

**LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR E REGULAÇÃO PELA GLICOSE *in vivo* DE P E V  
H<sup>+</sup>-ATPases EM LEVEDURA**

**THAÍS MOTTA GRANATO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ  
ABRIL/2006**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR E REGULAÇÃO PELA GLICOSE *in vivo* DE P E V  
H<sup>+</sup>-ATPases EM LEVEDURA**

**THAÍS MOTTA GRANATO**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Lev Alexandrovitch Okorokov

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ**

**Abril de 2006**

**LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR E REGULAÇÃO PELA GLICOSE *in vivo* DE P E V  
H<sup>+</sup>-ATPases EM LEVEDURA**

**THAÍS MOTTA GRANATO**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia

Aprovada em

Comissão examinadora:

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Flávia Maria Lopes Passos (PhD, Microbiologia) - UFV

---

Prof. Dr. Cláudio Andrés Retamal Martinez (Dr, Bioquímica) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olga Lima Machado Tavares (PhD, Bioquímica) – UENF

---

Prof. Dr. Lev Alexandrovitch Okorokov (PhD, Bioquímica) – UENF  
(Orientador)

“Reunir-se é começo.  
Manter-se unido é progresso.  
Trabalhar unido é sucesso.”  
(Chico Xavier)

---

# ÍNDICE

---

EQUIPAMENTOS .....	VIII
ABREVIATURAS .....	IX
AGRADECIMENTOS .....	XI
RESUMO .....	XII
ABSTRACT .....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	2
Bombas protônicas .....	3
ATPases do tipo V .....	4
ATPases do tipo P .....	14
3. OBJETIVOS .....	23
3.1. Objetivos específicos .....	23
3.2. Estratégias experimentais .....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1. Material biológico.....	25
4.2. Métodos.....	25
4.2.1. Manutenção da cepa e condições de cultura .....	25
4.2.1.1. Preparo de meio de cultura líquido .....	25
4.2.1.2. Preparo de meio de cultura sólido .....	25
4.2.1.3. Manutenção da cepa .....	26
4.2.1.4. Preparo de pré-inóculo para isolamento de membranas.....	26
4.2.1.5. Curva de crescimento .....	26
4.2.1.6. Preparo de cultura de células para isolamento de membranas.....	27
4.2.2. Isolamento de membrana e fracionamento subcelular.....	27

4.2.2.1. Sedimentação de células .....	27
4.2.2.2. Isolamento dos esferoplastos .....	28
4.2.2.3. Pré-incubação dos esferoplastos com glicose .....	29
4.2.2.4. Pré-incubação dos esferoplastos com modificadores de MP.....	29
4.2.2.4.1. DCCD .....	29
4.2.2.4.2. Concanavalina A .....	30
4.2.2.5. Isolamento de membranas totais .....	31
4.2.2.6. Fracionamento de membranas intracelulares .....	32
4.2.3. Ensaio de acidificação .....	32
4.2.4. Determinação do conteúdo de proteína.....	33
4.2.5. Preparo da curva padrão de fosfato inorgânico (Pi) .....	33
4.2.6. Determinação de GDPase (Marcador de membranas enriquecidas com complexo de Golgi) .....	34
4.2.7. Determinação de NADP-H citocromo 'c' óxido redutase (Marcador de membranas enriquecidas com retículo endoplasmático).....	34
4.2.8. Determinação da concentração de sacarose.....	35
4.2.9. Determinação de $\Delta$ pH (transporte de H <sup>+</sup> ) .....	35
4.2.10. Imunodeteção por <i>dot blotting</i> .....	38
5. RESULTADOS .....	40
5.1. Curva de crescimento .....	40
5.2. Atividade de transporte de H <sup>+</sup> em membranas da via secretória .....	40
5.3. Atividade de transporte de H <sup>+</sup> por P-ATPase em membranas da via secretória ..	47
5.4. Atividade de transporte de H <sup>+</sup> por V-ATPase em membranas da via secretória ..	58
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÃO.....	70
8. REFERÊNCIAS.....	73

---

## EQUIPAMENTOS

---

Agitador de tubos	Phoenix Mod. AP56
Autoclave de Chamberland	Quimis – 190.24
Balança Analítica	Sartorius – BP 210S e Ohaus Mod. CT1200S
Banho-maria	Desaga Frigostat – Heidelberg, Fanem (Mod. 100), Quimis (Mod. 304) 1 – 105 e 2 – 105
Bomba peristáltica de fluxo	Pharmacia LKB – Pump P-1
Centrífugas	Himac CR21 – Hitachi e Himac CP 75 - Hitachi
Rotores	Nº 29 R14A (4000 rpm); Rotor P50A2 (30000rpm); P28S/P28S <sub>2</sub> 892 (27000 rpm)
Coletor de frações	Pharmacia LKB - Redi Frac
Espectrofotômetro	Shimadzu – UV – 1203
Estufas	Quimis – Mod. 317 B 242 e Fanem – Mod. 315 SE
Espectrofluorímetros	F 4500 Fluorescence Spectrophotometer – Hitachi e Spectrophotometer – RF - 5301 PC – Shimadzu
Freezer (– 70 °C)	“Forma Scientific’ Non – CFC Biofreezer (Mod. 8526)
Homogeneizador de vidro com pistilo de teflon	Glas-col
Micropipetas	Eppendorf e Gilson
pHmetro	DMPH-3– Digimed
Placa agitadora/aquecedora	Corning
Refratômetro	Milton Roy Company

---

## ABREVIATURAS

---

Abs	Absorbância
ACMA	9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina
A <sub>595</sub>	Absorbância a 595 nm
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
° C	Graus Celsius
Ca <sup>+2</sup>	Íon cálcio
CG	Complexo de Golgi
conA	Concanavalina A
DAB	Diamonibenzidina
DCCD	Dicicloexilcarbodiámidia
DMSO	Dimetil sulfoxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
F <sub>max</sub>	Fluorescência máxima
GDP	Guanosina difosfato
GDPase	Guanosina difosfatase
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosina trifosfato
H <sup>+</sup>	Íon hidrogênio
H <sup>+</sup> -ATPase	ATPase translocadora de prótons
I <sub>50</sub>	Inibição de 50 %
K <sup>+</sup>	Íon potássio
kDa	Quilodalton
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Mentem
Mg <sup>+2</sup>	Íon magnésio
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico
MP	Membrana plasmática

Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NADPH	α-Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato reduzido
PBS	Tampão fosfato salino (phosphate buffer saline)
pH	Potencial hidrogeniônico
P H <sup>+</sup> -ATPase	ATPase de membrana plasmática translocadora de prótons
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgânico
q.s.p.	que se precisa
RE	Retículo endoplasmático
rpm	Rotações por minuto
SDS	Docecil sulfato de sódio
V <sub>0</sub>	Velocidade inicial
van	Ortovanadato de sódio (vanadato)
VAC	Vacúolo
V H <sup>+</sup> -ATPase	ATPase vacuolar translocadora de próton
VS	Vesículas secretórias
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextran

---

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço à FENORTE, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Ao professor Lev A. Okorokov por ter sido sempre mais do que um orientador.

À Solange Samarão, pela colaboração e iniciação desde deste trabalho.

Ao prof. Luciano Pasqualoto Canelas, revisor e conselheiro.

Aos membros da banca, prof<sup>a</sup>. Flávia M. L. Passos, prof<sup>a</sup>. Olga L. M. Tavares e ao prof. Cláudio A. R. Martinez este tendo colaborado também na obtenção de importantes resultados aqui apresentados.

Aos professores do LFBM, João C. A. Almeida, Julio C. Ferreira, Valdirene M. Gomes e, em especial, Anna L. Okorokova-Façanha, pelo carinho, amizade e ajuda sempre.

Ao suporte técnico do LFBM, Luis e Carlos Eduardo, este muito mais que um colega de trabalho, um amigo de toda hora.

Aos amigos do LFBM pelo bom convívio e amizade, Ludmilla, Ana Cristina, Flávia Azevedo, Juliana, André, Izabela, Felipe, Priscila, Patrícia, Luana, Erica, Camila, Flavia Emenegilda, Oneida, Marcela, Renan, Guilherme, Diogo e, especialmente, Natalia.

Aos amigos da graduação, que estiveram presentes nas horas de desabafo, muitas vezes passando pelos mesmos problemas.

Aos amigos em geral que cooperaram, cada um do seu jeito e dentro de seus limites.

Às amigas pra toda vida, Suzanna, Mariângela, Lívia, Patrícia, Thaisinha, Flavinha, Fernanda e Gabi.

Ao Luis Felipe, pela atenção, amor, dedicação, compreensão e carinho no último e mais difícil ano de trabalho.

Aos professores e funcionários da UENF, em maior evidência os do CBB.

À minha família, principalmente mãe e irmão, pelo incentivo, tolerância e compreensão.

Por último, mas não menos importante, agradeço a Deus, porque sem ele nada na vida seria realizável.

---

## RESUMO

---

O objetivo principal do presente estudo é localizar e avaliar as H<sup>+</sup>-ATPases em leveduras além de sua estimulação pela glicose. Para tanto, foram isoladas/fracionadas membranas de *Saccharomyces cerevisiae* em gradiente descontinuo de densidade de sacarose. A eficiência do fracionamento foi avaliada a partir do uso de enzimas marcadoras de RE (NADPH citocromo c oxidoreductase) e CG (GDPase). Ao todo, foram definidas quatro populações enriquecidas por membranas de EN, RE (+MP), CG e VAC. O uso de inibidores específicos, vanadato e concanamicina, permitiu identificar a presença de P e V H<sup>+</sup>-ATPases. Procurou-se avaliar se a P H<sup>+</sup>-ATPase encontra-se ativa, capaz de transportar H<sup>+</sup>, desde a sua biossíntese no RE até a sua ancoragem na MP. Membranas intracelulares foram purificadas de vesículas de MP através do tratamento com concanavalina A (conA). Demonstrou-se que 75 % da atividade total de P H<sup>+</sup>-ATPase localiza-se na MP e 25 % nas membranas intracelulares. Em concentrações mais elevadas a conA promove a remoção de vesículas de membranas intracelulares, com conseqüente redução de atividade de V H<sup>+</sup>-ATPase. O fato de, mesmo nestas condições, ainda haver atividade de P H<sup>+</sup>-ATPase confirma que esta enzima encontra-se realmente ativa nas organelas intracelulares, além da MP. O efeito da glicose na estimulação da atividade de transporte de H<sup>+</sup> pela V-ATPase também foi avaliado. Os resultados confirmaram que o mecanismo molecular de regulação é baseado na dissociação/associação dos complexos V<sub>1</sub> e V<sub>0</sub>. A falta de correlação entre a imunodeteccção de V-ATPase por *Dot Blotting* e a atividade de transporte de H<sup>+</sup> encontrada sugere que existem diferentes formas da enzima. A enzima do CG não está sob controle efetivo da glicose ou esta sob controle menos efetivo em comparação a enzima do RE e do VAC, diferença explicada pela existência de dois genes que codificam a subunidade "a" (100 kDa) requerida para a associação dos complexos V<sub>1</sub> e V<sub>0</sub> da V H<sup>+</sup>-ATPase em levedura: *VPH1* e *STV1*. Os dados confirmam a hipótese de que duas bombas protônicas, P e V H<sup>+</sup>-ATPase, participam da homeostase de H<sup>+</sup> e criam gradientes que colaboram com o funcionamento ótimo das organelas da via secretória de levedura.

---

## ABSTRACT

---

The aim of this study is to localize and evaluate yeast H<sup>+</sup>-ATPases and their regulation by glucose. To this end, *Saccharomyces cerevisiae* membranes were isolated and fractionated in sucrose gradient. The fractionation efficiency was evaluated using enzymes markers of ER (NADPH cytochrome "c" oxidoreductase) and Golgi (GDPase). In the total, four membrane populations were defined: enriched by NE, ER (+ PM), Golgi and VAC. The use of specific inhibitors, vanadate and concanamycin, allowed to identify the presence of both P and V H<sup>+</sup>-ATPases. Also, we tried to evaluate if P H<sup>+</sup>-ATPase is active and able to transport H<sup>+</sup> already after its biosynthesis in the ER and during its traffic to the PM. Intracellular membranes were purified from PM by using concanavalin A (conA). The PM P H<sup>+</sup>-ATPase activity corresponds to 75% of its total activity and 25% to the secretory pathway enzyme. High conA concentrations promoted a removal of intracellular membranes, with consequent reduction of activity of V H<sup>+</sup>-ATPase. The presence of remaining P H<sup>+</sup>-ATPase activity, even in these conditions, confirms that this enzyme is really active in the intracellular membranes, beyond the PM. The glucose stimulation of H<sup>+</sup> transport activity by V-ATPase also was evaluated. The results confirmed that the molecular mechanism underlying V-ATPase regulation is based on the dissociation/association of V<sub>1</sub> and V<sub>0</sub> complexes. The lack of correlation between the V-ATPase subunits content revealed by *dot blotting* and the H<sup>+</sup> transport activity suggests the existence of different isoforms of the enzyme. The enzyme of Golgi appears not to be under the effective control of the glucose or is under less effective control in comparison with the enzyme of RE and VAC. This difference can be explained by the existence of 2 genes that codify subunit "a" (100 kDa) required for the association of V<sub>1</sub> and V<sub>0</sub> complexes of V H<sup>+</sup>-ATPase in yeast, namely *VPH1* and *STV1*. The data confirm the hypothesis that two proton pumps, P and V H<sup>+</sup>-ATPases, participate in the H<sup>+</sup> homeostasis and create the gradient that collaborate with the optimum organelles function in the yeast secretory pathway.

---

# 1. INTRODUÇÃO

---

Há evidências de que a homeostase iônica seja um processo crítico para diversos eventos fisiológicos, tais como, biossíntese/degradação, enovelamento, e endereçamento/secreção proteica, fusão e divisão de membranas, morfogênese de organelas e células, dinâmica de microtúbulos e divisão celular.

Desvios na homeostase iônica podem causar doenças/fenômenos patológicos em homens, plantas e microrganismos.

Estudos mostram que os mecanismos moleculares de homeostase iônica mantêm-se conservados ao longo do processo evolutivo, desde fungos e leveduras até o homem. Utilizam-se, portanto, leveduras como objeto de pesquisa desses processos básicos.

Leveduras vêm sendo utilizadas como modelo de estudo da via secretória, já que as vias utilizadas para transporte intracelular parecem ser similares àquelas apresentadas por mamíferos e vegetais. O transporte proteico em vacúolos de leveduras acontece através das mesmas organelas que medeiam o transporte de proteínas para os lisossomos em eucariotos superiores (Klionsky, 1992).

Durante os últimos anos, houve um progresso significativo na verificação da hipótese do papel polifuncional das organelas da via secretória com base em estudos das ATPases. Estes estudos serviram de alicerce para o desenvolvimento deste e de outros trabalhos pelo nosso grupo.

---

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

*S. cerevisiae* é um organismo unicelular utilizado em estudos de biologia celular desde o início do século XX e, desde então, tem recebido grande atenção.

É classificado como um fungo ascomiceto incluído na subclasse *Hemiascomycetidae*, ordem *Saccharomycetales*, família *Saccharomycetaceae*, caracterizada pela ausência de ascocarpos e hifas ascogênicas. A fase unicelular é predominante no seu ciclo de vida e a sua reprodução se dá por brotamento.

Dentre os organismos eucariotos, a levedura de brotamento foi o primeiro a ter seu genoma inteiro seqüenciado (Goffeau *et al.*,1996), revelando uma seqüência de, aproximadamente, 5.600 genes. Porém, uma nova estimativa do número de genes foi proposta com um limite superior a 5.804, mas após a remoção de muitos genes hipotéticos e de pseudogenes esta estimativa foi reduzida a 5.570 genes (Wood *et al.*,2001).

Devido à sua biologia ser bem compreendida, também tem sido uma ferramenta comum em biologia molecular. Usando *S. cerevisiae* como modelo, os cientistas têm analisado uma grande diversidade de processos celulares, que abrangem desde o controle do ciclo celular e tráfego de proteínas até a regulação transcricional (Forsburg & Nurse,1991).

São muitas as vantagens da utilização de leveduras como modelo de estudo, a considerar a simplicidade e economia do cultivo, amplitude da coleção de mutantes, variedade de detalhes já descritos do metabolismo, facilidade da manipulação genética, versatilidade de crescimento em ambiente aeróbico/anaeróbico, além da disponibilidade de um genoma recém seqüenciado.

Apesar de alguns aspectos como a rigidez da parede celular, seu pequeno tamanho (que pode impossibilitar a observação por microscopia de fluorescência), duplicação de certas regiões do genoma (talvez tetraploidização) e esporos muito resistentes atrapalharem algumas análises, até agora nenhum destes fatores influenciou sua utilização a ponto de inibi-la.

## Bombas protônicas

A membrana plasmática (MP) dos fungos filamentosos, leveduras, algas e plantas contêm ATPases que utilizam o complexo ATP-Mg como principal substrato e bombeiam  $H^+$  para fora da célula, formando o gradiente eletroquímico de  $H^+$  (Goffeau & Slayman, 1981; Pedersen & Carafoli, 1987; Serrano, 1991; Morsomme *et al.*, 2000). Essas enzimas convertem energia na forma química (hidrólise de ATP) em energia elétrica (potencial de membrana) e energia quimiosmótica do gradiente de  $H^+$  ( $\Delta pH$ ). Sua atividade gera a força próton-motora a partir da hidrólise da molécula de ATP (Mitchell, 1968).

A diferença de concentração de  $H^+$  (i.e., diferença de potencial químico,  $\Delta pH$ ) através da membrana e diferença de potenciais elétricos, chamada também de potencial de membrana ( $E_m$ ), constituem o gradiente eletroquímico de  $H^+$  ( $\Delta \mu H^+$ ).

O gradiente é usado tanto para o influxo de solutos necessários à sobrevivência celular quanto para o efluxo de íons tóxicos, metabólitos e outras substâncias. Cada um destes fluxos exige energia do gradiente eletroquímico de  $H^+$  para o funcionamento de uma gama de transportadores secundários (Goffeau & Slayman, 1981; Serrano, 1991).

Medidas do potencial de membrana e do gradiente de pH através da membrana ( $\Delta pH$ ) sugerem que a regulação do pH citosólico depende, dentre outros eventos, das  $H^+$ -ATPases (Sanders *et al.*, 1981; Sanders & Slayman, 1982).

As  $H^+$ -ATPases são agrupadas como: ATPases do tipo F ( $F_1F_0$   $H^+$ -ATPases), do tipo V ( $V_1V_0$   $H^+$ -ATPases), e do tipo P. As ATPases do tipo F são enzimas localizadas nas mitocôndrias, na membrana de bactérias (também chamadas ATPases do tipo  $B_1B_0$ ) e cloroplastos (ATPases  $C_1C_0$ ). Funcionalmente, as F  $H^+$ -ATPases são ATP sintetases, pois são responsáveis pela síntese de ATP. *In vivo* elas podem funcionar também como  $H^+$ -ATPases (Pedersen & Carafoli, 1987). As do tipo V encontram-se nos vacúolos, lisossomos e, ainda, na MP de algumas células especializadas. As ATPases do tipo P foram inicialmente descritas como localizadas na MP e VS (Merzendorfer *et al.*, 1997). Ambas utilizam a energia da hidrólise do ATP para gerar gradiente eletroquímico de  $H^+$ , transportando  $H^+$  para o lúmen de organelas como vacúolos, ou para fora da célula.

## ATPases do tipo V

As V H<sup>+</sup>-ATPases são bombas protônicas bastante conservadas durante o curso evolutivo. São encontradas em algumas membranas de compartimentos intracelulares de células eucarióticas (Kane,2000), tais como, vesículas cobertas por clatrina, grânulos de cromatina, endossomos, lisossomos, vesículas sinápticas, vacúolos (Wilkins *et al.*,2005) e até mesmo nos subcompartimentos finais do CG (Graham *et al.*,2003). Também estão presentes na MP de células animais especializadas (Nelson & Harvey,1999), tais como, células renais, epididimais, macrófagos, osteoclastos e osteoblastos (Merzendorfer *et al.*,1997).

Em plantas as V H<sup>+</sup>-ATPases estão localizadas no tonoplasto. Foi observada imunoresposta também em RE e CG, mas sua atividade ainda não foi evidenciada nestas organelas (Oberbeck *et al.*,1994). No tonoplasto as V H<sup>+</sup>-ATPases compõem entre 6,5-35% do conteúdo de proteína total, variando de acordo com a espécie da planta e com as condições fisiológicas/ambientais. Além da participação das V H<sup>+</sup>-ATPases na homeostase de íons e metabolismo celular, estas enzimas estão diretamente relacionadas ao estresse ambiental, podendo apresentar mudanças na expressão de algumas subunidades (Ratajczak,2000). O estresse salino induziu aumento de duas a três vezes da subunidade A em cultura de células de *Nicotiana tabacum* (Narasimhan *et al.*,1991).

Por terem sido caracterizadas primeiramente nas membranas vacuolares foram designadas como sendo ATPases do tipo vacuolar (Bowman & Bowman,1986; Pedersen & Carafoli,1987; Rea *et al.*,1987; Barkla & Pantoja,1996), ou simplesmente V-ATPases.

São enzimas responsáveis pela geração e manutenção do gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup>, através das membranas supracitadas, sendo mais ativas em pH entre 7,0 e 7,5. Estão envolvidas em uma gama de processos inter e intracelulares, tais como, o tráfego proteico, a manutenção de pH, o armazenamento de metabólitos, a liberação de neurotransmissores, a endocitose mediada por receptor e, ainda, a entrada de vírus/certas toxinas nas células (Nelson & Harvey,1999; Wilkins *et al.*,2005). Quando localizadas em MP de células especializadas são importantes para a maturação espermática e invasão de células tumorais (Inoue & Forgac,2005). Em

leveduras, as V-ATPases são essenciais para o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$ , aminoácidos e fosfato inorgânico bem como para energizar o transporte e manter o balanço osmótico (Ohsumi & Anraku,1983; Okorokov & Lichko,1983; Okorokov *et al.*,1985; Harvey,1992; Okorokov *et al.*,2001).

As V  $\text{H}^+$ -ATPases são constituídas por dois domínios funcionais (Figura 1; Wilkens *et al.*,2005). O domínio  $V_1$  é um complexo periférico de 570 kDa composto por oito subunidades (A-H), responsáveis pela hidrólise de ATP (Forgac,1999). As subunidades A, B, C, D, E, F, G e H apresentam massa molecular de 67 a 73 kD, 55 a 60 kD, 40 a 45 kD, 32 a 33 kD, 28 a 32 kD, 13 a 14 kD, 12 a 16 kD e 51 a 54 kD, respectivamente, dependendo da célula em questão. Supõe-se que a subunidade catalítica “A” tenha atividade hidrolítica, desde que os complexos  $V_1$  e  $V_0$  encontrem-se associados, enquanto que a subunidade “B” apresenta função regulatória. O domínio  $V_1$  é usualmente descrito como um hexâmero constituído de três cópias de cada uma das subunidades “A” e “B” (alternadas) e cópias simples das demais subunidades (Forgac,1999; Graham *et al.*,2000). O domínio  $V_0$  hidrofóbico, de aproximadamente 260 kDa, é constituído de cinco subunidades (a,d,c,c', c'') que juntas formam um canal protônico (Forgac,1999). As subunidades a, c, c', c'' e d do complexo  $V_0$  apresentam massa molecular aparente de 100 kDa, 16-17 kDa, 17 kDa, 21-23 kDa e 36-38 kDa, respectivamente (Graham *et al.*,2000).

A estequiometria das subunidades da V-ATPase ainda encontra-se em discussão. As subunidades do complexo  $V_1$  foram descritas como  $A_3B_3C_1D_1E_1F_1G_2H_{1-2}$  (Nishi & Forgac,2005; Wilkens *et al.*,2005). As subunidades de  $V_0$  foram estequiometricamente distribuídas como  $a(c,c')_{4-5}c''d$  por Wilkens e colaboradores (2005), mas segundo Inoue & Forgac (2005),  $a_1d_1e_xc_4c'_1c''_1$ .

A subunidade “e” parece ser homóloga de Vma21p (um dos três fatores de associação de V-ATPase no RE) descrito por Hill & Stevens (1994), mas encontra-se ainda em estudo e sua função permanece ainda desconhecida.

Em levedura, cada uma destas subunidades é codificada por um gene, exceto a subunidade “a”, que é codificada por um só gene em células de mamíferos (Peng *et al.*,1994), mas por dois genes em leveduras (Tabela I). Há, ainda, isoformas de algumas subunidades desta enzima em plantas e animais.

Os genes que codificam as subunidades da V-ATPase comuns entre CG e vacúolos são chamados *VMA* (vacuolar membrane ATPase). A diferença entre a V-ATPase destes dois compartimentos é justamente a presença de diferentes isoformas da subunidade “a” (Graham *et al.*,2003).

Os genes que codificam a subunidade “a” requerida para a associação da V H<sup>+</sup>-ATPase de levedura são chamados *VPH1* (Vacuolar pH 1) e *STV1* (Similar To V*PH1*) (Manolson *et al.*,1992;1994). Seus produtos apresentam 54% de identidade e 71% de similaridade. Vph1p está presente nas V-ATPases de vacúolo enquanto Stv1p está presente em V-ATPases localizadas em outros compartimentos intracelulares, possivelmente CG e endossomos (Kawasaki-Nishi *et al.*,2001).

Os complexos V<sub>0</sub> contendo Stv1p formados como resultado de sua superexpressão foram localizados em membranas vacuolares. Neste caso, apresentam uma razão transporte protônico/hidrólise de ATP de 4 a 5 vezes menor do que os complexos contendo Vph1p. Porém, ainda não está claro se esta é uma propriedade real da Stv1p *in vivo* ou um artefato causado pela superexpressão dessa subunidade.

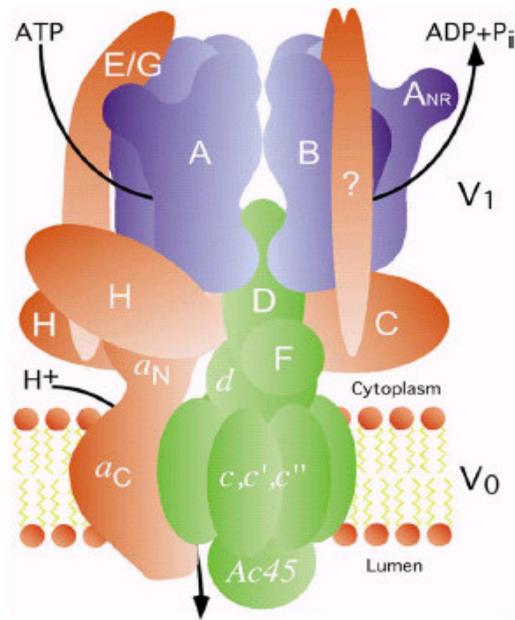
Quando presentes no vacúolo, os complexos Vph1p possibilitam a dissociação entre os complexos V<sub>1</sub> e V<sub>0</sub> em condições de escassez de glicose. Kawasaki-Nishi e colaboradores (2001) sugerem que os complexos contendo Stv1p permanecem constantemente associados nestas condições quando localizados em seus prováveis compartimentos intracelulares normais (CG e endossomos). O mesmo não acontece quando estes últimos são superexpressos no vacúolo, tornando possível a dissociação dos complexos. Sugere-se então, que exista uma reserva maior de V-ATPase ativa no vacúolo do que a realmente necessária para a sobrevivência celular, uma vez que a atividade remanescente em condições nas quais a glicose é depletada é suficiente para manter este compartimento relativamente ácido.

Surpreendentemente, as células deficientes apenas da V-ATPase de CG não apresentam problemas no crescimento, enquanto aquelas com ausência de V-ATPase vacuolar sofrem apenas um enfraquecimento (Graham *et al.*,2003). O fato de continuar viável mesmo quando na ausência da enzima, diferentemente dos demais organismos eucariotos, faz da *S. cerevisiae* um sistema ideal para estudo de estrutura, função e associação deste complexo enzimático.

