



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Efeitos das variações na homeostase de cálcio,
sobre o processo de ativação, induzido por
carboidratos, da H⁺- ATPase de membrana
citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae*:
papel do cálcio externo e do canal vacuolar Yvc1p**

AUTORA: ANAMARIA DE SOUZA CARDOSO

ORIENTADOR: PROF. Dr. ROGELIO LOPES BRANDÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor(a) em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular

Ouro Preto – Minas Gerais
Abril de 2009

C268e Cardoso, Anamaria de Souza.

Efeitos das variações na homeostase de cálcio, sobre o processo de ativação por carboidratos, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae* [manuscrito] : papel do cálcio externo e do canal vacuolar Yvclp / Anamaria de Souza Cardoso – 2009.
xix, 131f.: il., color; grafs.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Biologia Molecular

1. Biologia molecular - Transdução de sinal celular - Teses. 2. Homeostase - Teses. 3. Cálcio - Teses. 4. Leveduras - Teses. 5. Carboidratos - Teses.
I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 577.112:582.282.23

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, sob a orientação do Professor Dr. Rogelio Lopes Brandão e com auxílio financeiro da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

RESUMO

A H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* é uma enzima muito importante, pois pelo bombeamento de prótons para fora da célula, ela cria um gradiente eletroquímico que é essencial para a captação de nutrientes. A presença de glicose desencadeia modificações pós-traducionais que aumentam a atividade da H⁺-ATPase. Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram que a ativação da enzima, induzida por glicose, é dependente do metabolismo de cálcio e que nesta via, o sensor Snf3p, parece atuar de forma paralela a Gpa2p, e que sua cauda C-terminal é aparentemente responsável por este papel.

Neste trabalho, nós observamos que em baixas concentrações de cálcio externo, o sinal de cálcio, e conseqüentemente a ativação induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana plasmática, é independente da atividade de proteínas responsáveis pela captação de cálcio em *S. cerevisiae*. Nesta condição, as células parecem ser capazes de detectar as baixas concentrações de cálcio externo e de alguma forma controlar a atividade da Ca²⁺-ATPase vacuolar, Pmc1p. Nós apresentamos dados que sugerem que Yvc1p, um canal de cálcio de membrana vacuolar está envolvido no sinal de cálcio induzido por glicose em células de levedura. Além disso, trabalhando com a droga 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB), um modulador de receptores de IP₃ em células de mamíferos, fomos capazes de demonstrar que provavelmente o Yvc1p funcione como um receptor de IP₃ ou pelo menos responda a um componente, ainda desconhecido, sensível ao mesmo, no sinal de cálcio induzido por açúcar. Nossos resultados também sugerem que Snf3p deve regular negativamente a atividade da Ca²⁺-ATPase, Pmc1p, inibindo o sequestro de cálcio citosólico.

Investigando os braços paralelos que regulam nossa via de estudo, observamos no duplo mutante *snf3Δplc1Δ*, surpreendentemente, uma reversão dos fenótipos observados nos mutantes únicos. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que neste mesmo duplo mutante há uma ausência de acúmulo de cálcio e então as condições de concentração e localização deste íon sejam favoráveis a uma ativação normal da H⁺-ATPase. Finalmente, nós demonstramos que a proteína quinase C parece estar envolvida no sinal de cálcio induzido por açúcar em células de levedura. Muito provavelmente ela participe do controle da H⁺-ATPase de membrana plasmática pela regulação dos níveis de cálcio e não pela fosforilação direta da enzima.

ABSTRACT

The plasma membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is a very important enzyme, because by pumping protons out of the cell, it creates an electrochemical gradient that is essential for nutrient uptake. The presence of glucose triggers post translational modifications that increase the H⁺-ATPase activity. Previous work from our lab demonstrated that the sugar-induced activation of the enzyme is dependent of calcium metabolism and that in this pathway, the sensor Snf3p, seems to work in parallel to Gpa2p, and that its C-terminal tail is apparently responsible for this role.

In this work, we observed that in very low external calcium concentrations, the calcium signaling, and consequently the glucose-induced activation of plasma membrane ATPase, is independent of the activity of the proteins claimed to be involved in calcium uptake in *S. cerevisiae*. In this condition, it seems that cells are able to sense low external concentrations of calcium and by somehow to control the activity of the vacuolar Ca²⁺-ATPase, Pmc1p. We presented data that suggest that Yvc1p, a calcium channel present in the membrane of the vacuole is involved in the sugar-induced calcium signaling in yeast cells. Moreover, by working with the drug 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), an IP₃ receptor modulator in mammalian cells, we have been able to demonstrated that most probably Yvc1p could likely function as an IP₃ receptor or at least it responds to an unknown IP₃ sensitive component in the sugar-induced calcium signaling. Our results also suggest that Snf3 p would regulate negatively the activity of the Ca²⁺-ATPase Pmc1p, inhibiting the sequestration of cytosolic calcium.

Investigating of the parallel arms that regulate our pathway of study, we observed in the double mutant *snf3Δplc1Δ*, surprisingly, a reversion of the phenotypes observed for the only mutants. This behavior can be explained that because of what in the same double mutant there is an absence of accumulation of calcium and so the conditions of concentration and location of this ion must favor a normal activation of the enzyme. Finally, we demonstrated that the protein kinase C seems to be involved in the sugar-induced calcium signaling in yeast cells. Most probably, it participates of the control of plasma membrane ATPase by regulating calcium levels instead of direct phosphorylation of the enzyme.

ÍNDICE

RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE ABREVIACÕES	X
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XV
INTRODUÇÃO	1
1 Introdução	2
1.1 Sinalização celular.....	2
1.1.1 Sinalização celular em leveduras.....	3
1.1.1.1 Papel da glicose na sinalização em leveduras.....	8
1.1.1.2 Metabolismo de cálcio.....	13
1.1.1.2.1 Transportadores e os compartimentos intracelulares.....	13
1.1.1.2.2 Resposta “TECC” induzida por glicose.....	18
1.2 A H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.2.1 Origem, estrutura e função.....	19
1.2.2 Regulação transcricional e pós-transcricional da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática.....	22
1.2.2.1 Mecanismos hipotéticos para a via de ativação, induzida por glicose, da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática	25

	OBJETIVOS.....	31
2	Objetivos.....	32
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.2	Objetivos Específicos.....	32
	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3	Material e métodos.....	34
3.1	Microorganismos e construções utilizados nos experimentos.....	34
3.1.1	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
3.2	Vetores e plasmídeos utilizados nos experimentos.....	36
3.3	Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos.....	36
3.4	Meios de cultura.....	37
3.4.1	Meio YP.....	37
3.4.2	Meio mínimo sintético (SD).....	37
3.5	Condições de crescimento.....	37
3.6	Transformação de leveduras.....	38
3.6.1	Preparo de células de levedura competentes.....	38
3.6.2	Transformação de leveduras.....	38
3.7	Construção de novos mutantes.....	39
3.7.1	Construção do mutante <i>plc1Δ</i> no background PJ69-2a e dos duplos mutantes <i>pmc1Δsnf3Δ</i> e <i>snf3Δplc1Δ</i>	39
3.7.1.1	Extração do DNA genômico de levedura.....	39
3.7.1.2	Amplificação das deleções.....	40
3.7.1.3	Eletroforese em gel de agarose.....	40
3.7.1.4	Transformação de leveduras.....	40
3.7.2	Construção dos duplo mutantes <i>fig1Δmid1Δ</i> e <i>pdr5Δmid1Δ</i>	41
3.7.2.1	Construção da deleção <i>MID1::URA3</i> e obtenção dos duplo mutantes.....	41
3.7.3	Construção do mutante <i>yvc1Δ</i> no background PJ69-2a e do duplo mutante <i>pmc1Δyvc1Δ</i>	42
3.7.3.1	Construção da deleção <i>YVC1::URA3</i> e obtenção dos mutantes.....	42
3.7.4	Construção do duplo mutante <i>pmc1Δgpa2Δ</i>	44

3.7.4.1	Corte do plasmídeo pUC18 / gpa2 / LEU com a enzima de restrição Smal e purificação do fragmento GPA2::LEU, utilizado na transformação.....	44
3.8	Acidificação extracelular.....	46
3.8.1	Medida da acidificação extracelular induzida por glicose ou galactose.....	46
3.8.2	Medida da acidificação extracelular induzida por glicose na presença de EGTA.....	46
3.8.3	Medida da acidificação extracelular induzida por glicose na presença de 2-APB.....	47
3.8.4	Determinação do peso seco.....	47
3.8.5	Cálculo da taxa de acidificação extracelular.....	47
3.9	Atividade específica da H ⁺ - ATPase.....	48
3.9.1	Obtenção da fração de membranas citoplasmáticas para o estudo do perfil de ativação da H ⁺ - ATPase.....	48
3.9.2	Ensaio da atividade ATPásica.....	49
3.9.3	Dosagem de proteínas.....	50
3.10	Atividade Ca ⁺² -ATPásica específica.....	50
3.10.1	Obtenção da fração de membrana subcelular para o estudo do perfil de atividade da Ca ⁺² – ATPase vacuolar, Pmc1 p.....	50
3.10.2	Identificação das frações contendo membrana subcelular de vacúolo.....	51
3.10.3	Ensaio da atividade Ca ²⁺ - ATPásica.....	52
3.11	Análise estatística.....	52
3.12	Níveis de cálcio celular total.....	53
3.12.1	Medida do cálcio celular total.....	53
3.12.2	Determinação do cálcio celular total.....	53
3.13	Monitoramento <i>in vivo</i> da concentração de cálcio citosólico livre.....	54
3.13.1	Monitoramento <i>in vivo</i> da concentração de cálcio citosólico livre na presença de EGTA.....	55
3.13.2	Monitoramento <i>in vivo</i> da concentração de cálcio citosólico livre na presença de 2-APB.....	55

	RESULTADOS	57
4	Resultados	58
4.1	Envolvimento da captação do cálcio extracelular no processo de ativação, induzido por glicose, da H ⁺ - ATPase de membrana citoplasmática.....	58
4.2	Relação entre a sinalização intracelular de íons cálcio e a ativação, induzida por glicose, da H ⁺ - ATPase.....	65
4.2.1	Sinalização do fosfatidilinositol em leveduras e a indução, desencadeada pela presença de glicose, da H ⁺ - ATPase de membrana citoplasmática.....	65
4.2.2	Envolvimento do canal TRP de membrana vacuolar, Yvc1p, na ativação induzida por açúcar da H ⁺ - ATPase de membrana citoplasmática.....	69
4.2.3	O cálcio vacuolar e a ativação induzida por glicose, da H ⁺ - ATPase de membrana citoplasmática: sequestro X liberação.....	79
4.3	Papel do sensor Snf3p na homeostase de cálcio e na ativação, induzida por glicose, da H ⁺ - ATPase.....	82
4.4	Controle das duas vias distintas que promovem a ativação, induzida por glicose da H ⁺ - ATPase.....	85
4.5	Participação de eventos envolvidos na regulação do cálcio intracelular, no mecanismo de ativação da H ⁺ - ATPase.....	93
4.6	Envolvimento da proteína quinase C, Pkc1p, na ativação, induzida por glicose, da H ⁺ - ATPase de membrana citoplasmática.....	99
	DISCUSSÃO	102
5	Discussão	103
	CONCLUSÃO	116
6	Conclusão	117

	PERSPECTIVAS.....	119
7	Perspectivas.....	120
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
8	Referências Bibliográficas.....	122

LISTA DE ABREVIações

AEQ1	Gene que codifica para a apoaequorina de <i>Phyllorhiza punctata</i>
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ANSA	1-Amino- 2- hidroxí- 4 - ácido naftaleno sulfônico
Apa1p	Proteína envolvida na regulação gênica da H ⁺ - ATPase
2- APB	2- aminoethoxy diphenyl borate
AP^r	Presença de gene que codifica para resistência a ampicilina
Arg	Arginina
ARG82	Gene que codifica para a IP ₃ quinase ou inositol fosfato multiquinase (Ipmkp)
Arg82p	Proteína IP ₃ quinase ou inositol fosfato multiquinase (Ipmkp)
ATP	Adenosina 5´ Trifosfato
Bck1p	Proteína quinase quinase quinase envolvida na síntese da parede celular
CCH1	Gene que codifica para uma proteína envolvida no influxo de cálcio durante o processo de conjugação
Cdk1p	Fator de transcrição repressor envolvido na inibição do crescimento celular durante a reprodução
C-terminal	Carboxi terminal
DAG	Diacilglicerol
EGTA	“Ethylene Glycol-bis (β-Aminoethyl Ether)-N'-N'-N'-N'Tetracetic Acid”
Fig1p	Proteína politópica de membrana componente do sistema de captação de cálcio de baixa afinidade
FIG1	Gene que codifica para a proteína politópica de membrana componente do sistema de captação de cálcio de baixa afinidade
FKS2	Gene que codifica para uma proteína do complexo glucano sintase
FGM	“Fermentable-growth-medium-induced pathway”, via induzida por crescimento fermentativo.

GAL	Sistema para metabolização da galactose
Glc7p	Proteína fosfatase mediadora da repressão de <i>SNF1</i>
Glk1p	Glicoquinase 1
Glu	Glutamato
Gpa2p	Proteína G de membrana
GPCR	“G-protein-coupled receptors”, receptor acoplado a proteína G
Gpr1p	Receptor de membrana acoplado a proteína G
GTP	Guanosina 5´ Trifosfato
Hxk1p	Proteína Hexoquinase 1
Hxk2p	Proteína Hexoquinase 2
Hxts	Proteínas transportadoras de hexose
HXT1-7	Genes que codificam para transportadores funcionais de hexose
IPs	Inositóis polifosfato
IP₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
IP₄	Inositol-1,4,5,6-trifosfato
IP₅	Inositol-1,3,4,5,6-trifosfato
Kb	Quilobases
kDa	Quilodáltons
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LEU	Gene que codifica para o aminoácido leucina
MAP quinases	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKK	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno
MAPKKK	Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno
MID1	Gene que codifica para uma proteína componente do sistema de influxo de cálcio, de alta afinidade
Mid1p	Proteína componente do sistema de influxo de cálcio, de alta afinidade
Mig1p	Proteína repressora estimulada por glicose
Mkk1 / Mkk2p	Proteínas quinase quinase envolvidas na síntese da parede celular
Mpk1p	Proteína quinase envolvida na síntese da parede celular
ORI	Origem de replicação

PB	Pares de bases
PDR5	Gene que codifica para uma proteína ABC (ATP-binding cassette ou cassete de ligação do ATP), da família PDR (pleiotropic drug resistance ou resistência pleiotrópica a drogas) em leveduras
Pdr5p	Proteína ABC (ATP-binding cassette ou cassete de ligação do ATP), da família PDR (pleiotropic drug resistance ou resistência pleiotrópica a drogas) em leveduras
Pgm2p	Proteína fosfoglucomutase 2
PIP₂	Fosfatidilinositol- 4, 5 – bifosfato
Pkap	Proteína quinase dependente de AMPc
Pkc1p	Proteína quinase dependente de cálcio
PKC1	Gene que codifica para a proteína quinase dependente de cálcio
PLC1	Gene que codifica para a fosfolipase C 1
Plc1p	Fosfolipase C 1
PMA1	Gene que codifica para H ⁺ ATPase de membrana citoplasmática
PMA2	Gene que codifica uma isoforma da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática
PMCA_s	Ca ²⁺ - ATPases de membrana plasmática
PMC1	Gene que codifica para a Ca ²⁺ - ATPase de membrana vacuolar em leveduras
Pmc1p	Ca ²⁺ - ATPase de membrana vacuolar de leveduras
Pmr1p	Ca ²⁺ /Mn ²⁺ - ATPase presente na membrana do complexo de golgi de leveduras
Ras 1 e 2	Proteínas ativadoras da enzima adenilato ciclase
Rgt2p	Proteína que atua como sensor de baixa afinidade para glicose e gera um sinal para indução da expressão do(s) gene(s) <i>HXT</i>
RGT2	Gene que codifica para o sensor de glicose Rgt2p
Rho1p	Proteína pertencente a família das GTPases
Rlm1p	Regulador gênico para síntese da parede celular
Sch9p	Proteína quinase envolvida na via FGM
Ser	Serina
Smal	Enzima de restrição recombinante de <i>Serratia marcescens</i>
Snf1p	Proteína quinase envolvida na via principal de repressão por glicose

Snf3p	Proteína que atua como sensor de alta afinidade para glicose e gera um sinal para indução da expressão do(s) gene(s) HXT
SNF3	Gene que codifica para o sensor de glicose Snf3p
SUC2	Gene que codifica para a enzima invertase
TCA	Ácido tricloroacético
TECC	<i>Transient Elevation of Calcium Cytosolic</i>
Thr	Treonina
TM	Temperatura ótima de anelamento
TRP	<i>Transient Receptor Potencial</i>
TRP1	Gene que codifica para o aminoácido triptofano
Tuf/Rap1/Grf1	Fator de transcrição do gene <i>PMA1</i>
UAS1/UAS2	Região promotora do gene <i>PMA1</i>
URA3	Gene que codifica para o nucleotideo uracila
V_{max}	Velocidade máxima
VCX1	Gene que codifica para o permutador H ⁺ / Ca ²⁺ , de membrana vacuolar de leveduras
Vcx1p	Canal permutador vacuolar H ⁺ /Ca ²⁺
Yvc1p	Canal liberador de cálcio vacuolar membro da família dos canais do tipo TRP

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito da adição de açúcares (glicose ou galactose 100 mM) sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (BY4741) e seus mutantes <i>mid1Δ</i> , <i>fig1Δ</i> e <i>pdr5Δ</i> .	60
Tabela 2	Efeito da adição de glicose 100 mM, sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de <i>S. cerevisiae</i> (BY4741) e seus duplo mutantes <i>fig1Δmid1Δ</i> e <i>pdr5Δmid1Δ</i> .	63
Tabela 3	Efeito da adição de glicose 100 mM, sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de <i>S. cerevisiae</i> (PJ69-2a) e seus mutantes <i>arg82Δ</i> , <i>plc1Δ</i> e <i>arg82Δplc1Δ</i> .	67
Tabela 4	Efeito da adição de açúcares (glicose ou galactose 100 mM) sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PJ69-2a) e o mutante <i>yvc1Δ</i> .	71
Tabela 5	Efeito da adição de glicose 100 mM, sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de <i>S. cerevisiae</i> (PJ69-2a) e seus mutantes <i>arg82Δ</i> , <i>yvc1Δ</i> e <i>arg82Δyvc1Δ</i> .	73
Tabela 6	Efeito da adição de açúcares (glicose ou galactose 100 mM) sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de <i>S. cerevisiae</i> (BY4741) e seus mutantes <i>pmc1Δ</i> , <i>snf3Δ</i> e <i>snf3Δpmc1Δ</i> .	84
Tabela 7	Efeito da adição de glicose 100 mM, sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de <i>S. cerevisiae</i> (BY4741), seus mutantes <i>pmc1Δ</i> e <i>gpa2Δ</i> e o duplo mutante <i>pmc1Δgpa2Δ</i> .	86
Tabela 8	Efeito da privação de cálcio extracelular sobre a extrusão de prótons, induzida por glicose (100 mM), em uma cepa selvagem de <i>S. cerevisiae</i> (BY4741) e seus mutantes <i>snf3Δ</i> , <i>plc1Δ</i> , <i>pmc1Δ</i> e <i>snf3Δplc1Δ</i> , pré-incubados com EGTA (12 mM).	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de sinalização PKC MAP quinase.	7
Figura 2	Modelo das duas vias responsáveis pelo controle da glicose sobre os alvos de Pkap	12
Figura 3	Vias de transporte de cálcio em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
Figura 4	Modelo topológico da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática de fungos	21
Figura 5	Modelo de fosforilação da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática, induzida por glicose	24
Figura 6	Mecanismo hipotético de ativação induzida por glicose da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , via Proteína quinase dependente de AMPc (Pkap).	26
Figura 7	Mecanismo hipotético de ativação induzida por glicose da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , via Proteína quinase dependente de cálcio (Pkc1p).	27
Figura 8	Modelo hipotético da ativação, induzida por carboidratos, da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática mediada por íons cálcio.	30
Figura 9	Mapa do vetor de expressão pYES2/CT	43

- Figura 10** Representação esquemática do plasmídio pUC18/gpa2/LEU. Estão representadas na figura as posições dos sítios de restrição para a enzima *Sma*I, que foram utilizados para a obtenção do fragmento de 3.059 pares de base *GPA2::LEU*. A figura mostra também o sítio de replicação em bactéria (ORI) e o gene *AP^r* que confere resistência a ampicilina. 45
- Figura 11** Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *Saccharomyces cerevisiae*: selvagem BY4741; *mid1Δ*; *fig1Δ* e *pdr5Δ*. Células expressando apoaquorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos. 61
- Figura 12** Atividade enzimática (em %) da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática (Painel A) e sinal de cálcio (Painel B) em células de *S. cerevisiae* crescidas em glicose: cepas, selvagem BY4741 e mutantes *fig1Δmid1Δ* e *pdr5Δmid1Δ*, antes (tempo zero) e após a indução com 100 mM de glicose. 64
- Figura 13** Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *S. cerevisiae*: selvagem PJ69-2a; *arg82Δ*, *plc1Δ* e *arg82Δplc1Δ*. Células expressando apoaquorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos. 68
- Figura 14** Atividade enzimática (em %) da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática (Painel A) e sinal de cálcio (Painel B) em células de *S. cerevisiae* crescidas em glicose: cepas selvagem PJ69-2a (●) e mutante *yvc1Δ* (■), antes (tempo zero) e após a indução com 100 mM de glicose. 72

- Figura 15** Atividade enzimática (em %) da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática (Painel A) e sinal de cálcio (Painel B) em células de *S. cerevisiae* crescidas em glicose: cepas selvagem PJ69-2a e mutante *yvc1Δ*, antes (tempo zero) e após a indução com 100 mM de glicose. 74
- Figura 16** Acidificação extracelular induzida por glicose (100 mM) nas cepas *S. cerevisiae*: selvagem PJ69-2a e mutantes *arg82Δ* e *arg82Δyvc1Δ*. Colunas não preenchidas correspondem à taxa de bombeamento de prótons na ausência de 2-APB 50 μM e as colunas preenchidas representam a taxa de bombeamento com pulso de 2-APB (50 μM) antes da indução com glicose 100 Mm. 77
- Figura 17** Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *Saccharomyces cerevisiae*: selvagem PJ69-2a e mutantes *arg82Δ* e *arg82Δyvc1Δ*; na ausência (símbolos não preenchidos) e na presença (símbolos preenchidos) de 2-APB 50 μM. Células expressando apoaequorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos. 78
- Figura 18** Medida da ativação, induzida por glicose (100 mM), da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática em células de *S. cerevisiae* crescidas em glicose. As cepas foram: selvagem BY4741 e mutantes *pmc1Δ*, *yvc1Δ* e *pmc1Δyvc1Δ*. Painel A – Medida da taxa de bombeamento de prótons. Painel B – Medida da atividade enzimática específica, em % de ativação. 80
- Figura 19** Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *Saccharomyces cerevisiae*: selvagem BY4741 e mutantes *pmc1Δ*, *yvc1Δ*, e *pmc1Δyvc1Δ*. Células expressando apoaequorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos. 81

- Figura 20** Medida da ativação, induzida por glicose (100 mM), da H⁺-ATPase de membrana em células de *S. cerevisiae* crescidas em glicose. Painel A – Medida da taxa de bombeamento de prótons das cepas: selvagem BY4741, mutantes *snf3Δ* e *plc1Δ*; e o duplo mutante *snf3Δplc1Δ*. Painel B – Medida da atividade enzimática específica, em % de ativação. O ATP foi utilizado a uma concentração final de 2 mM e as cepas foram: selvagem BY4741 e o duplo mutante *snf3Δplc1Δ*. 88
- Figura 21** Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *Saccharomyces cerevisiae*: selvagem BY4741 e mutante *pmc1Δ*; na ausência (símbolos não preenchidos) e na presença (símbolos preenchidos) de EGTA 12 mM. Células expressando apoaequorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos. 92
- Figura 22** Concentrações de cálcio celular total em cepas *S. cerevisiae* (background BY4741) crescidas em meio YP glicose (colunas azuis) ou YP galactose (colunas vermelhas). As cepas foram crescidas até a densidade de ± 1 DO_{600nm}/mL. Dez unidades DO_{600nm}, foram coletadas por centrifugação e lavadas com YP fresco. O Ca⁺² total foi então medido por espectrofotometria de absorção atômica. 95
- Figura 23** Medida da atividade enzimática específica da Ca⁺²-ATPase, Pmc1p, em cepas *S. cerevisiae* (background BY4741) crescidas em meio YP glicose e induzidas com glicose 100 mM (colunas azuis) ou YP galactose e induzidas com galactose 100 mM (colunas vermelhas). As cepas foram crescidas em 500 mL de meio rico até atingirem DO_{600nm} = 1.0. O ATP foi utilizado a uma concentração final de 2 mM e a atividade expressa em nmoles de Pi. min⁻¹. mg de proteína⁻¹. 98

- Figura 24** Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *S. cerevisiae*: selvagem W303 (painel A) e mutantes *pkc1Δ* (painel B) e *bck1Δ* (painel C). Símbolos preenchidos representam as respostas após a adição de glicose e símbolos não preenchidos representam a resposta basal das células. Células expressando apoaquorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 6 minutos. 101
- Figura 25** Modelo hipotético da ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática mediada por íons cálcio, via Yvc1p e regulação do sequestro mediado por Pmc1p, dos íons Ca²⁺. 118

1 – Introdução

Todos os organismos vivos encontram-se constantemente expostos as inúmeras modificações ambientais e as oscilações dos componentes que constituem o meio no qual habitam. Dentro deste contexto, o papel da membrana citoplasmática faz-se essencial para que ocorra uma comunicação eficiente entre a célula e o meio externo. As proteínas transmembranares (inseridas na bicamada lipídica), são responsáveis, na maioria dos casos, pela percepção dos sinais e estímulos, provindos do exterior e pela subsequente transmissão de um sinal intracelular gerador de respostas fisiológicas. Devido ao papel dos nutrientes como moléculas sinalizadoras, acredita-se que estes recursos são as vias primárias de sinalização, e que posteriormente, essas vias foram duplicadas e/ou modificadas para servirem a propósitos mais sofisticados. Dentre os nutrientes, a glicose, possui um papel muito importante e seu efeito sobre mensageiros secundários intracelulares, como o cálcio, ativa uma variedade de vias essenciais para a sobrevivência da célula.

