

MANUEL GUSTAVO LEITÃO RIBEIRO

“PARTICIPAÇÃO DA Cu(I)-ATPase NA RESPOSTA
CELULAR A ALTERAÇÕES ÁCIDO-BASE: PAPEL DE
DOMÍNIOS ESPECÍFICOS DE SUA REGIÃO
N-TERMINAL”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2 0 0 6

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

“Participação da Cu(I)-ATPase na resposta celular a alterações ácido-base: papel de domínios específicos de sua região N-terminal”

Manuel Gustavo Leitão Ribeiro

Tese de Doutorado desenvolvida no laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch, sob orientação de Adalberto R. Vieyra, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica). O apoio financeiro para a realização desta tese foi concedido pelas agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (convênio CAPES/Cofecub n° 378/02), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, programa Cientistas de Nosso Estado) e Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS/França).

Orientador: Adalberto Ramón Vieyra

Rio de Janeiro

Agosto - 2006

RIBEIRO, Manuel Gustavo Leitão.

Participação da Cu(I)-ATPase na resposta celular a alterações ácido-base: papel de domínios específicos de sua região N-terminal/ Manuel Gustavo Leitão Ribeiro - Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF, 2006.

xv, 161f.: il.; 31 cm.

Orientador: Adalberto Ramón Vieyra

Tese (Doutorado): UFRJ/ IBCCF/ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2006.

Referências Bibliográficas: f. 143-161.

1. Cu(I)-ATPase. 2. Região N-terminal. 3. Domínios de ligação de cobre. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. 5. Metabolismos de cobre e ferro. 6. Alterações ácido-base.

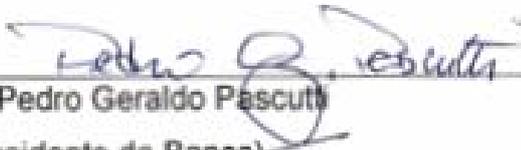
I. Vieyra, Adalberto Ramón. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título

**"PARTICIPAÇÃO DA CU(I)-ATPASE NA RESPOSTA
CELULAR A ALTERAÇÕES ÁCIDO-BASE: PAPEL DE
DOMÍNIOS ESPECÍFICOS DE SUA REGIÃO N-
TERMINAL"**

MANUEL GUSTAVO LEITÃO RIBEIRO

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS

APROVADA POR:



Dr. Pedro Geraldo Pascutti
(Presidente da Banca)



Dr. Adalberto Ramon Vieyra



Dr. Antonio Ferreira Pereira



Dr. José Roberto Meyer Fernandes



Dr. Marcelo Marcos Morales



Dra. Sonia Rozental



Dr. Marcelo Marcos Morales
(Revisor)



Dr. Adalberto Ramon Vieyra
(Orientador)

Rio de Janeiro, RJ, Brasil
14 de agosto de 2006

Nada é impossível de mudar

“Desconfiai do mais trivial, na aparência singelo.

E examinai, sobretudo, o que parece habitual.

Suplicamos expressamente: não aceiteis o que é de hábito como coisa natural, pois em tempo de desordem sangrenta, de confusão organizada, de arbitrariedade consciente, de humanidade desumanizada, nada deve parecer natural nada deve parecer impossível de mudar”.

Bertold Brecht (1898-1956)

AGRADECIMENTOS

Talvez a palavra que eu mais tenha usado ao longo desses quatro anos de doutorado tenha sido “obrigado” (e suas variações “valeu”, “te devo essa”...). Ainda assim, é necessário relembrar aqui as pessoas que foram importantes durante este período. Por isso, agradeço publicamente:

Aos meus pais, pela confiança sempre depositada e por terem agüentado os períodos de impaciência.

A toda a minha família, que sempre se mantém unida para enfrentar os problemas que surgem.

A todos os envolvidos neste projeto: a Jennifer, com quem tirei muitas dúvidas e estive sempre pronta a ajudar, tanto nos 6 meses em que convivemos debaixo do mesmo teto em Grenoble, quanto aqui no laboratório; os alunos de IC, que participaram em diferentes períodos: Renata, no início do projeto, quando ainda estávamos quebrando a cabeça; Carol, que participou das primeiras microscopias e ficou muitas vezes com o dedo dolorido de dar petelecos nos eppendorfs; Cadu, que se dedicou (e continua se dedicando) enormemente na última e decisiva parte do projeto; todos do grupo de ATPases do lab. BMC, no CEA: Ely, Florent, Martine, Patrice, Isabelle, Chen Chou e Roger, por gentilmente nos cederem os plasmídeos e a cepa Δ CCC2 e pelo convívio sempre amigável no laboratório; o Rafael, assim como a Jennifer, pelos resultados de fosforilação.

Ao Pedro, pela dedicação com que trabalhou na montagem das figuras.

A toda a equipe do laboratório de Físico-Química Biológica, em especial a Luciene, o Marcelo e a Dra. Aída, sempre dispostos a contribuir com seus conhecimentos.

À professora Sônia Rozental, ao Anderson, ao Marcel e ao Kildare pela ajuda essencial em vários experimentos, principalmente nas microscopias.

Aos professores Rosália Mendes Otero e Marcelo Santiago, pela utilização do microscópio confocal para a obtenção das imagens.

Ao professor Antônio Pereira, ao Gustavo e à Luciana, pela dicas e contribuições para a obtenção das frações de membrana.

À professora Celuta e a todos do seu laboratório pela permissão e ajuda no uso do homogeneizador de células.

Ao professor Orlando Bonifácio, pela realização das amplificações no seu laboratório.

À Ariane e ao Rodrigo, não apenas pela ajuda com as amplificações dos plasmídeos, mas também e, talvez, principalmente, pelas suas amizades e por demonstrarem sempre

dedicação à luta pela melhoria das condições de trabalho na UFRJ e por mais verbas para educação e pesquisa.

Aos professores Margarida de Mello Ayres e Gerhard Malnic, por nos cederem o DIDS e a ACTZ, fundamentais para o fechamento da tese.

Aos professores Bonapace e Roberto Faria, do IQ, pelas aproximações numéricas para o cálculo dos íons livres.

Ao professor Marcelo Morales, pela revisão da tese e pelas sugestões.

Aos amigos Iranaia, Fabrício, Andréia e Cláudio pelos carnavais e pelas confraternizações que passamos juntos e por me ajudarem em períodos mais complicados.

À Tati, como não poderia deixar de agradecer, apesar de tudo, pois foi com quem compartilhei alguns dos melhores momentos da minha vida e também alguns dos mais difíceis.

À secretaria de pós-graduação, em especial à Sandrinha, por sempre tirar aquelas minhas dúvidas de “aluno”.

A todos da secretaria geral, Edna, Maria Luíza, Terezinha e Jorge, pelo pronto atendimento sempre que precisei.

Ao pessoal do estacionamento, em especial Alexandre e Genésio, por abrirem os portões sempre que ficava até tarde no laboratório.

Ao pessoal que cuida da manutenção das instalações dos laboratórios e da administração, em especial Júlio, Waldir e Gentil. Sabemos que, diante da falta de condições de trabalho, vocês fazem o possível.

Aos companheiros da Biofísica, em especial o pessoal do futebol (que o campinho não vire estacionamento!), e àqueles que sempre encontrava, seja nas reuniões, nos corredores ou pra tomar um café, principalmente a Vanessa, a Renata, o Maurício e, mais recentemente o Brian.

Aos amigos que fiz em Grenoble, em especial Anne Emanuelle, Thomas, Chen Chou, Mariana e Tânia, pelos bons momentos que me faziam esquecer a saudade do Brasil.

A todos da Associação de Pós-graduandos da UFRJ, o lugar onde tive minhas primeiras experiências de militância (algo que não quero mais largar) e onde fiz bons amigos.

A todos os integrantes dos conselhos onde fui representante de alunos, que me ensinaram um pouco do que é este mundo chamado UFRJ.

A todos do CeCAC, que me mostraram que a coisa mais importante a se fazer na vida é lutar por uma sociedade mais justa.

RESUMO

A interconexão entre as homeostacias de cobre (Cu) e ferro (Fe), influenciada por alterações ácido-base, é descrita em diversos organismos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*. Um dos elementos chave desta interconexão é Ccc2, a Cu(I)-ATPase de leveduras que, transferindo Cu(I) a apo-Fet3 no Golgi, ativa o complexo transportador de Fe e seu endereçamento para a membrana plasmática (MP). Esta ATPase apresenta uma longa região N-terminal com dois domínios de ligação de Cu(I): MBD1 ($^{13}\text{CSA}^{16}\text{C}$) e MBD2 ($^{91}\text{CGS}^{94}\text{C}$). O objetivo desta tese foi investigar o papel da região N-terminal no manuseio de Cu(I) em combinações extremas de Cu e Fe (traços; concentrações saturantes) em pH ácido e alcalino. Foi empregada uma cepa de levedura sem o gene CCC2 (ΔCCC2) transformada para superexpressar o gene selvagem (wt) ou os mutantes D627A (inativo), $\Delta\text{N-ter}$ (truncado em toda a região N-terminal), ΔMBD1 (sem MBD1) e M1 (sem MBD2). Ccc2 wt apresenta um fenótipo de resistência a pH alcalino com Cu^{2+} 0,3 μM e Fe^{2+} 1,6 μM , enquanto ΔMBD1 > M1 requerem a adição de Cu^{2+} 2 μM para crescimento parcial. Os resíduos ^{13}C e ^{16}C são essenciais para a viabilidade de Ccc2 a pH alcalino (substituições por serinas tornam inviável a cepa a pH 8,0, a qual cresce de forma tênue a pH 7,2 com Cu^{2+} 10 μM). $\Delta\text{N-ter}$ não fosforila e, ao contrário dos demais mutantes, não se direciona para o Golgi, o que revela uma enzima duplamente inativa. Em nível molecular, a adaptação de Ccc2 a pH alcalino correlaciona-se com acentuado aumento da atividade ATPásica. Finalmente, o crescimento das cepas é afetado de maneira diferenciada ($\text{Ccc2} < \text{M1} = \Delta\text{N-ter} = \text{M1(ss)}$) por DIDS (inibidor da permuta $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$) e por acetazolamida (inibidor da anidrase carbônica). Conclui-se: a) Ccc2 participa nas respostas celulares a alterações ácido-base; b) os MBDs participam com seletividade diferente; c) a resposta de Ccc2 depende da disponibilidade de Cl^- no lúmen do Golgi, revelando um acoplamento entre fluxos de Cu(I) (no Golgi) e ânions (na MP).

SUMMARY

A link between copper (Cu) and iron (Fe) homeostasis that is influenced by acid-base alterations has been described in different organisms, including *Saccharomyces cerevisiae*. A key element in this link is Ccc2, the Cu(I)-ATPase that transfers Cu(I) to apo-Fet3 in the Golgi apparatus, thereby activating the Fe-transporting complex and directing it to the plasma membrane (PM). This ATPase has a long N-terminal region with two Cu(I)-binding domains: MBD1 (^{13}C SA ^{16}C) and MBD2 (^{91}C CGS ^{94}C). The aim of this thesis was to investigate the role of the N-terminal region in Cu(I) handling in combinations of extreme Cu^{2+} and Fe^{2+} concentrations (traces; saturating concentrations) at acid and alkaline pH. Yeast strains lacking the CCC2 gene (ΔCCC2) were transformed to overexpress the wild-type gene (wt) or the mutants D627A (inactive control without ATPase activity), $\Delta\text{N-ter}$ (lacking the entire N-terminal region), ΔMBD1 (without MBD1) and M1 (without MBD2). Ccc2 wt exhibits an alkaline pH resistance phenotype with $0.3 \mu\text{M Cu}^{2+}$ and $1.6 \mu\text{M Fe}^{2+}$, while $\Delta\text{MBD1} > \text{M1}$ require the addition of $2 \mu\text{M Cu}^{2+}$ for limited growth. The ^{13}C and ^{16}C residues are essential for yeast survival at alkaline pH (there is no growth when serines replace for both cysteines at pH 8.0; slight growth is seen in the presence of $10 \mu\text{M Cu}^{2+}$). $\Delta\text{N-ter}$ does not phosphorylate and, in contrast with the other mutants, it is not found in the Golgi, thus revealing a twofold inactive enzyme. At a molecular level, the adaptive response of Ccc2 to alkaline pH is associated with a huge increase in ATPase activity. Finally, growth of yeast strains is reduced to different extents ($\text{Ccc2} < \text{M1} = \Delta\text{N-ter} = \text{M1(ss)}$) by DIDS (an inhibitor of the $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$ exchanger) and by acetazolamide (a carbonic anhydrase inhibitor that decreases HCO_3^- supply). It is concluded: a) Ccc2 participates in the cellular response to acid-base alterations; b) the MBDs participate with different selectivity; and c) the response of Ccc2 depends on $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$ exchange at the PM level.

RESUMÉ

La communication entre les homéostasies du cuivre (Cu) et du fer (Fe), sous les altérations acido-basiques, est décrite en plusieurs organismes, inclus *Saccharomyces cerevisiae*. Un élément important de cette communication est Ccc2, la Cu(I)-ATPase qui transfère le Cu(I) à apo-Fet3 dans le Golgi et active le complexe transporteur de Fe et son adressage à la membrane plasmique (MP). Cette ATPase possède une grande région N-terminal avec deux domaines de liaison du Cu(I) : MBD1 ($^{13}\text{CSA}^{16}\text{C}$) e MBD2 ($^{91}\text{CGS}^{94}\text{C}$). L'objectif de cette thèse a été l'étude du rôle de la région N-terminal dans le transport de Cu(I) dans les conditions extrêmes de Cu et Fe (traces; concentrations saturants) en pH acide et basique. Une souche de levure sans le gène CCC2 (ΔCCC2) a été utilisé pour sur exprimer le gène sauvage (wt) ou les mutants D627A (inactive), $\Delta\text{N-ter}$ (sans la région N-terminal), ΔMBD1 (sans MBD1) et M1 (sans MBD2). Ccc2 wt présente un phénotype de résistance à pH basique avec Cu^{2+} 0,3 μM et Fe^{2+} 1,6 μM , pendant que ΔMBD1 > M1 a besoin de l'addition de 2 μM Cu^{2+} pour une croissance partiel. Les résidus ^{13}C et ^{16}C sont essentiels pour la viabilité de Ccc2 à pH basique (avec les substitutions par serines, la souche devient non-viable à pH 8,0 et pousse doucement à pH 7,2 avec Cu^{2+} 10 μM). $\Delta\text{N-ter}$ ne phosphoryle pas et différemment des autres mutants ne vas pas au Golgi, ce qui caractérise une enzyme inactive. Au niveau moléculaire, l'adaptation de Ccc2 à pH basique a un rapport avec la grande élévation d'une activité ATPase. Finalement, la croissance des différentes souches est affectée de façon distinguée ($\text{Ccc2} < \text{M1} = \Delta\text{N-ter} = \text{M1(ss)}$) par DIDS (inhibiteur du transport $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$) et par acétozolamide (inhibiteur de l'anhydrase carbonique). On peut conclure : a) Ccc2 fait partie des réponses cellulaires au changement de pH ; b) les MBDs possèdent différent sélectivité par rapport au stress alcaline; c) la réponse de Ccc2 est dépendent de la disponibilité de Cl^- dans le lumen du Golgi, ce qui montre une liaison parmi les fluxes de Cu(I) (dans le Golgi) et les anions (dans la MP).

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1. Importância dos metais de transição – o papel do cobre.....	1
2. As vias celulares de captação e transporte de cobre	5
2.1. Disponibilização de íons cobre para o complexo de Golgi e as vias secretórias	8
2.1.1. Conexão das homeostacias de cobre e ferro	17
2.2. Disponibilização de íons cobre para a mitocôndria	23
2.3. Disponibilização de íons cobre para o citosol	25
3. Ccc2: uma ATPase do tipo P	25
3.1. ATPases	26
3.1.1. ATPases do tipo P	27
3.1.2. ATPases do tipo P1	34
II. OBJETIVOS	38
III. MATERIAIS E MÉTODOS	40
1. Materiais	40
1.1. Gene CCC2	40
1.2. Cepa de levedura deficiente no gene CCC2 (Δ CCC2)	41
1.3. Plasmídeos de expressão em leveduras	45
1.4. Frações de membrana de células <i>Sf9</i> contendo Ccc2 e seus mutantes	48
1.5. Meios de cultura	52
1.5.1. Meio Rico (YD)	52
1.5.2. Meio <i>Drop out base</i> (DOB)	53
1.5.3. Meios para os testes de complementação em presença de ferrozina.....	53
2. Métodos	58
2.1. Amplificação em <i>E. coli</i> dos plasmídeos de expressão em leveduras	58
2.1.1. Transformação de células de <i>E. coli</i>	58
2.1.2. Seleção dos clones	59
2.1.3. Extração do DNA plasmidial de <i>E. coli</i> (Mini-preparação)	59
2.1.4. Confirmação dos clones obtidos por digestão com enzima de restrição	60
2.2. Transformação de leveduras	60
2.3. Curvas de crescimento de cepas Δ CCC2 transformadas com os genes CCC2 e	

seus mutantes	63
2.4. Preparações de frações de membrana de leveduras	63
2.5. Dosagem de proteína	64
2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e <i>western blotting</i>	64
2.7. Dosagem de atividade Cu(I)-ATPásica em frações de membrana de leveduras e de células <i>Sf9</i>	66
2.8. Experimentos de fosforilação de Ccc2	66
2.9. Testes de complementação	67
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
1. Análise do crescimento de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformadas com o gene CCC2 e os mutantes utilizados nesta tese	69
2. Ensaio de complementação a pH ácido (6,1) na presença de diferentes concentrações de cobre e ferro	75
3. Ensaio de atividade Cu(I)-ATPásica	77
4. Imunodeteção de Ccc2 e D627A nas frações totais de membrana de <i>S. cerevisiae</i>	91
5. Efeito de variações de pH sobre a atividade Cu(I)-ATPásica	93
6. Papel da região N-terminal de Ccc2 na catálise e no endereçamento celular em <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	96
7. Importância da região N-terminal de Ccc2 para o crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	104
8. Efeito da variação de pH extracelular na viabilidade celular de cepas Δ CCC2 transformadas	104
9. Dissecção da região N-terminal na resistência ao pH alcalino	111
10. Efeito do cobre no fenótipo de resistência a pH alcalino de cepas Δ CCC2 transformadas com diferentes mutantes de Ccc2	115
11. Estudo dos efeitos de modificações em resíduos passíveis de fosforilação por proteínas quinases	125
12. Efeito do ferro no fenótipo de resistência ou sensibilidade a pH alcalino de cepas Δ CCC2 transformadas com diferentes mutantes de Ccc2	127
13. Modificação do crescimento de cepas Δ CCC2 transformadas com diferentes mutantes de Ccc2 na presença de inibidores do transporte de ânions	134
V. CONCLUSÕES	139
VI. REFERÊNCIAS	143

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1	3	Figura 28	81
Tabela 2	54	Figura 29	83
Tabela 3	55	Figura 30	85
Tabela 4	56	Figura 31	87
Tabela 5	57	Figura 32	89
Figura 1	4	Figura 33	90
Figura 2	7	Figura 34	92
Figura 3	10	Figura 35	95
Figura 4	12	Figura 36	97
Figura 5	13	Figura 37	99
Figura 6	15	Figura 38	100
Figura 7	16	Figura 39	103
Figura 8	18	Figura 40	105
Figura 9	21	Figura 41	107
Figura 10	24	Figura 42	109
Figura 11	29	Figura 43	110
Figura 12	31	Figura 44	113
Figura 13	32	Figura 45	114
Figura 14	37	Figura 46	116
Figura 15	42	Figura 47	118
Figura 16	44	Figura 48	119
Figura 17	46	Figura 49	121
Figura 18	47	Figura 50	123
Figura 19	49	Figura 51	124
Figura 20	50	Figura 52	128
Figura 21	61	Figura 53	129
Figura 22	65	Figura 54	131
Figura 23	71	Figura 55	133
Figura 24	73	Figura 56	135
Figura 25	76	Figura 57	136
Figura 26	78	Figura 58	141
Figura 27	79		

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTZ - acetazolamida

AE – *anion exchanger* (canal trocador de ânions)

ATP – trifosfato de adenosina

BCA – ácido bicinconínico

BCS – ácido batocuproíno dissulfônico

CA – *carbonic anhydrase* (anidrase carbônica)

CSM – *complete supplement mixture*

D.O. – densidade óptica

DAPI - 4',6'-diamidino-2-fenilindol

DIDS - ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2-2'-disulfônico

DNA – ácido desoxirribonucléico

DOB – meio de cultura *drop out base*

DTT - ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético

x g - gravidade

GFP – *green fluorescent protein*

h - hora

MBD – *metal binding domain* (domínio de ligação de metal)

min - minuto

MOPS – ácido (3-[N-Morpholino]propanosulfônico

PCR – *polymerase chain reaction*

Pi – Íon fosfato (PO_4^{3-}) liberado com a hidrólise do ATP

PKA – proteína cinase A

ptn - proteína

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de dodecil sulfato de sódio

Serca1A – Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático

Sf9 – células de *Spodoptera frugiperda*

Sod – Cu/Zn superóxido dismutase

TK – proteína tirosina cinase

TRIS – tris (hidroximetil) aminometano

YD – *yeast dextrose* (designa o meio rico em nutrientes)

YNB – meio de cultura *yeast nitrogen base*

NOMENCLATURAS ESPECIAIS

Cu(I) – nomenclatura usada para referir-se ao cobre em estado de oxidação (I); empregada quando se trata de cobre intracelular ou à forma em que se encontra na ATPase ou nas metalochaperonas.

Cu – forma genérica de referir-se ao cobre, sem detalhamento de carga ou estado de oxidação.

Cu²⁺ - nomenclatura para destacar a forma iônica; empregada para referir-se ao cobre em solução (nos meios).

Ccc2 – *Ca-sensitive Cross-Complementer* (designa a **enzima** Cu(I)-ATPase de leveduras)

CCC2 – designa o **gene** da Cu(I)-ATPase de leveduras.

Esta diferença entre maiúsculas e minúsculas ao referir-se ao gene e à proteína, respectivamente, foi usada para todas as moléculas.

I. INTRODUÇÃO

1. Importância dos metais de transição para a célula – o papel do cobre

“Metal de transição” é quimicamente definido como todo elemento que forma pelo menos um íon com o subnível “d” de elétrons parcialmente preenchido. Os metais de transição mais importantes fisiologicamente são ferro (Fe), zinco (Zn), cobalto (Co), manganês (Mn) e cobre (Cu) (Van Ho *et al.*, 2002). Estes metais atuam como cofatores essenciais em diversas reações, sendo importantes inclusive para a definição da correta estrutura terciária de várias proteínas. As proteínas que dependem de metais de transição para suas atividades podem ser encontradas em praticamente qualquer compartimento celular, desde a superfície da membrana plasmática, passando pelo citoplasma, até chegar ao núcleo e às diferentes organelas, como o Golgi e a mitocôndria. Isso gera algumas importantes questões. Em primeiro lugar, quais e como são modulados os fatores celulares envolvidos na captação e distribuição desses metais para que as enzimas os recebam no compartimento e momento certos, sabendo-se que as células passam por alterações metabólicas a todo instante, que podem modificar a expressão e a atividade desses fatores? Tais alterações metabólicas podem derivar de situações fisiológicas e hábitos normais, como, no caso do homem, alimentar-se, fazer a digestão, praticar exercícios e dormir, até situações menos comuns como mudanças climáticas, acidentes e doenças. Segundo, uma vez que os metais de transição são avidamente captados pelas células, de que forma elas são capazes de evitar que esses metais, quando em concentrações exageradas, tornem-se potencialmente tóxicos?

Estas questões têm sido pouco a pouco respondidas nos últimos anos através dos estudos realizados em *Saccharomyces cerevisiae*. Hoje sabemos como os metais de transição são capazes de atravessar a membrana plasmática de *S. cerevisiae* mais do que em qualquer

outro organismo. A caracterização dos genes envolvidos na captação e no transporte destes metais em *S. cerevisiae* permitiu a identificação dos genes correlatos em eucariotos superiores como plantas e homens (Van Ho *et al.*, 2002). Os metais de transição são normalmente referidos como elementos traços, mas do ponto de vista da célula esse termo não é bem aplicado. Estudos realizados em *Escherichia coli*, por exemplo, revelam que uma única bactéria concentra (principalmente na forma complexada ou ligada, não “livre”), para utilização em diferentes vias metabólicas, Zn e Fe na ordem de 2×10^5 átomos por célula, o que significa uma concentração de cerca de 0,1 mM; Cu e Mn em concentrações de 10 a 100 μ M (Finney e O’Halloran, 2003).

O Cu é um elemento necessário para a atividade de diversas cuproenzimas essenciais para a respiração celular, oxidação do Fe, formação de pigmentos, biossíntese de neurotransmissores, defesa contra antioxidantes, amidação de peptídeos e formação de tecido conectivo (Tabela 1). Dentre as enzimas mais importantes que utilizam o Cu como cofator pode-se citar a citocromo c oxidase (componente da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria), superóxido dismutase (envolvida na proteção contra espécies reativas de oxigênio) e lisil oxidase (que é necessária para a interação entre colágeno e elastina). A necessidade metabólica de Cu torna-se mais evidente na infância, que representa um dos mais críticos períodos em termos de requerimento de Cu porque o rápido crescimento gera um aumento na demanda pelo metal (Arredondo e Núñez, 2005). No entanto, enquanto este metal é necessário em quantidades limitadas, o seu excesso é altamente tóxico, o que explica a existência de mecanismos de controle de suas quantidade e localização no interior das células. Esta toxicidade do Cu pode ser explicada analisando-se a sua posição na Tabela Periódica dos Elementos (Figura 1) e a sua distribuição eletrônica (K=2, L=8, M=18, N=1): este metal pode apresentar dois principais estados de oxidação, Cu(II) e Cu(I). A capacidade de transitar entre estes dois estados de oxidação o torna um potencial gerador de radicais livres através da sua participação em reações de oxi-redução que ocorrem no meio intracelular.

Tabela 1. Proteínas ligadoras de Cu, com suas respectivas funções e conseqüências de sua deficiência ou defeito (extraída de Peña *et al*, 1999).

Nome comum	Função Biológica	Conseqüências da deficiência ou defeito
Cu/Zn superóxido dismutase	Detoxificação de radicais livres	Danos oxidativos a componentes celulares
Citocromo c oxidase	Transporte de elétrons na mitocôndria	Sintomas de deficiência de ATP: miopatia, ataxia, ataques epiléticos
Lisil oxidase	Interação entre colágeno e elastina	Sintomas relacionados ao tecido conjuntivo: ruptura vascular e torção
Dopamina β-hidroxilase	Produção de catecolamina	Pele e juntas frouxas; enfisema
Tirosinase	Produção de melanina	Desbalanço hipotalâmico: hipotermia, hipotensão, desidratação, sonolência, despigmentação
Peptidilglicina monooxigenase	Bioativação de hormônios peptídicos	Efeitos variados devido ao mal-funcionamento de hormônios peptídicos
Ceruloplasmina	Ferroxidase, transporte de Cu	Anemia
Fatores de coagulação V, VII	Coagulação do sangue	Sangramentos
Angiogenina	Indução da formação de vasos sangüíneos	Desenvolvimento defeituoso dos vasos sangüíneos
Metalotioneína	Quelante de Cu	Intoxicação por Cu
Proteína príon	Função normal ainda desconhecida; propriedades de ligação de Cu sugerem um potencial papel na captação de Cu	Padrões alterados de sono e ciclo circadiano em camundongos; doenças de Creutzfeld Jacob, Kuru, e Gerstmann-Straussler-Scheinker; Insônia hereditária fatal
Proteína precursora β-amilóide	Função normal ainda desconhecida	Mal de Alzheimer hereditário
Hephaestina	Saída de Fe do intestino	Anemia ligada ao sexo

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18				
1	H HIDROGÊNIO 1.00794	TABELA PERIÓDICA () = ESTIMATIVA																	2 He HÉLIO 4.002602				
		FAMÍLIA																					
		1 Metal Alcalino										17 Halogênios											
		2 Metal Alcalino Terroso										18 Gases Nobres											
		3 a 12 Metal de Transição																					
3 Li LÍTIO 6.941	4 Be BERILIO 9.012182																	5 B BÓRIO 10.811	6 C CARBONO 12.0107	7 N NITROGÊNIO 14.0067	8 O OXIGÊNIO 15.9994	9 F FLUOR 18.9984032	10 Ne NEÔNIO 20.1797
11 Na SÓDIO 22.989770	12 Mg MAGNÉSIO 24.3050																	13 Al ALUMÍNIO 26.981538	14 Si SILÍCIO 28.0855	15 P FÓSFORO 30.973761	16 S ENXOFRE 32.065	17 Cl CLORO 35.453	18 Ar ARGÔNIO 39.948
19 K POTÁSSIO 39.0983	20 Ca CÁLCIO 40.078	21 Sc ESCÂNDIO 44.955910	22 Ti TITÂNIO 47.867	23 V VANÁDIO 50.9415	24 Cr CROMO 51.9961	25 Mn MANGANÊS 54.938049	26 Fe FERRO 55.845	27 Co COBALTO 58.933200	28 Ni NÍQUEL 58.6934	29 Cu COBRE 63.546	30 Zn ZINCO 65.409	31 Ga GÁLIO 69.723	32 Ge GERMÂNIO 72.64	33 As ARSENÍO 74.92160	34 Se SELENÍO 78.96	35 Br BROMO 79.904	36 Kr CRÍPTÔNIO 83.798						
37 Rb RUBÍDIO 85.4678	38 Sr ESTRÔNCIO 87.62	39 Y ÍTRIO 88.90585	40 Zr ZIRCONÍO 91.224	41 Nb NÍOBIO 92.90638	42 Mo MOLIBDÊNIO 95.94	43 Tc TECNÉCIO 97.9072	44 Ru RUTÊNIO 101.07	45 Rh RÓDIO 102.90550	46 Pd PALÁDIO 106.42	47 Ag PRATA 107.8682	48 Cd CADMIO 112.411	49 In ÍNDIO 114.818	50 Sn ESTANHO 118.710	51 Sb ANTIMÔNIO 121.760	52 Te TELÚRIO 127.60	53 I IODO 126.90447	54 Xe XENÔNIO 131.293						
55 Cs CÉSIO 132.90545	56 Ba BÁRIO 137.327	Lantanídeos		72 Hf HÁFNIO 178.49	73 Ta TANTÁLIO 180.9479	74 W TUNGSTÊNIO 183.84	75 Re RÊNIO 186.207	76 Os ÓSMIO 190.23	77 Ir IRÍDIO 192.217	78 Pt PLATINA 195.078	79 Au OURO 196.96655	80 Hg MERCÚRIO 200.59	81 Tl TÁLIO 204.3833	82 Pb CHUMBO 207.2	83 Bi BISMUTO 208.98038	84 Po POLÔNIO 209.9871	85 At ASTATO 209.9871	86 Rn RADÔNIO 222.0176					
87 Fr FRÂNCIO 223.0197	88 Ra RÁDIO 226.0254	Actinídeos		104 Rf RUTHERFÓDIO 261.1088	105 Db DÚBÊNIO 262.1141	106 Sg SEABÓRGIO 266.1219	107 Bh BÓHRIO 264.12	108 Hs HASSÍO (277)	109 Mt MEITENÉRIO 268.1388	110 Ds DARMSTADTIO (271)	111 Rg ROENTGENIO (272)												
		57 La LANTÂNIO 138.9055	58 Ce CÉRIO 140.116	59 Pr PRASEÓDÍMIO 140.90765	60 Nd NEODÍMIO 144.24	61 Pm PROMÉCIO 144.9127	62 Sm SAMÁRIO 150.36	63 Eu EUROPIO 151.964	64 Gd GADOLÍNIO 157.25	65 Tb TÉRBIO 158.92534	66 Dy DISPRÓDIO 162.500	67 Ho HÓLMIO 164.93032	68 Er ÉRBIO 167.259	69 Tm TULÍO 168.93421	70 Yb ÍTERBIO 173.04	71 Lu LÚTECIO 174.967							
		89 Ac ACTÍNIO 227.0277	90 Th TÓRIO 232.0381	91 Pa PROTACTÍNIO 231.03588	92 U URÂNIO 238.02891	93 Np NEPTÚNIO 237.0482	94 Pu PLUTÔNIO 244.0642	95 Am AMERICÍO 243.0614	96 Cm CÚRIO 247.0704	97 Bk BERQUÉLIO 247.0703	98 Cf CALIFÓRNIO 251.0796	99 Es EINSTEÍNIO 252.0830	100 Fm FERMÍO 257.0951	101 Md MENDELEVIO 258.0984	102 No NOBÉLIO 259.1010	103 Lr LAURÊNCIO 262.1097							

Figura 1. A sua posição na Tabela Periódica dos Elementos fornece subsídios para compreender por que o Cu (em destaque na Tabela) pode apresentar diferentes estados de oxidação e, desta forma, atuar como um potencial gerador de espécies reativas de oxigênio (modificada de <http://www.pensalab.com.br>).

2. As vias celulares de captação e transporte de cobre

Como foi citado anteriormente, a internalização celular e a regulação homeostática de elementos essenciais, embora altamente tóxicos, como o Cu, requerem a ação coordenada de várias proteínas, presentes em diferentes compartimentos celulares (Finney e O'Halloran, 2003). Até hoje, apenas algumas proteínas envolvidas na homeostasia do Cu foram identificadas e ainda há muito a se desvendar acerca dos mecanismos que regulam a sua ação e distribuição. Os estudos realizados com leveduras e organismos procarióticos, baseados na inserção de cDNAs de mamíferos em cepas de microrganismos deficientes ou mutados em diferentes genes, vêm contribuindo enormemente para a descoberta de proteínas homólogas e a identificação do seu papel em outros organismos

No início da década passada, estudos pioneiros desenvolvidos em *Enterococcus hirae* levaram às primeiras descrições dos processos e componentes envolvidos na regulação da entrada e distribuição celular do Cu, bem como na sua detoxificação e eliminação (Odermatt *et al.*, 1992; Odermatt *et al.*, 1993; Solioz *et al.*, 1994). Nesta bactéria, a homeostasia do Cu é controlada por um operon composto por cinco genes: COPX, Y, Z, A e B. CopX, Y e Z são proteínas envolvidas na regulação do operon e CopA e CopB são duas proteínas integrais de membrana pertencentes à família das ATPases do tipo P, sendo necessárias para o transporte de Cu para dentro das células e para a extrusão do Cu em excesso, respectivamente. A remoção do gene COPA impede a bactéria de crescer em ambientes com escassez de Cu, enquanto a bactéria deficiente no gene COPB torna-se hipersensível ao metal.

A facilidade de manipulação genética e o conhecimento do genoma de *S. cerevisiae* contribuíram fortemente para a condução, nestes organismos, de estudos que auxiliassem a compreensão do transporte e distribuição intracelular de Cu em eucariotos. Dado o elevado índice de conservação de estrutura e função entre leveduras e humanos, não é de espantar que

as proteínas e as vias de transporte de Cu observadas nestes microrganismos sejam muito conservadas em células de mamíferos (Figura 2). Em condições fisiológicas, a entrada de Cu nas células ocorre na forma de Cu(I) via transportadores de alta afinidade (K_m 1-4 μ M), topologicamente conservados em todas as células eucarióticas (Puig e Thiele, 2002), denominados Ctr1 e Ctr3 (Dancis *et al.*, 1994; Knight *et al.*, 1996). Antes ou concomitante à entrada por alta afinidade, Cu(II) é reduzido a Cu(I) por uma ou mais Fe(III)/Cu(II) redutases presentes na membrana plasmática, codificadas pelos genes FRE1 a FRE7 (Figura 2).

Em humanos, Ctr1 é o provável responsável pelo transporte de Cu para o interior das células do epitélio intestinal através da membrana apical, mesmo em baixas concentrações do metal (Kuo *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). Outro candidato a transportador de Cu nesta face das células é DMT1, já descrito como transportador de Fe, cádmio (Cd), Mn e Cu (Arredondo e Núñez, 2005). É possível que Ctr1 esteja igualmente presente na membrana basolateral, uma vez que o Cu pode entrar nos enterócitos a partir do sangue. É interessante notar que níveis de Cu que excedam o valor do K_m de Ctr1 desencadeiam uma rápida e específica degradação do transportador na membrana plasmática ou uma endocitose mediada por Cu (Ooi *et al.*, 1996), o que pode ser mecanismos de defesa da célula para reduzir o número de cópias de Ctr1 na membrana em presença de altas concentrações do metal. Esta característica será explorada mais adiante.

Em paralelo ao sistema de transporte por alta afinidade, todos os organismos apresentam, em presença do metal em concentrações elevadas, embora não-tóxicas, no meio extracelular, um mecanismo alternativo de transporte de Cu por baixa afinidade ($K_m \cong 35 \mu$ M), que em geral não é específico para Cu, como é o caso dos transportadores Ctr2, Fet4 e Smf1/2 em *S. cerevisiae* (Peña *et al.*, 1999; Portnoy *et al.*, 2001; Luk *et al.*, 2003). Em situações fisiológicas, embora a concentração estimada de Cu intracelular seja 70 μ M, a disponibilidade de íons Cu(I) livres é muito restrita (segundo Rae *et al.*,

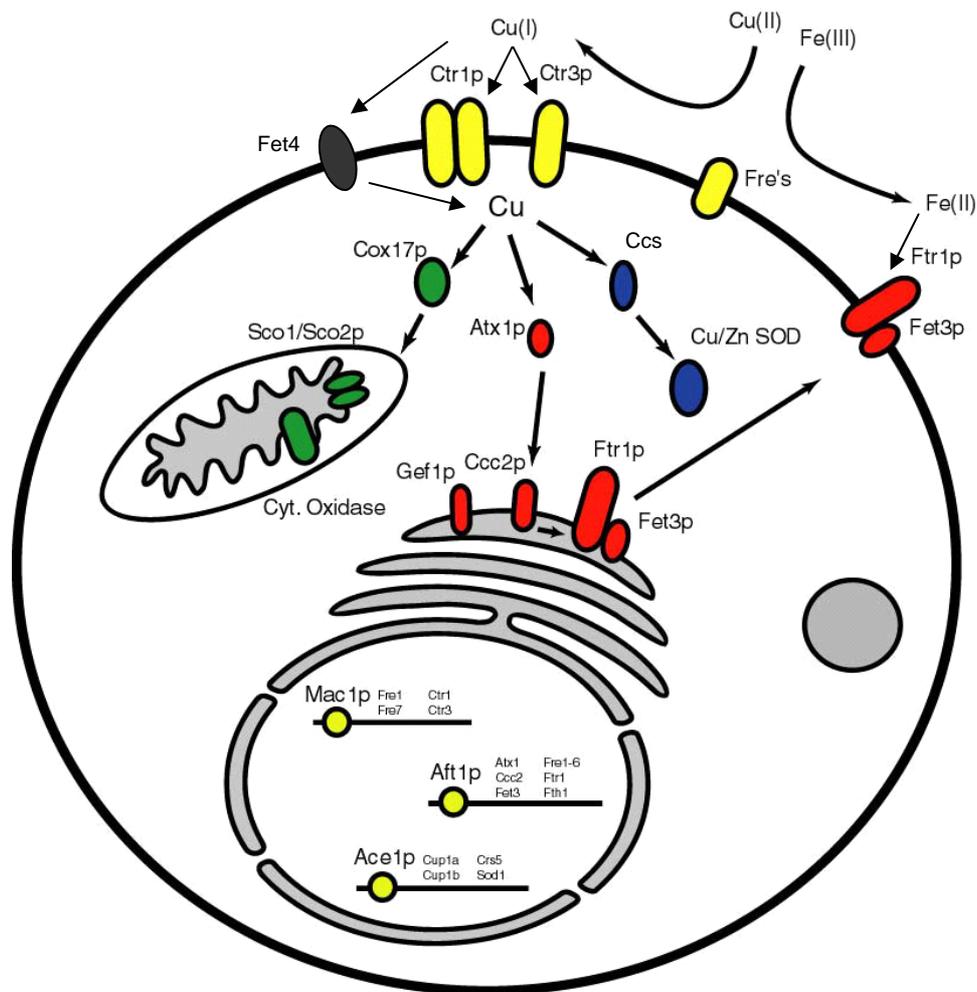


Figura 2. Esquema geral do transporte e distribuição de cobre em *S. cerevisiae*.

Cu(II) é reduzido a Cu(I) no meio extracelular pelas redutases presentes na membrana plasmática (Fre's), podendo então ser transportado para dentro da levedura por transportadores presentes na membrana plasmática, de alta (Ctr1 e Ctr3) ou baixa afinidade (Fet4, que também pode transportar outros metais, como o Fe). Uma vez dentro da célula, o Cu(I) é rapidamente sequestrado pelas metalochaperonas de Cu, Cox17, Ccs e Atx1, responsáveis, respectivamente, pela sua entrega para Sco1 (importante para a função da citocromo c oxidase na mitocôndria), Cu/Zn superóxido dismutase (no citoplasma) e Ccc2 (no trans-Golgi). Uma vez transportado para o lúmen do Golgi por Ccc2, o Cu(I) se liga a Fet3 (num processo que depende da captação de Cl⁻ por Gef1; ver item 2.1.1 adiante) e o complexo Fet3/Ftr1 ativado migra para a membrana, onde é responsável pela internalização de Fe por alta afinidade. Mac1, Aft1 e Ace1, que regulam a transcrição de genes de diferentes proteínas envolvidas na homeostasia de Cu e Fe, serão descritos mais adiante (modificado de <http://www.bioinformatics.med.uu.nl/courses/blast/>).

1999, praticamente não há Cu livre no citoplasma), já que o meio intracelular apresenta uma capacidade extraordinária de quelar Cu. Uma vez no interior da célula, uma fração substancial é submetida à detoxificação por fatores tais como glutatona ou metalotioneínas, que efetivamente previnem que o Cu seja acumulado na forma tóxica e iônica. Inicialmente acreditava-se que as enzimas que necessitavam do Cu para suas atividades obtinham este cofator através de processos de colisão com os íons livres ou com complexos de Cu envolvendo ligantes de baixo peso molecular, como a glutatona. No entanto, hoje se sabe que um outro *pool* de Cu(I) ultrapassa o sistema de detoxificação e é rapidamente ligado às “chaperonas de Cu”. Este termo foi utilizado pela primeira vez por Pufahl *et al.* (1997) para designar aquelas proteínas solúveis que têm a função de atuar como receptores intracelulares, direcionando uma parte dos íons Cu(I) que seriam destinados ao sistema de detoxificação para entregá-los a vias intracelulares específicas dentro da célula: complexo de Golgi, mitocôndria ou citoplasma.

O mecanismo pelo qual o Cu que entra na célula através dos transportadores presentes na membrana plasmática é entregue às metalochaperonas sem liberar íons livres no citoplasma ainda permanece obscuro. É possível que haja um receptor central de Cu que incorpore estes íons e os disponibilize para as metalochaperonas ou que os transportadores da membrana interajam diretamente com elas. Tampouco se sabe da existência de competição das diferentes metalochaperonas pelo Cu ou de uma hierarquia entre elas.

2.1 Disponibilização de íons cobre para o complexo de Golgi e as vias secretórias

A disponibilização de Cu para as cuproproteínas que transitam na via secretória com destino à membrana plasmática (p. ex. fatores de coagulação V e VII, tirosinase, lisil oxidase e ceruloplasmina em mamíferos, além de Fet3 em leveduras) é mediada pelas

metalo-chaperonas de Cu (Atox1 em mamíferos e Atx1 em leveduras). Atx1, que foi originalmente isolada como uma proteína antioxidante (antioxidante) em *S. cerevisiae* (Lin e Culotta, 1995), é uma proteína de 72 aminoácidos tida como o protótipo das metalochaperonas, por ser mais conhecida e estudada. A função de Atox1 e Atx1 é entregar o Cu(I) às proteínas transmembrana transportadoras de Cu(I) no complexo de Golgi, pertencentes à família das ATPases do tipo P: Ccc2¹ em leveduras; ATPases de Menkes (ATP7A) e Wilson (ATP7B) em humanos, assim chamadas porque mutações nestas enzimas dão origem às doenças genéticas homônimas.

Cabe aqui traçar um breve paralelo entre os papéis exercidos pelas Cu(I)-ATPases, bem como sua localização intracelular em leveduras e em humanos. Em 1997, Yuan *et al.* detectaram, por microscopia de fluorescência, que Ccc2 está restrita a compartimentos tardios de Golgi ou pós-Golgi na via secretória em leveduras (Figura 3). O tráfego intracelular de ATP7A e ATP7B é dependente de Cu (Petris *et al.*, 1996; Nagano *et al.*, 1998; Mercer *et al.*, 2003), sendo que em baixas concentrações desse metal, ambas estão predominantemente localizadas na rede do trans-Golgi. Na presença de elevados níveis de Cu, ATP7A, que é expressa em tecidos extra-hepáticos, é redistribuída em direção à membrana plasmática, onde realiza o efluxo de Cu para a corrente sanguínea. Este mecanismo é fundamental nas células intestinais, onde o Cu absorvido pela alimentação é transportado para a veia cava, através da qual chega até o fígado, de onde será distribuído para os diferentes tecidos. No fígado é expressa ATP7B que, em situações de elevada concentração intracelular de Cu, é transportada do trans-Golgi para vesículas secretórias que irão se fundir à membrana plasmática, onde atua na excreção do Cu através da bile. Mutações na proteína de Menkes são geralmente fatais, resultando em deficiência de Cu no organismo e, portanto, em falha na incorporação deste metal às proteínas que dele necessitam para suas atividades.

¹ Ccc2 e Cu(I)-ATPase de levedura são denominações intercambiáveis e ambas serão utilizadas nesta tese.

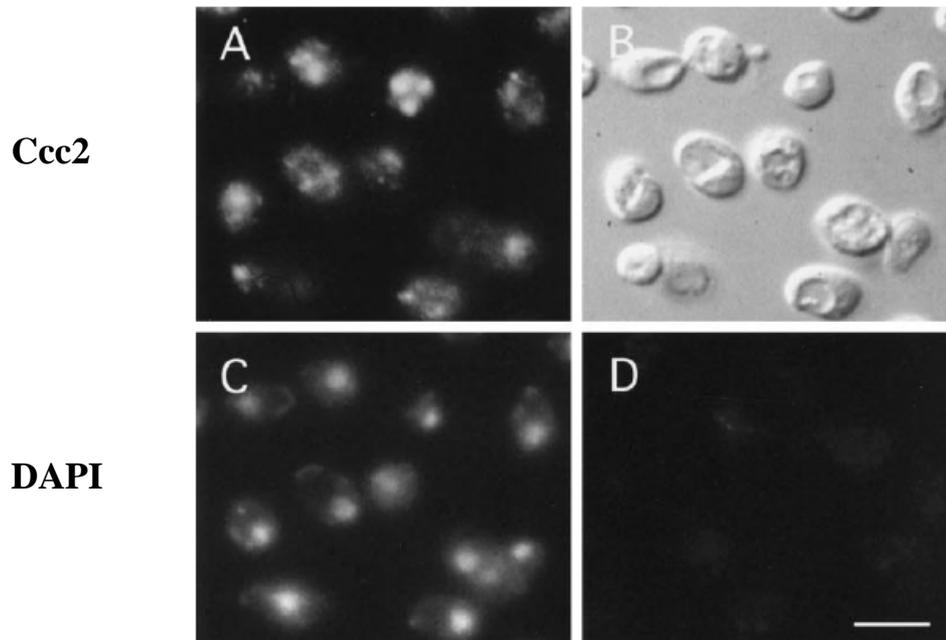


Figura 3. Microscopia confocal de Ccc2 fusionada com um epítipo de hemaglutinina (HA), mostrando a localização da enzima em vesículas do trans-Golgi. Células deficientes no gene CCC2 foram transformadas com plasmídeo contendo o gene CCC2.HA (A) ou com o plasmídeo sem o gene (D), incubadas com anticorpo anti-HA e examinadas por microscopia confocal. Em (C) estas mesmas células foram marcadas com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), corante específico de núcleo. (B) Imagem de fase das células em (A) (extraído e modificado de Yuan *et al.*, 1997).