Em *S. cerevisiae* foi identificada uma nova família de genes chamada de *VTC* (Vacuolar Transporter Chaperon). Esta família é importante na distribuição intracelular da  $V H^+$ -ATPase e de outras proteínas. A deleção de genes resultou na redução da  $V H^+$ -ATPase em membranas vacuolares e também na redução de  $P H^+$ -ATPase de membrana plasmática, possivelmente devido ao direcionamento para outro local (Cohen *et al.*,1999).

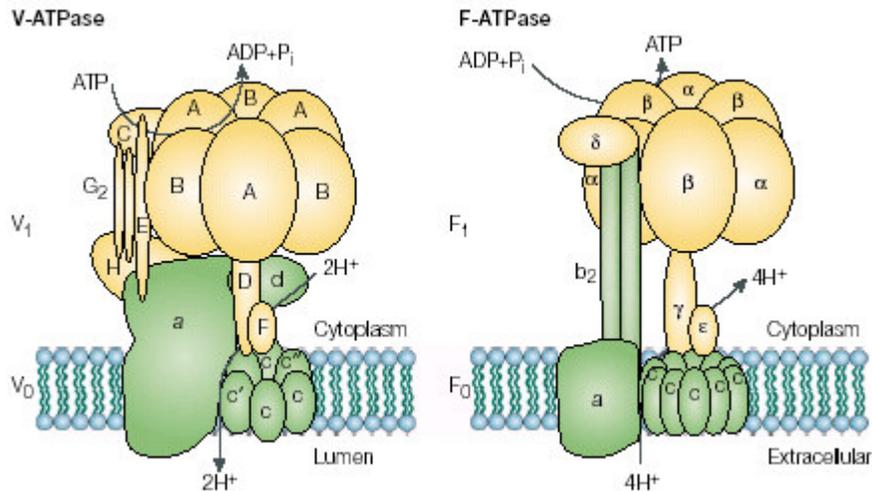
**Tabela I. Subunidades da V ATPase em leveduras (modificado de Nishi & Forgac,2002)**

Domínio	Subunidade	Peso Molecular (kDa)	Gene em levedura	Função da subunidade
V <sub>1</sub>	A	70	VMA1	Sítio catalítico, regulação
	B	60	VMA2	Sítio não-catalítico, <i>targeting</i> (?)
	C	40	VMA5	Atividade, associação
	D	34	VMA8	Atividade, associação
	E	33	VMA4	Atividade, associação
	F	14	VMA7	Atividade, associação
	G	13	VMA10	Atividade, associação
	H	50	VMA13	Atividade, (não-associação)
V <sub>0</sub>	a	100	VPH1/STV1	Transporte de H <sup>+</sup> , associação, <i>targeting</i>
	d	38	VMA6	Atividade, associação
	c	17	VMA3	Transporte de H <sup>+</sup>
	c'	17	VMA11	Transporte de H <sup>+</sup>
	c''	21	VMA16	Transporte de H <sup>+</sup>



**Figura 1. Modelo estrutural atual da V H<sup>+</sup>-ATPase (Wilkens *et al.*,2005).** Complexo V<sub>1</sub> com estrutura A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>CDEFG<sub>2</sub>H<sub>2</sub> e complexo V<sub>0</sub>, a(c,c')<sub>4-5</sub>c''d. Subunidades do domínio rotor e talo apresentadas em verde e vermelho, respectivamente, e o domínio catalítico (A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>) de V<sub>1</sub> em azul. A subunidade Ac45 está presente na enzima encontrada em células de mamíferos, mas não em leveduras.

As V H<sup>+</sup>-ATPases são estrutural e evolutivamente relacionadas às F-ATPases (ou ATP sintases) (Nelson,1992; Cross & Duncan,1996; Weber & Senior,1997). A subunidade A e B da V H<sup>+</sup>-ATPase apresenta homologia com a subunidade β e α, respectivamente, da F-ATPase (Bowman *et al.*,1988). A homologia da seqüência de aminoácidos sugere que estas subunidades evoluíram dos mesmos ancestrais. A propriedade que separa estruturalmente as F e V H<sup>+</sup>-ATPases em famílias distintas de bombas protônicas é a falta de homologia entre as subunidades C e E das V H<sup>+</sup>-ATPases e as subunidades γ, δ e ε das F-ATPases (Nelson,1991).



**Figura 2. Modelo estrutural comparativo entre V e F H<sup>+</sup>-ATPases (Nishi&Forgac,2002).**

Vários estudos sugerem que existe uma importante ligação entre as V H<sup>+</sup>-ATPases e o citoesqueleto. Mutações no gene *VMA4* que codifica a subunidade E em levedura causaram alterações na morfologia celular e mudanças na distribuição de actina (Zhang *et al.*,1998).

A super-expressão da subunidade E, em células de mamíferos, causou alterações na distribuição de actina, possivelmente através da interação com a via de sinalização mSOS-Rac1(Miura *et al.*,2001).

Um estudo com levedura mostrou que a dissociação dos complexos da V H<sup>+</sup>-ATPase em resposta a depleção de glicose é dependente de microtúbulos intactos e não de filamentos de actina, sugerindo que a interação entre as V H<sup>+</sup>-ATPases e os filamentos de actina pode não existir ou ter menor importância que em células de mamíferos (Xu & Forgac,2001).

Devido à importância da V-ATPase na fisiologia celular, é esperado que sua atividade seja regulada em diferentes níveis (Finbow & Harrison,1997).

Um dos primeiros mecanismos de regulação é a ativação pela glicose (Figura 3A). Quando células de levedura são privadas de glicose por pelo menos cinco minutos, pode ocorrer dissociação de aproximadamente 70% entre os complexos V<sub>1</sub> e V<sub>0</sub>. A integridade estrutural da enzima se refaz tão logo a glicose é novamente fornecida, sem que seja necessário iniciar a síntese de novos subcomplexos (Kane,1995). O transporte de H<sup>+</sup> feito pelas V H<sup>+</sup>-ATPases necessita da associação funcional dos complexos V<sub>1</sub> e V<sub>0</sub>. A atividade ATPásica de V<sub>1</sub> e a condução passiva de H<sup>+</sup> por V<sub>0</sub> são silenciadas pela

dissociação (Puopolo & Forgac,1990), ou seja, o complexo  $V_0$  não transporta  $H^+$  e o complexo  $V_1$  não hidrolisa ATP quando estão dissociados (Zhang *et al.*,1992; Nelson,1992; Kane,1995).

O desacoplamento dos dois domínios é, portanto, um método eficaz de controle da atividade da enzima sem que haja hidrólise desnecessária de ATP ou colapso do potencial de membrana (Finbow & Harrison,1997). Os setores  $V_1$  e  $V_0$  mantêm-se inativos na célula sem sofrer qualquer tipo de degradação, mesmo quando a supressão de glicose acontece por longos períodos de tempo. São sugeridas duas razões para tentar explicar este fato: (a) quando os níveis de glicose se normalizam, a reassociação ocorre mais rapidamente em comparação com o tempo necessário à síntese de novos subcomplexos ou (b) o complexo  $V_1$  citoplasmático pode exercer alguma função adicional daquela exercida quando associado à membrana.

A subunidade “C” possui dois domínios globulares conectados por um segmento  $\alpha$ -hélice. Num deles, chamado de “pé”, encontra-se tanto o resíduo N (1-115 resíduos de aminoácidos) quanto o C-terminal (287-392 resíduos); enquanto no outro domínio, chamado de “cabeça”, estão os resíduos centrais (116-263 resíduos de aminoácidos).

O domínio “pé” interage com um sítio ainda não identificado da subunidade “a” do complexo  $V_0$  da V-ATPase (Doroy *et al.*,2005).

A subunidade “C” é a única liberada em ambos os domínios,  $V_1$  e  $V_0$ , quando há dissociação *in vivo* (Kane, 1995). A clonagem do gene que codifica esta subunidade foi feita em células de medula bovina (Nelson *et al.*,1990), mas sua classificação como subunidade catalítica ou regulatória ainda não está definida (Nelson & Harvey, 1999).

A subunidade catalítica (subunidade “A”) da V-ATPase de células eucarióticas carrega três resíduos de cisteína conservados. Parece haver um possível mecanismo de regulação que envolve uma modificação na ligação covalente no sítio ativo da enzima, através da formação de pontes dissulfeto (Forgac,1998). Sugeriu-se que quando estas pontes são desfeitas, ou seja, transformadas em grupamentos sulfidrílicos (-SH), a enzima torna-se ativa (Figura 3B). Foi sugerido, também, que a inativação oxidativa seja responsável pela sensibilidade da enzima ao nitrato, e, que em determinadas condições, pode causar dissociação de  $V_1$  (Forgac, 1999).

O desacoplamento entre transporte protônico e a atividade ATPásica foi proposto como um mecanismo de regulação da V-ATPase (Figura 3C). Diversas condições, que

incluem baixos níveis de proteólises e altas concentrações de ATP, são causadoras de variações no acoplamento entre a hidrólise e o transporte de H<sup>+</sup>. No entanto, em ambos os processos, os sinais *in vivo* capazes de manter este acoplamento permanecem ainda desconhecidos (Forgac,1999). Foi sugerido que o resíduo C-terminal da subunidade “a” esteja envolvido neste acoplamento (Kawasaki-Nishi *et al.*,2001).

Por serem bombas eletrogênicas, uma permeabilidade aniônica paralela acompanha o transporte protônico, a fim de que aconteça uma acidificação significativa do lúmen. Sob condições *in vivo*, a permeabilidade aniônica mais importante envolvida parece ser o influxo de cloreto. Este fluxo é mediado por uma família de canais de cloreto presente em membranas intracelulares, cuja atividade é controlada por uma proteína quinase A dependente de fosforilação (Forgac,1998). Sugere-se que, após a fosforilação, os canais de cloreto sejam ativados (Figura 3D). Esta regulação representa um mecanismo adicional de controle das V-ATPases (Forgac, 1999).

Foi isolado um complexo, denominado RAVE (Regulador de ATPases de membranas Vacuolares e Endossomais), que parece estar relacionado com a reassociação dos complexos da V H<sup>+</sup>-ATPase. Este complexo é estruturalmente formado por 3 subunidades: Rav1p, Rav2p e Skp1p (Seol *et al.*,2001). Mutantes de levedura que não contem uma das subunidades que compõem RAVE apresentaram problemas estruturais e funcionais, mesmo quando crescidas na presença de glicose, sugerindo um papel crítico na associação biossintética dos complexos.

Há algumas indicações da existência de características comuns entre a associação biossintética da V H<sup>+</sup>-ATPases e reassociação de complexos dissociados, incluindo a necessidade da intervenção do complexo RAVE (Figura 3E) em ambos os processos (Sardon *et al.*,2002). Os autores também verificaram que as interações de RAVE com o complexo V<sub>1</sub> são interrompidas em células sem as subunidades E e G do complexo V<sub>1</sub>, e sugeriram o envolvimento direto destas subunidades na interação dos dois complexos.

A formação de uma ponte de dissulfeto entre a Cys<sup>254</sup> e a Cys<sup>532</sup> da subunidade A bovina resulta na inativação reversível da atividade da V H<sup>+</sup>-ATPases. Uma parte significativa das V H<sup>+</sup>-ATPases das vesículas cobertas de clatrina existe neste estado (Feng & Forgac,1994). Este mecanismo parece não funcionar no caso de enzimas do CG em leveduras (Liu *et al.*,1997).

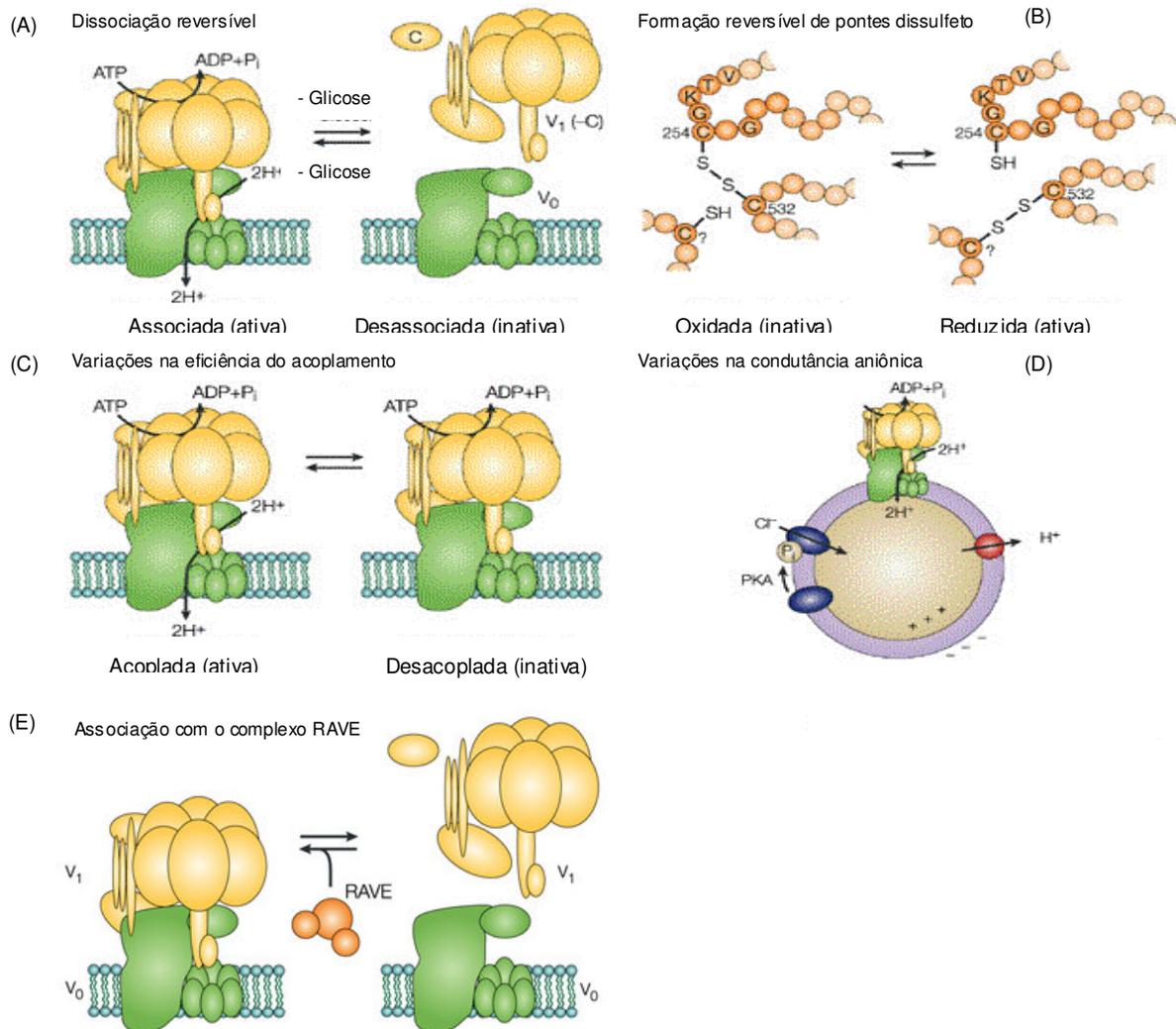
Alguns íons como o  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  causam mudanças na eficiência no acoplamento do transporte de prótons e hidrólise de ATP. O aumento na concentração de  $Mg^{+2}$  livre até 1,5 mM estimulou a formação de  $\Delta pH$  e de potencial de membrana em 6,6 e 2,9 vezes, respectivamente. A hidrólise de ATP foi estimulada em níveis maiores do que 10%. Isto significa que o  $Mg^{+2}$  livre funciona como fator de acoplamento do transporte de  $H^+$  e/ou hidrólise de ATP, enquanto que o mecanismo do acoplamento é desconhecido (Okorokov *et al.*, 1985).

Altas concentrações de ATP causam diminuição no acoplamento do transporte de  $H^+$  e de hidrólise de ATP pela  $V H^+$ -ATPase. A hidrólise do ATP pode continuar aumentando, mas o transporte de prótons chega a seu platô e começa a diminuir (Arai *et al.*, 1989). A proteólise também causa diminuição no acoplamento, já que o tratamento com baixas concentrações de tripsina promove uma perda na atividade de transporte de  $H^+$ , mesmo apresentando 50% da hidrólise de ATP (Adachi *et al.*, 1990).

O transporte de  $H^+$  pela  $V H^+$ -ATPases é um processo eletrogênico que necessita de um co-transporte de ânions ou efluxo de cátions/prótons em troca com outro cátion como o  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  ou  $K^+$  para dissipar o potencial de membrana formado durante o transporte de  $H^+$  (Kakinuma *et al.*, 1981; Okorokov & Lichko, 1983; Arai *et al.*, 1989). A dissipação é realizada por ânions que entram através de um canal, provavelmente de  $Cl^-$ , e a sua atividade é controlada por fosforilação dependente de proteína quinase A. A desfosforilação do canal de cloreto diminui a sua condutância e a acidificação dependente de ATP, enquanto que a fosforilação (pela proteína quinase A) aumenta as duas atividades (Mulberg *et al.*, 1991).

A concepção da importância do canal aniônico para modulação da atividade de  $V H^+$ -ATPase foi proposta para explicar os efeitos do  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  sobre a atividade de  $V H^+$ -ATPase e formação de  $\Delta\mu H^+$  (Okorokov *et al.*, 1985). Sugeriu-se que o  $Ca^{2+}$  poderia fechar o canal aniônico. A troca do  $Ca^{2+}$  com o  $H^+$  (trocador de  $Ca^{2+}/H^+$ ) estimulou a  $V H^+$ -ATPase em 60%, e aumentou o potencial de membrana feito pelo  $Ca^{2+}$  em 3 vezes, diminuindo simultaneamente o  $\Delta pH$ . O  $Mn^{2+}$  apresentou um efeito contrário, ou seja, a completa diminuição do potencial de membrana e o aumento significativo de  $\Delta pH$ , sugerindo que este íon seja capaz de abrir parcialmente o canal aniônico. Assim, cátions bivalentes como  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ , na levedura *S. carlsbergensis*, podem regular a atividade da  $V H^+$ -ATPase e modificar a maneira como

a energização de membrana vacuolar ocorre. Por exemplo, podem modificar a contribuição de  $\Delta\text{pH}$  e potencial de membrana feito pelo  $\text{H}^+$  em  $\Delta\mu\text{H}^+$ , e com isso regular as atividades de transportadores secundários, os quais usam o  $\Delta\text{pH}$  (trocaadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , arginina, lisina,  $\text{Zn}^{2+}$ ) ou potencial de membrana (uniportadores de citrato e  $\alpha$ -cetogluturato) (Okorokov *et al.*,1985). Pode-se esperar que o  $\text{Mg}^{+2}$  livre e /ou  $\text{Mn}^{+2}$  estimulem o transporte de arginina, lisina,  $\text{Zn}^{2+}$ , aumentando  $\Delta\text{pH}$ .



**Figura 3. Principais mecanismos de regulação de V H<sup>+</sup>-ATPase (Nishi&Forgac,2002).** (A) dissociação reversível, (B) formação reversível de pontes dissulfeto, (C) Variações na eficiência do acoplamento entre transporte e hidrólise e (D) variações na condutância aniônica a partir de canais de cloreto, (E) Associação com o complexo RAVE.

Há regulação na intensidade do fluxo de  $H^+$  através da realocização da  $V H^+$ -ATPase. Por exemplo, quando localizadas na região apical das membranas de células do epitélio secretório de vertebrados, rica em mitocôndrias, podem ser transportadas entre membranas intracelulares e superfícies apicais a fim de modular a secreção protônica destas células.

A atividade das  $V H^+$ -ATPases pode ser distinguida das outras  $H^+$ -ATPases pela sensibilidade aos diferentes inibidores. São consideradas como insensíveis ao vanadato, em distinção a  $P H^+$ -ATPase, porém há dois tipos de  $V H^+$ -ATPases descritas como sensíveis a este inibidor: 1) presente em tonoplasto de *Acer pseudoplatanus* e 2) localizada em células do fruto de *Citrus limon* (Ratajczak, 2000). Também são insensíveis a azida e oligomicina, que são inibidores específicos da atividade de  $F$ -ATPase.

São inibidas especificamente tanto *in vivo* como *in vitro* por bafilomicina  $A_1$ , mas também são sensíveis a altas concentrações de nitrato (Bowman,1983; Yoshimori *et al.*,1991). No caso da levedura *S. pombe*, 60 nM de bafilomicina  $A_1$ , foi a concentração considerada suficiente para inibição de  $V H^+$ -ATPases (Okorokov *et al.*,2001).

A concanamicina A é um antibiótico mais efetivo do que a bafilomicina  $A_1$  (Matsuoka *et al.*,1997), demonstra inibição total sob concentrações em torno de  $10^{-10}$  M. Em trabalhos anteriores foi encontrada inibição bastante efetiva da  $V H^+$ -ATPase com uso de concanamicina A entre 0,1 e 1,0 nM.

### **ATPases do tipo P**

As ATPases do tipo P formam uma segunda grande família de bombas iônicas, composta por mais de 50 membros, responsáveis pelo transporte ativo de uma gama de cátions através das diferentes membranas. Isto só é possível a partir da utilização da energia de hidrólise da ligação do fosfato terminal da molécula de ATP (Lutsenko & Kaplan,1995).

As  $P H^+$ -ATPases têm atividade ótima em pH menor ou igual a 6,0 (Serrano,1978). Porém, a maioria das enzimas desta família, que transportam outros cátions, tais como as  $Ca^{2+}$ -ATPases, por exemplo, são mais ativas em pH 7,0-7,2.

A característica distintiva dessas enzimas é a formação de um intermediário aspartilfosforilado durante seu ciclo catalítico por isso são chamadas de P-ATPases (Pedersen & Carafoli,1987; Axelsen & Palmgren,1998).

A massa molecular destas enzimas pode variar de 72 kDa, para ATPase transportadora de cádmio em bactérias (Nucifora *et al.*,1989), até 200 kDa , para ATP1-ATPase de *Plasmodium* (Krishna *et al.*,1993). No entanto, a maioria, incluindo a H<sup>+</sup>-ATPase de MP de leveduras, fungos e plantas, apresenta massa molecular em torno de 100 kDa.

Os domínios N- e C-terminal são as regiões mais divergentes dos homólogos deste tipo de enzima, sugerindo que tais domínios estejam especificamente envolvidos no transporte de cada cátion (Portillo *et al.*,1989).

As P ATPases são, normalmente, divididas em cinco grupos, de acordo com a seletividade iônica e estrutura primária (Catty *et al.*,1997; Axelsen & Palmgreen,1998):

i) ATPases do tipo P<sub>1</sub>: envolvidas no transporte de metais pesados como Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e Hg<sup>2+</sup>;

ii) ATPases do tipo P<sub>2</sub>: transportam vários cátions mono e divalentes incluindo, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>;

iii) ATPases do tipo P<sub>3</sub>: transportam H<sup>+</sup>;

iv) ATPases do tipo P<sub>4</sub>: transportam, provavelmente, aminofosfolipídeos;

v) ATPases do tipo P<sub>5</sub>: não se conhece o substrato, mas sabe-se que funcionam no RE, como a Cta4 ATPase, necessária para o controle da morfologia celular e da dinâmica dos microtúbulos em *S. pombe* (Okorokova-Façanha *et al.*,2002) e a ATPase Cod1p/Spf1p de *Saccharomyces cerevisiae* (Catty *et al.*,1997).

Foi demonstrado que Spf1p e Cta4p são importantes para homeostase de Ca<sup>2+</sup> em *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (Cronin *et al.*,2002; Okorokova-Façanha *et al.*,2002).

Em *S. cerevisiae* as ATPases do tipo P apresentam-se em número de 16, enquanto que em células animais e vegetais, foram encontradas mais de trinta, das quais se sabe que, pelo menos, duas são H<sup>+</sup>-ATPases. Entre as 16 ATPases encontradas em *S. cerevisiae* estão incluídas, entre outras, duas ATPases do tipo P<sub>1</sub>, cinco do tipo P<sub>2</sub>, uma do tipo P<sub>4</sub> e outra do tipo P<sub>5</sub> (Axelsen & Palmgreen,1998).

As P H<sup>+</sup>-ATPases de MP são sintetizadas como polipeptídeos de aproximadamente 106 kDa, sem modificações perceptíveis pela glicosilação ligada à asparagina ou proteólise durante seu tráfego até a MP (Holocomb *et al.*,1988). É integrada à membrana do retículo endoplasmático (RE) sem clivagem da seqüência N-terminal, sendo transportadas para o complexo de CG (CG) e, então, enviadas à MP passando pelas vesículas secretórias (VS) (Chang & Slayman,1991; Nakamoto *et al.*,1991). Apresentam-se funcionalmente ativas tanto nas VS quanto na MP. Entretanto, não está claro se são capazes de realizar o transporte de H<sup>+</sup>, quando localizadas nas membranas do RE e CG durante o tráfego em toda a via secretória até atingir VS e MP (Chang & Slayman,1991, Ferreira *et al.*,2001).

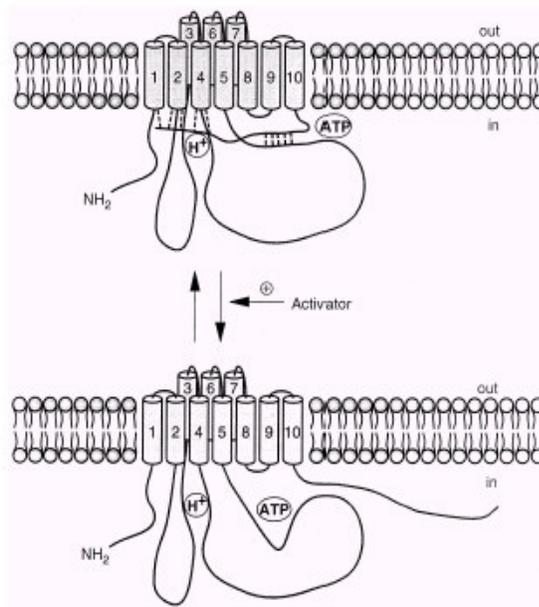
As P H<sup>+</sup>-ATPases de fungos, plantas e algas geram gradiente eletroquímico de membrana e dirigem a absorção de nutrientes para o co-transporte protônico. Em animais, são responsáveis pela criação do potencial de ação em tecidos nervosos, secreção e absorção de solutos nos rins, acidificação estomacal, absorção de nutrientes no intestino, relaxamento muscular e transdução de sinal dependente de Ca<sup>+2</sup>, entre outras funções (Axelsen & Palmgreen,1998).

O método mais simples de distinguir as P H<sup>+</sup>-ATPases das demais é através de ensaios com inibidores. A H<sup>+</sup>-ATPase de MP pode ser completamente bloqueada por vanadato, mas não é afetada por azida e oligomicina (inibidores de F-ATPase) ou por nitrato, bafilomicina A<sub>1</sub>, e concanamicina A (inibidores de V-ATPase). A inibição pelo vanadato (geralmente 100μM) pode ser ambígua na indicação da atividade ATPásica, já que células fúngicas também apresentam fosfatases vanadato sensíveis capazes de hidrolisar ATP. No entanto, P H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose *in vivo* são bem mais sensíveis ao vanadato (I<sub>50</sub> entre 8 e 10 μM) (Serrano,1983)

*S. cerevisiae* possui dois genes (*PMA1* e *PMA2*) que codificam H<sup>+</sup>-ATPases de MP, porém apenas *PMA1* demonstrou ser essencial para a viabilidade e para o crescimento celular (Schlesser *et al.*,1988). Entretanto, *PMA2* codifica uma proteína Pma2p funcional (Supply *et al.*,1993) que tem expressão 500 vezes menor do que a de Pma1p, mas e sua função fisiológica permanece, ainda, desconhecida (Viegas *et al.*,1994).