A H^+ -ATPase de membrana citoplasmática de levedura, é uma proteína transmembranar e sua atividade é indispensável para a viabilidade da célula. Esta enzima constitui um importante alvo final de vias de sinalização desencadeadas pela adição de glicose ao meio extracelular, no entanto, embora novas evidências quanto à participação do cálcio e de proteínas específicas tenham sido descritas, o mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não foi totalmente elucidado.

1.1 – Sinalização celular

A sinalização celular faz parte de um complexo sistema de comunicação que governa e coordena as atividades e funções celulares, por isso, ela requer além dos sinalizadores extracelulares, um conjunto complementar de proteínas receptoras que permita a cada célula, responder de uma forma característica ao estímulo. Sendo assim, a habilidade que as células possuem em perceber e responder seletivamente ao seu ambiente é determinante para a comunicação e o comportamento celular assim como, para o controle geral da mesma (nutrição, reprodução e apoptose). Tendo em vista que este ramo da ciência é amplamente estudado, uma vez que todos os fenômenos biológicos ou envolvem uma sinalização ou são afetados por ela, a

investigação do funcionamento de sistemas biológicos ajuda a compreender a estrutura subjacente das redes de sinalização e a perceber como as mudanças nessas redes afetam a transmissão de informação (Cooper, G. M. & Hausman, R. E., 2000 e Lodish, H. e cols., 2007).

Para responder efetivamente a um sinal, a célula precisa ser estimulada por uma molécula sinalizadora que se liga e ativa um receptor protéico, este por sua vez, age como transdutor. Os receptores celulares propagam os sinais através de rotas de sinalização intracelulares buscando transformar, amplificar e distribuir o sinal à maquinaria celular de resposta.

Os receptores celulares propagam os sinais através de rotas de sinalização intracelulares buscando transformar, amplificar e distribuir o sinal à maquinaria celular de resposta. É importante salientar que um mesmo estímulo pode gerar mais de uma resposta e ainda, que a combinação de múltiplos sinais pode convergir para um único evento celular.

Os principais processos de propagação do sinal são aqueles que desencadeiam cascatas de fosforilações protéicas altamente reguladas que resultam na ativação e/ou inativação de enzimas, bem como na modulação de fatores transcricionais que alteram a expressão gênica da célula e, conseqüentemente, seu comportamento (Alberts, B. e cols., 1999).

Células de leveduras e de mamíferos possuem vias de sinalização muito similares sendo que a maior diferença deve-se ao fato de que estas vias são utilizadas com propósitos distintos, isto é, o sinal primário e o alvo(s) são diferentes (Thevelein, J. M., 1994). No entanto, existem muitas vias de sinalização típicas que foram altamente conservadas e, portanto, são encontradas em todas as células eucarióticas.

1.1.1 – Sinalização celular em leveduras

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, constitui-se de um fungo unicelular de largo interesse industrial devido a suas várias aplicações biotecnológicas na atualidade. Esse microorganismo tem sido muito utilizado nas pesquisas fundamentais (metabolismo de drogas, biologia celular e molecular, bioquímica e genética), na tecnologia ambiental e nas indústrias de fermentação produtoras de vinhos, cerveja, aguardente, pão e bioetanol (Walker, G. M., 1998). Em 1997 a levedura *S. cerevisiae*,

tornou-se o primeiro organismo eucarioto com o genoma completamente sequenciado, constituído de pouco mais de seis mil genes (Goffeau, A. e cols., 1997), sendo que em 30% deles as proteínas codificadas já foram caracterizadas experimentalmente e outros 35% dos mesmos correspondem a genes que codificam para proteínas relacionadas estruturalmente com produtos gênicos já caracterizados em outros fungos ou organismos (Oliver, S. G., 1996).

Dentro deste contexto as leveduras passaram a ser utilizadas como um modelo experimental ainda mais interessante, pois com um sistema genético bem definido, há uma significativa facilidade de transformação, replicação e isolamento de seus mutantes (Dujon, B., 1996 e Goffeau, A. e cols., 1996), tudo isso possibilita ainda a complementação de suas células com genes heterólogos com o intuito de entender as funções biológicas de produtos gênicos de outros organismos eucariotos (Ton, V. & Rao, R., 2004).

Em organismos multicelulares os mensageiros extracelulares ativam vias de sinalização para proliferação, desenvolvimento ou mudança do metabolismo das células alvo; já em leveduras, estes mesmos fatores são quase sempre afetados pelos principais agentes sinalizadores, os nutrientes (Thevelein, J. M., 1994). O fato de ser capaz de responder as oscilações na disponibilidade de tais sinalizadores, modulando seu metabolismo e seu crescimento, faz com que este microrganismo seja bem adaptado às mais diversas mudanças nas condições ambientais (Newcomb, L. L. e cols., 2003 e Holsbeeks, I. e cols., 2004). Contudo, as células de leveduras são também capazes de responder a oscilações de temperatura, à variação de osmolaridade, à presença de agentes oxidantes ou à ação de hormônios (Hohmann, S. & Mager, W. H., 1997).

As células de *S. cerevisiae* respondem a muitos sinais externos por vias de sinalização através de cascatas de MAP quinases (proteínas quinases ativadas por mitógenos). Estas proteínas atuam na conexão da membrana plasmática aos eventos citoplasmáticos e nucleares (Marshall, C. J., 1994). Três proteínas quinases que são conservadas em todos os eucariotos participam destas cascatas: a MAP quinase (MAPK), a MAP quinase quinase (MAPKK) e a MAP quinase quinase quinase (MAPKKK). Já foram descritas em leveduras cinco vias de sinalização muito importantes que utilizam cascatas de MAP quinases (Banuett, F., 1998). Estas vias são controladas por uma quinase anterior que, por fosforilação, ativa a MAPKKK que

por sua vez fosforila a MAPKK e esta também por fosforilação, ativa a MAPK, responsável pela a ativação do alvo final da via.

Como exemplos de vias já bem compreendidas que utilizam uma cascata de fosforilações têm-se: a via pela qual as células de *S. cerevisiae* respondem à presença de feromônios sexuais e ativam o processo de conjugação (Hofer, M. 1997 e Banuett, F., 1998) e as cascatas de MAP quinases utilizadas para responder a variações de osmolaridade.

Para responder às modificações osmóticas do meio, referentes a estresse hipotônico ou choque hipo-osmótico, as células apresentam uma via de MAP quinase que está envolvida no controle da composição da parede celular e tem a participação da proteína quinase C (Levin, D. E. e cols., 1994 e Davenport, K. e cols., 1994).

A via de sinalização PKC MAP quinase é ativada quando a proteína Rho1p (pertencente à família das GTPases) ao ser estimulada por altas concentrações de cálcio, limitação de nutrientes, altas temperaturas e/ou baixa osmolaridade gera a ativação de Pkc1p (Nonaka, H. e cols., 1995). A proteína quinase C promove, por fosforilação, a ativação em cascata dos demais componentes da via (Bck1p, Mkk1p/Mkk2p, Mpk1p; respectivamente, MAPKKK; MAPKKs; MAPK), desencadeando a ativação de fatores de transcrição repressores, como Cdk1p (envolvido no processo de inibição do crescimento celular durante a reprodução) e/ou indutores, como Rlm1p (reguladora da expressão de genes envolvidos na síntese dos componentes da parede celular) (Banuett, F., 1998).

O gene *FKS2* constitui um dos principais alvos desta via (com indução de Rlm1p) e codifica para uma proteína do complexo glucano sintase, envolvida na síntese da parede celular. Deleções em quaisquer genes que codificam para os componentes desta via causam lise celular na ausência de estabilizadores osmóticos no meio de crescimento; contudo, a deleção do gene *PKC1* é mais severa que dos demais genes componentes da via. Este fenótipo sugere o envolvimento desta proteína em outras vias de sinalização (Levin, D. E. e cols., 1994) (Figura 1).

Outros possíveis alvos da proteína quinase C não foram claramente identificados, mas alguns trabalhos sugerem a participação desta enzima em vias de sinalização sensíveis à glicose (Souza, M. A. A. e cols., 2001; Brandão, R. L. e cols., 2002 e Salgado, A. P. e cols., 2002).

Em *S. cerevisiae* foram descritos também vários intermediários e homólogos presentes na via que controla a atividade da Pkc1p em mamíferos, tais como: o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) (Lester, R. L. & Steiner, M. R., 1968 e Patton, J. L. & Lester, R. L., 1992) e a fosfolipase C (Flick, J. S. & Thomer, J. 1993; Payne, W. E. & Fitzgerald-Hayes, M., 1993 e Yoko-o, T. e cols., 1993). Foram descritas ainda, a calmodulina (Hubbard, M. e cols.,1982) e a proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina (Londesborough, J., 1989 e Ohya, Y. e cols.,1991).

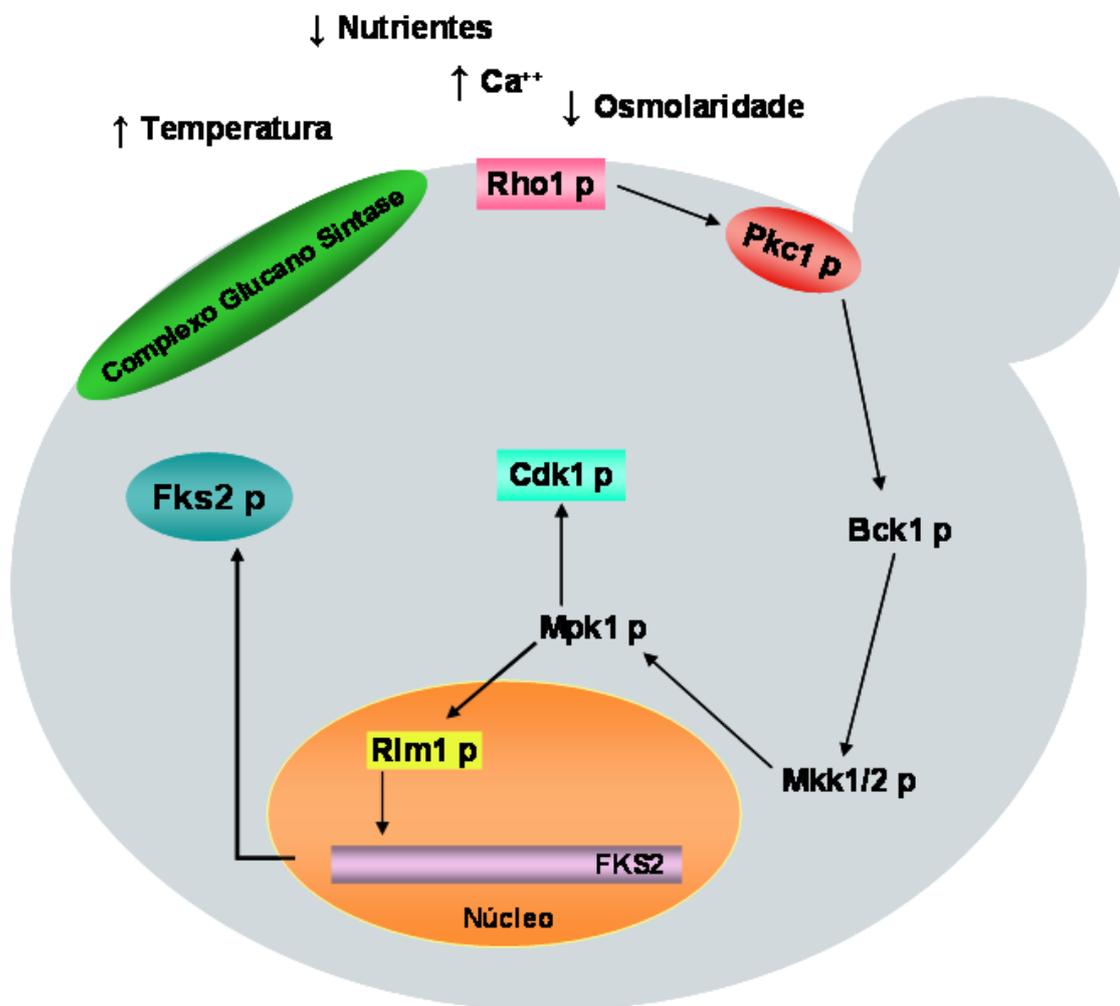


Figura 1: Via de sinalização PKC MAP quinase.

A via de PKC é ativada quando a proteína Rho1p é estimulada por altas temperaturas, altas concentrações de cálcio, limitação de nutrientes e/ou baixa osmolaridade e ativa a Pkc1p que através de fosforilações em cascata promove a ativação dos demais componentes da via, Bck1p (MAPKKK), Mkk1p/Mkk2p (MAPKK) e Mpk1p (MAPK) resultando na ativação de alguns fatores de transcrição indutores e/ou repressores. Temos como exemplo a regulação da transcrição do gene *FKS2* que codifica para uma proteína do complexo glucano sintase. A Pkc1p pode atuar também em outras vias de sinalização.

Fonte: Banuett, F., 1998.

1.1.1.1 – Papel da glicose na sinalização em leveduras

Em células de leveduras os nutrientes têm função de fonte de energia e/ou de substrato. Além de exercer alguma função regulatória, a sua disponibilidade no meio é o principal regulador do crescimento e desenvolvimento das células. Em muitos microorganismos a glicose é sem dúvida um dos mais importantes mensageiros primários, pois constitui a fonte de carbono e energia preferida e seu efeito sobre estas células se assemelha à ação de hormônios em mamíferos. A adição de glicose a células de *Saccharomyces cerevisiae*, previamente cultivadas em fontes de carbono não fermentáveis (glicerol ou etanol, por exemplo) ou a células em fase estacionária, desencadeia inúmeros processos regulatórios com o objetivo de aperfeiçoar a utilização desta fonte de carbono (Thevelein, J. M., 1988; Bisson, e cols., 1993; Thevelein, J. M., 1994 e Rolland, F. e cols., 2002).

Nestas condições muitas enzimas e proteínas são ativadas ou inativadas em um nível pós-transcricional, ao passo que, em nível transcricional, diversos genes são reprimidos ou induzidos. O principal efeito induzido pela adição de glicose parece ser a mudança eficiente do metabolismo respiratório para o metabolismo fermentativo (Holzer, H., 1976; Fiechter, A. e cols., 1981; Thevelein, J. M., 1991; Entian, K. D. & Barnett, J. A., 1992 e Johnston, M., & Carlson, M., 1992). Esta transição ocorre porque a glicólise é ativada, inibindo a gliconeogênese e estimulando a entrada de glicose que será quase que completamente convertida em etanol e dióxido de carbono. A adição de glicose desencadeia a repressão de genes que codificam para enzimas envolvidas na captação e metabolização de fontes alternativas de carbono e na resistência a estresse, e promove uma elevação na taxa de crescimento devido a um aumento na síntese de RNA ribossomal e na síntese protéica (Thevelein, J. M., 1994; Gancedo, J. M., 1998 e Rolland, F. e cols., 2002).

Para que a glicose possa exercer seu papel regulatório é essencial que ela seja internalizada. Este transporte constitui o primeiro passo de uma sequência de eventos sinalizadores que envolverão sensores específicos para a detecção da glicose e uma metabolização parcial do açúcar (fosforilação).

Apesar de a levedura *S. cerevisiae* possuir em seu genoma vinte genes que codificam para proteínas do sistema transportador de hexose, somente sete destes genes (*HXT1- HXT7*) são conhecidos por codificar transportadores funcionais

(Carlson, M., 1998 e Ozcan, S., & Johnston, M., 1999). Reifenberg e cols. (1997) demonstraram que a presença de apenas um desses sete genes é suficiente para permitir o crescimento do microorganismo em glicose. Também compõem este sistema, genes que codificam para proteínas com similaridade parcial com os outros membros da família de transportadores de glicose. Denominados de *SNF3* e *RGT2*, estes genes produzem duas proteínas que não são capazes de transportar a glicose, mas que atuam como sensores da mesma gerando um sinal intracelular para a indução da expressão dos genes *HXT*.

Tanto Snf3 p quanto Rgt2 p possuem longas caudas C-terminal citoplasmáticas que parecem ser responsáveis pela habilidade que estas moléculas têm de traduzir a presença de glicose no meio externo para o interior da célula (Ozcan, S. e cols., 1998 e Trópia, M. J. M. e cols., 2006). Na proteína Snf3 p esta cauda contem 341 aminoácidos e é responsável pela indução da expressão de alguns genes de transportadores de glicose em baixas concentrações do açúcar (sensor de alta afinidade). Já o sensor Rgt2 p apresenta uma cauda C-terminal composta de 218 aminoácidos e é importante para a indução de outros genes *HXT* quando as células se encontram na presença de altas concentrações de glicose (sensor de baixa afinidade) (Ozcan, S. & Johnston, M., 1999 e Kaniak, A. e cols., 2004). As sequências citoplasmáticas destes dois sensores são similares apenas em uma região de 25 aminoácidos, sendo que, o sensor de alta afinidade possui duas dessa sequência peptídica, ao passo que o Rgt2 p possui apenas uma. Acredita-se que este domínio de 25 aminoácidos esteja diretamente envolvido na geração do sinal para a indução da expressão dos transportadores (Carlson, M., 1998 e Ozcan, S. e cols., 1996 e 1998).

Outro fator essencial para ativar a sinalização desencadeada pela glicose é a fosforilação do açúcar. Este evento é catalisado, em leveduras, por três proteínas quinases específicas, Hxk1p, Hxk2p e Glk1p (Hohmann, S. e cols., 1999). Jiang, H. e cols. (2000), sugerem que nas vias afetadas por glicose uma resposta inicial direta seria mediada por qualquer uma das quinases, mas que, no que diz respeito aos efeitos em longo prazo somente a hexoquinase 2 seria requerida, apresentando assim um papel mais efetivo na sinalização, interagindo diretamente com fatores de transcrição que controlam a expressão de genes reprimidos por glicose.

Em nível transcricional, o principal efeito da adição de glicose a células de levedura, ocorre através da ativação da **via principal de repressão por glicose**. Esta

via é responsável por reprimir a respiração durante o crescimento celular em presença de altos níveis desta fonte de carbono (Entian, K. D. & Barnett, J. A.; Gancedo, J. M., 1992; Johnston, M. & Carlson, M., 1992 e Trumbly, R. J., 1992) e requer, além da internalização dessa molécula sinalizadora, sua fosforilação e a subsequente ação de três proteínas regulatórias: Snf1p, Mig1p e Glc7p. Trabalhos realizados em nosso laboratório (Brandão, R. L. e cols., 2002, Salgado, A. P. e cols., 2002 e Gomes, K. N. e cols., 2005) evidenciaram uma conexão entre a proteína quinase C (PKC) e esta via, pois demonstraram a participação desta quinase no controle da localização celular de importantes componentes desta sinalização e seu envolvimento na desrepressão de vários genes após a exaustão de glicose, dentre estes, aqueles que expressam sistemas enzimáticos relacionados ao metabolismo de carboidratos (*SUC2* e sistema *GAL*).

Ainda em nível transcricional, a adição de glicose desencadeia a indução de vários genes envolvidos na fermentação, dentre eles, aqueles que codificam para enzimas glicolíticas, tais como a piruvato quinase, álcool desidrogenase I, piruvato descarboxilase, enolase e a fosfoglicerato quinase (Thevelein, J. M. & Hohman, S. 1995).

No que diz respeito aos efeitos pós-transcricionais mediados pela glicose, a ativação da **via Ras – AMPc**, que controla a síntese do AMPc e a atividade da proteína quinase A (Pka p), encontra-se dentre as mais importantes (Matsumoto, K. e cols., 1984). A Pka p está envolvida na regulação pós-transcricional de uma gama de proteínas (enzimas essenciais da gliconeogênese e da glicólise), no controle da transcrição de vários genes (que codificam para proteínas ribossomais e que estão envolvidos na resposta geral ao estresse) e na rápida transição do metabolismo de respiração para fermentação (Rolland, F. e cols., 2000).

Em condições de adição de glicose às células, a via Ras – AMPc é desencadeada pela detecção do açúcar pelo sistema receptor de membrana GPCR (G-protein coupled receptor), Gpr1p – Gpa2p, internalizada e fosforilada. Esse sinal é transmitido, via proteínas Ras1 e Ras2 e estes eventos convergem para a ativação da proteína G, Gpa2 p, que ativa a enzima adenilato-ciclase a qual hidrolisa ATP em AMPc, e este, por sua vez ativa a proteína quinase A (Rolland, F. e cols., 2000). Este processo leva à ativação de enzimas como a trealase (participa da degradação da trealose), e a 6-fosfofrutoquinase-2; e à inativação da frutose1, 6-bifosfatase (enzima

gliconeogênica) (Thevelein, J. M. & Hohman, S., 1995 e Kraakman, L. e cols., 1999) (Figura 2).

Quando na presença de glicose, outros nutrientes essenciais requeridos para o crescimento, tais como; nitrogênio, fósforo e enxofre; são capazes de desencadear efeitos semelhantes em alvos da Pka p. Esta via de sinalização é denominada **FGM (Fermentable-growth-medium-induced pathway)** já que, para desencadear e sustentar os processos de ativação é necessário tanto a presença da fonte de carbono fermentável quanto de um meio de crescimento completo. Esta via não requer a fosforilação da glicose e tem como alvo primário a subunidade C da proteína quinase dependente de AMPc (Kraakman, L. e cols., 1999 e Rolland, F. e cols., 2002) (Figura 2).

Vários estudos têm demonstrado que a adição de glicose está, também, diretamente ligada a homeostase de cálcio sendo importante para ativar vias que induzem a captação, o sequestro e a liberação deste íon dos seus compartimentos intracelulares (Eilam, Y. & Othman, M., 1990; Eilam, Y. e cols., 1990; Nakajima-Shimada, J. e cols., 1991; Thevelein, J. M. & Hohman, S., 1995; Fu, L. e cols., 2000; Trópia, M. J. M. e cols., 2006 e Pereira, M. B. e cols., 2008).