Mutações na proteína de Wilson causam acúmulo de Cu em concentrações tóxicas no cérebro e fígado, o que leva a distúrbios hepáticos e neurológicos. O fígado desempenha um importante papel no metabolismo do Cu, sendo tanto o local de armazenamento deste metal, como também o sítio responsável pela regulação de sua excreção através da bile (Figura 4). Os hepatócitos são, desta forma, responsáveis pela normalização da homeostase de Cu e, em situações de deficiência deste metal, o estoque intracelular de Cu é reduzido, assim como diminui também o conteúdo biliar de Cu e a concentração de ceruloplasmina sanguínea (a ferroxidase responsável por carrear cerca de 95% do Cu encontrado no plasma).

As metalochaperonas de Cu apresentam um domínio conservado de ligação de metal (MBD – *Metal Binding Domain*) – MTCXXC (onde X representa um aminoácido qualquer). Os elementos importantes desta seqüência são os dois resíduos de cisteína, que mudam de conformação com a transferência e liberação de Cu(I) (Arnesano *et al.*, 2001a; Arnesano *et al.*, 2001b; Huffman e O'Halloran, 2001; Banci *et al.*, 2001; Banci *et al.*, 2006) (Figura 5). Ao se observar a sobreposição das estruturas apo-Atx1 (sem Cu ligado) e Cu(I).Atx1, verifica-se que, embora as folhas β fiquem alinhadas, existem diferenças nos *loops* e nas α -hélices (Arnesano *et al.*, 2001a; Huffman e O'Halloran, 2001). À medida que o Cu é liberado, o *loop* 1 se distancia do *loop* 5, a hélice 1 perde a conformação enovelada (Figura 5) e o *loop* de ligação do metal torna-se mais desordenado (Arnesano *et al.*, 2001a). Estes aspectos serão retomados mais adiante nesta tese na discussão de resultados obtidos com mutantes na região N-terminal de Ccc2 que interagem com Cu(I).Atx1.

A transferência de Cu(I) entre Atx1 e Ccc2 ocorre através de um mecanismo ainda não completamente elucidado. Foi demonstrado que esta transferência não se baseia numa suposta maior afinidade da proteína-alvo pelo Cu (Huffman e O'Halloran, 2000). A especificidade seria, portanto, decorrente de uma propriedade cinética e não termodinâmica, garantida por uma interação proteína:proteína (doadora:aceptora) mediada por Cu(I) (ver também Figura

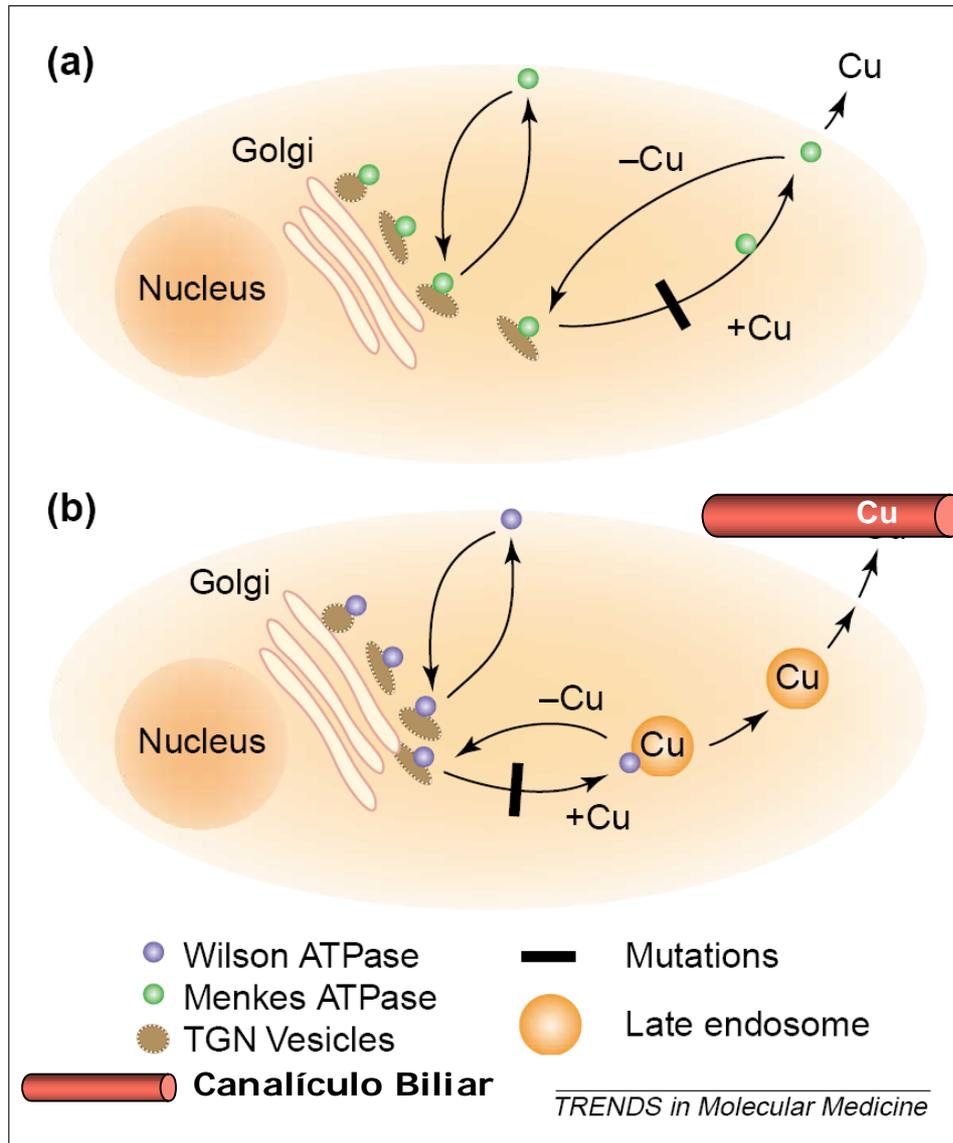


Figura 4. Tráfego intracelular de vesículas secretórias, contendo a Cu(I)-ATPase, induzido pelo Cu em humanos. (A) A ATPase de Menkes, localizada em tecidos extra-hepáticos, é transportada para a membrana plasmática em presença de concentrações elevadas de Cu. A perda de atividade desta enzima causa uma deficiência na disponibilização de Cu no organismo. (B) O mesmo mecanismo ocorre em hepatócitos, sendo que em presença de Cu em excesso a ATPase de Wilson é preferencialmente transportada para endossomos tardios, onde será responsável por transportar o íon para dentro dos canalículos biliares. Mutações nesta enzima podem causar a intoxicação por Cu, uma vez que ele não é eliminado pelo organismo (adaptado de Mercer, 2001).

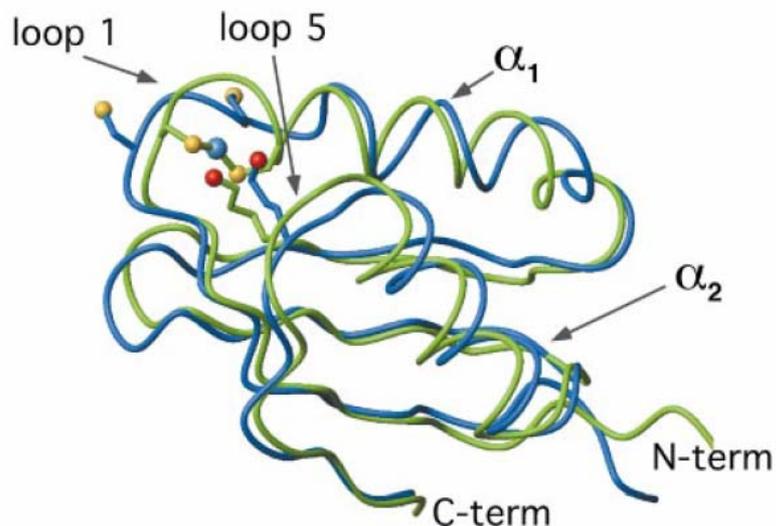


Figura 5: Sobreposição das estruturas de Cu(I).Atx1 (verde) e apo-Atx1 (azul), mostrando o Cu (círculo azul), o enxofre dos resíduos de cisteína 15 e 18 (círculo amarelo) e a amina do resíduo K65 (círculo vermelho). Este último é um dos aminoácidos carregados positivamente que parece ser essencial para a complementaridade de cargas entre a doadora Cu(I).Atx1 e a receptora Ccc2 (ver mais adiante Figura 48). α_1 e α_2 indicam as α -hélices da estrutura da proteína modificadas no processo de ligação/transferência de Cu(I) (extraído de Huffman e O'Halloran, 2001).

48) e favorecida pela complementaridade de cargas entre elas. Atx1 possui diversos resíduos carregados positivamente em sua superfície (Rosenzweig *et al.*, 1999; Arnesano *et al.*, 2001a), enquanto Ccc2 apresenta múltiplos resíduos carregados negativamente (Banci *et al.*, 2001). Os resíduos de lisina K24, K28, K62 e K65 de Atx1 e os resíduos de aspartato D65 e D61, bem como o resíduo de glutamato E60 de Ccc2 parecem mediar interações eletrostáticas importantes para a orientação correta das duas moléculas, conforme demonstrado em aproximações a partir de experimentos com ressonância magnética nuclear (NMR) (Figura 6, Arnesano *et al.*, 2004). Em Ccc2, a coordenação pelo Cu(I) envolve os dois resíduos de cisteína presentes no MBD1 (C13 e C16) (Figura 6). A partir deste momento, Cu(I) passa a sofrer uma série de rápidas reações de troca envolvendo os átomos de enxofre (S) dos resíduos de cisteína em intermediários bi e tri-coordenados (Figura 7), deslocando-se de Atx1 para Ccc2, com base em pequenas diferenças nas constantes de ligação de Cu de cada um dos sítios (Pufahl *et al.*, 1997; Huffman e O'Halloran, 2001).

Embora a complementaridade de cargas possa ser importante para atrair e posicionar a metalochaperona junto à ATPase, estas interações não parecem ser fortes o bastante para garantir a transferência de Cu(I), uma vez que resultados recentes com a ATPase de Menkes (Walker *et al.*, 2004), que possui 6 domínios de ligação de metal, mostram que a complementariedade de cargas não é suficiente para explicar qual destes domínios interage com Atox1 (neste trabalho os autores apresentam o MBD2 como o sítio de interação com Atox1). Além disso, Morin *et al.* (2005) demonstraram, utilizando uma cepa de *S. cerevisiae* deficiente em Atx1 (Δ ATX1), que várias proteínas com um domínio similar de ligação de metal, de origem procariótica ou eucariótica, tendo cargas superficiais predominantemente positivas ou negativas, podem substituir Atx1 na entrega de Cu(I) a Ccc2.

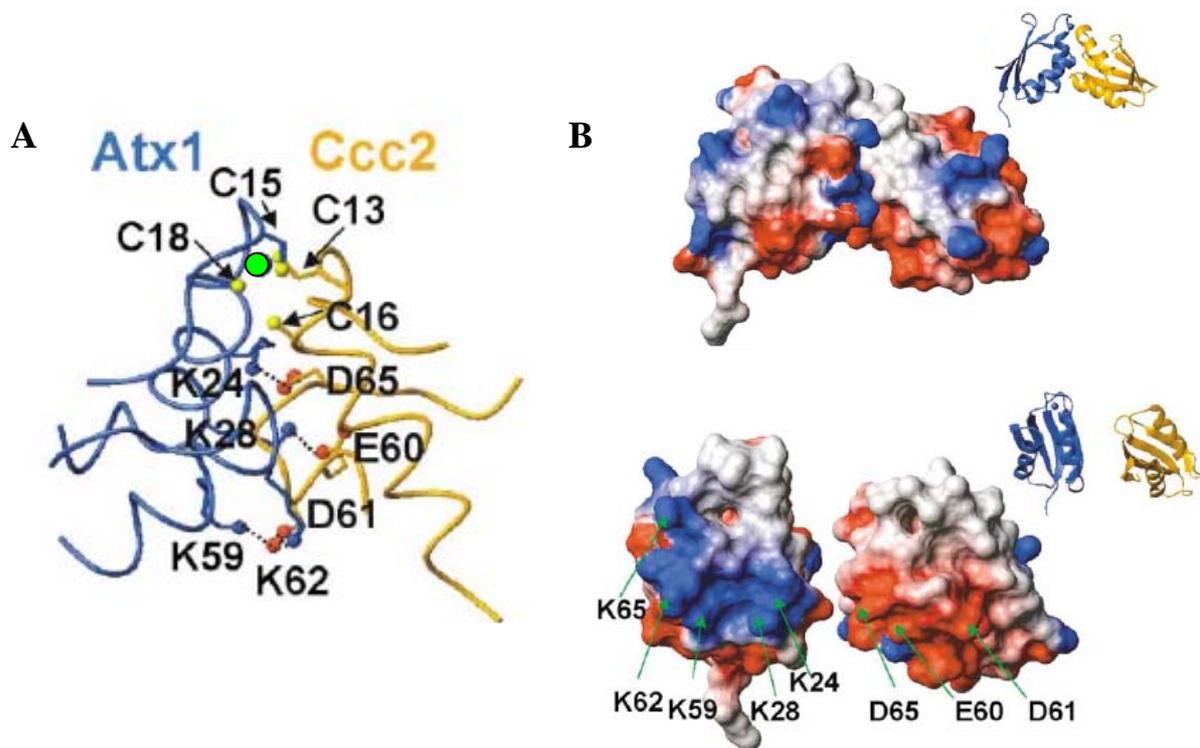


Figura 6. Aminoácidos de Atx1 e Ccc2 possivelmente envolvidos nas atrações eletrostáticas entre as duas proteínas. (A) Complexo formado entre Atx1 (azul) e Ccc2 (laranja). O íon Cu(I) é mostrado como um círculo verde e os resíduos importantes, determinados por cálculos de modelagem molecular, são indicados. (B) Representação dos resíduos carregados na superfície: azul (positivos), vermelho (negativos) e branco (neutros). Em menor escala estão representadas as estruturas de Atx1 (azul) e Ccc2 (laranja) em forma de fita. Na figura inferior, foi realizada uma rotação em 90° das moléculas para mostrar as superfícies de interação (extraído de Arnesano *et al.*, 2004).

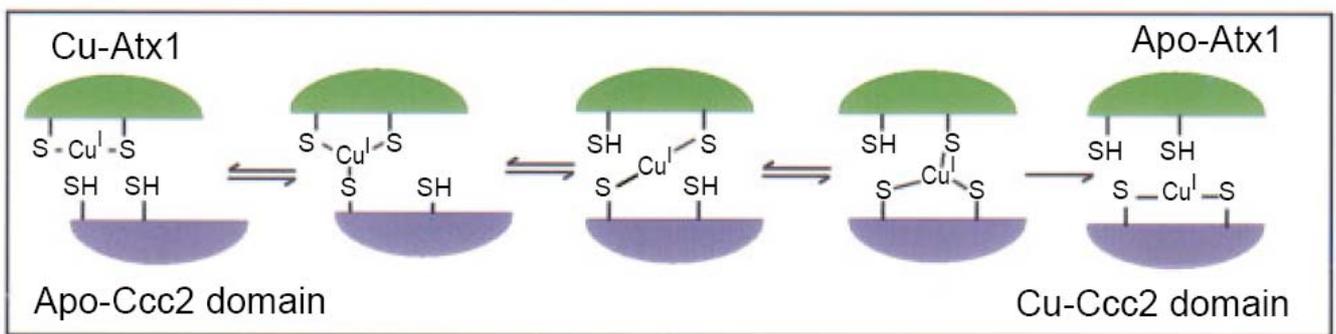


Figura 7. Mecanismo proposto para a transferência de Cu(I) de Atx1 para Ccc2, envolvendo pontes intermediárias de Cu(I) bi e tri-coordenadas. Ver também Figura 48 (extraído de Pufahl *et al.*, 1997).

2.1.1. Conexão das homeostacias de cobre e ferro

A interação entre as homeostacias de Cu e Fe em mamíferos foi primeiramente descrita por Lahey *et al.* na década de 1950. Sabe-se que a maioria das manifestações da deficiência de Fe (p. ex. ataxia locomotora, baixa concentração de hematócritos e função mitocondrial reduzida) pode ser reproduzida em animais com nutrição limitada de Cu. Lee *et al.* (1968) descreveram, em suínos com deficiência em Cu, o desenvolvimento de uma anemia capaz de ser corrigida com a suplementação de Cu na dieta, mas não com Fe. Esta suplementação reduzia o acúmulo de Fe e aumentava a sua absorção nos tecidos, sugerindo que o Cu seria essencial para a internalização e distribuição eficientes de Fe. Em *S. cerevisiae* esta conexão também foi demonstrada, onde Ccc2, a Cu(I)-ATPase de leveduras, desempenha um papel fundamental devido ao fato de ser responsável por transportar o Cu para dentro das vesículas do trans-Golgi, onde estão localizadas as cuproproteínas recém-sintetizadas (Figura 8). Uma destas proteínas é a multicobre oxidase Fet3 (uma proteína com significativa homologia com a ceruloplasmina humana), que é requerida para a internalização de Fe por alta afinidade (Yuan *et al.*, 1995; Stearman *et al.*, 1996) (Figura 8). Os íons Fe(II) ainda podem entrar nas células através do transportador Fet4, de baixa afinidade (Dix *et al.*, 1994), ou por sideróforos (do grego “carregadores de ferro”), que são compostos orgânicos de baixo peso molecular capazes de quelar especificamente Fe. *S. cerevisiae* não sintetiza seus próprios sideróforos, mas é capaz de utilizar aqueles produzidos por outros microrganismos (Philpott *et al.*, 2002).

A descoberta de que um componente essencial do complexo transportador de Fe por alta afinidade em leveduras deve ser suplementado com Cu foi fundamental para explicar a importância deste metal na internalização de Fe. Uma vez transportados para dentro do lúmen do trans-Golgi por Ccc2, os íons Cu(I) ativam apoFet3 (a forma inativa de Fet3) que, em

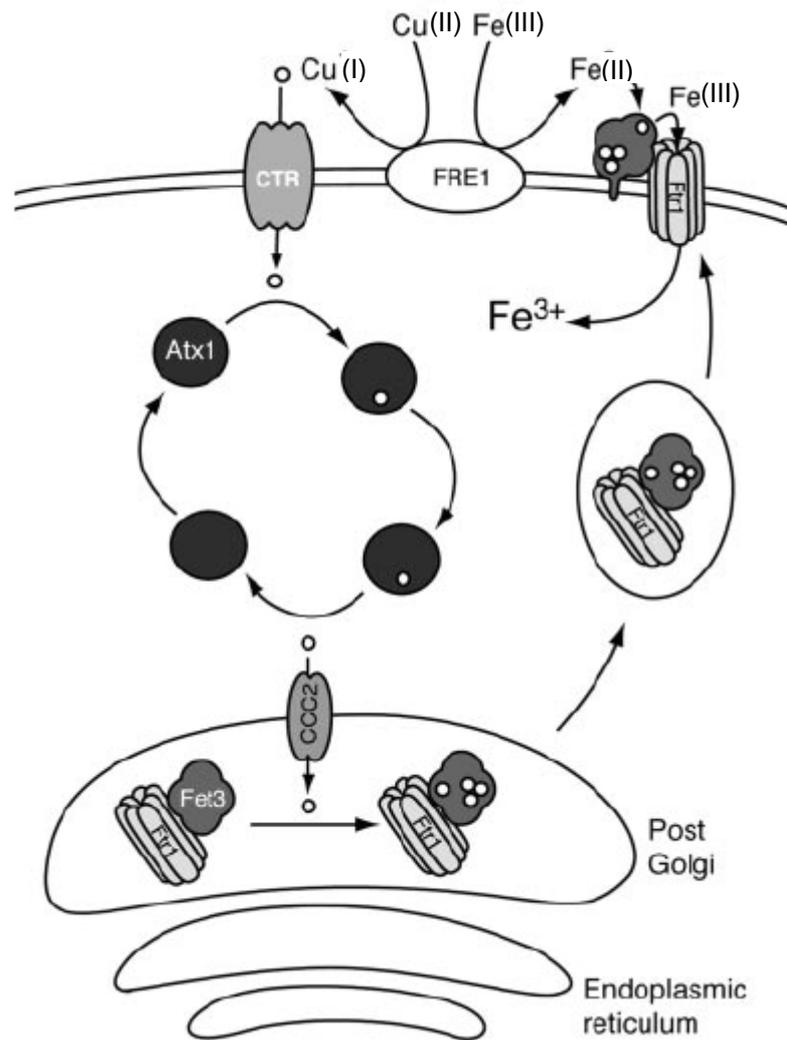


Figura 8. Modelo ilustrando o papel de Ccc2 na interconexão entre as homeostacias de Cu e Fe em *S. cerevisiae*. Após redução do íon Cu(II) no meio extracelular, este é internalizado via transportadores presentes na membrana plasmática (representados por CTR) e rapidamente seqüestrado por fatores presentes no meio intracelular. A figura mostra a ligação de Cu(I) a Atx1, que por sua vez o entrega a Ccc2, presente na membrana dos compartimentos tardios do Golgi ou pós-Golgi. O íon é então transportado pela Cu(I)-ATPase para o lúmen do Golgi, onde é incorporado a apoFet3, ativando-a. A maturação de Fet3P através da via secretória requer Ftr1 (permease de Fe) e ambas atuam no transporte por alta afinidade de Fe na membrana plasmática, para onde o complexo é deslocado. Na membrana plasmática, as metaloredutases são responsáveis por reduzir os íons Cu(II) e Fe(III) para que se liguem às proteínas envolvidas no seu transporte para o meio intracelular (modificado de Taylor *et al.*, 2005).

associação com Ftr1 (permease de Fe de alta afinidade), migra através de vesículas em direção à membrana plasmática (Figura 8). Os íons Fe(III) presentes no meio extracelular são reduzidos a Fe(II) pela metaloredutase Fre(1-7) presente na membrana plasmática e posteriormente oxidados a Fe(III). Este complexo Fe(III).Fet3 é o substrato para a permeabilização facilitada de Fe mediada por Ftr1 (Figura 8). Quando o sistema de captação de Cu por alta afinidade em leveduras é inibido ou eliminado, Fet3 passa existir como uma apoproteína inativa (Stearman *et al.*, 1996). Como consequência, a permease de Fe Ftr1 não está corretamente inserida e acoplada na membrana plasmática, o que resulta em uma deficiência de Fe na levedura, demonstrando a importância do Cu para a captação e mobilização de Fe neste organismo. Este modelo parece se aplicar à essencialidade do Cu para a internalização de Fe em mamíferos, pelo menos em termos das proteínas fundamentais envolvidas no processo (Peña *et al.*, 1999).

Além de Ccc2, alguns estudos vêm demonstrando que a eficiente entrega de Cu a Fet3 requer Gef1, uma proteína homóloga ao canal de cloreto (Cl⁻) regulado por voltagem CIC em mamíferos, que também se encontra na rede trans-Golgi (Greene *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1994; Davis-Kaplan *et al.*, 1998; Gaxiola *et al.*, 1998; Schwappach *et al.*, 1998; Flis *et al.*, 2002). Os canais de Cl⁻ são largamente distribuídos em procariotos e eucariotos e pertencem a diversas famílias. Nos últimos anos, os estudos publicados apontam para a importância desta nova família dos canais de Cl⁻ regulados por voltagem (CLCs). Nove genes da família de CICs foram descritos em mamíferos, que apresentam localização tecido-específica e estão presentes na membrana plasmática (CIC-1), em organelas intracelulares (p. ex. CIC-5, CIC-7) ou apresentam mais de uma localização (p. ex. CIC-2; Jentsch *et al.*, 1999; Lipecka *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2003). O papel de Gef1 na homeostasia vesicular de cátions vem sendo sugerida, já que cepas deficientes no gene GEF1 (Δ GEF1) exibem um defeito no metabolismo de Fe: elas necessitam de suplementação com Fe para crescerem em meio

contendo fontes de carbono não fermentáveis (Greene *et al.*, 1993). Estas mesmas cepas, assim como as cepas Δ CCC2, apresentam um defeito na atividade de Fet3 e não são capazes de crescer em meio sintético (suplementado com glicose) a pH 7,0 (Gaxiola *et al.*, 1998).

Há algumas evidências de que, juntamente com a entrada de Cu nas vesículas do trans-Golgi para ativação de Fet3, é necessário o movimento paralelo de íons Cl^- para a compensação de cargas; assim, em algumas organelas como Golgi e endossomas, a entrada de Cl^- favorece o transporte de H^+ por uma H^+ -ATPase presente nas suas membranas (Xie *et al.* 1989; Al-Awqati, 1995; Kane, 2006). De fato, a principal função dos canais de Cl^- no trans-Golgi seria auxiliar na regulação de pH (Glickman *et al.*, 1983), uma vez que o pH baixo do lúmen do Golgi tem sido implicado numa série de funções, tais como sialilação e sulfatação, bem como na saída de vesículas do trans-Golgi (Al-Awqati, 1995). Mais ainda, através da ligação eletrovalente do Cl^- com Cu(I) (Cu^+), seria possível manter uma alta concentração de Cu(I) livre, não quelado por proteínas. Desta forma, o transporte compensatório de Cl^- via Gef1 favoreceria tanto a acidificação do lúmen quanto a entrega de Cu(I) a Fet3 (Figura 9).

A interconexão entre os metabolismos de Cu e Fe também pode ser evidenciada na adaptação de *S. cerevisiae* a ambientes alcalinos. Estes organismos crescem com maior facilidade em ambientes acídicos do que em ambientes neutros ou alcalinos e a manutenção da acidez no meio extracelular depende basicamente da atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática de leveduras (Pma1), que é a proteína majoritária da membrana e bombeia prótons para o meio extracelular (van der Rest *et al.*, 1995). Esta atividade, além de ser capaz de manter o pH intracelular em $\sim 6,6$ quando o pH extracelular está em 3,5 (Eraso e Gancedo, 1987), gera um gradiente de prótons que possibilita a entrada de muitos nutrientes e cátions (van der Rest *et al.*, 1995; Serrano, 1996).

Diferentes estudos demonstraram um conjunto de genes que são induzidos durante a resposta transcricional ao estresse alcalino (Causton *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2001; Serrano

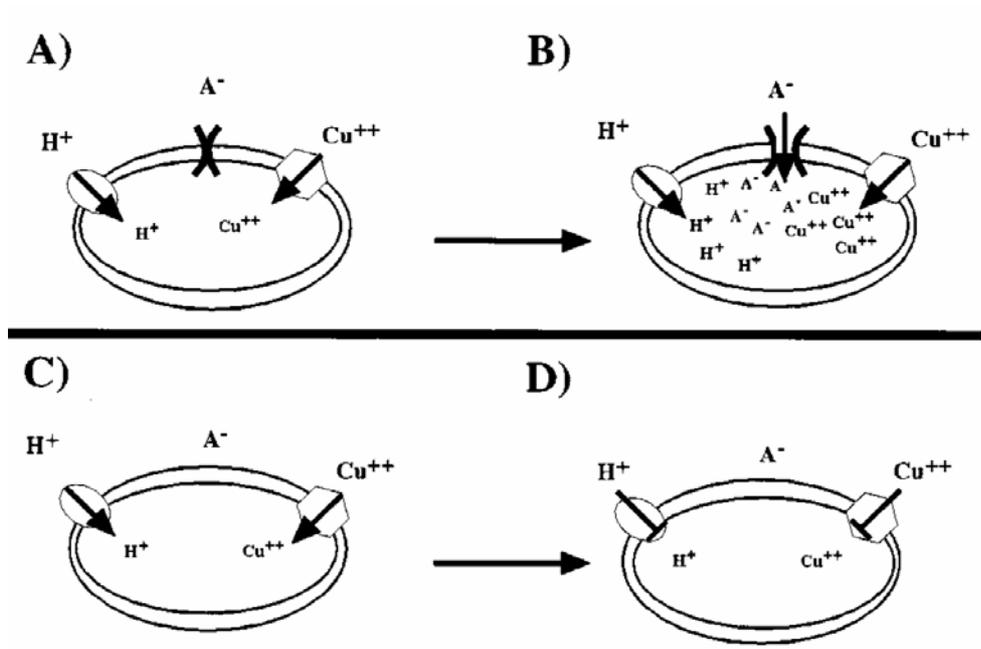


Figura 9. Modelo proposto para explicar o papel de Gef1 na regulação do pH nas vesículas trans-Golgi e a incorporação de Cu(I) (Cu⁺) a Fet3 em leveduras. (A) H⁺ e Cu(I) (Cu⁺) são ativamente transportados para o lúmen do Golgi tardio pela H⁺-ATPase e Ccc2, respectivamente. (B) Quando uma certa voltagem é atingida, Gef1 permite a entrada de íons Cl⁻ que a reduzirão, facilitando o transporte posterior de H⁺ (eletrogênico) e Cu(I) (ainda se desconhece se é eletrogênico). (C) e (D) O transporte de H⁺ e Cu(I) para o interior do Golgi tardio é deficitário nos mutantes deficientes em Gef1 (modificado de Gaxiola *et al.*, 1998).

et al., 2002; Serrano *et al.*, 2004). Utilizando cepas deficientes em vários destes genes, Serrano *et al.* (2004) verificaram que algumas mutações estavam relacionadas a genes envolvidos no metabolismo de Cu e Fe e que, pelo menos em parte, a dificuldade ou impossibilidade de crescimento em pHs alcalinos se devia à atividade reduzida do sistema de transporte de Fe por alta afinidade.

Os metabolismos de Cu e Fe estão também interligados em nível transcricional. Em *S. cerevisiae*, o número de estudos acerca da regulação da expressão de muitos genes envolvidos na captura, distribuição, seqüestro e detoxificação do Cu, bem como no transporte de Fe, vem crescendo a cada ano, embora nem todos os fatores de transcrição sensíveis às variações de concentração destes metais tenham sido bem caracterizados. Nestes organismos a regulação gênica dependente de Fe é mediada por dois fatores de transcrição responsivos a ferro, Aft1 e Aft2 (do inglês “*activator of ferrous transport*”), enquanto o Cu regula a expressão dos fatores transcricionais Ace1, Mac1, Amt1, Crf1, Cuf1 e GRISEA (De Freitas *et al.*, 2003; Rutherford e Bird, 2004). Mac1 e Ace1 são os fatores responsivos a Cu mais bem estudados; Mac1 é induzido em baixas concentrações de Cu e ativa os genes envolvidos no transporte deste metal para dentro da célula (CTR1 e CTR3) (Jungmann *et al.*, 1993; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998), enquanto altos níveis de Cu ativam Ace1, que por sua vez induz a expressão de genes envolvidos no seqüestro do metal - os genes das metalotioneínas Cup1 (Thiele, 1988) e Crs5 (Culotta *et al.* 1994) – além do gene da Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1, Gralla *et al.*, 1991). Cinco dos genes que codificam para a Fe(III)/Cu(II) redutase presente na membrana plasmática, FRE2 a FRE6, são regulados por Aft1, enquanto FRE1 e FRE7 são regulados por Mac1 (Martins *et al.*, 1998; Peña *et al.*, 1999; Rutherford e Bird, 2004). Sabe-se que Aft1 regula ainda a expressão de Ccc2 e Atx1 e que Aft2 parece atuar de forma parecida, embora nenhum fenótipo tenha sido atribuído a uma cepa deficiente neste fator (Rutherford e Bird, 2004).

2.2. Disponibilização de íons cobre para a mitocôndria

Das três vias de distribuição intracelular do Cu por metalochaperonas atualmente conhecidas, a via mitocondrial talvez seja a mais complexa e com maior número de detalhes a serem desvendados. A metalochaperona que tem o papel de disponibilizar o Cu para as mitocôndrias para as funções respiratórias foi caracterizada em 1996 por Glerum *et al.* e é denominada Cox17. Cox 17 é um polipeptídeo de 69 aminoácidos (8 kDa) que está presente tanto no citoplasma (40%) quanto no espaço intermembranar da mitocôndria (60%). A inativação do gene COX17 leva à perda da atividade da citocromo c oxidase, devido à falha na correta interação de suas subunidades. Ainda é limitado o conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos no transporte de Cu através da membrana externa para o espaço intermembranar por Cox17: a população de unidades de Cox17 presente no citoplasma poderia “lançar” o Cu para dentro da mitocôndria, onde seria capturado pelas unidades presentes no espaço intramembranar (Beers *et al.*, 1997) ou então as Cox17 citoplasmáticas seriam proteínas recém-sintetizadas que estariam sendo direcionadas para a mitocôndria.

Em procariotos, uma proteína periplasmática denominada CopB localiza-se na membrana externa e parece estar envolvida na ligação do Cu (Figura 10), enquanto CopC disponibiliza Cu para CopD na membrana interna, que por sua vez é responsável por transportá-lo para o citoplasma (Cha e Cooksey, 1991). É possível, então, que o espaço intermembranar em mitocôndrias de leveduras seja análogo ao periplasma bacteriano e Cox17 funcione similarmente a CopC no direcionamento do Cu neste espaço. De fato, Cox17 disponibiliza Cu para Sco1, uma proteína receptora localizada na membrana interna da mitocôndria, importante para a correta estabilidade estrutural e para a catálise redox pela citocromo c oxidase. Sco1 interage com Cox2, a subunidade polipeptídica da citocromo c oxidase, que contém o sítio Cu_A (Lode *et al.*, 2000). Uma outra proteína presente na

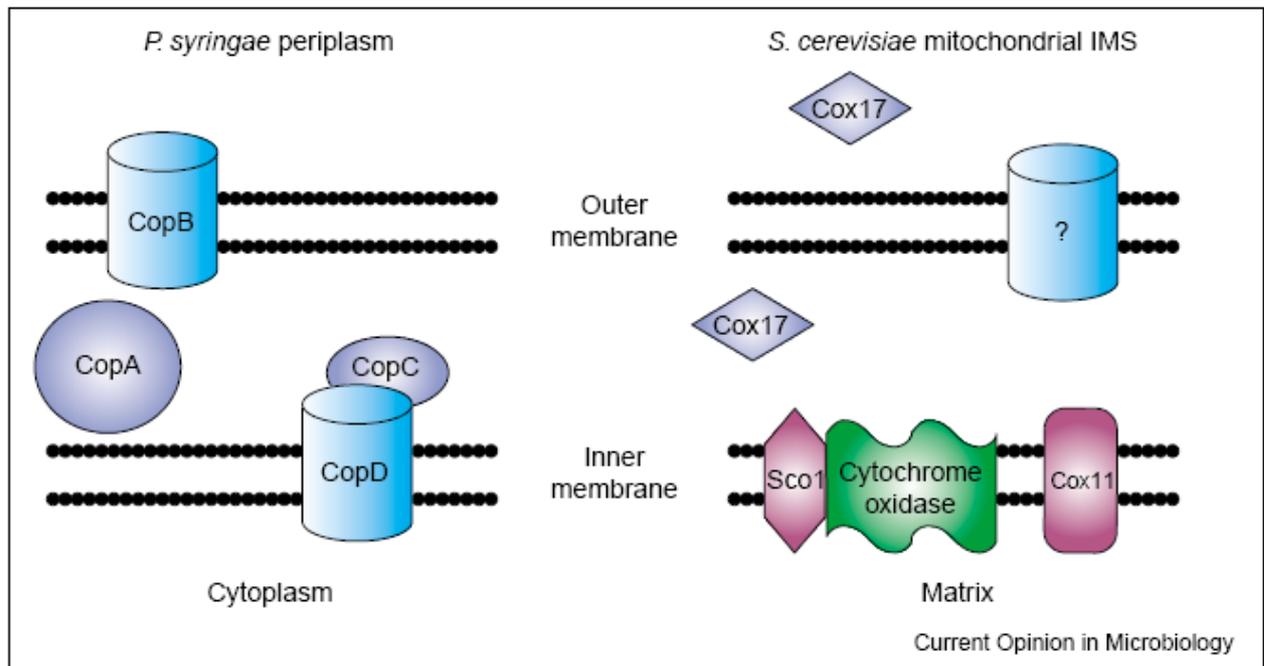


Figura 10. Mecanismo de distribuição de Cu para a mitocôndria em *S. cerevisiae* e comparação com o processo de internalização de Cu no espaço periplasmático em *Pseudomonas syringae*. Em *S. cerevisiae*, a metalochaperona Cox17 entrega o Cu para Sco1, presente no espaço intramembranar da mitocôndria, provavelmente de uma forma similar à interação de CopC e CopD em *P. syringae*. Sco1 transfere então o Cu para a citocromo oxidase (modificado de Rees e Thiele, 2004).

membrana interna mitocondrial, Cox11, pode funcionar de maneira similar a Sco1, mas entregando o Cu para o sítio Cu_B da subunidade Cox1 da citocromo c oxidase (Carr *et al.*, 2002). No entanto, ainda se desconhece qual a metalochaperona responsável por entregar o Cu para Cox11.

2.3. Disponibilização de íons cobre para o citosol

A segunda chaperona de Cu a ser descrita, Ccs, é uma proteína de 70 kDa necessária para entregar o Cu para a superóxido dismutase (Sod1), que é responsável por catalisar a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir do radical superóxido (O₂⁻), protegendo desta forma as células contra os danos oxidativos (Culotta *et al.*, 1997). A interação direta de Ccs com Sod1 resulta na transferência de Cu da metalochaperona para o sítio ativo de Sod1 (Casareno *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 2000). Sod1 está localizada majoritariamente no citoplasma, embora 1-5 % das moléculas estejam presentes no espaço intramembranar das mitocôndrias (Weisiger e Fridovich., 1973; Sturtz *et al.*, 2001). Os resultados obtidos até hoje e descritos na literatura sugerem um modelo em que o motivo CXXC no domínio I de Ccs estaria envolvido na ligação e aquisição de Cu (Rae *et al.*, 2001), enquanto o motivo CXC do domínio III iria transferir o metal do domínio I para o sítio ativo da proteína-alvo, Sod1 (Torres *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2001)

3. Ccc2: uma ATPase do tipo P

O gene CCC2 foi isolado pela primeira vez durante um estudo que visava identificar os genes envolvidos na homeostasia de cálcio (Ca) em *S. cerevisiae* (Fu *et al.*, 1995). A expressão de diferentes genes foi usada na tentativa de se recuperar o fenótipo de sensibilidade ao Ca, característico das cepas deficientes nos genes CSG1 e CSG2 (do inglês

Calcium-Sensitive Growth). Um dos genes capazes de restaurar este fenótipo foi denominado CCC2 pelos autores (do inglês *Ca-sensitive Cross-Complementer*). Este gene foi posteriormente seqüenciado (3015 pb), mapeado (era localizado no cromossomo IV) e verificou-se que a proteína por ele codificada apresentava seqüências características das ATPases, mais especificamente das ATPases do tipo P. Portanto, Ccc2, a enzima central dos estudos desenvolvidos nesta tese, é classificada como uma P-ATPase. Mas o que exatamente isso significa?

3.1. ATPases

As ATPases transportadoras são proteínas integrais de membrana (tanto de membrana plasmática quanto de membranas de diferentes organelas) que acoplam diversos processos biológicos a ciclos de síntese ou hidrólise de ATP, que devem ser finamente regulados de modo a responder à demanda das células, sejam elas eucarióticas ou procarióticas. As ATPases são classificadas em cinco famílias distintas (Pedersen e Carafoli, 1987), separadas de acordo com sua função biológica, com as espécies que transportam e com a estrutura de seus constituintes:

- F₀F₁-ATPases, que compreendem o complexo enzimático localizado na membrana interna de mitocôndrias, na membrana tilacóide de cloroplastos e na membrana citoplasmática de células procarióticas, sendo responsáveis pela síntese de ATP utilizando a energia liberada durante o fluxo de H⁺.
- V-ATPases, localizadas nas membranas de organelas intracelulares, que transportam H⁺ para o seu interior, acidificando-as e ativando diversas enzimas hidrolíticas.
- A₀A₁-ATPases, encontradas em arquea, que apresentam características de V-ATPases e F₀F₁-ATPases, sendo também responsáveis pela síntese de ATP.

- Transportadores ABC (*ATP Binding Cassete*), proteínas de transporte presentes em diferentes tipos de membrana que apresentam dois domínios de ligação para nucleotídeos. Dentro desta grande família encontram-se os transportadores de moléculas hidrofóbicas (Ferreira-Pereira *et al.*, 2003).
- P-ATPases, que são assim denominadas por formarem um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico. Esta família será melhor descrita ao longo da Introdução.

3.1.1. ATPases do tipo P

As ATPases do tipo P são proteínas integrais de membrana ubiqüamente distribuídas, responsáveis pelo transporte ativo de diversos íons contra um gradiente de potencial eletroquímico. Em geral, os genes das P-ATPases são mais variados em eucariotos, uma vez que em *Escherichia coli* apenas 4 destas ATPases foram identificadas, a arquea termofílica *Methanococcus jannaschii* tem apenas uma e algumas bactérias parasitárias parecem não apresentá-las (Kühlbrandt, 2004). Por outro lado, *S. cerevisiae* tem 16 P-ATPases (Goffeau, 1998). As ATPases pertencentes a esta família apresentam as seguintes características em comum (Figura 11) (Lutsenko e Kaplan, 1995):

I) Um domínio catalítico comum, que compreende a grande alça citoplasmática, contendo o sítio de ligação do ATP (domínio N) e o sítio de fosforilação (domínio P). O domínio catalítico contém 3 seqüências de aminoácidos conservados ao longo da evolução, que permitem identificar uma ATPase do tipo P: a) DKTGTL, que contém o resíduo de ácido aspártico que é fosforilado durante o ciclo catalítico; b) MXTGD (onde X é um aminoácido qualquer), localizado após a seqüência DKTGTL, sendo importante para a fosforilação por interagir com o resíduo de lisina desta seqüência durante a catálise (Toyoshima *et al.*, 2000; c)

GDGXNDXP (onde X é um aminoácido qualquer), também necessário para a fosforilação e para a ligação de ATP.

II) Uma seqüência **TGES**, situada na pequena alça citoplasmática (domínio A), cuja função aparentemente é a de interagir com a seqüência MXTGD no domínio N, sendo considerada importante nas etapas de catálise que se seguem à fosforilação (ver Figura 14 mais adiante).

Esta família de ATPases pode ser dividida em três sub-grupos, segundo Lutsenko e Kaplan (1995), com base essencialmente na topologia das proteínas (Figura 11), embora também se diferenciem pelos conjuntos de espécies que transportam:

1) ATPases do tipo P1. Estão envolvidas no transporte de metais pesados essenciais, como o Cu e o Zn, assim como de metais pesados tóxicos, como o Cd e o chumbo (Pb). CadA, a ATPase de *Listeria monocytogenes* transportadora de Cd (Bal *et al.*, 2002), Ccc2, a Cu(I)-ATPase de leveduras (Ccc2) e ATP7A e ATP7B, as Cu(I)-ATPases envolvidas respectivamente nas doenças de Menkes e Wilson, estão inseridas neste grupo.

2) ATPases do tipo P2. Esta classe compreende as ATPases mais conhecidas e estudadas, como a Ca²⁺-ATPase e a Na⁺,K⁺-ATPase. Este grupo pode ser ainda subdividido de acordo com o número de subunidades constituintes. De um lado estão a Na⁺,K⁺-ATPase e a H⁺,K⁺-ATPase, compostas de, respectivamente, três e duas subunidades (α - β - γ e α - β , sendo α a subunidade catalítica e β e γ as subunidades regulatórias). Do outro, as ATPases formadas por apenas uma subunidade, como a Ca²⁺-ATPase, e a H⁺-ATPase de leveduras. São estas ATPases que contribuem para o potencial de membrana nas células eucarióticas e geram gradientes iônicos fundamentais em processos como a contração muscular, a transmissão de impulsos nervosos, o transporte ativo secundário de nutrientes, a modulação de redes de sinalização, a regulação do pH, entre outros.

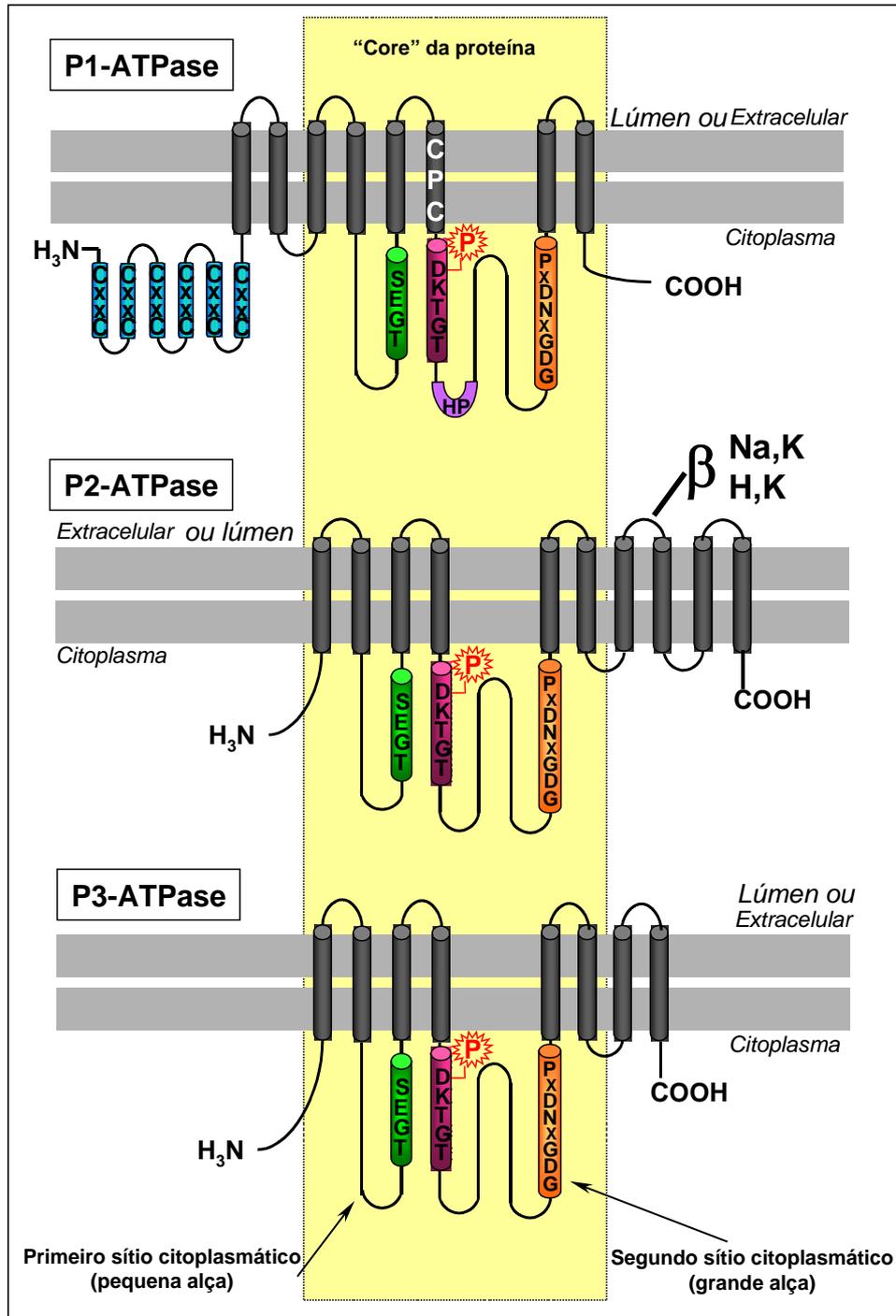


Figura 11. Esquema da topologia na membrana apresentando as características estruturais das ATPases. São mostradas as ATPases de metais pesados (P1-ATPases, representadas pela Cu(I)-ATPase humana), metais não-pesados (P2-ATPases) e as Kdp-ATPases de procariotos (P3-ATPases). A região marcada em amarelo agrupa os seguintes domínios conservados nas P-ATPases: os sítios de atividade “fosfatásica”, de fosforilação e ligação de ATP, respectivamente em verde, rosa e laranja. Em azul, roxo e branco estão representados os domínios característicos das ATPases de metais pesados, correspondendo aos sítios de ligação do metal, o dipeptídeo HP e a sequência CPX altamente conservada no sexto segmento transmembrana (modificado de Lutsenko e Kaplan, 1995).

3) ATPases do tipo P3. São as ATPases Kdp, sistemas enzimáticos complexos capazes de transportar ativamente K^+ para o interior das células em procariotos.

Com base na homologia de seqüências, a família das P-ATPases pode também ser dividida em 5 subfamílias (Figura 12), classificadas de I a V (Kühlbrandt, 2004). Neste caso, as P-ATPases tipo I englobariam as ATPases transportadoras de metais pesados e as ATPases Kdp; as P-ATPases tipo II seriam aquelas ATPases mais bem estudadas, conforme descrito acima; as P-ATPases tipo III são as H^+ -ATPases de membrana plasmática e as Mg^{2+} -ATPases bacterianas; as P-ATPases tipo IV são aquelas envolvidas respectivamente no transporte de lipídios e as P-ATPases tipo V, que ainda não têm descrita uma especificidade de substrato.