A H<sup>+</sup>-ATPase é uma das enzimas mais abundantes na MP de leveduras, compreendendo aproximadamente 10% das proteínas desta membrana. É um

polipeptídeo simples de aproximadamente 100 kDa ancorado à membrana por meio de dez  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas (Figura 4) (Auer *et al.*,1998; Portillo,2000; Ferreira *et al.*,2001). Três porções principais estão voltadas para o citosol: uma cauda N-terminal com cerca de 115 aminoácidos e duas grandes alças de 130 a 300 aminoácidos, que são as partes mais conservadas da proteína (Figura 4). A alça maior contém um resíduo aspartil que é fosforilado durante cada ciclo catalítico e está envolvido na ligação e hidrólise de ATP (Bowman & Bowman,1986).



**Figura 4. Modelo de ativação de  $H^+$ -ATPase de MP de fungos e plantas por alteração conformacional no C terminal (Portillo,2000).**

A P  $H^+$ -ATPase apresenta um mecanismo pós-transcricional de fosforilação em resíduos múltiplos de serina e treonina durante o tráfego do RE para a superfície celular. A razão funcional desta fosforilação é desconhecida. Entretanto são fortes as evidências de que uma fosforilação ocorra próximo a MP, tenha papel importante na ativação pela glicose (Ferreira *et al.*,2001).

A ativação pela glicose *in vivo* resulta numa mudança significativa em características da enzima que, provavelmente, são conseqüências de sua modificação bioquímica (Serrano,1983). A incubação de células de levedura com glicose, por exemplo, aumenta a afinidade da enzima ao Mg-ATP e ao vanadato (Serrano,1983; Portillo,2000)

A enzima ativada pela glicose extracelular tem Km para ATP de 0,3 mM na cepa ATCC 42407 e na levedura utilizada em panificação. Já a enzima não ativada, tem Km de 1,2 mM na cepa ATCC 42407 e 2,0 mM na levedura utilizada em panificação.

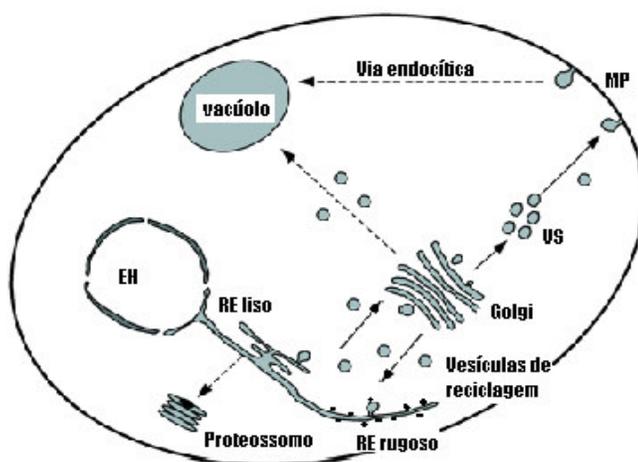
A enzima ativada apresenta maior sensibilidade ao vanadato, sendo necessários de 3 a 5  $\mu$ M para 50% de inibição ( $I_{50}$ ), enquanto que a enzima não ativada necessita de valores mais elevados, entre 17 e 18 mM (Serrano,1983)

Nas células eucarióticas, as proteínas são direcionadas à MP e organelas intracelulares através da via secretória iniciada no RE. Vários mecanismos de controle estão envolvidos neste transporte para detectar e eliminar proteínas defeituosas ao longo da via.

Muitas proteínas são eliminadas ainda no RE por um processo conhecido como ERAD (ER-associated degradation), que as devolve para o citoplasma para sofrer degradação pelos proteossomos. Esse mecanismo é dependente de ubiquitina e envolve a formação dos complexos de proteossomos 26S, membranas de RE e membranas de envelope nuclear. Aquelas que escapam deste sistema de reparo encontram um segundo controle, localizado no CG, que as envia para degradação vacuolar (Brodsky & McCracken,1999).

Há ainda um mecanismo de reconhecimento, localizado na MP, para regular transportadores e receptores por endocitose, em resposta a sinais fisiológicos específicos que, inicialmente, parece estar relacionado com a remoção de proteínas que podem atingir a superfície celular (Ferreira *et al.*,2002).

Sabe-se que as moléculas de P H<sup>+</sup>-ATPase de levedura são enviadas à MP através da via secretória. Após sua síntese no RE, são enviadas ao CG e através de VS atingem a MP (Figura 5).

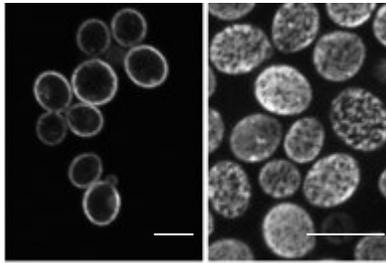


**Figura 5. Representação esquemática da via secretória em células eucariotas (adaptado de Morsomme, 2000).** RE liso: retículo endoplasmático liso; RE rugoso: retículo endoplasmático rugoso; VS: vesículas secretórias; EN: envelope nuclear; MP: membrana plasmática.

Pesquisas recentes consideraram os possíveis mecanismos que atuam nas primeiras fases do transporte das enzimas de MP a partir de RE e revelaram que as moléculas de  $P H^+$ -ATPase parecem formar complexos com lipídeos similares aos *lipid rafts* de MP já após sua biossíntese no RE (Malínská *et al.*,2003). Bagnat e colaboradores (2001) isolaram recentemente *lipid rafts* que apresentam alto conteúdo de esfingolipídeos, ergosterol e fosfolipídeos saturados, como na MP. Dados de espectrometria de massas mostram que podem conter *PMA1* ATPase ou, no mínimo, uma outra proteína Gas1p, proteína ancorada a glicofosfolipídeo ligado à superfície celular e de função ainda desconhecida. Nos *lipid rafts* não há proteínas residentes de RE ou proteínas destinadas à membrana vacuolar. Sugere-se, então, que são pontos onde se acumulam proteínas destinadas à MP (Ferreira *et al.*,2001). Os autores sugerem, ainda, que os longos segmentos hidrofóbicos transmembrana podem prender-se aleatoriamente à bicamada lipídica em regiões como *lipid rafts*, por exemplo (Rayner & Pelham,1997).

Malínská e colaboradores (2003) analisaram diferentes padrões de distribuição de proteínas e verificaram, através de marcação da *PMA1* ATPase com GFP (*Pma1p*-GFP), uma distribuição não homogênea da marcação, mas forte intensidade de fluorescência, compatível com a abundância da  $P H^+$ -ATPase (10 a 20% das proteínas de membrana). Parece que esta proteína está relacionada com diferentes *lipid rafts* e

que há um confinamento na MP (Figura 6). Observa-se, porém, que algumas células que expressam Pma1p-GFP apresentam sinal intracelular fraco, principalmente no RE. Estas marcações internas podem indicar a presença da enzima com localização intracelular, mesmo que pequena. É possível que essas enzimas não se tornem evidentes devido às diferenças de concentração/marcação entre a enzima distribuída nos compartimentos intracelulares e aquela localizada na MP.



**Figura 6. Localização de P H<sup>+</sup>-ATPase na MP (Malínská *et al*, 2003).** Padrões de fluorescência de Pma1p-GFP (A e B) em células de *S. cerevisiae*. Seção ótica transversal individual (A) e sobreposição de quatro seções óticas de superfície consecutivas (B). Barra, 5  $\mu$ m.

A ampla distribuição de Pma1p foi demonstrada por Sorin e colaboradores (1997) através de *imunoblotting*. A marcação aparece em todas as membranas separadas num gradiente de densidade de sacarose, porém com maior contribuição nas frações mais densas, enriquecidas por membranas do RE e MP (Sorin *et al.*,1997).

Estudos prévios (Granato,2002; Samarão,2003) sugeriram uma distribuição mais ampla da P H<sup>+</sup>-ATPase durante seu tráfego desde o RE até a MP, passando pelas diversas organelas da via secretória.

Devido à importância da P H<sup>+</sup>-ATPase em diversos processos celulares, sua atividade necessita de um controle apurado. Um dos mecanismos de regulação mais estudados é a ativação pela glicose.

Em leveduras, sugere-se que a ativação da P H<sup>+</sup> ATPase por glicose seja mediada pela fosforilação da enzima, que pode ser um requisito para que seja reconhecida por uma proteína regulatória acessória. Existem evidências de que a ativação induzida pela glicose envolve modificações nas ligações covalentes da enzima (Portillo,2000).

As ATPases de fungos e plantas são ativadas por um grande número de estímulos fisiológicos. Além da glicose, outros fatores presentes no meio podem controlar a atividade enzimática como a presença de etanol, ácidos orgânicos fracos, temperaturas supra-ótimas, choque térmico, e privação de fonte de nitrogênio (Portillo,2000).

Em quase todos os casos, o modelo proposto para explicar a ativação é semelhante: os ativadores superam a regulação negativa por um domínio localizado na porção C-terminal da enzima (Figura 4). Os resultados obtidos até agora sugerem um modelo no qual o domínio C-terminal interage, direta ou indiretamente, com a interface entre o setor de membrana e o sítio de ligação do ATP, inibindo a atividade enzimática. Este tipo de interação tanto pode limitar o acesso de prótons a seus sítios de transporte quanto o de ATP a seu sítio de ligação (Portillo,2000). Ativadores podem provocar mudanças na região C-terminal, desfazendo a interação inibitória e permitindo mudança para uma conformação mais ativa.

Cada tipo de H<sup>+</sup>-ATPase pode ser ativada através da diminuição do chamado “controle protônico”, através do qual a enzima é inibida à medida que  $\Delta\mu\text{H}^+$  aumenta, sendo que o potencial da membrana tem mais efeito sobre a atividade da enzima comparando com o  $\Delta\text{pH}$ .

Na presença de ácidos fracos, a P H<sup>+</sup>-ATPase pode transportar-se na forma não dissociada e dissociar-se quando atinge o citosol, diminuindo tanto o pH do citosol quanto o  $\Delta\text{pH}$  através da MP. Este sistema libera e ativa a enzima. Na presença de diferentes substâncias orgânicas como DMSO, por exemplo, a permeabilidade ao H<sup>+</sup> aumenta devido à desorganização das moléculas proteicas e fosfolipídios. Este efeito causa uma diminuição tanto do potencial de membrana, quanto do  $\Delta\text{pH}$  e controle protônico sobre a H<sup>+</sup>-ATPase, que é ativada como consequência dos processos indicados. Não está claro se estes casos da ativação da enzima estão envolvidos por mudanças na região C-terminal ou, ainda, por outras razões.

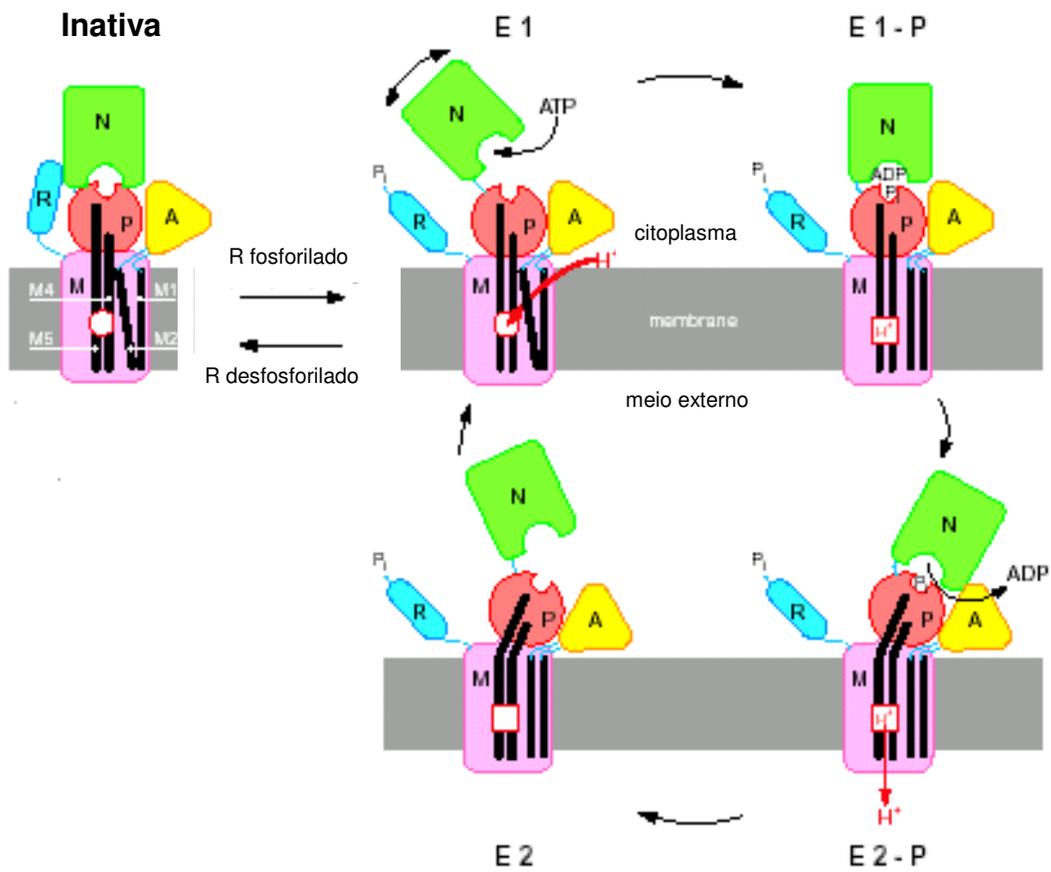
A configuração da H<sup>+</sup>-ATPase varia entre os estágios E1 e E2 e apresenta diferença de afinidade para nucleotídeos e íons transportados.

Na Figura 7 é apresentado o esquema de um mecanismo proposto para o transporte protônico e regulação da enzima. A bomba protônica contém quatro domínios citoplasmáticos: domínio de fosforilação (P), domínio ligante de nucleotídeo

(N), domínio de regulação C-terminal (R) e um último domínio ainda sem função conhecida (A). Apresenta, ainda, um domínio na membrana (M) bastante conservado e que pode ser novamente dividido em subdomínios classificados de M1 a M10, correspondentes às dez hélices transmembrana.

A ativação da bomba (após ligação com ATP) ocorre por meio de uma fosforilação reversível do domínio R, induzindo o estágio E1 da enzima, permitindo o acesso de  $H^+$  ao sítio de ligação de ATP-Mg (domínio N) e provocando, com isso, mudanças conformacionais que são transmitidas via M4 e M5 para os domínios P e A, reorientando-os. A movimentação do domínio A puxa o subdomínio M2 para uma posição que bloqueia a ligação do  $H^+$  no domínio M. A afinidade da fosforilação em P é reduzida e o  $H^+$  é transportado para fora do citoplasma. A enzima retorna, então, para o estágio E1 e um novo ciclo é iniciado (Kühlbrandt *et al.*, 2002).

Em situações em que há depleção de nutrientes, o metabolismo celular é diminuído, causando o nível baixo de ATP. Nessa situação, o domínio R autoinibitório é desfosforilado e associa-se a N, resultando na incapacidade de ligar ATP ao domínio de fosforilação (P). A afinidade do domínio N ao ATP é dependente da concentração deste substrato no meio.



**Figura 7. Mecanismo proposto para o transporte de H<sup>+</sup> e sua regulação (Kühlbrandt *et al.*, 2002).** (N) domínio de ligação com nucleotídeo, (P) domínio de fosforilação, (A) domínio sem função definida, (R) domínio regulatório, (M, M1, M2, M3, M4, M5) domínios transmembrana.

---

### 3. OBJETIVOS

---

- 1) Verificar se a P H<sup>+</sup>-ATPase apresenta-se ativa desde o RE (local de biossíntese) e CG durante seu transporte para VS e MP;
- 2) Determinar se a V H<sup>+</sup>-ATPase localizada em EN, RE, CG é ativada pela glicose extracelular como encontrado no caso da enzima de vacúolo ou se há seletividade nesta ativação;
- 3) Definir se existe algum mecanismo adicional de regulação da V H<sup>+</sup>-ATPase pela glicose extracelular além da dissociação/reassociação dos complexos V<sub>1</sub> e V<sub>0</sub>;

#### 3.1. Objetivos específicos:

1. Sabendo que P H<sup>+</sup>-ATPase de MP é estimulada *in vivo* pela glicose em MP (Serrano,1983), verificar se esta regulação enzimática ocorre já no RE e/ou CG ou somente nas VS e/ou MP;

2. Sabendo que V H<sup>+</sup>-ATPase de vacúolo é estimulada *in vivo* pela glicose (Kane,1995), verificar se esta regulação enzimática ocorre já no RE e/ou CG;

3. Sabendo que as V H<sup>+</sup>-ATPases de vacúolos e RE de levedura são também ativadas pela glicose *in vivo* (Kane,1995; Granato,2002; Samarão,2003), verificar se sua regulação depende da dissociação/associação de complexo catalítico V<sub>1</sub> e/ou alteração estequiométrica entre as subunidades “A” (catalítica) e “B” (regulatória);

#### 3.2. Estratégias experimentais:

1. Inibir/modificar P H<sup>+</sup>-ATPase de MP, a fim de purificar/liberar as membranas internas da contaminação da enzima de MP;

Duas estratégias principais de modificação de MP e sua P H<sup>+</sup>-ATPase podem ser usadas para tal tratamento:

- i) Inibição da atividade da P H<sup>+</sup>-ATPase de MP pelo DCCD;
- ii) Modificação bioquímica da MP por concanavalina A (lectina ligante de manoproteínas) para sua posterior remoção, eliminando a contribuição de suas enzimas;

É esperado que estes tratamentos possam inibir/remover a contribuição da P H<sup>+</sup>-ATPase de MP no transporte protônico e revelar se a P H<sup>+</sup>-ATPase está ou não ativa quando localizada nas membranas intracelulares. Espera-se, ainda, que este tratamento não diminua a atividade de V H<sup>+</sup>-ATPases, já que são enzimas de membranas intracelulares, e pretende-se alterar apenas as enzimas de MP.

2. Verificar a atividade enzimática e determinar o transporte de H<sup>+</sup> sensível a vanadato (inibidor específico de P H<sup>+</sup>-ATPase) e concanamicina A (inibidor específico de V H<sup>+</sup>-ATPase) nestas membranas purificadas/liberadas das atividades enzimáticas de MP;

3. a) Isolar e separar as membranas totais de levedura *S. cerevisiae* pré-incubando esferoplastos com e sem glicose para cada versão de experimento (+/- glicose e +/- inibidor ou modificador);

b) Separar as membranas em gradiente de densidade de sacarose e verificar a efetividade da separação por meio de determinação da atividade de enzimas marcadoras de RE e CG;

4. Avaliar a atividade de P H<sup>+</sup>-ATPase em membranas enriquecidas pelo RE e CG, através da utilização de vanadato, inibidor específico de P H<sup>+</sup>-ATPase, em membranas tratadas com os modificadores supracitados (DCCD e concanavalina A);

5. Avaliar a atividade de V H<sup>+</sup>-ATPase em organelas da via secretória de *S. cerevisiae* antes e depois do tratamento de esferoplastos/células com modificadores de MP a fim de avaliar possíveis efeitos laterais dos agentes modificadores sobre as enzimas de membranas internas.

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO:

A cepa AA255 de *S. cerevisiae* foi gentilmente cedida pelo Prof. Ludwig Lehle (Regensburg, Alemanha) e pelo Prof. Hans Rudolph (Institut für Biochemie der Universität Stuttgart, Alemanha). É uma cepa selvagem de laboratório, com genótipo MAT $\alpha$  ade2 his 3 $\Delta$ 200 leu 2-3,112 lys 2 $\Delta$ 201 ura 3-52. Esta cepa foi usada a fim de dar continuidade ao trabalho desenvolvido por Granato (2002).

### 4.2. MÉTODOS:

#### 4.2.1. – Manutenção da cepa e condições de cultura:

##### 4.2.1.1 – Preparo do meio de cultura líquido:

Foi utilizado o meio YEPD como meio padrão para o crescimento/manutenção das células, preparado como segue:

- 1% de extrato de levedura (USB);
- 2% de bactopectona (USB);
- 2% de glicose (Vetec);
- Água destilada q.s.p.

Esteriliza-se em autoclave a 0,5 Kg/cm<sup>3</sup>, a 121 °C por 30 minutos.

#### **4.2.1.2 – Preparo de meio de cultura sólido:**

Adicionam-se 2% de ágar ao meio padrão descrito anteriormente. Após autoclavagem, verte-se o meio em placas de Petri e/ou tubos de ensaio (para este, manter o tubo inclinado até solidificação completa do meio) e leva-se à estufa a 37 °C durante 24 horas, para controle de esterilidade.

#### **4.2.1.3 – Manutenção da cepa:**

Retira-se um arraste de células de *S. cerevisiae* da placa de Petri original (estoque) e semeia-se em uma nova placa e/ou em tubo de ensaio, fazendo estrias contínuas. Coloca-se em estufa a 30 °C por 48 h para o crescimento das colônias e então se armazena em geladeira.

A cada dois meses, em média, as células são repicadas a fim de manter sua vitalidade.

#### **4.2.1.4 – Preparo do pré-inóculo para o isolamento de membranas:**

Retira-se uma alçada de levedura da placa de Petri com repique mais recente e transfere-se para 40 mL do meio padrão YEPD, de forma que fique em torno de 0,1 unidade ótica de células/mL de meio, medido a 600 nm em espectrofotômetro. Deixa-se crescer por 24 horas incubando a 30 °C sob agitação constante (250 rpm) em shaker orbital até atingir a fase estacionária de 3 unidades óticas de células/mL de meio. Realizam-se diluições sempre quando a leitura ultrapassa 0,200 de valor de absorbância.

#### **4.2.1.5 – Curva de crescimento:**

Inocula-se uma alçada de levedura da placa de Petri contendo células viáveis e transfere-se para Erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL do meio padrão YEPD. Mantém-se a cultura sob agitação constante (250 rpm) em shaker orbital a 30 °C por aproximadamente 48 horas. Retira-se uma alíquota no tempo zero (momento da

inoculação) e alíquotas subseqüentes a cada duas horas, realizando-se a leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro.

Utilizam-se, no mínimo, dois frascos a fim de que apresentem uma diferença de 12 horas entre eles. Isto possibilita avaliar o comportamento das células durante a noite, período no qual não há monitoramento do crescimento.

#### **4.2.1.6 – Preparo de cultura de células para o isolamento de membranas:**

Calcula-se o volume de inóculo a ser adicionado em 250 mL de meio padrão (Erlenmeyers de 1 L) considerando-se tempo médio de duplicação da *S. cerevisiae* AA255 de, aproximadamente, 2 horas. Chamamos este inóculo inicial, crescido em menor volume de meio, de pré-inóculo.

Para fins de cálculo considera-se o volume de meio no Erlenmeyer (V), densidade óptica do pré-inóculo (F), tempo total de crescimento (T) e tempo de duplicação (t). Calcula-se o número de duplicações (d), fator de diluição (f) e o volume a ser transferido do pré-inóculo para o inóculo (v). Como no exemplo que segue:

- Volume do Erlenmeyer (V): 250 mL;
- Densidade óptica do pré-inóculo (F): 5 unidades;
- Tempo total de crescimento (T): 17,5 horas;
- Tempo de duplicação (t): 3 horas;
- Número de duplicações (d):  $17,5/3 \approx 6$ ;

Então, para atingir 3 unidades após 6 duplicações, faz-se:

3 unidades  $\rightarrow$  1,5  $\rightarrow$  0,75  $\rightarrow$  0,375  $\rightarrow$  0,1875  $\rightarrow$  0,09375  $\rightarrow$  0,046875

- Fator de diluição (f):  $F/0,046875 \approx 5/0,046875 = 106,66 \approx 107$ ;
- Volume a ser transferido (v):  $V/f = 250/107 \approx 2,34$  mL de pré-inóculo

Após a transferência do inóculo, deve-se manter sob agitação constante (250 rpm) em *shaker* orbital a 30 °C. Foram utilizadas culturas de células crescidas até uma faixa intermediária da fase logarítmica (2 a 3 unidades óticas de células/mL de meio).

#### **4.2.2 – Isolamento de membranas e fracionamento subcelular (Okorokov & Lehle, 1998):**

Com exceção do isolamento de esferoplastos, todo o procedimento foi realizado a baixas temperaturas. Soluções, tubos e rotores devem ser pré-resfriados.

##### **4.2.2.1) Sedimentação de células:**

Mantêm-se os Erlenmeyers contendo a cultura de células em recipientes com gelo a fim de reduzir a temperatura.

Pesam-se previamente os tubos de centrífuga (p1), para os quais se transfere a suspensão de células;

Centrifuga-se a 4000 *g* por 5 min a 4 °C. Utiliza-se parte do sobrenadante para ressuspender o sedimento e descarta-se o restante. Reune-se as células ressuspendidas num único tubo (de p1) e realiza-se nova centrifugação. Despreza-se todo o sobrenadante e pesa-se o tubo contendo o sedimento final (p2). Determina-se então o peso úmido das células a partir da diferença entre p1 e p2. Obtemos aproximadamente 3 a 4 g células/250mL do meio (peso úmido) para crescimento até 3 unidades óticas.

##### **4.2.2.2) Isolamento dos esferoplastos:**

Ressuspende-se as células em tampão de isolamento dos esferoplastos, também chamado tampão A (Sorbitol 1,2 M, Tris 10 mM, pH 7,4). Para cada grama de células (peso úmido) utilizam-se 5 mL do tampão A, 1 mg de complexo enzimático lítico (Liticase), e 12 µL de β-mercaptoetanol, incubando-se à 37 °C, sob agitação constante.

Determina-se a absorvância ( $Abs_{600nm}$ ) numa alíquota de 10 µL de suspensão de células e 990 µL água destilada. A leitura é feita em cubeta de plástico.

Monitora-se a cinética da hidrólise da parede celular, em espectrofotômetro, a partir do decaimento da absorvância sob intervalos médios de 5 -10 minutos até atingir 20% do valor inicial ou 50 minutos de incubação.

Transfere-se o tubo para o gelo e finaliza-se a incubação com a adição de *Stop Solution*, também chamado tampão B (Sorbitol 1,2 M, Tris HCl 200 mM, EDTA sódico 20 mM, pH 7,4), numa proporção de 1:19 de tampão B para tampão A. Adiciona-se, ainda, soluções de inibidores de proteases, PMSF e Benzamidina (200 mM estoque, diluídos em etanol) até concentração final de 1 mM.

A suspensão dos esferoplastos (~15 mL para cada tubo) foi cuidadosamente colocada, com auxílio de uma pipeta graduada, sobre 20 mL de solução de *Cushion*, também chamado tampão C (1,4 M Sorbitol, 50 mM Tris pH 7,4), num tubo de centrífuga inclinado, a fim de evitar a mistura entre a suspensão de esferoplastos e o tampão C. Centrifugou-se a 3000 *g* por 5 min a 4 °C a fim de purificar os esferoplastos de resíduos das enzimas líticas.

Descarta-se o sobrenadante cuidadosamente e secam-se as paredes do tubo com papel filtro para evitar que um possível resíduo de enzima lítica atue nas membranas após a homogeneização dos esferoplastos.

Ressuspende-se o sedimento com 20 mL de tampão de Lise, também chamado tampão D (sacarose 12,5%, MOPS 20 mM, pH 7,4), 1 mM DDT, 10 µL da solução estoque de coquetel de inibidores/10 mL de tampão (coquetel de inibidores: quimiostatina, pepstatina, antipaína, leupeptina e aprotinina, a 1 mg/mL cada), PMSF e benzamidina (200 mM estoque) até 1 mM.