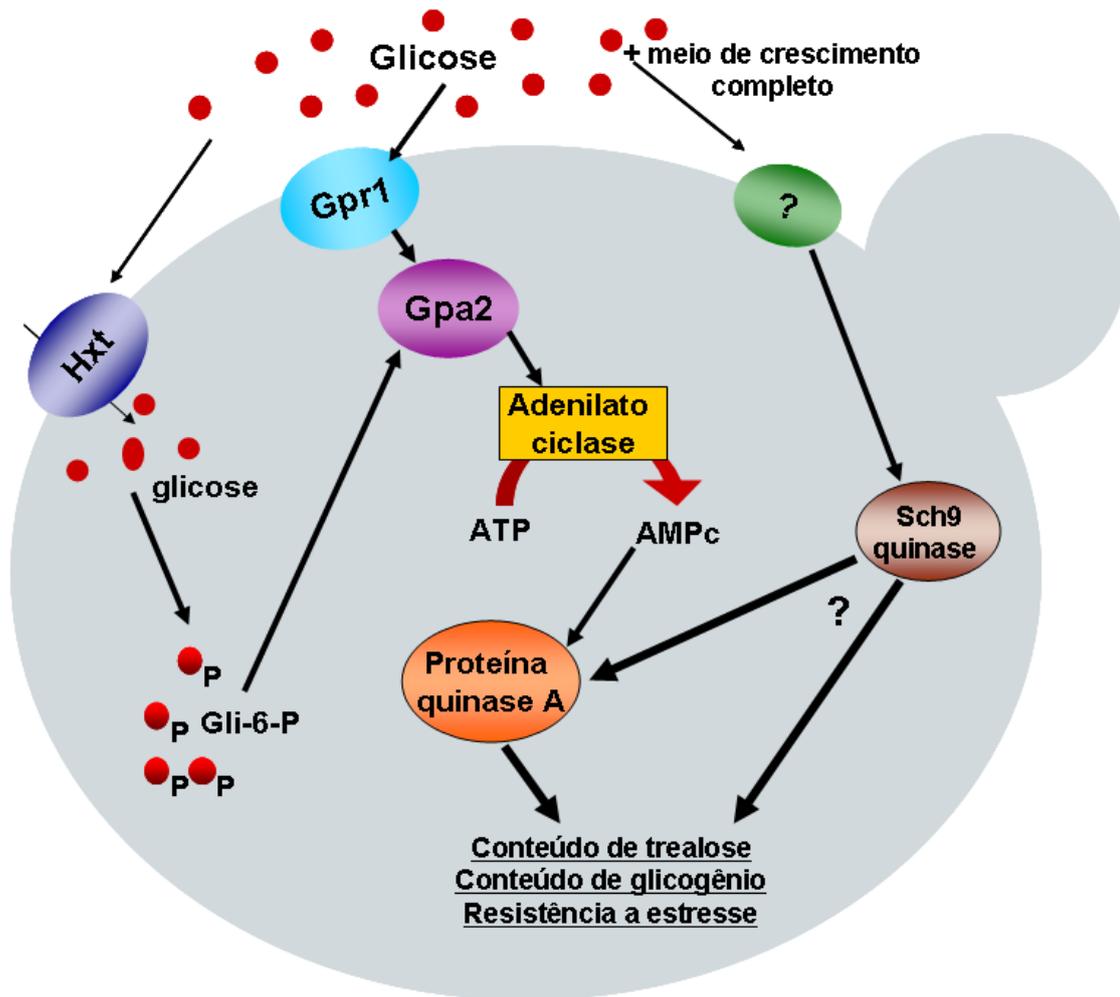


Figura 2: Modelo das duas vias responsáveis pelo controle da glicose sobre os alvos de Pkap.

O sistema GPCR Gpr1-Gpa2 ativa a síntese de AMPc em resposta à adição de glicose, e este efeito é transitório. O aumento do AMPc estimula a rápida adaptação à presença de glicose no meio de crescimento. A 2ª via não envolve o sistema GPCR, mas sim outro sistema sensível à glicose ainda desconhecido. Esta via chamada FGM, requer a proteína quinase Sch9p e é responsável por sustentar a ativação dos alvos de Pkap durante o crescimento em glicose. A adição de glicose requer nitrogênio, fósforo e todos os outros nutrientes essenciais para o crescimento. O mecanismo sensor para os outros nutrientes e a exata conexão entre a quinase Sch9p e a Pkap não foram ainda elucidados.

Fonte: Kraakman, L. e cols., 1999.

1.1.1.2- Metabolismo de cálcio

1.1.1.2.1- Transportadores e os compartimentos intracelulares

Todas as células eucariotas utilizam as vias de sinalização de cálcio em uma enorme variedade de funções incluindo expressão gênica, excitação, rearranjo do citoesqueleto e fisiologia celular, assim, íons cálcio são importantes mensageiros secundários na resposta aos sinais biológicos (Iida, H. e cols., 1990b).

A concentração de cálcio citosólico livre constitui um elemento regulatório primordial nestas células (Rasmussen, H., 1986), sendo que o funcionamento das vias de sinalização relacionadas a esse nutriente dependem da manutenção desta concentração basal extremamente baixa (50-200 nM), já que são fortemente sensíveis a uma rápida e transitória elevação dos níveis intracelulares deste íon (Carafoli, E., 1987).

Sempre após a indução da elevação dos níveis de cálcio sua concentração basal é restabelecida pelo sequestro destes íons para organelas capazes de estocar o excesso. Essa distribuição assimétrica evita a agregação de cálcio no citoplasma com moléculas fosfatadas e fornece cálcio a várias organelas para suas funções particulares (Cunningham, K. M. & Fink, G. R., 1994).

Sendo a homeostase do cálcio um processo complexo e altamente regulado têm-se no funcionamento e controle individual de cada um dos seus diversos transportadores, alvos chave para uma maior compreensão desta sinalização.

Em células eucariotas, os sinais de cálcio são comumente iniciados pela indução da abertura dos canais de cálcio presentes na membrana, os quais permitem um rápido influxo destes íons. Em 1994, Iida, H. e cols., identificaram um novo gene denominado *MID1*, o qual codifica para uma proteína glicosilada, de membrana plasmática. Foi demonstrado que este gene é requerido para o influxo de cálcio e para a reprodução sexuada da levedura. Fischer, M., e cols., (1997), demonstraram que o gene *CCH1* de *S. cerevisiae* apresentava homologia com genes da subunidade $\alpha 1$ de canais de cálcio em células animais e ainda, que a proteína codificada por este gene estava envolvida no influxo de cálcio durante o processo de conjugação e interagiu fortemente com o produto do gene *MID1* no controle da captação dos íons Ca^{2+} . Mais tarde, Locke, E. G. e cols., (2000), procurando desenvolver um modelo para os

mecanismos de comunicação entre os canais de cálcio de membrana plasmática e os compartimentos intracelulares, demonstraram que ambas, Cch1p e Mid1p, eram componentes necessários para o sistema de captação de Ca^{2+} de alta afinidade e que estas proteínas atuam juntas como subunidades catalítica e regulatória/acessório de um mesmo canal de cálcio heteromérico, homólogo ao canal de cálcio dependente de voltagem em células de mamíferos.

Um sistema de influxo de cálcio de baixa afinidade também foi descrito neste mesmo trabalho, sendo que em 2001, Muller e cols., estudando a regulação da via de resposta à feromônios, observaram que nesta sinalização, quando o sistema de alta afinidade era inibido pela fosfatase dependente de cálcio/calmodulina, a calcineurina, o sistema de baixa afinidade era fortemente estimulado. Em 2003 então, também Muller e cols., demonstraram que a proteína politópica de membrana, Fig1p, era requerida para a atividade deste mecanismo de captação de Ca^{2+} , facilitando o influxo do íon e a fusão celular durante a conjugação.

Ainda com relação ao transporte de cálcio através da membrana plasmática fortes evidências apresentadas em 2005 (Tutulan-Cunita, A. C. e cols.) sugeriram a atuação de uma ATPase denominada Pdr5p. Esta é uma proteína ABC (ATP-binding cassette ou cassete de ligação do ATP), da família PDR (pleiotropic drug resistance ou resistência pleiotrópica a drogas) em *S. cerevisiae* (Bauer e cols., 1999). O transportador Pdr5p é um elemento central na resistência a antifúngicos, pois é o mais abundante dos transportadores ABC em levedura e é responsável pela extrusão de centenas de compostos através da membrana (Egner e cols., 1998).

Foi sugerido que a ação de Pdr5p sob fosfolipídios na membrana pode modular sua permeabilidade e então agir indiretamente sob o transporte do cálcio extracelular. Diante disso Tutulan-Cunita, A. C. e cols. (2005), constataram que na ausência de Pdr5p a captação de cálcio era significativamente reduzida e propuseram então que o papel desta proteína na homeostase do cálcio seria possivelmente pela regulação de outros componentes de membrana que controlariam a captação de Ca^{2+} e sua sinalização.

Como a maior parte do cálcio contido na célula encontra-se estocado em seus compartimentos específicos, os transportadores presentes nas membranas dessas organelas de estoque apresentam papéis extremamente importantes nos mecanismos de homeostase e sinalização do cálcio em leveduras.

A bomba Pmr1p está localizada na membrana do Complexo de Golgi e têm como função sequestrar o excesso de cálcio no citoplasma e de íons manganês para dentro desta organela (Rudolph, H. K. e cols., 1989). Esta proteína foi o primeiro membro das Ca^{2+} - ATPases da via secretória a ser identificado em eucariotos (Tanida, I. e cols., 1995 e Misseta e cols., 1999). Diante do fato de que o cálcio possui diversos papéis em *S. cerevisiae*, este compartimento requer altas concentrações deste íon para a atividade das enzimas que catalisam o dobramento, modificações, processamento e tráfego de proteínas (Locke, E. G. e cols., 2000 e Michalak, M. e cols., 2002).

A concentração de cálcio total na célula (2-3 mM) chega a níveis 10.000 vezes maiores que a sua concentração citosólica (50-100 nM), estima-se que 95% deste total encontre-se no lúmen do vacúolo e isto faz desta organela o principal compartimento para o estoque desse íon (Halachmi, D. & Eilam, Y., 1989 e Dun e cols., 1994). Para exercer este importante papel na manutenção da homeostase do cálcio, o vacúolo apresenta em sua membrana duas proteínas responsáveis pela mediação do sequestro deste nutriente. São elas, o canal antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$, Vcx1p e a Ca^{2+} -ATPase vacuolar, Pmc1p (Pozos e cols., 1996). Ambos os genes que codificam para estas proteínas, *PMC1* e *VCX1*, são regulados pelos níveis de cálcio citosólico, através da via de sinalização calmodulina-calcineurina, sendo Vcx1p inibido por este mecanismo ao passo que a atividade de Pmc1p é intensificada pelo mesmo (Cunningham, K. M. & Fink, G. R., 1994 e 1996). Em 1999, Miseta, A. e cols., comprovaram a importância do canal na remoção de cálcio para o vacúolo nas respostas em curto prazo e seu papel como um transportador de alta capacidade e baixa afinidade.

A bomba de cálcio Pmc1p apresenta 40% de identidade com as Ca^{2+} -ATPases de membrana plasmática (PMCA) de células de mamíferos (Cunningham, K. M. & Fink, G. R., 1994b) e se classifica como um transportador de alta afinidade requerido principalmente nas respostas em longo prazo (Cunningham, K. M. & Fink, G. R., 1994, 1996 e Pozos e cols., 1996).

Já que o vacúolo é o principal compartimento de estoque de cálcio em leveduras, os mecanismos e componentes das vias de liberação deste cálcio quando requerida, têm sido alvos de muitos estudos. Porém, muito pouco se sabe ainda sobre essa sinalização. O transportador de cálcio intracelular identificado mais recentemente está localizado na membrana do vacúolo e seu papel é mediar o efluxo do Ca^{2+} desta

organela. Como demonstrado por Palmer e cols., (2001), o Yvc1p é um homólogo dos canais receptores de potencial transiente (TRPs) presentes em células animais, e constitui o único liberador de cálcio vacuolar descrito até hoje em *S. cerevisiae*, porém sua função fisiológica não foi ainda esclarecida. Foi sugerido também que este canal é um liberador de cálcio induzido por concentrações micromolares de cálcio livre no citoplasma e também por mudanças no gradiente da membrana vacuolar.

Em 2002, Denis, V. & Cyert, M. S., confirmaram a classificação de Yvc1p como um membro da família dos canais do tipo TRP e demonstraram que a liberação de cálcio pelo mesmo pode ser ativada também por uma força osmótica transitória durante um choque hipertônico estabelecendo assim, uma nova função para os canais desta família. Também avaliando a resposta de Yvc1p à hiperosmolaridade, Zhou, X. L. e cols. (2003) classificaram este transportador como sendo mecano-sensível.

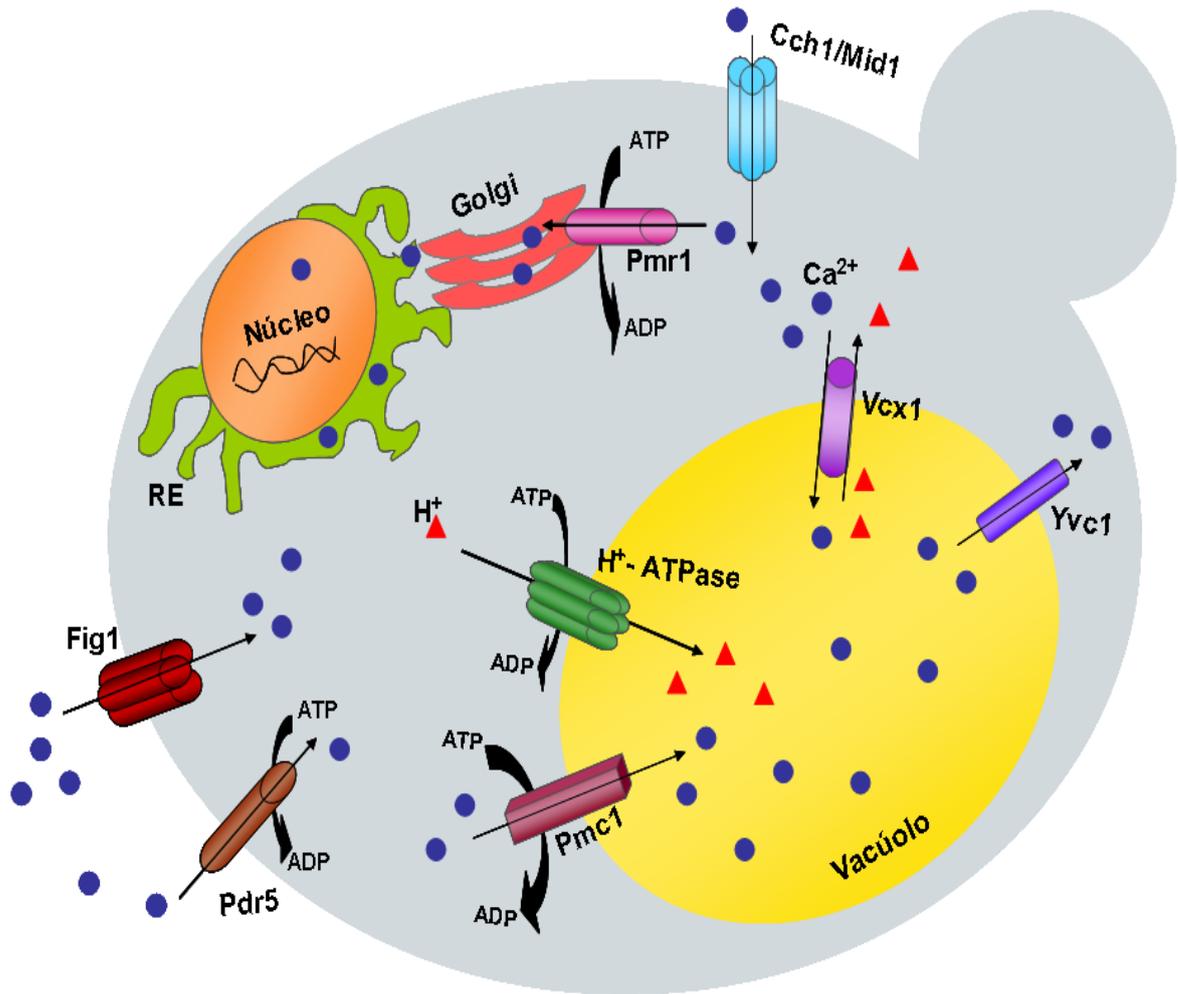


Figura 3: Vias de transporte de cálcio em *Saccharomyces cerevisiae*.

O Ca^{2+} é transportado para o citoplasma através do canal de membrana citoplasmática composto pelo complexo Cch1/Mid1 ou através do canal vacuolar do tipo TRP, Yvc1p, em resposta a diversas mudanças ambientais tais como estresse do retículo endoplasmático (RE), choque osmótico ou presença de feromônios. O Ca^{2+} é sequestrado do citoplasma pelas ATPases do tipo P no Golgi (Pmr1p) no vacúolo (Pmc1p), e pelo permutador vacuolar $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, Vcx1p. Ainda envolvidos no transporte de íons cálcio tem-se, na membrana citoplasmática, um canal de baixa afinidade (Fig1p) e uma ATPase envolvida na multirresistência a drogas, transportadora de cátions bivalentes (Pdr5p).

Fonte: Ton, V. & Rao, R., 2004; Muller e cols., 2003 e Tutulan-Cunita, A. C. e cols., 2005.

1.1.1.2.2- Resposta “TECC” induzida por glicose

Assim como em outras espécies o aumento transitório de cálcio regula uma enorme variedade de processos celulares, também em leveduras este mensageiro possui um papel muito importante. Como uma alta similaridade entre o conjunto de componentes da sinalização de cálcio nas células animais e nos eucariotos primitivos já foi descrita nos últimos anos, a investigação dos papéis individuais desta molécula efetora têm evoluído consideravelmente. (Cunningham, K. M. & Fink, G. R., 1994),

Variações nos níveis citosólicos de cálcio são observadas durante o processo de formação de células diplóides (Iida, H. e cols., 1990b), em situações de estresse hipotônico (Batiza e cols., 1996) e hipertônico (Denis, V. & Cyert, M. S., 2002), durante alguns eventos do ciclo celular (Saavedra-Molina, A. e cols., 1983 e Iida, H. e cols., 1990) e após a adição de glicose (Nakajima-Shimada, J. e cols., 1991 e Fu, L. e cols., 2000).

Em células de mamíferos, a liberação de cálcio dos compartimentos intracelulares é requerida para a sinalização e envolve uma regulação dependente de receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃). Já em leveduras, o aumento citosólico deve-se, quase sempre, ao influxo de cálcio do meio externo (Denis, V. & Cyert, M. S. e Tokes-Fuzesi, M. e cols., 2002), porém a identificação do liberador vacuolar Yvc1p leva a crer que a elevação de cálcio no citoplasma é, também neste microorganismo, mediada pelo fornecimento proveniente dos estoques deste íon.

Nakajima-Shimada, J. e cols. (1991), descreveram o mecanismo de sinalização de cálcio, induzido por glicose, em *Saccharomyces cerevisiae*, ao demonstrarem que após a adição do açúcar, estas células produziam uma acentuada resposta “TECC” (elevação transitória de cálcio citosólico). Ao contrário da elevação imediata observada na resposta a altos níveis de cálcio extracelular ou a choques osmóticos, na presença de glicose a resposta ocorre com um pequeno atraso e o nível normal de cálcio no citoplasma é restabelecido em poucos minutos (Tokes-Fuzesi, M. e cols., 2002).

Apesar de não estarem ainda definidos os eventos que ocorrem entre a exposição inicial da célula à glicose, e a resposta de cálcio citosólico, algumas proteínas já foram descritas como sendo componentes importantes deste processo. Fu, L. e cols.. (2000), evidenciaram que esta resposta era dependente da fosfoglucomutase 2 (Pgm2p), sugerindo que a homeostase do cálcio era fortemente afetada pelos níveis de glicose-

1-fosfato e glicose-6-fosfato (Aiello e cols., 2002). Foi também demonstrado que esta sinalização requer a atividade da fosfolipase C e do complexo Gpr1/Gpa2 GPCR (Tisi, R. e cols., 2002), bem como o transporte e fosforilação da hexose e a participação do canal Mid1p (Tokes-Fuzesi, M. e cols., 2002). Tisi, R. e cols. (2004), evidenciaram ainda que o IP_3 funciona como mensageiro secundário no metabolismo de cálcio, e mais recentemente, Trópia, M. J. M. e cols. (2006), apresentaram fortes evidências da participação do sensor de glicose Snf3p na geração de um sinal intracelular que conectaria os metabólitos de glicose aos compartimentos e/ou transportadores intracelulares do cálcio.

1.2- A H^+ - ATPase de membrana citoplasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.1- Origem, estrutura e função

A H^+ -ATPase é a proteína mais abundante na membrana citoplasmática de fungos e sua atividade é essencial para a viabilidade destes organismos (Portillo, 2000 e Ambesi, A. e cols., 2000). Esta enzima pertence à família das ATPases do tipo P (P-ATPases), bombas de cátions capazes de transformar a energia química contida na molécula de ATP em outra forma de energia (Pedersen, P. L. & Carafoli, E., 1987 e Morsomme, P. e cols., 2000). As P-ATPases são definidas por três características básicas: 1- a unidade catalítica constitui-se de um monômero com peso molecular entre 70 e 200 kDa; 2- são inibidas por concentrações micromolares de vanadato e 3 - apresentam um resíduo de aspartato que é covalentemente fosforilado durante o ciclo catalítico formando um intermediário acil-fosfato (Møller e cols., 1996 e Morsomme, P. e cols., 2000).

Há muito havia sido observado que a presença de glicose e a ativação do metabolismo fermentativo desencadeavam uma acidificação do meio extracelular, porém, somente em 1961, Mitchel, P., demonstrou que este sistema de efluxo de prótons era gerado por uma bomba presente na membrana citoplasmática das leveduras. A atividade da H^+ -ATPase de fungos foi confirmada bioquimicamente no final dos anos 70, sendo que nos anos seguintes, diferentes metodologias de purificação foram desenvolvidas, o que possibilitou a caracterização da H^+ -ATPase de

três espécies de fungos: *Schizosaccharomyces pombe* (Dufour, J. P. & Gouffreau, A., 1978), *Saccharomyces cerevisiae* (Malpartida, F. & Serrano, R., 1980) e *Neurospora crassa* (Bowman, B. J. e cols., 1981, Addison, R. & Scarborough, G. A., 1981 e Addison, R. , 1986). Esta caracterização demonstrou que as H⁺-ATPases são compostas por uma única cadeia polipeptídica, com massa molecular de 100 kDa, inserida na bicamada lipídica. Buscando elucidar a estrutura secundária das P-ATPases, Serrano, R. & Portillo, F. (1990), sugeriram uma estrutura consenso com dois grandes domínios hidrofílicos e 10 segmentos transmembranares.

Lutsenko, S. e Kaplan, J. H. (1995), propuseram um modelo topológico comum para as H⁺-ATPases de *Neurospora crassa*, para a Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático e para a Na⁺-K⁺-ATPase de células animais no qual a sequência de 100 kDa está ancorada à membrana por quatro segmentos hidrofóbicos na porção N-terminal e seis segmentos na porção C-terminal. Em 2007, Pedersen, B. P. e cols., apresentaram pela primeira vez uma estrutura determinada por cristalografia de raios-X para as ATPases do tipo-P. Dez hélices transmembranares e três domínios citoplasmáticos definem a unidade funcional do transporte de próton acoplado ao ATP através da membrana citoplasmática. A estrutura demonstra um estado funcional não previamente observado em ATPases do tipo P. O domínio transmembrana revela uma grande cavidade, a qual é comumente preenchida com água. Esta cavidade está localizada próximo ao centro da membrana que é composto por resíduos hidrofílicos conservados (Figura 4). As H⁺-ATPases dos fungos *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* são codificadas pelo gene *PMA1* (Serrano, R. e cols., 1986 e Ghislain, M. e cols., 1987), entretanto ambas as espécies apresentam um segundo gene, *PMA2*, altamente homólogo a *PMA1* e expresso em níveis muito baixos, que codifica para uma H⁺-ATPase com função fisiológica ainda desconhecida (Portillo, 2000).