Dentro deste vasto conjunto, a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (Serca1a) serve de modelo para o estudo das ATPases do tipo P, uma vez que seu ciclo catalítico é bem conhecido e é a única ATPase do tipo P cuja estrutura cristalina já foi resolvida por difração de raio X (Figura 13; Toyoshima *et al.*, 2000). A obtenção desta estrutura, no estado chamado E1 (ligada a íons Ca^{2+}) e no estado E2 (livre de íons Ca^{2+}) (Toyoshima *et al.*, 2002), foi crucial para a compreensão, pelo menos em parte, dos mecanismos moleculares de catálise e das mudanças conformacionais em curso durante o ciclo catalítico. A revelação mais surpreendente destas estruturas foi a existência de uma longa distância entre os sítios de ligação de ATP e os sítios de fosforilação (25Å) e uma distância ainda maior entre o sítio de fosforilação e o domínio de ligação do metal (Figura 13). Isso indica que durante o ciclo catalítico as mudanças conformacionais que ocorrem podem alterar de forma drástica a estrutura da ATPase, gerando comunicações intramoleculares de relativamente longo alcance que parecem ser cruciais para o acoplamento dos eventos de transporte iônico e hidrólise de ATP.

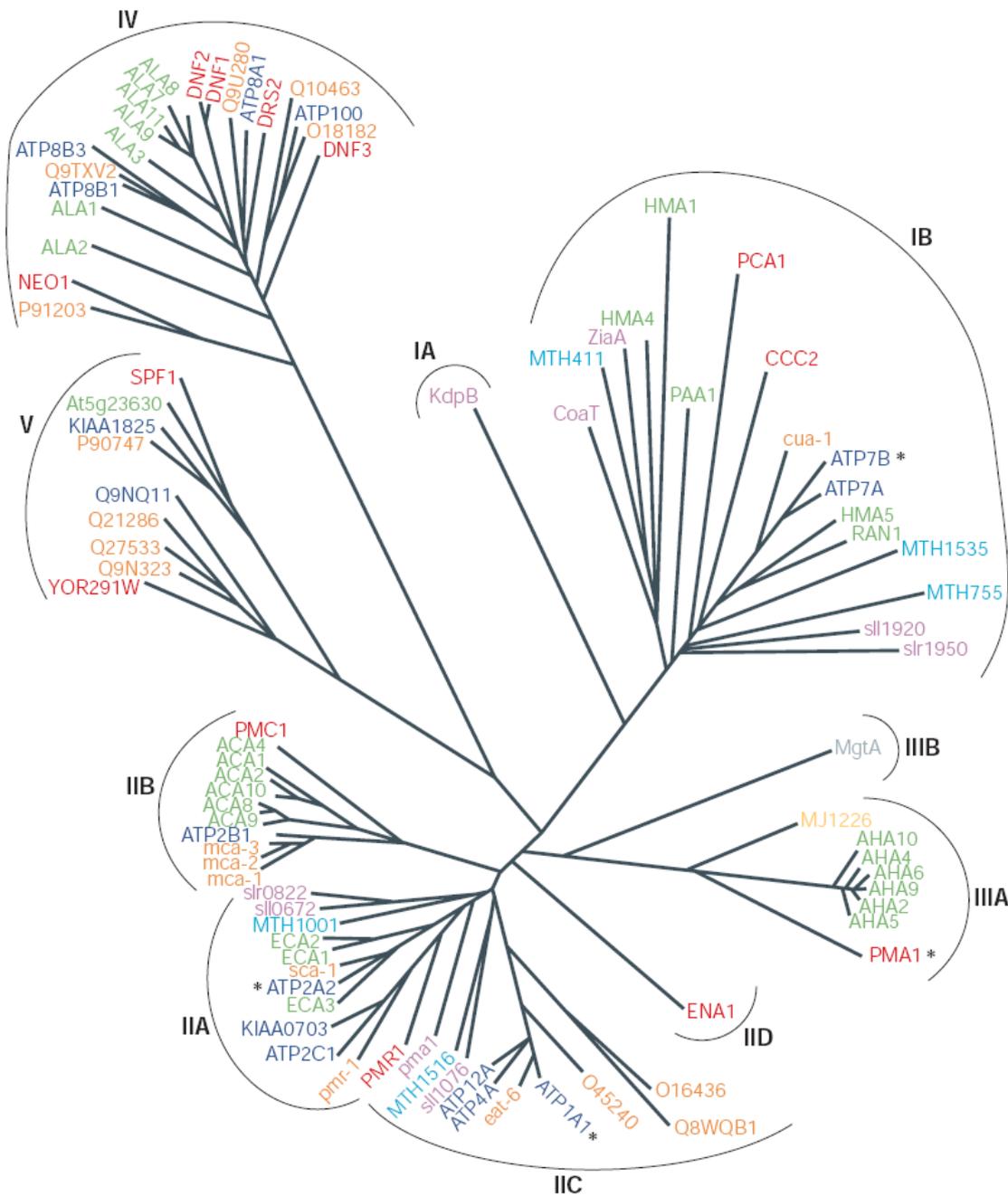


Figura 12. Árvore filogenética das P-ATPases. A figura mostra as subfamílias e os grupos em que elas se dividem, de acordo com a especificidade do substrato, conforme proposto por Axelsen e Palmgreen (1998) (ver também Kühlbrandt, 2004). Os genes representativos de cada subfamília estão coloridos de acordo com a espécie: *Arabidopsis thaliana* (verde); *Caenorhabditis elegans* (laranja); *Escherichia coli* (cinza); *Homo sapiens* (azul escuro); *Methanobacterium thermoautotrophicum* (azul claro); *Methanococcus jannaschii* (amarelo); *Synechocystis* PCC6803 (roxo) e *Saccharomyces cerevisiae* (vermelho).

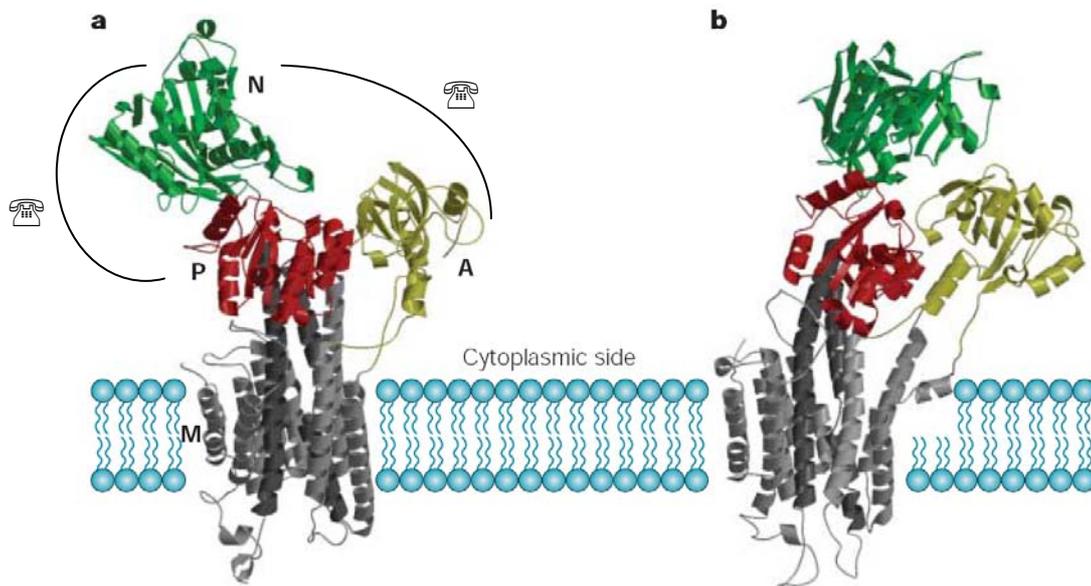


Figura 13. Estruturas cristalizadas da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (a) no estado E1 (ligada a Ca^{2+} ; Toyoshima *et al.*, 2000) e (b) no estado E2 (inibida especificamente por thapsigargina; Toyoshima *et al.*, 2002). São mostrados em vermelho o sítio de fosforilação (P), em verde o sítio de ligação do nucleotídeo (N), em amarelo o sítio considerado como o responsável por acionar os movimentos de N e P durante o ciclo de catálise (A) e em cinza os domínios transmembrana (M). As linhas pretas sugerem que mudanças conformacionais induzidas pela ligação do metal, do nucleotídeo ou de um inibidor podem fazer com que domínios espacialmente separados venham a interagir, como resultado de comunicações intramoleculares de longo alcance (modificado de Kühlbrandt, 2004).

O mecanismo de catálise de Serca1a, descrito em termos de movimentos de domínios e subdomínios na ausência e na presença do cátion ligado, tem contribuído significativamente para a compreensão da catálise por outras ATPases desta grande família, incluindo a Cu(I)-ATPase. Por isso, as transições entre as duas estruturas mostradas na Figura 13 serão descritas brevemente a seguir.

A comparação das duas estruturas permitiu identificar as mudanças de conformação provocadas pela dissociação dos íons Ca^{2+} , acompanhando a transição do estado Ca_2E_1 a E_2 :

- a) Uma rotação de 90° do domínio N e uma inclinação de 30° do domínio P, em relação à membrana; nesta configuração “fechada”, a fosforila γ do ATP se aproxima mas não chega a alcançar o resíduo de fosforilação D351;
- b) Uma rotação horizontal de 110° do domínio A, que se aproxima do domínio P;
- c) Um rearranjo de seis das dez hélices (M1 a M6).

As ligações entre as hélices e o domínio P permitem compreender como as mudanças de conformação devidas à dissociação do Ca^{2+} ocorrem entre os sítios membranares e os domínios citoplasmáticos. A inclinação de 30° do domínio P está diretamente ligada ao movimento das hélices transmembranares. As hélices M1 e M2 parecem estar, dessa forma, governadas pelo domínio P. Através de estudos utilizando-se um análogo não-hidrolizável de ATP, o TNP-AMP, verificou-se que a aproximação dos domínios N e P parece ser importante não apenas para a apresentação do ATP, mas também para possibilitar a fosforilação pelo nucleotídeo (Hua *et al.*, 2002).

Recentemente, Toyoshima e Mizutani (2004) obtiveram a estrutura cristalizada de Serca1a ligada a um análogo de ATP, um íon Mg^{2+} e dois íons Ca^{2+} . Neste estado, a ligação do análogo de ATP reorganiza os três domínios citoplasmáticos A, N e P, antes bastante separados, aproximando os domínios N e P. O domínio A sofre uma inclinação de forma que uma das hélices transmembrana se move para fechar a entrada citoplasmática dos sítios de

ligação dos íons Ca^{2+} , promovendo a sua oclusão antes de serem liberados dentro do retículo sarcoplasmático. Provavelmente, um mecanismo de transporte semelhante – com as especificidades conferidas pelos diferentes aminoácidos e pela espécie transportada – possa existir em outras ATPases, como Ccc2.

3.1.2. ATPases do tipo P1

Como já mencionado anteriormente, as ATPases do tipo P1, subfamília à qual pertence Ccc2, são responsáveis pelo transporte de metais pesados e encontradas nos mais diversos organismos, desde bactérias até o homem. Elas possuem um papel essencial na homeostasia destes metais, pelo seu transporte para dentro e fora da célula, assim como pela sua dispersão entre os diferentes compartimentos intracelulares. Além de possuírem regiões em comum com as outras ATPases do tipo P, as P1-ATPases apresentam quatro características que as distinguem das demais:

a) Uma região N-terminal com um a seis motivos CXXC, onde X é um aminoácido qualquer. A presença destes domínios torna a extremidade N-terminal destas ATPases mais longa do que as demais. Graças à grande concentração de resíduos de cisteína, cada um deles pode servir para a ligação a metais pesados, sendo por isso denominados *Metal Binding Domains* (MBDs) (ver Figura 11);

b) Uma seqüência CPC no sexto segmento transmembranar, importante para a atividade ATPásica, provavelmente porque o resíduo de prolina está envolvido na geometria de coordenação do sítio de ligação do metal e porque cada uma destas cisteínas desempenha um papel específico na catálise (Lowe *et al.*, 2004; ver Figura 14);

c) uma seqüência HP situada na grande alça citoplasmática, igualmente importante para a atividade ATPásica, provavelmente por contribuir para o correto enovelamento da

proteína. A mutação mais comum encontrada nos pacientes com a doença de Wilson é a modificação do resíduo de histidina por um resíduo de glutamato (Thomas *et al.*, 1995);

d) uma topologia de 8 segmentos transmembranares, sendo quatro localizados andas da pequena alça, dois entre a pequena e a grande alças e dois após a grande alça citoplasmática (ver Figura 11).

O mecanismo catalítico das Cu(I)-ATPases, incluindo a formação do intermediário fosforilado, ainda é pouco conhecido. A maioria dos trabalhos na literatura refere-se ao estudo conformacional da região N-terminal destas ATPases e interação desta com as metalochaperonas de Cu. Em outros trabalhos, foram construídas e clonadas Cu(I)-ATPases com mutações sítio-dirigidas para se investigar a importância catalítica de resíduos que se encontram alterados em pacientes afetados pelas doenças de Menkes ou Wilson (Forbes e Cox, 1998; Voskoboinik *et al.*, 2001). O primeiro trabalho a propor um ciclo catalítico para a Cu(I)-ATPase foi realizado pelo nosso grupo (Figura 14; Lowe *et al.*, 2004), com base no estudo de resíduos estruturalmente conservados, localizados principalmente nos segmentos transmembrana de Ccc2, como é o caso do domínio CPC (ver Figura 11), envolvido no transporte de Cu(I). Poucos estudos foram publicados acerca da regulação da atividade das Cu(I)-ATPases por mecanismos pós-traducionais, como por exemplo, a fosforilação Cu(I)-dependente de resíduos (Vanderwerf *et al.*, 2001; Voskoboinik *et al.*, 2003). Nestes estudos, foi sugerida a participação de diferentes proteínas kinases, cujas atividades podem ou não ser reguladas por Cu, assim como a relação entre a localização da Cu⁺-ATPase e a fosforilação em presença deste metal.

O estudo realizado nesta tese destinado a abordar um papel até agora não descrito de Ccc2 e de seus domínios específicos a alterações ácido-base, encontra-se inserido num amplo projeto do qual participam não apenas integrantes do nosso laboratório e o grupo formado pelos colegas franceses do Laboratório de Biophysique Moléculaire et Cellulaire (CEA –

Grenoble, França), com o qual mantemos colaboração desde 1998. A crescente facilidade de manipulação genética de *S. cerevisiae* e o conhecimento cada vez mais ampliado de sua biologia e genética contribuíram para que esta levedura se tornasse um bom modelo para o estudo da homeostasia de cobre em mamíferos e, conseqüentemente, das doenças de Menkes e Wilson. Além disso, *S. cerevisiae* apresenta um complexo e ainda não completamente elucidado conjunto de mecanismos que permitem sua adaptação a elevações discretas de pH acima da neutralidade (Calahorra *et al.*, 1998; Causton *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002; Giaver *et al.*, 2002). Embora existam algumas poucas evidências do papel de transportadores passivos de Cu e Fe na adaptação de *S. cerevisiae* a pHs alcalinos não existem informações sobre o papel de domínios específicos da molécula de Ccc2 neste processo. No fungo patogênico *Candida albicans*, mudanças no pH do meio ambiente servem como um potente sinal para diferenciações morfológicas entre as formas de levedura e de hifa, essenciais para o desenvolvimento da virulência (Davis, 2003). Neste organismo, a via do gene RIM101, ativada em resposta a mudanças de pH, regula a expressão de diversos genes envolvidos na homeostasia de Fe (Bensen *et al.*, 2004). Portanto, a compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas celulares dos microrganismos (patogênicos ou não) a essas mudanças de pH torna-se interessante para desvendar como e quais processos surgiram ao longo da evolução para confrontá-las.

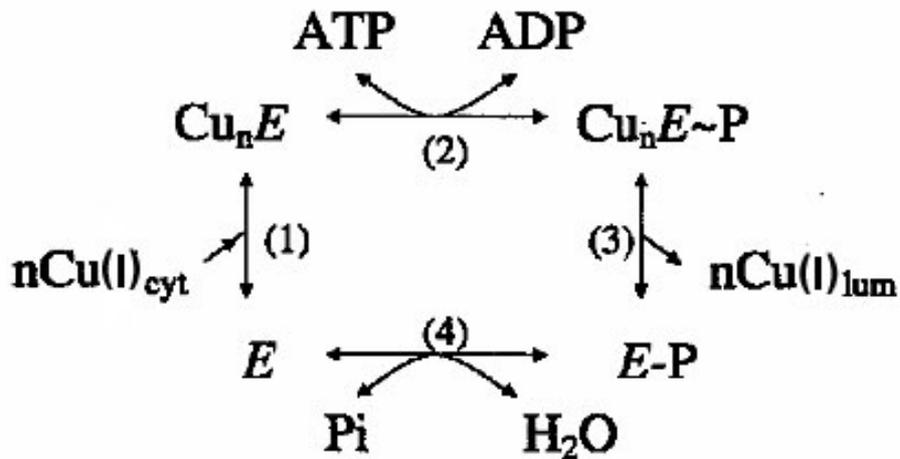


Figura 14. Modelo proposto para o ciclo catalítico de Ccc2. Em (1) ocorre a ligação de Cu(I) na região citoplasmática da enzima (transferido por Atx1, ver Figuras 6, 7 e 48), ocasionando uma mudança conformacional que permite a ligação de ATP. O metal é ocluído quando ocorre a transferência da fosforila do ATP para o resíduo D do domínio DKTGT (2). Após a formação do intermediário fosforilado de alta energia em D627, a sua energia potencial química decai na transição para E-P e, simultaneamente, ocorre o transporte do Cu(I) para o lúmen do Golgi (3). A enzima é finalmente desfosforilada (liberação de Pi) e o ciclo recomeça (modificado de Lowe *et al.*, 2004).

II. OBJETIVOS

A primeira hipótese de trabalho formulada no início desta tese foi a de que a superexpressão de *Ccc2* (Cu(I)-ATPase) no seu habitat natural, bem como de mutantes na região N-terminal (onde se localizam conservados domínios de ligação de Cu(I), permitiria obter células apropriadas para estudos fisiológicos de crescimento e para correlacionar estes eventos com a catálise por *Ccc2 in vitro*. Estes estudos poderiam, por sua vez, contribuir para a compreensão do papel de domínios moleculares específicos da Cu(I)-ATPase em processos metabólicos e de transporte em *Saccharomyces cerevisiae*, modelo implantado em nosso laboratório para o estudo estrutural, funcional e regulatório de ATPases transportadoras de Cu(I) em eucariotos.

A segunda hipótese de trabalho, de que a Cu(I)-ATPase poderia contribuir em processos adaptativos frente a alterações ácido-base, surgiu da observação de que o o crescimento de *S. cerevisiae* em meios de pH crescente, dependia das características estruturais de sua região N-terminal.

Estas duas hipóteses iniciais levaram então à formulação dos seguintes objetivos específicos:

1. Demonstrar e caracterizar a atividade Cu(I)-ATPásica em leveduras transformadas com o gene *CCC2* de forma a superexpressar a enzima.
2. Determinar o comportamento cinético da Cu(I)-ATPase em função de valores crescentes de pH, mimetizando *in vitro* as condições de estresse alcalino para as células de leveduras.
3. Investigar o papel na catálise pela Cu(I)-ATPase *in vitro* da região N-terminal da enzima.
4. Investigar o papel da região N-terminal no endereçamento intracelular da Cu(I)-ATPase em células de leveduras.

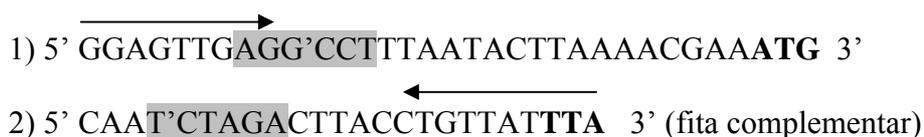
5. Investigar se os genes que codificam para Cu(I)-ATPases mutadas em domínios específicos da região N-terminal complementam o mutante Δ CCC2 em condições limitantes ou não de cobre (Cu) e ferro (Fe).
6. Investigar a resposta ao estresse alcalino de cepas de leveduras Δ CCC2 transformadas com os genes de Cu(I)-ATPases mutadas em diferentes domínios funcionais da região N-terminal.
7. Estudar o papel de domínios funcionais específicos na interconexão entre a homeostasia de Cu e Fe em situações de estresse alcalino.
8. Investigar a associação entre processos de transporte mediados pela Cu(I)-ATPase e o metabolismo ácido-base.
9. Propor um modelo de interação entre fluxos de Cu, Fe, Cl^- , HCO_3^- e H^+ .

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

1.1. Gene CCC2

A obtenção do gene CCC2 (ver seqüência na Figura 15) foi realizada por Martine Cuillel e colaboradores no Laboratório de Biophysique Moléculaire et Cellulaire (*Comissariat à l'Energie Atomique* – CEA, Grenoble, França), conforme descrito por Lowe e col. (2004), de forma a possibilitar a posterior superexpressão da proteína Ccc2 ou de seus mutantes em leveduras. O gene CCC2 foi recuperado a partir do DNA genômico da cepa S288C de *Saccharomyces cerevisiae* através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se os *primers* direcionados a seqüências do genoma da levedura contendo os códons de iniciação (ATG) e término (TAA) da transcrição (Figura 15):



As seqüências grifadas em cinza são os sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas StuI (seqüência 1) e XbaI (seqüência 2), que foram utilizadas para clonagem do gene CCC2 no plasmídeo bacteriano pSP72 (Promega, Charbonnières, França). O vetor pSP72 contém os promotores SP6 e T7 da RNA polimerase, presentes nas extremidades da única região de clonagem (MCS, do inglês “*Multi Cloning Sites*”), que inclui os sítios XhoI, PvuII, HindIII, SphI, PstI, Sall, AccI, XbaI, BamHI, SmaI, KpnI, SacI, EcoRI, ClaI, EcoRV e BglII. A presença do gene de resistência à ampicilina contribuiu para a escolha deste vetor, pois os clones obtidos após a transformação podem ser facilmente selecionados através da adição

deste antibiótico ao meio de cultura. O plasmídeo pSP72, contendo o gene CCC2 (pSP72.CCC2) foi utilizado para a obtenção dos mutantes da Cu(I)-ATPase de leveduras indicados na Figura 16. Todos os plasmídeos utilizados nesta tese, contendo os genes CCC2, bem como seus mutantes, também foram construídos no Laboratório de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, com o qual, como mencionado na Introdução, nosso laboratório mantém uma colaboração científica desde 1998. Todas as construções foram confirmadas por seqüenciamentos de DNA efetuados pela empresa Genome Express (Meylan, França).

As técnicas de digestão e de modificação enzimáticas pelas enzimas de restrição, de precipitação de DNA, de separação eletroforética em gel de agarose e de ligação de fragmentos de DNA foram efetuadas segundo os protocolos padrão (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley). As extrações de DNA de géis de agarose foram realizadas com o kit Gene-Clean[®] (Q-BIOgene, Illkirch, França). Todas as demais técnicas e metodologias empregando os materiais descritos nesta seção estão descritas em detalhes no item Métodos.

1.2. Cepa de levedura deficiente no gene CCC2 (Δ CCC2)

A obtenção de uma cepa de leveduras deficiente no gene CCC2 fez-se necessária para expressão de um grande número de cópias da enzima nativa (procedimento essencial para estudos bioquímicos e caracterização funcional) e para a análise funcional dos diferentes mutantes mostrados na Figura 16. A estratégia utilizada para a obtenção desta cepa foi a inserção do gene URA3 no gene CCC2.

As cepas selvagens de *S. cerevisiae* não possuem o gene URA3, responsável pela síntese de uracila e, portanto, não são capazes de crescer em meio de cultura que não contém esta base nitrogenada. A disrupção do gene CCC2 na cepa W3031a (cujos marcadores

Figura 15. Sequência de nucleotídeos do gene CCC2 e aminoácidos de Ccc2. Estão realçados os aminoácidos do domínio de ligação de nucleotídeo (Domínio N) (■), do domínio de fosforilação (Domínio P) (■) e dos segmentos transmembrana (■), além dos códons de início e fim da transcrição (■). Estão coloridos e sublinhados os aminoácidos dos sítios característicos de todas as ATPases do tipo P (em rosa), aqueles característicos das ATPases do tipo P1 (em azul escuro) e os correspondentes destes em Ccc2 (em vermelho).

ATGAGAGAAGTGATACTTGCTGTACATGGAATGACATGCAGCGCTGTACTAATACAATCAATACGCAGTTACGAGCT 78
M R E V I L A V H **G M T C S A C** T N T I N T Q L R A 26
C X X C

TTAAAGGGTGTAACAAAATGTGATATTAGTTTAGTGACTAATGAGTGCCAGGTGACATACGATAACGAGGTTACCGCC 156
 L K G V T K C D I S L V T N E C Q V T Y D N E V T A 52

GATTCTATTAAGGAAATTATAGAGGATTGTGGATTGACTGTGAGATACTAAGAGATTCTGAAATTACAGCCATAAGT 234
 D S I K E I I E D C G F D C E I L R D S E I T A I S 78

ACGAAGGAAGGACTACTGAGTGACAAGGTATGACCTGTGGGTCTTGTGTTTCTACAGTCACCAAACAAGTGGAAGGC 312
 T K E G L L S V Q **G M T C G S C** V S T V T K Q V E G 104
C X X C

ATTGAGGGTGTGAAATCGGTAGTCGTTTCCTTGGTAACGGAAGAGTGCCATGTTATTTATGAACCGTCCAAGACAACG 390
 I E G V E S V V V S L V T E E C H V I Y E P S K T T 130

CTAGAAACCGCCAGAGAAAATGATTGAAGACTGTGGATTGACTCAAATATTATATGGATGGCAACGGGAATGCAGAC 468
 L E T A R E M I E D C G F D S N I I M D G N G N A D 156

ATGACCGAAAAACGGTGATCTTGAAAGTAACTAAGGCTTTCGAGGACGAATCCCACTCATACTTTCTTCAGTAAGC 546
 M T E K T V I L K V T K A F E D E S P L I L S S V S 182

GAAAGGTTTCAATTTTTGTAGACCTAGGTGAAAATCGATAGAAAATTTCTGATGATATGCACACACTCACCATAAAA 624
 E R F Q F L L D L G V K S I E I S D D M H T L T I K 208

TACTGTTGTAACGAACCTCGGCATTAGAGATTTATTGAGGCACCTTGAGAGGACCGGATATAAATTCAGTATTTTCC 702
 Y C C N E L G I R D L L R H L E R T G Y K F T V F S 234

AATTTAGATAATACTACCCAGTTAAGGCTTCTCTCTAAAGAGGACGAGATAAGATTCTGGAAAAAACAAGCATAAAA 780
 N L D N T T Q L R L L S K E D E I R F W K K N S **I K** 260

TCCACCCTTTGGCTATAATATGTATGCTATGTATATGATTGTCCCTATGATGTGGCCAACAATTGTTTCAGGACCGC 858
S T L L A I I C M L L Y M I V P M M W P T I V Q D R 286

ATATTCCCTTACAAAGAACCTCCTTTGTTAGAGGTCTGTTCTACAGAGATATTTGGGTGTAATATTGGCAAGCTAT 936
 I F P Y K E T S F V R G L F Y R D I **L G V I L A S Y** 312

ATTGAGTTTTCAGCGTTGGTTTTTACTTTTTACAAGGCAGCATGGGCATCTTTAAAGCACGGTTCAGGAACCATGGATACA 1014
I Q F S V G F Y F Y K A A W A S L K H **G S G T M D T** 338

CTAGTTTGTGTTTCCACTACTTGTGCATACACATTTTCTGTGTTTTCTTTAGTTCACAATATGTTCCATCCCTCAAGT 1092
L V C V S T T C A Y T F S V F S L V H N M F H P S S 364

ACTGGCAAACCTCCAAGGATCGTTTTTCGACACATCAATCATGATCATTTTCATATATTTCCATCGGGAAATATTGGAA 1170
 T G K L P R I V F **D T S I M I I S Y I S I G K Y L E** 390

ACTTTAGCTAAATCACAACATCAACCGCACTTTCTAAATTAATTCAGCTCACTCCATCGGTGTGTTCAATTATATCT 1248
T L A K S Q T S T A L S K L I Q L T P S V C S I I S 416

GACGTGGAGCGGAATGAAACCAAGGAAATCCCATAGAATTATTGCAAGTGAACGATATAGTGGAGATTAACCGAGG 1326
 D V E R N E T K E I P I E L L Q V N D I V E I K P G 442

ATGAAAATCCTGCTGATGGCATATAACAAGAGGTGAATCTGAAAATTGACGAGTCGTTAATGACAGGCGAATCCATT 1404
 M K I P A D G I I T R G E S E I D E S L M **T G E S** I 468

TTGGTGCCCAAGAAAACGGTTTTCCGGTTATTGCTGGTTCTGTTAATGGACCTGGACATTTCTACTTCAGAACTACT 1482
 L V P K K T G F P V I A G S V N G P G H F Y F R T T 494
 ACCGTTGGGGAGGAAACTAAATTAGCAAATATTATCAAGGTAATGAAAGAAGCACAAATTGAGTAAAGCTCCCATTTCAG 1560
 T V G E E T K L A N I I K V M K E A Q L S K A P I Q 520
 GGGTATGCAGATTATTTAGCCTCTATTTTTGTTCCGGGGATCCTAATTTTGGCAGTATTGACTTTCTTTATTTGGTGT 1638
 G Y A D Y L A S I F V P G I L I L A V L T F F I W C 546
 TTTATTTTAAACATCTCGGCTAATCCTCCCGTCGCTTTCACCGCAAATACTAAGGCTGATAATTTTTTTATTTGCTTA 1716
 F I L N I S A N P P V A F T A N T K A D N F F I C L 572
 CAAACTGCTACTTCTGTTGTCATCGTCGCATGCCATGTGCATTGGGACTTGCCACGCCGACTGCTATAATGGTGGGT 1794
 Q T A T S V V I V A C P C A L G L A T P T A I M V G 598
 C X C
 ACAGGGGTTGGAGCTCAGAATGGTGTCTTAATAAAGGGCGGAGAAGTATTGAAAAATTCAATAGTATTACTACTTTT 1872
 T G V G A Q N G V L I K G G E V L E K F N S I T T F 624
 GTTTTTGATAAAACAGGTACCTTAACTACAGTTTTATGGTTGTGAAAAAGTTCCTTAAAGATTCAAATGGGTTGGA 1950
 V F D K T G T L T T G F M V V K K F L K D S N W V G 650
 AACGTGGATGAAGACGAAGTTCTCGCCTGTATAAAAGCAACGGAATCCATTAGTGACCATCCAGTTTCGAAAGCAATT 2028
 N V D E D E V L A C I K A T E S I S D H P V S K A I 676
 ATACGTTATGTGATGGTTGAACTGTAATAAGGCTTTAAATGCCGTTGTTTTAGAAAGCGAATACGTGCTTGGAAAAG 2106
 I R Y C D G L N C N K A L N A V V L E S E Y V L G K 702
 GGAATAGTCTCAAAGTGTCAAGTTAATGAAATACTTATGATATTTGTATTGGGAACGAGGCGCTGATTTTGGAGGAT 2184
 G I V S K C Q V N G N T Y D I C I G N E A L I L E D 728
 GCATTAATAAAATCCGGATTATTAACAGTAATGTGACCAAGGAAACACTGTATCATACGTATCAGTAAACGGGCAT 2262
 A L K K S G F I N S N V D Q G N T V S Y V S V N G H 754
 GTGTTTGGCTTGTTCGAGATTAATGATGAAGTTAAACATGATTTACGCAACAGTTCAGTATCTACAAAGAAATGGA 2340
 V F G L F E I N D E V K H D S Y A T V Q Y L Q R N G 780
 TATGAAACGTATATGATTACTGGCGATAATAACTCAGCAGCAAAAAGAGTCGCTAGAGAAGTAGGTATAAGCTTCGAA 2418
 Y E T Y M I T G D N N S A A K R V A R E V G I S F E 806
 AATGTTTACAGCGATGTGTACCCACAGGCAAATGTGATCTCGTAAAAAAATCAAGATAAAGAAGGTAATAACAAG 2496
 N V Y S D V S P T G K C D L V K K I Q D K E G N N K 832
 GTTGCTGTTGTTGGCGATGGCATTAAACGACGCTCCCGCTTTAGCACTGAGTGATCTAGGTATTGCCATTTCAACAGGT 2574
 V A V V G D G I N D A P A L A L S D L G I A I S T G 858
 ACGGAGATTGCTATTGAAGCAGCTGATATTGTTATACTGTGCGGTAATGATCTGAATACTAATAGTTTGGAGGACTG 2652
 T E I A I E A A D I V I L C G N D L N T N S L R G L 884
 GCCAACGCCATCGATATTTCACTAAAAACGTTCAAAGAATAAAAGCTGAATTTGTTCTGGGCACCTTTGCTATAATATA 2730
 A N A I D I S L K T F K R I K L N L F W A L C Y N I 910
 TTCATGATTCGGATTGCTATGGGTGTGCTCATTCTTGGGGCATAACTCTTCTCCAATGCTCGCCGGTTTAGCGATG 2808
 F M I P I A M G V L I P W G I T L P P M L A G L A M 936
 GCATTGAGCTCGGTGAGTGTGCTTCTAAGTTCATTGATGTTGAAGAAGTGGACTCCACCGGATATTGAATCACATGGG 2886
 A F S S V S V V L S S L M L K K W T P P D I E S H G 962
 ATTTGAGTTTCAAGTCCAAATTTTCGATTGGGAATTTTTGGTCAAGGCTTTTTTCTACGGGGCTATTGCAGGTGAG 2964
 I S D F K S K F S I G N F W S R L F S T R A I A G E 988
 CAAGACATAGAATCACAGGCCGGACTAATGTCAAACGAAGAAGTCTTGTA 3015
 Q D I E S Q A G L M S N E E V L STOP 1004

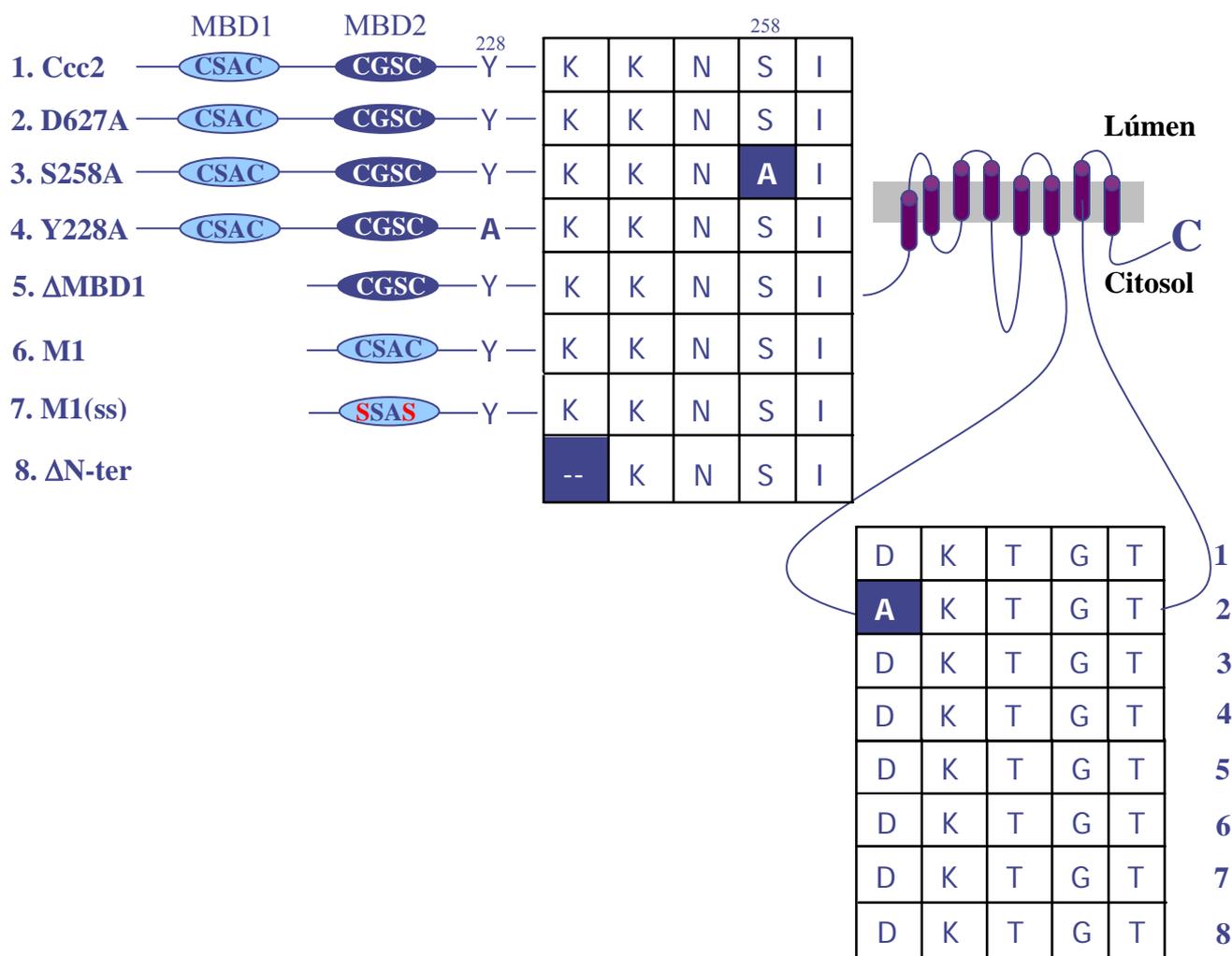


Figura 16. Esquema representativo de uma molécula de Ccc2 e dos mutantes construídos. A região N-terminal da enzima selvagem (contendo as elipses azuis que representam os MBDs com os domínios CXXC), o resíduo de tirosina Y228, os cinco últimos aminoácidos da região N-terminal imediatamente anteriores ao primeiro segmento transmembrana e a seqüência DKTGT de fosforilação estão ampliadas em relação à figura dos segmentos transmembrana dispostos na membrana do Golgi (ver Figura 11). Os aminoácidos alterados nos mutantes D627A, S258A e Y228A estão em negrito. O mutante ΔMBD1 é aquele que teve o MBD1 (elipse em azul claro) removido. O mutante M1 é aquele em que o MBD2 (elipse em azul escuro) foi removido e substituído por MBD1. O mutante M1(ss) é idêntico à molécula M1, embora com as mutações C13S e C16S (indicadas em vermelho). O mutante ΔN-ter é aquele que teve a região N-terminal completamente removida, com exceção da seqüência KNSI antes do primeiro segmento transmembrana. A seqüência completa de aminoácidos da região N-terminal dos constructos 1, 5 e 6 encontra-se na Figura 17. A seqüência do painel da direita mostra o domínio de fosforilação das diferentes moléculas na grande alça citoplasmática.

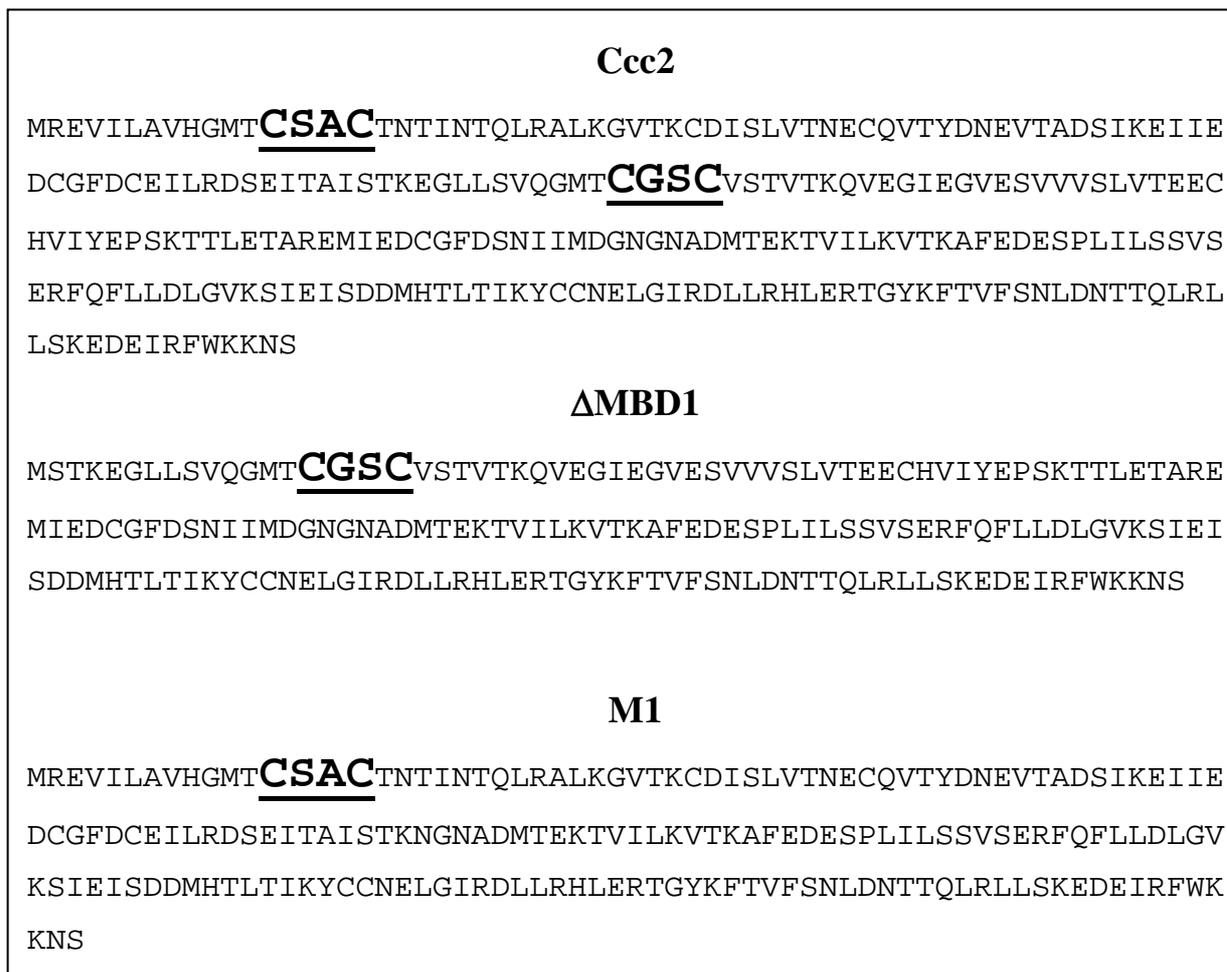


Figura 17. Seqüência de aminoácidos da região N-terminal das construções 1 (Ccc2), 5 (ΔMBD1) e 6 (M1) esquematizadas na Figura 16. Em ΔMBD1, a seqüência M1 a A76 (contendo o MBD1) foi removida e foi inserida a mutação I77M. Em M1, a seqüência M1 a K80 segue diretamente para N152 (tendo sido removido o MBD2). As seqüências em evidência referem-se ao domínio CXXC do MBD1 (CSAC) e do MBD2 (CGSC).

genômicos são: *ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3112 trp1-1 ura3-1*) de *S. cerevisiae* foi realizada conforme descrito por Lowe e colaboradores (2004). A quebra do gene é bastante estável, pois há uma recombinação na região correspondente no genoma da levedura (Figura 18), o que permite que as células sejam utilizadas durante várias gerações sem risco de o fenótipo ser revertido. As células obtidas possuem o gene CCC2 interrompido e são precursoras, portanto, de uma população de células que não são capazes de produzir a proteína Ccc2, mas capazes de crescerem em meio de cultura carente de uracila.

Para obtenção da interrupção do gene CCC2, primeiramente este gene foi interrompido modificando-se o plasmídeo pSP72.CCC2 com uma inserção do gene URA3. Isto foi feito pela excisão do gene URA3 do plasmídeo doador YDpU com a enzima BamHI e inserção deste fragmento de 1154 pb no único sítio para BamHI presente no gene CCC2 (Figura 19). O novo fragmento de 2549 pb contendo o gene URA3, compreendido entre os sítios SpeI e HindIII (Figura 19), foi utilizado para transformar a cepa W303 de *S. cerevisiae*. A transformação da levedura foi realizada pelo método de transformação utilizando-se o acetato de lítio (Kuo e Campbell, 1983), como será descrito mais adiante. A identificação de clones positivos foi realizada após plaqueamento das cepas transformadas em meio seletivo sem adição de uracila (ver composição dos meios de cultura mais adiante).

1.3. Plasmídeos de expressão em leveduras

Para expressão de Ccc2 e seus mutantes em leveduras durante a realização desta tese foram utilizados os plasmídeos YEplac181 (YEp) e pCEN. O plasmídeo de expressão YEp (plasmídeo epissomal de leveduras) é um plasmídeo derivado do círculo de 2 μ , que tem um comprimento de cerca de 6 Kb e existe nas células das leveduras em número elevado, o que o torna um bom vetor de expressão.

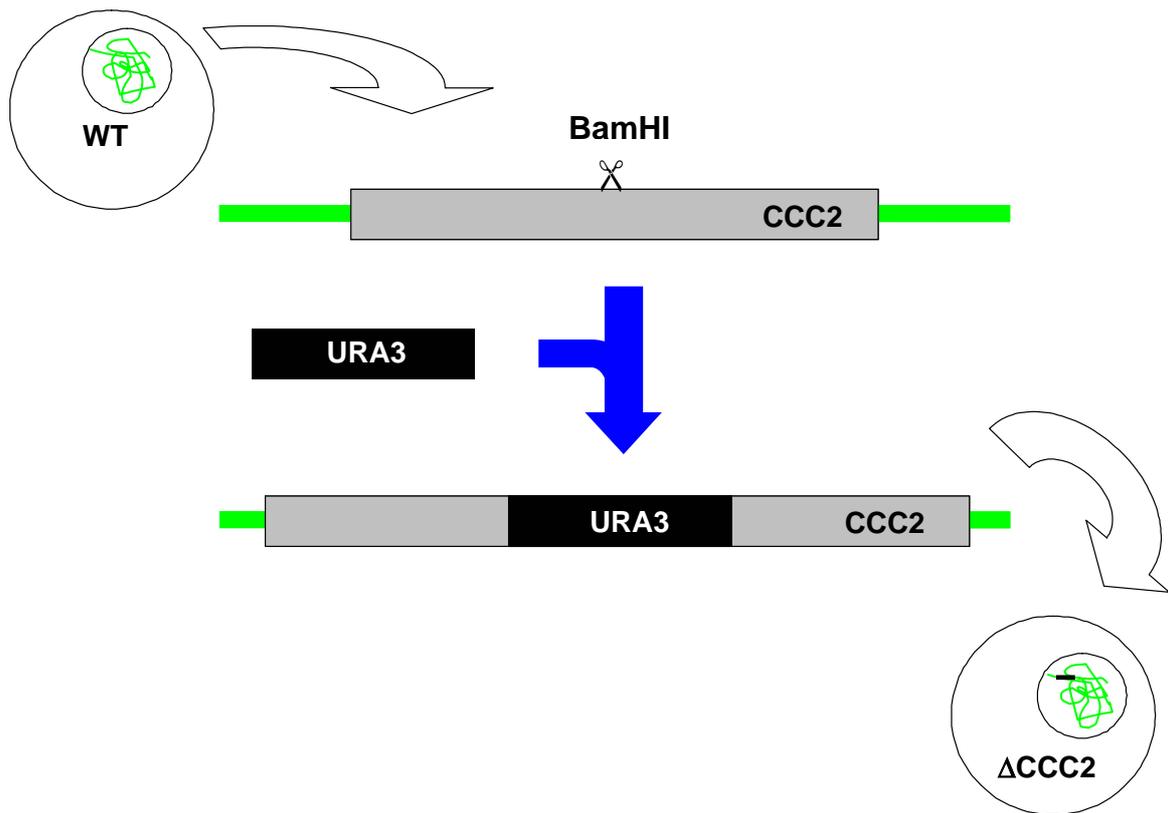


Figura 18. Esquema da interrupção do gene *CCC2* na cepa W303 de leveduras. O gene *URA3* foi obtido do plasmídeo doador YDpU utilizando-se a enzima de restrição *Bam*HI, cujos sítios foram utilizados para inserção do gene no genoma (em verde) da levedura selvagem (WT). A cepa resultante deste procedimento, contendo a inserção *URA3* (linha preta) foi denominada Δ *CCC2*.

