGTA apresentaram uma ativação ATPásica por CCCP praticamente igual às cepas selvagens que não foram submetidas ao agente quelante ou a solução CaCl<sub>2</sub>+EGTA. Desta maneira, podemos inferir que o cálcio livre presente no meio externo estaria possivelmente, agindo na levedura *S. cerevisiae* ativando, entre outras vias, aquela responsável pelo controle da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática.

Essa proposição é reforçada pelo trabalho desenvolvido por Miseta et cols., 2002, que demonstraram a necessidade de um canal de cálcio de alta afinidade, Mid 1 p, presente na membrana citoplasmática, para um aumento significativo dos níveis de cálcio citosólico em células de *S. cerevisiae* submetidas a hexoses (glicose/galactose). Outra consideração importante é a necessidade da fosforilação do açúcar internalizado (glicose/galactose) para a ocorrência do influxo de cálcio extracelular (Miseta et cols., 2002). Esta última observação vem de encontro com os resultados demonstrados por Souza et cols., 2001, que verificaram a necessidade da internalização e fosforilação da glicose para a ativação ATPásica. Além disso, no que se refere a presença de agentes despolarizantes há evidências de que este canal de cálcio (Mid1/Cch1) é voltagem-dependente (Iida et cols., 1990b; Locke et cols., 2000).

Assim, para confirmar a participação do cálcio extracelular no mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por agentes despolarizantes, experimentos com o mutante no gene que codifica para o canal de cálcio, Mid1 p, foram realizados. Nossos resultados sugerem uma necessidade apenas parcial do cálcio extracelular no mecanismo de ativação enzimática. Ainda neste contexto Muller et cols. (2003), demonstraram um importante componente ou regulador do sistema de influxo de cálcio de baixa afinidade (LACS), denominado Fig1 p. Assim, os resultados obtidos com a cepa mutante no gene que codifica para Fig1 p sugerem que o Ca<sup>++</sup> extracelular que possibilita uma ativação ATPásica parcial, provém ainda que parcialmente, via canal Mid1 p, uma vez que, o mutante *fig1Δ* mostrou não ser importante para o mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por agentes despolarizantes.

De fato, outros componentes parecem ser importantes para a homeostase de Ca<sup>++</sup> em células de leveduras. Tisi et cols. (2003) sugeriram um possível envolvimento de IP<sub>3</sub> na geração de um sinal de Ca<sup>++</sup> em células de *S. cerevisiae* expostas a glicose. Estes autores demonstraram que o nível de IP<sub>3</sub> é praticamente indetectável em cepas selvagens submetidas a glicose, possivelmente devido ao aumento da atividade da proteína quinase, Arg82 p, que fosforila rapidamente IP<sub>3</sub> em IP<sub>4</sub> e IP<sub>5</sub>. Assim, verificaram que a deleção do gene *ARG82*, foi capaz de promover uma elevação dos níveis de IP<sub>3</sub> e, ainda, um aumento significativo da sinalização de Ca<sup>++</sup> intracelular mediada por Plc1p. Esses dados, juntamente com os resultados obtidos com o mutante *arg82Δ* e *arg82Δplc1Δ* nos possibilita inferir sobre um provável papel de IP<sub>3</sub> na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase por CCCP, já que um aumento significativo da atividade enzimática foi observada no mutante. *arg82Δ* e também a redução da atividade enzimática no duplo mutante *arg82Δplc1Δ* nos aponta a real necessidade de Plc1 p como a enzima capaz de produzir IP<sub>3</sub> e por isso necessária a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase. A proposição que pode ser aventada com os resultados obtidos é a seguinte: o IP<sub>3</sub> gerado pela hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato em células de *S. cerevisiae* submetidas a CCCP, mesmo em concentração mais baixa, estaria promovendo um aumento da sinalização de Ca<sup>++</sup>, via canais externos e/ou compartimentos intracelulares culminando com a ativação ATPásica.

Contudo, a possibilidade do IP<sub>3</sub> estar atuando em compartimentos intracelulares e promovendo a liberação de Ca<sup>++</sup> para o citosol ainda é especulativa. Nenhum receptor homólogo àquele encontrado em células de mamíferos para IP<sub>3</sub> foi evidenciado no genoma de leveduras (Wera et cols., 2001). A importância do Ca<sup>++</sup> presente nos compartimentos intracelulares em células de leveduras já foi evidenciado por diversos autores.

A concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre citosólico em leveduras é mantida em níveis submicromolares pela atividade de bombas e canais de  $\text{Ca}^{++}$ , que são responsáveis pela remoção do excesso de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico para compartimentos intracelulares, como vacúolo, Complexo de Golgi, Retículo Endoplasmático (Cunningham & Fink, 1994).