A função básica da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática de fungos e plantas é criar um gradiente eletroquímico de prótons, através de um sistema de transporte ativo, importante para a captação de nutrientes e para a regulação do pH intracelular (Monteiro, G. A. & Sá-Correia, I., 1998 e Portillo, 2000). Para sua atividade, requer Mg²⁺, Mn²⁺ ou Co³⁺, pH ótimo em torno de 6.0 e especificidade para ATP (Dufour, J. P. & Gouffreau, A., 1978 e 1980). A H⁺-ATPase pode ser regulada por dois principais fatores, glicose e pH ácido, entretanto situações de estresse pela presença

de etanol (Monteiro, G. A. & Sá-Correia, I., 1998), de ácidos orgânicos (Viegas, C. A. & Sá-Correia, I., 1991) e choque térmico (Piper, P. W. e cols., 1997) também são capazes de promover um aumento da atividade da enzima.

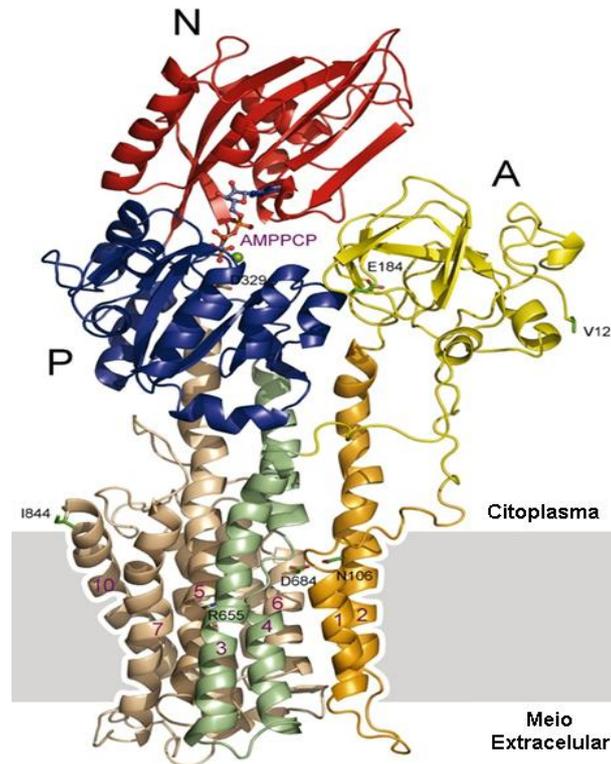


Figura 4: Estrutura, determinada por cristalografia de raios-X, representativa da forma ativa de uma bomba de prótons, sem a sua cauda C-terminal auto-inibitória em complexo com Mg-AMPPCP.

Os 10 segmentos transmembranares em alfa-hélice estão representados em laranja (M1 e M2), verdes (M3 e M4) e marrons (M5 a M10). O domínio de ligação do nucleotídeo está em vermelho (N), o domínio de fosforilação está em azul (P), e o domínio de atuação está representado em amarelo (A). Mg-AMPPCP encontra-se na interface entre os domínios N e P e é mostrado em uma representação círculos-palitos. Os resíduos de aminoácidos conservados, com suas respectivas posições, são mostrados por palitos verdes. A caixa cinzenta representa a localização aproximada da membrana plasmática.

Fonte: Pedersen, B. P. e cols., 2007.

1.2.2- Regulação transcricional e pós-transcricional da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática

Os processos de regulação da expressão do gene que codifica para a H⁺-ATPase de membrana citoplasmática são ainda pouco conhecidos. Apesar da região promotora de *PMA1* já ter sido identificada pouco se sabe sobre ela. Dois fatores importantes sugerem que os mecanismos regulatórios mais precisos envolvidos na atividade da H⁺-ATPase ocorram em nível pós-transcricional (Portillo, F., 2000): 1- o gene *PMA1* é altamente expresso (Rao, R. e cols., 1993) e 2- a H⁺-ATPase possui uma meia vida relativamente longa (Benito e cols., 1991).

Em células de *S. cerevisiae*, a regulação transcricional da H⁺-ATPase se dá através da ativação por glicose do fator de transcrição Tuf/ Rap1/ Grf1 (Diffley, J. F. X., 1992) o qual se liga às regiões promotoras UAS1 e UAS2 do gene *PMA1* (Capieaux, E. e cols., 1989).

A H⁺-ATPase de membrana citoplasmática é regulada em nível pós-transcricional pelo metabolismo de glicose que desencadeia três fenômenos importantes: 1- decréscimo do K_m por ATP; 2- aumento da V_{max} e 3- deslocamento do pH ótimo enzimático para valores neutros (Eraso, P. & Portillo, F., 1994 e De la Fuente, N. e cols., 1997). Embora o mecanismo molecular desta regulação induzida por glicose não esteja totalmente esclarecido, dois mecanismos parecem estar envolvidos no processo: fosforilação direta da enzima (Chang, A. & Slayman, C. W., 1991; Eraso, P. & Portillo, F., 1994 e Goosens, A. e cols., 2000) e/ou degradação de uma hipotética proteína inibitória do processo de ativação (De la Fuente, N. e cols., 1997).

Portillo, F. e cols. (1989), verificaram um papel importante da região C-terminal da enzima, porém somente em 1998, Mason e cols. apresentaram fortes evidências de que a porção C-terminal da enzima constitui um domínio auto-inibitório e que a região N-terminal tem uma função sutil na modulação da atividade da ATPase.

Através de estudos de mutagênese sítio dirigida foi possível identificar diversos resíduos da região carboxi-terminal, que seriam importantes na regulação da H⁺-ATPase (Portillo, F. & Serrano, R. 1989). Dentre estes, destacam-se dois sítios regulatórios que parecem afetar esta regulação: o sítio envolvendo os aminoácidos Arg909 e Thr912, que é essencial para promover mudanças da V_{max} (aumento), e o

sítio envolvendo os resíduos Ser899 e Glu901, necessário para alterações no K_m (redução) (Mason e cols., 1998).

No modelo proposto para explicar a regulação pós-transcricional, induzida por glicose, da H^+ - ATPase (Figura 5), a via de sinalização ativada pelo açúcar desencadeia uma modificação conformacional da região C-terminal, desfazendo a interação inibitória deste domínio com o domínio de ligação do ATP, e permitindo à enzima adotar uma conformação mais ativa. Esta interação, que limita o acesso do ATP e o transporte de prótons, é provavelmente desfeita pela fosforilação dos resíduos de serina e treonina por intermédio de uma proteína quinase ainda desconhecida (Diffley, J. F. X., 1992; Mason e cols., 1998 e Portillo, F., 2000).

No que diz respeito à ativação da H^+ - ATPase induzida por uma diminuição do pH intracelular, ela se deve a uma mudança do K_m e não envolve alterações de V_{max} e pH ótimo (Eraso, P. & Gancedo, C., 1987).

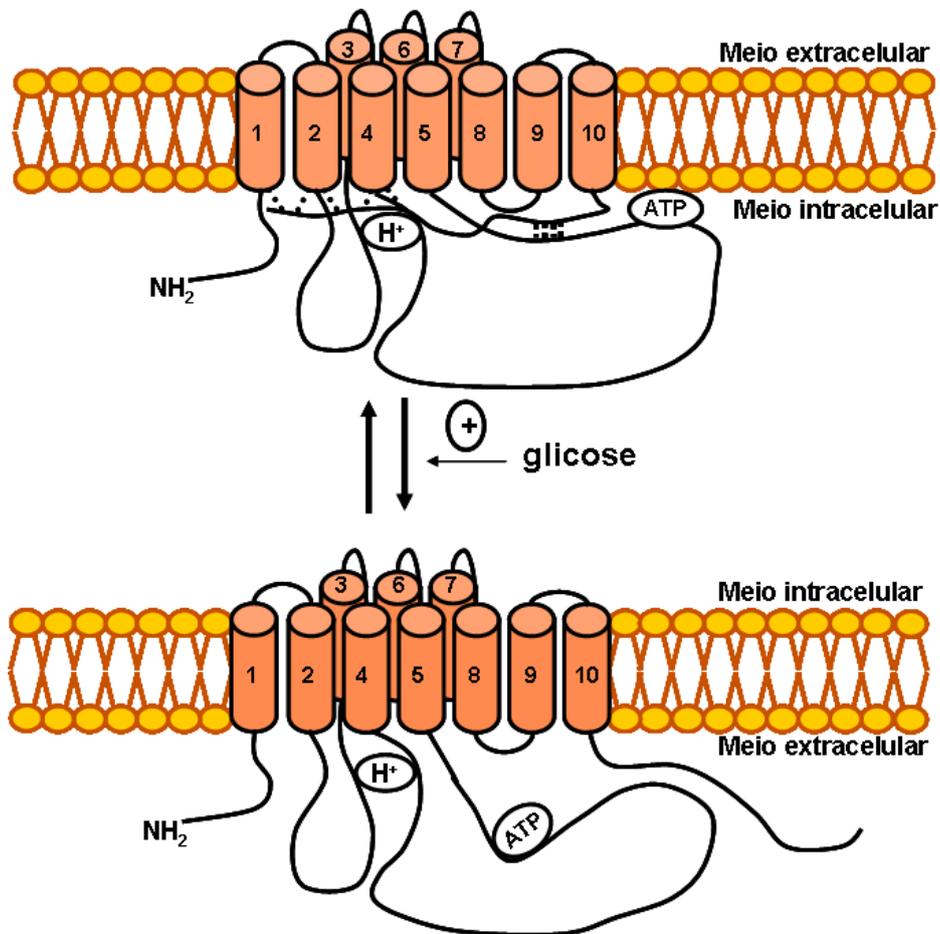


Figura 5: Modelo de fosforilação da H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, induzida por glicose.

A adição de glicose desencadeia uma via de sinalização que resulta na fosforilação do domínio C-terminal da enzima, nos resíduos serina-899 e treonina-912 causando, respectivamente, redução do K_m por ATP e elevação da V_{max} , produzindo um aumento da atividade específica da enzima.

Fonte: Portillo, F. 2000.

1.2.2.1- Mecanismos hipotéticos para a via de ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática

Em 1983, Serrano, R. evidenciou que a adição de glicose a células de levedura intensificava o efluxo de prótons mediado pela H⁺-ATPase e que estas mesmas condições acarretavam um forte aumento (cerca de 10 vezes) da atividade desta enzima. A via de sinalização responsável por esta elevada ativação da H⁺-ATPase não foi ainda completamente elucidada, entretanto muitos componentes e eventos importantes têm sido identificados, dentre eles, a confirmação da necessidade tanto de uma fosforilação direta da enzima quanto da presença de cálcio livre no citoplasma (Chang, A. & Slayman, C. W., 1991; De la Fuente, N. & Portillo, F., 2000; Trópia, M. J. M. e cols., 2006 e Pereira, M. B. e cols., 2008).

Na busca por identificar a proteína quinase capaz de regular diretamente a cauda C-terminal da H⁺-ATPase, foi sugerido primeiramente o envolvimento da proteína quinase A como sendo a responsável pela fosforilação da enzima (Ulaszewski, S. e cols., 1989) (Figura 6). Esta hipótese baseava-se no fato de que um dos mais bem caracterizados efeitos da glicose é o aumento dos níveis de AMPc, que leva à ativação da proteína quinase A (Thevelein, J. M., 1994 e Rolland, F. e cols., 2002). Porém, Becher dos Passos e cols., em 1992, utilizando diversas cepas contendo mutações nos componentes da via PKA, demonstraram que a ativação da ATPase não era mediada por esta quinase. Diante disso, a participação de outra proteína quinase no processo de ativação da H⁺-ATPase foi então proposta e investigada.

Considerando que outro importante efeito da adição de glicose a células de levedura, é a estimulação do “*turnover*” do fosfatidilinositol, fosfatidilinositol-4- fosfato e fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (Kaibuch, K. e cols., 1986; Francescotti, G. e cols., 1990 e Flick, J. S. & Thorner, J., 1993), Brandão, R. L. e cols. (1994) sugeriram um possível envolvimento deste processo na regulação da H⁺-ATPase. Assim, trabalhando com ativadores e inibidores da proteína quinase C, bem como inibidores da proteína quinase dependente de Ca²⁺/calmodulina e da fosfolipase C, propuseram um mecanismo semelhante àquele da via fosfatidilinositol de mamíferos, com a provável participação da Pkc1p na ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de levedura (Figura 7).

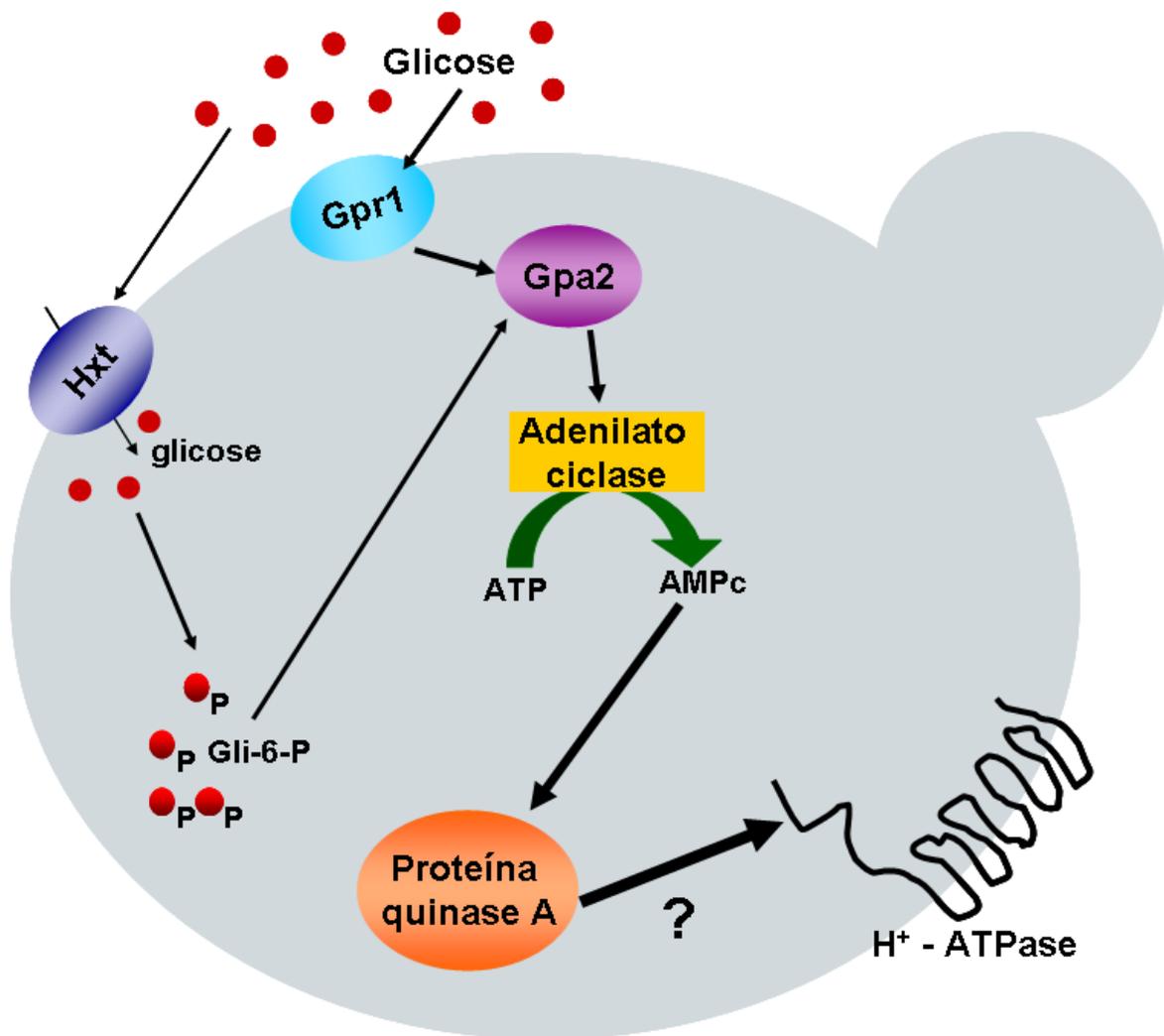


Figura 6: Mecanismo hipotético de ativação induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, via Proteína quinase dependente de AMPc (Pkap).

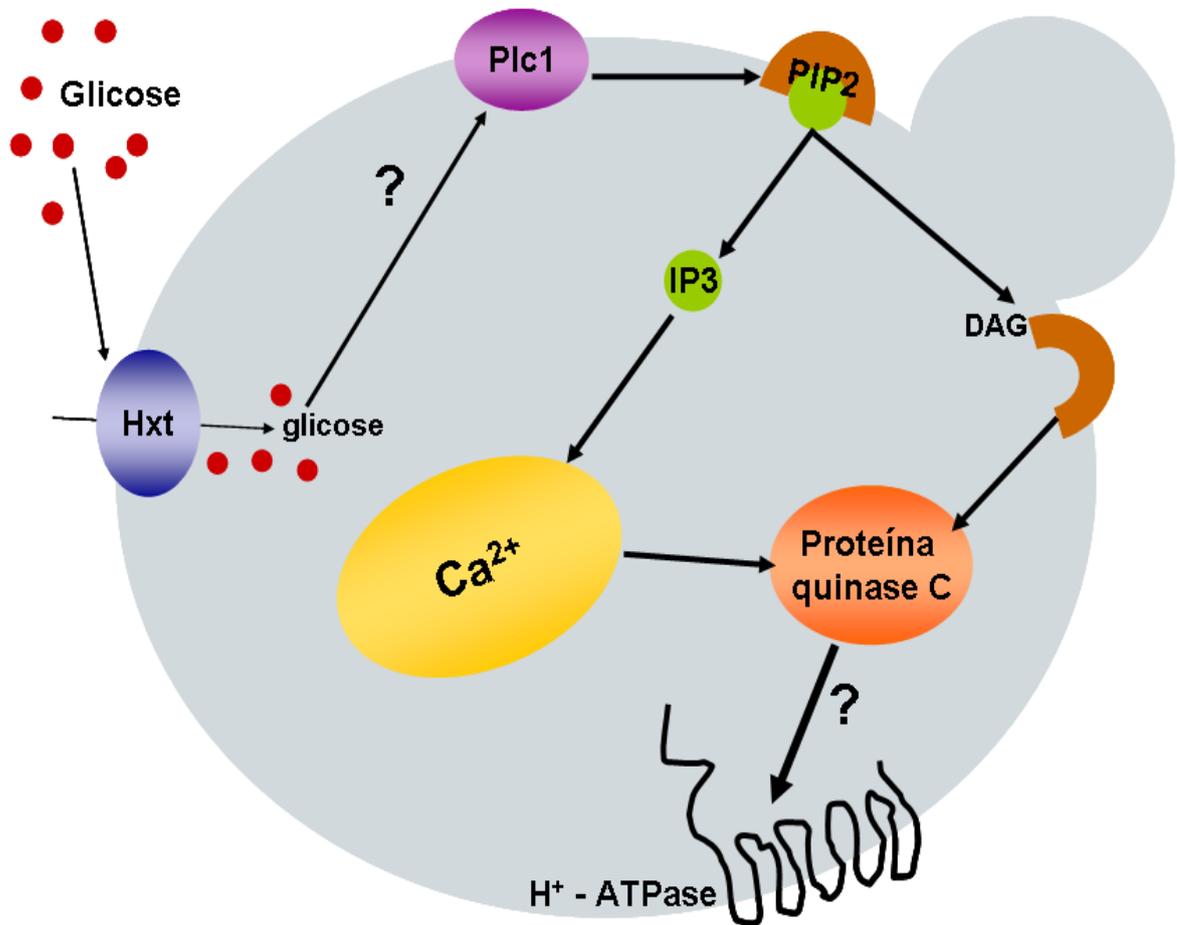


Figura 7: Mecanismo hipotético de ativação induzida por glicose da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, via Proteína quinase C (Pkc1p).

Mais tarde, Coccetti, P. e cols. (1998), demonstraram que, de fato, a fosfolipase C está envolvida, tanto na indução por glicose do “turnover” do fosfatidilinositol, quanto na ativação da H⁺-ATPase, já que em mutantes com deleção no gene que codifica para esta lipase, o “turnover” do fosfatidilinositol é inibido e a ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose é ou significativamente reduzida ou ausente.

Souza e cols. (2001) além de demonstrarem a participação da proteína G Gpa2p, do sensor de glicose Snf3p e a necessidade da entrada e fosforilação da glicose para que a ativação eficiente da H⁺-ATPase acontecesse, confirmaram ainda o envolvimento da proteína quinase C e não de outras MAP quinases, na via de sinalização que resulta na ativação da enzima, utilizando pela primeira vez cepas mutantes com deleção nestes genes.

Ainda que, a fosforilação direta da H⁺-ATPase não tenha sido demonstrada, outros pontos desta sinalização vêm sendo elucidados já que Trópia, M. J. M. e cols. (2006) demonstraram pela primeira vez que a ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase é fortemente dependente do metabolismo de cálcio e que o sensor Snf3p atua de forma paralela à proteína Gpa2p no controle desta via. O papel da cauda C-terminal de Snf3p foi também elucidado e evidências relevantes indicaram que esta proteína é provavelmente, a responsável pela detecção do sinal interno gerado pelos açúcares fosforilados. Observou-se ainda, o envolvimento da Ca²⁺-ATPase vacuolar, Pmc1p, e foi proposto que este transportador teria sua atividade controlada pelo sensor Snf3p culminando na regulação da disponibilidade de cálcio no citoplasma (Figura 8).

Sendo assim, novas similaridades entre a sinalização da homeostase do cálcio e o mecanismo que regula a ativação da H⁺-ATPase em células de levedura foram observadas. Embora nem todos os componentes desta primeira via tenham sido ainda identificados, a elevação transitória do cálcio citosólico (*TECC*) é também ativada por açúcares, sendo absolutamente necessário o transporte e fosforilação da hexose, bem como a participação da fosfolipase C e da proteína G Gpa2p. Tudo isto fortalece a hipótese da conexão entre estas duas vias de sinalização, sendo a disponibilização do cálcio, o evento integrativo envolvido na ativação da enzima pela adição de glicose.

Ainda neste contexto, Pereira, M. B. e cols. demonstraram, recentemente, que para a via de ativação da H⁺-ATPase induzida por agente despolarizante, a ativação da fosfolipase C, da proteína Gpa2p, bem como, da proteína quinase C é essencial.

Observou-se ainda que, este agente também induz um aumento nos níveis de cálcio no citoplasma. Diante disso, a forte dependência desta via em relação à disponibilidade de cálcio extracelular leva a crer que a conexão entre a sinalização de cálcio e a ativação da H⁺-ATPase, seja um evento real e importante na resposta das células de levedura à presença de glicose.