O plasmídeo YEp utilizado nesta tese (Figura 19) possui a região promotora do gene PMA1 (que codifica para a H⁺-ATPase de leveduras), a região terminadora ADC1, origem, o gene de resistência à ampicilina (AMP R, o que permite a seleção de clones após amplificação em *Escherichia coli* – ver adiante), além do marcador de seleção LEU2 (que codifica para a β-isopropil malato desidrogenase, uma das enzimas envolvidas na conversão do ácido pirúvico em leucina), o que permite às células que expressam este plasmídeo a síntese de leucina em meio de cultura carente deste aminoácido. Os plasmídeos YEp contendo o gene CCC2 ou os seus mutantes (Figura 16) foram utilizados nos experimentos de viabilidade celular e também para a obtenção de frações microsomais de membrana de leveduras contendo um grande número de cópias de Ccc2 e do mutante D627A.

O plasmídeo pCEN ou plasmídeo centromérico (Figura 20) é um vetor que tem a particularidade de ter uma zona CEN, que foi retirada de um centrômero dos cromossomos de levedura. Portanto, este vetor comporta-se como um cromossomo durante a divisão celular e cada célula filha herda uma única cópia do plasmídeo. Estes plasmídeos foram utilizados para expressão de Ccc2 ou de alguns de seus mutantes (S258A, Y228A, M1(ss) e ΔN-ter) fusionados ao epítipo GFP (ver seção Resultados e Discussão), tendo sido empregados tanto nos experimentos de viabilidade celular quanto nos experimentos de microscopia confocal.

Tanto os plasmídeos YEp quanto os plasmídeos pCEN contendo os mutantes mencionados foram obtidos a partir do plasmídeo de expressão bacteriana pSP72, conforme mencionado anteriormente.

1.4. Frações de membrana de células *Sf9* contendo Ccc2 e seus mutantes

A expressão de Ccc2 e de seus mutantes (D627A e ΔN-ter) foi realizada em células *Sf9* (células do inseto *Spodoptera frugiperda*) de modo a se obter uma grande quantidade de

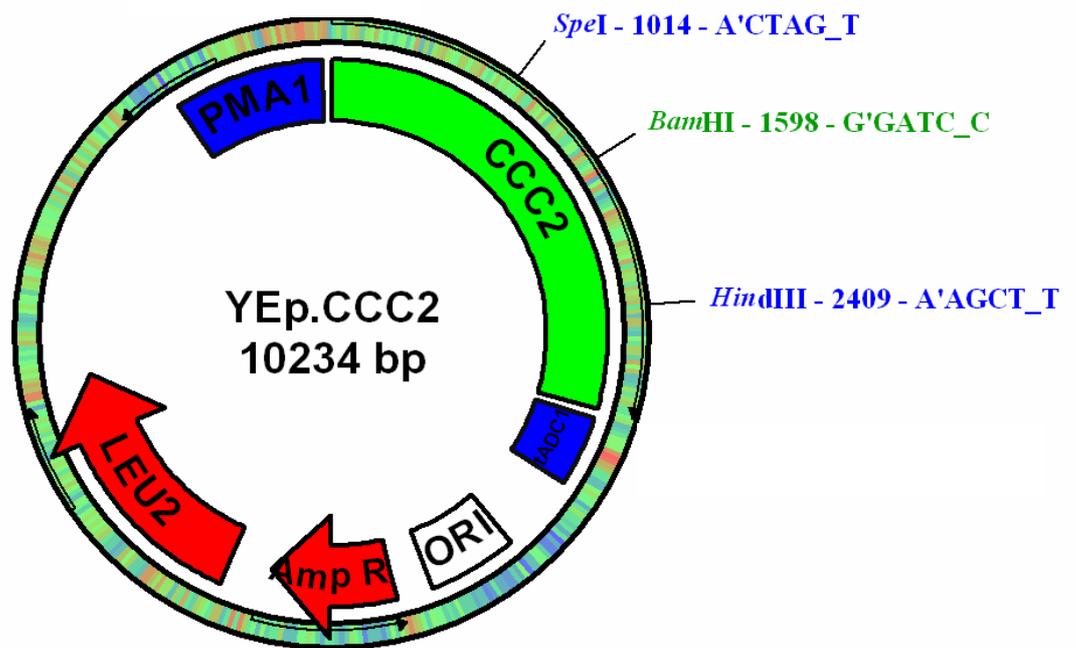


Figura 19. Mapa de restrição do plasmídeo YEp contendo o gene CCC2 (criado com auxílio do *software* pDraw32 v.1.1.88 – <http://www.aacalone.com>). A figura mostra o gene CCC2 (em verde) contendo o sítio de restrição para a enzima BamHI, utilizado para a inserção do gene URA3, além dos sítios para as enzimas SpeI e HindIII, utilizados para a clonagem e obtenção da cepa Δ CCC2, conforme descrito no texto. São indicados ainda o promotor PMA1 e a a região terminadora (em azul), os genes LEU2 e de resistência à ampicilina (em vermelho) e a origem de replicação (em branco).

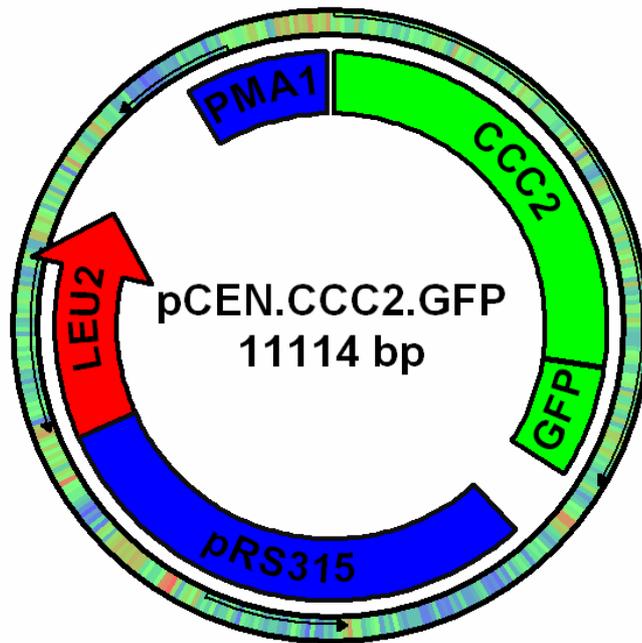


Figura 20. Mapa de restrição do plasmídeo pCEN contendo o gene CCC2 fusionado a GFP (criado com auxílio do *software* pDraw32 v.1.1.88 – <http://www.acaclone.com>). A figura mostra o gene CCC2 fusionado ao gene GFP (em verde), o promotor PMA1, o gene LEU2 e uma seqüência do plasmídeo centromérico pRS315 (Sikorski e Hieter, 1989).

proteína, com a vantagem de ser um tipo celular com baixa expressão de ATPases (o que favorece os estudos de fosforilação e de hidrólise de ATP). Para esta expressão, foi utilizado o sistema baculovírus/células *Sf9* (Gibco Bac-toBac™ Baculovirus Expression System), amplamente utilizado para a expressão de proteínas heterólogas (Smith *et al.*, 1983). Neste sistema, os genes de interesse foram clonados em plasmídeo pFastBac (planejado especificamente para este tipo de expressão) a partir do plasmídeo pSP72. O plasmídeo obtido foi então inserido em cepas DH10Bac de *E. coli*, que possuem o DNA viral do baculovírus (bacmídeo). Uma vez dentro da célula bacteriana, ocorre a integração do gene de interesse ao DNA viral (bacmídeo recombinante). Foi realizada então a extração do DNA viral (de alto peso molecular) das células bacterianas e este foi então transfectado para as células *Sf9*, onde passou a ser sintetizada a proteína de interesse (no caso, a Cu(I)-ATPase de leveduras ou os mutantes mencionados acima), juntamente com as proteínas necessárias para a replicação do vírus. Este sistema já foi utilizado para o estudo de outras proteínas transmembrana no laboratório de Biophysique Molléculaire et Cellulaire, como a Cd²⁺-ATPase de *Listeria monocytogenes* (Bal *et al.*, 2001) e a Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático (Miras *et al.*, 2001), bem como para o estudo da ATPase de Wilson (Tsikovskii *et al.*, 2002; Vanderwerf e Lutsenko, 2002).

Uma vez obtidas as células *Sf9* que expressam Ccc2 ou os mutantes D627A e Δ N-ter, passou-se então à preparação de frações de membrana destas células, onde estariam presentes as enzimas. Estas frações foram preparadas essencialmente como descrito em Miras *et al.* (2001), exceto pela eliminação de CaCl₂ e pela adição de ditioneitol (DTT) 5 mM (Lowe *et al.*, 2004). Culturas de 120 mL (contendo 2×10^6 células/mL) foram infectadas com os baculovírus recombinantes contendo os genes das proteínas acima mencionadas. Três dias depois as células foram centrifugadas a $500 \times g$ por 20 min. O precipitado foi então ressuspenso em tampão de extração contendo TES-KOH 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 100 mM,

KCl 200 mM, glicerol 40% (v/v), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, DTT 5 mM e coquetel de inibidores de proteases (1 μ L/mL – Calbiochem, San Diego, CA, USA). As células foram então centrifugadas por 40 min a $110000 \times g$, suspensas em 2 mL de tampão de extração e homogeneizadas num Potter-Elvehjem. O precipitado final foi suspenso em solução contendo tampão MOPS-KOH 100 mM (pH 7,0), glicerol 40% (v/v) e DTT 5 mM e estocado a $-80^{\circ} C$.

As frações de membrana de células *Sf9* foram utilizadas no experimento em que se avaliou o efeito de variações de pH sobre a atividade Cu(I)-ATPásica (Figura 35) e nos experimentos de fosforilação por ATP (Figura 37), devido à impossibilidade de realizá-los com frações de membranas de leveduras pelas razões que serão descritas mais adiante. Todos estes experimentos com membranas derivadas de células *Sf9* foram realizados durante as missões de trabalho no laboratório francês em diferentes períodos entre 2003 e 2005.

1.5. Meios de Cultura

Durante o desenvolvimento desta tese, foram utilizados diferentes meios de cultura para o crescimento das cepas selvagem (W303) e as células Δ CCC2 de *S. cerevisiae* transformadas para expressar as proteínas esquematizadas na Figura 16. Estes meios têm composição apropriada para o fornecimento de nutrientes e para expor as células a concentrações extracelulares diferentes de Cu^{2+} e Fe^{2+} , com ou sem uracila, em função da transformação realizada (ver item 2.1 e Tabelas 2 – 5).

1.5.1. Meio Rico (YD). Preparado com extrato de levedura 1% (p/v) (Q. Biogene) e glicose 2%.

1.5.2. Meio *Drop out base* (DOB, Q. Biogene – também denominado meio mínimo). Contendo o meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) 1,7 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L e glicose 20 g/L. A formulação do meio YNB está mostrada na Tabela 2. O meio DOB era ainda suplementado com uma mistura (*Complement Supplement Mixture* – CSM 0,067 g/L, Q. Biogene) contendo diferentes aminoácidos e bases nitrogenadas (sem leucina e uracila, os quais eram adicionados segundo a necessidade; ver legendas das figuras em Resultados e Discussão). A formulação do CSM é mostrada na Tabela 3.

1.5.3. Meios para os testes de complementação em presença de ferrozina. Preparados com meio YNB (sem adição de Cu e Fe, Bio101, Inc) com as concentrações de ferrozina (um quelante de ferro), CuSO_4 e $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ indicados na Tabela 4 (ver item 2.7). Para as concentrações de Cu^{2+} e Fe^{2+} livres, ver Tabela 5.

Tabela 2. Formulação do meio YNB (fonte: Q. Biogene). As concentrações de CuSO_4 e FeCl_2 em destaque estão mostradas também na forma μM e serão exploradas mais adiante durante a discussão dos resultados (ver também Tabela 5).

Componentes	mg/L
<i>Sais</i>	
Fosfato de potássio monobásico	1000
Sulfato de magnésio	500
Cloreto de sódio	100
Cloreto de cálcio	100
<i>Vitaminas</i>	
Biotina	0,002
Pantotenato de cálcio	0,4
Ácido fólico	0,002
Inositol	2
Niacina	0,4
PABA	0,2
Piridoxina, HCl	0,4
Riboflavina	0,2
Tiamina, HCl	0,4
<i>Elementos traços</i>	
Ácido bórico	0,5
Sulfato de cobre (CuSO_4)	0,04 (0,3 μM)
Iodeto de potássio	0,1
Cloreto férrico (FeCl_2)	0,2 (1,6 μM)
Sulfato de manganês	0,4
Molibdato de sódio	0,2
Sulfato de zinco	0,4

Tabela 3. Composição do meio CSM. Leucina (100 mg/L) e/ou uracila (20 mg/L) foram adicionados ao meio conforme a necessidade (ver legendas das figuras em Resultados e Discussão).

Componentes	mg/L
Adenina	10
Arginina	50
Ácido aspártico	80
Histidina	20
Isoleucina	50
Lisina	50
Metionina	20
Fenilalanina	50
Treonina	100
Triptofano	50
Tirosina	50
Valina	140

Tabela 4. Composição química dos meios de cultura utilizados nos ensaios de complementação em presença de ferrozina. Os meios são constituídos de meio sintético YNB (*Yeast Nitrogen Base*) sem adição de Cu e Fe (Bio101, Inc.), ao qual foram adicionados bases nitrogenadas e aminoácidos, com exceção de leucina. As concentrações dos sais de Cu (CuSO_4) e Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) estão indicadas. As setas indicam baixa (\downarrow) ou alta (\uparrow) concentração do metal. Para as concentrações de Cu^{2+} e Fe^{2+} livres ver Tabela 5.

	Meio 1 (Ferrozina) ($\downarrow\text{Cu}$ e $\downarrow\text{Fe}$)	Meio 2 (Cobre) ($\uparrow\text{Cu}$ e $\downarrow\text{Fe}$)	Meio 3 (Ferro) ($\downarrow\text{Cu}$ e $\uparrow\text{Fe}$)
Ferrozina	1 mM	1 mM	1 mM
CuSO_4	1 μM	500 μM	1 μM
$\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50 μM	50 μM	350 μM

Tabela 5. Concentrações dos íons Cu^{2+} e Fe^{2+} livres nos diferentes meios de cultura descritos na Tabela 4 e no item 1.5

Meio	Cu^{2+} , ^a	Fe^{2+} , ^b	
	μM	μM	pM
Nº 1 (Ferrozina)	$\sim 0,1^c$		$\sim 5^d$
Nº 2 (Cobre)	50^e		$\sim 5^d$
Nº 3 (Ferro)	$\sim 0,1^c$	30^d	
Meio rico	$\sim 10^e$	$> 10^e$	
Meio <i>Drop out</i>	$0,3^f$	$1,6^f$	

^a O Cu em solução aquosa de CuSO_4 é divalente e, na ausência de redutores, encontra-se no estado de oxidação Cu(II). Quando este Cu(II) é misturado com Na_2SO_3 em solução (condição das determinações de atividade Cu(I)-ATPásica *in vitro*), rapidamente transita para o estado Cu(I), o que permite sua ligação a Ccc2 sem a mediação de redutases (Silvester *et al.*, 1991).

^b Parte do íon Fe encontra-se na forma Fe^{3+} em solução aquosa (de Souza-Barros *et al.*, 2006).

^c Não há valores de constante de formação K_a para o complexo Cu^{2+} .Ferrozina₂. As determinações titimétricas ou espectrofotométricas desta constante na presença de Fe são incertas (Kundra *et al.*, 1974; Anusien e Ojo, 1977). Com base na reatividade seletiva para Cu de outros compostos que contêm o grupamento ferroina $-\text{N}=\text{C}-\text{C}=\text{N}-$, as concentrações de Cu^{2+} livre foram estimadas através de cálculo numérico por aproximações sucessivas empregando constantes $10^6 < K_a < 10^8$.

^d Concentrações calculadas como em ^(c), empregando-se uma $K_a = 1,57 \times 10^{16}$ (Garza-Ulloa *et al.*, 1980).

^e Valores estimados com base nas concentrações de Cu e Fe, a partir de uma suspensão de extrato de levedura granulado 1% (p/v).

^f Calculados com base nas indicações do fabricante. Em ^(e) e ^(f) não foram considerados os acréscimos decorrentes da presença dos metais na água.

2. Métodos

2.1. Amplificação em *E. coli* dos plasmídeos de expressão em leveduras

Quando necessário, foi realizada a amplificação (para a obtenção de um maior número de cópias) dos plasmídeos YEp e pCEN contendo os genes CCC2 ou os seus mutantes, utilizando-se a cepa DH10B de *E. coli*.

2.1.1. Transformação das células de *E. coli*

Antes da transformação, os plasmídeos a serem amplificados foram dialisados contra água deionizada ultrapura e as células de *E. coli* foram submetidas a sucessivas lavagens com a mesma água para remoção de sal, que poderia interferir no processo de eletroporação. Células de *E. coli* eletrocompetentes (alíquotas de 40 a 50 µL em glicerol 10% v/v congeladas a -70° C) foram cedidas pelo laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ. Estas células foram aplicadas em cubeta de 0,1 cm de espessura entre os eletrodos e submetidas a uma descarga elétrica de cerca de 5 ms com voltagem de 1,80 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω em eletroporador Gene Pulser® II (Bio-Rad) em presença de uma alíquota dos plasmídeos a serem amplificados. Imediatamente após o choque, as células foram ressuspensas em meio SOC estéril (triptona 2% p/v, extrato de levedura 0,5% p/v, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, Glicose 20 mM, pH 7,0) por 1 h a 37° C sob agitação de 200 rpm e plaqueadas em meio LB (meio Luria Bertani – triptona 1% p/v, extrato de levedura 0,5% p/v e NaCl 170 mM) sólido (com 1,5% p/v de agar), contendo ampicilina 100 µg/mL (Sambrook *et al.*, 1989) para seleção dos clones positivos. As placas da transformação foram incubadas em estufa a 37° C, por cerca de 20 h.

2.1.2. Seleção dos clones

Como mencionado anteriormente, a seleção dos clones que receberam plasmídeo no processo de transformação foi feita pelo uso de antibiótico no meio. Somente as bactérias transformadas foram capazes de crescer em pressão seletiva, uma vez que apresentam resistência ao antibiótico conferida pelo plasmídeo recebido. Foram adicionados ao meio de cultura LB sólido 100 µg/mL de ampicilina, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Algumas colônias (das dezenas obtidas) foram replaqueadas em meio LB sólido contendo o mesmo antibiótico, uma vez que na placa de transformação poderia haver crescido alguma colônia satélite após a degradação do antibiótico. As placas de seleção foram incubadas por cerca de 20 h em estufa a 37° C. Após esta purificação em meio sólido, as colônias foram incubadas em meio LB líquido com antibiótico e cultivadas a 37° C por 18 h e 200 rpm para propagação dos plasmídeos. As colônias selecionadas de cada um dos plasmídeos foram submetidas à confirmação por digestão com enzimas de restrição, conforme descrito a seguir.

2.1.3. Extração de DNA plasmidial de *E. coli* (Mini-preparação)

Conforme mencionado no último parágrafo, a extração dos plasmídeos das células de *E. coli* transformadas foi feita segundo o protocolo de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) a partir de 3 a 5 mL de cultivo celular a 37° C e 200 rpm, por cerca de 20 h, em meio contendo antibiótico (100 µg/mL de ampicilina). Após centrifugação (12000 × g por 1 min), as células foram ressuspensas em 100 µL de solução contendo glicose 50 mM, TRIS-HCl 25 mM (pH 8,0) e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 10 mM e tratadas com 50 µg de RNase A. Em seguida, foram lisadas com 200 µL de solução contendo NaOH 0,2 M e dodecilsulfato de sódio (SDS) 1% m/v e, após breve agitação em vortex, foram neutralizadas com 150 µL da

solução contendo acetato de potássio 1,32 M (pH 4,8). Nestas condições ocorre a precipitação de restos celulares, proteínas e de DNA de alto peso molecular, permitindo que os DNAs plasmidiais permaneçam em solução. Após centrifugação ($12000 \times g$ por 1 min), o sobrenadante foi recolhido e submetido a uma coluna comercial GFX *Micro* Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences), específica para ligação de DNA. Os DNAs plasmidiais com elevado grau de purificação foram lavados com solução TRIS-EDTA e 80% v/v de etanol e eluído em 50 μ L de água ultrapura autoclavada.

2.1.4. Confirmação dos clones obtidos por digestão com enzima de restrição

Para confirmação da obtenção de plasmídeos contendo corretamente os genes de interesse, foi selecionada uma enzima de restrição que reconhece (pelo menos) um sítio no gene inserido e outro no plasmídeo, de modo a obter duas bandas facilmente identificadas em gel de agarose. A enzima que se ajustou a este protocolo foi KpnI (Invitrogen) 1 U/ μ L, sendo utilizado o tampão fornecido pela empresa. Em cada reação foi empregado cerca de 200-250 ng de DNA plasmidial. As digestões foram feitas a 37° C durante a noite. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE (TRIS-acetato 40 mM – pH 8,0 – EDTA 10 mM) contendo brometo de etídeo 0,5 % (p/v) e visualizados e fotografados sob irradiação de luz ultravioleta (ver exemplo na Figura 21).

2.2. Transformação de leveduras

A transformação de leveduras com os plasmídeos descritos foi realizada utilizando-se acetato de lítio (Kuo e Campbell, 1983). Inicialmente foi estabelecida uma pré-cultura durante

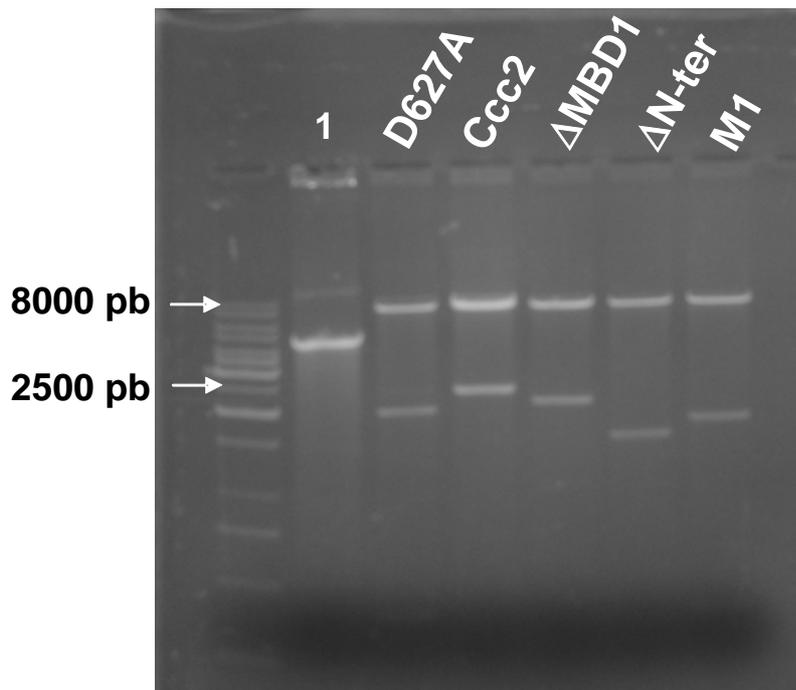


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial extraído de cepas de *E. coli* transformadas com o plasmídeo YEp vazio ou o mesmo plasmídeo contendo cada um dos genes indicados no topo do gel. O DNA plasmidial extraído das células de *E. coli* transformadas foi digerido com a enzima KpnI, gerando os fragmentos visualizados no gel sob irradiação de luz ultravioleta, conforme indicado no texto. À esquerda da figura estão indicados o tamanho de dois fragmentos do padrão de DNA λ . O poço 1 mostra um plasmídeo de ~ 6000 pb que não contém o sítio KpnI.

a noite em meio mínimo líquido (*Drop out* – ver composição adiante), com adição de leucina 100 mg/L (para as cepas Δ CCC2) ou leucina 100 mg/L e uracila 20 mg/L (para as cepas W303), a 30° C e agitação constante de 200 rpm. Após este período, as pré-culturas foram diluídas nos meios correspondentes para se obter uma densidade óptica (D.O.) inicial de 0,1, medida em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001) a 600 nm. Esta nova cultura foi então crescida a crescimento nas mesmas condições descritas até se atingir a D.O. de 0,6. Foram utilizados 5 mL da cultura para cada transformação, que foram transferidos para tubo Falcon estéril e depois centrifugados a $2500 \times g$ por 10 min (em centrífuga Fanem modelo 206-BL). O precipitado de células foi lavado com água deionizada ultrapura estéril (obtida por deionizador Barnstead, modelo Nanopure II) e centrifugado mais uma vez nas mesmas condições. O precipitado resultante foi então ressuspense em 1 mL de acetato de lítio 100 mM estéril e transferido para tubo eppendorf estéril. Esta suspensão foi centrifugada a $13000 \times g$ por 18 s (em centrífuga Incibrás, modelo Spin III) e o precipitado foi ressuspense em 50 μ L de acetato de lítio 100 mM. A esta suspensão foram adicionados (nesta ordem) 240 μ L de polietilenoglicol 50% p/v (3000-4000, Sigma - preparado na hora, em água estéril), 36 μ L de acetato de lítio 1 M estéril, 1 μ L do DNA plasmidial a ser inserido nas leveduras e 80 μ L de água estéril. Esta suspensão foi vortexada e submetida ao choque térmico (incubação por 30 min a 30° C seguida de incubação por 45 min a 42° C). Após o choque térmico, as células foram centrifugadas por $13000 \times g$ por 18 s, ressuspensas em 200 μ L de água estéril e plaqueadas no meio mínimo de origem (contendo agar 1%), embora sem adição de leucina, para seleção dos clones (uma vez que apenas as células que foram transformadas com os plasmídeos seriam capazes de crescer neste meio). As placas foram incubadas a 30° C por 72 h até aparecimento dos clones positivos (aqueles que cresceram em placas com antibiótico). Pelo menos quatro clones eram selecionados e repicados para nova placa. Após o crescimento das células, as placas eram mantidas em geladeira por até 1 a 2 meses.

2.3. Curvas de crescimento de cepas Δ CCC2 transformadas com os genes CCC2 e seus mutantes

As curvas de crescimento foram obtidas a partir pré-culturas de células de leveduras recém-transformadas (período máximo de 1 a 2 meses) e mantidas em geladeira em placas de Petri contendo meio sólido. Um inóculo das células foi retirado e transferido para o meio de cultura (20 a 30 mL em erlenmeyers de 150 mL) até torná-lo turvo (o que era indicativo de uma densidade inicial de células suficiente para iniciar o crescimento). Esta pré-cultura foi mantida durante a noite a 30° C sob agitação constante de 200 rpm. Decorrido este tempo, as pré-culturas foram diluídas nos meios correspondentes (YD, meio mínimo ou Meio 1, ver composição mais adiante) para um volume final de 50 mL de forma a obter-se a densidade óptica (D.O.) inicial de 0,1, medida em espectrofotômetro a 600 nm. As curvas foram realizadas nestas mesmas condições, alíquotas foram retiradas em intervalos periódicos durante 24 h (ou por períodos diferentes, conforme indicado nas legendas das figuras) e diluições foram realizadas quando necessário, de modo que a leitura da D.O. flutuasse entre 0,1 e 0,6. O número de células viáveis foi obtido através de contagem em câmara de Neubauer (0,0025 mm²) ao microscópio óptico. A determinação das células viáveis foi realizada após incubação das células com igual volume do corante Azul de Tripán 0,5% por tempo máximo de 5 min, para evitar que o corante entrasse também nas células viáveis (células não coradas).

2.4. Preparações de frações de membrana de leveduras

As frações microssomais de leveduras Δ CCC2 transformadas com os plasmídeos YEp contendo os genes CCC2 ou D627A foram obtidas essencialmente como descrito por Fischl *et al.* (2000). As células foram crescidas conforme descrito anteriormente, sendo que em volumes maiores (1,5 a 2 L), com o objetivo de se obter uma quantidade suficiente de

preparação para uso nos estudos bioquímicos. A D.O. da cultura foi monitorada periodicamente até se atingir a D.O. de aproximadamente 1,0 (cerca de 6 a 7 h de crescimento – ver Resultados e Discussão), quando então o crescimento foi paralisado pela adição de NaN_3 (concentração final de 10 mM). A suspensão de células foi incubada em presença de azida por 10 min a 4° C, com agitações periódicas. Decorrido este tempo, as células foram utilizadas para preparação das frações microssomais de membrana como descrito no esquema da Figura 22.

2.5. Dosagem de proteína

A concentração de proteínas totais nas frações de membrana de leveduras ou de células *Sf9* foi realizada como descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão.

2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *western blotting*

As proteínas das frações de membrana foram visualizadas pelo método SDS-PAGE, utilizando-se géis de poliacrilamida 10% em presença de SDS (Laemmli, 1970) e a corrida eletroforética foi realizada a 60 mA. Os géis foram corados por 30 min em solução de *Coomassie Blue* 0,25% (p/v) contendo (em v/v) metanol 30%, etanol 20% e ácido acético 10%. O descoloramento do gel para realçar as bandas foi realizado em solução contendo (em v/v) ácido acético 10% e metanol 40%. A presença de Ccc2 e D627A (ver Figura 16) em frações de membranas de leveduras ΔCCC2 (transformadas com o plasmídeo YEp contendo os genes correspondentes) ou de células *Sf9* foi verificada por *western blotting* após transferência para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se anticorpo policlonal anti-

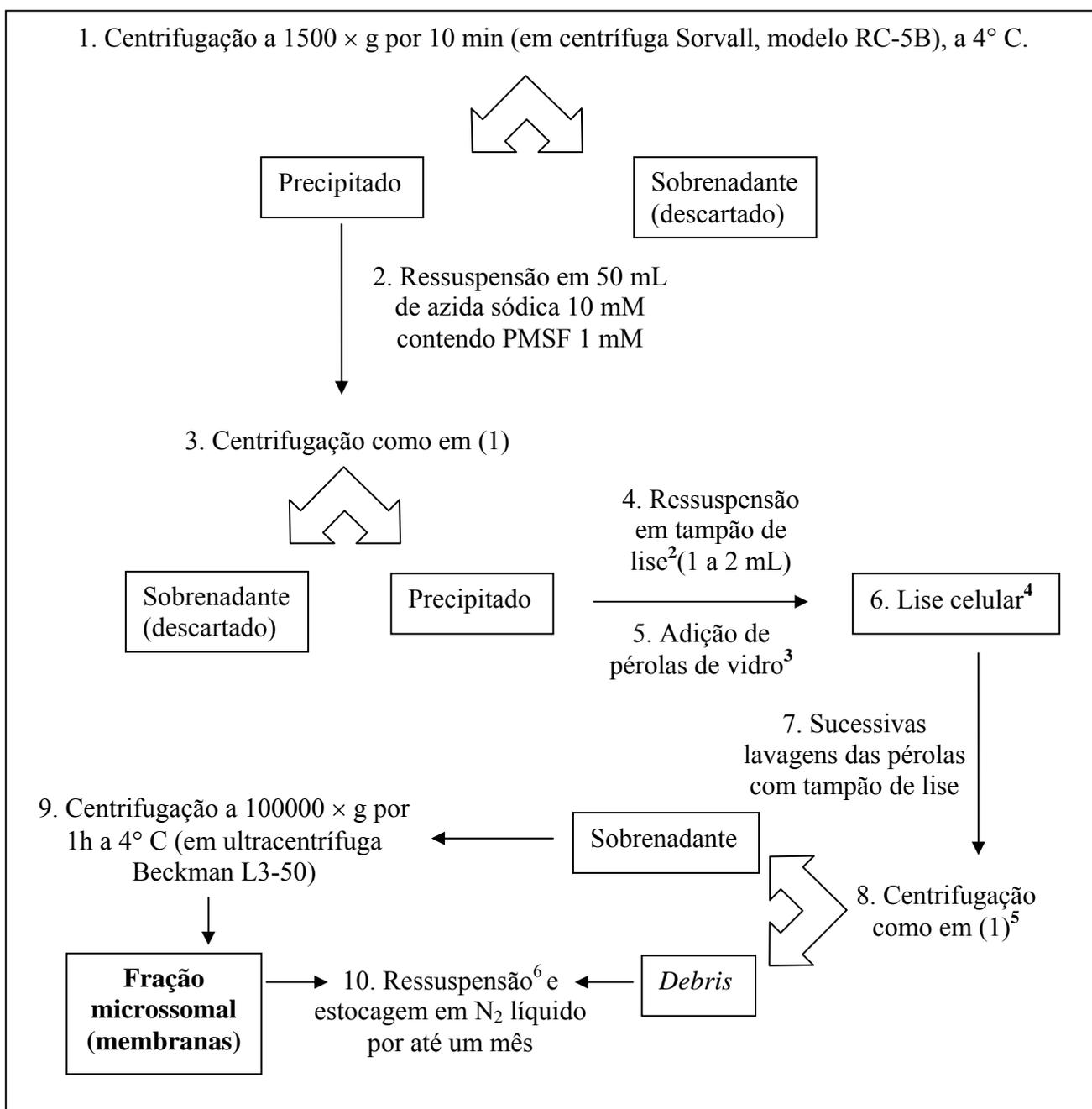


Figura 22. Esquema da preparação de frações microssomais de membrana de leveduras Δ CCC2 transformadas com os plasmídeos YEp.CCC2 ou YEp. D627A.

² Tampão MOPS-KOH 50 mM (pH 7,4) contendo sacarose 250 mM, PMSF 1 mM, DTT 5 mM, além dos inibidores de proteases pepstatina (0,7 μ g/mL), leupeptina (0,5 μ g/mL) e aprotinina (2 μ g/mL).

³ 425 – 600 μ m (Sigma). As pérolas de vidro foram adicionadas até o menisco da suspensão de células.

⁴ As células foram rompidas em homogeneizador de células MSK (B. Braun Biotech, Inc., Allentown, PA, USA), durante 10 ciclos de 1 min, intercalados por intervalos de 1 min no gelo.

⁵ Esta centrifugação serviu para eliminar *debris* celulares, células não rompidas e eventuais pérolas de vidro presentes na preparação.

⁶ O tampão de ressuspensão utilizado dependeu do objetivo final: para os ensaios de atividade, as frações foram ressuspensas em tampão MOPS-KOH 100 mM (pH 7,4) contendo glicerol 40% (p/v) e DTT 5 mM; para aplicação em SDS-PAGE as frações e os *debris* foram ressuspensos em tampão MOPS-KOH 100 mM (pH 7,4).

Ccc2GB gerado contra o peptídeo ⁶⁶⁰CIKATESISDHPVSKAIIRY (Lowe e col., 2004; ver a seqüência completa de aminoácidos de Ccc2 na Figura 15) e anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Amersham Biosciences) (ambos diluídos 1:5000 em TBS – *Tris Buffer Saline* contendo o detergente Tween 0,1% v/v). A presença de Ccc2 ou dos mutantes D627A, M1(ss) e ΔN-ter conjugados a GFP, transformados em cepas de leveduras ΔCCC2 com os plasmídeos pCEN, foi detectada nas respectivas frações de membrana com o anticorpo policlonal anti-GFP (1:500, Santa Cruz Biotechnology) e o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:2000) diluídos nas mesmas condições descritas acima. A membrana de nitrocelulose transferida foi corada com *Rouge ponceau* 0,1 % (p/v) em solução de ácido tricloroacético (TCA) 3% (v/v). Em todos os casos a atividade da peroxidase foi detectada por quimioluminescência utilizando-se o kit ECL (Amersham Biosciences).

2.7. Dosagem de atividade Cu(I)-ATPásica em frações de membrana de leveduras e de células *Sf9*

A atividade ATPásica foi determinada nas frações de membrana de acordo com o método descrito por Grubmeyer e Penefsky (1981) com pequenas modificações (Caruso-Neves *et al.*, 2000). As frações (0,25 mg/mL) foram incubadas em presença de redutores (ácido ascórbico 100 μM e Na₂SO₃ 1 mM) ou dos quelantes de cobre BCA (ácido bicinconínico dissódico) e BCS (ácido batocuproíno dissulfônico) nas concentrações indicadas nas legendas das figuras, além de thapsigargina 20 μM, por 30 min a 4 °C. Em seguida, a reação foi iniciada pela adição de [γ -³²P]ATP 5 mM num meio contendo (volume final de 0,25 mL) tampão MOPS-KOH 20 mM (pH 8,0), K₂SO₄ 50 mM, MgSO₄ 10 mM, NaF 10 mM, NaN₃ 10 mM, SDS- α -D-maltosídeo 0,2% (p/v), Glicerol 4% (v/v) e realizada a 37 °C por 10 min. A reação foi interrompida com 2 vol de carvão ativado e os tubos centrifugados

por 30 min a $19000 \times g$. Aliquotas do sobrenadante foram contadas em contador de cintilação líquida para determinar a quantidade de ^{32}P i liberado. Eventuais alterações na dosagem se encontram descritas nas correspondentes legendas das figuras.

2.8. Experimentos de fosforilação de Ccc2

Frações de membrana (50 μg) de células *Sf9* foram suspensas em 200 μL de meio contendo KCl 200 mM, MgCl_2 5 mM e BIS-TRIS Propano 20 mM (pH 6,0). Após a adição de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (5 μM final) as misturas foram incubadas no gelo por 45 s e a reação paralisada após este período pela adição de 50 μL de solução ácida composta por NaH_2PO_4 1 mM e TCA 50% (v/v). As amostras foram centrifugadas por 20 min a $19000 \times g$ a 4°C e o precipitado resultante foi lavado uma vez com água e ressuspensão em 40 μL de tampão de amostra (TRIS- PO_4 5 mM, uréia 6,7 M, DTT 0,4 M e SDS 5% p/v, pH 5,8). Esta suspensão foi aplicada num gel ácido de poliacrilamida 10% e, após a corrida eletroforética, o gel foi exposto durante a noite a uma tela de Phospho-screen (BioRad) para medir a intensidade das bandas fosforiladas em aparelho específico (Storm 860, GE Biosciences). Controles foram realizados para: a) confirmar a sensibilidade à hidroxilamina da fosforilação e, portanto, sua associação ao resíduo D627 (Figura 14); b) confirmar a sua co-localização com as bandas reconhecidas pelo anticorpo anti-Ccc2. Parte destes experimentos foi realizada no laboratório francês.

2.9. Testes de complementação

Como já mencionado anteriormente, os plasmídeos onde foram inseridos os genes de Ccc2 e de seus mutantes contêm o marcador de seleção LEU2, de forma que os meios de

cultura utilizados não poderiam conter leucina, com o objetivo de selecionar apenas os clones que foram transformados com os plasmídeos.

Para os ensaios de complementação em meio sólido (com agar 2%) contendo ferrozina, foram utilizados três meios de cultura diferentes em pH 6,1 (acertado com tampão MOPS-KOH antes da autoclavação). Estes meios contém 1 mM de um quelante de íons Fe, a ferrozina. A composição química dos três meios (ver Tabela 4) é idêntica, com exceção das concentrações de Cu^{2+} e Fe^{2+} (Forbes *et al.*, 1999). As concentrações de Cu^{2+} e Fe^{2+} livres nestes meios, bem como para os demais utilizados nesta tese estão descritas na Tabela 5. Estas concentrações serão discutidas mais adiante.

Os demais ensaios de complementação apresentados em Resultados e Discussão foram realizados com meio *Drop out* (ver composição no item 1.5) e os componentes suplementares foram adicionados conforme indicado nas legendas das figuras. Para os testes em que se variou o pH, este foi acertado antes da autoclavação com tampão MOPS-KOH 50 mM e confirmado posteriormente em meio controle, posteriormente descartado.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise do crescimento de células de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas com o gene CCC2 e os mutantes utilizados nesta tese

Nos estudos com microrganismos transformados, um dos problemas cruciais é a instabilidade dos plasmídeos (Zhang *et al.*, 1996). A instabilidade é a tendência das células transformadas em perderem suas propriedades devido à mudança ou perda dos plasmídeos. Durante a cultura, células que não possuem o plasmídeo podem surgir, coexistir e até mesmo competir com a população que o contém. Em geral, plasmídeos que apresentam um alto número de cópias por célula possuem maior estabilidade, já que existe grande probabilidade de uma célula-filha adquirir uma das cópias. Além disso, em experimentos onde foi estudada a complementação de cepas de leveduras deficientes no gene CCC2 (Δ CCC2) com o gene de uma Cu(I)-ATPase humana (ATP7B), demonstrou-se que a expressão através de plasmídeo multicópia era capaz de produzir 30 vezes mais cópias da enzima do que a expressão com um plasmídeo de única cópia (Forbes *et al.*, 1999). A estabilidade também é favorecida quando uma pressão de seleção é imposta sobre a população de células transformadas com plasmídeos contendo genes marcadores, como LEU2. Esta última característica estava presente nos plasmídeos utilizados nesta tese para inserção do gene CCC2 e dos seus mutantes em leveduras, nas quais o curso temporal de crescimento foi inicialmente analisado.

Dentre os métodos de análise funcional de leveduras, as curvas de crescimento são talvez os mais utilizados, sendo muito úteis para se avaliar a proliferação celular em diferentes condições e podem ser realizadas tanto em meios complexos quanto em meios sintéticos (quimicamente definidos) e mínimos, contendo apenas os nutrientes essenciais ao crescimento do fungo.

A primeira abordagem metodológica para analisar possíveis diferenças entre as cepas transformadas com diferentes mutantes da Cu(I)-ATPase de leveduras, *Ccc2*, foi estudar o crescimento destas em meio rico em nutrientes, pH \cong 4,5 (meio YD, ver composição em Materiais e Métodos). Novas curvas de crescimento eram construídas à medida que se realizavam novas transformações da cepa Δ CCC2, em função da possibilidade de variabilidade nas transformações, empregando diferentes clones. A Figura 23 mostra o perfil típico de crescimento das cepas transformadas *Ccc2*, D627A, Δ N-ter, Δ CCC2, M1 e Δ MBD1 em tempos diferentes. Os resultados mostram que a D.O. atingida pelas diferentes cepas após 24 h de crescimento em meio rico era praticamente igual e esta similaridade não era afetada mesmo com as pequenas variações apresentadas decorrentes da utilização de clones diferentes em diferentes experimentos. O número de células viáveis (praticamente 100% da população celular em todas as cepas) após 24 h oscilou entre 1×10^8 e 3×10^8 células/mL. Isso indica que, nestas condições de crescimento, não há alterações significativas entre as diferentes cepas e que o gene CCC2 não é absolutamente requerido para crescimento das células em meio rico a pH \cong 4,5, portanto não submetidas a estresse alcalino. Em geral, deficiências de crescimento em meio rico devem-se a defeitos ou remoções dos genes que codificam para categorias funcionais (enzimas ou cofatores protéicos) envolvidas na síntese protéica e na organização celular, para proteínas ribossomais e para aquelas que desempenham funções mitocondriais e respiratórias (Giaver *et al.*, 2002). A deficiência de alguns genes (ex.: componentes da via Bck1 – Slt2, requeridos para a integridade da parede celular) leva à hipersensibilidade a pH alcalino, mas nenhuma das poucas remoções descritas está associada a modificações em domínios específicos da Cu(I)-ATPase (Serrano *et al.*, 2004).

Quando foram realizadas as curvas em meio mínimo (meio *Drop out*, contendo apenas os nutrientes essenciais ao crescimento das leveduras – ver composição em Materiais e Métodos), que, ao contrário do meio rico, contém concentrações definidas de nutrientes (em

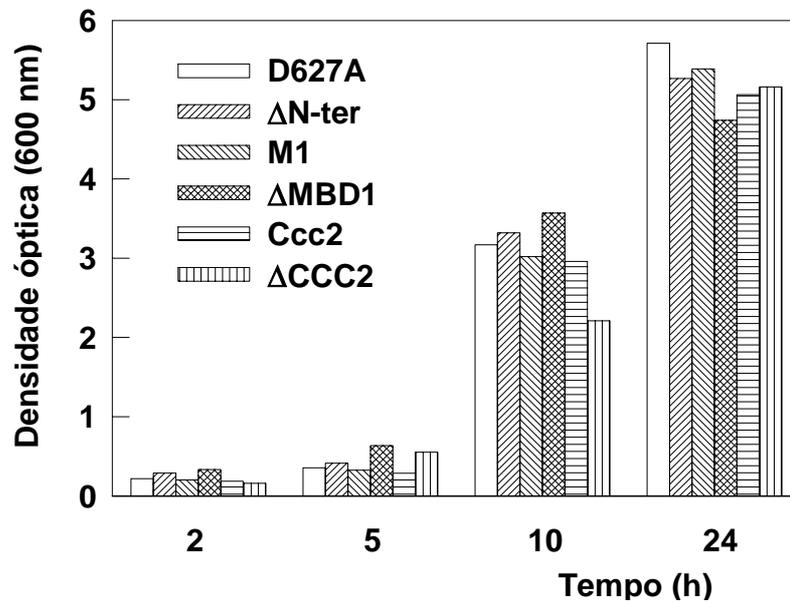


Figura 23. Crescimento em meio rico (YD) de células Δ CCC2 e das mesmas células quando transformadas com diferentes plasmídeos YEp, contendo cada um dos genes indicados na legenda. As culturas de cepas Δ CCC2 e das mesmas cepas transformadas com plasmídeos YEp contendo os genes indicados na legenda foram iniciadas a partir de pré-culturas realizadas durante a noite em meio YD a 30 °C e 200 rpm e normalizadas a uma D.O. 0,1 para início da curva de crescimento (tempo zero). As alíquotas foram retiradas nos tempos indicados durante um período de 24 h para medida da D.O. a 600 nm, conforme descrito em Materiais e Métodos.

ambos os casos concentrações micromolares de Cu^{2+} e Fe^{2+}), pode-se observar pequenas mudanças no perfil de crescimento dos diferentes mutantes. Estas diferenças se observam principalmente depois do início da fase exponencial (Figura 24), mas a análise do gráfico permite concluir que as diferenças de crescimento observadas neste meio seletivo ($\text{pH} \cong 4,5$) são aleatórias, derivando provavelmente de alterações durante o processo de transformação das células e não da expressão de um gene específico. Esta conclusão se apóia no fato de que a ausência do gene CCC2 (cepa ΔCCC2) ou a presença do gene D627A, que codifica para uma proteína não-funcional (não fosforila) não provocam mudanças no perfil de crescimento quando estas cepas são comparadas com a cepa Ccc2 (cepa ΔCCC2 transformada com o plasmídeo YEp.CCC2 – ver Materiais e Métodos).