Tropia et cols. (2006), demonstraram a importância da bomba de  $\text{Ca}^{++}$ , Pmc1 p, presente na membrana do vacúolo, para o mecanismo de ativação ATPásica por glicose. Além disto, verificaram que o canal de  $\text{Ca}^{++}$ , Vcx1 p, não apresenta influência neste mecanismo. Assim, experimentos com o mutante *pmc1Δ* nos permitem sugerir a importância do  $\text{Ca}^{++}$  endógeno para o mecanismo de ativação ATPásica também por agentes despolarizantes, uma vez que, uma maior atividade enzimática pode ser verificada neste mutante. No entanto, o processo pelo qual o  $\text{Ca}^{++}$  intracelular estaria sendo liberado para o citosol após a exposição das células de *S. cerevisiae* a agentes despolarizantes requer maiores estudos.

Por outro lado Fu et cols.,(2000), demonstraram a dependência do recurso de carbono em mutantes *pgm2Δ*, tanto na homeostase como na sinalização de  $\text{Ca}^{++}$  em células de *S. cerevisiae*. De acordo com estes autores a ausência da maior isoforma da fosfoglucomutase, enzima capaz de interconverter Glc-1-P e Glc-6-P, promove um acúmulo exarcebado de Glc-1-P em células crescidas em galactose como único recurso de carbono. Este acúmulo de Glc-1-P estaria estimulando a entrada e acumulação de  $\text{Ca}^{++}$  em cepas *pgm2Δ* crescidas sob estas condições.

De fato, Aiello et cols. (2002) mostraram que a homeostase de  $\text{Ca}^{++}$  celular em leveduras é dependente dos níveis relativos dos metabólitos de glicose, Glc-1-P e Glc-6-P. Além disto, Aiello et cols. (2004), evidenciaram que a entrada e acumulação excessiva de  $\text{Ca}^{++}$  em cepas *pgm2Δ* crescidas em galactose é devido a um aumento da atividade da bomba de  $\text{Ca}^{++}$  vacuolar, Pmc1 p. Assim, e de acordo com os resultados obtidos anteriormente com o mutante *pmc1Δ*, experimentos com a cepa mutante *pgm2Δ* crescidas em galactose foram realizados e evidências destes resultados indicam que, diferentemente do que ocorre com glicose, a mudança da razão dos metabólitos Glc-1P/Glc-6P parece não interferir no mecanismo de ativação ATPásica induzida por CCCP.

Diante deste fato, várias hipóteses podem ser consideradas:

- A incubação das células em galactose como recurso de carbono por um período de 24 horas permite a modificação transcricional de vários genes que reestabelecem a homeostase de cálcio;
- A exposição das células por um curto período de tempo (10 minutos) a um agente despolarizante, substância não metabolizada, não modificaria a homeostase reestabelecida durante a incubação em

galactose e assim o agente agiria diretamente na fosfolipase C desencadeando a via pela qual a H<sup>+</sup>-ATPase é ativada.

Ainda neste contexto, Dlugai et cols. (2001), demonstraram um provável envolvimento do sensor de glicose Snf3 p, na detecção dos níveis de Glc-6P em leveduras. Em paralelo a estes achados, Tropia et cols. (2006), demonstraram a participação do sensor Snf3 p na sinalização de Ca<sup>++</sup> em células de leveduras expostas a glicose. Além disso, verificaram a importância de Snf3 p, principalmente do seu domínio C-terminal, para a ocorrência da atividade ATPásica induzida por glicose. Assim, esta proteína passou a ser considerada um possível elo de ligação entre os níveis de Glc-1P e Glc-6P e a atividade da Ca<sup>++</sup>-ATPase, Pmc1 p em leveduras. Com isso, experimentos com o mutante *snf3Δ* também foram realizados e os resultados obtidos denotam que a ausência do hipotético detector dos níveis de Glc-1P/Glc-6P que é também o hipotético inibidor da bomba de Ca<sup>++</sup>, Pmc1p, estaria alterando a homeostase de Ca<sup>++</sup>, e por isso afetando a atividade enzimática induzida por CCCP.

Diante de todos os resultados obtidos neste trabalho, acreditamos que:

O CCCP desencadearia uma ativação da enzima Plc1, que uma vez, ativada hidrolisa PIP2 em dois componentes secundários: DAG e IP<sub>3</sub>. O diacilglicerol ativaria a proteína quinase C e o inositol trifosfato estaria relacionado com a captação de cálcio extracelular e liberação de cálcio presente no vacúolo para o citosol da célula. O aumento dos níveis intracelulares de cálcio citosólico e o aumento da atividade da Pkc1 p culminaria com a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase (Figura 21).