#### **4.2.2.3) Pré-incubação dos esferoplastos com glicose:**

Utiliza-se 20mL de tampão de incubação 1A (glicose 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM em tampão A, ajustado para pH 7,2) para os esferoplastos incubados na presença de glicose e 20 mL de tampão de incubação 1B (MgSO<sub>4</sub> 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM em tampão A, ajustado para pH 7,2) para os esferoplastos incubados na ausência de glicose. Em ambos os casos, incubam-se os esferoplastos a 30 °C por 10 minutos.

#### **4.2.2.4) Pré-incubação dos esferoplastos com modificadores de MP:**

##### **4.2.2.4.1) DCCD:**

Separa-se a suspensão pré-incubada com glicose em três partes. Destas, duas partes são reunidas e centrifugadas a 3000 *g* por 5 minutos, enquanto a outra é separada para o controle, sofrendo a mesma centrifugação.

A porção controle (1/3) é conservada no gelo enquanto na outra (2/3) adicionam-se 400  $\mu$ M de DCCD, incubando-se por aproximadamente 10 segundos, e logo em seguida adicionam-se 10 mM de solução de glicina, a fim de parar o efeito do DCCD.

##### **4.2.2.4.2) Concanavalina A (Okorokov,1994):**

Prepara-se a solução de conA no momento da utilização. Utilizam-se 3,5 mg conA/mL tampão de incubação 2 ( $MnCl_2$  1 mM,  $CaCl_2$  1 mM, em tampão A, ajustado para pH 7,2), neste caso a conA utilizada apresenta cerca de 15% de pureza e faz-se necessário recalcular o peso a ser utilizado. Tem-se então massa final de 23,5 mg/g de célula úmida que é então dissolvido em tampão de incubação 2 numa proporção 1 mL de tampão para cada 10 mg de conA.

A agitação não deve ser vigorosa, pois apesar do soluto ser difícil de dissolver, a solução resultante produz muita espuma. Adiciona-se a solução de conA, aos poucos, incubando no gelo por 17 minutos.

A Figura 8 descreve, resumidamente, este e o passo seguinte, para o caso de isolamento na presença de conA.

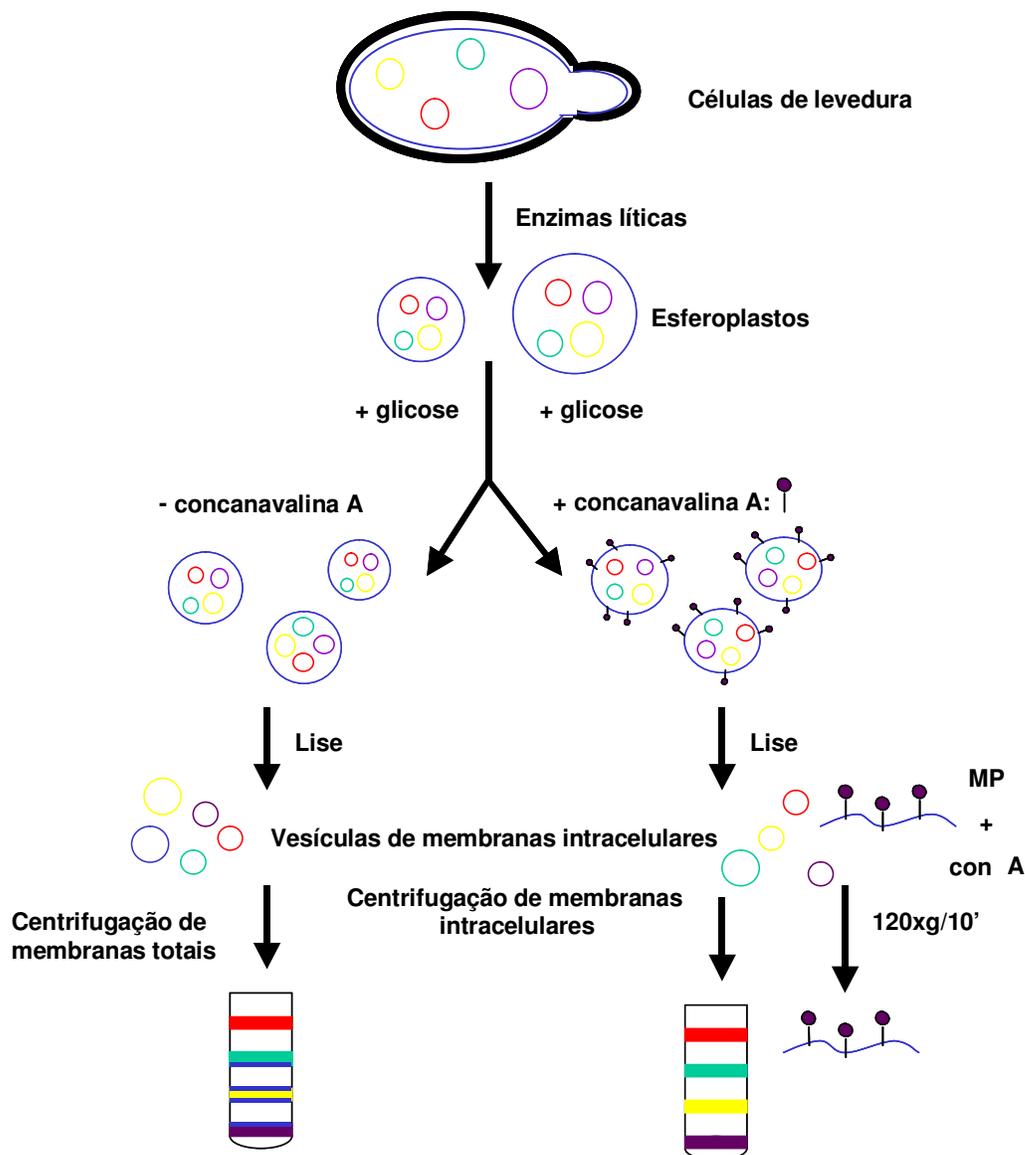


Figura 8. Esquema representativo do Isolamento de membranas de *S. cerevisiae* na presença de concanavalina A (conA), agente modificador de membrana plasmática (MP).

#### 4.2.2.5) Isolamento de membranas totais:

Coloca-se cada suspensão de esferoplastos, com auxílio de uma pipeta graduada, sobre 20 mL de solução de *Cushion*, também chamado tampão C (1,4 M Sorbitol, 50 mM Tris pH 7,4), num tubo de centrífuga inclinado, a fim de evitar a mistura entre a suspensão de esferoplastos e o tampão. Centrifuga-se a 3000 g por 5 min a 4 °C a fim de purificar os esferoplastos de resíduos de modificadores.

Homogeneiza-se a ressuspensão (21 ciclos completos) em homogeneizador de vidro com pistilo de teflon. Transfere-se para um tubo de centrífuga. Centrifuga-se a 3000 g por 5 min a 4 °C. Despreza-se o sedimento e transfere-se o sobrenadante (suspensão de membranas totais) para um tubo de ultracentrífuga. Centrifuga-se a 45000 g por 45 min a 4 °C.

Ao sedimento (membranas totais) adiciona-se, em média, 1,5 mL de tampão de lise (dependendo do conteúdo de membranas) contendo 1µg/mL de coquetel de inibidores. Transfere-se, aos poucos, o volume obtido, para o homogeneizador de vidro com o pistilo de teflon e faz-se a homogeneização (7 ciclos completos).

#### **4.2.2.6) Fracionamento de membranas intracelulares:**

Coloca-se uma alíquota de 1 a 1,4 mL de membranas totais sobre um gradiente descontínuo de sacarose de 20 a 56% (m/m de sacarose em tampão contendo MOPS-NaOH 10 mM, pH 7,2). Centrifuga-se a 140.000 g por 2 horas e 45 minutos de 0 a 4°C. Aliquota-se o volume restante de membranas totais, congela-se em nitrogênio líquido e armazena-se em freezer - 70 °C.

Depois de separadas pelo gradiente descontínuo de sacarose, coletam-se as frações de membrana, em freezer a -20 °C, com auxílio do coletor de frações e bomba peristáltica. Congelam-se as frações de membrana em nitrogênio líquido e armazena-se em freezer - 70 °C.

#### **4.2.3 – Ensaio de acidificação:**

Coloca-se em Becker de vidro (10 mL) 7 mL de tampão de acidificação (1,2 M Sorbitol, pH 7,2) e um magneto pequeno (tamanho suficiente para manter agitação constante sem atingir o eletrodo do pHmetro).

Mede-se o pH no tempo zero, adicionam-se 2 – 2,5 g/mL de esferoplastos (ou células) isolados como descrito anteriormente e fazem-se anotações sucessivas dos valores de pH, de 10 em 10 segundos. Após 1 - 2 minutos, em média, é adicionada concentração conhecida de modificador de MP e depois de 5 minutos, adiciona-se o tampão com glicose (1,2 M Sorbitol, 100 mM glicose, pH 7,2), mantendo-se sempre um

mesmo volume final e medindo-se o pH no mesmo intervalo até um tempo total médio de 30 minutos.

Constrói-se a curva de acidificação a fim de determinar a concentração ótima de modificador a ser utilizada no isolamento de membranas.

#### **4.2.4 – Determinação do conteúdo de proteína (Bradford,1976):**

Transfere-se 28 mg de Comassie Brilliant Blue G 90% para um Becker, devidamente envolto em papel alumínio para evitar a entrada de luz, contendo 12 mL de etanol absoluto. Deixa-se sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente (25 – 30 °C). Adicionam-se 25 mL de ácido ortofosfórico (85%) e após homogeneização completa-se o volume para 250 mL com água destilada em balão volumétrico. Filtra-se a solução em papel de filtro por três vezes. Armazena-se em vidro âmbar na geladeira.

Para determinação da curva padrão é utilizada uma solução de albumina de soro bovino contendo 1 mg/mL, armazenada em freezer ou congelador. Medem-se volumes de 2 µL a 20 µL da solução de albumina, completa-se para um volume de 100 µL com água destilada, e adiciona-se 1 mL da solução de Bradford, em intervalos de 30 em 30 segundos. Aguarda-se exatamente 10 minutos, à temperatura ambiente, e procedem-se as leituras em espectrofotômetro a 595 nm obedecendo ao mesmo intervalo de tempo utilizado anteriormente.

Determina-se o conteúdo de proteína utilizando-se entre 5 e 15 µL de suspensão de membranas, completando-se o volume para 100 µL com água destilada e adicionando-se 1 mL da solução de Bradford em intervalos de 30 em 30 segundos. Aguardam-se novamente exatos 10 minutos, à temperatura ambiente, e procedem-se leituras em espectrofotômetro a 595 nm obedecendo ao mesmo intervalo de tempo utilizado anteriormente.

O volume de membrana utilizado pode variar de acordo com o conteúdo de proteína. Os valores obtidos nas dosagens devem ficar, preferencialmente, entre os valores médios estabelecidos na da curva padrão.

#### **4.2.5 – Preparo de curva padrão de fosfato inorgânico (Pi):**

Utiliza-se uma solução estoque de 0,5  $\mu\text{mol/mL}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (previamente desidratado a uma temperatura entre 40 e 60  $^\circ\text{C}$ ) como padrão para a dosagem do conteúdo de fosfato inorgânico ( $\text{P}_i$ ). Medem-se volumes entre 50 e 1000  $\mu\text{L}$  desta solução para determinar a curva padrão. Os volumes inferiores a 1000  $\mu\text{L}$  foram completados com água destilada até atingir este volume final. Incubam-se os tubos a 30  $^\circ\text{C}$  por 30 minutos e então se adicionam 2,0 mL de uma solução C, que consiste de uma mistura 10:1 (v:v) entre as soluções A (molibdato de amônio 0,5%, SDS 0,5%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2%) e B (10% ácido ascórbico), que deve ser preparada o mais próximo possível do momento de utilização. Utiliza-se esta curva como padrão para a determinação fosfolitolítica de GDP, descrita a seguir.

#### **4.2.6 – Determinação de GDPase (Enzima marcadora de membranas enriquecidas por CG) (Albeijon *et al.*,1989):**

Faz-se a preparação em tubos, no gelo, adicionando 10 $\mu\text{L}$  de solução de imidazol 0,02 M, pH 7,4, 10  $\mu\text{L}$  de solução de Triton 0,1%, 10  $\mu\text{L}$  de solução de GDP 70 mM, 2  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{CaCl}_2$  40  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{L}$  de suspensão de membranas isoladas de *S. cerevisiae*. Completa-se o volume final do meio de incubação (100  $\mu\text{L}$ ) com água destilada, quando necessário.

Incuba-se a 37  $^\circ\text{C}$  por 30 minutos, retornam-se as amostras para o gelo e adicionam-se 20  $\mu\text{L}$  de SDS 5% gelado, a fim de parar a reação. Completa-se o volume para 1 mL com água destilada, homogeneiza-se e adicionam-se 2 mL da solução C descrita anteriormente. Incuba-se por mais exatos 10 min em banho-maria a 30  $^\circ\text{C}$  e procede-se a leitura a 750 nm em espectrofotômetro. A atividade GDPásica corresponde a quantidade de fosfato inorgânico ( $\text{P}_i$ ) liberado pela hidrólise de GDP.

#### **4.2.7 – Determinação de NADP-H citocromo “c” oxireductase (Enzima marcadora de membranas enriquecidas por RE) (Feldman *et al.*,1987):**

Faz-se a determinação diretamente numa cubeta de plástico a partir da mistura de 0,1 mL da solução de NADPH (Sorbitol 0,6 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NADPH 1 mM, pH 7,4), 0,9 mL da solução de citocromo “c” na presença solução contendo KCN (Sorbitol 0,6 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, 2,6 mg/100 mL de KCN e 1 mg/mL de citocromo “c”, pH 7,4, pré-aquecida a 30 °C) e 30  $\mu\text{L}$  de suspensão de membranas isoladas de *S. cerevisiae*. Imediatamente cobre-se a cubeta com Parafilm, invertendo-a aproximadamente 3 vezes a fim de homogeneizar completamente.

Mede-se a atividade de NADPH citocromo “c” oxireductase em espectrofotômetro a 550 nm por cinética enzimática, num tempo total de 180 segundos, com intervalos de 5 segundos.

Plotam-se, em papel milimetrado, os valores de absorbância encontrados e então se traça uma reta que considere o maior número de pontos lineares (geralmente os primeiros pontos) que é utilizada para o cálculo de atividade. A razão entre a diferença entre os pontos final e inicial da reta de tendência, num intervalo de 1 minuto ( $\Delta s$ ) e o tempo (1 minuto) é a velocidade enzimática.

#### **4.2.8 – Determinação da concentração de sacarose:**

A concentração de sacarose é medida em refratômetro, aparelho que estima a concentração total de sólidos dissolvidos (26 – 28 °C).

Após a devida limpeza do prisma, deve-se adicionar água destilada, utilizada como branco, a partir da qual ajusta-se a escala para 1g/L.

Seca-se o prisma com algodão ou papel macio (para que não provoque ranhuras) e colocam-se 15 -20  $\mu\text{L}$  de suspensão de membranas sobre o prisma. Realiza-se a leitura do índice de refração e estima-se a concentração.

#### 4.2.9 – Determinação do $\Delta\text{pH}$ (transporte de $\text{H}^+$ ) (Okorokov & Lichko, 1983):

Registra-se a formação do  $\Delta\text{pH}$  através das membranas das organelas da via secretória, a partir do transporte de  $\text{H}^+$  realizado pela  $\text{V H}^+$ -ATPase ou  $\text{P H}^+$ -ATPase.

A determinação se dá por método indireto, através do decaimento da fluorescência do ACMA.

Para tal, utiliza-se tampão de incubação contendo KCl 20 mM,  $\text{MgSO}_4$  2,5 mM, solução de MOPS-KOH (sacarose 12,5%, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) em volume necessário para completar 2,0 mL de volume final, 3  $\mu\text{L}$  de ACMA 1 mM (dissolvido em etanol) e suspensão de membranas com volume variando entre 20 e 90  $\mu\text{L}$ , dependendo da atividade apresentada, de modo que a amplitude máxima ( $F_{\text{máx}}$ ) não ultrapasse o valor de 50%.

Após cinco minutos de incubação (ou tempo necessário para estabilização da fluorescência) acrescenta-se 1 mM de ATP pH 7,2, observando-se a cinética enzimática em fluorímetro, nos comprimentos de ondas de excitação 415 nm e emissão em 485 nm com abertura de 5 nm/10 nm. Após um tempo aproximado de 600 segundos (ou suficiente para atingir o equilíbrio entre efluxo e influxo de prótons) adiciona-se 0,02 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a fim de parar a reação, desfazendo o gradiente protônico estabelecido.

Para análise de  $\text{V}$  e  $\text{P H}^+$ -ATPase seguiu-se o mesmo procedimento, adicionando-se inibidores (5,75  $\mu\text{M}$  de concanamicina A e 100  $\mu\text{M}$  de vanadato, respectivamente) ao tampão de incubação.

Montou-se a curva de  $\Delta\text{pH}$  utilizando os dados e gráficos obtidos a partir destas análises, a fim de determinar a velocidade inicial ( $V_0$ ) e a fluorescência máxima ( $\Delta F_{\text{máx}}$ ) em cada fração de membrana.

Utilizamos a fórmula  $V_0 = [F_0 / (F_{\text{máx}} * t)] * 100$  (Figura 9), onde:

$V_0$  : velocidade inicial de formação do  $\Delta\text{pH}$ ;

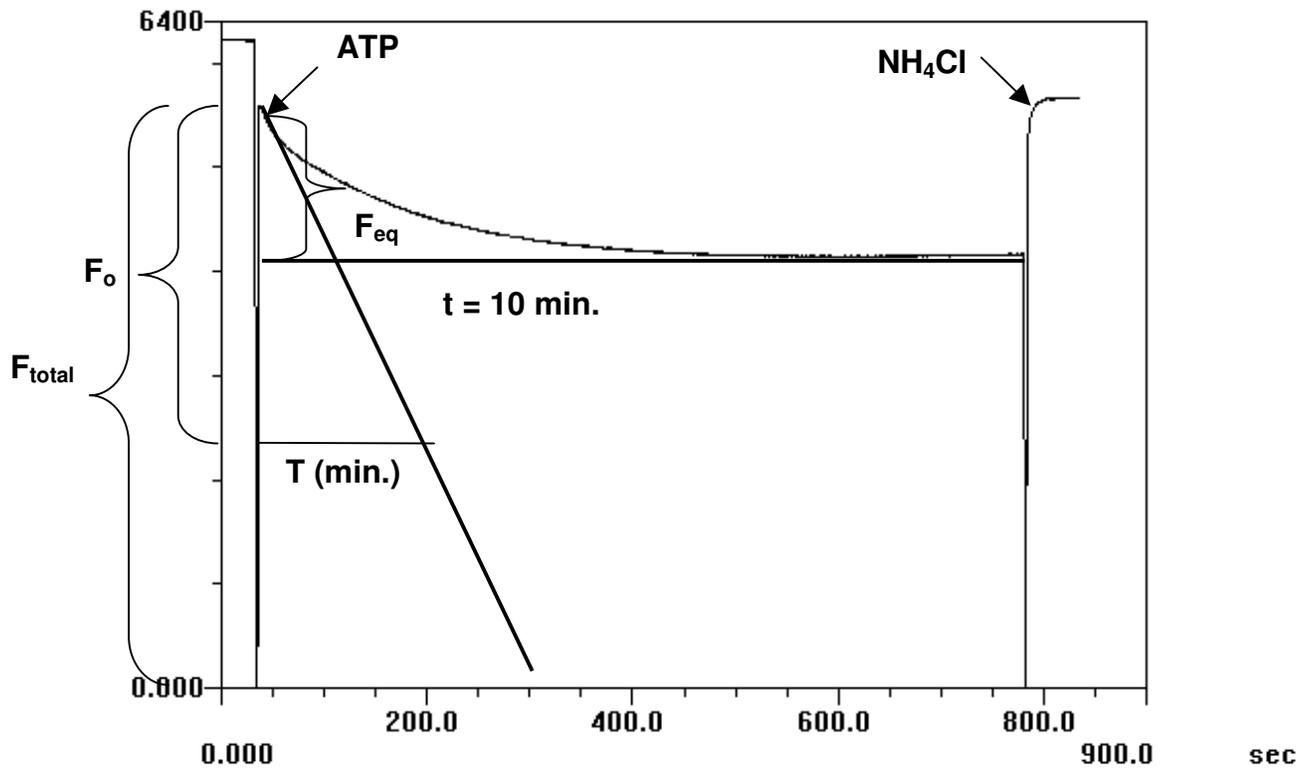
$F_0$  : fluorescência dependente de  $V_0$ , num tempo  $t$ , determinada pela extrapolação de uma reta tangente à maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

$F_{\text{máx}}$ : fluorescência máxima (total);

$t$  : tempo em minutos;

$\Delta F_{\text{máx}} = F_{\text{eq}} / F_{\text{máx}} * 100\%$ ;

$F_{eq}$  : fluorescência de equilíbrio, determinado como fluorescência do “platô” que reflete o equilíbrio entre o influxo e o efluxo de  $H^+$  nas vesículas.

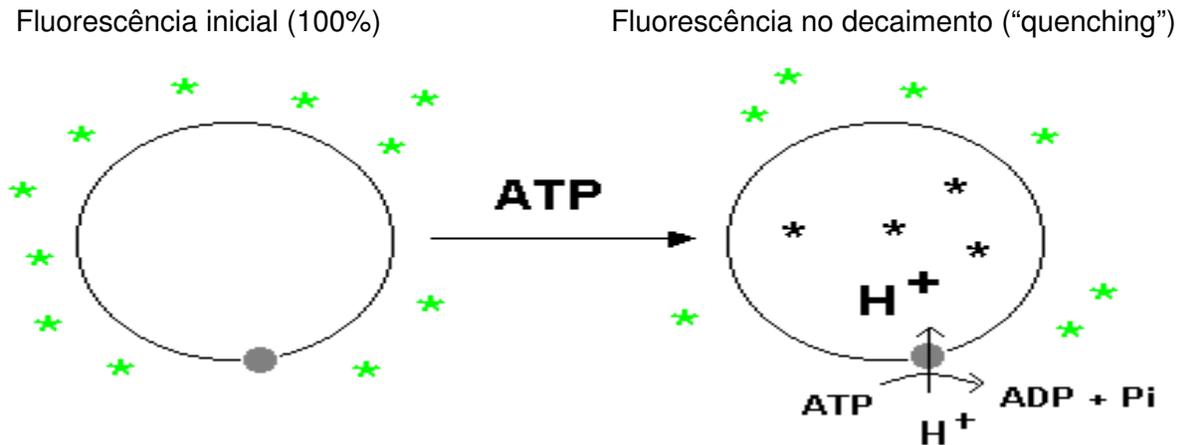


$$\text{Velocidade inicial} = V_0 = [F_0 / (F_{total} \cdot t)] \cdot 100$$

$$\text{Amplitude máxima} = \Delta F_{max} = F_{eq} / F_{total} \cdot 100$$

**Figura 9. Esquema da determinação de velocidade inicial ( $V_0$ ) e amplitude máxima ( $F_{m\acute{a}x}$ ) do transporte de prótons.** São usadas membranas de *S. cerevisiae*, cepa AA255, isoladas e analisadas de acordo com Métodos.

Na presença de ATP a fluorescência do ACMA diminui (Figura 10), demonstrando a formação do gradiente resultante do transporte de prótons para dentro das vesículas de membranas. Ao atingir o estágio máximo e de equilíbrio, adiciona-se  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , que desfaz o gradiente protônico.



**Figura 10. Representação esquemática do decaimento da fluorescência do ACMA.** Moléculas de ACMA entram nas vesículas de membrana após adição de ATP e consequente ativação da  $\text{H}^+$ -ATPase (representada por ●) e início do bombeamento de prótons.

#### 4.2.10 – Imunodeteção por dot blotting:

Marcam-se, em uma membrana de nitrocelulose, os quadrantes correspondentes a cada uma das frações de membranas a serem aplicadas. Corta-se, identifica-se (normalmente canto esquerdo do primeiro quadrante) e embebe-se a membrana em tampão bloqueador PBS (10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,6 contendo 0,9% NaCl) por alguns minutos até que esteja completamente umedecida.

Reserva-se sobre papel de filtro em local limpo e seco por algumas horas, até que esteja completamente seca.

Aplicam-se 5  $\mu\text{L}$  da fração, já homogeneizada, em cada um dos quadrantes marcados na membrana de modo que goteje perpendicularmente à membrana e se espalhe uniformemente, formando um círculo com bordas regulares. Espera-se tempo suficiente para que a amostra seque completamente.

Embebe-se a membrana em tampão PBS + leite comercial desnatado 5%, em temperatura ambiente por um período de 1 h, a fim de bloquear a região da membrana que não contém a proteína aplicada.

Coloca-se a membrana, em uma placa de Petri, imersa em tampão PBS, contendo anticorpo primário (monoclonal, anti-subunidade B da V-ATPase, Molecular Probes) diluído até 1:1000 v/v. Agita-se por 30 minutos e armazena-se *overnight* em geladeira.

Agita-se por 30 minutos e então se lava a membrana em tampão PBS + 5% de leite comercial desnatado por 1 hora, virando-se a membrana, a cada 15 minutos.

Agitar a membrana por 1 hora em tampão PBS + leite comercial desnatado 5%, contendo anticorpo secundário (*anti-mouse* conjugado com peroxidase, Amersham Pharmacia Biotech) diluído até 1:500 v/v.

Lava-se a membrana em tampão PBS + leite comercial desnatado 5% por 1 hora, trocando a solução a cada 10 minutos.

Lava-se a membrana em tampão PBS puro por 20 minutos, trocando a solução a cada 5 minutos.

Revela-se a marcação através da imersão da membrana numa solução de revelação (1 mM Tris-HCl, pH 7,4, contendo 0,1 M Imidazol, 4,7 mM DAB, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O) em local escuro por alguns minutos, até que os pontos apareçam, lava-se a membrana com água destilada em abundância e coloca-se para secar.

---

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. Curva de crescimento:

A utilização da densidade celular de 3 unidades óticas de células/mL foi padronizada para todos os experimentos já que correspondeu á metade da fase log da curva de crescimento (Figura 11).

### 5.2. Atividade de transporte de H<sup>+</sup> em membranas da via secretória:

Para avaliar a atividade enzimática nas diferentes frações de membranas isoladas fez-se uma análise prévia do transporte de H<sup>+</sup> nas membranas totais. O decaimento da fluorescência que segue a adição de Mg-ATP dá-se em resposta ao transporte de H<sup>+</sup> (formação de  $\Delta\text{pH}$ ) pelas H<sup>+</sup>-ATPases. O uso de inibidores específicos, tais como, vanadato e concanamicina A revela o tipo de ATPase responsável por este transporte.

Observou-se inibição completa com uso de 120  $\mu\text{M}$  de vanadato e 0,1 nM de concanamicina A, nas atividades de P e V ATPases, respectivamente. Atingiu-se 50% de inibição ( $I_{50}$ ) em torno de 18  $\mu\text{M}$  de concentração de vanadato (Figura 12) e 0,06 nM de concanamicina A (Figura 13), quando na presença de glicose. Confirmou-se que ambas as enzimas contribuem com a formação de  $\Delta\text{pH}$ .

Para determinar em que organelas da via secretória localiza-se a atividade de transporte de H<sup>+</sup> encontrada em membranas totais, analisa-se a formação de  $\Delta\text{pH}$  nas membranas fracionadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos pré-incubados tanto na presença, quanto na ausência de glicose (Figura 14), o que também reavalia a ativação da enzima pela glicose.