Como descrito na Introdução, o resíduo de ácido aspártico (D) da seqüência DKTGT encontrada em todas as ATPases do tipo P (Figura 11) é fundamental para a atividade destas enzimas, sendo o aminoácido que é fosforilado durante o ciclo catalítico. Desta forma, o mutante D627A codifica para uma Cu(I)-ATPase não-funcional, ou seja, incapaz de realizar o transporte de Cu(I). Em paralelo, o gene $\Delta\text{N-ter}$ codifica para uma cópia de Ccc2 em que a região N-terminal está ausente (ver Figura 16 em Materiais e Métodos). A região N-terminal das ATPases do tipo P1 é importante para a interação com as metalochaperonas Atx1 (em leveduras) e Atox1 (em mamíferos), embora é possível que haja uma via independente destas chaperonas para a entrega de Cu(I) para as Cu(I)-ATPases (Lin *et al.*, 1997; Pufahl *et al.*, 1997). Estudos mais recentes vêm demonstrando que não é necessária a presença dos seis domínios de ligação de metal (ver Figura 11) para a atividade catalítica das ATPases de Menkes e Wilson (Lutsenko e Petris, 2002) e a baixa similaridade entre alguns MBDs sugere que eles possuam propriedades distintas. Coerentemente com esta afirmação, os MBDs da ATPase de Wilson não são funcionalmente equivalentes, ou seja, os domínios que estão mais próximos ao primeiro segmento transmembrana não podem ser substituídos por outros MBDs

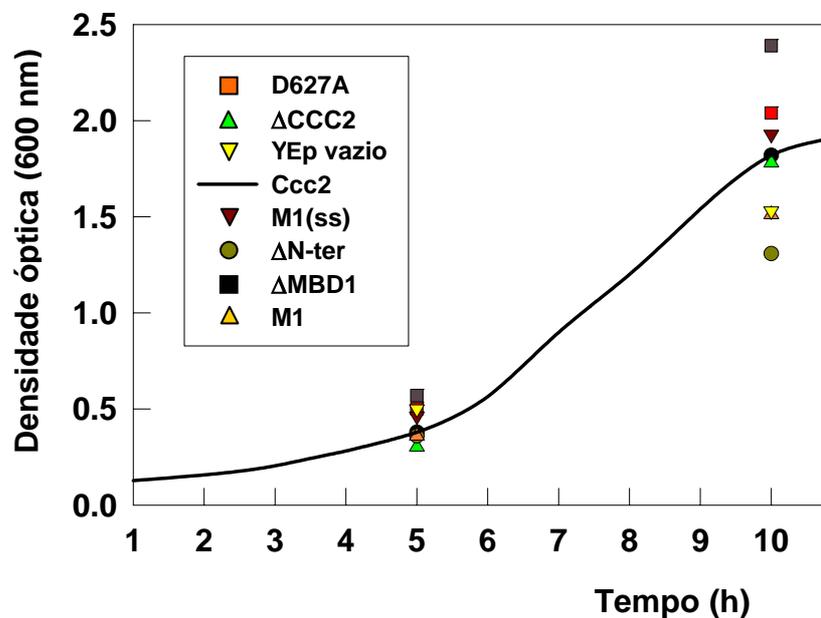


Figura 24. Crescimento em meio mínimo sem leucina e uracila (*Drop out base* – ver composição em **Materiais e Métodos).** Culturas de células Δ CCC2 e das mesmas células quando transformadas com diferentes plasmídeos YEp, contendo cada um dos genes indicados na legenda ou então o plasmídeo vazio (YEp vazio), foram iniciadas a partir de pré-culturas realizadas em meio *Drop out* a 30 °C e 200 rpm durante a noite e normalizadas a uma D.O. 0,1 para início da curva de crescimento (tempo zero). Para análise do crescimento das células Δ CCC2 foi adicionado leucina a uma concentração final de 0,1 mg/mL. As alíquotas foram retiradas nos tempos indicados e a D.O. foi medida a 600 nm. A linha mostra o perfil representativo do crescimento da cepa Ccc2 (pontos intermediários foram suprimidos para maior clareza).

sem que ocorra perda de atividade (Forbes *et al.*, 1999). Experimentos com diversos mutantes na região N-terminal das ATPases de Menkes e Wilson indicaram inicialmente que pelo menos um sítio seja necessário para a atividade transportadora (Iida *et al.*, 1998; Payne e Gitlin, 1998; Forbes *et al.*, 1999). No entanto, experimentos posteriores também demonstraram que os MBDs não são essenciais para a catálise, mas servem para a ligação do Cu(I) quando as suas concentrações são baixas (Voskoboinik *et al.*, 2001). Pelo que se pode constatar, ainda não há certeza se a presença de pelo menos um MBD é absolutamente requerida para a atividade ATPásica. Portanto, pode ser concluído que em pH ácido, em concentrações não-limitantes de Cu e Fe, o não-funcionamento (D627A) ou o funcionamento potencialmente alterado de Ccc2 (outros mutantes) não altera a captação de nutrientes e a maquinaria molecular da levedura. Com base no perfil de crescimento das cepas Ccc2 e D627A mostrado na Figura 24, determinou-se a D.O. igual a 1,0 (7 a 8 horas de crescimento) como ponto de interrupção do crescimento quando o objetivo era a obtenção das frações microsossomais de membrana (ver protocolo em Materiais e Métodos).

Como mencionado acima, ensaios de crescimento em meio líquido (Figuras 23 e 24) foram realizados na presença de concentrações submicromolares de Cu e Fe. O estudo da interconexão entre os metabolismos de Cu e Fe, tanto em leveduras quanto em eucariotos superiores, vem apresentando um avanço notável na última década (Kaplan, 1996; Fox, 2003). Esta interação metabólica serviu de base para desenvolvimento de um método capaz de avaliar a presença e o funcionamento de Cu(I)-ATPases humanas quando expressas em cepas de leveduras deficientes no gene CCC2 (Forbes *et al.*, 1999). Os autores deste trabalho utilizaram três meios de cultura sólidos contendo ferrozina, um quelante de ferro que reduz a disponibilidade de Fe para as células (ver a composição dos meios em Materiais e Métodos e Tabela 5), com o objetivo de estudar as conseqüências funcionais de mutações e remoções nos domínios de ligação de metal de ATP7B, a ATPase de Wilson. O meio de cultura limitado

em Cu^{2+} e Fe^{2+} (Meio 1), o meio rico em Cu^{2+} (Meio 2) e o meio rico em Fe^{2+} (Meio 3) foram preparados acrescentando-se concentrações diferentes de $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e CuSO_4 na presença de 1 mM de ferrozina (Tabelas 4 e 5). A influência da diminuição das concentrações de Fe^{2+} (e Cu^{2+}) no crescimento da cepa Ccc2 e das cepas D627A e $\Delta\text{N-ter}$ é mostrada na Figura 25. Os resultados apresentados nesta figura mostram que a cepa deficiente em Ccc2 onde o gene CCC2 foi superexpresso é capaz de apresentar um crescimento significativamente maior do que aquelas em que os genes D627A e $\Delta\text{N-ter}$ foram superexpressos. Mas todas as cepas são capazes de atingir um certo crescimento, provavelmente devido à sua capacidade de estocarem Fe disponível no meio em que se encontravam anteriormente (meio *Drop out* sólido – Tabela 5) ou à presença de concentração, embora baixa, de Fe^{2+} livre no Meio 1. A constante de associação para o complexo ferrozina.Fe é de $1,6 \times 10^{16} \text{ M}^{-1}$ (Garza-Ulloa *et al.*, 1980), de modo que na presença de 50 μM de $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a concentração de Fe^{2+} livre é de aproximadamente 5 pM, uma concentração que, apesar de extremamente baixa, mostra-se suficiente para permitir aos mutantes D627A e $\Delta\text{N-ter}$ o crescimento apresentado. O crescimento do mutante $\Delta\text{N-ter}$ é comparável ao do mutante não-funcional, o que, pelo menos a princípio, pode indicar que a presença da região N-terminal é necessária para o correto funcionamento de Ccc2 em condições restritivas de Cu ou então que $\Delta\text{N-ter}$ esteja localizada em outro compartimento que não o trans-Golgi. Isto será discutido mais adiante.

2. Ensaio de complementação a pH ácido (6,1) na presença de diferentes concentrações de cobre e ferro

Os meios 1, 2 e 3 descritos na Tabela 4 foram em seguida utilizados nos ensaios de complementação para se verificar a viabilidade das diferentes cepas mutantes em meios restritivos em Cu e Fe. As Figuras 26 e 27 são os controles experimentais a pH 6,1 e mostram

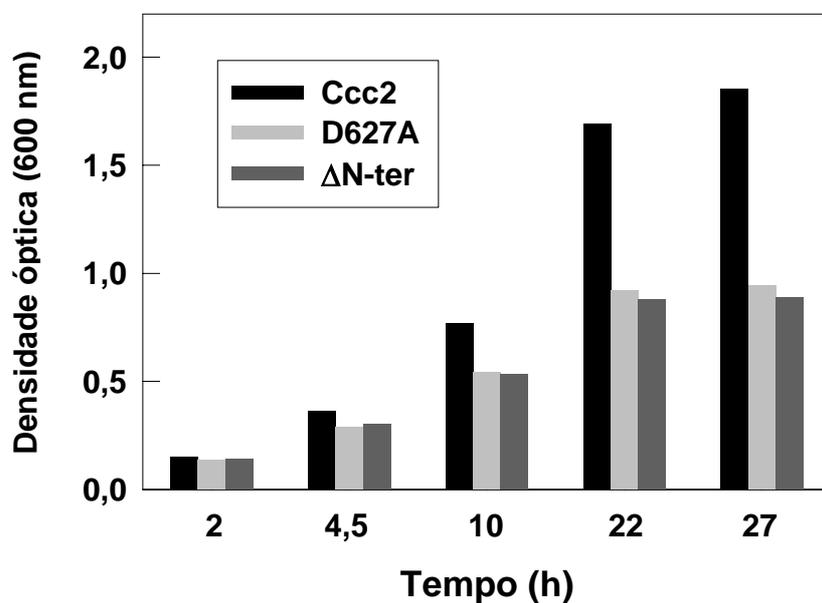


Figura 25. Crescimento em Meio 1, que contém ferrozina 1,0 mM e baixas concentrações de CuSO_4 (1 μM) e $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50 μM) adicionadas (ver composição em **Materiais e Métodos**). Células ΔCCC2 foram transformadas com o plasmídeo YEp contendo os genes CCC2, D627A ou $\Delta\text{N-ter}$, conforme indicado. As culturas foram iniciadas a partir de pré-culturas realizadas em Meio 1 a 30 °C e 200 rpm durante a noite e normalizadas a uma D.O. 0,1 para início da curva de crescimento (tempo zero). As alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a medida da D.O. a 600 nm.

que as cepas que não expressam Ccc2 (cepas Δ CCC2, Figura 26) ou que superexpressam uma variante não funcional de Ccc2 (D627A, Figura 27) são incapazes de crescer em Meio 1. A cepa selvagem (W303, Figura 26), contendo constitutivamente o gene CCC2 presente no seu genoma, assim como a cepa Δ CCC2 transformada com plasmídeos YEp.CCC2 (Figura 27) apresentam crescimento normal neste meio. Todas as cepas crescem em meios contendo concentrações maiores de Cu^{2+} (Meio 2) mostrando que pode existir uma via de internalização de Cu por cópias de Fet4 presentes na membrana plasmática, que poderiam captá-lo diretamente do meio com baixa afinidade e uma via alternativa de entrega para Fet3 no Golgi através da endocitose de Ctr (Figura 8) induzida pelo alto Cu (Ooi *et al.*, 1996.). Uma outra forma de entrega do Cu para Fet3 poderia ser através de metalochaperonas (Atx1 e outras) que, ligando o íon internalizado, o transfeririam para Fet3. Este conceito será também retomado posteriormente. Finalmente, todas as cepas são igualmente capazes de crescer em Meio 3, pois a presença de Fe em concentrações elevadas permite a sua entrada na célula através de transportadores inespecíficos, de baixa afinidade, presentes na membrana plasmática, como é o caso de Fet4 (Dix *et al.*, 1994). Os ensaios de complementação controle mostrados nas Figuras 26 e 27 confirmam aqueles obtidos por Lowe e colaboradores (2004).

3. Ensaios de atividade Cu(I)-ATPásica

De forma a complementar os resultados de crescimento celular obtidos e iniciar a caracterização da atividade enzimática de Ccc2 no seu meio ambiente natural (a levedura), ainda não descrita na literatura, procedeu-se com a medida da atividade enzimática de cepas Δ CCC2 superexpressando a enzima nativa (Ccc2) ou a enzima não-funcional (D627A). Considerou-se preliminar demonstrar uma atividade hidrolítica de ATP diferente entre cepas que superexpressam Ccc2 nativa e seus mutantes considerados “não funcionais”, para associar

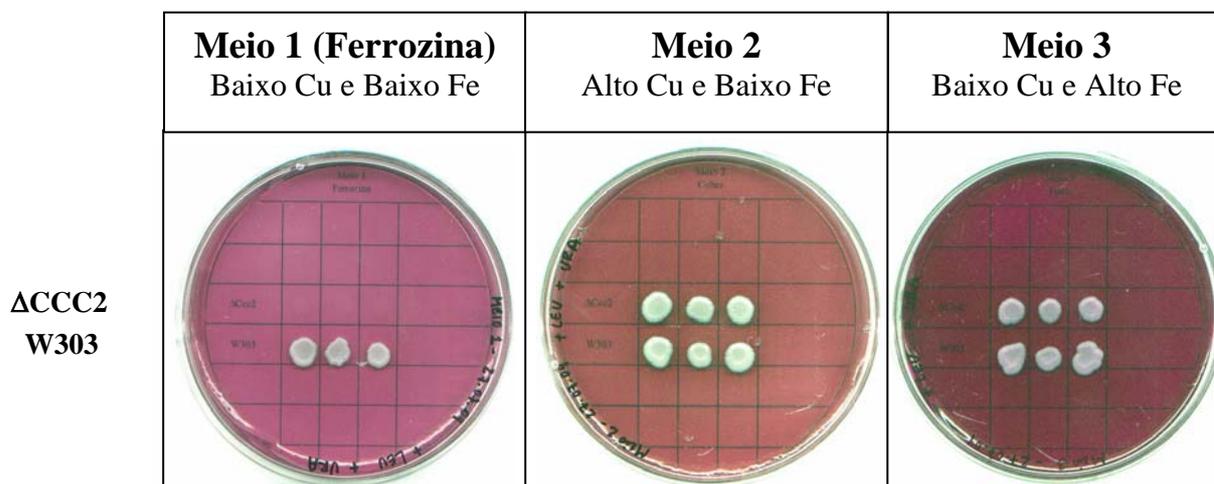


Figura 26. A presença de *Ccc2* é obrigatoriamente requerida para o crescimento da levedura *S. cerevisiae* em meio restritivo em Cu e Fe. A figura mostra ensaios de complementação - monitorados após 72 h - com 2 μ L de inóculo (2×10^6 células/mL) de três diferentes culturas de cada uma das duas cepas indicadas: uma que não expressa *Ccc2* (Δ CCC2) e outra que a expressa normalmente (W303). A obtenção da cepa Δ CCC2 e a composição dos três meios (*com* leucina e uracila, pH 6,1) com diferentes concentrações de CuSO_4 e $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (respectivamente 1 μ M e 50 μ M para Meio 1, 500 μ M e 50 μ M para Meio 2 e 1 μ M e 350 μ M para Meio 3, todos com 1 mM de ferrozina) encontram-se descritas em Materiais e Métodos (ver Tabelas 4 e 5) .

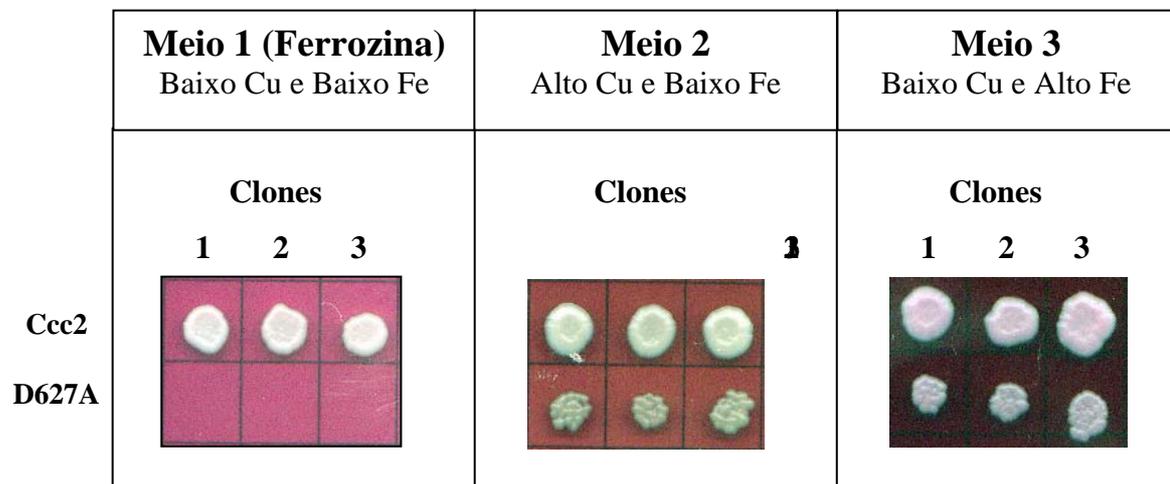


Figura 27. A mutação pontual do ácido aspártico D627 do centro ativo impede o crescimento da levedura *S. cerevisiae* em meio restritivo em Cu e Fe. Células Δ CCC2 foram transformadas com plasmídeos YEp contendo os genes CCC2 ou D627A. A figura mostra ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 μ L de inóculo (2×10^6 células/mL) das cepas mencionadas (três clones diferentes), conforme indicado. A obtenção das cepas e a composição dos três meios (sem leucina e sem uracila) com diferentes concentrações de CuSO_4 e $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ encontram-se descritas em Materiais e Métodos e na legenda da Figura 26.

a perda de funcionalidade *in vivo* à incapacidade de transportar ativamente Cu(I) para o lúmen do Golgi.

Poucos trabalhos onde se avalia a funcionalidade de Cu(I)-ATPases em eucariotos descrevem uma atividade hidrolítica de ATP (Takeda *et al.*, 1999; Lowe *et al.*, 2004; Portmann e Solioz, 2005). Em 2004, Lowe e colaboradores demonstraram a atividade ATPásica de Ccc2 superexpressando a enzima em células *Sf9* (células de ovário de inseto que contêm pouca atividade ATPásica endógena) através da infecção com baculovírus. Neste trabalho, devido ao fato de não ter sido ainda caracterizado um inibidor específico da Cu(I)-ATPase, os autores utilizaram como ferramentas para inibição de sua atividade os quelantes de cobre BCA (ácido bicinconínico dissódico – 100 μ M) e BCS (ácido batocuproíno dissulfônico – 250 μ M) (Figura 28). Estas concentrações foram escolhidas a partir da análise da atividade Cu(I)ATPásica após pré-incubação na presença de diferentes concentrações dos quelantes. Estes autores verificaram que a inibição máxima era atingida com a combinação dos dois compostos nestas concentrações (Lowe *et al.*, 2004). Além disso, a detecção da atividade utilizando-se o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ marcado de acordo com o método descrito por Grubmeyer e Penefsky (1981) com algumas modificações (Caruso-Neves *et al.*, 2000), se fez necessária. O uso de agentes redutores para manter o Cu na forma Cu(I) interfere nos métodos colorimétricos mais usados para a determinação da atividade ATPásica: o método colorimétrico de Fiske e Subbarow (1925) para detecção de Pi; e o método enzimático que acopla a produção de ADP à sua refosforilação por P-enolpiruvato (na presença de piruvato cinase) e à subsequente oxidação de NADH a NAD⁺ (na conversão de piruvato a lactato catalisada pela lactato desidrogenase) (revisto por Nørby, 1988).

A análise da atividade de Ccc2 foi então medida na presença dos redutores ácido ascórbico (100 μ M) e Na₂SO₃ (1 mM), de maneira a assegurar-se a presença de Cu no meio de reação no estado de oxidação Cu(I), que é a forma capaz de ser transportada pela Cu(I)-

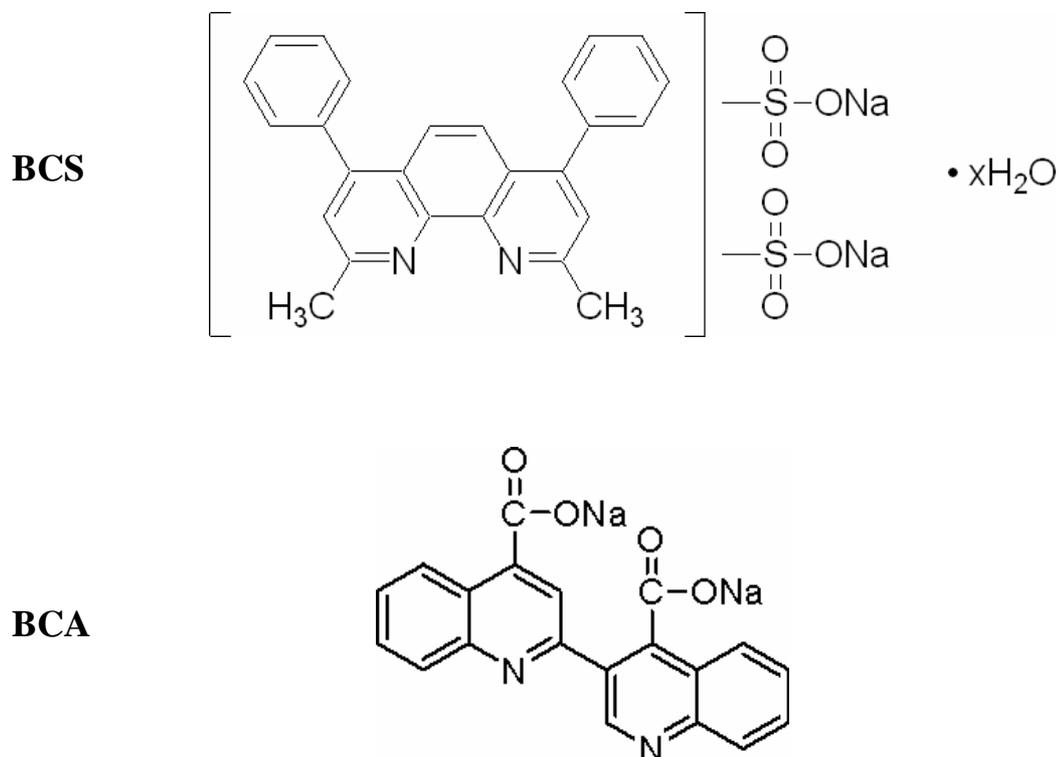


Figura 28. Estruturas moleculares de BCA (ácido bicinconínico) e BCS (ácido batocuproíno dissulfônico). A figura mostra as representações moleculares dos sais de Na^+ do BCS e do BCA. Note-se a maior hidrofobicidade conferida à molécula de BCS pelo “cluster” de batocuproína (dimetilada). As constantes de associação de Cu^{2+} e BCS ou BCA para formar os complexos BCS_2Cu e BCA_2Cu em água são 10^{20} M^{-1} e 10^{11} M^{-1} , respectivamente. Pelas características de geometria quadrada da configuração eletrônica do íon Cu^{2+} , a estequiometria da ligação de ambos os quelantes com Cu^{2+} é 2:1.

ATPase. Conforme já foi mencionado, não existem muitas publicações acerca da atividade enzimática das Cu(I)-ATPases e, especialmente, sobre a dependência da concentração de substratos e cofatores. No entanto, uma das conclusões mais aceitas dos trabalhos recentemente publicados é a altíssima afinidade da enzima por Cu(I) na faixa submicromolar. Em um destes trabalhos, Bissig *et al.* (2001) analisaram os parâmetros cinéticos de CopB, a Cu(I)-ATPase responsável pela extrusão de Cu em *Enterococcus hirae* quando os níveis citoplasmáticos deste metal tornam-se tóxicos (Solioz e Odermatt, 1995), verificando que concentrações de Cu²⁺ extracelular em torno de 1 µM eram inibitórias, o que os levou a realizar os experimentos na presença do Cu²⁺ contaminante. Em nosso caso, a concentração de Cu²⁺ na água deionizada utilizada (obtida em deionizador Barnstead, modelo Nanopure II) e no tampão de reação estão na faixa de 11-17 nM e 80 nM, respectivamente (detecção por absorção atômica), e por este motivo não foi adicionado Cu nos experimentos realizados para a detecção da atividade enzimática. De forma a reduzir a interferência de outras atividades presentes no sistema, foram adicionados thapsigargina (20 µM), um inibidor específico da Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático (Sagara e Inesi, 1991), azida sódica (NaN₃, 10 mM), para inibir as ATPases mitocondriais (Vasilyeva *et al.*, 1982) e fluoreto de sódio (NaF, 10 mM), inibidor de fosfatases (dos Passos Lemos *et al.*, 2002). Frações totais de membrana, obtidas através de lise e centrifugação diferencial de cepas ΔCCC2 que superexpressam os genes CCC2 ou D627A, crescidas até a metade da fase exponencial (para assegurar a presença de uma população de células em divisão, portanto com parede celular pouco espessa em sua maioria; Figura 24), foram pré-incubadas na presença do meio de reação contendo os agentes redutores ou os quelantes por 30 min a 4 °C, conforme descrito em Materiais e Métodos (Figuras 29, 30 e 31).

A Figura 29 mostra que: 1) a atividade da fração Ccc2 em presença dos redutores é significativamente maior do que a atividade das frações D627A nas mesmas condições; 2) em

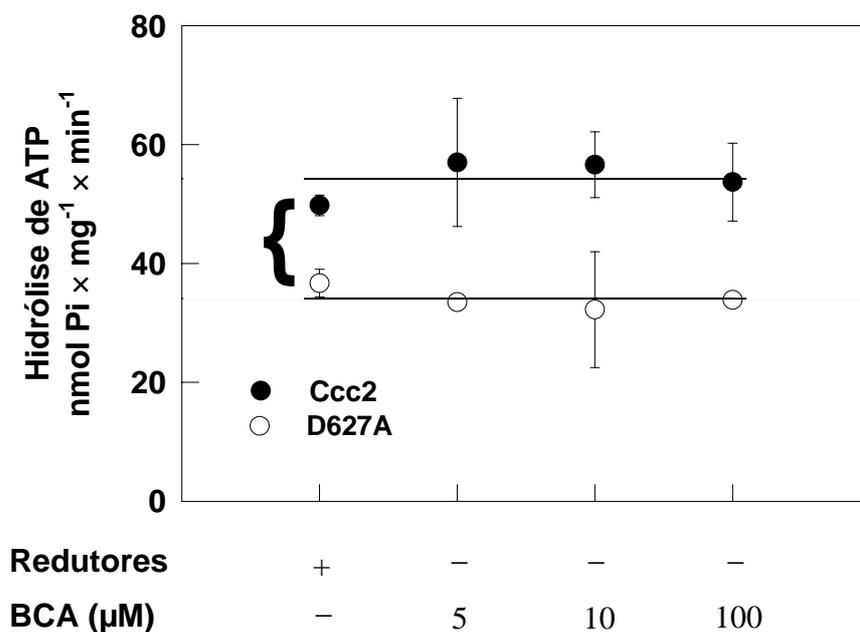


Figura 29. A atividade Cu(I)-ATPásica da fração microsomal de leveduras que superexpressam *Ccc2* não é inibida pelo quelante de cobre BCA. Cepas de leveduras Δ CCC2 transformadas com plasmídeos YEp contendo os genes CCC2 ou o mutante D627A foram crescidas em meio *Drop out base* e a análise do crescimento foi realizada conforme descrito na Figura 24. Frações de membranas totais dessas cepas foram obtidas conforme descrito em Materiais e Métodos. As frações (0,25 mg/mL) foram incubadas em presença de redutores (ácido ascórbico 100 μM e Na₂SO₃ 1 mM) ou BCA nas concentrações indicadas na abscissa. As outras condições foram as mesmas descritas em Materiais e Métodos (item 2.7). A atividade hidrolítica corresponde à média ± erro padrão de três experimentos em triplicata, realizados com pelo menos duas preparações de membrana diferentes. Como as inclinações das retas não diferem significativamente de 0 (zero), duas linhas horizontais foram traçadas ao nível do valor médio dos quatro conjuntos de determinações. A atividade Cu(I)-ATPásica é definida como a diferença entre os valores de hidrólise de ATP de *Ccc2* e D627A na presença de redutores (chave).

frações microssomais de *S. cerevisiae* concentrações crescentes de BCA não promovem qualquer efeito sobre a atividade ATPásica. Levando-se em conta que o mutante D627A gera uma ATPase não funcional, pode-se inferir que a diferença entre as atividades ATPásicas totais em presença dos redutores refere-se à atividade Cu(I)-ATPásica de Ccc2. Já a Figura 30 mostra que concentrações crescentes de BCS promovem uma inibição da atividade ATPásica de ambas as frações, embora de maneira diferenciada. O decréscimo mais drástico da atividade das frações Ccc2 quando a concentração de BCS é aumentada para 50 μM e a supressão da diferença entre as atividades das frações Ccc2 e D627A com 250 μM (o que significa inibição total da Cu(I)-ATPase), indica uma maior sensibilidade da primeira ao quelante. A inibição da atividade ATPásica das frações D627A provocada pelo BCS mostra que outras ATPases presentes na preparação são afetadas pela presença do quelante, não necessariamente através do seqüestro de íons, mas talvez pela formação de pontes dissulfeto com resíduos de cisteína destas enzimas, alterando a sua estrutura terciária e, conseqüentemente, a sua atividade.

As diferenças constitutivas entre as frações microssomais de células *Sf9* e de *S. cerevisiae* poderiam ser uma explicação para a diferença de sensibilidade a BCA e BCS entre a atividade ATPásica mostrada por Lowe *et al.* (2004) e a encontrada nesta tese. As composições protéica e lipídica díspares destas membranas podem resultar em maior ou menor acesso de moléculas às proteínas integrais ali presentes, mas, em paralelo, as características inerentes às moléculas de BCS e BCA podem conferir a estes quelantes capacidades desiguais de realizar interações (Figura 28). É importante mencionar que a molécula de Cu(I)-ATPase parece ter sempre Cu(I) ligado e ocluído em algum domínio, independentemente da etapa do ciclo de transporte que esteja ocorrendo (Tsivkovskii *et al.*, 2002). A molécula de Ccc2 tem dois resíduos de cisteína (motivo CPC) no sexto segmento transmembrana que parecem estar envolvidos na coordenação de íons Cu(I) e no seu

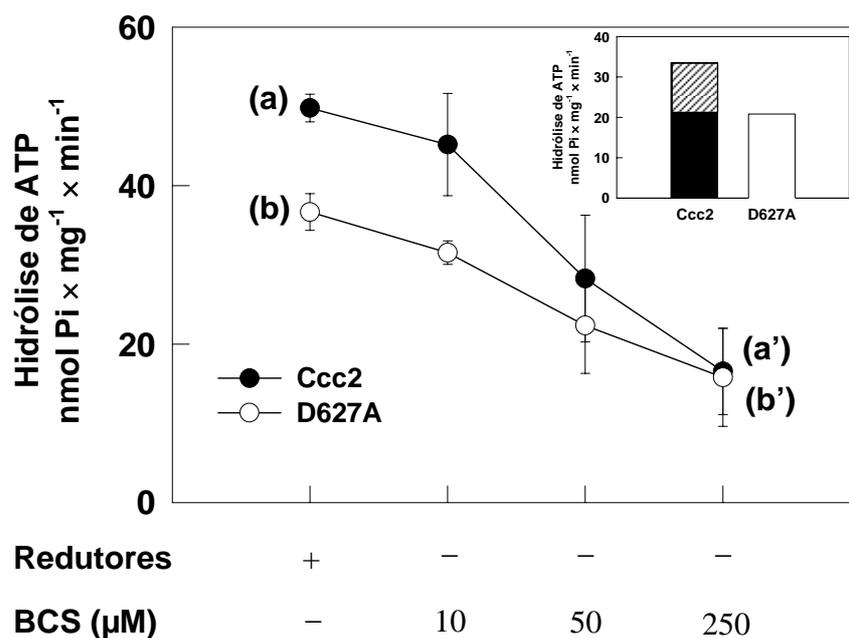


Figura 30. A atividade Cu(I)-ATPásica da fração microsomal de leveduras que superexpressam Ccc2 é progressivamente abolida por concentrações crescentes do quelante de cobre BCS. A hidrólise de ATP catalisada por frações microsomais de membranas de leveduras Δ CCC2, transformadas com plasmídeo YEp contendo os genes CCC2 (●) ou o mutante D627A (○), foi ensaiada na presença ou na ausência de agentes redutores e na ausência ou presença de BCS como indicado na abscissa. As outras condições foram as mesmas descritas em Materiais e Métodos (item 2.7). A figura no *inset* corresponde às diferenças entre as atividades ATPásicas das frações na ausência e presença de BCS (250 μ M) ($[a - a']$ e $[b - b']$). O retângulo hachurado, por sua vez, representa a diferença entre a atividade das frações Ccc2 e D627A ($12,7 \text{ nmoles Pi} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) e corresponde à atividade de Ccc2, sendo essencialmente igual à diferença das atividades das duas frações em presença dos agentes redutores (ver Figura 31). Os pontos correspondem à média \pm erro padrão de três experimentos em triplicata.

transporte para o lúmen do Golgi (Lowe *et al.*, 2004). O resíduo C585, em particular, é necessário para a ligação do metal seguida de fosforilação (etapas 1 e 2; ciclo da Figura 14). Somente um quelante com hidrofobicidade suficientemente alta para se particionar na bicamada lipídica do Golgi (como o BCS) poderia interagir com o CPC e seu entorno, removendo o Cu(I) ligado durante a pré-incubação das membranas a 4 °C. Esta remoção poderia ocorrer simultaneamente com a remoção de Cu(I) dos MBDs da região N-terminal expostos à água. No caso das células *Sf9*, o baixo grau de saturação dos ácidos graxos e a baixa concentração de colesterol nas suas membranas (Marheineke *et al.*, 1998) permitiriam com maior facilidade a partição do relativamente mais hidrofílico BCA e, conseqüentemente, a inibição parcial da Cu(I)-ATPase superexpressa nestas células.

Em consonância com as diferentes capacidades de interação dos quelantes propostas, foi demonstrado que BCS é capaz de inibir 50% da atividade de CopB em concentrações menores (4 µM) do que BCA (14 µM) (Bissig *et al.*, 2001) e que 300 µM de BCA removem apenas 10% do Cu(I) ligado ao MBD2 da ATPase de Wilson (Walker *et al.*, 2004), enquanto apenas o BCS é capaz de remover o Cu(I) ligado à Arr4 (uma ATPase solúvel ligadora de Cu) (Metz *et al.*, 2006) e à superóxido dismutase (Rae *et al.*, 1999). É possível, portanto, que o BCS possa seqüestrar não apenas o Cu que está solúvel, mas também o Cu(I) já coordenado pela Cu(I)-ATPase, como discutido acima.

A diferença entre as atividades das frações Ccc2 e D627A ($12,7 \text{ nmoles Pi} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) demonstradas no *inset* da Figura 30 (que representam a diferença entre as atividades na ausência de BCS e na presença de BCS 250 µM) é equivalente à diferença das atividades das duas frações ($13,1 \text{ nmoles Pi} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) em presença dos agentes redutores (Figura 31; ver também Figura 29), podendo assim ser caracterizada como a atividade Cu(I)-ATPásica de Ccc2 detectada pela primeira vez em frações microsossomais de leveduras (seu meio ambiente natural) que a superexpressam. Esta atividade é mais baixa do que aquela encontrada em

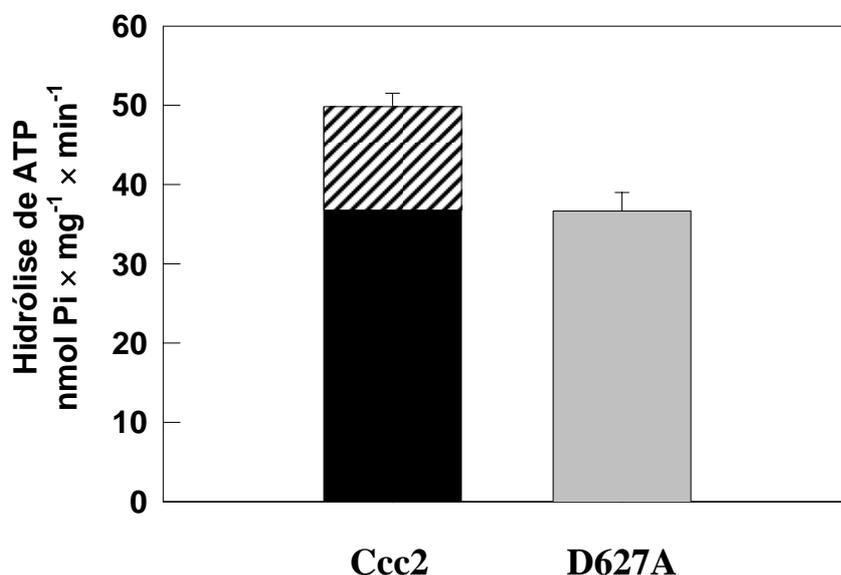


Figura 31. Atividade ATPásica de frações microsossomais de leveduras contendo os genes CCC2 ou o mutante D627A. A hidrólise de ATP catalisada por frações microsossomais de membranas de leveduras Δ CCC2 transformadas com o plasmídeo YEp contendo os genes CCC2 ou o mutante D627A foi ensaiada na presença de agentes redutores (ácido ascórbico 100 μ M e Na₂SO₃ 1 mM) e ausência de quelantes de Cu. As outras condições foram as mesmas descritas em Materiais e Métodos (item 2.7). A atividade Cu(I)-ATPásica foi definida como a diferença entre os valores das frações Ccc2 e D627A (retângulo hachurado - 13,1 nmoles Pi \times min⁻¹ \times mg⁻¹), tendo essencialmente o mesmo valor da atividade representada pela área hachurada do *inset* da Figura 30 (12,7 nmoles Pi \times min⁻¹ \times mg⁻¹). A atividade hidrolítica corresponde à média \pm erro padrão de quatro experimentos em triplicata, realizados com pelo menos duas preparações de membrana diferentes.

membranas de células *Sf9* (Figura 32). Todavia, em células *Sf9* transformadas, a Cu(I)-ATPase superexpressa representa 7% das proteínas totais, enquanto que em leveduras na fase exponencial de crescimento é a H⁺-ATPase (Pma1) a proteína predominante (van der Rest *et al.*, 1995). Os dados da Figura 32, obtidos a pH 8,0 (o ótimo para a Cu(I)-ATPase, ver Figura 35) mostram que – quando adequadamente transformadas – as próprias células de *S. cerevisiae* são capazes de superexpressar níveis de Ccc2 com conservadas propriedades catalíticas.

A atividade Cu(I)-ATPásica inibida por BCS é passível de reversão por agentes redutores e por Cu²⁺ 1 μM, retornando ao nível controle (Figura 33), o que confirma se tratar de uma atividade dependente de Cu(I). Frações microsossomais de membrana contendo Ccc2 foram pré-incubadas na presença de BCS 50 μM e ressuspensas em meio contendo os agentes redutores ou em meio contendo estes agentes e CuSO₄ 1 μM. A atividade recuperada nesta última condição (13,1 nmoles Pi × min⁻¹ × mg⁻¹), é igual à diferença das atividades das frações Ccc2 e D627A em presença dos agentes redutores mostrada na Figura 31. O requerimento de altas concentrações de agentes redutores para a recuperação da atividade ATPásica (Figura 33) após tratamento com BCS sugere também a necessidade adicional de reduzir novamente os resíduos de cisteína que teriam sido oxidados pelo quelante ao se remover os íons Cu coordenados na Cu(I)-ATPase. Durante o complexo ciclo fisiológico de captação, transporte intracelular e transferência do íon para o sítio intramembranar de Ccc2 responsável pelo seu transporte para o lúmen do Golgi em leveduras, o ambiente intensamente redutor seria garantido pela alta concentração citosólica de glutathiona (Penninckx, 2002).

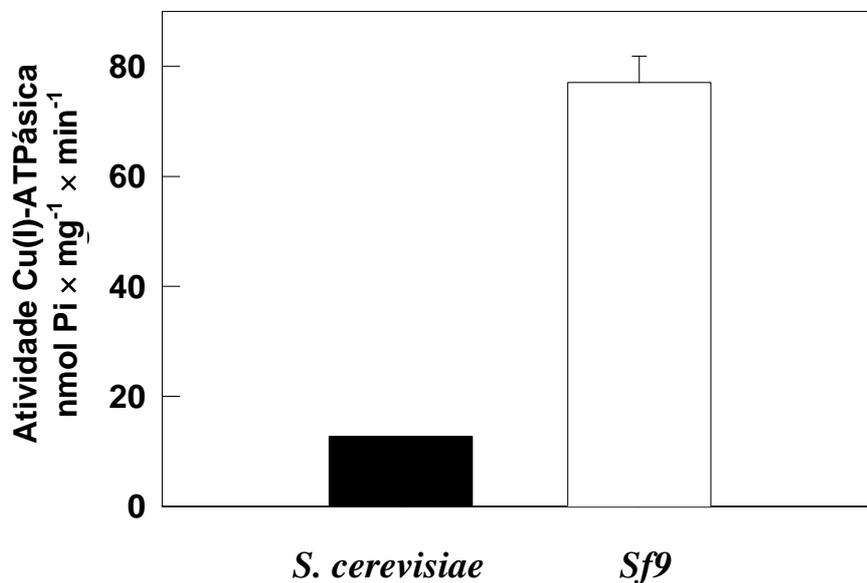


Figura 32. Comparação da atividade da Cu(I)-ATPase superexpressa em *S. cerevisiae* e em células *Sf9*. Coluna cheia: atividade Cu(I)-ATPásica em membranas de *S. cerevisiae*, determinada como indicado no *inset* da Figura 30. Coluna vazia: atividade Cu(I)-ATPásica em membranas de células *Sf9*. Células *Sf9* foram transformadas como indicado em Materiais e Métodos e as membranas obtidas como descrito em Miras *et al.* (2001), exceto que o CaCl₂ foi omitido durante o procedimento. A atividade Cu(I)-ATPásica em membranas de células *Sf9* foi calculada pela diferença entre aquela obtida na ausência de quelantes de Cu e na presença de BCA e BCS (ambos a uma concentração de 0,25 mM). Nestas membranas, a atividade na presença de BCA e BCS é essencialmente igual àquela obtida em membranas provenientes de células transfectadas com o gene D627A ou com o plasmídeo vazio).

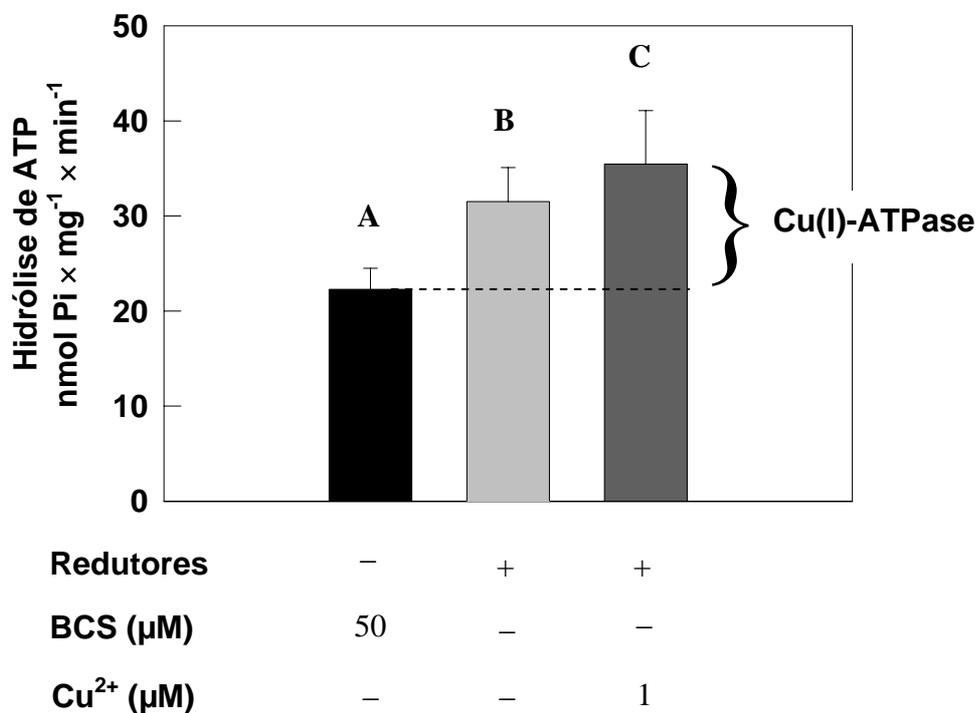


Figura 33. Recuperação da atividade ATPásica inibida por BCS 50 μM, após remoção do quelante e adição de agentes redutores. Frações microsomais de leveduras ΔCCC2 transformadas com o plasmídeo YEp contendo o gene CCC2 foram pré-incubadas por 30 min a 4 °C no meio de reação descrito em Materiais e Métodos (item 2.7), na ausência de agentes redutores e ATP, na presença de BCS 50 μM. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 19000 × g por 20 min a 4 °C. As membranas sedimentadas foram ressuspendidas no meio de reação (sem ATP) contendo BCS 50 μM e na ausência de redutores (A), na presença de ascorbato 100 μM e Na₂SO₃ 1 mM (B) ou na presença destes agentes redutores, além de CuSO₄ 1 μM (C). Após 30 min de nova pré-incubação a 4 °C, os tubos foram aquecidos a 37 °C por 10 min e a reação de hidrólise foi iniciada pela adição de [γ-³²P]ATP 5 mM. Os valores correspondem à média ± desvio padrão de amostras em quadruplicata.

4. Imunodeteccção de Ccc2 e D627A nas frações totais de membrana de *S. cerevisiae*

As diferenças detectadas entre as atividades ATPásicas das frações Ccc2 e D627A mostradas nas Figuras 29 a 31 poderiam ser decorrentes de uma menor presença de proteínas com atividade ATPásica nas frações D627A. De forma a conferir esta possibilidade, realizou-se uma eletroforese em SDS-PAGE para verificar se o perfil protéico das frações era semelhante. A Figura 34A mostra um gel SDS-PAGE corado em *Coomassie Blue* (conforme descrito em Materiais e Métodos) e demonstra que a composição protéica das duas frações era idêntica. Todavia, a quantidade de cópias de Ccc2 e D627A ainda poderia ser diferente nas frações, a despeito da semelhança inicial mostrada pela coloração do gel. Portanto, foi realizada a imunodeteccção destas proteínas no gel, utilizando um anticorpo policlonal (coelho) gerado contra o peptídeo ⁶⁶⁰CIKATESISDHPVSKAIRY (ver a seqüência completa de aminoácidos de Ccc2 na Figura 15). As diluições do anticorpo primário anti-Ccc2 e do anticorpo secundário foram 1:5000. A Figura 34B mostra que a imunodeteccção de Ccc2 não foi maior do que a imunodeteccção de D627A nas respectivas frações microsossomais (pelo contrário, a marcação do mutante foi ainda maior do que a marcação de Ccc2). Em conjunto, estes dados permitem descartar a hipótese de que a diferença entre as atividades poderia ser decorrente da presença de um número maior de cópias de Ccc2 na preparação de membranas totais de levedura ou a concentrações maiores de outras ATPases nestas frações, o que seria decorrente de alterações fisiológicas nas cepas derivadas do processo de transformação com os plasmídeos. Este controle pode ser considerado relevante, uma vez que, por razões ainda não elucidadas, alguns mutantes têm níveis de expressão reduzidos ou indetectáveis na fração microsossomal (ver Figura 38 mais adiante).

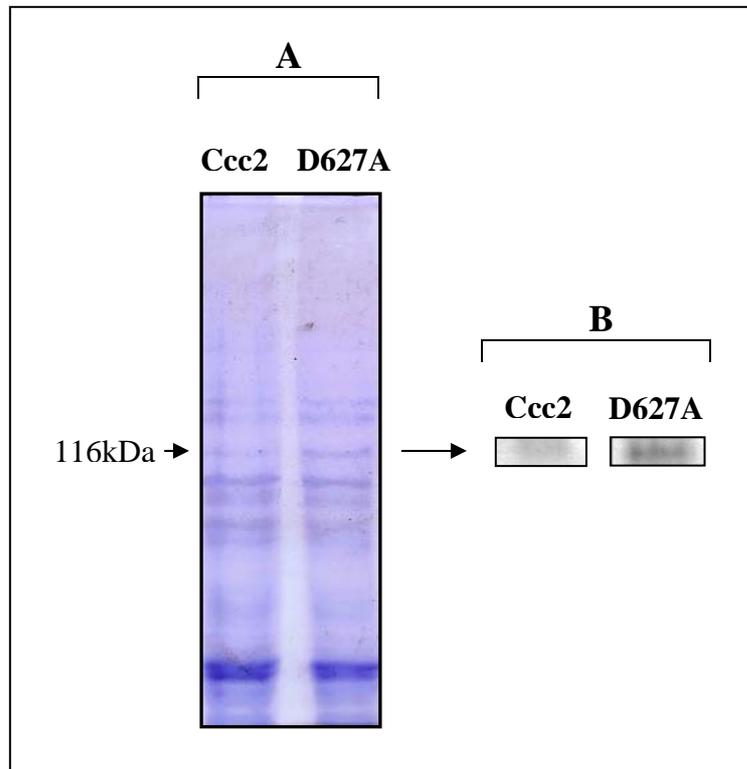


Figura 34. A diferença observada entre as atividades ATPásicas das frações Ccc2 e D627A não decorre de diferenças na expressão das ATPases correspondentes. A figura mostra o perfil eletroforético das proteínas das frações Ccc2 e D627A (A) e a imunodeteção destas proteínas utilizando-se anticorpo policlonal anti-Ccc2 (B). Frações microsossomais de membrana foram obtidas de cepas de leveduras Δ CCC2 transformadas com plasmídeos YEp contendo os genes CCC2 ou o mutante D627A, conforme descrito em Materiais e Métodos e na legenda da Figura 29. As proteínas destas duas frações (50 μ g/lane) foram separadas em SDS-page (10%) e coradas com *Coomassie Blue* (A) e submetidas à imunodeteção empregando o anticorpo policlonal anti-Ccc2 1:5000 (B). À esquerda da Figura A está indicado o peso molecular de Ccc2.