## **Conclusões**

---

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir:

- ✓ O processo no qual a H<sup>+</sup>-ATPase é ativada por agentes despolarizantes é passível de comparações com aquele desencadeado por glicose, ocorrendo através de uma via de sinalização única e específica;
- ✓ O agente despolarizante provavelmente age diretamente na enzima Plc1 desencadeando o “turnover” fosfatidilinositol e subseqüentemente induzindo o aumento da atividade ATPásica;
- ✓ O influxo do cálcio extracelular parece ter um papel apenas parcial no mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase desencadeada por agentes despolarizantes em células de *S. cerevisiae*;
- ✓ O IP<sub>3</sub>, possivelmente, promove o aumento do cálcio citosólico, agindo no canal de Ca<sup>++</sup> externo (Mid1) e/ou liberando o cálcio presente nos compartimentos intracelulares, acarretando o aumento da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase;
- ✓ O Ca<sup>++</sup> presente nos compartimentos intracelulares, principalmente no vacúolo, parece ser importante para a ocorrência do aumento da atividade ATPásica por agentes despolarizantes;
- ✓ Os metabólitos derivados de hexoses (glicose/galactose) não interferem na indução da ativação ATPásica por CCCP, contudo a ausência do sensor de alta afinidade de glicose (Snf3p) parece alterar a homeostase de Ca<sup>++</sup> em células de leveduras e, conseqüentemente, afetar a ativação ATPásica induzida por agentes despolarizantes;
- ✓ A proteína quinase C está envolvida na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por agentes despolarizantes;
- ✓ Um provável mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase induzida por agentes despolarizantes, cuja representação esquemática está exposta na figura 21. Neste mecanismo proposto: O CCCP desencadearia uma ativação da enzima Plc1, que uma vez ativada hidrolisa PIP2 em dois componentes secundários: DAG e IP<sub>3</sub>. O diacilglicerol ativaria a proteína quinase C e o inositol trifosfato estaria relacionado com a captação de cálcio extracelular e liberação de cálcio

presente no vacúolo para o citosol da célula. O aumento dos níveis intracelulares de cálcio citosólico e o aumento da atividade da Pkc1 p culminaria com a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase.