A glicose estimula a atividade H<sup>+</sup>-ATPásica e este estímulo dá-se em diferentes frações de membranas ao longo de toda a via secretória. Verificou-se, ainda, que este estímulo é cerca de quatro vezes maior na região correspondente às membranas enriquecidas por vesículas de RE. Também houve estímulo da atividade de transporte

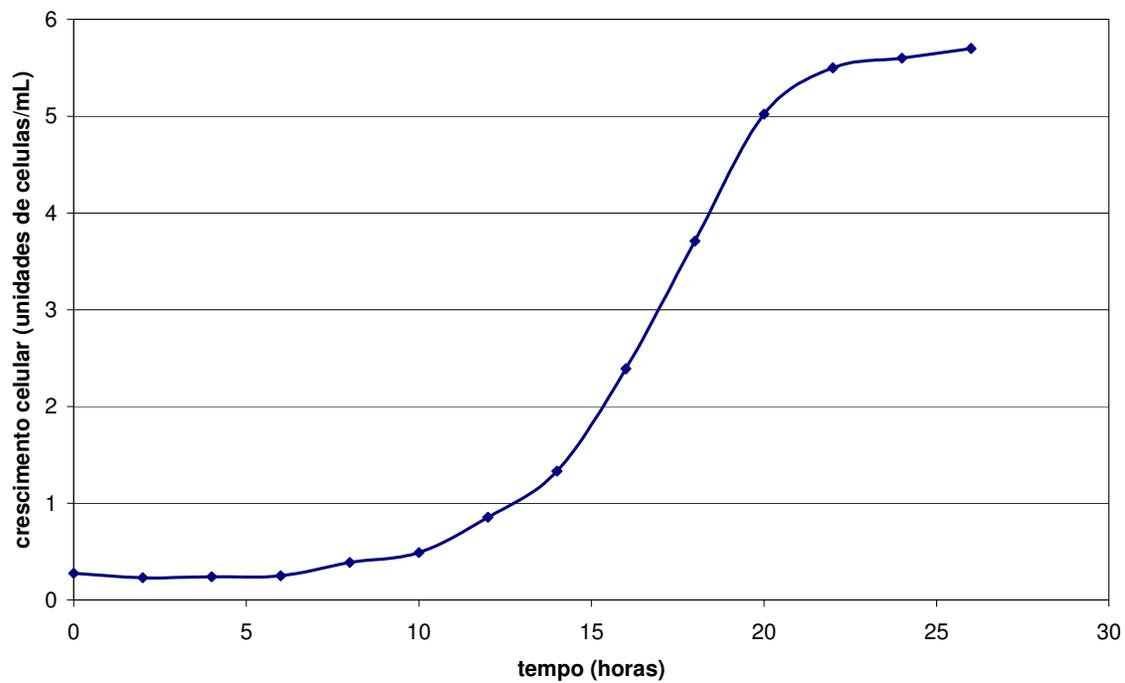
de  $H^+$  na região de vesículas enriquecidas por CG e vacúolos, porém em menor magnitude, ou seja, em torno de duas vezes.

A efetividade do fracionamento foi verificada através da análise da atividade de enzimas marcadoras do RE e CG, NADPH citocromo "c" oxireductase (Feldman *et al.*, 1987) e GDPase (Albeijon *et al.*, 1989), respectivamente. A Figura 15 mostra que 61% da atividade de GDPase encontra-se entre as frações 26 e 43, enquanto que entre as frações 9 e 25 encontram-se 52% da atividade de NADPH citocromo "c" oxireductase.

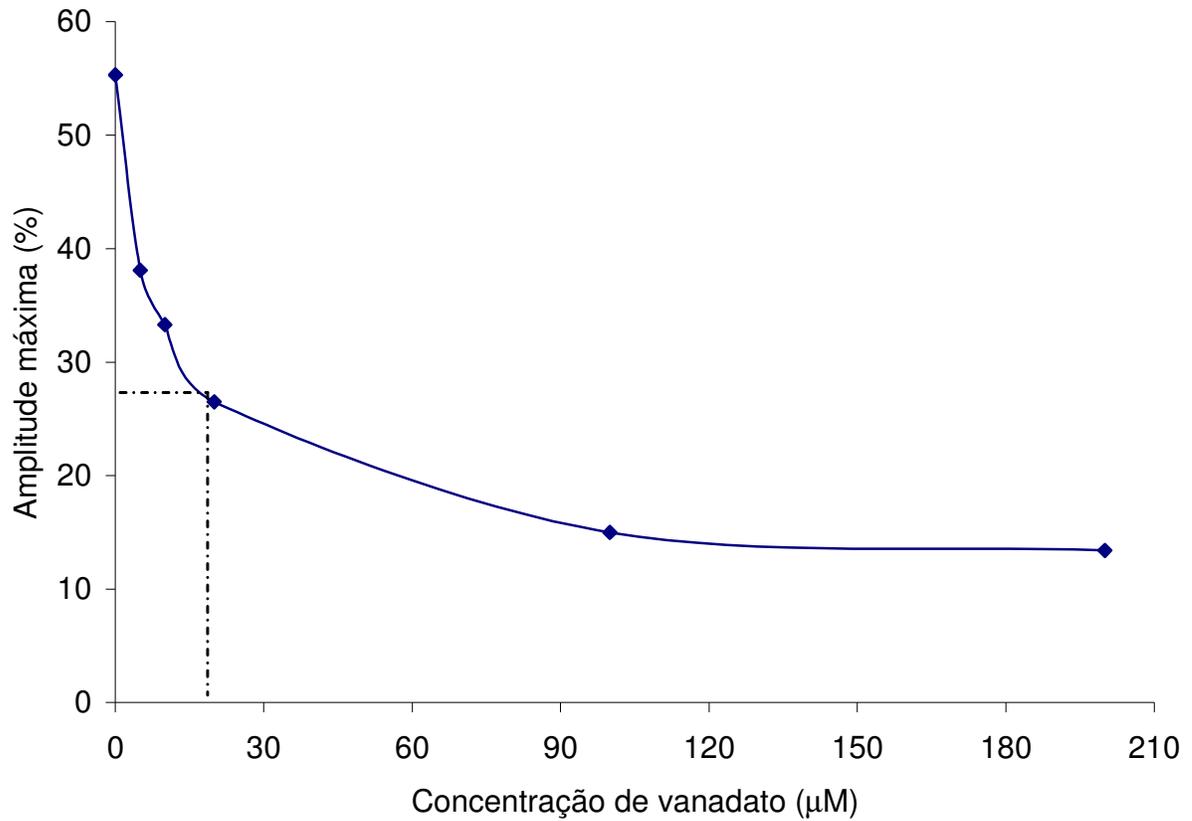
Vesículas de membranas enriquecidas por mitocôndria também estão presentes, migrando entre RE e CG (Silva, 1998), porém, não serão consideradas neste trabalho por serem sabidamente carentes de atividade de transporte de  $H^+$  por P e V-ATPase.

Estes resultados aliados à análise da distribuição da concentração de sacarose no gradiente estão de acordo com dados da literatura que indicam membranas vacuolares migrando em densidade de sacarose entre 22 e 25% (Opheim, 1978; Okorokov & Lehle, 1998), membranas do CG entre 26 e 38% (Albeijon *et al.*, 1989; Okorokov *et al.*, 2001) e do RE entre 39 e 50% (Feldman *et al.*, 1987). Estabeleceu-se, então, a presença de quatro diferentes populações de membranas: 1) vesículas de membranas enriquecidas pelo vacúolo; 2) pelo CG; 3) pelo RE, com as quais parecem co-migrar as vesículas de membrana de MP; e 4) por vesículas de membrana mais densas do que as do RE, provavelmente, envelope nuclear.

Vale frisar que todas as análises aqui descritas foram feitas após a determinação da atividade de transporte de  $H^+$ , já que esta reduz após o primeiro descongelamento das vesículas de membrana isoladas.

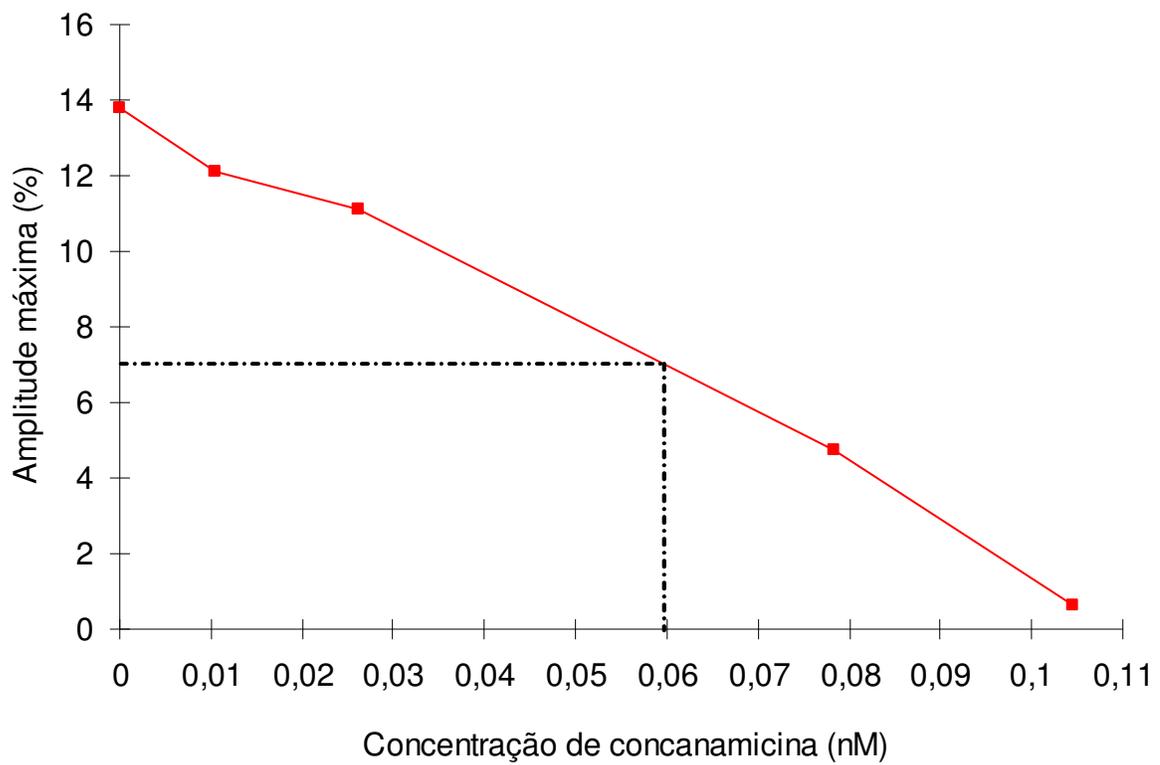


**Figura 11. Curva de crescimento de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, em meio YEPD.**  
Crescimento celular medido em espectrofotômetro ( $A_{600\text{nm}}$ ).



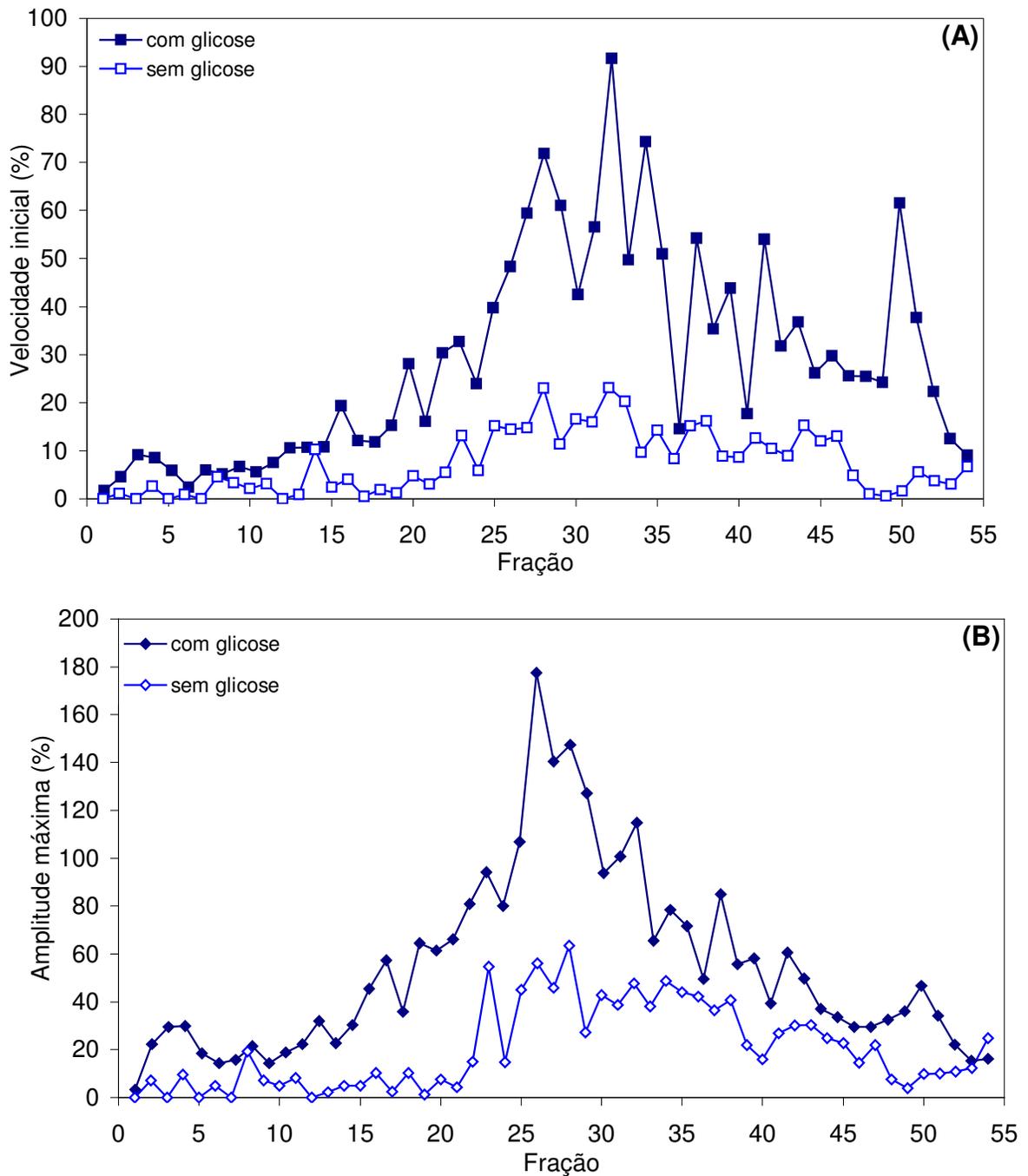
**Figura 12 – Efeito do ortovanadato de sódio em membranas totais obtidas a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados com 100 mM de glicose.**

Inibição específica de P H<sup>+</sup>-ATPase, I<sub>50</sub> = 18 $\mu\text{m}$

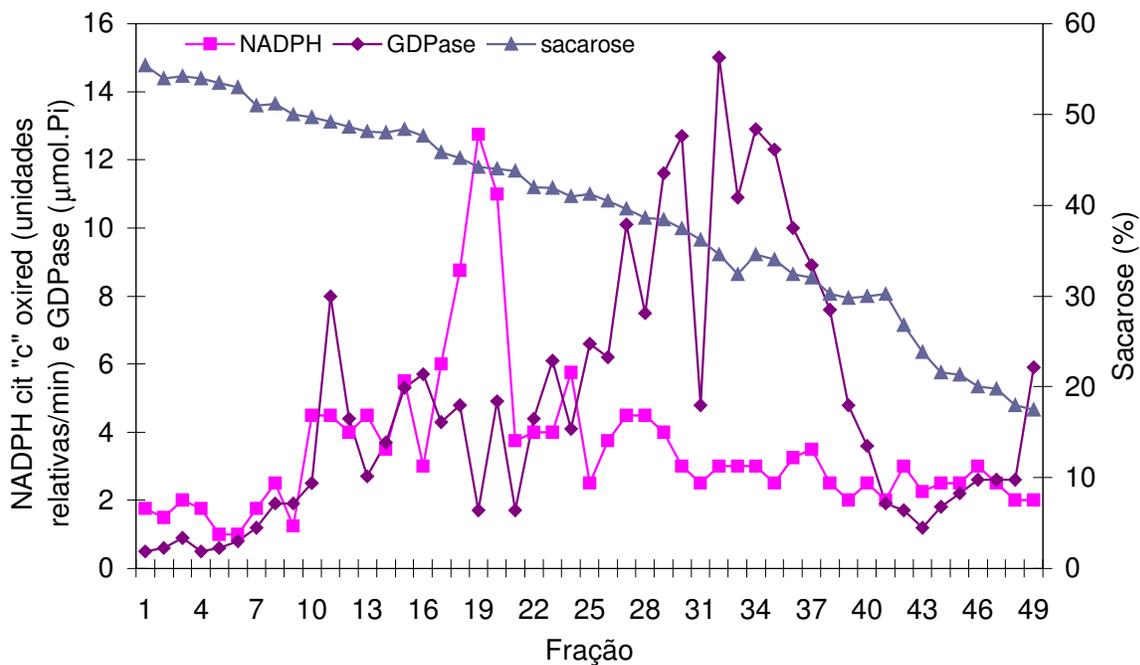


**Figura 13 – Efeito do concanamicina A em membranas totais obtidas a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados com 100 mM de glicose.**

Inibição específica de V H<sup>+</sup>-ATPases, I<sub>50</sub> = 0,06 nM.



**Figura 14 – Velocidade inicial (A) e amplitude máxima (B) do transporte de H<sup>+</sup>.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados ou não com 100 mM de glicose. Dados normalizados para mg de proteína de membranas totais. Análise feita em espectrofluorímetro na ausência de inibidores a partir da extinção de fluorescência do ACMA e atividade calculada como descrito em Métodos.



**Figura 15 - Concentração de sacarose, atividade de NADPH citocromo “c” oxireductase e de GDPase.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, submetidas à análise de concentração de sacarose, atividade de NADPH citocromo “c” oxireductase (enzima marcadora de retículo endoplasmático - RE) e GDPase (enzima marcadora do complexo de Golgi - CG). Valores obtidos para GDPase multiplicados por 100.

### **5.3. Atividade de transporte de H<sup>+</sup> por P-ATPase em membranas da via secretória:**

Após verificação da atividade de transporte de H<sup>+</sup> nas várias populações de membranas fez-se necessário avaliar que tipo de H<sup>+</sup>-ATPase contribui para a formação deste  $\Delta$ pH. Seguindo os padrões de concentração inibitória (I<sub>50</sub>) estabelecidos na Figura 12 foi verificada a atividade de P H<sup>+</sup>-ATPase.

Há transporte de H<sup>+</sup> pela P-ATPase ao longo de todo o gradiente, como mostrado na Figura 16. Observa-se que a ativação pode acontecer tanto para velocidade inicial (Figura 16A) quanto para amplitude máxima (Figura 16B) em todas as populações de membranas, porém com mais intensidade nas vesículas enriquecidas por membranas de RE+MP e CG isoladas a partir de esferoplastos pré-incubados na presença de glicose extracelular.

Sabe-se que as vesículas de membranas enriquecidas por MP comigram com aquelas de RE. Assim, para esclarecer se a atividade de transporte de H<sup>+</sup> e estimulação pela glicose encontram-se realmente em RE, e não apenas em MP, foi necessário eliminar a contribuição deste tipo vesículas na região correspondente às vesículas enriquecidas por membranas de RE.

Para tal, realizaram-se análises em membranas totais obtidas a partir de esferoplastos pré-incubados na presença de DCCD, um reagente carboxilado hidrofóbico capaz de inibir H<sup>+</sup>-ATPases de MP (Sussman *et al.*, 1983). Apresenta-se na Figura 17A a média dos dois ensaios de acidificação feitos na presença de diferentes concentrações do inibidor, a fim de avaliar a concentração mais adequada a ser utilizada. Um curto tempo de incubação e 600  $\mu$ m do modificador foram utilizados a fim de que a reação acontecesse preferencialmente com a enzima de MP. Análises feitas com membranas totais obtidas a partir de esferoplastos pré-incubados na presença de DCCD mostram inibição em torno de 60% para P e de 40% para V H<sup>+</sup>-ATPase (Figura 17B). A remoção da V H<sup>+</sup>-ATPase pode ser explicada pelo tempo de incubação ou concentração de modificador serem inadequados, fugindo da intenção inicial do teste e possibilitando a passagem do DCCD pela MP e alteração das membranas intracelulares, ricas neste tipo de enzima.

A utilização de concanavalina A (conA), uma molécula ligante de manoproteínas, foi o único dos métodos testados que se mostrou eficiente. Como representado na Figura 8 de Métodos, quando a MP está modificada com conA torna-se mais densa, não sendo capaz de resselar e formar vesículas após seu rompimento, tornando-se passível de remoção por leve centrifugação.

A Figura 18 apresenta o perfil da atividade de transporte de  $H^+$  pela P-ATPase obtido na concentração avaliada como adequada para remoção de MP após modificação com conA, sem alterar as demais vesículas de membranas. Há redução de atividade na região agora compreendida apenas por vesículas enriquecidas por RE (antes RE+MP). Nas vesículas enriquecidas por CG também há redução de atividade, sugerindo que esta população de membrana pode estar contaminada por vesículas de MP. Além disso, observa-se também que a atividade de P  $H^+$ -ATPase permanece em todo gradiente, mesmo após o tratamento com conA. Isto confirma nossa hipótese de transporte de  $H^+$  por uma P-ATPase ativa ao longo da via secretória, desde sua biossíntese no RE até sua ancoragem na MP.

A modificação por conA foi capaz de remover 60% da atividade de P  $H^+$ -ATPase. Considerando que 50% de vesículas de membranas de MP encontram-se na posição contrária a original, ou seja, invertidas, após o rompimento (Ibarz *et al.*,1994), temos então  $H^+$ -ATPases indisponíveis para ligação com ATP. Reavaliando a atividade real da enzima retirada após a remoção da MP pelo tratamento com conA, chega-se a um valor de 75%, enquanto, para toda via secretória, principalmente para ER e CG, 25%. Esta avaliação indica a relação entre as moléculas de P  $H^+$ -ATPase da via secretória e da MP é de 1:3, sendo assim, na região do gradiente onde comigram as vesículas de membranas de RE e MP, verificou-se maior redução da atividade.

É importante ressaltar que a atividade de transporte de  $H^+$  mantém um valor relativamente estável em vesículas de RE e CG após tratamento com conA, ou seja, o fluxo protéico mantém-se ao longo das organelas da via secretória, como apresentado na Figura 19. Pode ocorrer acúmulo de atividade enzimática nesta região devido à velocidade de transporte entre RE e CG ser maior que a velocidade de saída de vesículas secretórias em direção a MP e/ou vias secundárias, ou seja, demais organelas.

A avaliação da atividade de transporte de  $H^+$  em vesículas isoladas a partir de esferoplastos pré-incubados ou não com concanavalina A foi feita também para V-ATPase. A Figura 20 apresenta o perfil obtido nesta análise e percebe-se que a enzima tem atividade ao longo de todo o gradiente, mesmo quando as vesículas enriquecidas por MP são removidas, ou seja, a enzima está funcionando ativamente em toda via secretória. Além disso, confere consistência aos dados obtidos nas análises com conA por evidenciar que não existem efeitos laterais, ou seja, a conA não reagiu com as membranas intracelulares.

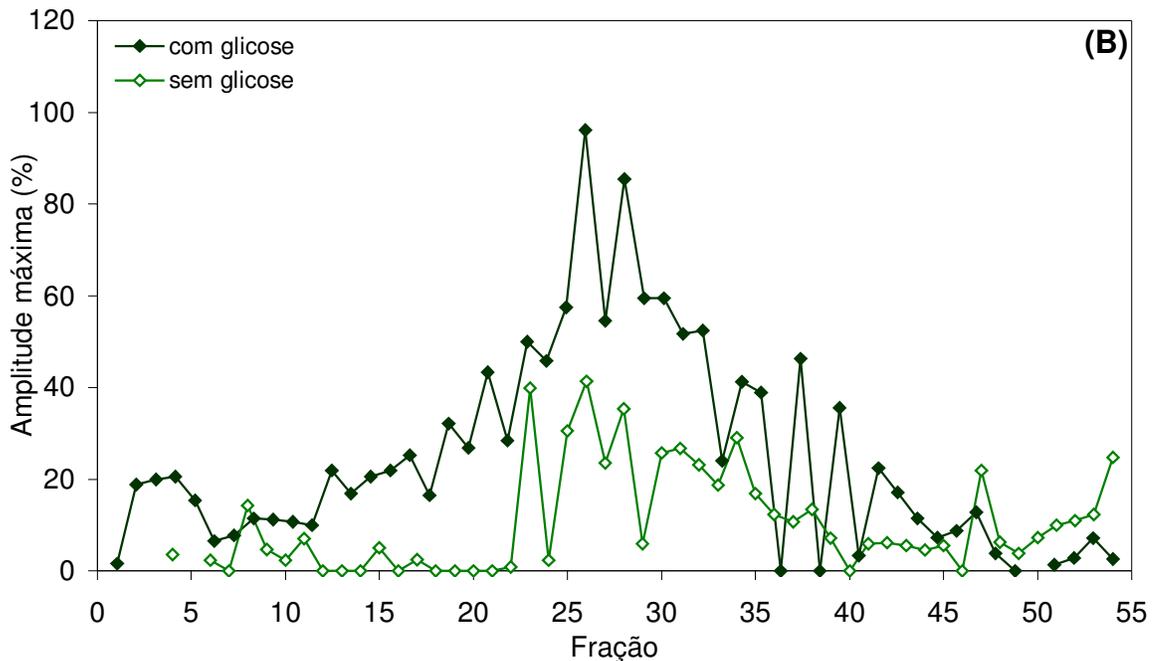
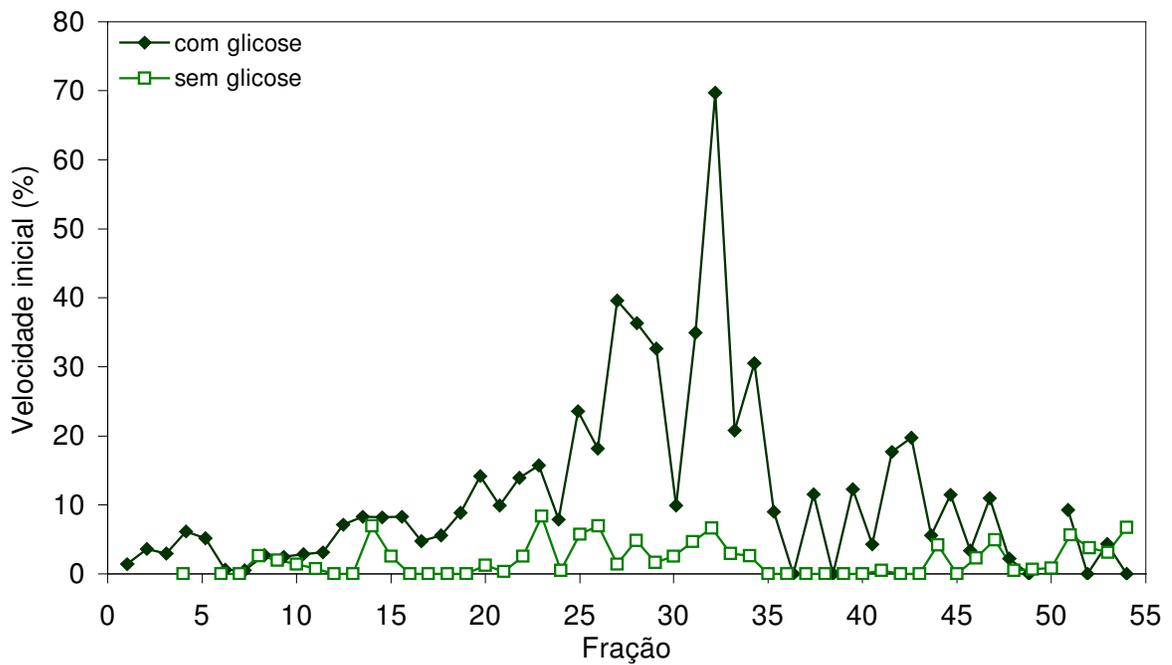
O resultado da remoção de MP através da modificação por conA foi avaliado também por "Dot Blotting" que detecta o conteúdo de proteína de P  $H^+$ -ATPase em frações selecionadas de cada gradiente (com e sem conA) utilizando-se anticorpos policlonais gerados contra a P  $H^+$ -ATPase (Figura 21A). Verificou-se uma redução do conteúdo de proteína que acompanha a redução de atividade de transporte de  $H^+$  pela P-ATPase (Figura 19B) em frações de vesículas de membranas enriquecidas por membranas de RE, que comigravam com MP, além de EN.