5. Efeito de variações de pH sobre a atividade Cu(I)-ATPásica

Uma das características fisiológicas mais importantes das células de *S. cerevisiae* é o requerimento de pH ácido para seu crescimento ótimo, uma vez que adequadas concentrações de H^+ intracelular são necessárias para a importação de aminoácidos em permuta por este íon (van der Rest *et al.*, 1995; Serrano, 1996). Como mencionado brevemente no ponto 1 desta seção, defeitos genéticos que afetam a parede celular (entre outros) estão envolvidos na hipersensibilidade a pH alcalino, que, por sua vez, influencia o ambiente intracelular (Calahorra *et al.*, 1998).

Como já descrito, um dos objetivos desta tese é o de investigar o papel da Cu(I)-ATPase na resposta da célula de levedura a alterações ácido-base e de dissecar o papel que desempenhariam – em diferentes pHs – os domínios da ATPase envolvidos na ligação e na transferência de Cu(I). O primeiro conjunto de experimentos, destinados a caracterizar molecularmente o fenótipo de resistência parcial a pH alcalino, foi desenvolvido para investigar a resposta da atividade hidrolítica de ATP catalisada por Ccc2 frente a variações de pH. A hipótese formulada foi a de que, se a Cu(I)-ATPase desempenhasse um papel cada vez mais importante na transferência de Cu(I) para o lúmen do Golgi à medida que aumenta o pH - para assim garantir a viabilidade e o crescimento celulares - sua atividade seria grandemente estimulada à medida que aumentasse o pH.

Uma vez que em preparações de membranas de levedura a medida da atividade ATPásica sempre sofre a interferência da alta atividade H^+ -ATPásica, principalmente daquela presente na membrana plasmática, foi necessário contornar esta dificuldade. A H^+ -ATPase de membrana plasmática não possui inibidor específico descrito e o pH ótimo para sua atividade está em torno de 6,0 (Goffeau e Slayman, 1981), o que inviabilizaria o estudo da dependência de variações de pH da Cu(I)-ATPase em valores baixos de pH utilizando frações de

membrana de levedura. Partindo da observação de que as propriedades cinéticas das P-ATPases em geral são preservadas quando elas são superexpressas em células *Sf9* (Hu e Kaplan, 2000), a dependência do pH foi investigada em extratos de células *Sf9* que superexpressam *Ccc2*.

A Figura 35 mostra que a atividade Cu(I)-ATPásica aumenta ligeiramente entre pH 6,0 e 6,5, que podem ser considerados os valores fisiológicos para o citoplasma de *S. cerevisiae* (Calahorra *et al.*, 1998). À medida que o pH aumenta, a atividade Cu(I)-ATPásica passa também a aumentar drasticamente entre 6,5 e 8,0, permanecendo estável até valores de pH ainda mais alcalinos. A função seguinte pode ser ajustada à variação da atividade com o pH:

$$A = \frac{\text{lim}_1 + \text{lim}_2 (10^{\text{pH}-\text{pK}'})}{(10^{\text{pH}-\text{pK}'}) + 1} \quad (\text{Equação 1})$$

onde lim_1 e lim_2 são, respectivamente, os valores mínimos e máximos teóricos de atividade Cu(I)-ATPásica (abaixo de 6,0 e acima de 8,0) e pK' corresponde ao pK aparente para um conjunto de aminoácidos que, tendo suas cadeias laterais parcialmente dissociadas, contribuiriam criando um ambiente molecular mais propício para a catálise. Deve ser frisado que a atividade máxima é atingida em valores de pH que correspondem ao pK das cadeias laterais das cisteínas, os aminoácidos-chave envolvidos na ligação e transferência de Cu(I) no segmento transmembrana M6 (Figura 11). A dissociação parcial destas cisteínas poderia favorecer a ligação do Cu(I) e sua oclusão após a fosforilação do resíduo D627A por ATP, compensando a dificuldade que o aumento de pH provocaria em relação à transferência de Cu(I) entre *Atx1* e o *MBD1* da Cu(I)-ATPase (ver mais adiante, seção 10).

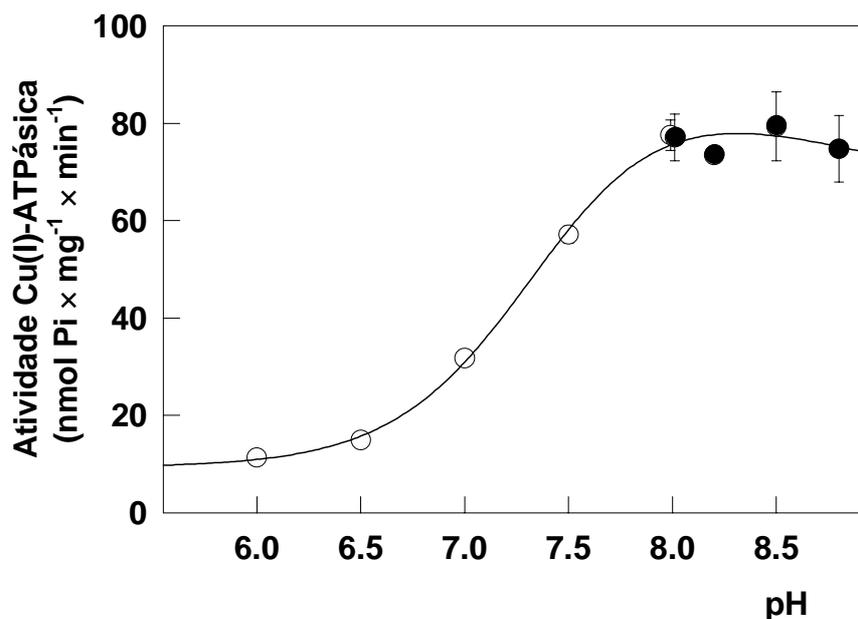


Figura 35. Efeito de variações de pH sobre a atividade Cu(I)-ATPásica. Frações de membrana de células *Sf9* que superexpressam Ccc2 foram obtidas conforme descrito em Materiais e Métodos (seção de Materiais). As frações (0,25 mg/mL) foram pré-incubadas por 30 min a 4 °C em meios contendo tampão MOPS-KOH (círculos vazios) ou EPPS-KOH (círculos cheios) 20 mM (valores de pH indicados na abscissa), MgSO₄ 5 mM, K₂SO₄ 50 mM, NaF 10 mM, thapsigargina 1 μM, SDS-β-D-maltosídeo 0,2% (p/v) e glicerol 4 % (v/v) na presença de redutores (ácido ascórbico 100 μM e Na₂SO₃ 1 mM) ou de BCS mais BCA (0,25 mM cada, sem redutores). Após este período, as amostras foram aquecidas até 37 °C e a reação foi iniciada pela adição de [γ-³²P]ATP (concentração final 1 mM). A reação foi parada após 10 min pela adição de 2 vol de carvão ativado e, após centrifugação dos tubos por 30 min a 19000 × g, alíquotas do sobrenadante foram contadas em contador de cintilação líquida para determinar a quantidade de ³²Pi liberado. O tampão empregado entre pH 6,0 e pH 8,0 foi MOPS-KOH (pK = 7,2); entre 8,0 e 8,8 foi EPPS-KOH (pK = 8,0). Os pontos correspondem a pelo menos quatro determinações empregando diferentes frações de membrana e foram ajustados pela Equação 1 (ver texto).

É também interessante mencionar que na mesma faixa de pH em que se observa um grande aumento da atividade Cu(I)-ATPásica, dissociam-se também as cadeias laterais de histidinas. Os resíduos conservados H670 em Ccc2 e H1069 e H462 nas ATPases de Wilson e de *Archaeoglobus fulgidus*, encontram-se estrategicamente localizadas no domínio de ligação de nucleotídeo de P1-ATPases (domínio N) orientado face-a-face com o domínio de fosforilação (Figura 36), o que conferiria a estas histidinas a capacidade de regular a afinidade por ATP. O significado destas histidinas altamente conservadas na catálise de Cu(I)-ATPases e, portanto, no funcionamento das células onde se localizam, pode ser deduzido a partir da constatação de que a mutação H1069Q é a mais comum entre pacientes com a doença de Wilson em populações do norte da Europa (Thomas *et al.*, 1995). O estímulo com o aumento do pH da atividade de Ccc2 perfeitamente acoplada poderia, assim, constituir uma das bases moleculares-chave para o adequado tráfico de Cu desde o exterior até o lúmen do Golgi. Esta questão será retomada mais adiante.

6. Papel da região N-terminal de Ccc2 na catálise e no endereçamento celular em *S. cerevisiae*

Como mencionado na seção correspondente, um dos objetivos desta tese foi o de investigar o papel da região N-terminal na hidrólise de ATP catalisada pela Cu(I)-ATPase, no endereçamento celular da ATPase e na resposta à alteração ácido-base em células de *S. cerevisiae*. Uma vez demonstrada a atividade hidrolítica de Ccc2 em preparações de membrana de leveduras e caracterizado o perfil de ativação por alto pH, passou-se então ao estudo dos possíveis domínios na região N-terminal que poderiam ser importantes nos processos mencionados no parágrafo anterior.

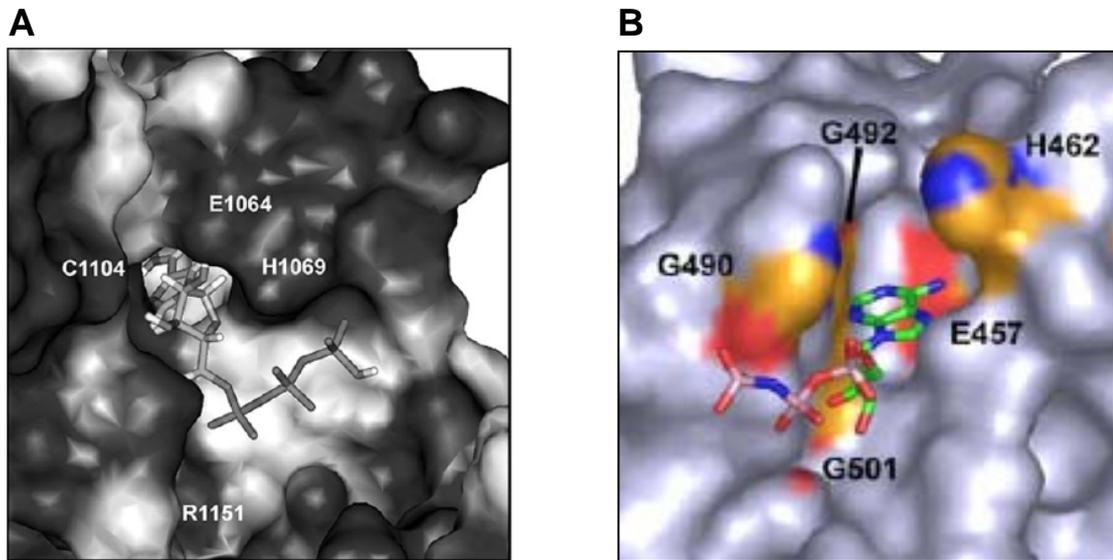


Figura 36. Modelo estrutural da superfície do domínio de ligação de nucleotídeo (domínio N) nas Cu(I)-ATPases ATP7B (A) e CopA (B). A localização do ATP é mostrada (átomos coloridos em “B”), assim como os resíduos H1069 (A) e H462 (B) no entorno do domínio N. A representação A mostra ainda o resíduo de arginina R1151. Extraídas de Morgan *et al.* (2004) e Sazinsky *et al.*, (2006) (“A” e “B”, respectivamente).

As Figuras 37 e 38 mostram dois aspectos diferentes da perda de funcionalidade da Cu(I)-ATPase de levedura desprovida de sua região N-terminal (Figura 16). A Figura 37A revela que, apesar da preservação completa dos domínios P e N em Δ N-ter, não ocorre a fosforilação no resíduo D627 do centro ativo. Isto revela que, a despeito da preservação dos sítios de ligação de Cu(I) no domínio constituído pelos segmentos transmembrana M6, M7 e M8 de Ccc2 (centrado em C583 e C585 de M6), não ocorre a ligação de Cu(I) necessária para a fosforilação por ATP (Figura 14). Esta situação, que mimetiza a encontrada por Lowe e colaboradores (2004) com o mutante C585S, revela claramente uma Cu(I)-ATPase sem atividade hidrolítica.

Pelas razões que se depreendem da Figura 38, o experimento de fosforilação mostrado na figura anterior foi realizado empregando-se uma preparação de Δ N-ter expressa em células *Sf9*. Nas membranas destas células, a Cu(I)-ATPase pode ser imunodetectada (Figura 37B), o que não ocorre nas membranas de levedura (Figura 38, painel da esquerda). A ausência de Δ N-ter nas frações de membrana de leveduras indica um possível endereçamento para um compartimento não membranar e, portanto, não recuperável na fração microsomal. Estes experimentos foram realizados com Ccc2 (controle) e diferentes mutantes conjugados a GFP nas frações microsomais de membranas de cepas Δ CCC2 transformadas com os respectivos plasmídeos, para utilizar as mesmas membranas das cepas utilizadas a seguir em experimentos de microscopia confocal (Figura 39). A análise das proteínas fusionadas a GFP através da utilização de anticorpo anti-GFP mostra a marcação para Ccc2 e D627A na altura correspondente à soma do peso molecular destas enzimas (116 kDa) com o peso molecular de GFP (29 kDa), mas nenhuma marcação foi detectada para o mutante Δ N-ter (*lane 3*, painel da esquerda). É interessante acrescentar que a marcação as membranas contendo o mutante M1(ss) (*lane 4*, painel da esquerda) encontra-se levemente abaixo das bandas referentes a Ccc2.GFP (*lane 1*, painel da esquerda) e D627A.GFP (*lane 2*, painel da esquerda), em

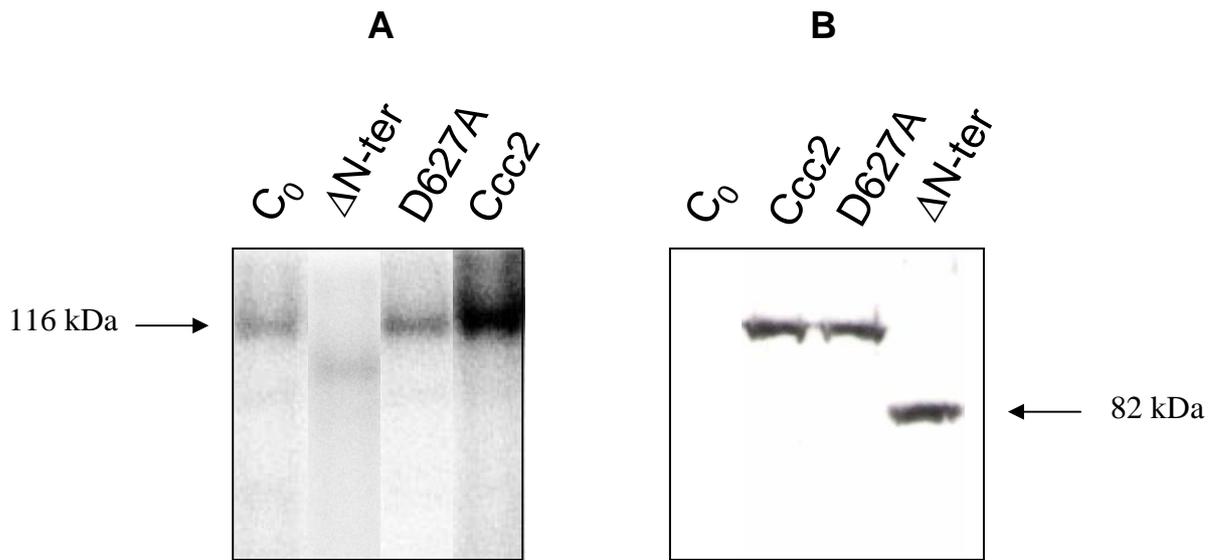


Figura 37. O mutante ΔN -ter não é fosforilado por $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ na presença de Cu contaminante. (A): Fosforilação. Frações de membrana de células *Sf9* que expressam Ccc2, ΔN -ter ou D627A (ou transformadas com o baculovírus sem o gene – C₀) foram obtidas conforme descrito em Materiais e Métodos (seção de Materiais). 50 μg de membranas foram suspensas em 200 μL de Bis-TRIS propano 20 mM (pH 6,0), KCl 200 mM e MgCl_2 5 mM a 0 °C. A fosforilação foi iniciada adicionando-se 5 μM de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e conduzida durante 45 s. Outras condições, tratamento das membranas fosforiladas e detecção da fosfoenzima estão descritas em Materiais e Métodos. (B): Imunodeteção de Ccc2 e suas variantes em 40 μg de frações de membrana de células *Sf9* submetidas a SDS-PAGE, utilizando-se o anticorpo policlonal anti-Ccc2. As setas indicam as bandas de 116 kDa e 82 kDa, referentes ao peso molecular de Ccc2 e ΔN -ter. Cortesia de Rafael Valverde.

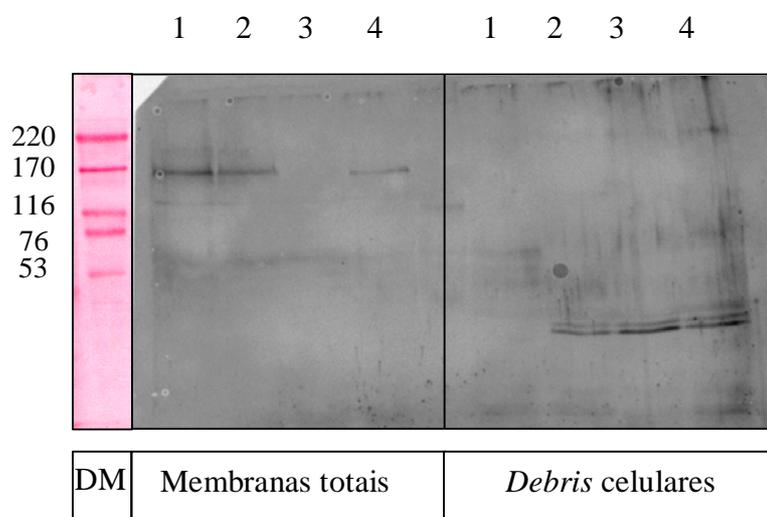


Figura 38. A remoção da região N-terminal de Ccc2 não permite sua inserção na membrana do trans-Golgi. Células Δ CCC2 foram transformadas com o plasmídeo pCEN contendo os genes CCC2.GFP (1), D627A.GFP (2), Δ N-ter.GFP (3) ou M1(ss).GFP (4). As células foram cultivadas em meio *Drop out* líquido com Cu e Fe contaminantes, sem uracila e suplementado com aminoácidos (exceto leucina) até a metade da fase exponencial de crescimento (D.O. aproximadamente igual a 1,0). Em seguida, deu-se início à preparação de uma fração de membranas totais, reservando-se os *debris* celulares recuperados imediatamente após a lise celular (ver Materiais e Métodos). As proteínas destas duas frações (50 μ g/lane) foram separadas em SDS-page (10%) e submetidas à imunodeteção empregando o anticorpo policlonal anti-GFP (ver Materiais e Métodos) conforme mostrado nos painéis principais. O painel colorido (coloração com *Rouge ponceau*) mostra os padrões de peso molecular (DM), com os valores indicados.

consonância com o seu menor peso molecular devido à remoção do MBD2 (ver Materiais e Métodos).

A análise dos *debris* celulares (painel da direita) pode fornecer subsídios para compreender a diferença de marcação encontrada. A Figura 38 mostra, no painel da direita, a imunodeteção para GFP próximo ao peso molecular desta proteína, indicando a ocorrência de degradação parcial (provavelmente por proteólise) dos mutantes D627A (*lane 2*) e M1(ss) (*lane 4*) e total do mutante Δ N-ter (*lane 3*), mas não da enzima íntegra (*lane 1*). Pode-se observar que as marcações para GFP referentes a cada uma das enzimas são complementares (comparar os painéis da esquerda e da direita), indicando que a degradação de Ccc2 também depende da preservação de sua capacidade catalítica, já que nem D627A nem Δ N-ter funcionam. As preparações de membrana das quatro cepas foram realizadas simultaneamente, utilizando-se as mesmas soluções contendo inibidores de proteases, de forma que se pode descartar a possibilidade de as diferenças nas marcações serem derivadas de proteólise ocorrida durante o processo de obtenção das frações microssomais. A marcação para GFP fusionada ao mutante Δ N-ter encontrada exclusivamente nos *debris* celulares (células não rompidas, frações de núcleo, etc...) confirma a alteração de localização da enzima resultante da ausência da região N-terminal. A observação de que o mutante M1(ss) é recuperado nas membranas (Figura 38) sugere que, apesar da atenuada funcionalidade da cepa que o expressa (ver Figuras 44 e 47 mais adiante), o direcionamento correto de Ccc2 para as membranas do Golgi dependeria mais de uma sequência de reconhecimento na região do MBD1 do que da ligação de Cu(I) neste domínio.

Para verificar a hipótese apresentada no parágrafo anterior, foram realizados experimentos de microscopia confocal para comparar a localização das Cu(I)-ATPases Ccc2 e Δ N-ter fusionadas a GFP. As cepas Δ CCC2 transformadas com plasmídeos pCEN contendo os constructos Ccc2.GFP e Δ N-ter.GFP foram submetidas a crescimento em meio líquido

(*Drop out*, ver composição em Materiais e Métodos), sem adição de Cu, até a fase exponencial (como na Figura 24). Após este período, as células foram imediatamente centrifugadas, lavadas em PBS por duas vezes e aplicadas em lâmina para observação ao microscópio confocal. Os resultados apresentados na Figura 39 mostram que a marcação correspondente às cepas que expressam CCC2 é encontrada por toda a célula, enquanto que a marcação de ΔN -ter parece restringir-se ao interior de grandes vacúolos celulares. Estes resultados sugerem que Ccc2 desprovida na região N-terminal é encaminhada para vacúolos ou endossomas para degradação, ou por não apresentar a seqüência sinalizadora presente nesta região (Blobel e Sabatini, 1970; Humphrey *et al.*, 1993; Northwehr *et al.*, 1993; Ponnambalam *et al.*, 1994; Scwappach *et al.*, 1998), ou por ser identificada pela célula como uma enzima não-funcional. A proteólise de ΔN -ter em vacúolos seria, portanto, a causa de seu desaparecimento das membranas, como mostrado na Figura 38 (painel da esquerda).

Se os resultados com o mutante M1(ss) introduzem algum elemento de controvérsia acerca do paradigma “ligação de Cu(I) nos MBDs \leftrightarrow tráfego e direcionamento correto de Cu(I)-ATPases” (Vanderwerf *et al.*, 2001; Mercer *et al.*, 2003), aqueles mostrados nas Figuras 38 e 39 trazem um outro adicional. Muito embora as Figuras 38 e 39 se complementem para confirmar a hipótese de que a região N-terminal é essencial para o adequado endereçamento de Cu(I)-ATPases, a Figura 37, em contraste com o observado por Voskoboinik *et al.* (2001), mostra que ela também o é para a fosforilação por ATP. Esta diferença no comportamento de ΔN -ter pode ser devida a uma acentuada diminuição da afinidade da enzima pelo Cu. A máxima fosforilação de Ccc2 por ATP é alcançada com concentrações contaminantes do metal (Lowe *et al.*, 2004), o que não ocorreria com ΔN -ter. Novas análises ainda devem ser realizadas com este mutante em diferentes condições (especialmente variando-se as concentrações de Cu^{2+} no meio).

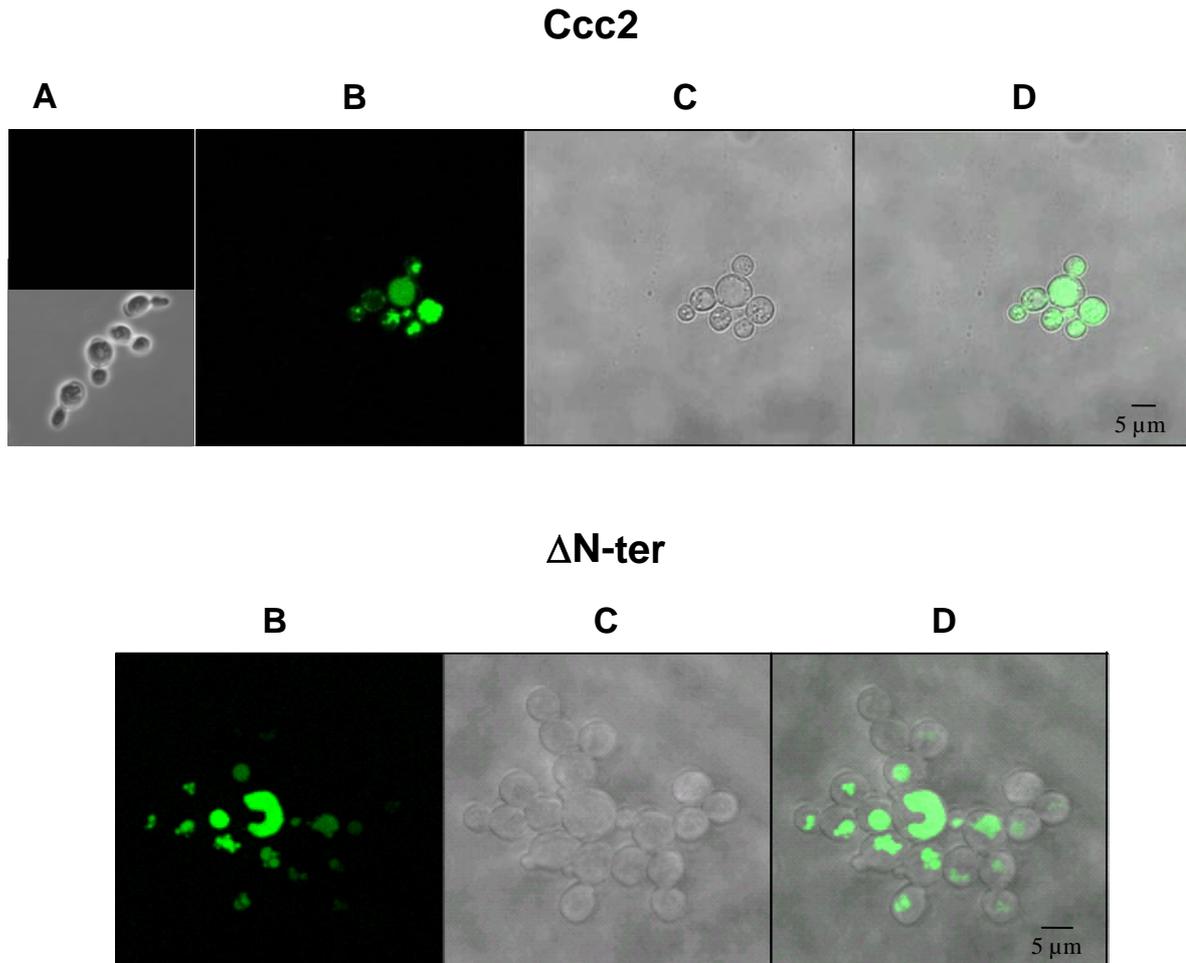


Figura 39. Mutantes ΔN -ter têm distribuição intracelular diferente de Ccc2. As culturas de células $\Delta CCC2$ transformadas com o plasmídeo pCEN contendo os genes CCC2 ou ΔN -ter fusionados a GFP foram realizadas em meio *Drop out* (sem leucina e uracila) e paralisadas após as células terem atingido a metade da fase exponencial de crescimento. As células foram então lavadas duas vezes em PBS e imediatamente aplicadas sobre a lâmina para observação no microscópio confocal (aumentos em objetiva de $40\times / 1.3$ para as imagens das cepas Ccc2 e $63\times / 1.4$ óleo para as imagens das cepas ΔN -ter), conforme indicado na figura. (A) Imagens obtidas com cepa transformada com YEp.CCC2 sem GFP (acima, imagem de fluorescência; abaixo, imagem de fase); (B) Imagem de fluorescência de cepas $\Delta CCC2$ transformadas com os plasmídeos pCEN.CCC2.GFP ou pCEN. ΔN -ter.GFP, conforme indicado; (C) Imagem de fase das populações celulares analisadas; (D) Imagens B e C sobrepostas.

7. Importância da região N-terminal de Ccc2 para o crescimento de *S. cerevisiae*

Após a demonstração da importância do domínio N-terminal na catálise (Figura 37) e no endereçamento de Ccc2 (Figuras 38 e 39), passou-se a investigar seu papel na viabilidade celular de *S. cerevisiae*, analisando a capacidade do mutante Δ N-ter de complementar Δ CCC2, uma cepa que se revelou impossibilitada de crescer em meio restritivo em Cu e Fe (Figura 26). Mais uma vez, utilizou-se os ensaios de complementação descritos na Figura 26 como forma de avaliar a viabilidade das cepas transformadas com o gene mutante e, conseqüentemente, a contribuição da enzima truncada para o crescimento celular. A Figura 40 mostra que cepas Δ CCC2 transformadas com plasmídeos YEp. Δ N-ter não são capazes de crescer em meio restritivo em Cu e Fe, o que confirma a importância da região N-terminal para o adequado fornecimento destes cátions à maquinaria celular da levedura. As mesmas cepas Δ CCC2, quando transformadas com o plasmídeo YEp vazio, também são incapazes de crescer, o que permite concluir que a presença de Ccc2 funcional é essencial para o fenótipo de crescimento em meio ácido (pH 6,1) deficiente em Cu e Fe (ver Tabela 5).

8. Efeito da variação do pH extracelular na viabilidade celular de cepas Δ CCC2 transformadas

A habilidade em responder rapidamente a mudanças no meio ambiente, tais como flutuações na temperatura e no pH, concentração e disponibilidade de nutrientes, dentre outras, é importante para a sobrevivência das células de modo geral. O pH externo pode servir como um potente indutor de diferenciação e desenvolvimento e, no caso de microrganismos patogênicos, a capacidade de se adaptar a mudanças no pH (por exemplo, migração entre diferentes órgãos do corpo humano) é importante para o estabelecimento da patogenicidade.

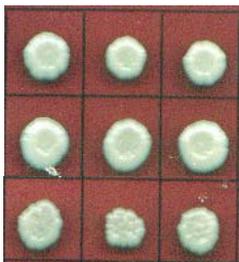
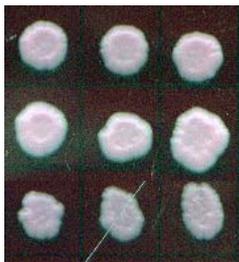
	Meio 1 (Ferrozina) Baixo Cu e Baixo Fe	Meio 2 Alto Cu e Baixo Fe	Meio 3 Baixo Cu e Alto Fe
	Clones 1 2 3	Clones 1 2 3	Clones 1 2 3
YE_p			
Ccc2			
ΔN-ter			

Figura 40. Domínios de ligação de metal na região N-terminal de Ccc2 são requeridos para o crescimento da levedura *S. cerevisiae* em meio restritivo em cobre e ferro. Células Δ CCC2 foram transformadas com o plasmídeo YE_p vazio ou com o mesmo plasmídeo contendo os genes CCC2 ou Δ N-ter. A figura mostra ensaios de complementação - monitorados após 72 h - com 2 μ L de inóculo (2×10^6 células/mL) de três diferentes clones de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado nas placas. A obtenção das cepas e a composição dos três meios (sem leucina e sem uracila) com diferentes concentrações de CuSO₄ e FeSO₄.(NH₄)₂SO₄ encontram-se descritas em Materiais e Métodos (ver Tabelas 4 e 5) e na legenda da Figura 26.

Como já mencionado, a adaptação de *S. cerevisiae* a meios alcalinos envolve regulação de um grande número de genes, cuja expressão pode ser induzida quando as células são transferidas de um meio ácido para um meio alcalino (Causton *et al.*, 2001 Lamb *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002). Estes estudos mostram que a expressão de alguns genes que codificam para proteínas envolvidas no metabolismo de Cu e Fe em leveduras pode ser induzida nestas condições, como por exemplo, os genes de Fre1, Fet3, Ctr1, entre outros (ver Figura 8). Mais recentemente, alguns trabalhos utilizando bibliotecas genômicas de leveduras mostraram quais os genes cujas deficiências geram um fenótipo sensível a pH alcalino (Giaver *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2004). Estes últimos autores demonstram que Cu e Fe são os fatores limitantes do crescimento e da sobrevivência de *S. cerevisiae* em pHs alcalinos, através da análise do crescimento de cepas deficientes em vários genes envolvidos no metabolismo de Cu e Fe (Serrano *et al.*, 2004), sendo um deles o gene CCC2 (cepas deficientes neste gene eram incapazes de crescer em meio sólido com pH acima de 7,3).

Os resultados apresentados na Figura 41 mostram que cepas Δ CCC2 transformadas com o plasmídeo YEp. Δ N-ter são incapazes de crescer a pH 7,2 (valor próximo ao pH fisiológico em mamíferos) e 8,0 (assim como a cepa que superexpressa o mutante que não fosforila, D627A). Pode ser observado que – em contraste com o resultado mostrado no meio contendo ferrozina (pH 6,1); Figura 40 – concentrações de Cu 0,3 μ M e Fe 1,6 μ M permitem o crescimento do mutante contendo a Cu(I)-ATPase completamente truncada na região N-terminal a pH 6,5, um fenótipo perdido a pHs mais alcalinos. Em contraste, as cepas que superexpressam o gene CCC2 são capazes de sobreviver nos três valores de pH, embora o crescimento seja gradativamente reduzido (Figura 41). Estes resultados indicam que a presença de Ccc2 funcional é essencial para conferir à *S. cerevisiae* o fenótipo de resistência a pHs alcalinos. Este fenômeno independe do número de cópias da enzima presente nas células, uma vez que cepas selvagens (W303), que apresentam apenas enzimas advindas do genoma

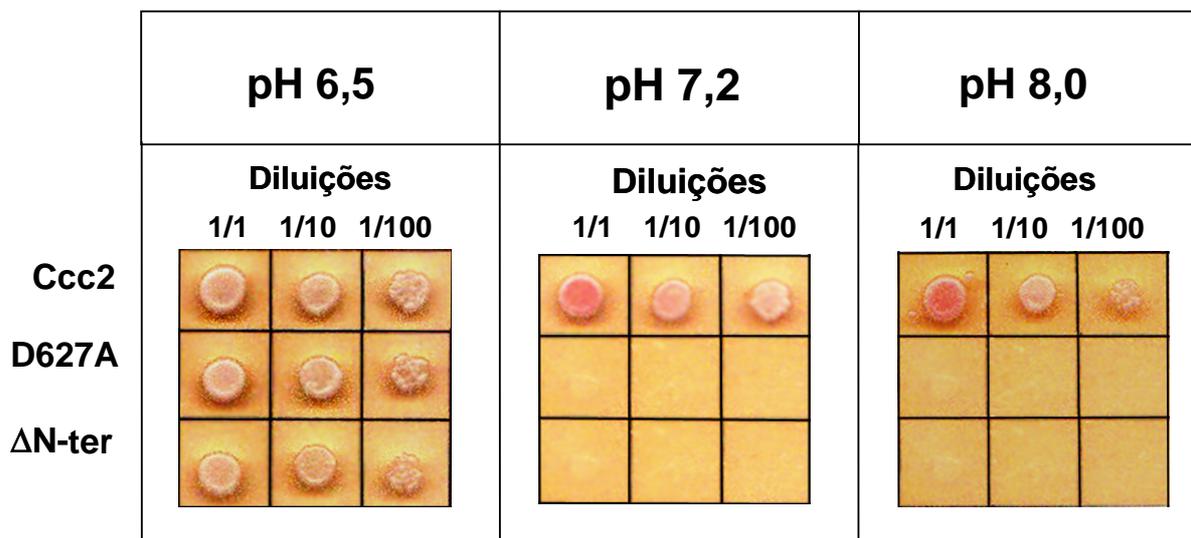


Figura 41. A presença de Ccc2 selvagem é essencial para conferir a *S. cerevisiae* o fenótipo de resistência a pH alcalino. Células Δ CCC2 foram transformadas com plasmídeos YEp contendo os genes CCC2, D627A ou Δ N-ter. A figura mostra ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 μ L de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. A obtenção das cepas que superexpressam as três variantes e a composição do meio (sem leucina e sem uracila), a diferentes valores de pH (6,5; 7,2; 8,0), encontram-se descritas em Materiais e Métodos.

celular, são igualmente capazes de crescer em pHs alcalinos (Figura 42). Estes resultados indicam que em pHs alcalinos, as cepas selvagens de levedura que contém somente as cópias constitutivas de *Ccc2* são capazes de encaminhar o Cu(I) para seus alvos intracelulares, embora de maneira menos eficiente à medida que o pH aumenta. Quando as cepas W303 são transformadas com os plasmídeos YEp.Ccc2, embora a célula passe a apresentar um maior número de cópias de *Ccc2* (as cópias advindas do genoma e as cópias traduzidas a partir do plasmídeo), não se observa um maior crescimento em pHs alcalinos (Figura 43), o que indica que o aumento da expressão de *Ccc2* não provoca uma maior adaptabilidade a estes meios e confirma que o fenótipo observado na Figura 41 não é o resultado de um aumento “não-fisiológico” (para a levedura) de *Ccc2*. De fato, as únicas proteínas cuja expressão aumentada parece refletir um maior crescimento em pHs alcalinos são os transportadores presentes na membrana plasmática Fet4 e Ctr1 (Serrano *et al.*, 2004), um transportador de baixa afinidade ($K_m = 35 \mu\text{M}$) de vários metais como Fe, Cu e outros (Fet4) e o transportador de alta afinidade ($K_m = 1-4 \mu\text{M}$) de Cu(I) (Ctr1). A cepa selvagem usada por estes autores (BY4741) não foi capaz de crescer em meios com pH acima de 7,5, de modo que a cepa W303 parece ser um modelo mais adequado para o estudo do fenótipo de resistência a pHs alcalinos. Deve-se ressaltar que, de fato, não existem cepas de *S. cerevisiae* verdadeiramente selvagens, já que muitas cepas assim consideradas contém caracteres mutantes (Sherman, 2002). Além disso, vários deles podem ser os responsáveis pelas diferenças de resposta ao estresse alcalino entre as cepas BY4741 e W303.

A Figura 43 também mostra que a co-expressão dos mutantes D627A com os genes CCC2 oriundos do genoma da cepa W303 atenua o fenótipo de resistência a pH alcalino. Em nível transcricional, é possível que a presença de um grande número de cópias de D627A possa estar regulando negativamente a transcrição dos genes CCC2 no genoma destas cepas.

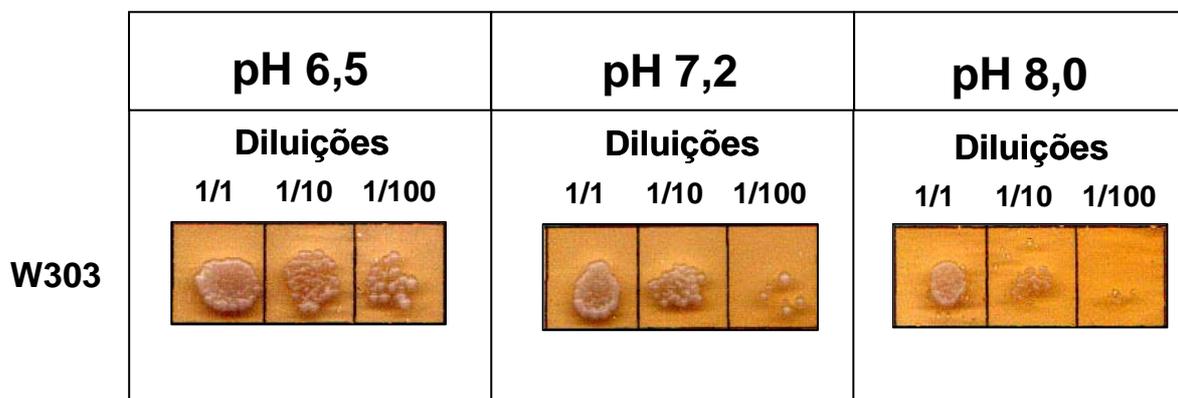


Figura 42. A resistência a pH alcalino conferida por Ccc2 é um fenótipo que **independe do número de cópias da ATPase**. A figura mostra ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 μ L de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de uma cepa selvagem de *S. cerevisiae* (W303) que expressa normalmente Ccc2 (cópias de Ccc2 em níveis “basais”). A composição do meio contendo leucina e uracila em diferentes valores de pH (6,5; 7,2; 8,0) encontra-se descrita em Materiais e Métodos.

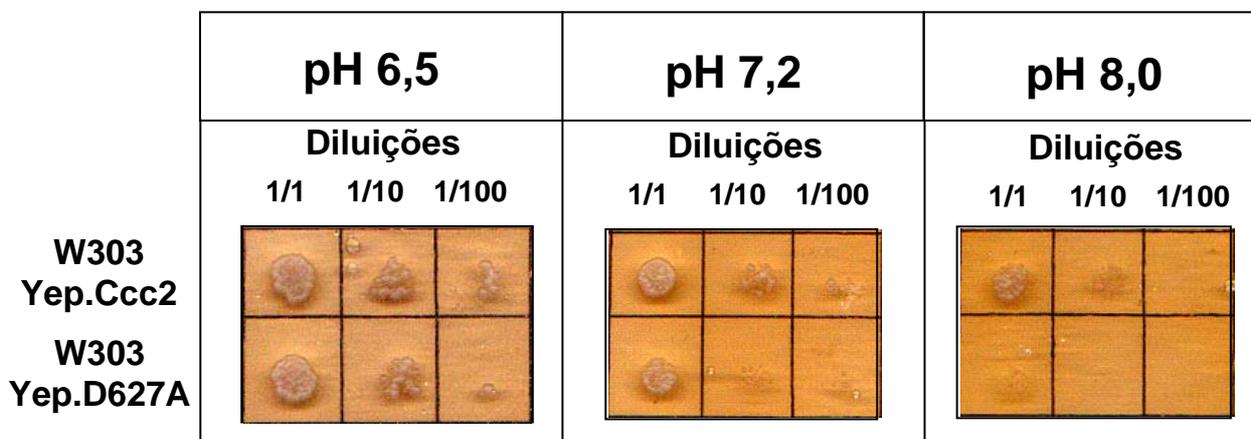


Figura 43. A superexpressão de cópias de D627A, junto com as cópias constitutivas de Ccc2 numa cepa W303 transformada, atenua o fenótipo de resistência a pH alcalino. Células de uma cepa selvagem W303 foram transformadas com os plasmídeos YEp contendo o gene CCC2 ou o mutante D627A, para superexpressar as ATPases correspondentes, conjuntamente com as cópias constitutivas advindas do genoma da levedura. A figura mostra ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 µL de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de dois clones (W303 transformada com YEp.CCC2 ou W303 transformada com YEp.D627A). A obtenção das cepas e a composição do meio contendo uracila a diferentes valores de pH (6,5; 7,2; 8,0) encontram-se descritas em Materiais e Métodos.

Além disso, em nível pós-traducional, também é possível que, em presença de um maior número de cópias do mutante não-funcional (D627A), Atx1 distribua a entrega de Cu(I) entre estas enzimas em detrimento de Ccc2 funcional. Esta transferência ocasionaria a coordenação de Cu(I) por D627A que é incapaz de transportá-lo para o lúmen do trans-Golgi. A retenção de Cu(I) por cópias destes mutantes causaria a redução da disponibilidade do metal para Ccc2, ocasionando a ausência do fenótipo de resistência a pH alcalino. Em baixas concentrações de Cu, Atx1 entregaria o metal aos MBDs de Ccc2 (funcional ou não) que, por sua vez o transfeririam para os domínios transmembrana de transporte. No caso de D627A, este Cu(I) ficaria retido sem poder ser transferido ao lúmen do Golgi.

9. Dissecção da região N-terminal na resistência ao pH alcalino

O papel da região N-terminal de Ccc2 foi mais detalhado nos experimentos que visaram estudar a viabilidade de cepas expressando diferentes mutantes nesta região em meios com diferentes pHs. A Figura 44 mostra o perfil de crescimento de diferentes cepas que expressam Ccc2 mutada de forma diferenciada na região N-terminal (Figura 16), à medida que o pH do meio é aumentado. Em pH 6,5 observa-se um crescimento dos mutantes comparável ao crescimento apresentado pela cepa Δ CCC2 transformada com o plasmídeo YEp.Ccc2 (Figura 41). O crescimento das três cepas (Δ MBD1, M1(ss) e M1) é reduzido gradativamente à medida que aumenta o pH, porém com sensibilidades diferentes. O fenótipo de resistência é preservado no mutante M1, aquele em que o MBD2 é removido e substituído pelo MBD1. Menor resistência apresenta a cepa Δ MBD1 (que teve removida a longa seqüência R2...A76 da região N-terminal onde se encontra o motivo C₁₃SAC₁₆), e ainda muito menor resistência o mutante M1(ss) (construção igual à de M1 mas com as duas cisteínas substituídas por serinas), cujo crescimento é abolido já a pH 7,2 (ver Figura 16).

Os resultados da Figura 44 demonstram a essencialidade do primeiro domínio de ligação de Cu(I) da região N-terminal e, o que parece mais intrigante, independentemente da região que ele ocupa na seqüência da região N-terminal da Cu(I)-ATPase. Esta propriedade pode ser atribuída ao grande número de resíduos acídicos (glutamatos e aspartatos) encontrados na longa seqüência onde se localiza o MBD1 e altamente conservados em várias ATPases transportadoras de metais pesados. A negatividade conferida a esta região permitiria uma adequada interação de Ccc2 com a superfície carregada positivamente de Atx1 (Rosenzweig *et al.*, 1999; Arnesano *et al.*, 2001a). Este alinhamento estrutural somado à baixa barreira energética existente para a transferência de Cu(I) da chaperona ao MBD1 da Cu(I)-ATPase (Huffman e O'Halloran, 2000) confeririam a este domínio uma particular eficiência, necessária para acoplar a ligação de Cu(I) com seu direcionamento para o motivo CPC e seu transporte final para o lúmen do Golgi a pH alcalino. Esta seqüência de eventos seria menos eficiente com MBD2 e muito afetada em M1(ss) pela ausência de cisteínas para coordenar o Cu(I) com alta afinidade.

A importância das cisteínas 13 e 16 do MBD1 para o manuseio intracelular de Cu é reforçada pelas observações da Figura 45. Esta figura mostra que a um pH (6,1) ainda mais favorável para o crescimento de todas as cepas (compare com a Figura 44), a acentuada restrição de Cu e Fe (Fe, pelas razões que emergem das Figuras 54 e 55) como resultado da adição de ferrozina, a) impede totalmente o crescimento das cepas M1(ss) e de Δ N-ter; b) atenua o crescimento da cepa Δ MBD1 mais do que o da cepa M1, capaz de se desenvolver até a última diluição. Como já mencionado, as transformações mostradas na Figura 45 com os genes CCC2, Δ N-ter e M1(ss) foram realizadas com estes genes fusionados ao epítipo GFP, empregando-se um plasmídeo pCEN, em função de desenvolver estudos de microscopia para investigar o endereçamento dos mutantes (Figura 39). Deve ser mencionado que a presença de GFP na extremidade C-terminal de Ccc2 não interfere com os fenótipos de resistência ou

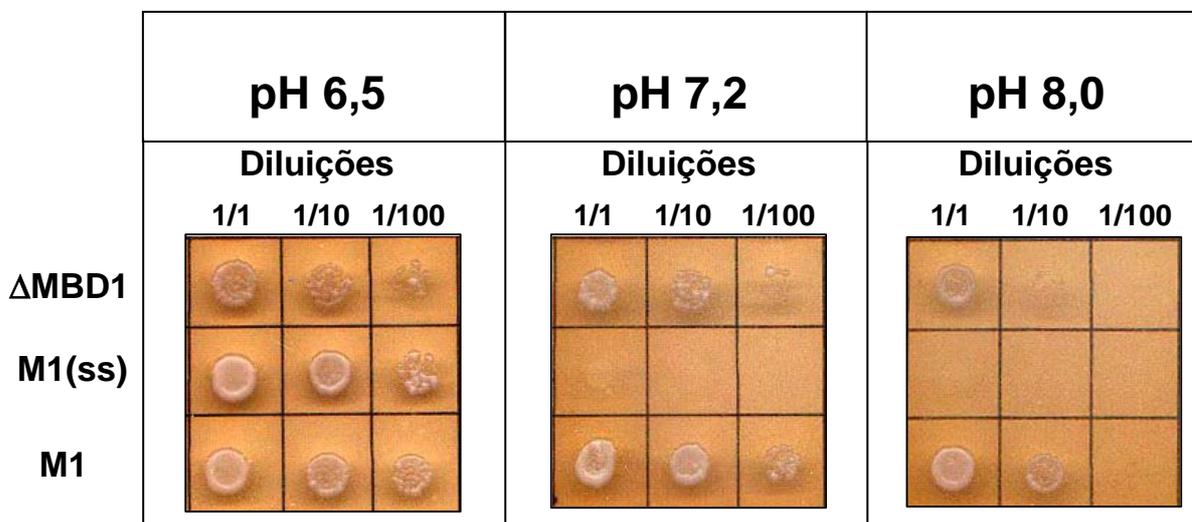


Figura 44. Os resíduos de cisteína C13 e C16 do domínio de ligação de metal MBD1 são essenciais para conferir o fenótipo de resistência a pH alcalino. Células Δ CCC2 foram transformadas com os seguintes plasmídeos: a) YEp contendo os genes Δ MBD1 ou M1; b) pCEN contendo o gene M1(ss).GFP. A figura mostra ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 μ L de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. A obtenção das cepas e a composição do meio (sem leucina e sem uracila) a diferentes valores de pH (6,5; 7,2; 8,0) encontram-se descritas em Materiais e Métodos.