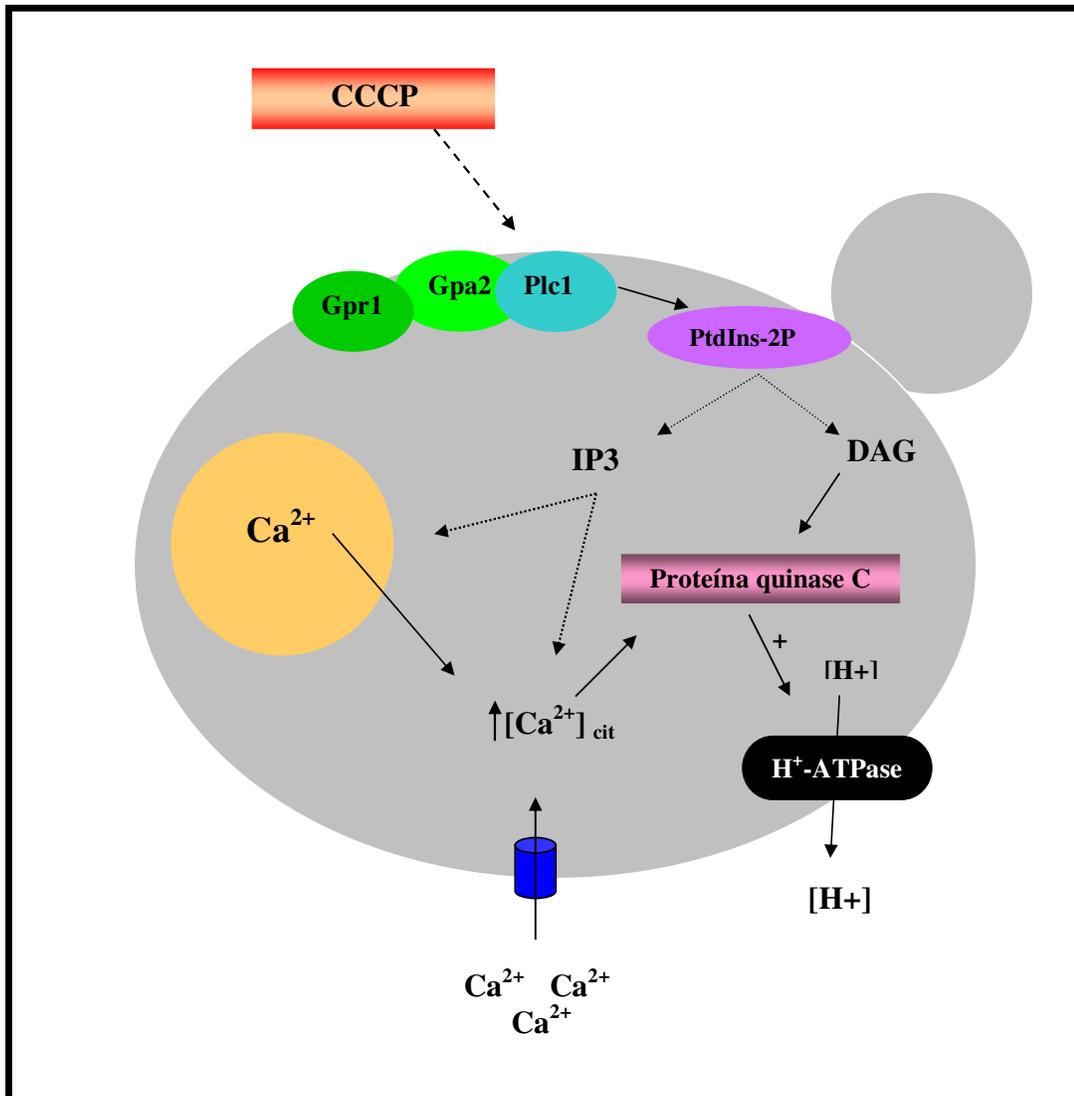


Figura 21: Mecanismo hipotético de ativação da  $H^+$ -ATPase de membrana citoplasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae* - via PKC1 - induzido por agentes despolarizantes.

**Mecanismo:** CCCP desencadearia uma ativação da enzima Plc1, que uma vez, ativada hidrolisaria PIP2 em dois componentes secundários: DAG e IP<sub>3</sub>. O diacilglicerol ativaria a proteína quinase C e o inositol trifosfato estaria relacionado com a captação de cálcio extracelular e liberação de cálcio presente no vacúolo para o citosol da célula. O aumento dos níveis intracelulares de cálcio citosólico e o aumento da atividade da Pkc1 p culminaria com a ativação da  $H^+$ -ATPase

## **Perspectivas**

---

Muitas dúvidas ainda devem ser sanadas para o perfeito entendimento do mecanismo de ativação da enzima  $H^+$ -ATPase de membrana citoplasmática da levedura *S. cerevisiae* por agentes despolarizantes.

Neste sentido, julgamos necessários os seguintes experimentos complementares:

- ✓ Experimentos com a cepa *gpa2*  $\Delta$  em presença de EGTA, para comprovar a possível participação do cálcio na atividade ATPásica, já que esta proteína também é importante no influxo de cálcio e seus resultados foram contraditórios àqueles observados para a proteína fosfolipase C;
- ✓ Determinar como a adição de agentes despolarizantes afetam os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ) da ATPase em relação à hidrólise de ATP para podermos elaborar uma hipótese sobre a identidade do sítio de fosforilação envolvido neste tipo de ativação;
- ✓ Verificar se a Pkc1 p está envolvida na fosforilação da Thr-912 encontrada na região carboxi-terminal, que aparentemente é o evento mais importante para um aumento da  $V_{m\acute{a}x}$  da enzima induzida por glicose. Desta maneira, estudos comparativos devem ser feitos com agentes despolarizantes;
- ✓ Purificações da enzima  $H^+$ -ATPase em gel, em diferentes tempos, para posterior identificação dos sítios fosforilados (Serina 899/Treonina912), através de espectrofotometria de massa, relacionando estes sítios com a atividade ATPásica desencadeada por agentes despolarizantes;
- ✓ Com a utilização de outras cepas com mutações em genes que codificam para proteínas integrantes da via de ativação da  $H^+$ -ATPase induzida por glicose, pretendemos continuar estudando o mecanismo pelo qual a enzima é ativada por agentes despolarizantes.

## **Referências Bibliográficas**

---

ADDISON, R. (1986). Primary structure of the *Neurospora crassa* plasma membrane ATPase deduced from gene sequence. *J. Biol. Chem.* **261**: 14896-14901.

AIELLO, D.P.; FU, L.; MISETA, A. & BEDWELL, D.M. (2002). Intracellular glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate levels modulate Ca<sup>2+</sup> homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**: 45751-45758.