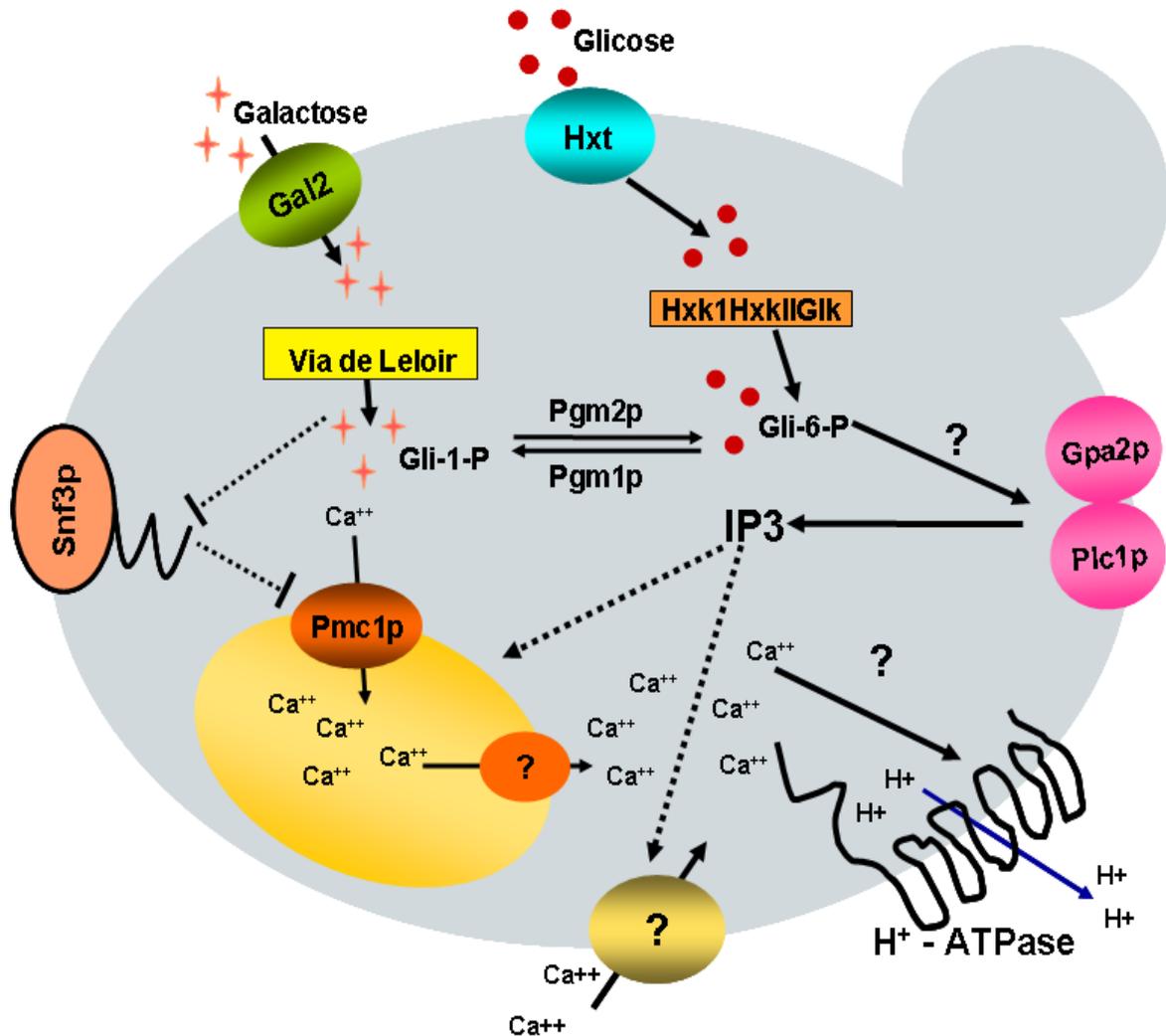


Figura 8: Modelo hipotético da ativação, induzida por carboidratos, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática mediada por íons cálcio.

A internalização e a fosforilação da glicose gerariam um sinal relacionado a um balanço entre os níveis de glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato, que seria detectado pelo domínio C-terminal de Snf3p. Esta proteína estimulada inibiria o sequestro de Ca²⁺ citosólico mediado pela Ca²⁺-ATPase vacuolar, Pmc1p. Atuando em uma via paralela a esta, a proteína Gpa2p responderia a presença do açúcar fosforilado (gli-6-P) estimulando a fosfolipase C, que hidrolisaria o fosfatidilinositol a DAG e IP₃. O inositol-1,4,5- trifosfato, atuaria sobre canais de cálcio nas membranas citoplasmática e/ou intracelulares, o que acarretaria uma elevação dos níveis de Ca²⁺ no citosol. Esta elevação resultaria de dois mecanismos que iriam controlar então a disponibilização de Ca²⁺ a um nível capaz de ativar a H⁺-ATPase de membrana citoplasmática.

Fonte: Trópia, M. J. M. e cols., (2006).

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo Geral:

Estudar a interação existente entre os mecanismos de regulação da homeostase do cálcio e o processo de ativação, induzido por carboidratos, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 – Objetivos Específicos:

- a. Elucidar o envolvimento do cálcio extracelular e das proteínas que atuam na sua captação (Mid1p, Fig1p e Pdr5p), na via de ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática de levedura;
- b. Estudar a relação entre a sinalização do fosfatidilinositol e a ativação induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática para verificar um suposto envolvimento do mensageiro inositol-1,4,5-trifosfato, o IP₃;
- c. Investigar uma provável participação do canal vacuolar liberador de cálcio, o Yvc1p, no mecanismo de ativação, induzida por carboidratos, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática;
- d. Verificar a participação dos eventos de homeostase do cálcio, sequestro e liberação vacuolar, na regulação do processo de ativação da H⁺-ATPase, desencadeado pela adição de glicose avaliando o envolvimento das proteínas de membrana vacuolar, Pmc1p e Yvc1p;
- e. Elucidar cada uma das vias distintas responsáveis pela mobilização do cálcio e consequente ativação da H⁺-ATPase, compreendendo a relevância de seus eventos sobre o efeito final da sinalização;
- f. Avaliar a participação da proteína quinase C, Pkc1p, no mecanismo de ativação da H⁺-ATPase, induzido por glicose, via mobilização de cálcio através do monitoramento *in vivo* da concentração de cálcio citosólico livre em mutantes com deleção de genes que codificam para proteínas componentes da via PKC MAP quinase.

Material e métodos

3 – Material e métodos

3.1 – Microrganismos e construções utilizados nos experimentos

3.1.1 – Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Nome	Genótipo	Origem
PJ69- 2a	<i>MATa; trp-901; leu2-3; 112 ura3-52; his3-200; gal4Δ gal80Δ; LYS:: GAL1-HIS3; GAL2-ADE2; met2::GAL7-lacZ</i>	Enzo Martegani, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Italy.
PJ69-4a 1	<i>PJ69-2a; arg82::KanMX4</i>	Enzo Martegani, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Italy.
W303	<i>MATα; ura3-52; his3-11,15; trp1-Δ901; ade2-101</i>	Johan Thevelein, J. M., Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
YSH813	<i>MATa; ura3-52; trp1-Δ901; ade2-101; bck1 ::URA3</i>	Johan Thevelein, J. M., Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
YSH850	<i>MATa; ura3-52; trp1-Δ901; ade2-101; pkc1 ::HIS3</i>	Johan Thevelein, J. M., Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
BY4741	<i>MATa ; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPL268W	<i>BY4741; ple1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDR315C	<i>BY4741; mid1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDR017C	<i>BY4741; fig1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOR153W	<i>BY4741; pdr5:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YGL006w	<i>BY4741; pmc1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOR087w	<i>BY4741; yvc1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .

Nome	Genótipo	Origem
LBCM 506	PJ69-2a; <i>arg82::KanMX4 plc1::URA3</i>	Fernanda Machado de Carvalho – LBCM, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.
LBCM 513	PJ69-2a; <i>arg82::KanMX4 yvc1::URA3</i>	Fernanda Machado de Carvalho – LBCM, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.
LBCM 488	BY4741; <i>pmc1::KanMX4 snf3::HIS3</i>	Cepa obtida durante o desenvolvimento da tese, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.
LBCM 505	BY4741; <i>snf3::KanMX4 plc1::URA3</i>	Cepa obtida durante o desenvolvimento da tese, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.
LBCM 487	BY4741; <i>pmc1::KanMX4 gpa2::LEU2</i>	Cepa obtida durante o desenvolvimento da tese, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.
LBCM 514	BY4741; <i>fig1::KanMX4 mid1::URA3</i>	Cepa obtida durante o desenvolvimento da tese, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.
LBCM 515	BY4741; <i>pdr5::KanMX4 mid1::URA3</i>	Cepa obtida durante o desenvolvimento da tese, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.
LBCM 520	BY4741; <i>pmc1::KanMX4 yvc1::URA3</i>	Cepa obtida durante o desenvolvimento da tese, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.
LBCM 518	PJ69-2a; <i>plc1::URA3</i>	Cepa obtida durante o desenvolvimento da tese, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.
LBCM 519	PJ69-2a; <i>yvc1::URA3</i>	Cepa obtida durante o desenvolvimento da tese, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.

3.2 – Vetores e plasmídeos utilizados nos experimentos

pYES2/CT: vetor de expressão comercial (Invitrogen), que possui o gene *URA3* como marcador auxotrófico.

pVTU-AEQ1(*URA3*) e pVTW-AEQ1(*TRP1*): cedidos por Renata Tisi, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Italy.

pUC18/gpa2/LEU: cedido por Johan Thevelein, J. M., Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.

3.3 – Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos

Sequências dos iniciadores desenhados para as reações em cadeia da polimerase para amplificação das sequências de interesse.

<i>Iniciadores</i>	<i>Sequências</i>	<i>Linha</i>
<i>PLC1</i> direto	5´ - AGAAGATTCCAAAACCGAAATC - 3´	1
<i>PLC1</i> reverso	5´ - AATTAATTATTAGACGCTAACTGTG - 3´	2
<i>SNF3</i> direto	5´ - AACCCATCCAAGGTGCTACT - 3´	3
<i>SNF3</i> reverso	5´ - GAAACAGTCCAGCAAACAAT - 3´	4
<i>URA3-MID1-URA3</i> direto	5´ - ATGGTATCAGCCAACGGCGACTTGCACTTGCCA ATTTCTAACGAACAGTGCATGCCGGAA - 3´ 5´ - GATTCGGTAATCTCCGAA - 3´	5
<i>URA3-MID1-URA3</i> reverso	5´ - GTAACGCCCTTAATGCAAATACTCTTCAGAA GATTGGGATAAAATATCATATAGAGTC - 3´ 3´ - TTAGTTTTGCTGGCCGCA - 5´	6
<i>URA3-YVC1-URA3</i> direto	5´ -ATGATAGTCTGGCAAGCACTATTTCGTGGTTTAC TGCTATTTACCACTTCTATTACGGT - 3´ 5´ - GATTCGGTAATCTCCGAA - 3´	7
<i>URA3-YVC1-URA3</i> reverso	5´ -ACAGGACTGAATGCCTCAACAACCTTATGTAGC GTAC TGACAAAGAAAATCAGTAATGGT - 3´ 5´ -TTAGTTTTGCTGGCCGCA - 3´	8

3.4 - Meios de cultura

3.4.1 - Meio YP

O meio líquido YP é composto por extrato de leveduras 1% (p/v) e peptona bacteriológica 2% (p/v). O meio sólido requer o acréscimo de ágar 1.5% (p/v).

As diferentes fontes de carbono (glicose 2% ou galactose 2%) utilizadas nos experimentos foram autoclavadas separadamente e acrescentadas, individualmente, ao meio YP estéril.

3.4.2 - Meio mínimo sintético (SD)

Os meios líquido e sólido de SD são compostos por 0.67% (p/v) de base nitrogenada de leveduras sem aminoácidos, suplementado com os aminoácidos: arginina 20 mg/L, metionina 20 mg/L, tirosina 30 mg/L, isoleucina 30 mg/L, lisina 30 mg/L, fenilalanina 50 mg/L, triptofano 100 mg/L, histidina 100 mg/L, ácido glutâmico 100 mg/L, ácido aspártico 100 mg/L, valina 100 mg/L, treonina 200 mg/L, leucina 250 mg/L e serina 375 mg/L, e as bases adenina 50 mg/L e uracila 50 mg/L. Sendo o meio sólido acrescido de ágar 1.5% (p/v) e o pH ajustado com KOH para 6.5. Para o preparo do meio SD líquido, o valor de pH foi ajustado para 5.5. A glicose, como fonte de carbono, foi adicionada separadamente, em uma concentração final de 2%.

3.5 – Condições de crescimento

As células de *Saccharomyces cerevisiae* foram crescidas a 30°C sob agitação de 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25) em meio YP suplementado com a fonte de carbono requerida. Para as cepas transformadas portadoras de plasmídeos, ou não, foi usado o meio seletivo SD.

3.6 – Transformação de leveduras

3.6.1 – Preparo de células de levedura competentes

As cepas *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao processo de transformação, foram pré-crescidas em 4 mL de YP glicose, a 28°C sob agitação constante (200 rpm), durante 24 horas. Este pré-inóculo foi utilizado para inocular 100 mL do mesmo meio que foi então incubado nas mesmas condições de temperatura e agitação descritas acima, até que a cultura atingisse um valor de densidade ótica de 0.6. Após o crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 3.750 rpm por 4 minutos. O sobrenadante da cultura foi descartado e as células de leveduras foram lavadas com 20 mL de TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) e ressuspensas em 5 mL do mesmo tampão, acrescidos de 250 µL de LiAc 2.5 M. A suspensão de células foi incubada a 28°C sob agitação constante (200 rpm) durante no mínimo 90 minutos.

As células de levedura, tornadas competentes pelo tratamento descrito acima, foram aliqüotadas em frações de 300 µL e usadas imediatamente para as transformações.

3.6.2 – Transformação de leveduras

Às frações de 300 µL da suspensão de leveduras competentes, adicionou-se 5 µg do DNA de interesse a ser inserido e 10 µL de DNA de esperma de salmão (10 mg/mL) previamente desnaturado a 95°C. Após uma incubação de 30 minutos em estufa a 30°C (sem agitação) foram adicionados 700 µL de PEG 4.000 (50%). Procedeu-se a homogeneização do conteúdo delicadamente e o mesmo foi incubado por 1 hora, sem agitação, a 30°C. Em seguida, as células foram submetidas a choque térmico a 42°C (banho Maria), por 10 minutos, e logo após foram centrifugadas por um minuto a 3.750 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 1 mL de água mili-Q ou sorbitol 1M quando necessário. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, 900 µL do sobrenadante foram descartados e as células foram ressuspensas no sobrenadante residual e plaqueadas com pérolas de

vidro em meio sólido seletivo (SD - marcador). As placas foram incubadas a 30°C, por 72 horas (Ito, H. e cols. 1983).

Como controle negativo do experimento, foram utilizados apenas os 300 µL da suspensão de leveduras, acrescidos do DNA de esperma de salmão (10 mg/mL) previamente desnaturado.

3.7 – Construção de novos mutantes

3.7.1 – Construção do mutante *plc1Δ* no background PJ69-2a e dos duplos mutantes *pmc1Δsnf3Δ* e *snf3Δplc1Δ*

3.7.1.1 – Extração do DNA genômico de levedura

As cepas *Saccharomyces cerevisiae* foram crescidas em 5 mL de YP glicose, a 28°C, sob agitação de 200 rpm durante 24 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 3.750 rpm por 4 minutos e ressuspensas em 200µL de tampão de extração (sorbitol 1 M, citrato de sódio 100 mM, EDTA 60 mM, pH 7.0). Esse conteúdo foi transferido para tubos de microcentrífuga e adicionou-se 100 µL de solução de enzima liticase 1000 U/mL, Sigma (0,3 mg/mL de liticase e 8 µL/mL de β-mercaptoetanol em tampão de extração), agitando delicadamente.

As células foram incubadas por 2 horas, em estufa, a 37° C. Em seguida, adicionou-se 300 µL de tampão de lise (solução de SDS 2% em Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0), homogeneizando a suspensão de células que foi incubada por 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se ao 200 µL de NaCl 5 M, mantendo-o em gelo por 2 horas, e realizando, em seguida, uma centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm (Heraeus Sepatech, Biofure 13). Ao final, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

Ao tubo de microcentrífuga foram adicionados 400 µL de PCI (fenol, clorofórmio, álcool isoamílico na proporção de 25:24:1) promovendo uma homogeneização em vórtex por 2 minutos. Tal procedimento foi efetuado em duas etapas de 1 minuto, submetendo o conteúdo à incubação em gelo no intervalo entre as etapas. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm, a camada

superior foi transferida para um novo tubo, e procedeu-se novamente a etapa de adição de PCI, seguida de nova centrifugação. O sobrenadante obtido foi novamente transferido para um novo tubo, ao qual se adicionou 2 volumes de etanol 100%. Esse tubo foi mantido à temperatura de -70°C por um período de 5 minutos e realizou-se, em seguida, uma centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e o tubo foi novamente centrifugado nas mesmas condições descritas na etapa anterior.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento secado à temperatura de 65°C (Thermomixer 5436). O DNA obtido foi, então, ressuspensão em 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) ou de água Mili-Q estéril.

3.7.1.2 – Amplificação das deleções

As deleções que foram utilizadas para a construção dos mutantes foram amplificadas a partir do DNA genômico das cepas que já possuíam tais deleções. Os iniciadores construídos e utilizados nesta reação apresentam suas sequências no item 3.3, linhas 1 a 4.:

As reações foram conduzidas em um termociclador (Mastercycler – Eppendorf) utilizando como parâmetro de tempo de extensão para o fragmento de interesse o tamanho do mesmo.

3.7.1.3 – Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses foram realizadas em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE (Tris 0.04 M, EDTA 1mM, pH 8.0 ajustado com ácido acético). Para a aplicação das amostras adicionou-se às mesmas loading buffer 6X, concentração final 1X (azul de bromofenol 0.25%, xilenocianol 0.25% e sacarose 40% p/v).

3.7.1.4 – Transformação de leveduras

As cepas, selvagem PJ69-2a e mutantes *snf3Δ* e *pmc1Δ* foram submetidas ao protocolo do item 3.5.1 e transformadas com os amplificados *PLC1::URA3*, para a

selvagem e a *snf3Δ*, e *SNF3::HIS3* no caso da cepa *pmc1Δ*. O procedimento utilizado para as transformações está descrito no item 3.5.2.

3.7.2 – Construção dos duplos mutantes *fig1Δmid1Δ* e *pdr5Δmid1Δ*

Na construção dos duplos mutantes com deleção nos genes que codificam para transportadores de íons cálcio na membrana, foram utilizadas células competentes (preparadas de acordo com o protocolo do item 3.5.1) das cepas *fig1Δ* e *pdr5Δ*. As deleções para as transformações (item 3.5.2) foram construídas de acordo com a metodologia de Megaprimers descrita por Manivasakam, P. e cols., (1995).

3.7.2.1 – Construção da deleção *MID1::URA3* e obtenção dos duplo mutantes

Para a obtenção dessa deleção, onde um cassete *URA3* encontrava-se dentro da sequência codificadora de *Mid1p*, as seguintes etapas foram realizadas:

1. Construção de iniciadores (direto e reverso) destinados à amplificação do marcador auxotrófico *URA3* a partir do vetor de expressão pYES2/CT (Figura 9), flanqueados por seqüências homólogas ao gene *MID1*. Especificamente, esses iniciadores continham 18 pb destinados à amplificação de *URA3* flanqueados por 60 pb homólogas à seqüência de *MID1* (Manivasakam, P. e cols., 1995);

2. Reação em cadeia da polimerase, com os iniciadores descritos acima para amplificação da sequência *URA3*;

3. Eletroforese em gel de agarose (item 3.6.1.3) para confirmar a presença de um amplificado de aproximadamente 1.1 kb compatível à amplificação do gene *URA3*;

4. Transformação (itens 3.5.1 e 3.5.2) dos mutantes *fig1Δ* e *pdr5Δ* com o amplificado obtido na segunda etapa.

Obs.: Os iniciadores construídos e utilizados neste procedimento apresentam suas seqüências no item 3.3, linhas 5 e 6.

3.7.3 – Construção do mutante *yvc1Δ* no background PJ69-2a e do duplo mutante *pmc1Δyvc1Δ*

O duplo mutante foi construído a partir da transformação de células competentes (itens 3.5.1 e 3.5.2) da cepa mutante *pmc1Δ*. E na construção do mutante *yvc1Δ* foi utilizada a cepa selvagem PJ69-2a submetida também aos protocolos dos itens 3.5.1 e 3.5.2. Novamente a metodologia empregada foi a de Megaprimers (Manivasakam, P. e cols., 1995).

3.7.3.1 – Construção da deleção *YVC1::URA3* e obtenção dos mutantes

Na obtenção dessa deleção foram seguidas as etapas apresentadas no item 3.6.2.1, porém, neste caso, o cassete *URA3* encontrava-se flanqueado por sequências do gene *YVC1*. Os iniciadores construídos e utilizados neste procedimento apresentam suas sequências no item 3.3, linhas 7 e 8.

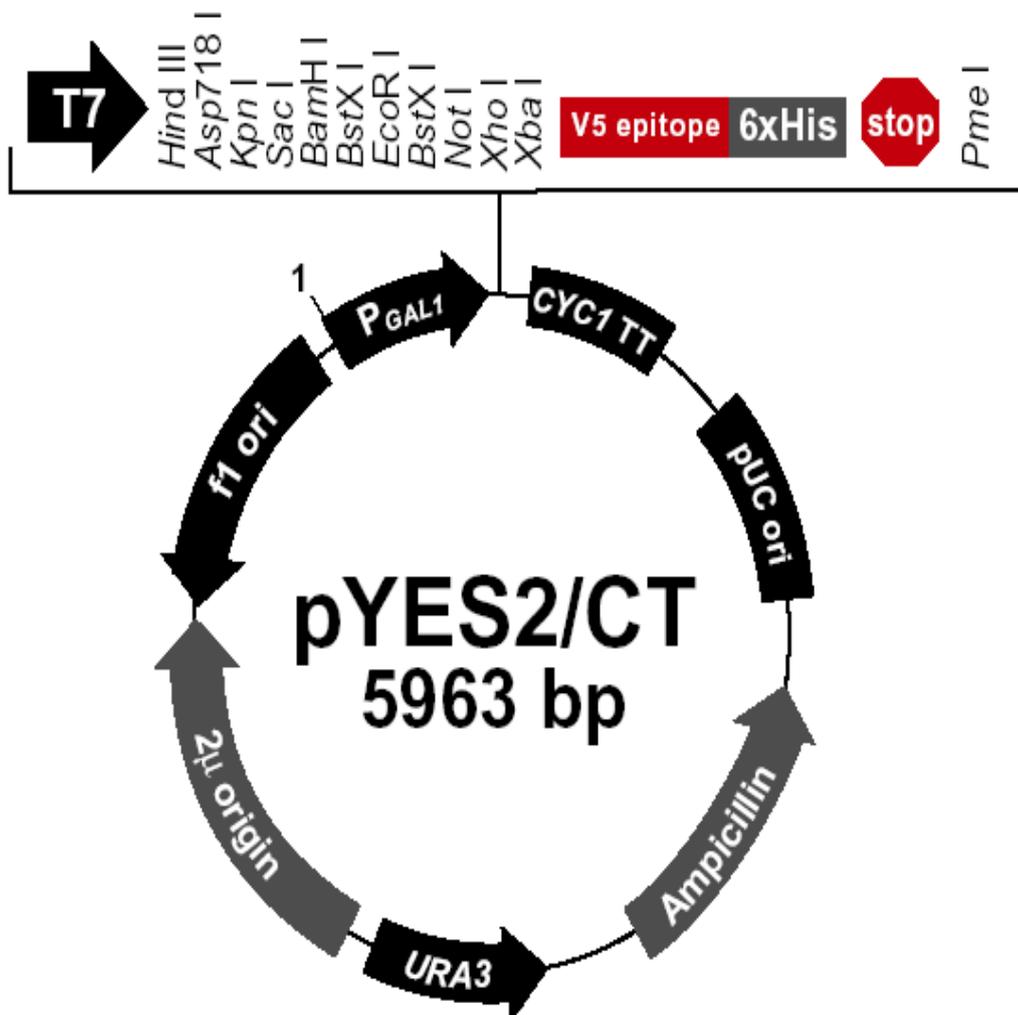


Figura 9 - Mapa do vetor de expressão pYES2/CT.

Fonte: www.invitrogen.com

3.7.4 – Construção do duplo mutante *pmc1Δgpa2Δ*

3.7.4.1 – Corte do plasmídio pUC18 / *gpa2* / LEU com a enzima de restrição *Sma*I e purificação do fragmento *GPA2::LEU*, utilizado na transformação

Um volume de 6µL de DNA plasmidial pUC18 / *gpa2* / LEU (~ 200 ng) (Figura 10), foi digerido com 1 µL da enzima de restrição *Sma*I em 2,0 µL de tampão React 4 (acetato de potássio 50 mM, Tris acetato 20 mM, acetato de magnésio 10 mM e dithiothreitol 1 mM, pH 7.9) acrescidos de 11 µL de água Mili-Q, a 25°C, por 2 horas. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (item 3.6.1.3). O fragmento de DNA de 3.059 pb contendo a construção *GPA2::LEU*, foi purificado utilizando-se o Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

A cepa mutante *pmc1Δ* foi submetida ao protocolo do item 3.5.1 e transformada com o fragmento de DNA contendo a construção *GPA2::LEU*, obtido na purificação. O procedimento utilizado para a transformação está descrito no item 3.5.2.