Os dois experimentos, análise por "Dot Blotting" e de transporte de  $H^+$ , independentemente, mostram que, além da P  $H^+$ -ATPase encontrar-se distribuída ao longo da via secretória de *S. cerevisiae*, apresenta-se na sua forma ativa.

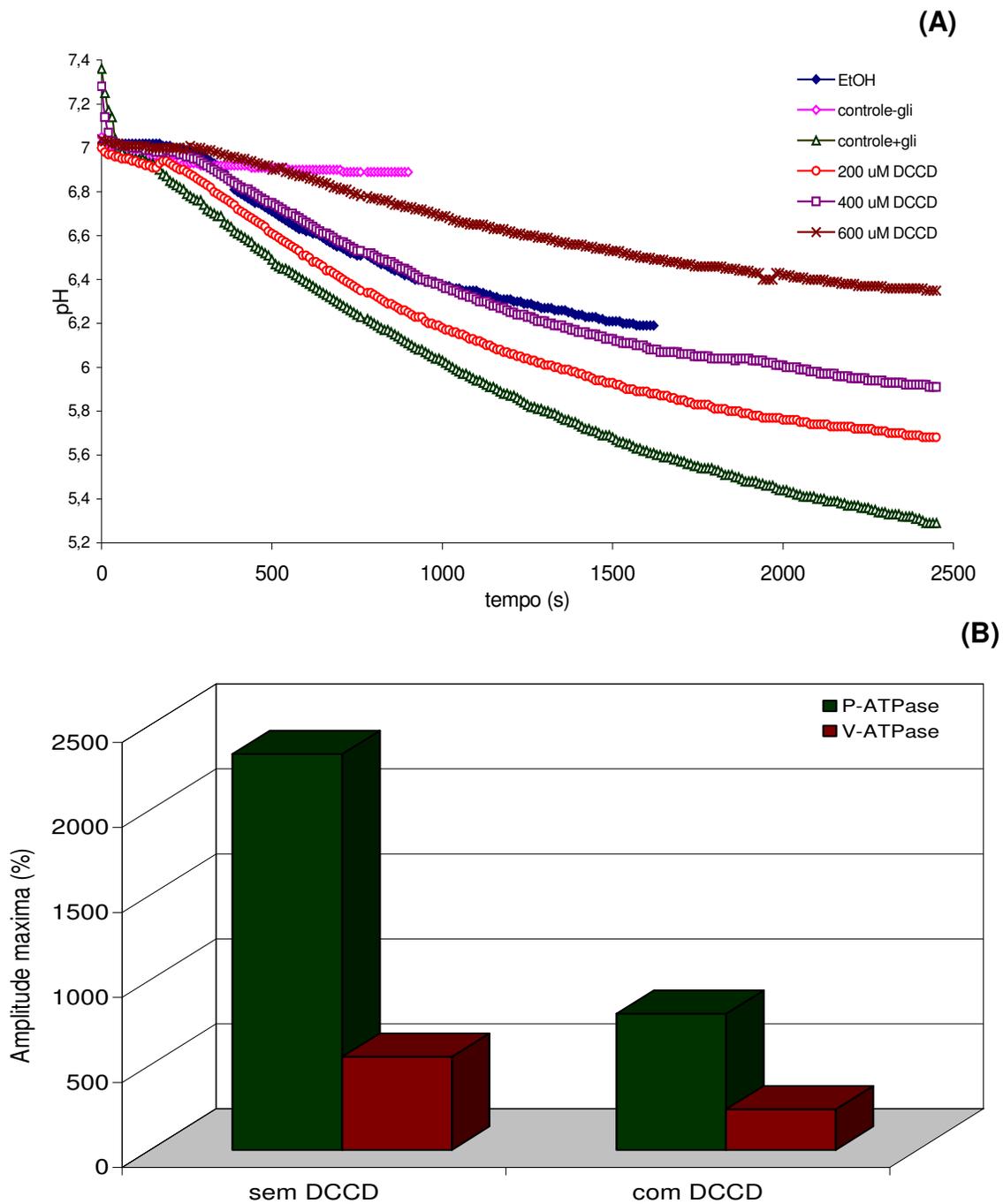
Sabendo que a MP de levedura não apresenta atividade de V  $H^+$ -ATPase, realizou-se um outro experimento no qual as vesículas de membranas isoladas a partir de esferoplastos pré-incubados com glicose e com uma concentração maior de conA para de verificar se seria possível reduzir ainda mais a atividade transporte de  $H^+$  por P-ATPase sem alterar a atividade de transporte de  $H^+$  pela V  $H^+$ -ATPase. Na Figura 22 pode-se observar que o aumento de concentração de conA provoca um efeito secundário, ou seja, a conA passa a modificar também as membranas intracelulares, além da MP, durante de rompimento de esferoplastos. Na região de vesículas enriquecidas por membranas de vacúolos a redução da atividade é menor. Isto mostra que há atividade de transporte de  $H^+$  pela V-ATPase, ainda que reduzida, ao longo da via secretória, mesmo quando vesículas de membranas intracelulares também são removidas.

A existência de atividade de transporte de  $H^+$  por P-ATPase mesmo quando usa-se uma maior concentração de conA (Figura 23) e, portanto, atingem-se as membranas

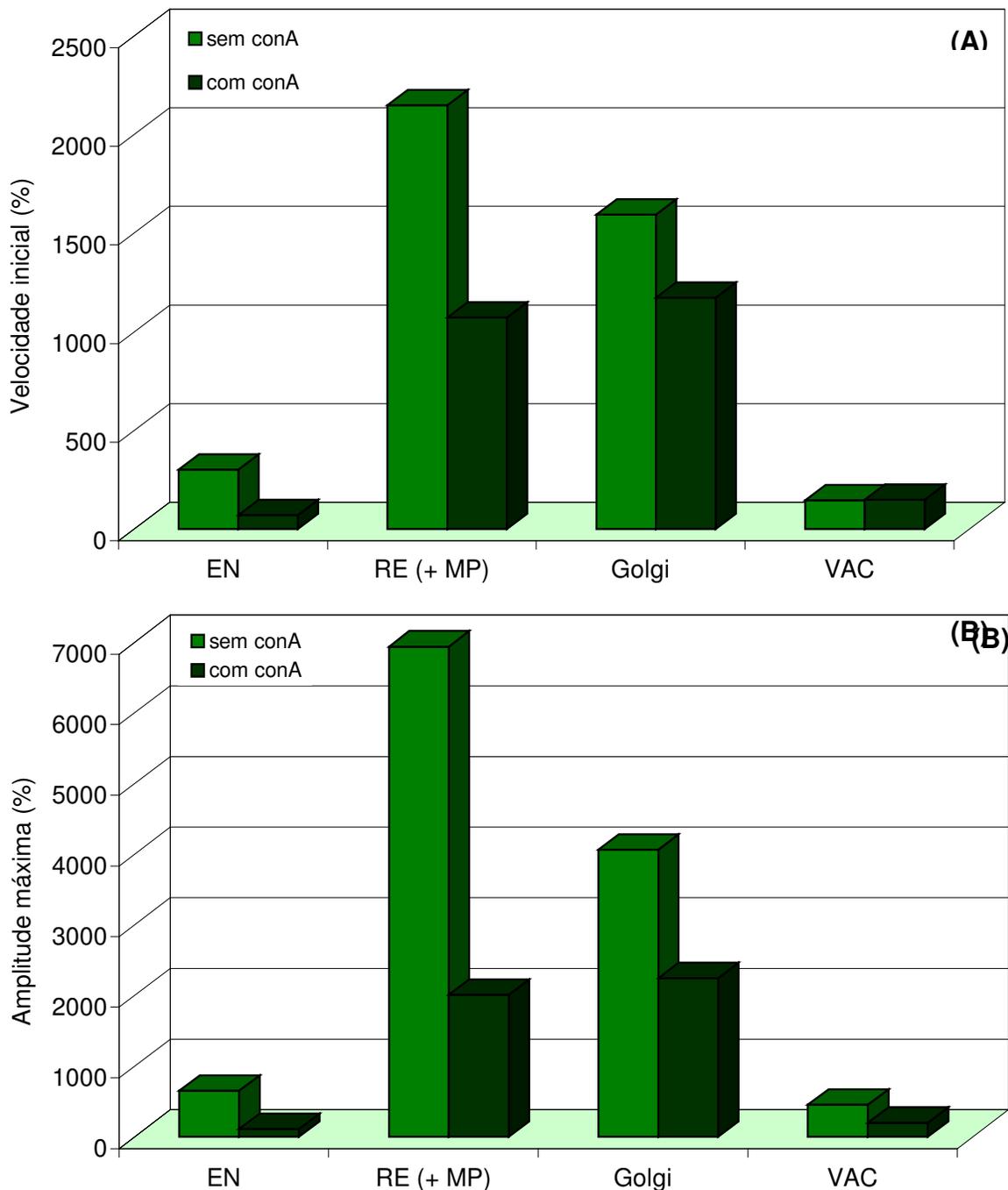
intracelulares, ou seja, reduz-se a atividade de transporte de V-ATPase nestas membranas, reforça a idéia de que as P H<sup>+</sup>-ATPases encontram-se realmente ativas nas membranas intracelulares.



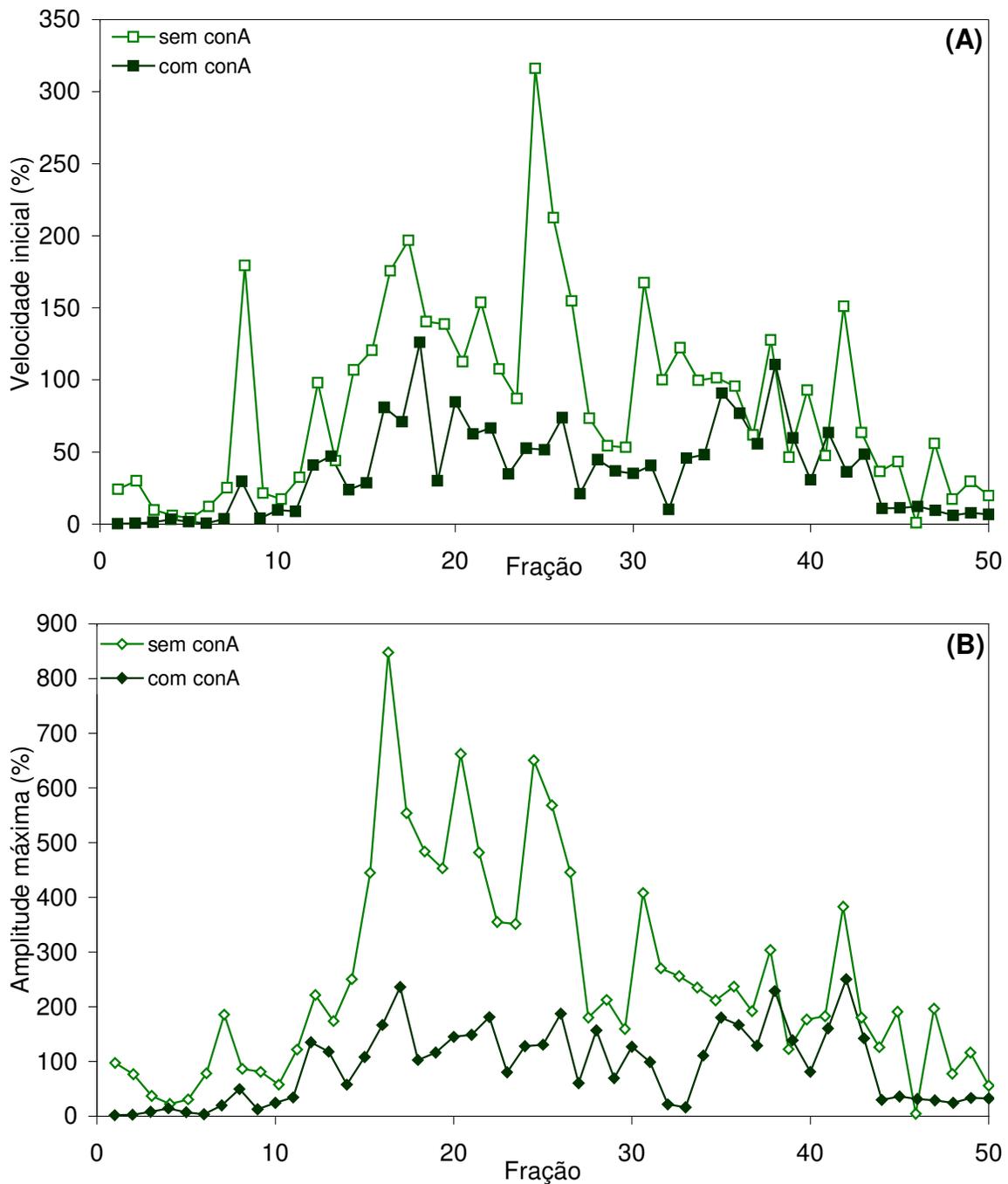
**Figura 16 – Velocidade inicial (A) e amplitude máxima (B) do transporte de  $H^+$  pela P ATPase.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados ou não com 100 mM de glicose. Dados normalizados para mg de proteína de membranas totais. Análise feita em espectrofluorímetro na presença de 100  $\mu$ M de vanadato a partir da extinção de fluorescência do ACMA e atividade calculada como descrito em Métodos.



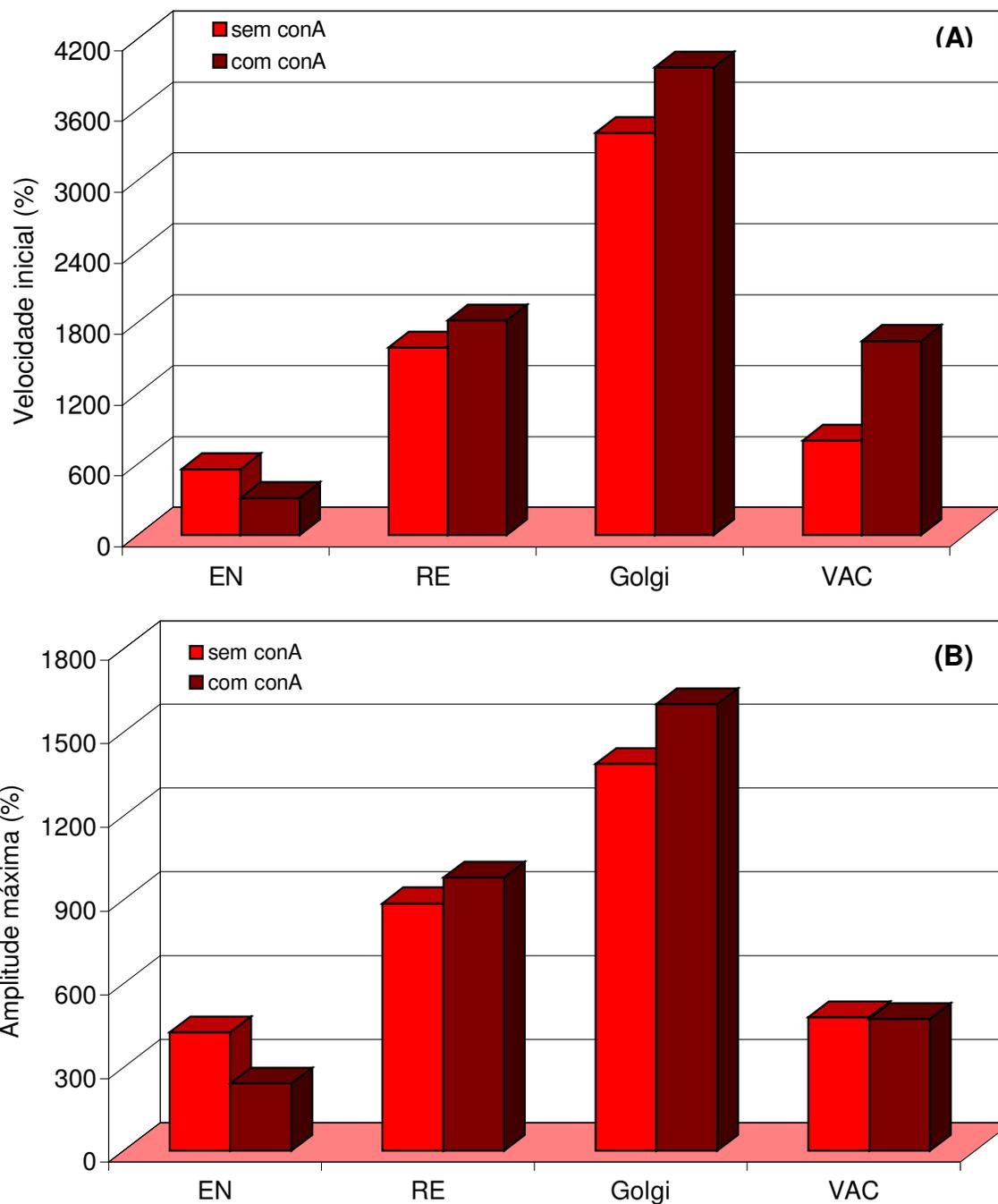
**Figura 17. Análises feitas na presença de DCCD. (A)** Ensaio de acidificação feito em esferoplastos isolados a partir de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados com glicose e DCCD. O solvente utilizado no preparo da solução de DCCD foi o etanol (EtOH). Análises feitas na presença e ausência de 100 mM de glicose (+ gli e - gli), com diferentes concentrações de DCCD (200, 400 e 600  $\mu$ M), e atividade calculada como descrito em Métodos. **(B)** Análise de transporte de  $H^+$  ATPase dependente feito em membranas totais isoladas a partir dos esferoplastos supracitados.



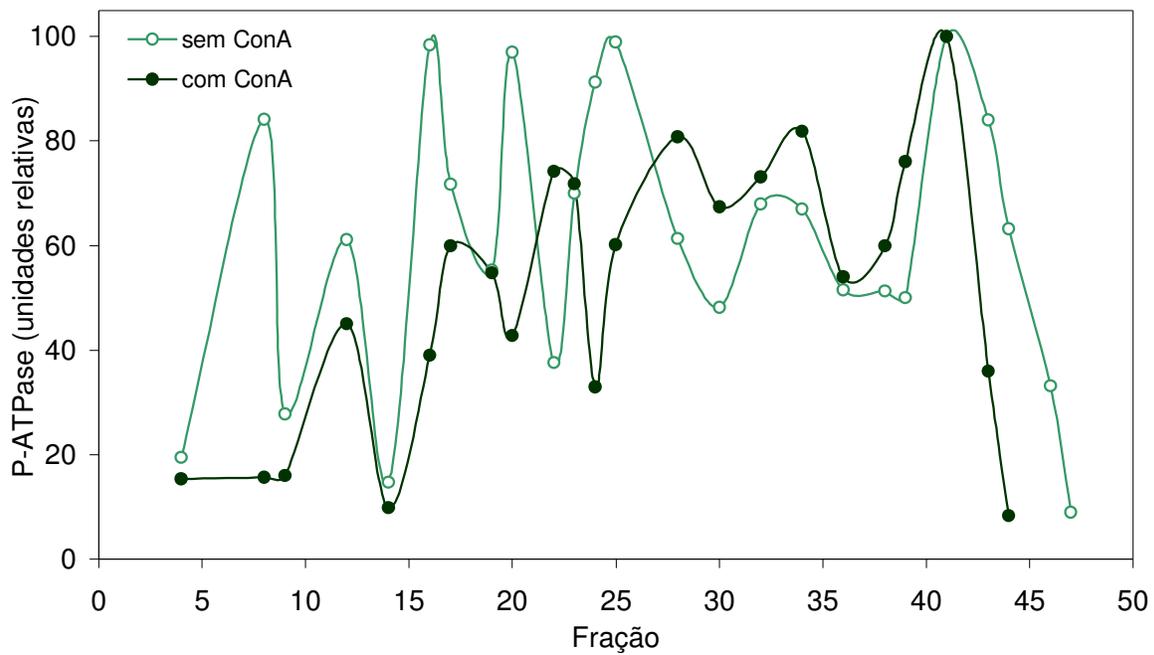
**Figura 18 – Velocidade inicial (A) e amplitude máxima (B) do transporte de  $H^+$  pela P ATPase.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados com 100 mM de glicose e pré-incubados ou não com concanavalina A (conA). Dados normalizados para volume de esferoplastos. Análise feita em espectrofluorímetro na presença de 100  $\mu$ M de vanadato a partir da extinção de fluorescência do ACMA e atividade calculada como descrito em Métodos.



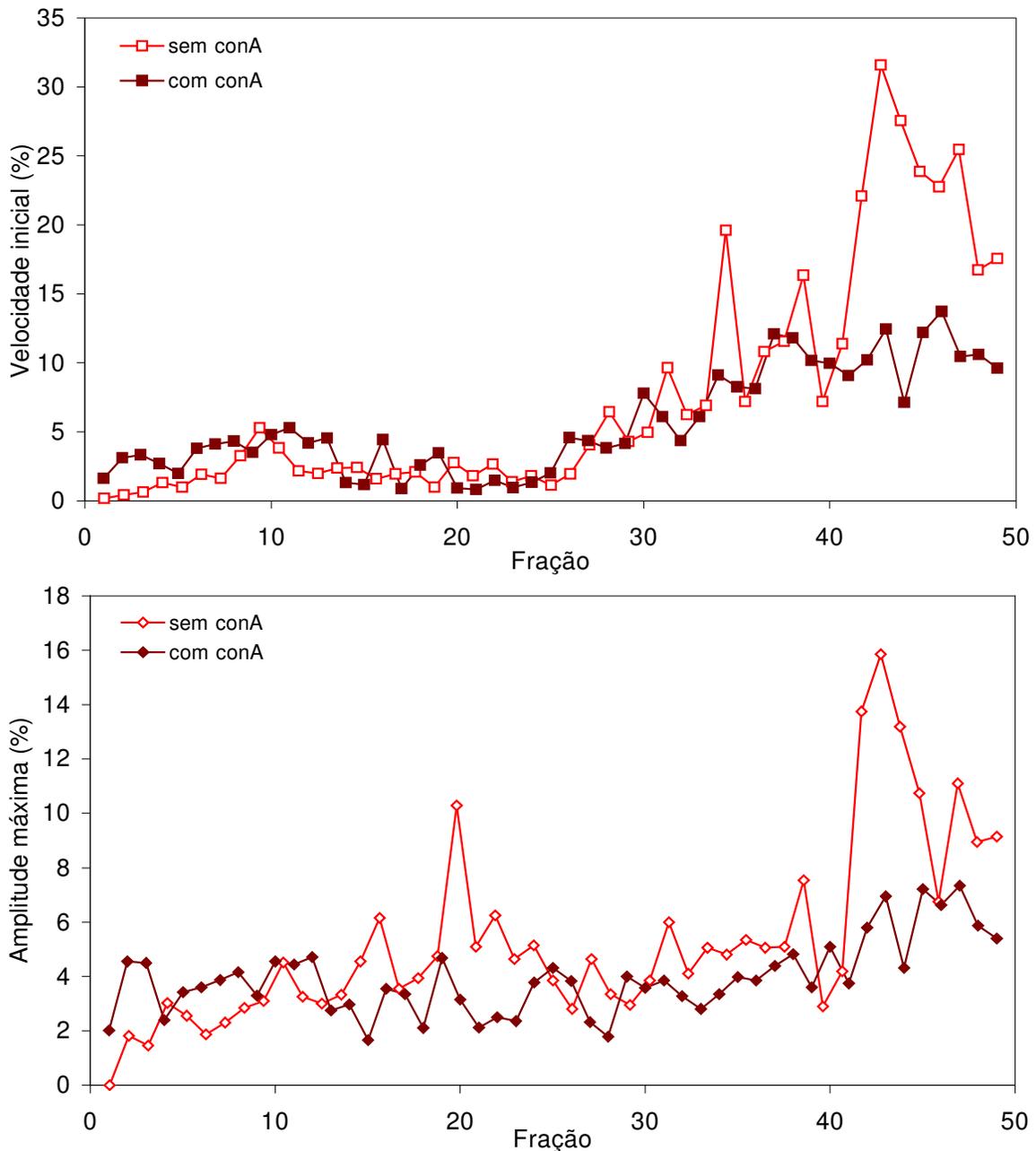
**Figura 19 – Velocidade inicial (A) e amplitude máxima (B) do transporte de H<sup>+</sup> pela P ATPase.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados com 100 mM de glicose e pré-incubados ou não com concanavalina A (conA). Dados normalizados para mg de proteína de membranas totais. Análise feita em espectrofluorímetro na presença de 100 μM de vanadato a partir da extinção de fluorescência do ACMA e atividade calculada como descrito em Métodos.



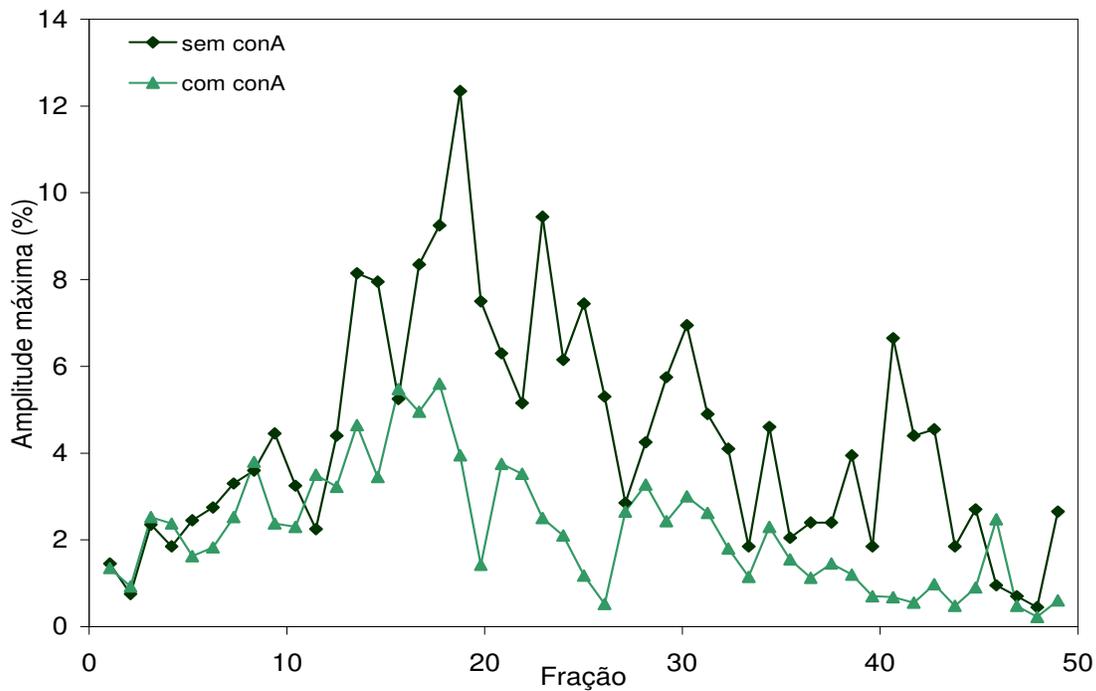
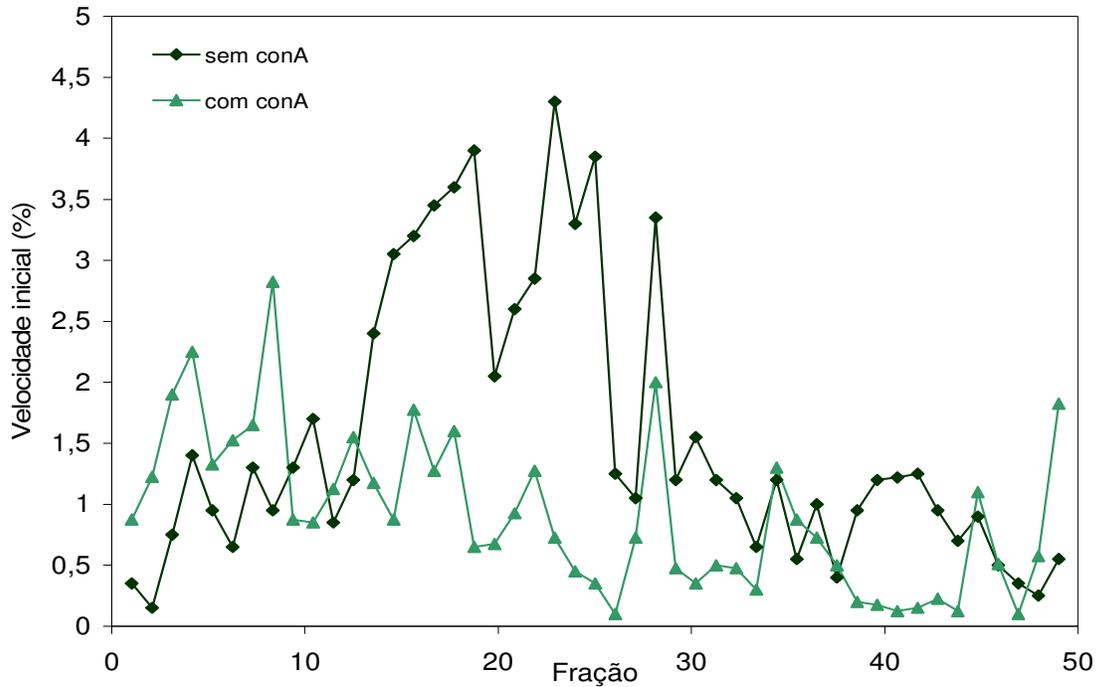
**Figura 20 – Velocidade inicial (A) e amplitude máxima (B) do transporte de H<sup>+</sup> pela V ATPase.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados com 100 mM de glicose e pré-incubados ou não com concanavalina A (con A). Dados normalizados para volume de esferoplastos. Análise feita em espectrofluorímetro na presença de 5,75 nM de concanamicina A a partir da extinção de fluorescência do ACMA e atividade calculada como descrito em Métodos.