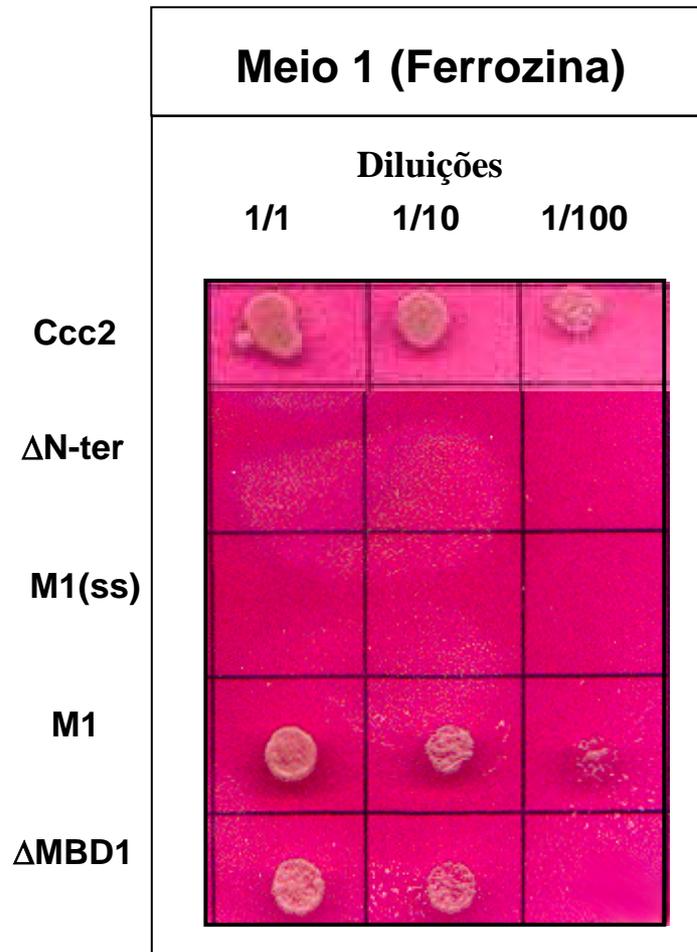


Figura 45. Os resíduos de cisteína C13 e C16 do domínio de ligação de metal MBD1 de Ccc2 são essenciais para o crescimento da levedura *S. cerevisiae* em meio restritivo em Cu e Fe. Células ΔCCC2 foram transformadas com os seguintes plasmídeos: a) YEp contendo os genes M1 ou ΔMBD1; b) pCEN contendo os genes ΔN-ter, M1(ss) ou CCC2. A figura mostra ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 μL de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. A composição do Meio 1 (*sem* leucina e uracila, pH 6,1) encontra-se descrita em Materiais e Métodos (Tabelas 4 e 5).

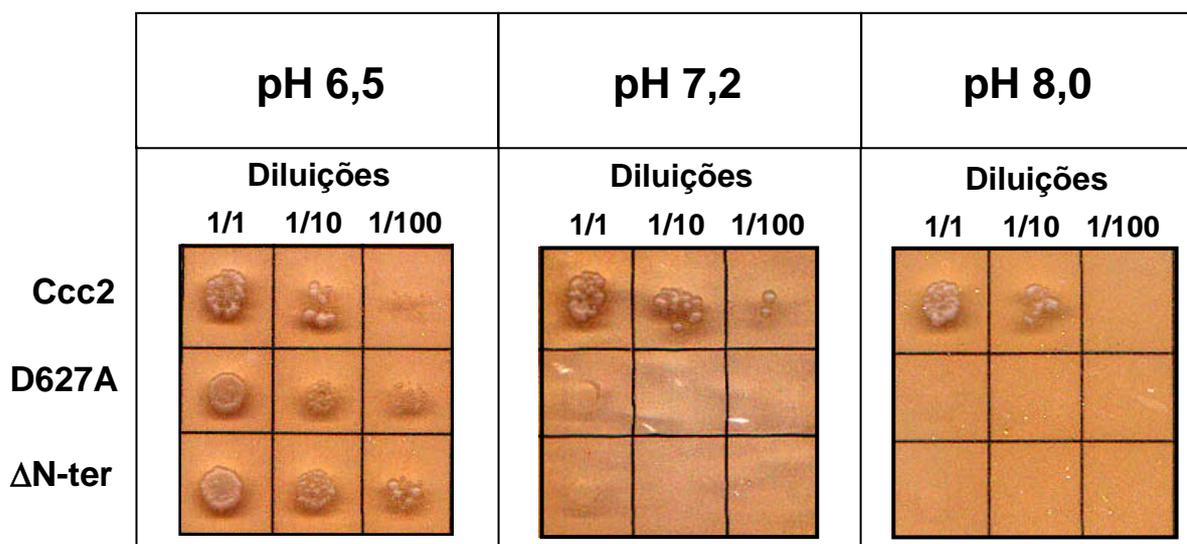
sensibilidade a baixas concentrações de Cu e Fe, como pode ser observado na Figura 45 (comparar os crescimentos das cepas Ccc2.GFP e Δ N-ter.GFP com os crescimentos das cepas Ccc2 e Δ N-ter sem GFP mostrados na Figura 40). A utilização de GFP na biologia de fungos é bastante difundida (para revisões ver Lorang *et al.*, 2001; Tatchell e Robinson, 2002) e pouquíssimos relatos foram feitos acerca da perda de função ou localização de uma proteína fusionada a GFP (Brachat *et al.*, 2000). Os resultados apresentados na Figura 45 para as cepas Ccc2.GFP e Δ N-ter.GFP, portanto, são indicativos de que a resposta dos diferentes mutantes nos ensaios de complementação mostrados nesta tese não derivam da utilização de diferentes plasmídeos e confirmam a independência do número de cópias de Ccc2 do fenótipo de resistência a pH alcalino (Figura 42), uma vez que pCEN é um plasmídeo presente em apenas uma cópia na célula.

10. Efeito do cobre no fenótipo de resistência ou sensibilidade a pH alcalino de cepas Δ CCC2 transformadas com diferentes mutantes de Ccc2

Os experimentos das Figuras 44 e 45 demonstraram a especificidade de mecanismos de ligação de Cu(I) com alta afinidade na região N-terminal para o adequado processamento do metal e para a viabilidade celular, especialmente a pH alcalino. As figuras seguintes confirmam que a disponibilidade de Cu é, de fato, o elemento central do fenótipo de resistência a pH alcalino com Fe limitante.

A Figura 46 mostra que o aumento gradativo da concentração de Cu em meios a pH alcalino ou levemente alcalino é capaz de reverter parcialmente a incapacidade de crescimento de cepas Δ CCC2 que superexpressam os genes D627A ou Δ N-ter. Estas concentrações não causam alterações significativas no fenótipo de resistência a pH alcalino nas cepas que superexpressam CCC2 (comparar com a Figura 41). A suplementação de Cu

A) CuSO₄ 2,0 μM



B) CuSO₄ 10 μM

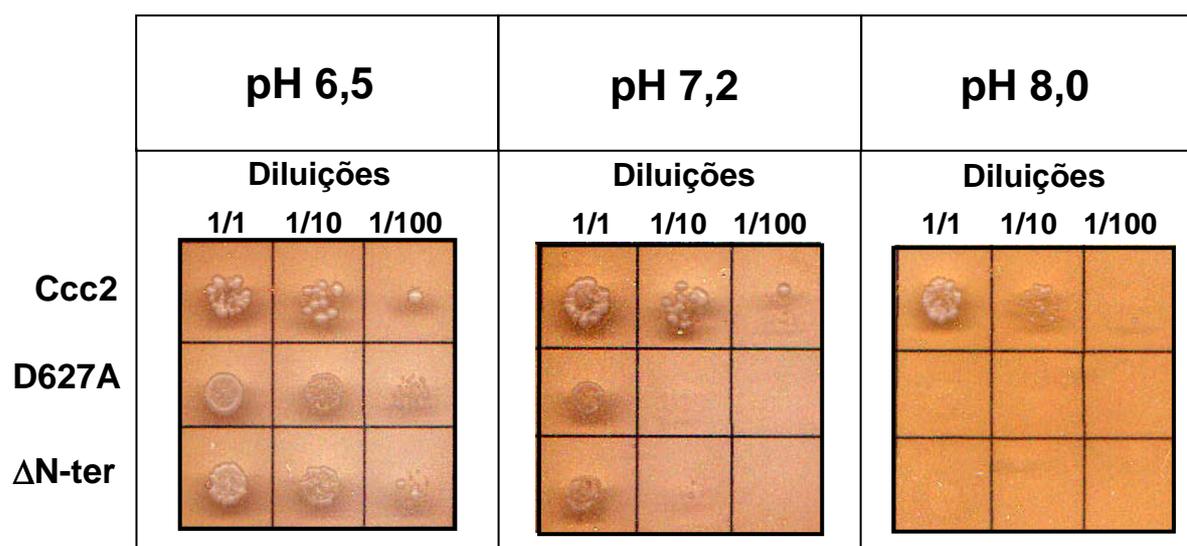


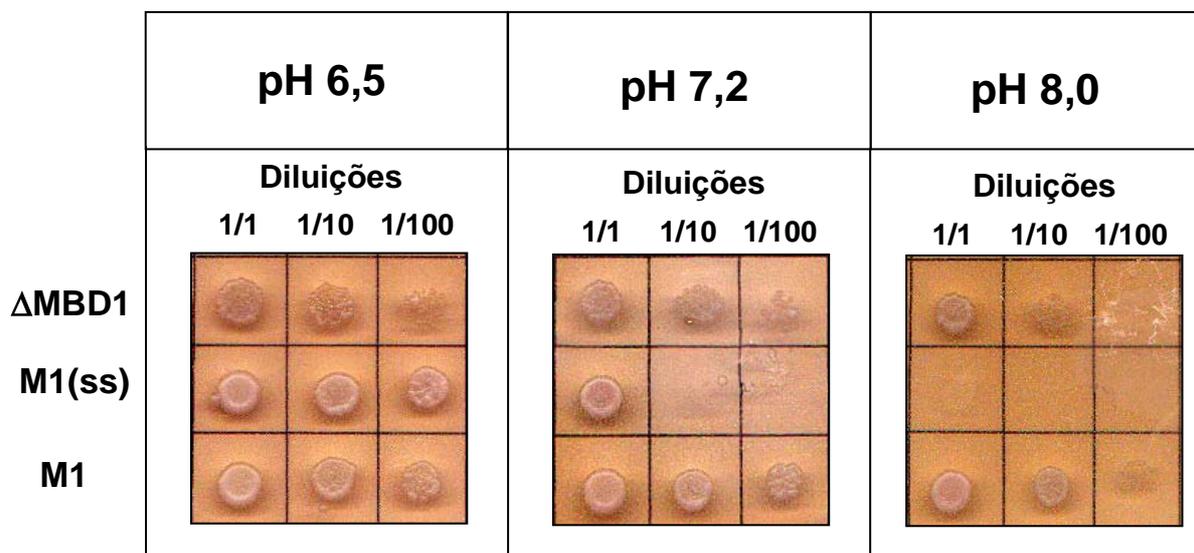
Figura 46. Tênu recuperação do crescimento a pH alcalino das cepas D627A e ΔN-ter após adição de cobre. Células ΔCCC2 foram transformadas com plasmídeos Yep contendo os genes Ccc2, D627A ou ΔN-ter. As figuras mostram ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 μL de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. Os ensaios de complementação (a pH 6,5; 7,2, 8,0) foram realizados na presença de 2 μM (A) ou 10 μM (B) de CuSO₄.

e/ou Fe ao meio de cultura foi demonstrada por alguns autores como uma forma de restabelecer o crescimento de cepas de *S. cerevisiae* deficientes nos genes CCC2 e ATX1 (Lin *et al.*, 1997; Forbes *et al.*, 1999; Serrano *et al.*, 2004) e, num destes trabalhos, esta suplementação permitiu o crescimento de mutantes da cepa BY4741, defeituosa em diferentes transportadores destes íons (Serrano *et al.*, 2004). Este fenômeno foi interpretado como decorrente do aumento da disponibilidade destes íons num pH em que seus sais seriam menos solúveis.

Os experimentos das Figuras 47, 50 e 51 mostram que a adição de concentrações micromolares de Cu^{2+} não restaura o fenótipo de resistência a pH alcalino através de um processo inespecífico de aumento da disponibilidade de Cu solúvel e de seu transporte passivo para o lúmen do Golgi. Se assim fosse, a resistência independeria da variante de Ccc2 expressa. A Figura 46 demonstra que, pelo contrário, a recuperação parcial do fenótipo envolve a participação da região N-terminal da Cu(I)-ATPase e a Figura 47 evidencia uma clara seletividade $M1 > \Delta MBD1 \gg M1(ss)$, para conferir viabilidade às cepas que os expressam quando se acrescentam concentrações crescentes de Cu a pH alcalino. Estas diferenças podem ser explicadas em função do papel dominante de MBD1 já demonstrado na Figura 44.

Este papel, como já discutido anteriormente, envolveria a interação com Atx1. A interação entre as duas proteínas depende da presença de Cu(I) (Banci *et al.*, 2006), cuja concentração aumentada seria necessária a pH alcalino. A transferência de Cu(I) de Atx1 para Ccc2 seria favorecida normalmente pela trilha complementar de cargas na superfície das duas proteínas (Banci *et al.*, 2006; Arnesano *et al.*, 2004; ver também Figura 6), nas regiões próximas a suas cisteínas C15/C18 (Atx1) e C13/C16 (Ccc2) (Figura 48). Em concentrações limitantes do metal, à medida que aumenta o pH ocorreria a dissociação progressiva dos grupamentos das cadeias laterais das lisinas e argininas presentes na superfície de Atx1, as

A) CuSO₄ 2,0 μM



B) CuSO₄ 10 μM

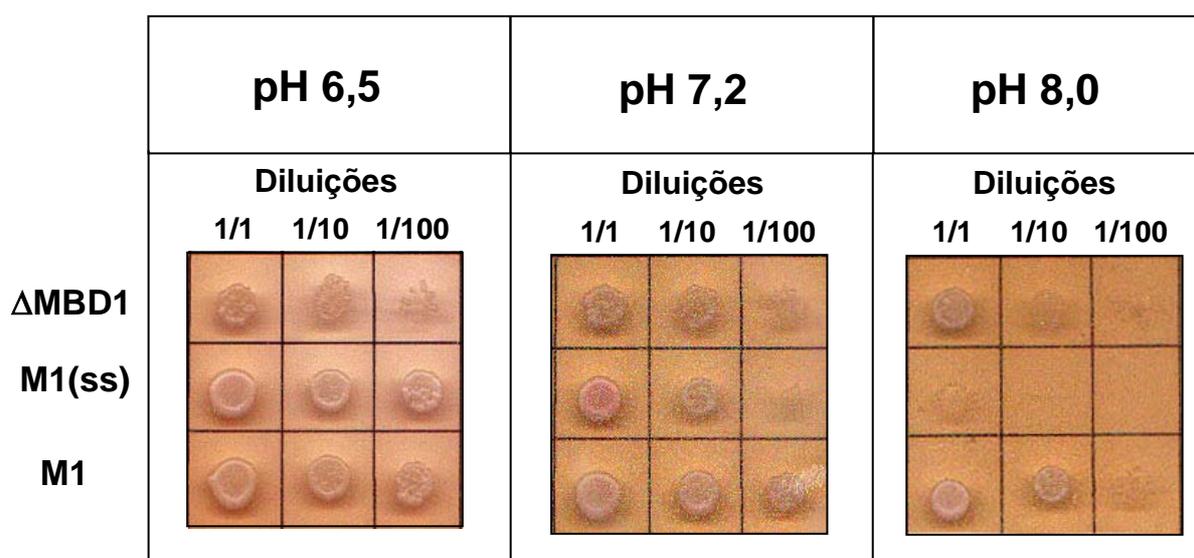


Figura 47. A recuperação parcial do fenótipo de resistência a pH alcalino após adição de Cu por variantes mutadas na região N-terminal requer a integridade do motivo C₁₃SAC₁₆ do MBD1. Células ΔCCC2 foram transformadas com os seguintes plasmídeos: a) YEp contendo os genes ΔMBD1 ou M1; b) pCEN contendo o gene M1(ss). As figuras mostram ensaios de complementação - monitorados após 72 h – empregando 2 μL de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. Os ensaios de complementação (a pH 6,5; 7,2, 8,0) foram realizados na presença de 2 μM (A) ou 10 μM (B) de CuSO₄.

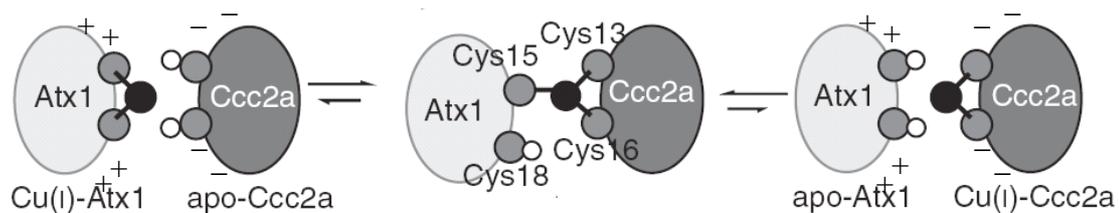


Figura 48. Mecanismo de transferência de Cu(I) entre Atx1 e Ccc2. A figura esquematiza a interação proteína-proteína mediada por Cu (círculo preto), a coordenação do Cu(I) pelos resíduos C15/C18 (Atx1) e C13/C16 (MBD1 de Ccc2) e as superfícies carregadas (de sinal oposto) de Atx1 e MBD1. Ver também Figura 7 (modificado de Banci *et al.*, 2006).

cargas positivas da trilha de cargas se atenuariam, a associação Atx1.MBD1 ficaria enfraquecida e a transferência de Cu(I) para a Cu(I)-ATPase seria prejudicada. Altas concentrações permitiriam superar, pelo menos parcialmente, o efeito do alto pH (inclusive a pH 8,0), com uma seletividade que demonstra o papel dominante de MBD1 e de suas cisteínas (Figura 47).

Como explicar a recuperação tênue, mas clara, da viabilidade das células de *S. cerevisiae* expressando D627A, Δ N-ter e M1(ss) ao se adicionar alto Cu^{2+} ? Por que a seletividade $\text{M1(ss)} > \Delta\text{N-ter} \cong \text{D627A}$ (comparar as Figuras 46 e 47)? Os mecanismos são provavelmente distintos. Os resultados com M1(ss), se por um lado ressaltam a importância das cisteínas C13 e C16 do MBD1 no fenótipo de resistência a pH alcalino já analisada, permitem sugerir que a ligação do Cu(I) (via Atx1) ao MBD1 envolveria a participação de outros resíduos. Estes, quando presentes, permitiriam um adequado funcionamento da cadeia de transporte de Cu a pH alcalino, na ausência de C13 e C16, desde que se forneçam concentrações mais altas do metal. Resíduos hidrofóbicos altamente conservados entre Ccc2, ATP7A e ATP7B encontram-se na vizinhança do sítio de ligação de Cu(I) no MBD1 e são afetados (se posicionam e se expõem de maneira diferente) na presença do íon. Estes aminoácidos incluem F64, I20 e L37 estabilizados por M11 (Banci *et al.*, 2006; ver seqüência primária de Ccc2 na Figura 15). Graças a esta “forquilha” de amparo, a pH levemente alcalino e na presença de alto Cu^{2+} , Cu(I).Atx1 poderia interagir com MBD1, ainda que fracamente, mas o suficiente para permitir sua entrega aos domínios de transporte. A pH mais básico, a falta de complementariedade eletrostática, discutida no parágrafo anterior, tornaria impossível esta fraca interação. A Figura 49 mostra a representação da estrutura de Ccc2, evidenciando as relações de vizinhança entre os aminoácidos mencionados.

No caso do mutante D627A, Atx1 entregaria o Cu(I) à Cu(I)-ATPase que, por não ser funcional, seria incapaz de transferi-lo para o lúmen do Golgi. Em concentrações altas do

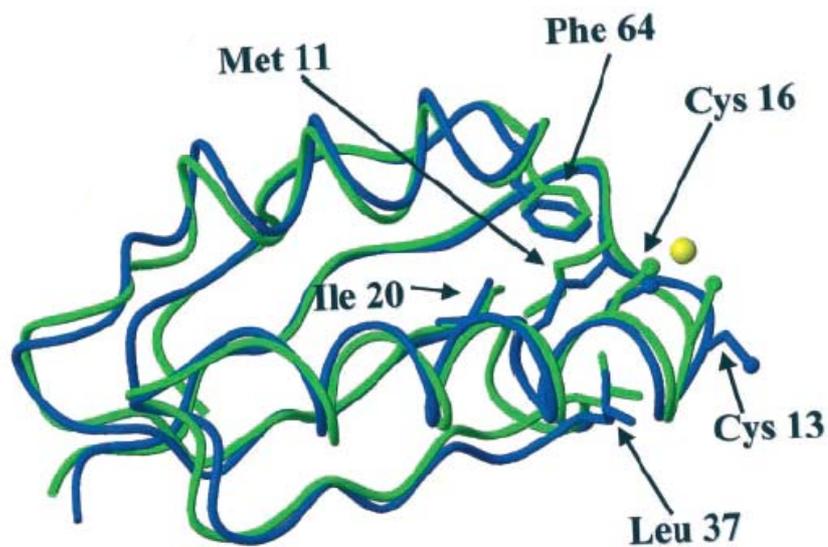


Figura 49. Aminoácidos presentes no MBD1 de Ccc2 importantes para a ligação do cobre. A figura mostra a estrutura de Cu(I)-Ccc2 em verde e de apo-Ccc2 em azul. Cu(I) é mostrado em amarelo e as cadeias laterais dos aminoácidos I21, F64, M11 e L38 são assinalados (modificado de Banci *et al.*, 2001).

metal, a ativação da endocitose de Ctr1 presente na membrana plasmática (Figuras 2 e 8) (Ooi *et al.*, 1996; Petris *et al.*, 2003) permitiria a realocização deste transportador de alta afinidade na membrana do Golgi, restaurando o fornecimento de Cu(I) às cuproenzimas em processamento. No caso de ΔN -ter, Atx1 não teria seu acceptor de Cu(I) disponível na ATPase truncada. “Vagando” pela célula de *S. cerevisiae*, Cu(I).Atx1 seria capaz de ativar mecanismos pós-traducionais (como fosforilações dependentes de Cu; Mercer *et al.*, 2003; Voskoboinik *et al.*, 2003) e transcricionais que regulariam a expressão de transportadores na membrana do Golgi. Vários destes fatores transcricionais foram descritos (De Freitas *et al.*, 2003; Rutherford e Bird, 2004), embora os sinais que ativam/desativam estes processos e sua hierarquia sejam ainda pouco conhecidos (Rees e Thiele, 2004). Simultaneamente, a falta de interação com Atx1 seria um elemento de sinalização capaz de se somar à perda de pequenos motivos de reconhecimento (Blobel e Sabatini, 1970; Humphrey *et al.*, 1993; Northwehr *et al.*, 1993; Ponnambalam *et al.*, 1994; Scwappach *et al.*, 1998) para impedir a inserção correta de ΔN -ter na membrana do Golgi, provocar seu depósito e proteólise em vacúolos (Figura 39) e, conseqüentemente seu desaparecimento das membranas (Figura 38).

A idéia da existência de sinais de Cu capazes de ativar, em pH alcalino, mecanismos de transferência de Cu(I) para o lúmen do Golgi menos eficientes que o mediado pela Cu(I)-ATPase foi ainda abordada através dos experimentos que seguem. Foi formulada a hipótese de que, na ausência do gene CCC2, a falta total da Cu(I)-ATPase tornaria mais eficiente a expressão e ativação de transportadores capazes de realizar esta transferência. As Figuras 50 e 51 mostram testes de complementação da cepa $\Delta CCC2$ com o plasmídeo YEp vazio na ausência e na presença de Cu adicionado, que apóiam esta hipótese. Pode ser observada a perda do fenótipo de resistência a pH alcalino, como era de se esperar pela ausência de Ccc2 (Figura 50), mas a sua recuperação após a adição de Cu é maior que a de ΔN -ter (compare os painéis de pH 7,2 da Figura 51). O fato de não existir a transcrição de um gene de Ccc2

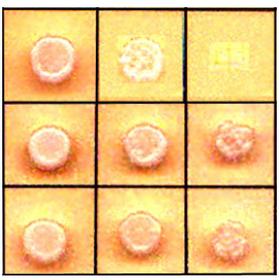
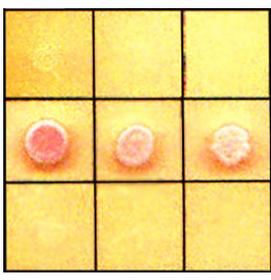
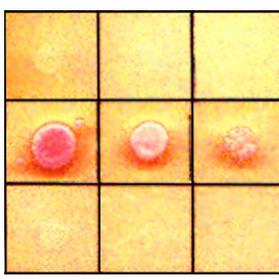
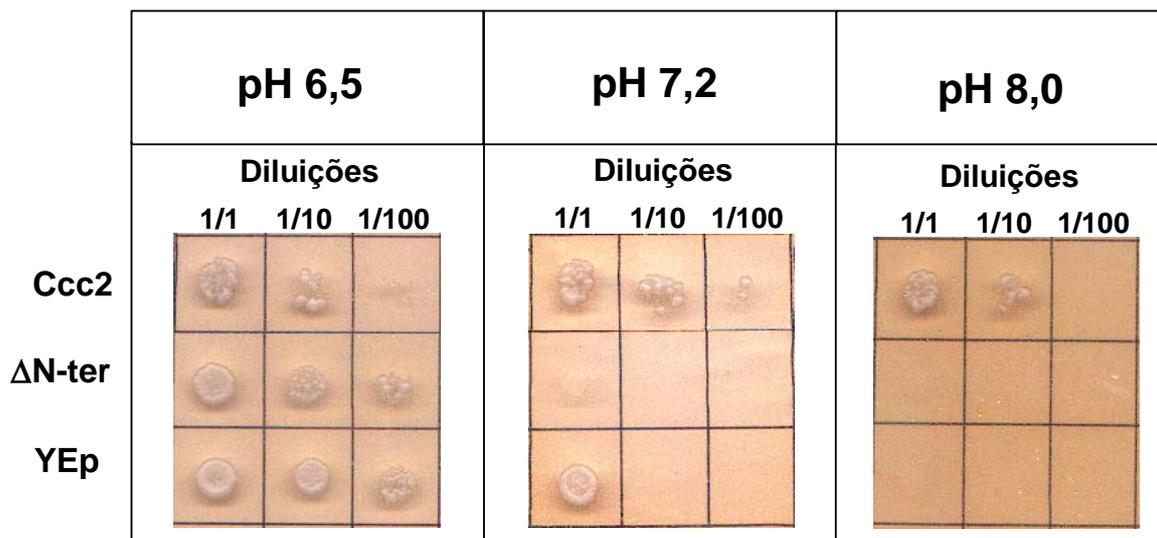
	pH 6,5	pH 7,2	pH 8,0
	<p>Diluições</p> <p>1/1 1/10 1/100</p> 	<p>Diluições</p> <p>1/1 1/10 1/100</p> 	<p>Diluições</p> <p>1/1 1/10 1/100</p> 
YE _p			
Ccc2			
ΔN-ter			

Figura 50. A expressão do plasmídeo YE_p gera em pH alcalino, *sem* adição de Cu, um fenótipo igual ao das cepas que superexpressam um gene para uma enzima não-funcional (ΔN-ter). Células ΔCCC2 foram transformadas com plasmídeos YE_p vazios ou com plasmídeos YE_p contendo os genes Ccc2 ou ΔN-ter. As figuras mostram ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 μL de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. A obtenção das cepas e a composição do meio (sem leucina e sem uracila) a diferentes valores de pH (6,5; 7,2; 8,0) encontram-se descritas em Materiais e Métodos.

A) CuSO₄ 2,0 μM



B) CuSO₄ 10 μM

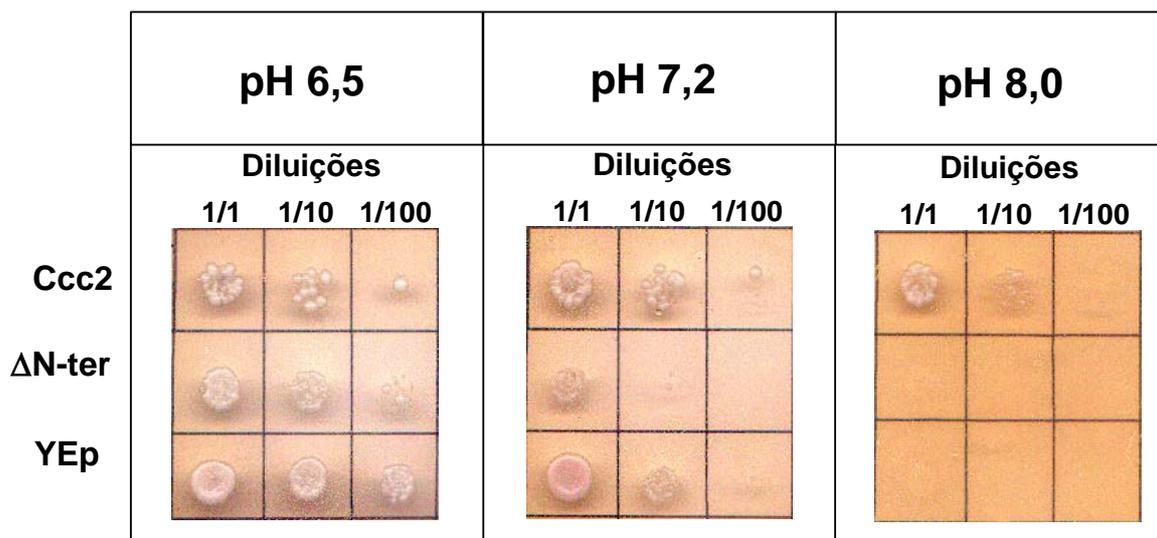


Figura 51. A expressão do plasmídeo YEp gera em pH alcalino, com adição de Cu, um fenótipo diferente das cepas que superexpressam uma enzima não-funcional (Δ N-ter). Células Δ CCC2 foram transformadas com plasmídeos YEp vazios ou com plasmídeos YEp contendo os genes Ccc2 ou Δ N-ter. As figuras mostram ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 μL de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. A obtenção das cepas e a composição do meio (sem leucina e sem uracila) a diferentes valores de pH (6,5; 7,2; 8,0) encontram-se descritas em Materiais e Métodos. Os ensaios de complementação foram realizados na presença de 2 μM (A) ou 10 μM (B) de CuSO₄.

(modificado ou não) impediria, ainda, a transferência por metalochaperonas a um transportador não-funcional. Isto aumentaria a disponibilidade de Cu(I) para Fet3, uma idéia apoiada pelos experimentos da Figura 43.

11. Estudo dos efeitos de modificações em resíduos passíveis de fosforilação por proteínas cinases no funcionamento de Ccc2

Como já foi mencionado na Introdução, a localização intracelular das Cu(I)-ATPases humanas é regulada por variações na concentração de Cu (Petris *et al.*, 1996; Nagano *et al.*, 1998; Mercer *et al.*, 2003). Yuan *et al.* (1997) mostraram que a localização de Ccc2 em células de *S. cerevisiae* incubadas na presença de 100 μM de Cu^{2+} parecia alterar-se, tendo sido encontradas marcações para a enzima em regiões próximas às membranas vacuolares. Em escassez de Cu, as Cu(I)-ATPases humanas estão predominantemente localizadas na rede do trans-Golgi, enquanto que, em níveis maiores do metal, ATP7A é direcionada à membrana plasmática e ATP7B é predominantemente encontrada em vesículas secretórias que se fundem à membrana plasmática. Juntamente com as alterações nos níveis de Cu, em alguns trabalhos foi sugerido um papel da região N-terminal das Cu(I)-ATPases no direcionamento intracelular destas enzimas por apresentar sítios-alvo para a regulação por proteínas cinases e fosfatases (Goodyer *et al.*, 1999; Vanderwerf *et al.*, 2001; Cobbold *et al.*, 2002; Voskoboinik *et al.*, 2003; Mercer *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2005). Não se sabe de que maneira oscilações na disponibilidade de Cu poderiam modificar a atividade de cinases e fosfatases e, desta forma, afetar a localização intracelular destas proteínas.

Mecanismos de fosforilação e desfosforilação são talvez os eventos regulatórios dos processos celulares básicos mais bem estudados em detalhe, já que se estima que cerca de 30% das proteínas de uma célula possam ser fosforiladas por proteínas cinases (Manning *et*

al., 2002; Ptacek *et al.*, 2005), que catalisam a transferência de um grupamento fosforila para resíduos de serina, treonina e tirosina. A fosforilação dependente de proteínas cinases é importante para a regulação, tanto da atividade catalítica, como da localização subcelular de várias ATPases, incluindo a Na⁺,K⁺-ATPase, a Ca²⁺-ATPase e a Na⁺-ATPase (Efendiev *et al.*, 2000; Valverde *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2006) e sabe-se que cerca de 2-3% dos genes em leveduras codificam para proteínas cinases (Hunter e Plowman, 1997).

A primeira descrição na literatura sobre a fosforilação regulatória (que é um fenômeno distinto da fosforilação que ocorre no resíduo de ácido aspártico durante o ciclo catalítico das ATPases) de Cu(I)ATPases foi feita por Vanderwerf *et al.* (2001), em estudos realizados com a ATPase de Wilson. Neste trabalho, os autores demonstram um importante papel do resíduo N-terminal na fosforilação regulatória dependente de Cu. Cobbold *et al.* (2002) mostraram que a fosforilação por uma proteína cinase A (PKA) pode estar envolvida no processo de migração da ATPase de Menkes para a membrana plasmática. Mais recentemente, Voskoboinik *et al.* (2003) identificaram dois fosfopeptídeos na ATPase de Menkes responsáveis pela maior concentração da fosforilação dependente de Cu na enzima e que a remoção da região N-terminal impedia a ocorrência deste processo. Nestes trabalhos foi igualmente sugerida a existência de proteínas cinases Cu-dependentes que poderiam estar envolvidas nestes eventos de fosforilação. Entretanto, uma rápida análise da seqüência primária de Ccc2 revela a existência de inúmeros motivos consenso para fosforilação por cinases mais comuns, como PKAs e tirosinas cinases (TK). Apenas na região N-terminal, pelo menos duas seqüências são potenciais alvos para estas cinases: ²²¹R H L E R T G Y, onde o resíduo de tirosina Y228 pode ser fosforilado por uma tirosina cinase e ²⁵⁵K K N S I, próximo ao primeiro segmento transmembrana, em que o resíduo S258 pode ser fosforilado por uma proteína cinase A.

De forma a se estudar quais os possíveis papéis dos resíduos Y228 e S258 no funcionamento de Ccc2, foram realizadas as mutações S258A e Y228A e os genes alterados foram expressos em cepas Δ CCC2. As cepas transformadas foram então submetidas aos ensaios de complementação já descritos até aqui. As Figuras 52 e 53 indicam que, tanto em situações de escassez de Cu (crescimento em Meio 1 – Figura 52) quanto no estabelecimento do fenótipo de resistência a pH alcalino (Figura 53), estes resíduos não são essenciais, uma vez que as cepas transformadas com os genes que codificam cópias de Ccc2 com as mutações mencionadas são capazes de crescer de forma comparável à cepa transformada com o gene CCC2 íntegro. É possível que, nas situações às quais foram submetidas as cepas Δ CCC2 transformadas com os mutantes Y228A e S258A, níveis de fosforilação basais que Ccc2 possa vir a apresentar em outros dois sítios permitam que não sejam alteradas a capacidade de sobrevivência em situações de baixo Cu ou a pH alcalino. Levando em consideração alguns resultados recentes do laboratório, outras explicações para a falta de efeito observado com os mutantes S258A e Y228A nas Figuras 52 e 53 podem ser: a) a fosforilação em S258 por PKA é inibitória da catálise por Ccc2 (*in vitro*); b) outros domínios conservados em todas as Cu(I)-ATPases, de alto *score* de fosforilação regulatória, compensariam as alterações provocadas pelas mutações em S258 ou Y228; c) somente em baixo ATP (o que não é o caso de uma levedura em crescimento) a mutação em S258 modifica a catálise *in vitro* (Rafael Valverde, comunicação pessoal).

12. Efeito do ferro no fenótipo de resistência ou sensibilidade a pH alcalino de cepas Δ CCC2 transformadas com diferentes mutantes de Ccc2

Desde a descoberta do Cu como fator importante para a homeostasia de Fe em organismos evolutivamente distantes como leveduras, plantas e o homem, as moléculas

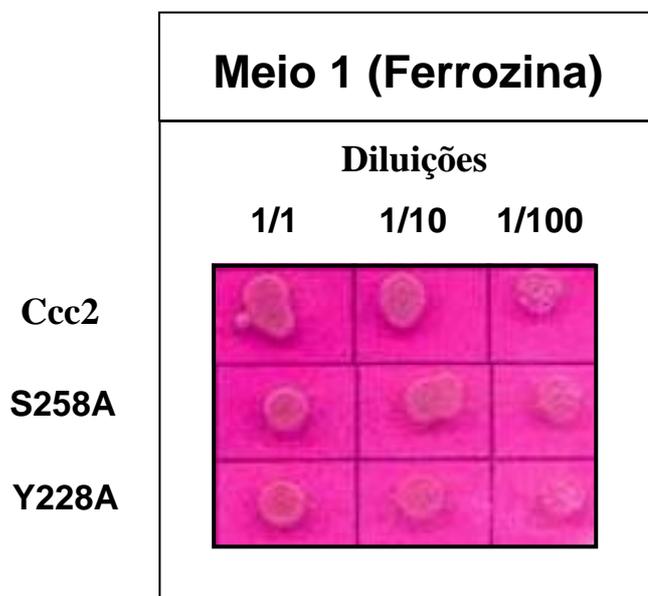


Figura 52. Mutações nos resíduos fosforiláveis S258A e Y228A da região N-terminal de Ccc2 não são essenciais para o crescimento de *S. cerevisiae* em meio restritivo em Cu e Fe. Células Δ CCC2 foram transformadas com o plasmídeo pCEN contendo os genes CCC2, S258A ou Y228A. A figura mostra ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 μ L de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. A composição do Meio 1 (*sem* leucina e uracila, pH 6,1) encontra-se descrita em Materiais e Métodos (Tabelas 4 e 5).

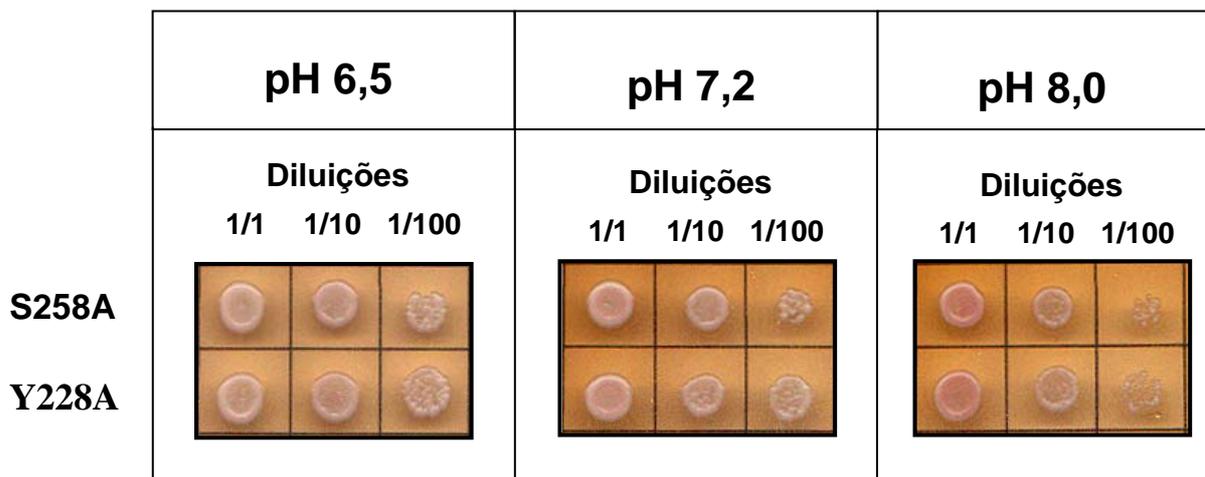


Figura 53. Mutações nos resíduos fosforiláveis S258A e Y228A da região N-terminal de Ccc2 não são essenciais para conferir o fenótipo de resistência a pH alcalino. Células Δ CCC2 foram transformadas com o plasmídeo pCEN contendo os genes CCC2, S258A ou Y228A. A figura mostra ensaios de complementação – monitorados após 72 h – empregando 2 μ L de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. A obtenção das cepas e a composição do meio (sem leucina e sem uracila) a diferentes valores de pH (6,5; 7,2; 8,0) encontram-se descritas em Materiais e Métodos.

envolvidas no metabolismo do Cu e, conseqüentemente, na captação de Fe com alta afinidade, vêm sendo descritas (para revisão ver Kaplan, 1996; De Freitas *et al.*, 2002; Fox, 2003). A suplementação de Fe ao meio de cultura favorece o crescimento de cepas de *S. cerevisiae* deficientes em proteínas reconhecidamente ligadoras de Cu no meio intracelular (Forbes *et al.*, 1999) e esta recuperação tem sido geralmente interpretada como um aumento da velocidade de difusão de Fe para dentro da célula. Os resultados desta tese apresentados até aqui indicam que, após a adição de Cu, a recuperação em pH alcalino do crescimento de cepas que contêm diferentes variantes de Ccc2 não envolve um mecanismo inespecífico de aumento de disponibilidade do metal. Pelo contrário, depende do grau de funcionalidade e, pelo menos no caso de ΔN -ter, da sua localização subcelular. Para analisar se o fenótipo de sensibilidade a pH alcalino das diferentes cepas mutantes aqui descritas poderia ser revertido pela adição de Fe e se esta reversão dependeria do tipo de Cu(I)-ATPase presente, foram realizados os ensaios de complementação em diferentes pHs, em presença de concentrações crescentes deste cátion (Figuras 54 e 55). Os resultados apresentados na Figura 54 mostram que a recuperação do fenótipo de resistência a pH alcalino por concentrações de Fe, na faixa do K_m para o transportador Fet4, depende da funcionalidade da Cu(I)-ATPase e da estrutura da região N-terminal. Esta figura permite observar uma clara diferença entre os mutantes não-funcionais D627 e ΔN -ter (mais M1(ss)) por um lado e Ccc2, $\Delta MBD1$ e M1 por outro.

Os dados da Figura 54, com o inexistente ou menor crescimento do primeiro conjunto mencionado no parágrafo anterior (em pH 7,2 e 8,0), mostram que, apesar da oferta citoplasmática de Fe aumentada (pela parcial saturação de Fet4; Figura 8), também é requerida uma eficiente transferência de Cu(I) para o lúmen do Golgi e sua subsequente ligação a Fet3 para ativá-lo. Demonstram ainda que a Cu(I)-ATPase é um “interlocutor” limitante que modula a “conversa funcional” entre transportadores de Fe da membrana plasmática e da membrana do Golgi. A falta de recuperação da viabilidade atingida com o

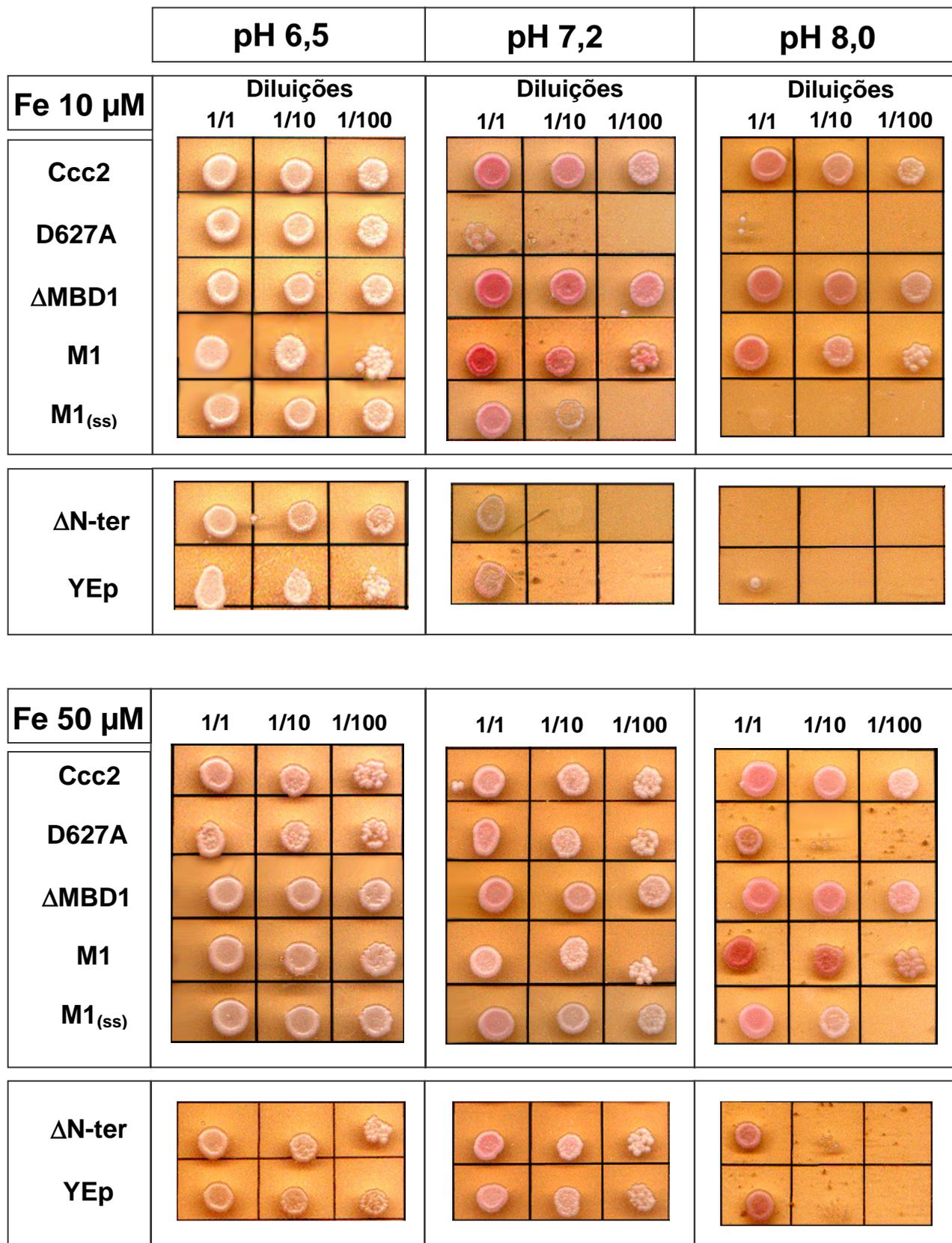


Figura 54. A recuperação do fenótipo de resistência a pH alcalino por concentrações de Fe na faixa do K_m para o transportador Fet4, depende da funcionalidade da Cu(I)-ATPase e da estrutura da região N-terminal. Os ensaios foram realizados conforme descrito na Figura 55, em concentrações de FeSO₄ 10 μ M e 50 μ M.

mutante M1(ss), que transporta Cu(I) com muito menor eficiência (Figura 47) confirma que – em situações em que o Cu é limitante – o Fe tampouco é transportado adequadamente a despeito de suas altas concentrações. Deve ser apontado, por outro lado, que o fato de que a viabilidade e o crescimento são agora essencialmente idênticos para os mutantes Δ MBD1 e M1, em contraste com o observado quando se adiciona Cu a pH alcalino (compare com a Figura 47). Apesar da concentração limitante de Cu (na faixa submicromolar), a menos eficiente capacidade do MBD2 em receber o Cu(I) de Atx1 (Huffman e O’Haloran, 2000) e transferi-lo para os domínios de transporte de Ccc2 seria ainda adequada para fornecer o Cu necessário para Fet3 quando o Fe não é limitante. Estes experimentos permitem postular que menores concentrações intraluminais de Cu seriam requeridas para ativar Fet3 na presença de maiores concentrações de Fe.