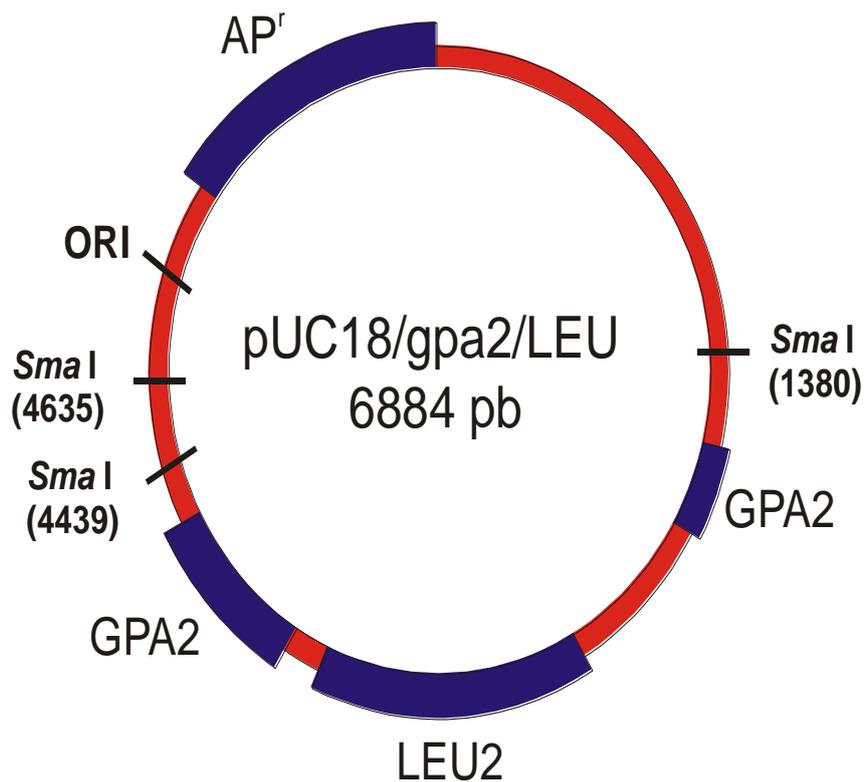


Figura 10 – Representação esquemática do plasmídio pUC18/gpa2/LEU. Estão representadas na figura as posições dos sítios de restrição para a enzima *Sma*I, que foram utilizados para a obtenção do fragmento de 3.059 pares de base *GPA2*::*LEU*. A figura mostra também o sítio de replicação em bactéria (ORI) e o gene *AP^r* que confere resistência a ampicilina.

3.8 – Acidificação extracelular

3.8.1 – Medida da acidificação extracelular induzida por glicose ou galactose

As células de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em YP glicose ou galactose 2%, foram coletadas por centrifugação a 3.750 rpm por 5 minutos, a 4°C (centrífuga Beckman GS-6R) e lavadas 2 vezes com água destilada gelada. Frações de 0.45 g destas células foram coletadas em 6 béqueres de 5 mL, contendo 4.5 mL de tampão de acidificação (Tris-HCl 100mM/ KCl 100 mM pH 4.5). Em dois desses béqueres foram adicionados 0.49 mL de água destilada e a suspensão de células foi homogeneizada acompanhando-se a estabilização do pH por 2 minutos. Em seguida as células foram submetidas a um pulso de 1 μmol de H^+ pela adição de 10 μL de HCl 100 mM (padrão). A variação de pH foi acompanhada por 6 minutos, e os valores foram anotados de 30 em 30 segundos (potenciômetro Orion Model 900 A).

Em duas das suspensões de células adicionou-se glicose a uma concentração final de 100 mM e foi acompanhada a variação do pH como descrito anteriormente para o pulso de HCl. O mesmo procedimento foi realizado nas suspensões de células submetidas a um pulso de galactose (concentração final de 100 mM).

3.8.2 – Medida da acidificação extracelular induzida por glicose na presença de EGTA

Para o estudo do efeito do EGTA (Ethylene Glycol-bis (β -Aminoethyl Ether) – N'-N'-N'-N'-Tetracetic Acid) sobre a acidificação induzida por glicose, foi preparada uma solução estoque de EGTA 180 mM, em tampão de acidificação. A uma suspensão de células, preparada como descrita no item 3.8.1, adicionou-se o EGTA a uma concentração final de 12 mM. Após homogeneização por 5 minutos e estabilização do pH, as células foram submetidas a um pulso de glicose (100 mM, concentração final) e a variação do pH foi monitorada. Uma suspensão de células, incubadas com EGTA como citado anteriormente, foi submetida a um pulso de 1 μmol de H^+ como descrito no item 3.8.1.

3.8.3 – Medida da acidificação extracelular induzida por glicose na presença de 2-APB

Foi demonstrado em células de mamíferos, que o 2-APB (2-aminoethoxy diphenyl borate) é um potente modulador, permeável, da liberação de cálcio induzida por Ins(1,4,5)P3 (Maruyama, T. e cols., 1997). Nas suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae* o efeito desse modulador foi investigado. As células foram crescidas em YP glicose 2% e a medida da acidificação extracelular foi realizada como descrito no item 3.8.1, porém antes das induções com 100 mM de glicose, as suspensões foram submetidas a um pulso do 2-APB (solução estoque de 500 mM, em DMSO) a uma concentração final de 50 μ M, por 30 segundos.

3.8.4 – Determinação do peso seco

Ao final de cada experimento de acidificação, 100 μ L da suspensão de células foram coletados por filtração a vácuo em membranas Millipore (0.75 μ m de porosidade) previamente pesadas. Após a filtração, as membranas contendo as células foram levadas a estufa de 80°C, por 24h e pesadas. O peso seco final foi determinado pela média de todos os experimentos.

3.8.5 – Cálculo da taxa de acidificação extracelular

Com os resultados obtidos nos experimentos de acidificação foram traçados gráficos de pH vs tempo (minutos) e as taxas de bombeamento de H^+ . h^{-1} . (g de células) $^{-1}$ foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\mu\text{moles } H^+ . h^{-1} . g^{-1} = \frac{\Delta y \text{ cm} \div \Delta HCl \text{ cm} \times 60}{\Delta x \text{ min} \times \text{peso seco em g} \times \text{volume da solução (50)}}$$

Onde:

- $\Delta y \text{ cm}$ = variação de pH na presença de glicose ou galactose;
- $\Delta HCl \text{ cm}$ = refere-se à variação de pH após a adição de 1 μ mol H^+ (controle)
- $\Delta x \text{ min}$ = tempo referente há 1 minuto, convertido em escala.

- d) Multiplicou-se por 60 para converter o valor para hora.
- e) Foi dividido pelo peso seco obtendo o resultado em gramas.

O resultado obtido com a equação foi dividido por 1.000 já que a extrusão de prótons foi apresentada em mmoles de H^+ . $h^{-1}.g^{-1}$ de célula.

3.9 – Atividade específica da H^+ - ATPase

3.9.1 – Obtenção da fração de membranas citoplasmáticas para o estudo do perfil de ativação da H^+ - ATPase

As células crescidas em meio YP foram coletadas por centrifugação a 3.750 rpm (Centrífuga Beckman GS-6R), por 5 minutos e lavadas duas vezes em tampão de incubação de células (MES 100 mM, pH 6.5 ajustado com Tris Base). Após a centrifugação, 5 g dessas células foram coletadas em erlenmeyers contendo 32 mL do mesmo tampão e incubadas em banho Maria a 30° C, sob agitação moderada constante (170 rpm), durante 10 minutos. A concentração final foi de 75 mg/mL. Então, 5 mL dessa suspensão foram coletados e filtrados a vácuo, antes (tempo 0) e após a adição de 3 mL de glicose 1 M, concentração final 100 mM (tempos 2, 5, 10 e 20 minutos de incubação). A massa celular obtida nesta coleta foi congelada em nitrogênio líquido e depois transferida para tubos de ensaio contendo 1.5 g de pérolas de vidro (0.5 mm de diâmetro), 0.5 mL de tampão de extração (sorbitol 0.33 M, Tris 0.1 M, EDTA 5 mM, β Mercaptoetanol 1 mM, pH 8.0) e rompidas por agitação em vórtex (3 ciclos de 90 segundos) com intervalos de resfriamento em gelo como descrito por Becher dos Passos, J. e cols., (1992). Em seguida adicionou-se 1 mL do tampão de extração e as células foram novamente homogeneizadas por mais 60 segundos.

A fração de membranas citoplasmáticas foi obtida por centrifugação fracionada subsequente do homogenato. Inicialmente as células foram coletadas a 3.750 rpm (1.000g) por 4 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 30.000 rpm (15.000g) por 30 minutos (centrífuga Beckman L7-65- rotor 55,2 Ti), o sedimento obtido foi ressuspensão em 1 mL de tampão glicerol (glicerol 20% Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, β Mercaptoetanol 1 mM, pH 7.5) e em seguida centrifugado em gradiente de sacarose (3 mL de sacarose 53.5% + 6 mL de sacarose 43.5%) a 27.000 rpm (100.000g) por 2 horas (centrífuga Beckman L7-65-rotor SW 40 Ti). Na interface do

gradiente foi coletada a fração contendo a membrana citoplasmática, esta, por sua vez, foi diluída e homogeneizada em 10 mL de água mili-Q gelada. Em seguida, centrifugou-se novamente a 27.000 rpm (100.000g) por 30 minutos (centrífuga Beckman L7-65-rotor SW 40 Ti). O sedimento final foi ressuspenso em 300 µL de tampão glicerol sendo utilizado para a determinação da atividade específica da H⁺-ATPase (Becher dos Passos, J. e cols., 1992).

3.9.2 – Ensaio da atividade ATPásica

A determinação da atividade da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática foi realizada utilizando-se aproximadamente 40 µg de proteínas (40 µL da suspensão de membranas) em um volume final de 250 µL de tampão de incubação da atividade (Hepes 50 mM, NaN₃ 10 mM que inibe ATPase mitocondrial e molibdato de amônio 5 mM, pH 6.5) contendo MgCl₂ 1 mM final. Esta mistura foi pré-incubada por 10 minutos a 30°C em banho Maria. Em seguida, iniciou-se a reação pela adição de ATP 25 mM para uma concentração final de 2 mM. A reação foi interrompida após 10 minutos com a adição de 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Imediatamente a seguir foram adicionados 450 µL de molibdato de amônio 5 mM em HCl 0.8 N (para fixar o fosfato liberado durante a reação de hidrólise de ATP), e 50 µL do reativo de cor (ANSA 1 mg, Na₂SO₃ 20 mg, Na₂S₂O₅ 600 mg, água q.s.p.4 mL). Após 30 minutos à temperatura ambiente procedeu-se a leitura. As absorvâncias a 720 nm foram obtidas em um espectrofotômetro (Beckman DU-68) (Becher dos Passos, J. e cols.,1992). Como padrão utilizou-se uma solução de Na₃HP0₄.

A atividade específica expressa em µmoles Pi/min./mg proteína foi calculada por meio da seguinte equação:

$$\text{Ativ. enz. específica } (\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) = \left[\frac{\text{Abs. 720nm} - a_1}{b_1} \right] \times 4 \times 62.5 \times 1000 \times \left[\frac{\text{Abs. 546nm} - a_2}{b_2} \right] \times 20 \times 10$$

Sendo que:

- a) Abs. 720nm = Valor da absorbância relativa à hidrólise de ATP.
- b) a_1 = Intercepto da curva padrão de fosfato.
- c) b_1 = Inclinação da curva padrão de fosfato.
- d) 4 = Fator de correção ($\mu\text{g fosfato}/ 250\mu\text{L} \longrightarrow \mu\text{g fosfato/mL}$) desde que a proteína foi expressa em mg/mL.
- e) 6.25 = Fator de diluição da amostra (40 μL da amostra diluídos para 250 μL final do tampão de incubação).
- f) Abs. 546nm = Valor em absorbância referente à dosagem de proteína.
- g) a_2 = Intercepto da curva padrão de proteínas.
- h) b_2 = Inclinação da curva padrão de proteínas.
- i) 20 = Fator de diluição da amostra para dosagem de proteínas (20 μL da amostra + 380 μL de água).
- j) 10 = Tempo de reação.

As dosagens foram feitas em duplicata com no mínimo três culturas diferentes.

3.9.3 – Dosagem de proteínas

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

3.10 – Atividade Ca^{+2} -ATPásica específica

3.10.1 – Obtenção da fração de membrana subcelular para o estudo do perfil de atividade da Ca^{+2} – ATPase vacuolar, Pmc1p

Para o fracionamento celular utilizou-se o protocolo descrito por Becherer, K. A. e cols. (1996), com algumas modificações. As células foram crescidas em 500 mL de meio YP glicose 2%, até a fase logarítmica ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 1.0$), coletadas por centrifugação a 3.750 rpm e ressuspensas em 50 mL de tampão Tris-HCl 200mM, pH 8.0; EDTA 20mM, 1% de β -Mercaptoetanol, NaN_3 5mM e NaF 5mM. Após uma incubação de 10 minutos, a 30°C, as células foram coletadas por centrifugação,

ressuspensas em 50 mL de meio para esferoplastos (meio sintético contendo sorbitol 1M, NaN_3 5mM e NaF 5mM) suplementado com liticase (Sigma) 0.3 mg/mL e procedeu-se nova incubação a 30°C por 30 minutos. Posteriormente as células foram resfriadas no gelo e lavadas duas vezes com meio para esferoplastos gelado; para garantir a integridade das proteínas obtidas no fracionamento, as células permaneceram a 4°C em todos os passos subsequentes.

Os esferoplastos produzidos foram lisados em 4-6 mL de tampão hiposmótico gelado (Tris-HCl 50mM, pH 7.5, sorbitol 200mM e EDTA 1mM) acrescido do inibidor de proteases PMSF 1mM (phenylmethylsulphonyl fluoride), através de desrupção ultra-sônica (em sonicador Sonic Dismembrator model 500 – Fisher Scientific) com 4 pulsos de sonicação de 10 segundos, com 10 segundos de intervalo em gelo, entre cada pulso. O lisado celular foi centrifugado subsequentemente a 500g (por 5 minutos), 13.000g (10 minutos) e 100.000g (60 minutos). O precipitado final foi ressuspenso em 2 mL de tampão hipo-osmótico (acrescido de PMSF), e adicionado no topo de um gradiente de sacarose. Todas as soluções de sacarose que compunham o gradiente foram feitas na porcentagem (p/p) com sacarose ultrapura em HEPES-KOH 10 mM, pH 7.6, EDTA 1mM, sorbitol 0.8M e o gradiente foi gerado usando os seguintes passos: 1.5 mL 60%, 1.0 mL 37%, 1.5 mL 34%, 2.0 mL 32%, 2.0 mL 29%, 1.5 mL 27% e 1.0 mL de sacarose 22%. Após centrifugação em rotor SW40Ti Beckman a 170.000g por 17 horas, frações de 0.6 mL foram coletadas a partir do topo (um total de 20 frações foi obtido).

3.10.2 – Identificação das frações contendo membrana subcelular de vacúolo

Segundo resultados apresentados por Lisman, Q. e cols. (2004), em um fracionamento de membrana subcelular, a membrana de cada organela aparece em maior proporção em uma faixa contínua e específica de frações.

Diante destes relatos e tendo em vista que a proteína de interesse encontrava-se na membrana do vacúolo, foi realizado um ensaio de atividade ATPásica (item 3.8.2), na presença ou não de 500 μM de CaCl_2 (concentração final) com cada uma das 20 frações isoladamente. As frações selecionadas foram submetidas também a um novo ensaio de atividade na presença de 500 μM de CaCl_2 acrescidos de 2mM, final, do quelante EGTA.

Ao final, passou-se a utilizar então, o mix das frações 15, 16 e 17, para a obtenção dos níveis de atividade da Ca^{2+} -ATPase vacuolar, Pmc1p. Optou-se pelo mix nos ensaios para eliminar possíveis interferências devido a diferenças na migração da suspensão de membrana subcelular durante o fracionamento.

3.10.3 – Ensaio da atividade Ca^{2+} - ATPásica

A determinação da atividade da Ca^{2+} - ATPase vacuolar, Pmc1p, foi realizada utilizando-se basicamente a mesma reação descrita no item 3.8.2 (Becher dos Passos, J. e cols. 1992). O mix da suspensão de membranas de vacúolo purificadas foi adicionado ao tampão de incubação da atividade (Hepes 50 mM, NaN_3 10 mM que inibe ATPase mitocondrial e molibdato de amônio 5 mM, pH 6.5) contendo MgCl_2 1 mM final. A reação iniciou-se com a adição de ATP (2 mM final) após uma pré-incubação de 10 minutos, a 30°C com CaCl_2 (concentração final de 500 μM) ou CaCl_2 (500 μM) mais EGTA (2mM final). Após 10 minutos a adição de 250 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) interrompeu a reação e 450 μL de molibdato de amônio 5 mM em HCl 0.8 N foram usados para fixar o fosfato liberado durante a reação de hidrólise do ATP. A mistura de reação contendo 50 μL do reativo de cor (ANSA 1 mg, Na_2SO_3 20 mg, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 600 mg, água q.s.p. 4 mL) foi incubada por 30 minutos e então as absorbâncias a 720 nm foram obtidas em um espectrofotômetro (Beckman DU-68).

A atividade ATPásica expressa em $\mu\text{moles Pi/min./mg}$ proteína foi calculada com a mesma equação utilizada no item 3.6.2. Ao fim, para obtenção da atividade Ca^{2+} - ATPásica, específica, os valores obtidos na reação contendo CaCl_2 + EGTA, foram subtraídos daqueles obtidos para as reações que aconteceram apenas na presença do CaCl_2 . Esse procedimento foi realizado para eliminar possíveis atividades contaminantes de outras ATPases que não a de interesse. A dosagem de proteínas das amostras foi feita como no item 3.6.3

3.11 – Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo método *t* de Student. As médias e os desvios padrão estão indicados em cada Figura e/ou Tabela. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.12 – Níveis de cálcio celular total

3.12.1 – Medida do cálcio celular total

A determinação do cálcio celular total foi realizada basicamente como descrito por Miseta, A. e cols. (1999). As células de levedura crescidas em YP glicose ou YP galactose, até a fase exponencial, foram coletadas por centrifugação a 3.750 rpm por 5 minutos. O precipitado celular foi lavado com YP fresco e transferido para tubos de microcentrífuga previamente pesados. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e as células foram centrifugadas mais uma vez para retirada do meio residual. Os tubos foram novamente pesados para determinar o peso úmido e logo depois o precipitado celular foi colocado para secar em Sistema SpeedVac Savant. Posteriormente, os tubos foram pesados para que fosse possível determinar o peso seco de células. Adicionou-se aos tubos uma solução de HCl 1M, a suspensão foi homogeneizada por agitação em vórtex e incubada por pelo menos 24 horas, sob agitação constante. Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos. Coletou-se então 1 mL do sobrenadante, que foi transferido para tubos de 15 mL e diluído cinco vezes em solução de HCl 1M. O conteúdo de cálcio das amostras foi medido por Absorção Atômica em um espectrofotômetro Varian AA-20. Uma solução padrão de Ca^{2+} com concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi utilizada.

3.12.2 – Determinação do cálcio celular total

Na determinação dos níveis de cálcio celular total foi utilizada a equação matemática descrita a seguir:

$$\text{Ca}^{2+} \text{ (mmoles/ kg de massa seca)} = \frac{\left(\frac{\text{Leitura} \times (5 \times 10^{-3})}{40} \right)}{\text{P.S}} \times 1000$$

Sendo que:

- a) Leitura = quantidade de cálcio expresso em mg/L.
- b) P.S. = valor do peso seco em kg.
- c) 5×10^{-3} = volume da alíquota de cálcio em litros.
- d) 40 = quantidade de Ca^{2+} (em mg) presente em 1 mmol do mesmo (peso molecular).
- e) 1000 = fator de correção desde que o conteúdo de cálcio foi expresso em mmoles/kg de célula.

3.13 – Monitoramento *in vivo* da concentração de cálcio citosólico livre

Para a medida da concentração de cálcio citosólico livre foi utilizado o método da Aequorina (Tisi, R. e cols., 2002). As cepas analisadas foram transformadas (itens 3.5.1 e 3.5.2) com o plasmídeo contendo o gene que codifica para a apoaequorina, sob regulação do promotor ADH1. Os plasmídeos foram obtidos com base na família de vetores de expressão de leveduras, oito séries pVT, construída e caracterizada por Vernet, T. e cols. (1987). Dois plasmídeos foram utilizados nestas transformações, o pVTU-AEQ1 e o pVTW-AEQ1, sendo que a única diferença entre eles deve-se ao marcador auxotrófico presente em cada um dos mesmos, *URA3* e *TRP1*, respectivamente. Diante disso, o critério utilizado para a escolha do plasmídeo em cada uma das transformações foi a compatibilidade do genótipo das cepas com cada um dos vetores. Os plasmídeos pVTU-AEQ1 e pVTW-AEQ foram gerados pela inserção do fragmento do gene *AEQ1* obtido com PCR do vetor pYX212-AEQ (Tisi, R. e cols., 2002).

Para o experimento de monitoramento, as células foram pré-inoculadas em 5 mL de meio YP glicose, a 30°C sob agitação constante de 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25) até a fase exponencial ($5-6 \times 10^6$). Após serem coletadas por centrifugação (3.750 rpm por 5 minutos) e lavadas três vezes com água mili-Q, as células foram ressuspensas em 0.1M de tampão MES/Tris, pH 6.5, a uma densidade de 1×10^8 células/mL e procedeu-se a incubação para esgotamento dos nutrientes (por 90 minutos, a temperatura ambiente). Em seguida as células foram centrifugadas a 3.750 rpm por 2 minutos e ressuspensas então no mesmo tampão, desta vez a uma densidade de 2.5×10^9 cels/mL.

Na etapa seguinte, 50 μ M de coelenterazina (Sigma; solução estoque de 1 μ g/ μ L dissolvidos em metanol) foram adicionados a 30 μ L da suspensão de células e as mesmas foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Este procedimento é essencial para a reconstituição da aequorina funcional. Para remover o excesso de coelenterazina as células foram lavadas três vezes com tampão MES 0.1M pH 6.5 (200 μ L para cada lavagem) com centrifugação de 2 minutos a 6.000 rpm. No procedimento de preparo das amostras para leitura em luminômetro Berthold Lumat LB 9501/16 as células foram ressuspensas em 500 μ L do mesmo tampão citado anteriormente (5×10^7 cels/mL) e então transferidas para um tubo de luminômetro. Para medir a elevação do cálcio citosólico (sinal de cálcio) induzida por glicose (100 mM final) a luminescência emitida foi monitorada em intervalos de 10 s, por 1 min, antes do estímulo. E após a adição do açúcar, por pelo menos 6 minutos. Os dados obtidos foram transferidos e analisados em computador acoplado ao equipamento.

3.13.1 – Monitoramento *in vivo* da concentração de cálcio citosólico livre na presença de EGTA

Para o estudo do efeito do EGTA (Ethylene Glycol-bis (β -Aminoethyl Ether) – N'-N'-N'-N'-Tetracetic Acid) sobre a elevação dos níveis de cálcio citosólico livre, utilizou-se uma solução estoque de EGTA 180 mM, em tampão MES/Tris 0.1M pH 6.5. A uma suspensão de células, preparada como descrita no item 3.11, adicionou-se o quelante, a uma concentração final de 12 mM e a suspensão foi homogeneizada por 5 minutos antes de ser submetida ao pulso de glicose. Para a leitura e o monitoramento das amostras então, procedeu-se da mesma forma descrita para as células que não foram incubadas com o quelante (item 3.11).