**Figura 21 - Imunomarcção de P H<sup>+</sup>-ATPase.** Dot Blotting feito com uso de anticorpo policlonal contra a P H<sup>+</sup>-ATPase em vesículas de membranas isoladas a partir de esferoplastos pré-incubados ou não com concanavalina A. Imunomarcção detectada segundo o método descrito em Retamal *et al.*, 1999.



**Figura 22 – Velocidade inicial (A) e amplitude máxima (B) do transporte de H<sup>+</sup> pela V ATPase.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados com 100 mM de glicose e pré-incubados ou não com concanavina A (con A). Dados normalizados para volume de esferoplastos. Análise feita em espectrofluorímetro na presença de 5,75 nM de concanamicina A a partir da extinção de fluorescência do ACMA e atividade calculada como descrito em Métodos.



**Figura 23 – Velocidade inicial (A) e amplitude máxima (B) do transporte de H<sup>+</sup> pela P-ATPase.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados com 100 mM de glicose e pré-incubados ou não com concanavalina A (con A). Dados normalizados para volume de esferoplastos. Análise feita em espectrofluorímetro na presença de 100  $\mu$ M de vanadato a partir da extinção de fluorescência do ACMA e atividade calculada como descrito em Métodos.

#### **5.4. - Atividade de transporte de H<sup>+</sup> por V-ATPase em membranas da via secretória:**

O perfil encontrado para transporte de H<sup>+</sup> pela V-ATPase em vesículas inibidas ou não por concanavalina A (conA), tanto para velocidade inicial (A) quanto para amplitude máxima (B) é apresentado na Figura 24.

Observa-se na Figura 24A aumento da atividade de transporte de H<sup>+</sup> pela V-ATPase desde as frações mais densas do RE (a partir da fração 26) até aquelas enriquecidas com vesículas de membranas vacuolares. Já na Figura 24B, tem-se a amplitude máxima da atividade de transporte por V H<sup>+</sup>-ATPase na região do limiar entre RE e CG e, principalmente, nas frações finais do gradiente.

A atividade de transporte de H<sup>+</sup> pela V-ATPase além de estar presente ao longo da via secretória, é estimulada pela glicose extracelular, como apresentado na Figura 14. As frações de membrana que migram entre vesículas enriquecidas por membranas de CG e vacúolo, no caso de velocidade inicial, e entre RE e CG, para amplitude máxima, evidenciam este fato.

Avaliou-se a atividade de transporte de H<sup>+</sup> pela V-ATPase de duas maneiras distintas. Através da atividade inibida por concanamomicina A (inibição específica) ou resistente ao vanadato (inibidor específico de P H<sup>+</sup>-ATPase). Os dados da Figura 25 mostram que ambas maneiras de determinação podem ser utilizadas para avaliar a atividade de transporte de H<sup>+</sup> pela V-ATPase. Verificou-se que a velocidade inicial (Figura 26A) foi estimulada pela glicose em torno de 3,5 vezes tanto em vesículas enriquecidas por EN quanto RE+MP. Nas vesículas de membranas enriquecidas por vacúolo o estímulo ficou em torno de 2,5 a 3 vezes, e apenas em torno de 1,5 vezes naquelas enriquecidas por CG. Para amplitude máxima (Figura 26B) observou-se estimulação de 4,3; 4,1; 1,5 e 2,3, respectivamente, para vesículas enriquecidas por membranas de EN, RE+MP, CG e vacúolo. Dessa forma, a atividade de V H<sup>+</sup>-ATPase passou a ser analisada como aquela sensível a concanamomicina A ou como resistente ao vanadato.

Para esclarecer se as demais membranas da via secretória são equipadas ou não com a mesma enzima do vacúolo fizeram-se ensaios de Western Blotting (Samarão,2003) e Dot Blotting utilizando-se anticorpo monoclonal contra a subunidade A e B de V H<sup>+</sup>-ATPase de *S. cerevisiae*.

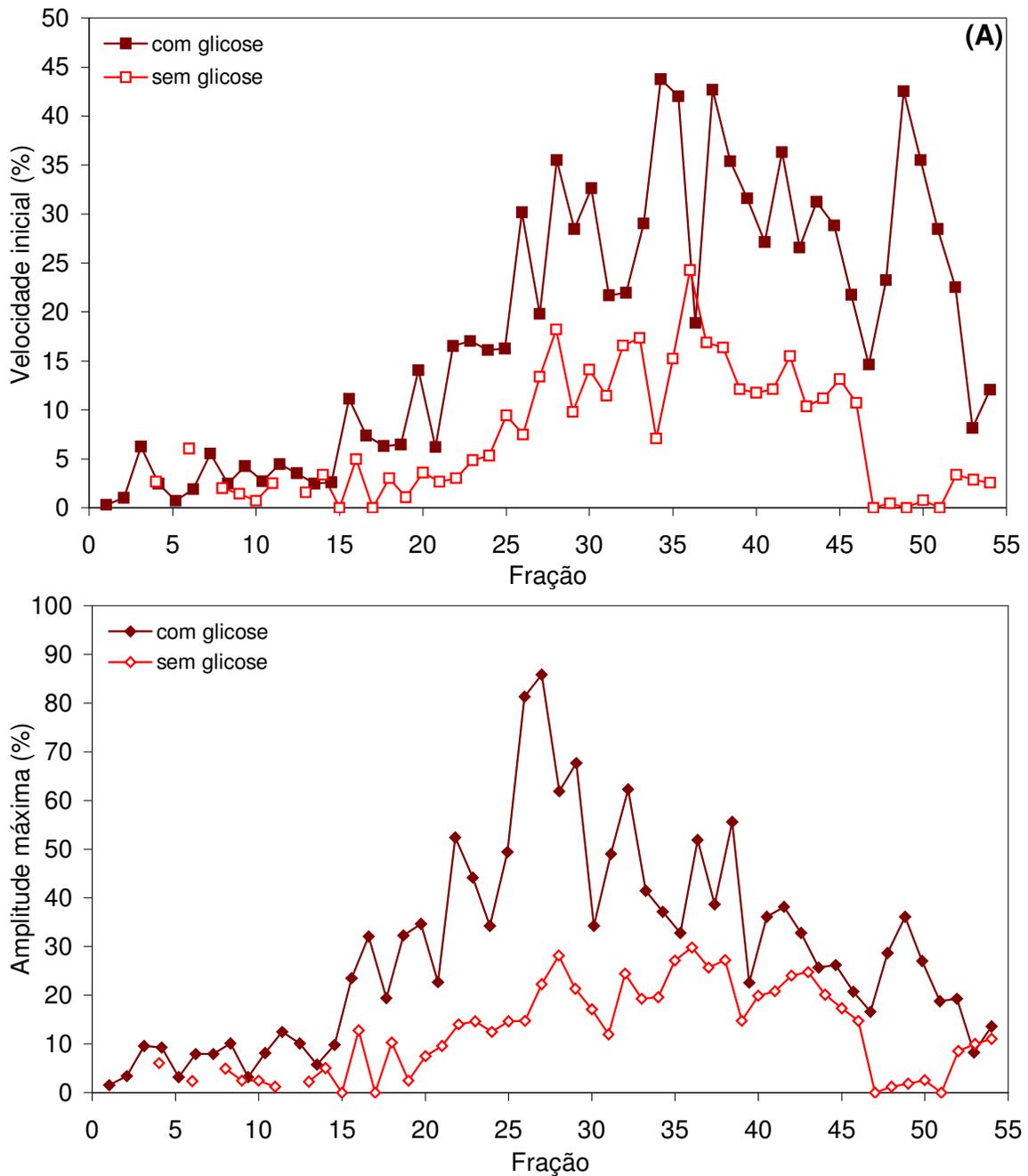
Os resultados da análise de transporte de  $H^+$  em vesículas de membranas isoladas a partir de esferoplastos que não foram pré-incubados com 100 mM de glicose apresentam atividade concentrada nas vesículas de membrana enriquecidas por RE e CG, apresentando-se muito baixa na região correspondente as vesículas de membranas enriquecidas por vacúolo. Porém, a imunoresposta está presente para ambas subunidades desde as vesículas de membranas mais leves até as mais pesadas indicando que o complexo  $V_1$  está presente inclusive nas membranas vacuolares. A enzima não apresentou atividade de transporte por razões ainda desconhecidas.

Além disso, a relação do conteúdo de subunidade A e B é muito próxima de 1:1, em todas as três populações de membranas (RE, CG e VAC), mas a atividade de transporte de  $H^+$  apresenta variações bem mais altas, sugerindo que as enzimas destas regiões podem ser, de alguma maneira, diferentes e/ou reguladas diferentemente.

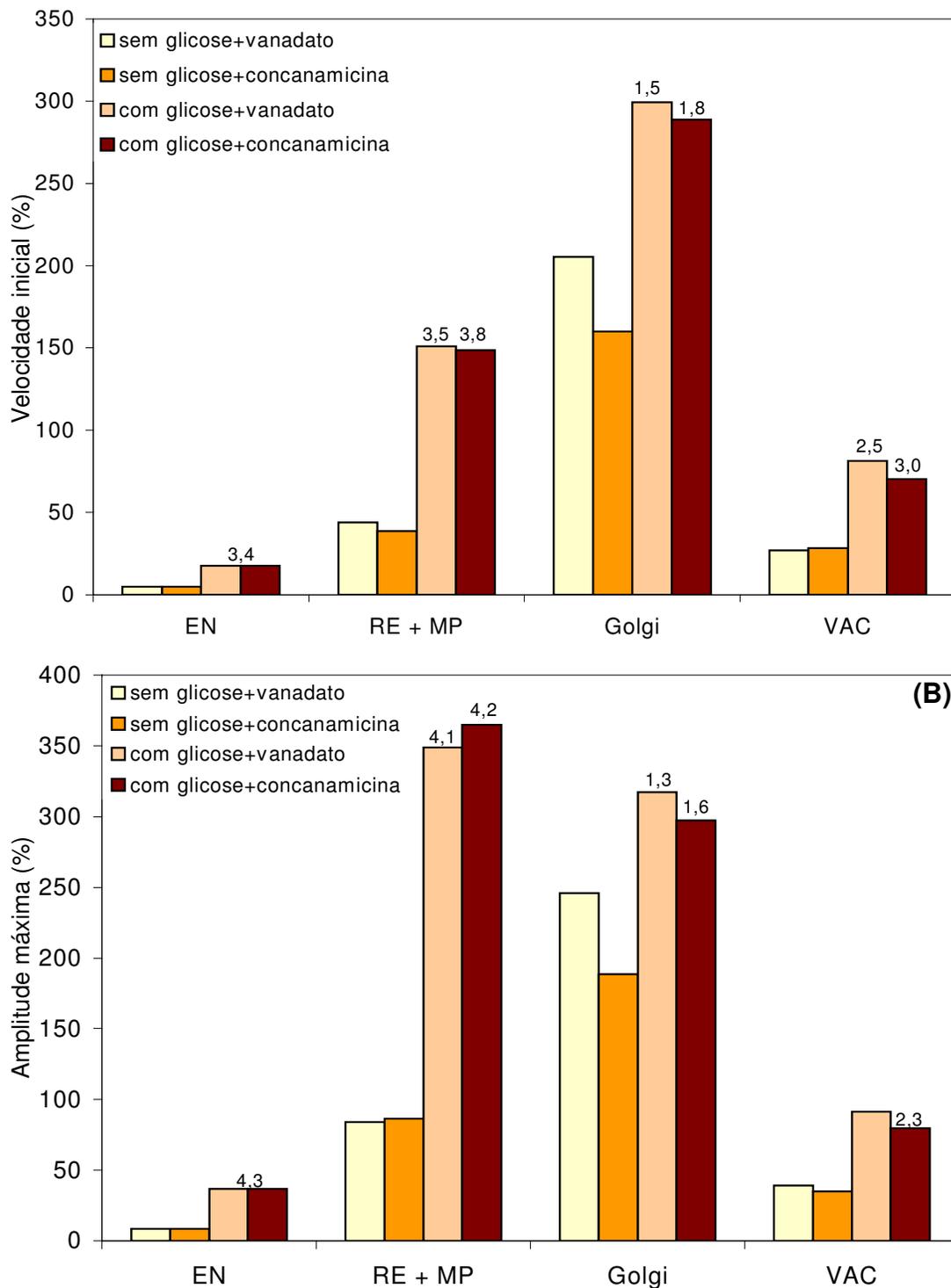
Como a glicose extracelular estimulou a atividade de transporte de  $H^+$  de maneira diferenciada, realizou-se análise de Dot Blotting em vesículas de membranas isoladas a partir de esferoplastos pré-incubados ou não com glicose a fim de desvendar se as enzimas têm mecanismos regulatórios distintos.

A Tabela II apresenta os dados obtidos através da análise de Dot Blotting a partir das qual foi possível estabelecer uma relação entre a estimulação da atividade de transporte de  $H^+$  e da imunodeteção na presença de 100 mM de glicose (Figura 27). Percebe-se que a razão entre estes parâmetros é similar para membranas enriquecidas por vesículas de RE rugoso e de vacúolos, 2,8 e 2,4, respectivamente. Distingue-se o RE liso e o rugoso em duas partes, de acordo com a densidade e, conseqüentemente, migração no gradiente de sacarose. Não há uma relação fixa para a razão entre os dois parâmetros, atividade de transporte e imunomarcção, ao longo da via secretória, sendo maior na área do RE.

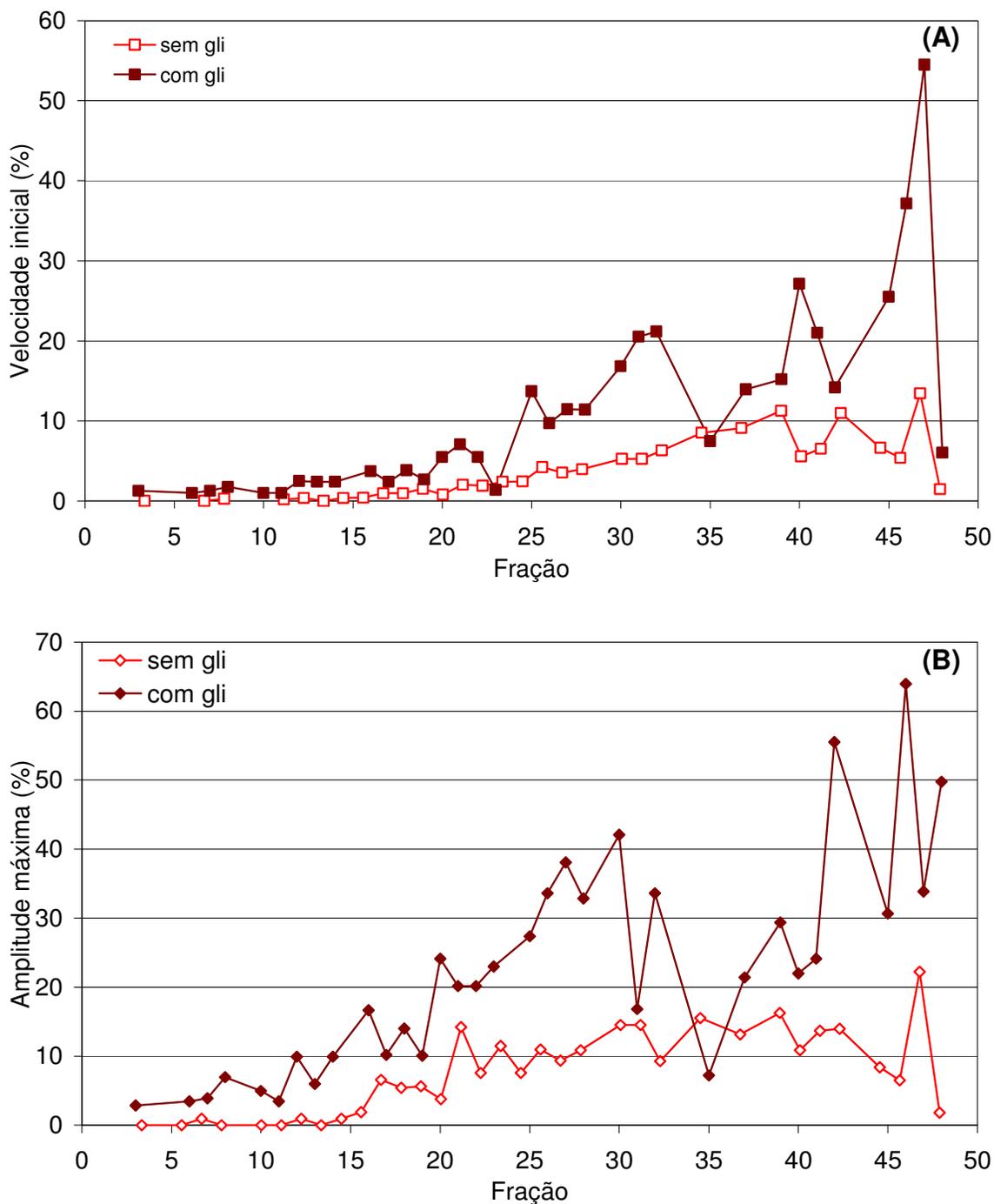
Perzov e colaboradores (2002) verificaram que a enzima de trans CG e de endossomos não tem capacidade de dissociação entre  $V_1$  e  $V_0$  e que isto pode ser explicado pela presença de diferentes isoformas da subunidade "a" (Stv1p e Vph1p). Assim, a avaliação do conteúdo de  $V_1$  feita nas vesículas de membranas isoladas a partir de esferoplastos pré-incubados ou não com 100 mM de glicose sugere que a regulação da  $V H^+$ -ATPase de EN, RE e vacúolos acontece de maneira diferente da enzima de CG.



**Figura 24 – Velocidade inicial (A) e amplitude máxima (B) do transporte de H<sup>+</sup> pela V ATPase.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados ou não com 100 mM de glicose. Dados normalizados para mg de proteína de membranas totais. Análise feita em espectrofluorímetro na presença de 5,75 nM de concanamicina A a partir da extinção de fluorescência do ACMA e atividade calculada como descrito em Métodos.



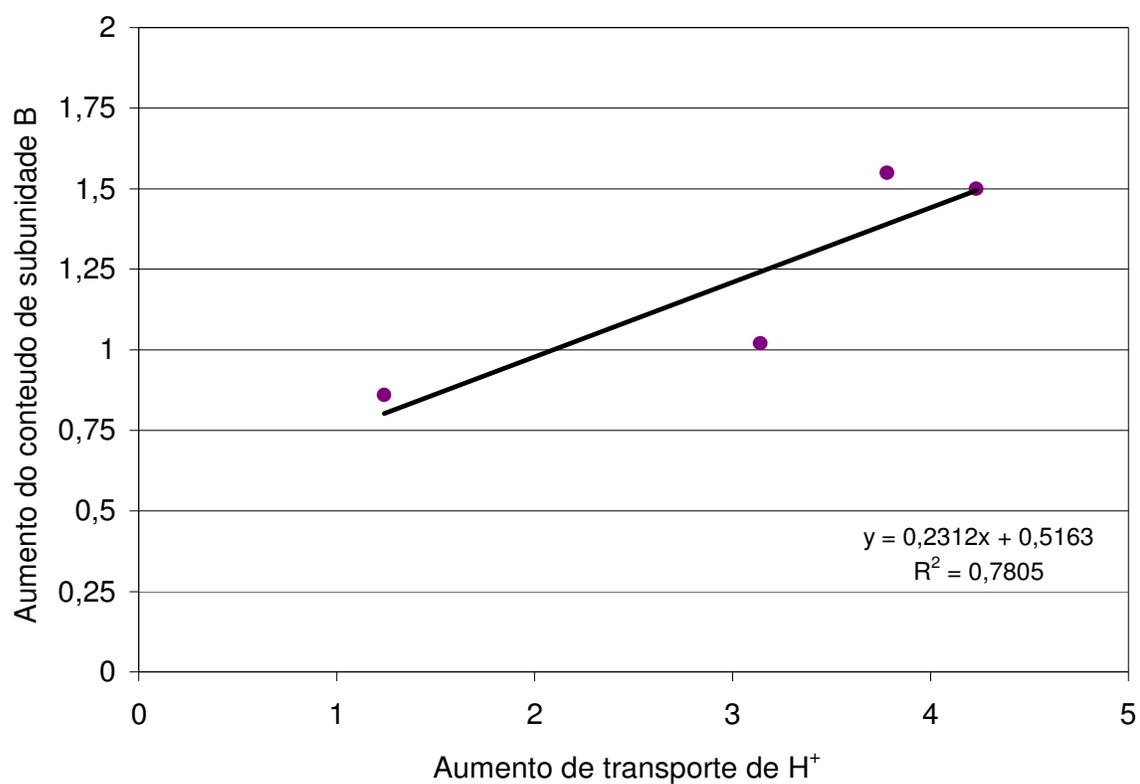
**Figura 25 – Velocidade inicial (A) e amplitude máxima (B) do transporte de H<sup>+</sup> pela V ATPase.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados ou não com 100 mM de glicose. Dados normalizados para mg de proteína de membranas totais. Análise feita em espectrofluorímetro na presença de 5,75 nM de concanamicina A ou 100 μM de vanadato a partir da extinção de fluorescência do ACMA e atividade calculada como descrito em Métodos.



**Figura 26 – Velocidade inicial (A) e amplitude máxima (B) do transporte de H<sup>+</sup> pela V ATPase.** Frações de membranas separadas em gradiente descontínuo de sacarose a partir de esferoplastos isolados de células de *S. cerevisiae*, cepa AA 255, pré-incubados ou não com 100 mM de glicose. Dados normalizados para mg de proteína de membranas totais. Análise feita em espectrofluorímetro na presença de 5,75 nM de concanamicina A ou 100 μM de vanadato a partir da extinção de fluorescência do ACMA e atividade calculada como descrito em Métodos.

	EN (1–10)	RE (11–19)	RE (20–28)	CG (29–39)	V (40–48)
<b>Aumento de transporte de H<sup>+</sup></b>	-	4.23	3.14	1.24	3.78
<b>Aumento do conteúdo de subunidade B</b>	1.65	1.5	1.02	0.86	1.55
<b><math>\Delta = \frac{\text{transporte de H}^+}{\text{conteúdo de sub. B}}</math></b>		2.8	3.1	1.4	2.4

**Tabela II - Razão entre transporte de H<sup>+</sup> e imunomarcção detectada em *Dot Blotting*.** Análises feitas em vesículas de membranas isoladas de esferoplastos obtidos a partir de *S. cerevisiae*, cepa AA-255.



**Figura 27. Relação entre o aumento do transporte de H<sup>+</sup> e o aumento do conteúdo da subunidade B. Dados apresentados na Tabela II.**

---

## 6. DISCUSSÃO

---

O papel central exercido pelas H<sup>+</sup>-ATPases na fisiologia celular confere grande importância ao estudo de sua localização e regulação. Dados da literatura indicam a importância do gradiente de H<sup>+</sup> através de vesículas de membranas para sua fusão/divisão (Klionsky,1990; Nelson & Harvey,1999), além do correto endereçamento de proteínas e outras moléculas, além da homeostase iônica.

A presença destas enzimas ao longo da via secretória foi confirmada em endossomos, lisossomos, vesículas secretórias e vacúolos, quando se trata de V-ATPases (Klionsky *et al.*,1990; Forgac,1998; Kane,2000) e membrana plasmática e vesículas secretórias, no caso das P-ATPases (Serrano,1983; Ferreira *et al.*,2001). A localização das V H<sup>+</sup>-ATPases estende-se ao CG no caso de células de mamíferos e plantas (Nelson & Harvey,1999). Em leveduras acredita-se que a V H<sup>+</sup>-ATPase esteja ativa somente em vacúolo (Kakinuma *et al.*,1981; Klionsky *et al.*,1990; Stevens & Forgac,1997).

Entretanto, nossos dados apresentam atividade de transporte de H<sup>+</sup> dependente de ATP em toda a via secretória (pelo menos EN, RE+MP, CG e vacúolos). Parte desta atividade foi determinada como vanadato sensível, P H<sup>+</sup>-ATPase, e outra como concanamicina sensível, correspondendo à V H<sup>+</sup>-ATPase (Figura 8).

### **6.1. - Atividade de transporte de H<sup>+</sup> por P-ATPase em membranas da via secretória:**

A P H<sup>+</sup>-ATPase, considerada uma enzima marcadora de MP, foi descrita como ativada apenas nesta membrana e em vesículas secretórias (Serrano,1983; Ferreira *et al.*,2001). Porém, não existiam, até então, evidências do transporte de H<sup>+</sup> em RE e CG pela P H<sup>+</sup>-ATPase. De acordo com o modelo atual, a enzima é sintetizada no RE e sofre fosforilações sequenciais durante o seu transporte através da via secretória até as VS, onde se encontra já ativa.

Chang e Slayman (1991) indicam que não há diferenças conformacionais da enzima em RE e MP, dando margem para a possibilidade da enzima já estar ativa

desde o RE. Entretanto, revelou-se a atividade de P H<sup>+</sup>-ATPase ao longo da via secretória de *S. cerevisiae* (Figura 16) tanto na ausência quanto na presença de glicose.

As tentativas de modificação de P H<sup>+</sup>-ATPase de MP por DCCD não foi bem sucedida. O agente parece não ter agido especificamente na MP, já que houve remoção de V H<sup>+</sup>-ATPase, enzima característica de membranas intracelulares para o caso de leveduras, estando ausente na MP.