AIELLO, D. P., FU, L., MISETA, A, SIPOS, K. & BEDWELL, D. M. (2004). The Ca<sup>2+</sup> homeostasis in a *pgm2Δ* strain of *S. cerevisiae* are caused by excessive vacuolar Ca<sup>2+</sup> uptake mediated by the Ca<sup>2+</sup>-ATPase Pmc1 p. *J. Biol. Chem.* **In press**.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J. D. (1999). Cell Signaling. In *Molecular Biology of the Cell*. **15**: 721-785.

AMBESI, A.; MIRANDA, M.; PETROV, V. V. & SLAYMAN C. W. (1999). Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Experim. Biol.* **203**: 155-160.

ANSARI, K., MARTIN, S., FARKAASOVSKY, M., ELSBRECHT, I. M. & KUNTZEL, H. (1999). Phospholipase C binds to the receptor-like Gpr1 p protein and controls pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**: 30052-30058.

AXELSEN, K. B. & PALMGREEN, M. G. (1998). Evolution of P-type ATPases. *Bioch. Biophys. Acta* **1365**: 37-45.

BECHER DOS PASSOS, J.; VANHALEWYN, M.; BRANDÃO, R. L.; CASTRO, I. M.; NICOLI, J. R. & THEVELEIN, J. M. (1992). Glucose-induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affected in cAMP metabolism, cAMP-dependent protein phosphorylation and the initiation of glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1136**: 57-67.

BELDE, P.J.M., VOSSEN, J.H., BORST-PAUWELS, G.W.F.H. & THEUVENET, M.C. (1993). Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca<sup>2+</sup> from vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **323**: 113-118.

BOWMAN, B.J., BLASCO, F. & SLAYMAN, C.W. (1981). Purification and characterization of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **256**, 12343-12349.

BRANDÃO, R. L.; CASTRO, I. M.; PASSOS, J. B.; NICOLI, J. R. & THEVELEIN, J. (1992). Glucose- induced activation of the plasma membrane ATPase in *Fusarium oxysporum*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1579-1586.

BRANDÃO, R. L.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M.; ALIJO, R.; RAMOS, J. & THEVELEIN, J. M. (1994). Possible involvement of a phosphatidylinositol-type signalling pathway in glucose- induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and cellular proton extrusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1223**: 117-124.

CAMONIS, J.H. & JACQUET, M. (1988). A new *RAS* mutation that suppresses the *CDC 25* gene requirement for growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **8**: 2980-2983.

CAPIEAUX, E.; VIGNAIS, M.-L., SENTENAC, A. & GOFFEAU, A. (1989). The yeast H<sup>+</sup>-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J. Biol. Chem.* **264**: 7437-7446.

CASPANI, G.; TORTORA, P.; HANOZET, G.M.& GUERRITORE, A. (1985). Glucose-stimulated cAMP increase may be mediated by intracellular acidification in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **186**: 75-79.

CHANG, A. & SLAYMAN, C. W. (1991). Maturation of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell. Biol.* **115**: 289-295.

COCETTI, P.; BRANDÃO, R. L.; TISI, R.; MARTEGANI, E.; TEIXEIRA, L. S.; CASTRO, I. M. & THEVELEIN, J. M. (1998). The *PLC 1* encoded phospholipase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is essential for glucose-induced phosphatidylinositol turnover and activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1405**: 147-154.

COHEN, R. YOKOI, T.; HOLLAND, J.P.; PEPPER, A.E. & HOLLAND, M. (1987). Transcription of the constitutively expressed yeast enolase gene *ENO1* is mediated by positive and negative cis-acting regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2753-2761.

CUNNINGHAM, K. & FINK, G.R. (1994). Ca<sup>2+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Exp. Biol.* **196**: 157-166.

DE LA FUENTE, N.; MALDONADO, A. M. & PORTILLO, F. (1997). Glucose activation of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase requires the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *FEBS Lett.* **411**: 308-312.

DELLEY, P. A. & HALL, M. N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of *RHO1*. *J. Cell. Biol.* **147**: 163-174.

DENIS, V. & CYERT, M. S. (2002). Internal Ca<sup>2+</sup> release in yeast is triggered by a TRP channel homologue. *J. Cell. Biol.* **156**, 29-34.

DE VIT, M.J., WADDLE, J.A. & JOHNSTON, M. (1997). Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell.* **8**: 1603-1618.

DIFFLEY, J. F. X. (1992). Global regulators of chromosome function in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **62**: 25-33.

DLUGAI, S., HIPPLER, S., WIECZORKE, R. & BOLES, E. (2001). Glucose-dependent and independent signaling functions of the yeast glucose sensor Snf3. *FEBS Letters* **505**: 389-392.

DUFOUR, J-P. & GOFFEAU, A. (1977). Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma membrane ATPase of the *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **253**: 7026-7032.