3.13.2 – Monitoramento *in vivo* da concentração de cálcio citosólico livre na presença de 2-APB

Para o estudo do efeito do inibidor 2-APB, sobre a elevação dos níveis de cálcio citosólico livre, utilizou-se uma solução estoque de 2-APB 500 mM, em DMSO. A uma suspensão de células, preparada como descrita no item 3.11, adicionou-se a

droga, a uma concentração final de 50 μM e a suspensão foi homogeneizada por 30 segundos antes de ser submetida ao pulso de glicose. Para a leitura e o monitoramento das amostras procedeu-se da forma descrita no item 3.11.

Resultados

4 – Resultados

4.1 - Envolvimento da captação do cálcio extracelular no processo de ativação, induzido por glicose, da H⁺ - ATPase de membrana citoplasmática

A H⁺-ATPase constitui a principal e mais abundante proteína presente na membrana citoplasmática de fungos (Portillo, F., 2000 e Ambesi, A. e cols., 2000) e diante do fato de que esta enzima possui uma meia vida relativamente longa (Benito, B. e cols., 1991) é possível sugerir que os fatores regulatórios mais importantes ocorram através de mecanismos pós- transcricionais.

Brandão, R. L. e cols.. (1994) e Coccetti, P. e cols. (1998) sugeriram o envolvimento de uma via do tipo fosfatidilinositol neste processo, e Souza, M. A. A. e cols. (2001) comprovaram a participação da proteína quinase C (Pkc1p) na ativação induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana.

Trabalhos realizados em nosso laboratório (Trópia, M. J. M. e cols., 2006 e Pereira, M. B. e cols., 2008) evidenciaram a importância da mobilização de íons cálcio na ativação da H⁺-ATPase e três importantes observações ajudam a reforçar a hipótese desta relação: Ansari, K. e cols., (1999) demonstraram que a proteína G Gpa2p parece estar ligada a fosfolipase C em leveduras; neste mesmo ano Kraakman, L. e cols. relataram que o receptor Gpr1p está acoplado a Gpa2p, o que fortalece a ideia da existência de um complexo trimérico; e ainda, em 2002, foi evidenciado por Tisi, R. e cols., o envolvimento de tal complexo na captação de cálcio extracelular, induzida por glicose.

Trópia, M. J. M. e cols., (2006) demonstraram uma forte relação entre a disponibilidade de cálcio extracelular, o sinal de cálcio induzido por glicose e a ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática em leveduras, porém detalhes de como se dá esta relação, não foram ainda elucidados.

Diante disso, investigamos inicialmente o real envolvimento do cálcio extracelular no processo de ativação, induzido por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática. Diante do fato de que três genes que codificam para proteínas envolvidas na captação de cálcio já foram descritos: *MID1*, *FIG1* e *PDR5* (Iida, H. e cols., 1994; Locke, E. G. e cols., 2000; Muller, E. M. e cols., 2001 and 2003; Tutulan-Cunita, A. C. e cols., 2005), foram realizados experimentos de medida da taxa

de extrusão de prótons nas cepas mutantes com deleção em cada um destes genes (cepas *mid1Δ*, *fig1Δ* e *pdr5Δ*). Para tanto, as células foram crescidas em meio rico (YP) suplementado com glicose ou galactose, suspensas em tampão, e então submetidas à re-adição de glicose ou galactose.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, a captação de cálcio, mediada por estes transportadores, parece não ser requerida para a ativação induzida por açúcar da H⁺-ATPase de membrana já que a taxa de efluxo de prótons, induzida tanto por glicose quanto por galactose, observada nos mutantes, foi comparável àquela observada na cepa selvagem correspondente ($p > 0.05$).

Nestas mesmas cepas, através de um ensaio de aequorina, foi avaliado o sinal intracelular de cálcio induzido por glicose, a resposta “TECC”. É possível observar que a ausência de qualquer um dos transportadores analisados não comprometeu a elevação dos níveis de cálcio citosólico após a adição de glicose 100 mM (Figura 11). Apesar do fato de que o mutante *fig1Δ* apresentou o seu pico de luminescência somente após pouco mais de um minuto que este pico já havia sido alcançado na resposta da cepa selvagem correspondente, e do pequeno atraso observado no mutante *mid1Δ*, de acordo com o perfil de luminescência relativa, uma clara indução do sinal de cálcio esteve presente em todos os casos.

Tabela 1 – Efeito da adição de açúcares (glicose ou galactose 100 mM) sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741) e seus mutantes *mid1Δ*, *fig1Δ* e *pdr5Δ*.

“Background”	Fonte de crescimento	Indução	Cepa	[mmol H ⁺ .h ⁻¹ (g cel.) ⁻¹]
BY4741	Glicose	Glicose	Selvagem	0.883 ± 0.069
		Galactose		0
	Galactose	Glicose		0.451 ± 0.031
		Galactose		0.259 ± 0.016
	Glicose	Glicose	<i>mid1Δ</i>	0.809 ± 0.099
		Galactose		0
	Galactose	Glicose		0.532 ± 0.063
		Galactose		0.226 ± 0.011
	Glicose	Glicose	<i>fig1Δ</i>	0.820 ± 0.113
		Galactose		0
	Galactose	Glicose		0.475 ± 0.050
		Galactose		0.202 ± 0.022
Glicose	Glicose	<i>pdr5Δ</i>	0.946 ± 0.087	
	Galactose		0	
Galactose	Glicose		0.483 ± 0.036	
	Galactose		0.213 ± 0.014	

As médias mostradas são estatisticamente similares aquelas apresentadas pela cepa selvagem (p > 0.05).

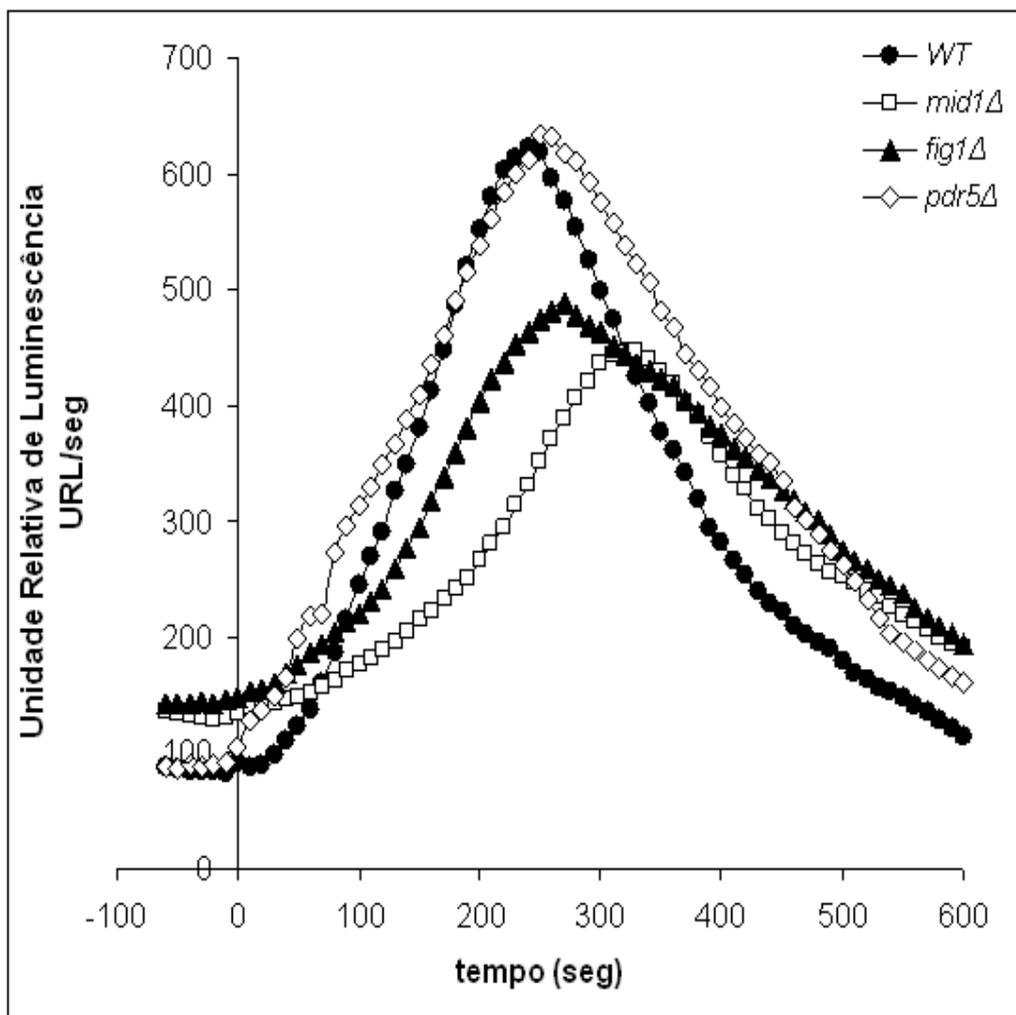


Figura 11 – Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *Saccharomyces cerevisiae*: selvagem BY4741; *mid1Δ*; *fig1Δ* e *pdr5Δ*. Células expressando apoaequorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos.

Diante dessas observações, foram construídos duplos mutantes com deleções nos genes que codificam para dois dos transportadores de cálcio presentes na membrana plasmática. Nas cepas mutantes *fig1Δ* e *pdr5Δ*, realizou-se a interrupção gênica de *MID1*. Observamos então, que para as três análises realizadas; taxa de extrusão de prótons (Tabela 2), atividade ATPásica (Figura 12 – painel A) e medida do sinal de cálcio (Figura 12 – painel B), todas induzidas por glicose, a dupla deleção não acarretou nenhuma redução ou inibição das respostas.

O mutante *fig1Δmid1Δ* e apresentou níveis de acidificação extracelular, ativação da H⁺-ATPase e resposta “TECC”, comparáveis àqueles observados na selvagem correspondente e nos mutantes únicos (Tabela 1 e figura 11). Apesar de apresentar uma resposta normal, o pequeno atraso no pico do sinal de cálcio observado na cepa *fig1Δ* se repetiu quando esta medida foi realizada no duplo.

No que diz respeito ao duplo mutante *pdr5Δmid1Δ*, somente quando realizamos a medida da taxa de extrusão de prótons o mesmo apresentou uma resposta levemente maior do que o observado na selvagem, porém, como o nosso interesse era investigar o comprometimento das respostas, essa diferença não foi considerada (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito da adição de glicose 100 mM, sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de *S. cerevisiae* (BY4741) e seus duplos mutantes *fig1Δmid1Δ* e *pdr5Δmid1Δ*.

“Background”	Fonte de crescimento	Indução	Cepa	[mmol H ⁺ .h ⁻¹ (g cel.) ⁻¹]
BY4741	Glicose	Glicose	Selvagem	0.883 ± 0.069
			<i>fig1Δmid1Δ</i>	0.842 ± 0.168
			<i>pdr5Δmid1Δ</i>	1.083 ± 0.089 ^a

^aA média mostrada é estatisticamente diferente daquela apresentada pela cepa selvagem (p < 0.05).

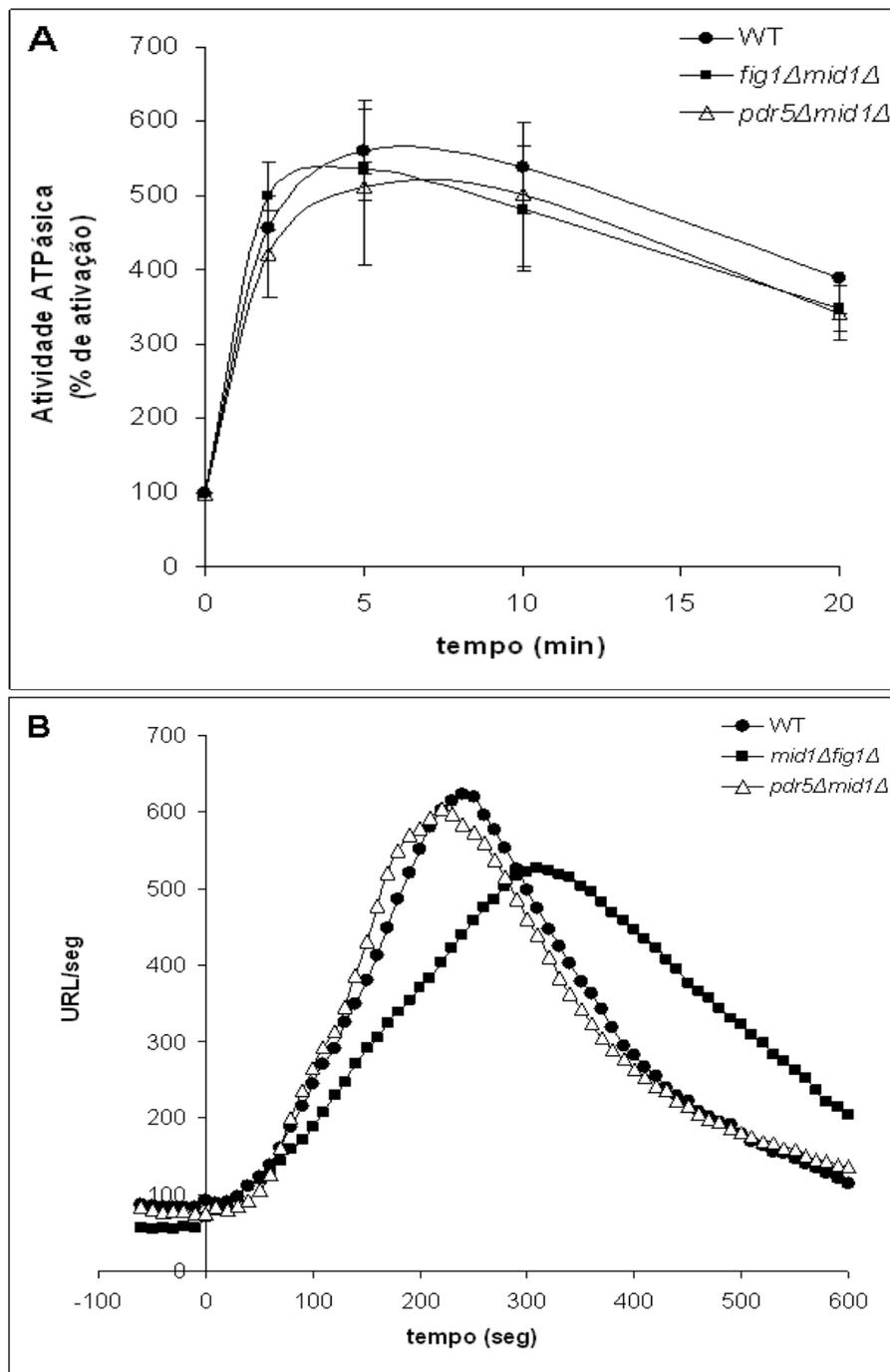


Figura 12 – Atividade enzimática (em %) da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática (Painel A) e sinal de cálcio (Painel B) em células de *S. cerevisiae* crescidas em glicose: cepas, selvagem BY4741 e mutantes *fig1Δmid1Δ* e *pdr5Δmid1Δ*, antes (tempo zero) e após a indução com 100 mM de glicose.

4.2 - Relação entre a sinalização intracelular de íons cálcio e a ativação, induzida por glicose, da H⁺ - ATPase

Temos demonstrado nos últimos anos (Trópia, M. J. M. e cols., 2006; Pereira, M. B. e cols., 2008), fortes evidências da importante relação entre o metabolismo do cálcio e a ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática. Diante do fato de que a regulação da homeostase de cálcio constitui uma rede complexa e por isso muito estudada, é necessário elucidar os eventos e os componentes de interação que existem entre essa sinalização e a nossa via de estudo.

4.2.1 - Sinalização do fosfatidilinositol em leveduras e a indução, desencadeada pela presença de glicose, da H⁺ - ATPase de membrana citoplasmática

A participação de uma via do tipo fosfatidilinositol no processo de ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, já foi demonstrada em vários estudos (Brandão, R. L. e cols., 1994; Coccetti, P. e cols., 1998 e Souza, M. A. A. e cols., 2001). Conforme descrito em modelos eucariotos mais evoluídos, a hidrólise do fosfatidilinositol mediada pela fosfolipase C gera duas importantes moléculas: o diacilglicerol e o inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) (Noh, D. Y. e cols., 1995).

Em mamíferos o IP₃ é responsável por estimular a mobilização de cálcio a partir de compartimentos intracelulares. Tisi, R. e cols., em 2004, relataram um papel para este derivado de fosfolípidios no metabolismo do cálcio em *S. cerevisiae*, pois demonstraram que a deleção do gene que codifica para a quinase responsável por converter o IP₃ a IP₄ e IP₅, (o gene *ARG82*), gera uma elevação dos níveis de IP₃ e um aumento significativo da sinalização intracelular de cálcio, mediada por Plc1p. Os resultados obtidos por Trópia, M. J. M. e cols., (2006), demonstram claramente que na ausência de Plc1p uma redução significativa da ativação da H⁺-ATPase pode ser observada, ao passo que na ausência da quinase Arg82p esta ativação é fortemente intensificada.

Para elucidar o verdadeiro papel dessa interrupção gênica da quinase Arg82p, avaliamos o fenótipo de um duplo mutante *arg82Δplc1Δ*. Nossos resultados demonstram que a ausência da fosfolipase C reverte a intensificação das respostas

apresentadas pelo mutante *arg82Δ* ($p < 0.05$), indicando que o comportamento desta cepa é consequência do acúmulo de IP_3 mediando um aumento dos níveis de cálcio citosólico livre. Na tabela 3 é possível observar que a taxa de extrusão de prótons do duplo mutante é semelhante aquela observada na cepa *plc1Δ* ($p > 0.05$). É importante salientar que na ausência da fosfolipase C não há hidrólise do PIP_2 e, portanto a produção de IP_3 na célula está comprometida e os níveis desta molécula estão muito baixos.

O monitoramento de um sinal de cálcio expressivo induzido por glicose, também foi realizado para os três mutantes (*arg82Δ*, *plc1Δ* e *arg82Δplc1Δ*) e o mesmo perfil de resposta foi encontrado. Na figura 13 está claro que o sinal exacerbado obtido no mutante que acumula IP_3 , é abolido quando a produção deste sinalizador é reduzida pela deleção do gene *PLC1*.

Tabela 3 – Efeito da adição de glicose 100 mM, sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de *S. cerevisiae* (PJ69-2a) e seus mutantes *arg82Δ*, *plc1Δ* e *arg82Δplc1Δ*.

“Background”	Fonte de crescimento	Indução	Cepa	[mmol H ⁺ .h ⁻¹ (g cel.) ⁻¹]
PJ69-2 ^a	Glicose	Glicose	Selvagem	0.426 ± 0.042
			<i>arg82Δ</i>	0.887 ± 0.124 ^{a,b}
			<i>plc1Δ</i>	0.129 ± 0.013 ^a
			<i>arg82Δplc1Δ</i>	0.198 ± 0.081 ^{a,b}

^aAs médias mostradas são estatisticamente diferentes daquela apresentada pela cepa selvagem.

^bAs médias são estatisticamente diferentes entre si.

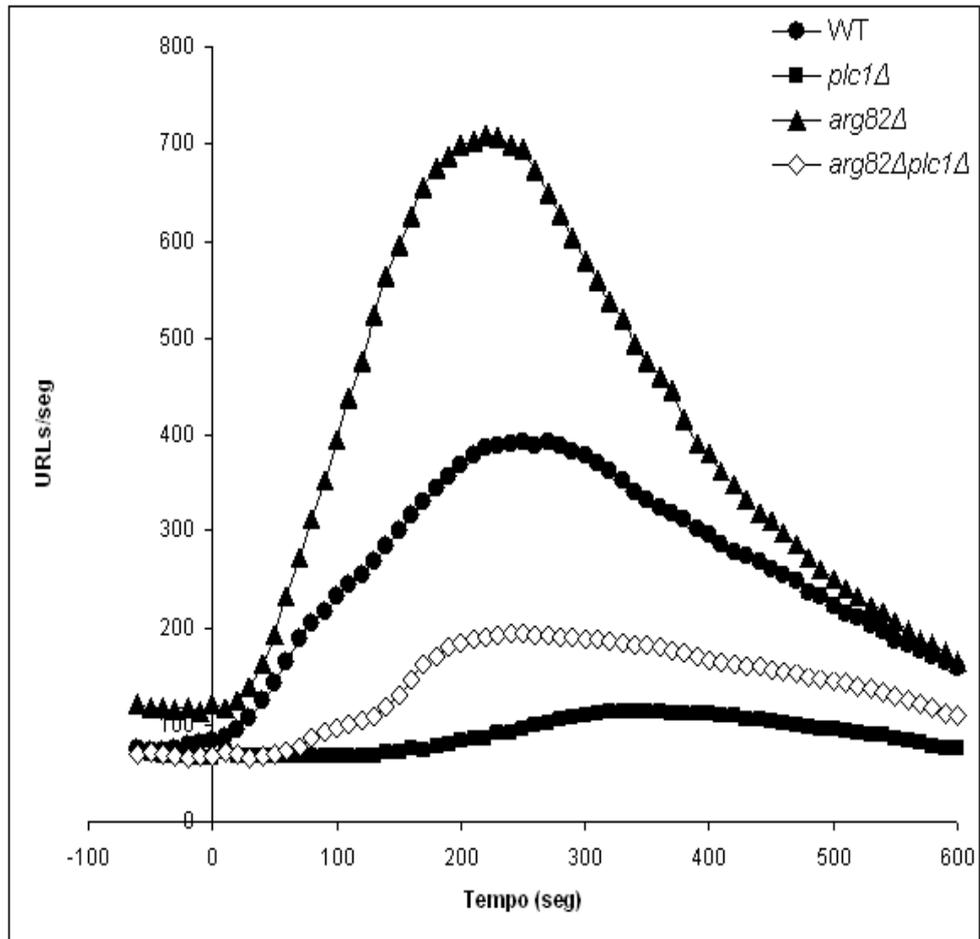


Figura 13 – Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *S. cerevisiae*: selvagem PJ69-2a; *arg82Δ*, *plc1Δ* e *arg82Δplc1Δ*. Células expressando apoaecorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos.

4.2.2 - Envolvimento do canal TRP de membrana vacuolar, Yvc1p, na ativação induzida por açúcar da H⁺- ATPase de membrana citoplasmática

Em células de levedura já se sabe que os fosfolipídios são sintetizados no retículo endoplasmático (Kohlwein, S. D. e cols., 1996), através de mecanismos altamente conservados em eucariotos (Athenstaedt, K. & Daum, G., 1997 e Athenstaedt, K. e cols., 1999), mas o envolvimento do metabolismo do fosfatidilinositol na sinalização de cálcio neste organismo ainda está pouco elucidado. A possível relação do acúmulo de IP₃ descrito, com a elevação dos níveis de Ca⁺² não está bem estabelecida, já que no genoma de leveduras não foi encontrado nenhum receptor para IP₃, homólogo, aquele encontrado em mamíferos (Wera, S. e cols., 2001). Dentre as várias questões importantes nesta provável via de sinalização, não está claro se os compartimentos de estoque de cálcio são sensíveis a presença desta molécula sinalizadora e se, para responder a tal sensibilidade, eles apresentam algum receptor para o inositol-1,4,5- trifosfato.

Mais recentemente um transportador de cálcio intracelular foi identificado na membrana do vacúolo. O Yvc1p é um homólogo dos canais receptores de potencial transiente (TRPs) presentes em células animais. Sabe-se que esta organela constitui o principal compartimento de estoque de cálcio em leveduras e sendo assim a identificação deste canal como liberador de cálcio vacuolar em *S. cerevisiae* faz-se um achado muito importante. Pouco se sabe sobre as funções fisiológicas desta proteína, mas acredita-se que ela seja induzida por concentrações micromolares de cálcio livre no citoplasma, por mudanças no gradiente da membrana vacuolar e ainda em resposta a hiperosmolaridade (Palmer, C. P. e cols., 2001; Denis, V. & Cyert, M. S., 2002 e Zhou, X. L. e cols., 2003).