A remoção da contribuição de atividade de transporte de H<sup>+</sup> através da enzima de MP foi feita a partir da pré-incubação dos esferoplastos com concanavalina A (conA), o que resultou numa diminuição da atividade total encontrada. A principal diferença foi encontrada na região de vesículas enriquecidas por membranas de RE, com as quais comigravam vesículas enriquecidas com MP, onde a modificação por conA atingiu quase 60% da atividade total de P H<sup>+</sup>-ATPase retirada. Estes dados corroboram com aqueles encontrados por Kang e colaboradores (1985) em ensaios realizados com quitina sintetase.

É importante ressaltar ainda que, nestas condições, a atividade de V H<sup>+</sup>-ATPase não sofreu mudanças significativas, o que comprova a efetividade e seletividade da modificação da MP pela conA, deixando intactas as vesículas de membranas intracelulares.

As análises de Dot Blotting (Figura 20) confirmam a presença de P H<sup>+</sup>-ATPase mesmo após a remoção da MP por conA. Fica clara a redução da imunoresposta entre as frações 8 e 28, região na qual vesículas enriquecidas com MP comigram com as membranas de RE. Na região que compreende as vesículas enriquecidas por membranas de CG (fração 28 a 39) a alteração não é tão notável.

É interessante perceber que em vesículas de membranas correspondentes as frações a partir de 40, as quais não apresentam atividade significativa de transporte de H<sup>+</sup> pela P-ATPase, o conteúdo da enzima é significativo. Isto pode indicar que a enzima encontra-se em sua fase final, ou seja, em sua fase de destruição no interior das vesículas vacuolares.

Vale ressaltar que se estabelece uma equivalência entre a atividade de transporte de H<sup>+</sup> na região de vesículas enriquecidas por membrana de RE e de CG, indicando um fluxo protéico regular com a enzima ativa desde a sua biossíntese no RE

até seu transporte através das diferentes organelas da via secretória. Assim, não se pode limitar atividade deste sistema de homeostase de  $H^+$  apenas à MP.

A modificação dos esferoplastos utilizando-se uma maior concentração de conA resulta na remoção de vesículas de membranas intracelulares além de apenas aquelas de MP (Figura 21). Isto mostra que a concentração utilizada anteriormente é adequada. Além disso, comprova que há atividade de transporte de  $H^+$  tanto por P quanto por V-ATPase mesmo na ausência da contribuição das enzimas presentes na MP, ou seja, há atividade de P e V  $H^+$ -ATPases em vesículas de membranas intracelulares.

Kang e colaboradores (1985) verificaram que dois terços da atividade de quitina sintetase de MP foram removidos utilizando-se o mesmo tratamento com conA, em acordo com os resultados obtidos aqui. Para o caso de P  $H^+$ -ATPases de MP, há também concordância entre os dados.

## **6.2. - Atividade de transporte de $H^+$ por V-ATPase em membranas da via secretória:**

A ativação de V  $H^+$ -ATPases pela glicose extracelular acontece desde as frações mais pesadas (vesículas consideradas enriquecidas por EN) até as mais leves, ditas vacuolares (Opheim, 1978; Okorokov & Lehle, 1998), mesmo naquelas regiões nas quais a atividade de transporte de  $H^+$  é muito baixa na ausência de glicose extracelular. Isto pode ser explicado se houver confirmação de uma dissociação dos complexos V1 e  $V_0$  da enzima (Kane, 1995).

A baixa estimulação da V  $H^+$ -ATPase pela glicose em vesículas enriquecidas por membrana de CG é, provavelmente, decorrente de contaminações por vesículas enriquecidas por membranas vizinhas (RE+MP e vacúolos).

Quando se comparam as atividades de transporte de  $H^+$  para V e P-ATPases percebe-se que a velocidade inicial ( $V_0$ ) para a primeira enzima é 3,3 vezes maior do que para a segunda. Já quando se trata de amplitude máxima ( $F_{máx}$ ) esta situação se inverte, passando a P-ATPase a valores maiores, em média, 1,6 vezes do que os de V-ATPase. Sugere-se então que a V  $H^+$ -ATPase seja mais rápida na regulação do pH enquanto a P  $H^+$ -ATPase, mais potente na formação de  $\Delta pH$ .

Um fato interessante é a baixa estimulação por glicose extracelular das vesículas enriquecidas por membranas de CG quando comparadas com as de RE e vacúolos. Como não há correlação entre a imunomarcação detectada pelo imunoblotting e o transporte de  $H^+$  pela V-ATPase, sugerimos que diferentes formas desta enzima possam ser encontradas nas vesículas de membranas isoladas de diferentes organelas da via secretória.

Esta diferença pode ser explicada pelo fato de existirem 2 genes que codificam a subunidade "a" (100 kDa) requerida para a associação dos complexos  $V_1$  e  $V_0$  da  $V H^+$ -ATPase em levedura: *VPH1* e *STV1*. Kawasaki-Nishi e colaboradores (2001) verificaram que os complexos com a isoforma Vph1p localizam-se no vacúolo e sofrem regulação pela glicose através do mecanismo de dissociação/reassociação enquanto aqueles que apresentam Stv1p localizada, provavelmente, no CG e/ou endossomos apresentam-se constantemente na forma associada, tendo atividade independente da presença ou ausência de glicose extracelular.

As razões fisiológicas desta diferença de regulação ainda não estão claras, porém o fato da enzima de CG apresentar atividade de transporte de  $H^+$  mesmo em condições de déficit energético pode indicar uma importante função desta organela.

Como o conteúdo de subunidade A não é alterado significativamente após o tratamento dos esferoplastos com 100 mM de glicose (Samarão,2003), parece que há um desligamento entre os complexos  $V_1$  e  $V_0$  que não chega a ser considerado uma dissociação completa. Este mecanismo parece permitir a hidrólise de ATP, mas não o transporte de  $H^+$ , o que explicaria o aumento da atividade ATPásica na presença de glicose extracelular sem concomitante aumento do conteúdo de subunidade A.

Outra hipótese pode ser surgir a partir da verificação do acoplamento entre hidrólise de ATP e atividade de transporte de  $H^+$ . Perzov e colaboradores (2001) descrevem casos nos quais V e F-ATPases podem clivar ATP em seu sítio ativo, porém o transporte de  $H^+$  fica comprometido. Okorokov e colaboradores (2001) mostraram que realmente há acoplamento entre transporte de  $H^+$  e hidrólise de ATP nas distintas organelas da via secretória, além ser diferente nos dois sub-compartimentos do CG.

Vale ressaltar que alguns experimentos aqui apresentados/discutidos foram obtidos em colaboração com Samarão (2003), já que seu trabalho tinha objetivos

relacionados com este, além de serem dados que demandam muito tempo para serem obtidos e dos reagentes terem custo bastante elevados.

---

## 7. CONCLUSÕES

---

1. Após separação em gradiente de densidade de sacarose e determinação de atividade de enzimas marcadoras de organelas foram reveladas, no mínimo, quatro populações de membranas de *S. cerevisiae*: 1) enriquecidas por vesículas de MP e RE, 2) por vesículas de CG, 3) por vesículas de vacúolo e, provavelmente, 4) por vesículas de membranas nucleares;
2. Cada uma destas populações apresenta atividade de transporte de  $H^+$  ATP dependente, determinados através do uso de inibidores, como exercido tanto por  $V$  quanto por  $P$   $H^+$ -ATPase. Isto confere com dados encontrados anteriormente neste laboratório, sugerindo que as membranas de organelas da via secretória, além de vacúolos, apresentam  $V$   $H^+$ -ATPase ativa a que a  $P$   $H^+$ -ATPase está sendo transportada na forma ativa a partir do RE para MP;
3. A atividade de  $P$   $H^+$ -ATPase foi revelada em membranas de RE e CG após modificações de MP com concanavalina A e remoção de MP. Estes resultados eliminam a possibilidade de contaminação de membranas de RE e CG com MP e evidenciam que a  $P$   $H^+$ -ATPase está ativa em RE e CG;
4. A  $V$   $H^+$ -ATPase é ativada pela glicose extracelular. Esta ativação pode chegar a 2 e 4 vezes em vesículas enriquecidas com membranas vacuolares e de RE, respectivamente, mas em CG atinge apenas em torno de 30-60%. Sugerimos que a enzima de RE e de vacúolos está controlada pela glicose extracelular a partir do mecanismo de dissociação e reassociação dos complexos. Ao contrário, o complexo  $V_1$  da enzima de CG não é capaz de dissociar, já que apresenta uma outra isoforma da subunidade "a";

5. A estimulação diferenciada de V H<sup>+</sup>-ATPase de EN, RE e vacúolos associada a baixa estimulação ou até a sua ausência na enzima do CG pela glicose extracelular colabora com a sugestão feita aqui sobre a diferença entre as enzimas nestas organelas. Assim, conclui-se que as principais organelas da via secretória possuem V H<sup>+</sup>-ATPase, mas estas são estruturalmente distintas, representadas por modificações bioquímicas que parecem ser reguladas por diferenças no metabolismo energético;
6. A identificação de ambas enzimas foi confirmada por análise de imunomarcção por *western blotting*, para o caso de V H<sup>+</sup>-ATPases (Samarão,2003) e por *dot blotting*, para P H<sup>+</sup>-ATPases. Estes experimentos confirmam a presença de ambas enzimas desde sua biossíntese no RE até o transporte através de toda a via secretória;
7. Pelo fato da V H<sup>+</sup>-ATPase seja mais rápida na regulação do pH enquanto a P H<sup>+</sup>-ATPase, mais potente na formação de  $\Delta$ pH, são estabelecidas condições ótimas para o funcionamento celular, promovendo o controle de pH do citosol e do lúmen das organelas.
8. Em conjunto, estes resultados confirmam a hipótese de duas bombas de H<sup>+</sup> funcionarem em organelas da via secretória de *S. cerevisiae* e estarem controladas pela glicose extracelular. Isto sugere que:
  - a. V H<sup>+</sup>-ATPase e P H<sup>+</sup>-ATPase estão funcionalmente montadas já no RE e participam da homeostase de H<sup>+</sup> e outros íons, assegurando o funcionamento da via secretória;
  - b. Estas bombas criam diferença de potencial eletroquímico de prótons através de membranas de organelas da via secretória, acidificam o lúmen destas organelas e, com isso, oferecem condições ótimas para “enovelamento/endereçamento” de proteínas, fusão/divisão de membranas e, provavelmente, funcionamento de transportadores

secundários de diferentes íons e outras substâncias (como drogas e metabólitos).

7. A ausência ou mau funcionamento destas bombas pode causar alterações-chaves destes processos. Assim, um estudo mais detalhado do funcionamento de cada bomba protônica nestas distintas organelas pode esclarecer questionamentos levantados sobre alterações dos processos celulares básicos e fisiológicos normais e em condições de estresse como doenças de plantas e animais, por exemplo.

---

## 8. REFERÊNCIAS

---

- ADACHI I., Arai, H, Pimental, R., Forgac, M. (1990) Proteolysis and orientation on reconstitution of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* 265: 960-966
- ALBEIJON C, Orlean PW, Hirschberg CB (1989) Topography of glycosylation in yeast characterization of GDP mannanose transport and luminal guanosine diphosphatase activities in CG-like vesicles. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 86:66935-6939
- ARAI H., Pink, S., Forgac, M. (1989) Interactions of anions and ATP with the coated vesicle proton pump. *Biochemistry* , 28: 3075-3082
- AUER M, Scarborough GA, Kuhlbrandt W (1998) Three-dimensional map of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the open conformation. *Nature.* 392: 840-843
- AXELSEN KB, Palmgren MG (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamilies. *J. Mol. Evol.* 46:84-101
- BAGNAT M, Chang A, Simons K (2001) Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Molecular Biology of the Cell.* 12: 4129–4138
- BARKLA BJ, Pantoja O (1996) Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:159-184
- BOWMAN EJ (1983) Comparison of the Vacuolar Membrane ATPase of *Neurospora crassa* with the Mitochondrial and Plasma Membrane ATPases *J. Biol. Chem.*, 258 (24): 5238-5244
- BOWMAN BJ, Bowman EJ (1986) H<sup>+</sup>-ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells. *J. Memb. Biol.* 94: 83-97
- BOWMAN B.J., Allen, R., Wecuser, M. A., Bowman, E.J. (1988) Isolation of genes encoding the *Neurospora* vacuolar ATPase *J. Biol. Chem.* 263:14002-14007
- BOZZO, S.; Retamal, C. (1991) Gel-Perfect: Gels unidimensionales. Un nuevo método densitométrico para computadores personales. *Arch. Biol. Med. Exp.* 24: N2: R-181
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of dye binding. *Ann.Biochem.* 72: 248-254

- BRODSKY JL, McCracken AA (1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Seminars in cell & Developmental Biology*, 10: 507-513
- CATTY P, de Kerchove d'Exaerde A, Goffeau A (1997) The complete inventory of the yeast *S. cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Letters*. 409: 325-332
- CHANG A, Slayman CW (1991) Maturation of the yeast plasma membrane [H<sup>+</sup>]ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *The Journal of Cell Biology*. 115(2): 289-295
- COHEN A., Perzov, N., Nelson, H., Nelson, N. (1999) A novel family of yeast chaperons involved in the distribution of V-ATPase and other membrane proteins. *J. Biol. Chem*. 274(38): 26885-26893
- CRONIN SR, Rao R, Hampton R Y (2002) Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* 157 (6) 1017-1028
- CROSS R.L., Duncan, T.M. (1996) Subunit rotation in F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthases as a means of coupling proton transport through F<sub>0</sub> to the binding changes in F<sub>1</sub>. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28: 403-408
- FELDMAN RJ, Bernstein M, Scheckman R (1987) Product of SEC 53 is required for folding and glycosylation of secretory proteins in the lumen of the yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem*. 262: 9332-9339
- FENG Y, Forgac M(1992) Cysteine 254 of 73 kDa A subunit is responsible for inhibition of the coated vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase upon modification by sulphhydryl reagents. *J. Biol. Chem*. 267(9): 5817-5822
- FERREIRA T, Mason AB, Slayman CW (2001) The yeast Pma1 proton pump: a model for understanding the biogenesis plasma membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 276(32): 29613-29616
- FERREIRA T, Mason AB, Pypaert M, Allen KE, Slayman CW (2002) Quality Control in the Yeast Secretory Pathway: a misfolded PMA1 H<sup>+</sup>-ATPase reveals two checkpoints. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (23):21027-21040
- FINBOW ME, Harrison MA (1997) The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. (1997) *Biochem. J.*,324:697-712
- FORGAC M (1998) Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>) ATPases. *FEBS Letters*. 440 (3): 258-63

- FORGAC M (1999) Structure and properties of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase). *The Journal of Biological Chemistry*. 274(19): 12951-12954
- FORSBURG SL, Nurse P (1991) Cell cycle regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annual. Review of Cell Biology*. 7:227-256
- GRAHAM LA, Powell B, Stevens TH (2000) Composition and assembly of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase complex. *J. Exp. Biol*. 203: 61-70
- GRAHAM LA, Flannery AR, Stevens TH (2003) Structure and Assembly of the Yeast V-ATPase *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 35 (4): 301-312
- GRANATO TM (2002) Atividade e regulação de H<sup>+</sup>-ATPases do tipo P e V em organelas da via secretória de *S. cerevisiae* por glicose. Monografia, UENF
- GOFFEAU A, Slayman CW (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*.:30;639(3-4):197-223
- GOFFEAU A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science*. 274: 546-567
- HARVEY WR (1992) Physiology of V-ATPases *J Exp Biol*.:172:1-17
- HILL KJ and Stevens TH (1994) Vma21p is a yeast membrane protein retained in the endoplasmic reticulum by a di-lysine motif and is required for the assembly of the vacuolar H(+)-ATPase complex. *Mol. Biol. Cell* 5, 1039–1050
- IBARZ EI, Palmgren MG, Palazon J, Pinol M, Serrano R (1994) Activation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by the non-ionic detergent Brij 58 *Biochimica et Biophysica Acta* 1196: 93-96
- INOUE T, Forgac M (2005) Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V<sub>1</sub> domain and subunit a of the V<sub>0</sub> domain. *JBC Papers in Press* M504890200
- KAKINUMA Y., Ohsumi, Y., Anraku, (1981) Properties of H<sup>+</sup>-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae* *J. Biol. Chem*. 256:10859-10863
- KANE PM (1995) Disassembly and reassembly of yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 28: 17025-17032

- KANE PM (2000) Regulation of V-ATPases by reversible disassembly *FEBS Letters* 469 137-141
- KANG MS, Au-Young J, Cabib E (1985) Modification of Yeast Plasma Membrane Density by Concanavalin A Attachment: Application to study of chitin synthetase distribution *Journal of Biological Chemistry* 260: 12680-12684
- KAWASAKI-NISHI S, Nishi, T, Forgac, M (2001) Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa  $\alpha$ -subunit differ in coupling efficiency and *in vivo* dissociation. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:17941-17948
- KLIONSKY D. J., Herman P. K., Emr S. D. (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54: 266 -292
- KLIONSKY DJ, Nelson H, Nelson N, Yaver DS (1992) Mutations in the yeast vacuolar ATPase result in the mislocalization of vacuolar proteins *J. exp. Biol.* 172, 83-92
- KRISHNA S, Cowan G, Meade JC, Wells RA, Stringer JR, Robson KJ (1993). A Family of Cation ATPase-like Molecules from *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Cell Biology*, 120 (2): 385-398
- KÜHLBRANDT W, Zeelen J, Dietrich J (2002) Structure, mechanism, and regulation of the *Neurospora* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase *Science* 297:1692-1696
- LIU Q., Leng, X.H., Newman, P., Vasilyeva, E., Kane, P.M., Forgac, M. (1997) Site directed mutagenesis of yeast V-ATPase A subunit. *J. Biol. Chem.* 272: 11750-11756
- LUTSENKO S, Kaplan JK (1995) Organization of P-Type ATPases: Significance of Structural Diversity? *Biochemistry* 34 (48): 15607-15613
- MALÍNSKÀ K, Malínský J, Operakova M, Tanner W (2003) Visualization of Protein Compartmentation within the Plasma Membrane of Living Yeast Cells. *Molecular Biology of the Cell* 14: 4427–4436
- MANOLSON MF, Proteau D, Preston RA, Slenbit A, Roberts T (1992) The VPH1 gene encodes a 95 kDa integral membrane polypeptide required for *in vivo* assembly and activity of yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase *J. Biol. Chem.* 267: 14294-14303
- MANOLSON MF, Wul B, Proteau D, Taillon BE, Roberts T, Hoyt MA, Jones EW (1994) *STV1* Gene Encodes Functional Homologue of 95-kDa Yeast Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Subunit Vph1p *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 19, 14064-14074
- MATSUOKA K, Higuchi T, Maeshima M and Nakamura, K (1997) *The Plant Cell*, 9:533-546

- MERZENDORFER H, Gräf R, Huss M, Harvey WR, Wiczorek H (1997) Regulation of proton-translocating V-ATPases. *The Journal of Experimental Biology*. 200, 225–235
- MITCHELL P (1961) Coupling of phosphorylation to Electron and hydrogen transfer by chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-148
- MIURA K., Miyazawa, S., Furuta, S., Mitsushita, Kamijo, K., Ishida, H., Miki, T., Suzukawa, K., Resau, J., Copeland, T.D. (2001) The Sos-Rac1 Signaling, possible involvement of a vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase E subunit. *J. Biol. Chem.* 276 (49): 46276-46283
- MORSOMME P, Slayman CW, Goffeau A (2000) Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase *Biochimica et Biophysica Acta* 1469: 133-157
- MULBERG A.E., Tulk, B.M., Forgac, M. (1991) Modulation of coated vesicle chloride channel activity and acidification by reversible protein kinase A-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266: 20590-20593
- NAKAMOTO RK, Rao R, Slayman CW (1991) Expression of the yeast plasma membrane [H<sup>+</sup>]ATPase in secretory vesicles. A new strategy for directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*:25;266(12):7940-9
- NARASIMHAN ML, Binzel ML, Perez-Prat E, Chen Z, Nelson DE, Singh NK, Bressan RA, Hasegawa PM (1991) NaCl regulation of tonoplast ATPase 70-kilo-dalton subunit mRNA in tobacco cells. *Plant Physiol.* 97: 562-568
- NELSON H, Mandiyan S, Noumi T, Moriyama Y, Miedel MC, Nelson N (1990) Molecular cloning of cDNA encoding the C subunit of H(+)-ATPase from bovine chromaffin granules. *J Biol Chem.* 265(33): 20390-20393.
- NELSON N (1992) The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase – one of the most fundamental ion pumps in nature. *J. Exp. Biol.* 172: 19-27.
- NELSON N and Harvey WR (1999) Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev.*:79(2):361-85.
- NISHI T, Forgac M (2002) The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nature Reviews Molecular Cellular Biology* 3: 94-103
- NUCIFORA G, Chu L, Misra T K, Silver, S. (1989) Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 cadA gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (10): 3544 - 3548

- OBERBECK K, Drucker M, Robinson DG (1994) V-ATPase and pyrophosphatase in endomembranes of maize roots. *J. Exp. Bot.* 45: 235-244
- OKOROKOV LA, Lichko LP (1983) The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*: ATPase is electrogenic H<sup>+</sup>-translocase. *FEBS Letters*. 155: 102-106
- OKOROKOV LA, Lichko LP, Kulakovskaya TV (1985) H<sup>+</sup>/ion antiport as the principal mechanism of transport systems in the vacuolar membrane of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* *FEBS Letters* 192: 303-306
- OKOROKOV LA (1994) Several compartments of *S. cerevisiae* are equipped with Ca<sup>2+</sup>-ATPase(s). *FEMS Microbiology Letters*. 117:311-318
- OKOROKOV LA, Lehle L (1998) Ca<sup>2+</sup>-ATPases of *S. cerevisiae*: diversity and possible role in protein sorting. *FEMS Microbiology Letters*. 162: 83-91
- OKOROKOV LA, Silva FE, Okorokova-Façanha AL (2001) Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> homeostasis in fission yeast: a role of Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and distinct V H<sup>+</sup>-ATPases of secretory pathway organelles. *FEBS Letters*, 505:321-324
- OKOROKOVA-FAÇANHA AL, Applgren, H, Tabish, M, Okorokov, LA & Ekwall, K (2002) The endoplasmic reticulum cation P<sub>-</sub>Type ATPase Cta4p is required for control of cell shape and microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* 157 (6) 1029-1039
- OPHEIM DJ (1978) alpha-D-Mannosidase of *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization and modulation of activity. *Biochim. Biophys. Acta*. 524: 121-30
- OSHUMIT Y and Anraku Y (1983). Calcium transport driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *S. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258: 5614-5617
- PEDERSEN PL, Carofoli E (1987) Ion motive ATPase.I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends Biochem. Science*. 12, 146-150
- PENG SB, Crider BP, Xie XS, Stone DK (1994) Alternative mRNA splicing generates tissue-specific isoforms of 116kDa polypeptide of vacuolar proton pump. *J. Biol. Chem.* 269: 17262-17266
- PERZOV N, Padler-Karavani V, Nelson H, Nelson N (2002) Characterization of yeast V-ATPase mutants lacking Vph1p or Stv1p and the effect on endocytosis *Journal of Experimental Biology* 205:1209–1219

- PORTILLO F, de Larrinoa I F, Serrano R (1989) Deletion analysis of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. *FEBS Letters*, 247 (2): 381-385
- PORTILLO F (2000) Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants *Bioch. and Bioph. Acta*. 1469:31-42
- PUOPOLO K, Forgac M (1990) Functional reassembly of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* (25) 265: 14836-14841
- RATAJCZAK R (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 (2000) 17-36
- RAYNER JC, Pelham HRB (1997) Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *The EMBO Journal*, 16(8): 1832-1841
- REA PA, Griffith CJ, Sanders D (1987) Purification of the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid of a higher plant tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem.* 25;262(30):14745-52
- RETAMAL C, Thiebaut P, Alves EW (1999). Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Anal. Biochem.* 268 (1): 15-20
- SAMARÃO SS (2003) "Caracterização das atividades das V H<sup>+</sup>-ATPases e P H<sup>+</sup>-ATPase nas organelas de via secretoria de levedura e regulação destas enzimas pela glicose extracelular" Tese de Doutorado, UENF
- SANDERS D, Hansen UP, Slayman CL (1981) Role of the plasma membrane proton pump in pH regulation in non-animal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.* 78:5903-7
- SANDERS D, Slayman CL (1982) Control of intercellular pH. Predominant role of oxidative metabolism, not proton transport, in the eucaryotic microorganism *Neurospora*. *Journal of General Physiology.* 80:377-402
- SCHELESSER A, Ulaszewski S, Ghislain M, Goffeau A (1988) A second transport ATPase gene in *S. cerevisiae*. *J Biol Chem.* 263(36):19480-7
- SEOL J., H., Shevchenko, A, Deshaies, R.J. (2001) SKp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly. *Nat. Cell. Biol.* 3: 384-391

- SERRANO R (1978) Characterization of the plasma membrane ATPase of *S. cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biochemistry*.22 (1) 51-63
- SERRANO R (1983) In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Letters*. 156, 11-14
- SERRANO R (1991) Transport across yeast vacuolar and plasma membranes *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces Genome, Dynamics, Protein Synthesis and Energetics*: 524-529
- SILVA F.E. (1998) A participação da via secretória da levedura *Schizosaccharomyces pombe 972 h<sup>-</sup>* na homeostase dos íons Ca<sup>2+</sup> e H<sup>+</sup> : o papel de Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiportador(s) e V<sub>1</sub>V<sub>0</sub> H<sup>+</sup>-ATPase(s). Monografia apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro
- SMARDON A M., Tarsio, M., Kane P.M. (2002) The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277 (16): 13831-13831
- SORIN A, Rosas G, Rao R (1997) PMR1, a Ca<sup>2+</sup>-ATPase in yeast CG, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J Biol Chem.* 272 (15): 9895-9901
- STEVENS T.H., Forgac, M. (1997) Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13:779-808
- SUPPLY P, Wach A, Goffeau A. (1993) Enzymatic properties of the PMA2 plasma membrane-bound H<sup>(+)</sup>-ATPase of *S. cerevisiae*. *J Biol Chem.* 268(26):19753-9
- SUSSMAN MD, Slayman CW (1983) Modification of the *Neurospora crassa* Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase with N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide *J Biol Chem.* 258: 3, 1839-1843
- VIEGAS CA, Supply P, Capieaux E, Van Dyck L, Goffeau A, Sá-Correia I (1994) Regulation of the expression of the H<sup>+</sup>-ATPase genes PMA1 and PMA2 during growth and effects of octanoic acid in *S. cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1217:74-80
- WILKENS S, Zhang Z, Zheng Y (2005) A structural model of the vacuolar ATPase from transmission electron microscopy. *Micron* 36: 109–126

- WOOD V, Rutherford KM, Ivens A, Rjandream MA, Barrell B (2001) A Reannotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Comp. Funct. Genom.* 2:143-154
- XU T., Forgac, M. (2001) Microtubules are involved in glucose-dependent dissociation of yeast vacuolar [H<sup>+</sup>]-ATPase *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* 276(27): 24855-24861
- YOSHIMORI T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y(1991) Bafilomycin A1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase, Inhibits Acidification and Protein Degradation in Lysosomes of Cultured Cells *J. Biol. Chem.* 266 (26):17707-17712
- ZHANG J, Myers M, Forgac M (1992) Characterization of the V<sub>0</sub> domain of the coated vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase. *J.Biol.Chem.* 267(14): 9773-9778
- ZHANG J, Parra K .J, Liu, J., Kane , P. M.(1998) Characterization of a temperature-sensitive yeast vacuolar ATPase mutant with defects in actin distribution and bud morphology. *J. Biol. Chem.* 273: 18470-18480

# 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](#)