DUFOUR, J-P. & GOFFEAU, A. (1980). Molecular and kinetic properties of the purified plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **105**: 145-154.

EILAM, Y. & OTHMAN, M. (1990). Activation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx by metabolic substrates in *Saccharomyces cerevisiae*: role of membrane potential and cellular ATP levels. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 861-867.

EILAM, Y.; OTHMAN, M. & HALACHMI, D. (1990). Transient increase in  $\text{Ca}^{2+}$  influx in *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose: effects of intracellular acidification and cAMP levels. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2537-2543.

ERASO, P. & GANCEDO, C. (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* **224**: 187-192.

ERASO, P. & PORTILLO, F. (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase by glucose. *J. Biol. Chem.* **269**: 10393-10399.

ESTRADA, E.; AGOSTINIS, P.; VANDENHEEDE, J. R.; GORIS, J.; MERLEVEDE, W.; FRANÇOIS, J.; GOFFEAU, A. & GHISLAIN, M. (1996). Phosphorylation of yeast plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase by casein kinase I. *J. Biochem.* **271**: 32064-32072.

FLICK, J. S. & THORNER, J. (1993). Genetic and biochemical characterization of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 5861-5876.

FRANCESCOTTI, G.; BARONI, D. & MARTEGANI, E. (1990). The glucose-induced polyphosphoinositides turnover in *Saccharomyces cerevisiae* is not dependent on the CDC25-RAS mediated signal transduction pathway. *FEBS Lett.* **274**: 19-22.

FU, L., MISETA, A., HUNTON, D., MARCHASE, R. B. & BEDWELL, D. M. (2000). Loss of the major isoform of phosphoglucomutase results in altered calcium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 5431-5440.

GARCIA-ARRANZ, M.; MALDONADO, A.M.; MAZÓN, M.J. & PORTILLO, F. (1994). Transcriptional control of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose. *J. Chem. Biol.* **269**: 18076-18082.

GANCEDO, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334-361.

GOFFEAU, A., BARREL, B. G., BUSSEY, H., DAVIS, R., DUJON, B., FELDMAN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J. D., JACQ, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E. J., MEWES, H., MURAKAMI, Y., PHILIPPSEN, P., TETTELIN, H. & OLIVIER, S. G. (1997). Life with 6000 genes. *Science.* **275**: 1051-1052.

GOOSSENS, A.; DE LA FUENTE, N.; FORMENT, J.; SERRANO, R. & PORTILLO, F. (2000). Regulation of the yeast H<sup>+</sup>-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell Biol.* **20**: 7654-7661.

HAGER, K. M.; MANDALA, S. M.; DAVENPORT, J. W.; SPEICHER, D. E.; BEN, E. J. & SLAYMAN, C. W. (1986). Amino acid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*: deduction from genomic and cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7693-7697.

HERRUER, M. H.; MAGER, W.H.; WOUDT, L.P.; NIEUWINT, R.T.M.; WASSENAAR, G.M.; GROENEVELD, P. & PLANTA, R.J. (1987). Transcriptional control of yeast ribosomal protein synthesis during carbon source upshift. *Nucleic Acids Res.* **15**: 10133-10144.

HOHMANN & MAGER (1997). Yeast stress response. *Mol. Biol. Intelligent Unit*.

HOLZER, H. (1976). Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **1**: 178-181.

HUET, J.; COTTRELLE, P., COOL, M.; VIGNAIS, M.-L.; THIELE, D.; MARCK, C.; BUHLER, J.M.; SENTENAC, A. & FROMAGEOT, P. (1985). A general upstream binding factor for genes of the yeast translational apparatus. *EMBO J.* **4**: 3539-3547.

IIDA, H., YAGAWA, Y. & ANRAKU, Y. (1990b). Essential role for induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx followed by  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise in maintaining viability of yeasts cells late in the mating pheromone response pathway. A study of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in single *Saccharomyces cerevisiae* cells with imaging of fura-2. *J. Biol. Chem.* **265**: 13391-13399.

KAIBUCH, K., MIYAJIMA, A., ARAI, K.-I. & MATSUMOTO, K. (1986). Possible involvement of Ras-encoded proteins in glucose-induced inositolphospholipid turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Biol.* **83**: 8172-8176.

KELLERMAYER, R.; SZIGETI, R.; KELLERMAYER, M. & MISETA, A. (2004). The intracellular dissipation of cytosolic calcium following glucose re-addition to carbohydrate depleted *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **571**: 55-60.

KEMP, B. E. & PEARSON, R. B. (1990). Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 342-346.

KOLAROV, J.; KULPA, J.; BAILOT, M. & GOFFEAU, A. (1988). Characterization of a protein serine kinase from yeast plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **263**: 10613-10690.