Quando se emprega uma concentração de Fe saturante para Fet4 (200 μ M; Figura 55), apenas os mutantes não-funcionais da Cu(I)-ATPase apresentam um crescimento muito diminuído, o que suporta a conclusão anterior. Todavia, outros processos podem estar ocorrendo nesta concentração tão elevada e, potencialmente tóxica, de Fe (observe-se que o crescimento da cepa que superexpressa Ccc2 é reduzido quando comparado com o crescimento em presença de 50 μ M no mesmo pH; Figura 54). É possível ainda que, em concentrações elevadas de Fe, as cepas estejam armazenando o metal, pois sabe-se que as células apresentam mecanismos de retenção, tanto de Fe quanto de Cu, para prevenir a toxicidade ou então para posterior utilização dos metais. O Cu parece estar envolvido no mecanismo de detoxificação do Fe (Szczyepka *et al.*, 1997) e, quando em excesso, ambos podem ser conduzidos aos vacúolos (Eide *et al.*, 1993; Urbanowski e Piper, 1999). As claras diferenças encontradas a pH 8,0 (Figura 55) com D627A, M1(ss) e Δ N-ter (além do plasmídeo vazio), por um lado e as outras variantes, por outro, indicam que uma Cu(I)-ATPase funcional seria necessária também para a detoxificação do Fe.

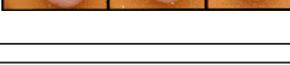
	pH 6,5	pH 7,2	pH 8,0
Fe 200 μM	Diluições 1/1 1/10 1/100	Diluições 1/1 1/10 1/100	Diluições 1/1 1/10 1/100
Ccc2			
D627A			
ΔMBD1			
M1			
M1_(ss)			
ΔN-ter			
YEp			

Figura 55. A recuperação do fenótipo de resistência a pH alcalino por concentrações de Fe saturantes para o transportador Fet4 ainda é modulada pela estrutura da região N-terminal da Cu(I)-ATPase. Células Δ CCC2 foram transformadas com os seguintes plasmídeos: a) YEp vazio ou contendo os genes CCC2, D627A, Δ N-ter, M1 ou Δ MBD1; b) pCEN contendo o gene M1(ss). A figura mostra ensaios de complementação (72 h) empregando as cepas mencionadas em três diluições do inóculo inicial, conforme indicado nas placas. A composição do meio (sem leucina, sem uracila; pH 6,5; 7,2 e 8,0), com a concentração de FeSO₄ adicionado (200 μ M), se encontra descrita em Materiais e Métodos.

Em síntese, os resultados obtidos na presença de Fe, em conjunto com aqueles obtidos na presença de Cu, permitem concluir que o fenótipo de resistência a pH alcalino é dependente das concentrações relativas de Cu e Fe e que a presença ou não de Ccc2 e o seu grau de funcionalidade condicionam de forma variável a aquisição deste fenótipo. O aumento da atividade de Ccc2, à medida que aumenta o pH (Figura 35), indica claramente que o aumento da velocidade dos processos acoplados de hidrólise de ATP/transporte ativo de Cu(I) para o lúmen do Golgi seria o mecanismo molecular responsável (ao nível da Cu(I)-ATPase) pela resistência a pH alcalino de cepas que expressam Ccc2 funcional. Como já discutido anteriormente, este incremento na eficiência catalítica compensaria inclusive o enfraquecimento da complementariedade eletrostática entre Atx1 e MBD1 e as dificuldades para coordenar o Cu(I). Por este motivo, alterações no MBD1 tornariam ainda mais acentuada a sensibilidade a pH alcalino.

13. Modificação do crescimento de cepas Δ CCC2 transformadas com diferentes mutantes de Ccc2 na presença de inibidores do transporte de ânions

Os resultados que mostram a sensibilidade a pH alcalino das células que expressam ou superexpressam Ccc2 (ver por exemplo Figuras 41 e 42) são fortemente sugestivas de acoplamento funcional entre transporte de Cu(I) pela ATPase e fluxos de ânions entre diferentes compartimentos das células de leveduras. Para testar esta hipótese, foram delineados dois conjuntos de experimentos: 1) ensaios de complementação com Ccc2 nativa e mutantes na região N-terminal na presença de um inibidor da permuta $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$ (Figura 56); 2) ensaios de complementação com Ccc2 nativa e mutantes na região N-terminal na presença de um inibidor da produção intracelular de HCO_3^- (Figura 57). No primeiro conjunto, foi

DIDS 25 μ M

	pH 6,5	pH 7,2	pH 8,0
	Diluições		
	1/1 1/10 1/100	1/1 1/10 1/100	1/1 1/10 1/100
Ccc2			
ΔN-ter			
M1			
M1_(ss)			

Figura 56. A inibição do permutador $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$ da membrana plasmática por DIDS deprime de forma diferenciada o crescimento a pH alcalino de Ccc2 e seus **mutantes. Células ΔCCC2 foram transformadas com os seguintes plasmídeos: a) YEp contendo os genes CCC2, Δ N-ter ou M1; b) pCEN contendo o gene M1(ss). As figuras mostram ensaios de complementação empregando 2 μ L de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. Os ensaios (a pH 6,5; 7,2; 8,0) foram realizados na presença de DIDS 25 μ M (filtrado em filtro Millipore 0,22 μ m e aplicado sobre o meio após a autoclavação).**

ACTZ 100 μ M

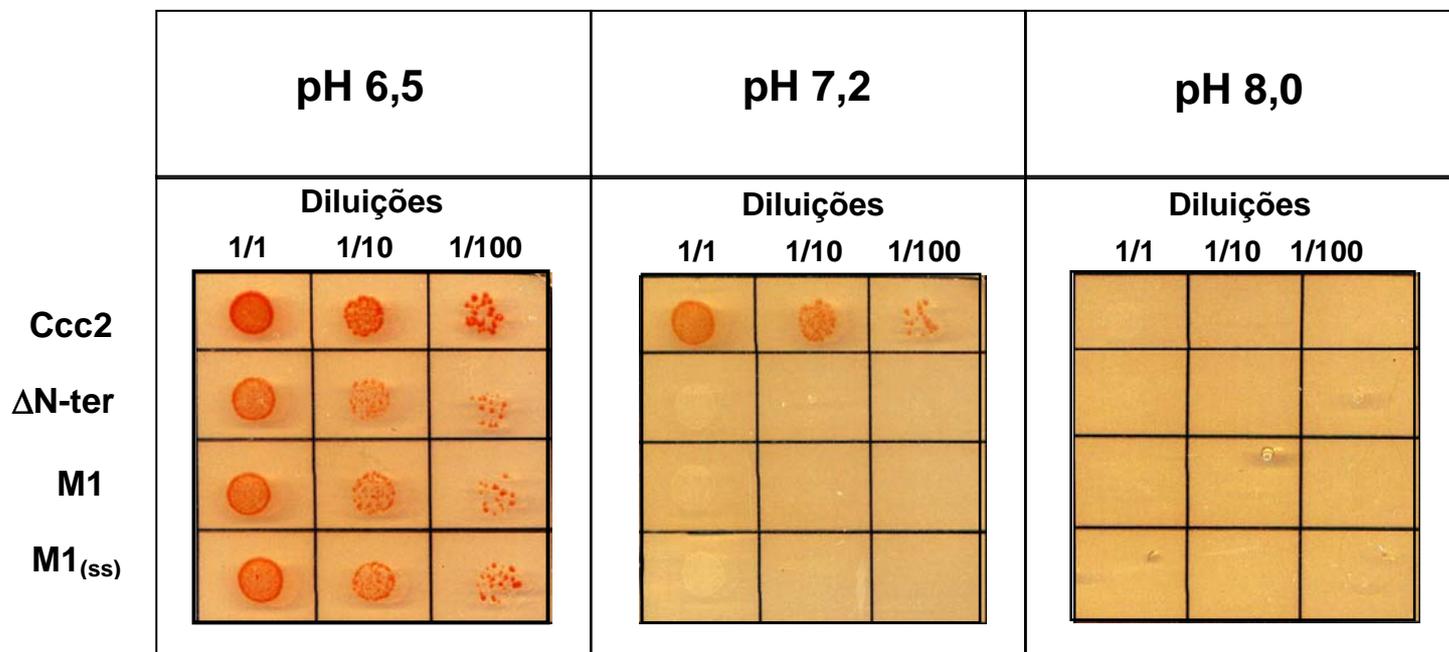


Figura 57. A inibição da anidrase carbônica por acetazolamida deprime de forma diferenciada o crescimento a pH alcalino de Ccc2 e seus mutantes. Células Δ CCC2 foram transformadas com os seguintes plasmídeos: a) YE_p contendo os genes CCC2, Δ N-ter ou M1; b) pCEN contendo o gene M1(ss). As figuras mostram ensaios de complementação empregando 2 μ L de inóculo (2×10^6 células/mL) em diferentes diluições (1/1, 1/10, 1/100) de cada uma das cepas mencionadas, conforme indicado. Os ensaios (a pH 6,5; 7,2; 8,0) foram realizados na presença de acetazolamida (ACTZ) 100 μ M (filtrada em filtro Millipore 0,22 μ m e aplicada sobre o meio após a autoclavação).

usado o inibidor dos transportadores AE⁷ da membrana plasmática, o ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2-2'-disulfônico (DIDS; Ko *et al.*, 2002); no segundo, acetazolamida (ACTZ), um inibidor da anidrase carbônica (CA⁸), enzima que catalisa a hidratação do CO₂ para gerar HCO₃⁻ (Jennings, 1989).

Quando se compara a Figura 56 com as Figuras 41 e 44, pode-se observar nitidamente que a inibição por DIDS da entrada de Cl⁻ em troca de HCO₃⁻ gerado no metabolismo, reduz o crescimento de todas as cepas, com efeito mais acentuado nos mutantes na região N-terminal. O mutante M1, que crescia de forma comparável a Ccc2 (Figuras 41 e 44), deixou de crescer inclusive a pH 7,2. A própria cepa que superexpressa Ccc2 (a única que se desenvolve em pH 7,2) tem um crescimento reduzido já em pH 6,5, desaparecendo completamente a pH 8,0. O mesmo perfil de inibição observado quando se adiciona ACTZ 100 µM (Figura 57), que deprime a oferta de HCO₃⁻ para sua permuta por Cl⁻, corrobora a conclusão anterior, reforça a hipótese de associação entre o transporte de ânions e revela, mais uma vez, o significado funcional da região N-terminal na aquisição do fenótipo de resistência a pH alcalino. A anidrase carbônica de levedura, codificada pelo gene NCE103, é importante para o fornecimento de fonte inorgânica de carbono para processos biossintéticos em condições anaeróbicas com alta pressão parcial de CO₂ (Aguilera *et al.*, 2005). Os resultados apresentados nesta tese permitem atribuir-lhe um papel até agora não descrito: o de participar na homeostasia celular de Cu.

Existem na literatura algumas observações fortemente sugestivas do acoplamento entre transporte de Cu e fluxo de ânions, demonstrado nesta tese. No fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*, por exemplo, há grandes evidências deste acoplamento: a produção de melanina, essencial para a sua virulência, requer a atividade de uma enzima denominada laccase, que depende tanto de Cu para o seu funcionamento (Salas *et al.*, 1996),

⁷Anion exchanger; ⁸Carbonic anhydrase

quanto do canal de Cl^- Clc-A, que tem grande homologia com o canal Gef1 encontrado no trans-Golgi em *S. cerevisiae* (Zhu e Williamson, 2003). Recentemente, foram ainda demonstrados os possíveis papéis de genes homólogos a CCC2 e ATX1 no processo de melanização (Walton *et al.*, 2005), o que fornece mais alguns indícios da interconexão entre a Cu(I)-ATPase e o transporte de ânions.

Resta por fim abordar a questão que surge a partir dos resultados obtidos a pH 6,5: por que todos os mutantes crescem a pH 6,5, independente da funcionalidade da Cu(I)-ATPase (ver por exemplo Figuras 41 e 44)? Como discutido a partir do observado após a adição de Cu (Figura 47), a hipótese da maior disponibilidade do metal neste pH do que em pHs alcalinos não parece ser plausível. Com concentrações em torno de $0,3 \mu\text{M}$ de Cu no meio extracelular (Tabelas 2 e 5), Ctr1 e Ctr3 (semisaturados) poderiam transferir o íon, em quantidades adequadas, para o citoplasma. Da mesma forma que proteínas de diferentes especificidades e origens podem realizar o papel de Atx1 na entrega do Cu a Ccc2 (que atuaria, assim, como uma enzima “oportunista”) (Morin *et al.*, 2005), Atx1 e outras proteínas ligadoras poderiam interagir aleatoriamente entre si e intercambiar os íons Cu(I) a elas ligados e transferi-lo para Fet3. Este processo, independente de Ccc2, se tornaria preponderante a pH 6,5. O ambiente citoplasmático ácido, por sua vez, proveria quantidades suficientes de H^+ para favorecer a ligação do Cu(I) a Fet3. Esta hipótese, portanto, significa atribuir a Ccc2 um papel predominante e crucial no transporte de Cu(I) em valores de pH alcalinos.

V. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesta tese permitem elaborar as seguintes conclusões:

1) O fenótipo de resistência de *S. cerevisiae* a pH alcalino requer a ligação de Cu(I) aos MBDs de Ccc2 para a sua transferência funcionalmente competente para os segmentos transmembrana.

2) A maior especificidade de MBD1 para conferir o fenótipo de resistência a pH alcalino está relacionada à sua estrutura terciária, envolvendo aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos na vizinhança de C13 e C16, que confeririam acentuada estabilidade para a coordenação de Cu(I), mesmo com importantes flutuações de Cu(I) (para menos) ou de pH (para mais).

3) O aumento progressivo da atividade Cu(I)-ATPásica em pHs crescentes pode ser considerado o mecanismo molecular adaptativo que permite responder ao estresse alcalino, garantindo o adequado transporte de Cu(I) para a luz do Golgi e sua entrega para Fet3.

4) O adequado fluxo de Cl⁻ através da membrana plasmática (em troca de HCO₃⁻) constitui a principal fonte de ânions para o lúmen do Golgi, facilitando, *via* compensação de cargas, os fluxos de Cu(I) e H⁺ para o interior da organela.

A partir destas conclusões, pode-se propor um modelo (Figura 58) que envolve diferentes transportadores que contribuiriam para uma adequada oferta de Cu(I) para o lúmen do Golgi em *S. cerevisiae* e que acopla este fluxo ao de ânions na membrana plasmática. Na membrana plasmática, os transportadores de Cu(I) de alta afinidade Ctr1 e Ctr3 mediarão a entrada do íon para o citoplasma; na mesma membrana, o permeador Cl⁻:HCO₃⁻ AE facilitaria a entrada de Cl⁻ em troca pelo HCO₃⁻ impermeável, formado pela hidratação do CO₂ metabólico. Diferentes isoformas de CA já foram descritas em praticamente todas as células e recentes evidências apontam para um acoplamento não apenas funcional, mas também

estrutural na membrana entre AE e CA (com diferentes estequiometrias; Sterling *et al.*, 2001), o chamado “transport metabolon”.

Na etapa citoplasmática, o abundante Cl^- e os escasso Cu(I) teriam mecanismos de transferência diferentes no destino final para o lúmen do Golgi. É fácil imaginar uma difusão livre do Cl^- no meio da água celular, uma vez que a afinidade das proteínas por Cl^- é extremamente baixa. Como detalhado na Introdução, as características do íon Cu(I) tornam praticamente impossível sua existência não-ligada a proteínas ou a moléculas pequenas como a glutatona (Rae *et al.*, 1999; Penninckx, 2002). Ligado às metalochaperonas mostradas na Figura 2 para *S. cerevisiae*, o Cu(I) é transferido para diferentes sistemas e organelas descritos nas seções 2.2 a 2.3 da Introdução. Pela metalochaperona Atx1, através de mecanismos moleculares igualmente descritos na Introdução e discutidos nas seções 8 a 10 à luz dos resultados apresentados, o Cu(I) chegaria ao seu transportador ativo na membrana do trans-Golgi, Ccc2, com participação dos MBDs de sua região N-terminal. Frisando mais uma vez o papel crítico de uma Cu(I) -ATPase funcional em condições de estresse alcalino, torna-se mais relevante o papel da saída de HCO_3^- acoplada à entrada de Cl^- para diminuir o pH intracelular, contribuindo assim para a homeostasia ácido-base.

Além de Ccc2, necessária para o transporte de Cu(I) contra o gradiente de potencial eletroquímico, o canal Gef1 estrategicamente colocalizado na membrana do Golgi (Greene *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1994; Davis-Kaplan *et al.*, 1998; Gaxiola *et al.*, 1998; Schwappach *et al.*, 1998; Flis *et al.*, 2002), permitiria a rápida entrada de Cl^- no lúmen desta organela. A entrada de Cl^- tem uma dupla conseqüência em termos de processos de transporte, *via* compensação de cargas: 1) facilitaria o transporte de Cu(I) (se Ccc2 fosse eletrogênica); 2) facilita o bombeamento pela H^+ -ATPase (eletrogênica, Xie *et al.* 1989; Al-Awqati, 1995; Kane, 2006), mantendo a acidificação do lúmen. Este pH intralumenal baixo é necessário tanto para o processamento pós-traducional de proteínas no Golgi, como para a adequada

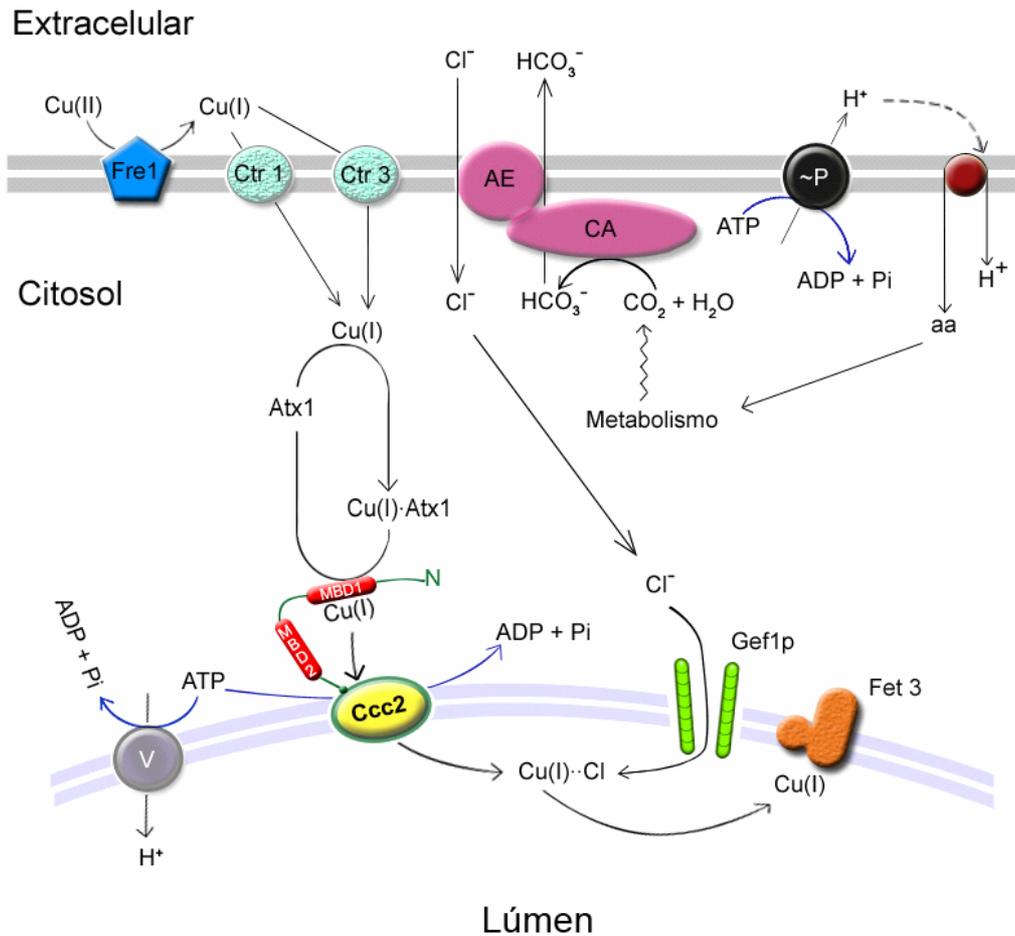


Figura 58. Modelo que associa a atividade hidrolítica da Cu(I)-ATPase na membrana do Golgi com a permuta $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$ na membrana plasmática, em *S. cerevisiae*. Em seqüência, a figura mostra, à esquerda, a redução de Cu(II) a Cu(I) por FreI, o transporte para o citoplasma mediado por Ctr1 e Ctr3, a ligação a Atx1, a transferência (preferencial) para o MBD1 e seu transporte ativo para o lúmen do Golgi mediado pela Cu(I)-ATPase. À direita, a figura focaliza a produção metabólica de CO_2 , sua hidratação catalisada pela anidrase carbônica (CA) e sua permuta por Cl^- mediada pelo trocador de ânions (AE). A representação mostra a CA citoplasmática associada molecular e funcionalmente ao AE, constituindo o “metabolon”. Em nível da membrana do Golgi, a representação mostra o canal de Cl^- Gef1, que permite a rápida entrada do ânion para o lúmen e sua interação eletrovalente com Cu(I) (o que impede sua ligação inespecífica a proteínas, garantindo sua acessibilidade a Fet3). O quadro se completa: a) com a H^+ -ATPase eletrogênica vacuolar (V) que acidifica o lúmen num processo facilitado pela compensação de cargas decorrente da entrada de Cl^- ; b) com a H^+ -ATPase da membrana plasmática (~P) que sustenta a maior parte dos eventos metabólicos em *S. cerevisiae*. Para os correspondentes dados e apropriadas referências que fundamentam o modelo, ver texto (Introdução e Resultados e Discussão).

transferência de Cu(I) para Fet3, que assim se torna funcional. Finalmente, a forte ligação eletrovalente do Cl⁻ com o Cu(I) (Cu⁺) garantiria suas altas concentrações em estado livre, não-ligado a proteínas, como no citoplasma.

VI. REFERÊNCIAS

- Aguilera J, Dijken JP, Winde JH, Pronk JT (2005). Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. *Biochem. J.* 391: 311-316.
- Al-Awqati Q (1995). Chloride channels of intracellular organelles. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 504-508.
- Anusien ACI, Ojo GB (1978). Limitations on the spectrophotometric determination of copper(I) with ferrozine. *Anal. Chem.* 50: 531-532.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Bonvin AMJJ (2004). A docking approach to the study of the copper trafficking proteins: interaction between metallochaperones and soluble domains of copper ATPases. *Structure* 12: 669-676.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Huffman DL, O' Halloran TV (2001a). Solution structure of the Cu(I) and apo forms of the yeast metallochaperone, Atx1. *Biochemistry* 40: 1528-1539.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Cantini F, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL, O' Halloran TV (2001b). Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. *J. Biol. Chem.* 276: 41365-41376.
- Arredondo M, Núñez MT (2005). Iron and copper metabolism. *Mol. Asp. Med.* 26: 313-327.
- Axelsen KB, Palmgreen MG (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46: 84-101.
- Bal N, Mintz E, Guillain F, Catty P (2001). A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* Cd²⁺-ATPase. *FEBS Letters* 506: 249-252.
- Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL, O'Halloran TV (2001). Solution structure of the yeast copper transporter domain Ccc2a in the apo and Cu(I)-loaded states. *J. Biol. Chem.* 276: 8415-8426.

- Banci L, Bertini I, Cantini F, Felli IC, Gonnelli L, Hadjiliadis N, Pierattelli R, Rosato A, Voulgaris P (2006). The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction. *Nat. Chem. Biol.* 2: 367-368.
- Beers J, Glerum DM, Tzagoloff A (1997). Purification, characterization, and localization of yeast Cox17, a mitochondrial copper shuttle. *J. Biol. Chem.* 272: 33191-33196.
- Bensen ES, Martin SJ, Li M, Berman J, Davis DA (2004). Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol. Microb.* 54: 1335-1351.
- Bissig KD, Voegelin TC, Solioz M (2001). Tetrathiomolybdate inhibition of the *Enterococcus hirae* CopB copper ATPase. *FEBS Lett.* 507: 367-370.
- Blobel G, Sabatini DD (1970). Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. I. Location of the polypeptides within ribosomes. *J. Cell Biol.* 1: 130-145.
- Brachat A, Liebundguth N, Rebischung C, Lemire S, Scharer F, Hoepfner D, Demchyshyn V, Howald I, Dusterhoft A, Mostl D, Pohlmann R, Kotter P, Hall MN, Wach A, Philippsen P (2000). Analysis of deletion phenotypes and GFP fusions of 21 novel *Saccharomyces cerevisiae* open reading frames. *Yeast.* 16: 241-253.
- Calahorra M, Martinez GA, Hernandez-Cruz A, Pena A (1998). Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast* 14: 501-15.
- Carr HS, George GN, Winge DR (2002). Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 277: 31237-31242.
- Caruso-Neves C, Rangel LB, Vives D, Vieyra A, Coka-Guevara S, Lopes AG (2000). Ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity is an effector protein for cAMP regulation in basolateral membranes of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta.* 1468: 107-114.
- Casareno RL, Waggoner D, Gitlin JD (1998). The copper chaperone Ccs directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273: 23625-23628.

- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA (2001). Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes. *Mol. Biol. Cell* 12: 323-337.
- Cha JS, Cooksey DA (1991). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 8915-8919.
- Cobbold C, Ponnambalam S, Francis MJ, Monaco AP (2002). Novel membrane traffic steps regulate the exocytosis of the Menkes disease ATPase. *Hum. Mol. Genet.* 11: 2855–2866.
- Culotta VC, Howard WR, Liu XF (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269: 25295-25230.
- Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B, Gitlin JD (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272: 23469-23472.
- Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Elde D, Moehle C, Kaplan J, Klausner RD (1994). Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76: 393-402.
- Davis D (2003). Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr. Genet.* 44 : 1-7.
- Davis-Kaplan SR, Askwith CC, Bengtzen AC, Radisky D, Kaplan J (1998). Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: an unexpected role for intracellular chloride channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13641-13645.
- De Freitas J, Wintz H, Kim JH, Poynton H, Fox T, Vulpe C (2003). Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals* 16: 185-197.
- Dix DR, Bridgham JT, Broderius MA, Byersdorfer CA, Eide DJ (1994). The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269: 26092-26099.

- dos Passos Lemos A, Fonseca de Souza AL, de Sa Pinheiro AA, de Berredo-Pinho M, Meyer-Fernandes JR (2002). Ecto-phosphatase activity on the cell surface of *Crithidia deanei*. *Z Naturforsch.* 57: 500-505.
- Efendiev R, Bertorello AM, Pressley TA, Rousselot M, Feraille E, Pedemonte CH (2000). Simultaneous phosphorylation of Ser11 and Ser18 in the alpha-subunit promotes the recruitment of Na(+),K(+)-ATPase molecules to the plasma membrane. *Biochemistry* 39: 9884-9892.
- Eide DJ, Bridgham JT, Zhao Z, Mattoon JR (1993). The vacuolar H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 241: 447-456.
- Eraso P, Gancedo C (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acidic pH during growth. *FEBS Lett.* 224: 187-192.
- Ferreira-Pereira A, Marco S, Decottignies A, Nader J, Goffeau A, Rigaud JL (2003). Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. *J. Biol. Chem.* 278: 11995-11999.
- Finney LA, O'Halloran TV (2003). Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors. *Science* 300: 931-936.
- Fischl As, Liu Y, Browdy A, Cremesti A (2000). Inositolphosphoryl ceramide synthase from yeast. *Meth. Enz.* 311: 123-130.
- Fiske CH, Subbarow Y (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
- Flis K, Bednarczyk P, Hordejuk R, Szewczyk A, Berest V, Dolowy K, Edelman A, Kurlandzka A (2002). The Gef1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with chloride channel activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 1144-1150.

- Forbes JR, His G, Cox DW (1999). Role of the copper-binding domain in the copper transport function of ATP7B, the P-Type ATPase defective in Wilson disease. *J. Biol. Chem.* 274: 12408-12413.
- Fox PL (2003). The copper-iron chronicles: The story of an intimate relationship. *Biometals* 16: 9-40.
- Fu D, Beeler TJ, Dunn TM (1995). Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca²⁺-sensitive phenotype of CSG1 mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu⁺-ATPase subfamily. *Yeast* 11: 283-292.
- Garza-Ulloa H, Villareal R, Canales AM (1980). Further studies of the ferrozine reaction for iron in beer. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* 38: 77-78.
- Gaxiola RA, Yuan DS, Klausner RD, Fink GR (1998). The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 4046-4050.
- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P *et al.* (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-391.
- Glerum DM, Shianko A, Tzagoloff A (1996). Characterization of COX17: a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 271: 14504-14509.
- Glickman J, Croen K, Kelley S, Al-Awqati Q (1983). Golgi membranes contain an electrogenic H⁺-pump in parallel to a Cl conductance. *J. Cell Biol.* 97: 1303-1308.
- Goffeau A (1998). The inventory of all ion and drug ATPases encoded by the yeast genome. *Acta Physiol. Scand.* 643: 297-300.
- Goffeau A, Slayman CW (1981). The proton-translocating ATPase of the fungal plasma

- membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 639: 197-223.
- Goodyer ID, Jones EE, Monaco AP, Francis MJ (1999). Characterization of the Menkes protein copper-binding domains and their role in copper-induced protein relocalization. *Hum. Mol. Genet.* 8: 1473-1478.
- Gralla EB, Thiele DJ, Silar P, Valentine JS (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper/zinc superoxide dismutase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 8558-8662.
- Greene JR, Brown NH, DiDomenico BJ, Kaplan J, Eide DJ (1993). The GEF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol. Gen. Genet.* 241: 542-553.
- Grubmeyer C, Penefsky HS (1981). Cooperatively between catalytic sites in the mechanism of action of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 256: 3728-3734.
- Guo Y, Nyasae L, Braiterman LT, Hubbard AL (2005). NH₂-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediate its Cu-dependent anterograde traffic in polarized cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289: 904-916.
- Hu YK, Kaplan JH (2000). Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein. The topology of the Na,K-ATPase alpha-subunit. *J. Biol. Chem.* 275: 19185-19191.
- Hua S, Ma H, Lewis D, Inesi G, Toyoshima C (2002). Functional role of "N" (nucleotide) and "P" (phosphorylation) domain interactions in the sarcoplasmic reticulum (SERCA) ATPase. *Biochemistry* 41: 2264-2272.
- Huang ME, Chuat JC, Galibert F (1994). A voltage-gated chloride channel in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 242: 595-598.

- Huffman DL, O'Halloran TV (2000). Energetics of copper trafficking between the Atx1 metallochaperone and the intracellular copper-transporter, Ccc2. *J. Biol. Chem.* 275: 18611-18614.
- Huffman DL, O'Halloran TV (2001). Function, structure and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 677-701.
- Humphrey JS, Peters PJ, Yuan LC, Bonifacino JS (1993). Localization of a TGN38 to the *trans*-Golgi network: involvement of a cytoplasmic tyrosine-containing sequence. *J. Biol. Chem.* 120: 1123-1135.
- Hunter T, Plowman GD (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* 22: 18-22.
- Iida M, Terada K, Sambongi Y, Wakabayashi T, Miura N, Koyama K, Futai M, Suguiyama T (1998). Analysis of functional domains of Wilson disease protein (ATP7B) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 428: 281-285.
- Jennings ML (1989). Structure and function of the red blood cell anion transport protein. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18: 397-430.
- Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, Yamada H (1999). The CLC chloride channel family. *Pflugers Arch.* 437: 783-795.
- Jungmann J, Reins HA, Lee J, Romeo A, Hassett R, Kosman D, Jentsch S (1993). MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *Embo J.* 12: 5051-5056.
- Kane P (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Micr. Mol. Biol. Rev.* 70: 177-191.
- Kaplan J (1996). Metal transport and unsafe sanctuary sites. *J Clin. Invest.* 98: 3-4.
- Knight SAB, Labbé S, Kwon LF, Kosman DJ, Thiele DJ (1996). A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev.* 10: 1917-1929.

- Ko BHS, Luo X, Hager H, Rojek A, Choi JY, Licht C, Suzuki M, Muallem S, Nielsen S, Ishibashi K (2002). AE4 is a DIDS-sensitive Cl⁻/HCO³⁻ exchanger in the basolateral membrane of the renal CCD and the SMG duct. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283: 1206-1208.
- Kühbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases (2004). *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 282-295.
- Kundra SK, Katyal M, Singh RP (1974). Spectrophotometric determination of copper(I) and cobalt(II) with ferrozine. *Anal. Chem.* 46: 1605-1606.
- Kuo Cl, Campbell JL (1983). Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* DNA replication genes: isolation of the CDC8 gene and two genes that compensate for the CDC8-1 mutation. *Mol. Cell Biol.* 3: 1730-1731.
- Kuo Y, Zhou B, Cosco D, Gitschier J (2001). The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98: 6836-6841.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15: 680-685.
- Lahey M, Gubler MS, Chase GE, Cartwright GE, Wintrobe MM (1952). Studies on copper metabolism. II. Hematologic manifestations of copper deficiency in swine. *Blood* 7: 1053-1065.
- Lamb AL, Torres AS, O'Halloran TV, Rosenzweig AC (2000). Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone. *Biochemistry* 39: 14720-14727.
- Lamb AL, Torres AS, O'Halloran TV, Rosenzweig AC (2001). Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat. Struct. Biol.* 8: 751-755.

- Lamb TM, Xu W, Diamond A, Mitchell AP (2001). Alkaline Response Genes of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Relationship to the *RIM101* Pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 1850-1856.
- Lara LS, Cavalcante F, Axelband F, De Souza AM, Lopes AG, Caruso-Neves C (2006). Involvement of the Gi/o/cGMP/PKG pathway in the AT2-mediated inhibition of outer cortex proximal tubule Na⁺-ATPase by Ang-(1-7). *Biochem. J.* 395: 183-190.
- Lee GR, Nacht S, Lukens JN, Cartwright GE. Iron metabolism in copper-deficient swine. *J. Clin. Invest.* 47 (1968) 2058-2069.
- Lee J, Prohaska J, Thiele D (2001). Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98: 6842-6847.
- Lin SJ, Culotta VC (1995). The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 3784-3788.
- Lin SJ, Pufahl RA, Dancis A, O'Halloran TV, Culotta VC (1997). A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J. Biol. Chem.* 272: 9215-9220.
- Lipecka J, Bali M, Thomas A, Fanen P, Edelman A, Fritsch J (2002). Distribution of Clc-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282: 805-816.
- Lode A, Kuschel M, Paret C, Rodel G (2000). Mitochondrial copper metabolism in yeast: interaction between Sco1p and Cox2p. *FEBS Lett.* 485: 19-24.
- Lorang JM, Tuori RP, Martinez JP, Sawyer TL, Redman RS, Rollins JA, Wolpert TJ, Johnson KB, Rodriguez RJ, Dickman MB, Ciuffetti LM (2001). Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1987-1994.

- Lowe J, Vieyra A, Catty P, Guillain F, Mintz E, Cuillel M (2004). A mutational study in the transmembrane domain of the yeast Cu(I)-ATPase, shows different roles for each Cys-Pro-Cys cysteine. *J. Biol. Chem.* 279: 25986-25994.
- Lowry OH, Rosebroug NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luk E, Jensen LT, Culotta VC (2003). The many highways for intracellular trafficking of metals. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8: 803-809.
- Lutsenko S, Petris MJ (2002). Function and regulation of the Mammalian copper-transporting ATPases: insights from biochemical and cell biology approaches. *J. Membr. Biol.* 191: 1-12.
- Lutzenko S, Kaplan JH (1995). Organization of P-Type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* 34: 15607-15613.
- Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S (2002). Evolution of protein kinase signalling from yeast to man. *Trends. Biochem. Sci.* 27: 514-520.
- Marheineke K, Grunewald S, Christie W, Reilander H (1998). Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Lett.* 441: 49-52.
- Martins LJ, Jensen LT, Simon JR, Keller GL, Winge DR, Simons JR (1998). Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 23716-23721.
- Mercer JFB, Barnes N, Stevenson J, Strausak D, Llanos R (2003). Copper-induced trafficking of the Cu-ATPases: a key mechanism for copper homeostasis. *BioMetals* 16: 175-184.
- Mercer JFB (2001). The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends Mol. Med.* 7: 64-69.

- Metz J, Wächter A, Schmidt B, Bujnicki JM, Schwappach B (2006). The yeast Arr4p ATPase binds the chloride transporter Gef1p when copper is available in the cytosol. *J. Biol. Chem.* 281: 410-417.
- Miras R, Cuillel M, Catty P, Guillain F, Mintz E (2001). Purification of heterologous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase Serca1a allowing phosphoenzyme and Ca²⁺-affinity measurements. *Protein. Expr. Purif.* 22: 299-306.
- Morgan CT, Tsivkovskii R, Kosinsky YA, Efremov RG, Lutsenko S (2004). The distinct functional properties of the nucleotide-binding domain of ATP7B, the human copper-transporting ATPase: analysis of the Wilson disease mutations E1064A, H1069Q, R1151H, and C1104F. *J. Biol. Chem.* 279:36363-73631.
- Morin I, Cuillel M, Lowe J, Crouzy S, Gillain F, Mintz E (2005). Cd²⁺ or Hg²⁺-binding proteins can replace the Cu⁺-chaperone Atx1 in delivering Cu⁺ to the secretory pathway in yeast. *FEBS Lett.* 579: 1117-1123.
- Nagano K, Nakamura K, Urakami K-I, Umeyama K, Uchiyama H, Kiwai K, Hattori S, Yamamoto T, Matsuda I, Endo F (1998). Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase 7B) after *in vitro* and *in vivo* exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat: an animal model of Wilson's disease. *Hepatol.* 27: 799-807.
- Nascimento DS, Reis CU, Goldenberg RC, Ortiga-Carvalho TM, Pazos-Moura CC, Guggino SE, Guggino WB, Morales MM (2003). Estrogen modulates ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflugers Arch.* 446: 593-599.
- Nørby JG (1988). Coupled assay of Na⁺,K⁺-ATPase activity. *Method. Enzymol.* 156: 116-119.
- Northehr SF, Roberts CJ, Stevens TH (1993). Membrane protein retention in the yeast golgi apparatus: dipeptidyl aminopeptidase A is retained by a cytoplasmic signal containing aromatic residues. *J. Biol. Chem.* 268: 1197-1209.

- Odermatt A, Suter H, Krapf R, Solioz M (1992). An ATPase operon involved in copper resistance by *Enterococcus hirae*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 671: 484-486.
- Odermatt A, Suter H, Krapf R, Solioz M (1993). Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 268: 12775-12779.
- Ooi CE, Rabinovich E, Dancis A, Bonifacino JS, Klausner RD (1996). Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* 15: 3515-3523.
- Payne AS, Gitlin JD (1998). Functional expression of the Menkes disease protein reveals common biochemical mechanisms among the copper-transporting P-type ATPases. *J. Biol. Chem.* 273: 3765-3770.
- Pedersen PL, Carafoli E (1987). Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *TIBS* 12: 146-150.
- Peña MMO, Lee J, Thiele D (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* 129: 1251-1260.
- Penninckx, MJ (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2: 295-305.
- Petris MJ, Mercer JFB, Culvenor JG, Lockhart P, Gleeson PA, Camakaris J (1996). Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulates trafficking. *EMBO J.* 15: 6084-6095.
- Philpott CC, Protchenko O, Kim YW, Boretsky Y, Shakoury-Elizeh M (2002). The response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of siderophore-based systems of iron uptake. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 698-702.

- Ponnambalam S, Rabouille C, Luzio JP, Nilsson T (1994). The TGN38 glycoprotein contains two non-overlapping signals that mediate localization to the *trans*-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 125: 253-268.
- Portmann R, Solioz M (2005). Purification and functional reconstitution of the human Wilson copper ATPase, ATP7B. *FEBS Lett.* 579: 3589-3595.
- Portnoy ME, Schmidt PJ, Rogers RS, Culotta VC (2001). Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics.* 265: 873-882.
- Ptacek J., Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJR, Stern DF, Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Sweitzer B, Predki PF, Snyder M (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438: 679-684.
- Pufahl R, Singer C, Peariso KL, Lin SJ, Schmidt P, Fahrni C, Culotta VC, Penner-Hahn JE, O'Halloran TV (1997). Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* 278: 853-856.
- Puig S, Thiele DJ (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 171-180.
- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808.
- Rae TD, Torres AS, Pufahl RA, O'Halloran TV (2001). Mechanism of Cu/Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCcs. *J. Biol. Chem.* 276: 5166-5176.
- Rees EM, Thiele D (2004). From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 175-184.

- Rosenzweig AC, Huffman DL, Hou MY, Wernimont AK, Pufahl RA, O'Halloran TV (1999). Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Struct. Fold. Des.* 7: 605-617.
- Rutherford JC, Bird AJ (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukar. Cell* 3: 1-13.
- Sagara Y, Inesi G (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J. Biol. Chem.* 266: 13503-13506.
- Salas SD, Bennet JE, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Williamson PR (1996). Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Exp. Med.* 184: 377-386.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sazinsky MH, Mandal AK, Argüello JM, Rosenzweig AC (2006). Structure of the ATP binding domain from the *Archaeoglobus fulgidus* Cu⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 281: 11161-11166.
- Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K, Jentsch TJ (1998). Golgi localization and functionally important domains in the NH2 and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J. Biol. Chem.* 273: 15110-15118.
- Serrano R (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev. Cytol.* 165:1-52.
- Serrano R, Bernal D, Simón E, Ariño J (2004). Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J. Biol. Chem.* 279: 19698-19704.
- Serrano R, Ruiz A, Bernal D, Chambers JR, Ariño J (2002). The transcriptional response to

- alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium mediated signaling. *Mol. Microbiol.* 46: 1319-1333.
- Sherman F (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350:3-41.
- Sikorski,R.S. and Hieter,P (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27.
- Silvester EJ, Grieser R, Sexton BA, Healy TW (1991). Spectroscopic studies on copper sulfide sols. *Langmuir* 7: 2917-2922.
- Smith GE, Summers MD, Fraser MJ (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell Biol.* 3: 2156-2165.
- Solioz M, Odermatt A, Krapf R (1994). Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man. *FEBS Lett.* 346: 44-47.
- Solioz M, Odermatt A (1995). Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270: 9217-9221.
- de Souza-Barros, Braz-Levigard F, Ching-San Jr Y, Monte MMB, Bonapace JAP, Montezano V, Vieyra A (2006). Phosphate sorption and desorption in primitive aqueous scenarios; relevance of acidic → alkaline transitions. *Orig. Life Evol. Biosph.* DOI 10.1007/s11084-006-9015-8.
- Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD, Dancis A (1996). A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271: 1552-1557.
- Sterling D, Reinhart AF, Reithmeier RAF, Casey JR (2001). A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase and chloride/bicarbonate exchangers. *J. Biol. Chem.* 276: 47886-47894.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, Cccs, localize to the intermembrane space

- of mitochondria. A physiological role for Sod1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 276: 38084-38089.
- Szczyпка MS, Zhu ZW, Silar P, Thiele DJ (1997). *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in vacuole function are defective in copper detoxification and iron-responsive gene transcription. *Yeast* 13: 1423-1435.
- Takeda K, Ushimaru M, Fukushima Y, Kawamura M (1999). Characterization of a P-type copper-stimulated ATPase from mouse liver. *J. Membr. Biol.* 170: 13-16.
- Tatchell K, Robinson L (2002). Use of green fluorescent protein in living yeast cells. *Meth. Enz.* 351: 661-683.
- Taylor AB, Stoj CS, Ziegler L, Kosman DJ, Hart PJ (2005). The copper-iron connection in biology: structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 15459-15464.
- Thiele DJ (1988). ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2745-2752.
- Thomas G, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW (1995). The Wilson disease gene: the spectrum of mutations and their consequences. *Nat. Genet.* 9: 210-217.
- Torres AS, Petri V, Rae TD, O'Halloran TV (2001). Copper stabilizes a heterodimer of the yCccs, the copper metallochaperone for Sod1. *J. Biol. Chem.* 276: 38410-38416.
- Toyoshima C, Mizutani T (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* 430: 529-535.
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647-655.
- Toyoshima C, Nomura H (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418: 605-611.

- Tsivkovskii R, Eisses JF, Kaplan JH, Lusenko S (2002). Functional properties of the copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells. *J. Biol. Chem.* 277: 976-983.
- Urbanowski JL, Piper RC (1999). The iron transporter fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J. Biol. Chem.* 274: 38061-38070.
- Valverde RH, Tortelote GG, Lemos T, Mintz E, Vieyra A (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is an essential mediator in the coordinated regulation of electrocyte Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 280: 30611-30618.
- van der Rest ME, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Poolman B, Konings WN (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59: 304-322.
- Van Ho A, Ward DM, Kaplan J (2002). Transition metal transport in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 237-261.
- Vanderwerf SM, Cooper MJ, Stetsenko IV, Lutsenko S (2001). Copper specifically regulates intracellular phosphorylation of the Wilson's disease protein, a human copper-transporting ATPase. *J. Biol. Chem.* 276: 36289-36294.
- Vanderwerf SM, Lutsenko S (2002). The Wilson's disease protein expressed in *SF9* cells is phosphorylated. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 739-741.
- Vasilyeva EA, Minkov IB, Fitin AF, Vinogradov AD (1982). Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite. *Biochem. J.* 202: 15-23.
- Voskoboinik I, Fernando R, Veldhuis N, Hannan KM, Marmy-Conus N, Pearson RB, Camakaris J (2003). Protein kinase-dependent phosphorylation of the Menkes copper P-type ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 337-342.

- Voskoboinik I, Mar J, Strausak D, Camakaris J (2001). The regulation of catalytic activity of the Menkes copper-translocating P-type ATPase. Role of high affinity copper-binding sites. *J. Biol. Chem.* 276: 28620-28627.
- Walker JM, Huster D, Ralle M, Morgan CT, Blackburn NJ, Lutsenko S (2004). The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilson's disease protein plays a key role in the transfer of copper from Atox1. *J. Biol. Chem.* 279: 15376-15384.
- Walton FJ, Idnurm A, Heitman J (2005). Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microb.* 57: 1381-1396.
- Weisiger RA, Fridovich I (1973). Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248: 4793-4796.
- Xie XS, Crider BP, Stone DK (1989). Isolation and reconstitution of the chloride transporter of clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* 264: 18870-18873.
- Yamaguchi-Iwai Y, Serpe M, Haile D, Yang W, Kosman DJ, Klausner RD, Dancis A (1997). Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J. Biol. Chem.* 272: 17711-17718.
- Yuan DS, Dancis A, Klausner RD (1997). Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 272: 25787-25793.
- Yuan DS, Stearman R, Dancis A, Dunn T, Beeler T, Klausner RD (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2632-2636.
- Zhang Z, Moo-Young M, Chisti Y (1996). Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Advances* 14: 401-435.
- Zhu X, Williamson PR (2003). A Clc-type chloride channel gene is required for laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microb.* 50: 1271-1281.

Zhu Z, Labbe S, Pena MM, Thiele DJ (1998). Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 273: 1277-1280.

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](#)