KOTYK, A., LAPATHITIS, G. & HORÁK, J. (2003). Critical findings on the activation cascade of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**: 175-180.

KRAAKMAN, L., LEMAIRE, K., MA, P., TEUNISSEN, A.W.R.H., DONATON, M.C. V., VAN DIJCK, P.; WINDERICKX, J., de WINDE, J.H. & THEVELEIN, J. M. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1 p, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* **32**: 1002-1012.

LEER, R.J.; VAN RAAMSDONK-DUIN, M.M.C.; MAGER, W. & PLANTA, R.J. (1985). Conserved sequences upstream of yeast ribosomal protein genes. *Curr. Genet.* **9**: 273-277

LEVIN, D. E., BOWERS, B., CHEN, C.-Y. & KAMADA, Y. (1994). Dissecting the protein kinase C/ map kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**: 229-239.

LOCKE, E.G., BONILLA, M., LIANG, L. TAKITA, Y. & CUNNINGHAM, K.W. (2000). A homolog of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels stimulated by depletion of secretory Ca<sup>2+</sup> in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 6686-6694.

LORELEI, B.S.-G. & ROGER, L.L. (2002). An IP<sub>3</sub>-activated Ca<sup>2+</sup> channel regulates fungal tip growth. *J. Cell. Scienc.* **115**: 5013-5025.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

MACHIDA, M.; UEMURA, H.; JIGAMI, Y. & TANAKA, H. (1988). The protein factor which binds to the upstream activating sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. *ENO1* gene. *Nucleic. Acids Res.* **16**: 1407-1422.

MALPARTIDA, F. & SERRANO, R. (1980). Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent. *FEBS Lett.* **111**, 69-72.

MARSHALL, C.J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Genet. & Develop.* **4**: 82-89.

MASON, A.B., KARDOS, T.B. & MONK, B.C. (1998). Regulation and pH expression of a bilaterally truncated yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1372**: 261-271.

MISETA, A., RAB, A., TÖKÉS-FÜZESI, M., BEDWELL, D.M., REPA, I., SÜMEGI, B. & SIPOS, K. (2002). Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1 p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **44**: 1299-1308.

MULLER, E. M.; MACKIN, N. A., ERDMAN, S. E. & CUNNINGHAM, K. W. (2003). Fig1 p facilitates Ca<sup>2+</sup> influx and cell fusion during mating of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**: 38461-38469.

NAKAJIMA-SHIMADA, J., IIDA, H., TSUJI, F. I. & ANRAKU, Y. (1991). Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* **88**: 6878-6882.

NANDURI, J., MITRA, S., ANDREI, C., LIU, Y., YU, Y., HITOMI, M. & TARTAKOFF, A.M. (1999). Na unexpected link between the secretory path and the organization of the nucleus. *J. Biol. Chem.* **274**: 33785-33789.

NANDURI, J. & TARTAKOFF, A. M. (2001). Pertubation of the nucleus: A novel Hog1 p-independent, Pkc1 p-dependent consequence of hypertonic shock in yeast. *Mol. Biol. Cell.* **12**: 1835-1841.

NEHLIN, J. O. & RONNE, H. (1990). Yeast *MIG1* repressor is related to the mammalian early growth response and and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J.* **9**: 2891-2898.

NEUMAN-SILBERBERG, F.S.; BHATTACHARYA, S. & BROACH, J.R. (1995). Nutrient availability and RAS/cyclic AMP pathway e both induce expression of ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae* but by different mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3187-3196.

OGAWA, H.; NOMURA, H.; NAKASAKO, M. & TOYOSHIMA, C. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2,6 Å<sup>0</sup> resolution. *Nature* **405**: 647-655.

PATTON, J.L. & LESTER, R.L. (1992). Phosphatidylinositol phosphate, phosphatidylinositol bis-phosphate, and the phosphoinositol sphingolipids are found in the plasma membrane and stimulate the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**: 70-76.

PARK, H. & LENNARZ, W. J. (2000). Evidence for interaction of the yeast protein kinase C with several subunits of oligosaccharyl transferase. *Glycobiology* **10**: 737-744.

PAYNE, W.E. & FITZGERALD-HAYES, M. (1993). A mutation in *PLC1*, a candidate phosphoinositide-specific phospholipase C gene from *Saccharomyces cerevisiae*, causes aberrant chromosome segregation. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4351-4364.

PEREZ, P. & CALONGE, T.M. (2002). Yeast protein kinase C. *J. Biochem.* **132**: 513-517.

PIPER, P.W., ORTIZ-CALDERON C, HOLYOAK C, COOTE P, COLE M. (1997). Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Cell. Stress Chaperones.* **2**: 12-24.

PORTILLO, F. (2000). Regulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1469**: 31-42.

RAO, R.; DRUMMOND-BARBOSA, D. & SLAYMAN, C. (1993). Transcriptional regulation by glucose of the yeast *PMA1* gene encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Yeast* **9**: 1075-1084.

ROLLAND, F., de WINDE, J.H., LEMAIRE, K., BOLES, E., THEVELEIN, J.M. & WINDERICKX, J. (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol. Microbiol.* **38**: 348-358.

RUIS, H. & SCHULLER, C. (1995). Stress signaling in yeast. *Bioessays*. **17**: 959-965.

SÁ-CORREIA, I. & ROSA, M.F. (1990). In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**: 830-835.

SÁ-CORREIA, I. & MONTEIRO, G.A. (1997). In vivo activation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by ethanol: effect on the kinetic parameters and involvement of the carboxyl-terminus regulatory domain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1370**: 310-316.

SAIARDI, A.; CAFFREY, J.J.; SNYDER, S.H.; SHEARS, S.B. (2000). Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **468**: 28-32.

SANZ, P., ALMS, G. R., HAYSTED, T. A. J. & CARLSON, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 1321-1328.

SCARBOROUGH, A. (2003). Rethinking the P-type ATPase problem. *TRENDS Bioch.Scienc.* **28**: 581-584.

SERRANO, R. (1983). In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* **156**: 11-14.

SERRANO, R., KIELLAND-BRAND, M.C. & FINK, G.R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* **319**: 689-693.

SERRANO, R. & PORTILLO, F. (1990). Catalytic and regulatory sites of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase studied by direct mutagenesis. *FEBS Lett.* **287**: 71-74.

SOUZA, M.A., TRÓPIA, M.J. & BRANDÃO, R.L. (2001). New aspects of the glucose activation of the H<sup>+</sup>-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **147**: 2849-2855.

THEVELEIN, J. M. & BEULLENS, M. (1985). Cyclic AMP and the stimulation of trehalase activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by carbon sources, nitrogen sources and inhibitors of protein synthesis. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 3199-3209.

THEVELEIN, J.M. (1991). Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol. Microbiol.* **5**: 1301-1307.

THEVELEIN, J. M. (1992). The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. In L. Grivell (Ed.), *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology*. Special Issue: Molecular Biology of Yeast, Kluwer, Dordrecht. **62**: 102-130.

THEVELEIN, J. M. (1994). Signal Transduction in Yeast. *Yeast* **10**: 1753-1790.

THEVELEIN, J.M. & HOHMANN, S. (1995). Threose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends. Bioch. Sci.* **20**: 1- 48. .

TISI, R., COCETTI, P., BANFI, S. & MARTEGANI, E. (2001). 3-Nitrocoumarin is an efficient inhibitor of budding yeast phospholipase C. *Cell. Biochem. Funct.* **19**: 229-235.

TISI, R., BALDASSA, S., BELOTTI, F. & MARTEGANI, E. (2002). Phospholipase C is required for glucose-induced calcium influx in budding yeast. *FEBS Lett.* **520**: 133-138.

TISI, R.; BELOTTI, F.; WERA, S.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M. & MARTEGANI, E. (2003). Evidence for inositol triphosphate as second messenger for glucose-induced calcium signaling in budding yeast. *Current Genetics* **294**: 465-470.

TÖKÉS-FÜZESI, M., BEDWELL, D. M., REPA, I., SIPOS, K., SÜMEGI, B., RAB, A. & MISETA, A. (2002). Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1 p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **44**: 1299-1308.

TRÓPIA, M. J. M., CARDOSO, A. S., TISI, R., FIETTO, L. G., FIETTO, J. L.R., MARTEGANI, E., CASTRO, I. M. & BRANDÃO, R. L. (2006). Relationship between calcium metabolism and sugar-induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (submetido).

ULASZEWSKI, S., HIELGER, F. & GOFFEAU, A. (1989). Cyclic AMP controls the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **245**: 131-136.

VIEGAS, C.A. & SÁ-CORREIA, I. (1991). Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 645-651.

XUE, Y., BATLLE, M. & HIRSCH, J.P. (1998). *GPR1* encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J.* **17**: 1996-2007.

WERA, S.; BERGMA, J.C.T. & THEVELEIN, J.M. (2001). Phosphoinositides in yeast: genetically tractable signalling. *FEMS Yeast Research I.* 9-13.

YORK, J.D.; ODOM, A.R.; MURPHY, R.; IVES, E.B., WENTE, S.R. (1999). A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* **285**: 96-100.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)