Diante destes achados decidimos investigar um hipotético envolvimento desta proteína, Yvc1p, no sinal de cálcio e na ativação da H⁺ - ATPase de membrana, ambos induzidos por glicose. De acordo com os dados apresentados na tabela 4 a taxa de efluxo de prótons, induzida tanto por glicose quanto por galactose, está comprometida quando o gene que codifica para o Yvc1p está ausente, já que nestas condições os níveis de acidificação extracelular são muito menores (menos de 50%) do que aqueles obtidos na cepa selvagem correspondente (p<0.05). Na figura 14,

painel A, é possível observar que a ativação da ATPase induzida por glicose, foi também significativamente reduzida no mutante *yvc1Δ*. Quando medimos o sinal de cálcio pelo método da aequorina, o mesmo perfil se repetiu claramente (figura 14 – painel B), ou seja, sem o Yvc1p, há um comprometimento da resposta “TECC”, induzida por glicose.

Considerando que a sinalização de cálcio mostrou-se sensível ao acúmulo de IP₃ e também à ausência do canal liberador do Ca⁺² estocado no vacúolo, o Yvc1p; propusemos uma possível relação entre este canal e a molécula sinalizadora, IP₃. Nesta interação, o Yvc1p poderia ser o transportador sensível ao inositol-1,4,5-trifosfato e sua atividade seria diretamente proporcional ao aumento significativo dos níveis de IP₃ no citoplasma. Isto então acarretaria uma elevação dos níveis de cálcio citosólico, ou seja, uma ativação da resposta “TECC”.

Para analisarmos a relevância desta hipótese, utilizamos um duplo mutante *arg82Δyvc1Δ* e que a deleção do gene que codifica para o Yvc1p comprometeu as respostas obtidas com a deleção de *ARG82* quando analisamos o perfil de ativação da H⁺-ATPase e medimos o sinal de cálcio citosólico livre, ambos após a indução por glicose 100 mM.

Na Tabela 5 a drástica redução dos níveis de bombeamento de prótons pode ser observada para o duplo mutante em comparação ao mutante *arg82Δ* ($p < 0.05$). No monitoramento da indução, por glicose, de uma resposta “TECC” o sinal foi bastante reduzido no duplo mutante *arg82Δyvc1Δ* já que uma baixa elevação da bioluminescência basal foi observada após a adição do açúcar (figura 15).

Tabela 4 – Efeito da adição de açúcares (glicose ou galactose 100 mM) sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* (PJ69-2a) e o mutante *yvc1Δ*.

“Background”	Fonte de crescimento	Indução	Cepa	[mmol H ⁺ .h ⁻¹ (g cel.) ⁻¹]
PJ69-2 ^a	Glicose	Glicose Galactose	Selvagem	0.426 ± 0.042 0
	Galactose	Glicose Galactose		0.292 ± 0.031 0.219 ± 0.016
	Glicose	Glicose Galactose	<i>yvc1Δ</i>	0.201 ± 0.073 ^a 0
	Galactose	Glicose Galactose		0.162 ± 0.023 ^a 0.102 ± 0.011 ^a

^aAs médias mostradas são estatisticamente diferentes daquelas apresentadas pela cepa selvagem (p < 0.05).

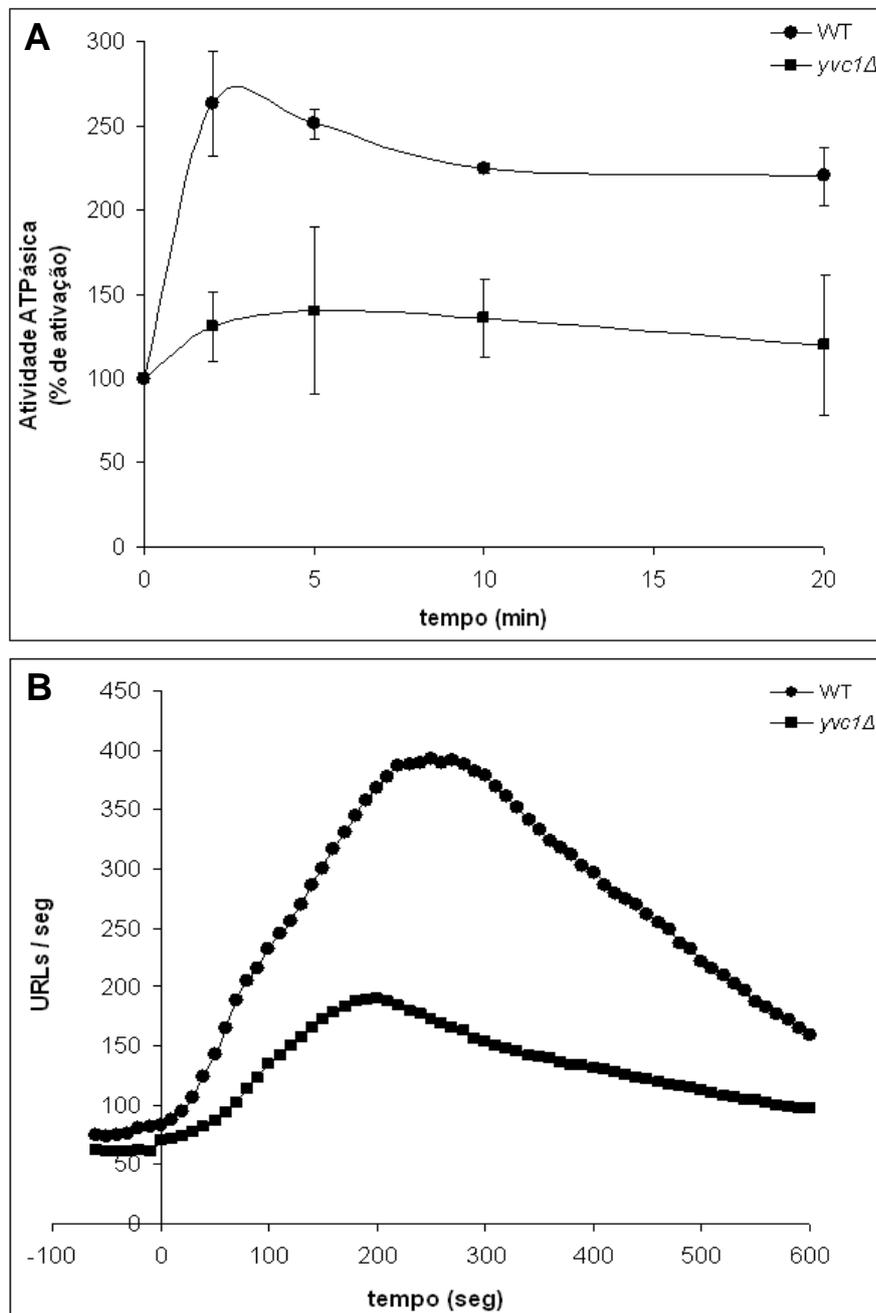


Figura 14 – Atividade enzimática (em %) da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática (Painel A) e sinal de cálcio (Painel B) em células de *S. cerevisiae* crescidas em glicose: cepas selvagem PJ69-2a e mutante *yvc1Δ*, antes (tempo zero) e após a indução com 100 mM de glicose.

Tabela 5 – Efeito da adição de glicose 100 mM, sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de *S. cerevisiae* (PJ69-2a) e seus mutantes *arg82Δ*, *yvc1Δ* e *arg82Δyvc1Δ*.

“Background”	Fonte de crescimento	Indução	Cepa	[mmol H ⁺ .h ⁻¹ (g cel.) ⁻¹]
PJ69-2 ^a	Glicose	Glicose	Selvagem	0.426 ± 0.042
			<i>arg82Δ</i>	0.887 ± 0.124 ^{a,b}
			<i>yvc1Δ</i>	0.201 ± 0.073 ^a
			<i>arg82Δyvc1Δ</i>	0.366 ± 0.119 ^b

^aA média mostrada é estatisticamente diferente daquela apresentada pela cepa selvagem (p<0.05).

^bAs médias mostradas são estatisticamente diferentes entre si (p< 0.05).

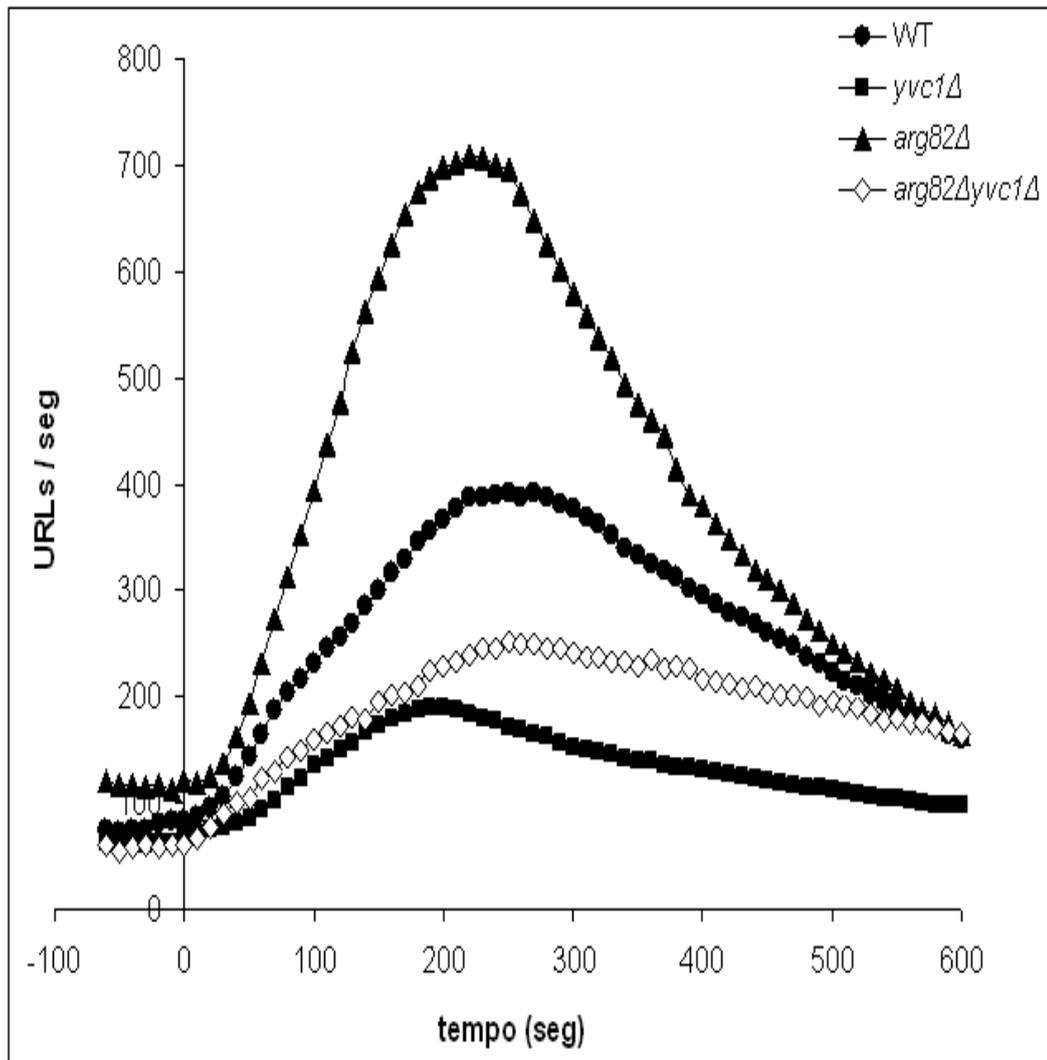


Figura 15 – Sinal de cálcio, induzido por glicose, em cepas *S. cerevisiae*: selvagem PJ69-2a, *arg82Δ*, *yvc1Δ* e *arg82Δyvc1Δ*. Células expressando apoaequorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos.

Os IPs, inosítóis polifosfatos, são moléculas sinalizadoras constituintes da via de sinalização do inositol, que por sua vez, representa um dos maiores mecanismos geradores de respostas celulares às condições do meio externo (Berridge, M. J., 1984).

Em células de mamíferos, a fosfolipase C hidrolisa o PI(4,5)P₂ presente na membrana citoplasmática em dois componentes DAG e IP₃. O primeiro permanece na membrana e serve como mensageiro secundário para ativação da proteína quinase C ao passo que o IP₃ também atua como mensageiro secundário, mas, para a mobilização de Ca⁺² a partir de estoques intracelulares (Kaibuchi, K. e cols., 1986; Wera, S. e cols., 2001). Ainda que todos esses componentes estejam presentes também em células de leveduras, a via na qual eles interagem ainda permanece obscura e vários estudos têm buscado compreendê-la.

O 2-aminoethoxydiphenyl borato (2-APB) tem sido usado para provar o envolvimento dos receptores de IP₃ na sinalização de cálcio, pois dentre os antagonistas da sinalização de fosfoinosítóis permeáveis à membrana, este constitui um dos mais eficientes (Bootman, M. D. e cols., 2002). Embora existam vários exemplos de 2-APB inibindo a sinalização de cálcio em células intactas, seu mecanismo de ação não está claro. Maruyama, T. e cols. (1997), demonstraram que a liberação de cálcio induzida por IP₃ é inibida pelo 2-APB através de um mecanismo concentração-dependente. De acordo com relatos da literatura, geralmente as concentrações de 2-APB utilizadas para uma inibição efetiva do sinal de cálcio encontram-se na faixa de 1 a 100 µM (Maruyama, T. e cols., 1997; Ascher-Landsberg, J. e cols., 1999; Silverman-Gavrila, L. B. & Lew, R. R., 2001 e Pal, M. e cols., 2001).

Dentro deste contexto, e ainda buscando elucidar o envolvimento da sinalização de cálcio, via IP₃ ou não, na ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase, decidimos avaliar um possível efeito deste composto sobre o metabolismo de cálcio em células de levedura e conseqüentemente, seus efeitos sobre o processo de ativação aqui estudado. Para uma análise inicial destes efeitos uma cepa selvagem foi submetida ao pulso de 50 µM (concentração final) de uma solução de 2-APB, antes da indução com glicose 100 mM, e a variação do pH extracelular foi acompanhada por 6 minutos. Os resultados apresentados na figura 16 demonstram que a presença do inibidor para receptores de IP₃, ocasionou uma redução significativa dos níveis de extrusão de prótons na cepa selvagem PJ69-2a (p<0.05).

Diante deste efeito observado, avaliamos também a resposta do mutante *arg82Δ* e do duplo mutante *arg82Δyvc1Δ*. Pudemos notar então, que na cepa com acúmulo de IP_3 , a *arg82Δ*, a presença do 2-APB resultou em uma queda na taxa de bombeamento de prótons e que esta redução foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Já no duplo mutante, este inibidor não teve nenhum efeito e as células responderam da mesma forma tanto na presença quanto na ausência do mesmo ($p > 0,05$) (figura 16).

Posteriormente, o efeito deste modulador foi analisado nestas diferentes células quanto ao sinal de cálcio induzido por glicose. Novamente, o mesmo efeito inibidor observado na taxa de bombeamento de prótons na cepa selvagem, se repetiu. A pré-incubação com o 2-APB também resultou em uma queda nos níveis de resposta “TECC” no mutante *arg82Δ*. Interessantemente, a adição do 2-APB não ocasionou nenhum decréscimo nas medidas de bioluminescência no duplo mutante *arg82Δ yvc1Δ* (figura 17).

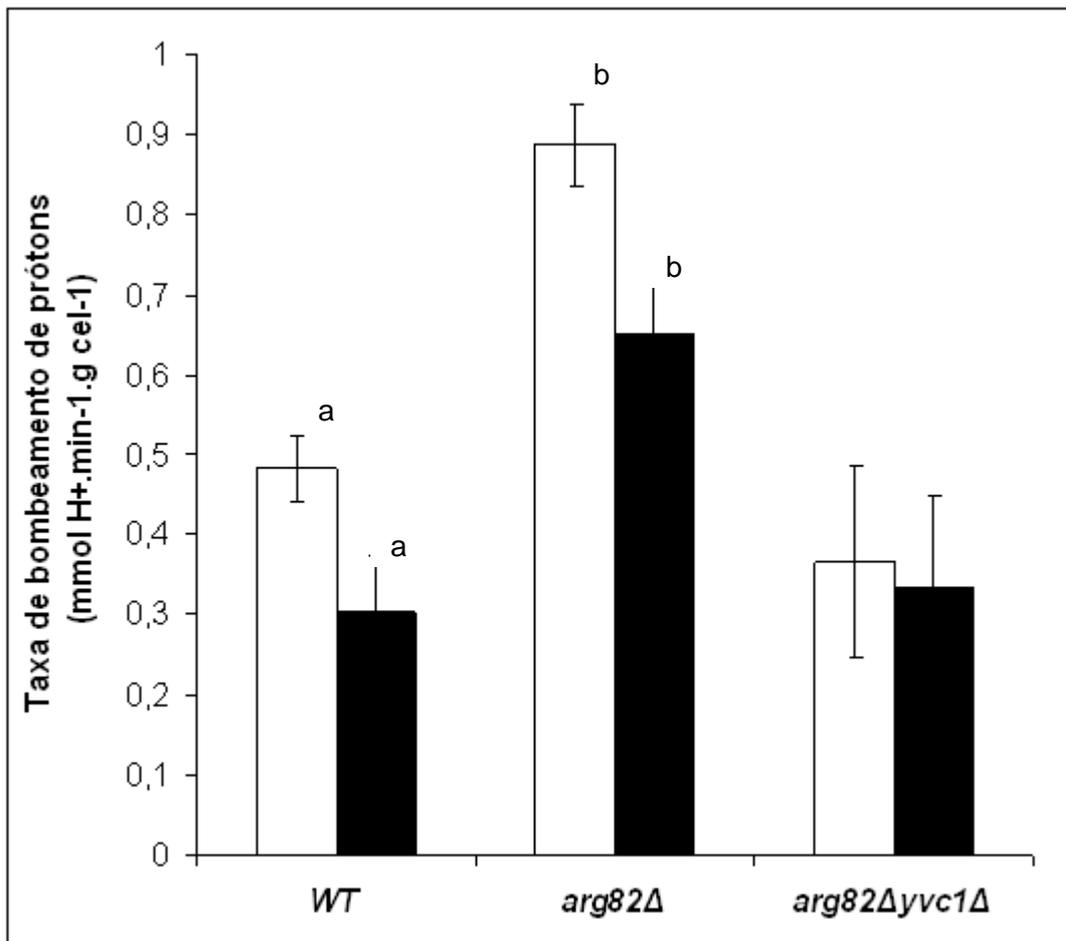


Figura 16 – Acidificação extracelular induzida por glicose (100 mM) nas cepas *S. cerevisiae*: selvagem PJ69-2a e mutantes *arg82Δ* e *arg82Δyvc1Δ*. Colunas não preenchidas correspondem à taxa de bombeamento de prótons na ausência de 2-APB 50 μM e as colunas preenchidas representam a taxa de bombeamento com pulso de 2-APB (50 μM) antes da indução com glicose 100 Mm.

^{a, b}As médias são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0.05$).

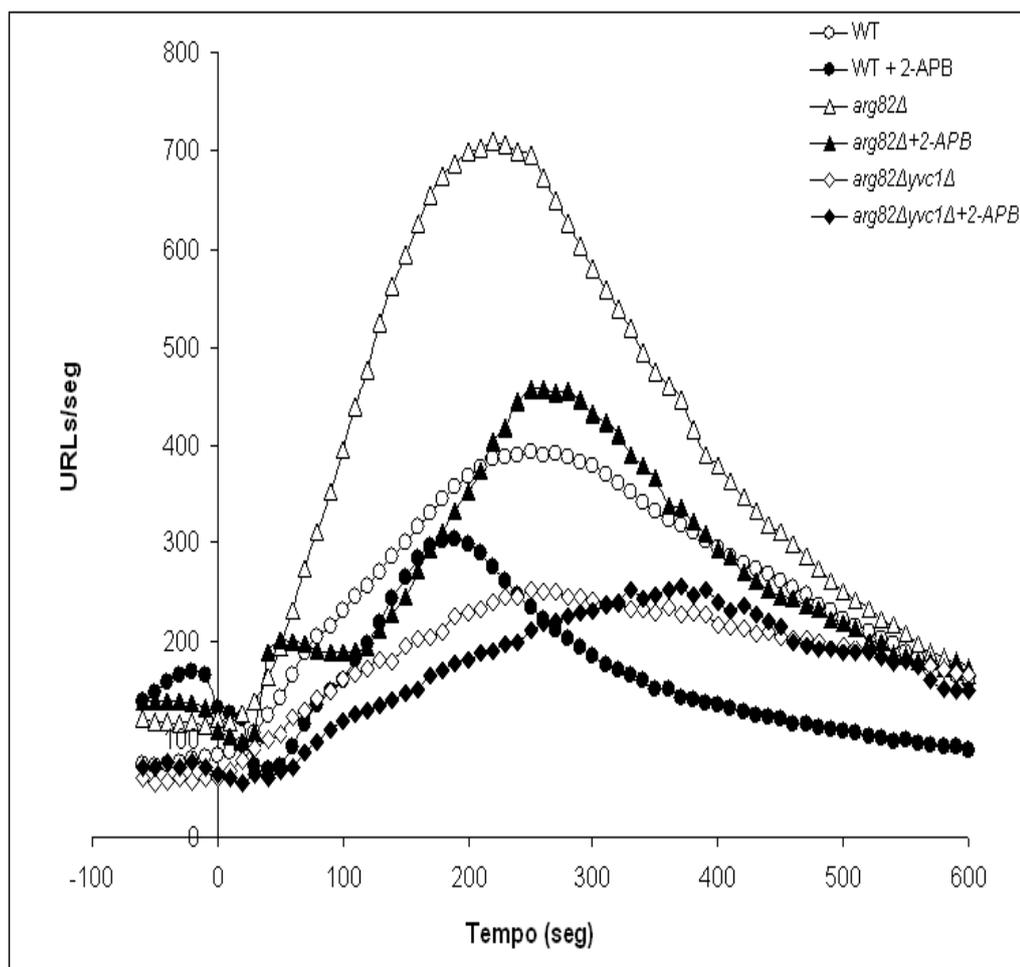


Figura 17 – Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *Saccharomyces cerevisiae*: selvagem PJ69-2a e mutantes *arg82Δ* e *arg82Δyvc1Δ*; na ausência (símbolos não preenchidos) e na presença (símbolos preenchidos) de 2-APB 50 μ M. Células expressando apoaequorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos.

4.2.3 – O cálcio vacuolar e a ativação induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática: sequestro X liberação

Em leveduras, o vacúolo constitui uma organela muito importante para o metabolismo e a fisiologia celular, pois representa o principal compartimento para o estoque de íons cálcio e estima-se que 95% do total deste mensageiro na célula encontrem-se no lúmen do mesmo (Halachmi, D. & Eilam, Y., 1989 e Dun, N. J. e cols., 1994). Com este importante papel na homeostase do cálcio, Trópia, M. J. M. e cols. (2006), já demonstraram que proteínas de membrana do vacúolo participam efetivamente da regulação do mecanismo de ativação da H⁺-ATPase após indução com glicose. Neste trabalho ficou claro o envolvimento da Ca²⁺ - ATPase, Pmc1p e foi sugerida uma necessidade de inibição da atividade desta bomba na mediação do sequestro de cálcio para que a elevação da atividade da ATPase de membrana citoplasmática não fosse comprometida.

Considerando que no presente trabalho evidenciamos a participação do Yvc1p na via de estudo, provavelmente pela liberação do cálcio vacuolar, construímos um duplo mutante com deleção tanto do gene que codifica para a bomba Pmc1p, quanto do gene *YVC1*. Acreditamos que nestas condições o sequestro e a liberação de cálcio no vacúolo, estariam ambos quase que totalmente abolidos na célula.

Os resultados apresentados na figura 17, painel A, demonstram que o duplo mutante apresentou uma resposta semelhante aquela observada no mutante *yvc1Δ* ($p > 0.05$) e que a deleção deste canal reverteu o fenótipo da cepa *pmc1Δ* ($p < 0.05$), que apresentava um nível de acidificação extracelular levemente maior que a cepa selvagem correspondente. Quando a atividade enzimática específica foi medida nestas mesmas cepas, o perfil de respostas foi exatamente o mesmo obtido na medida indireta da ativação da H⁺-ATPase (figura 18, painel B). As respostas foram reforçadas quando o sinal de cálcio foi avaliado nos mesmos mutantes e nas mesmas condições descritas acima (figura 19).

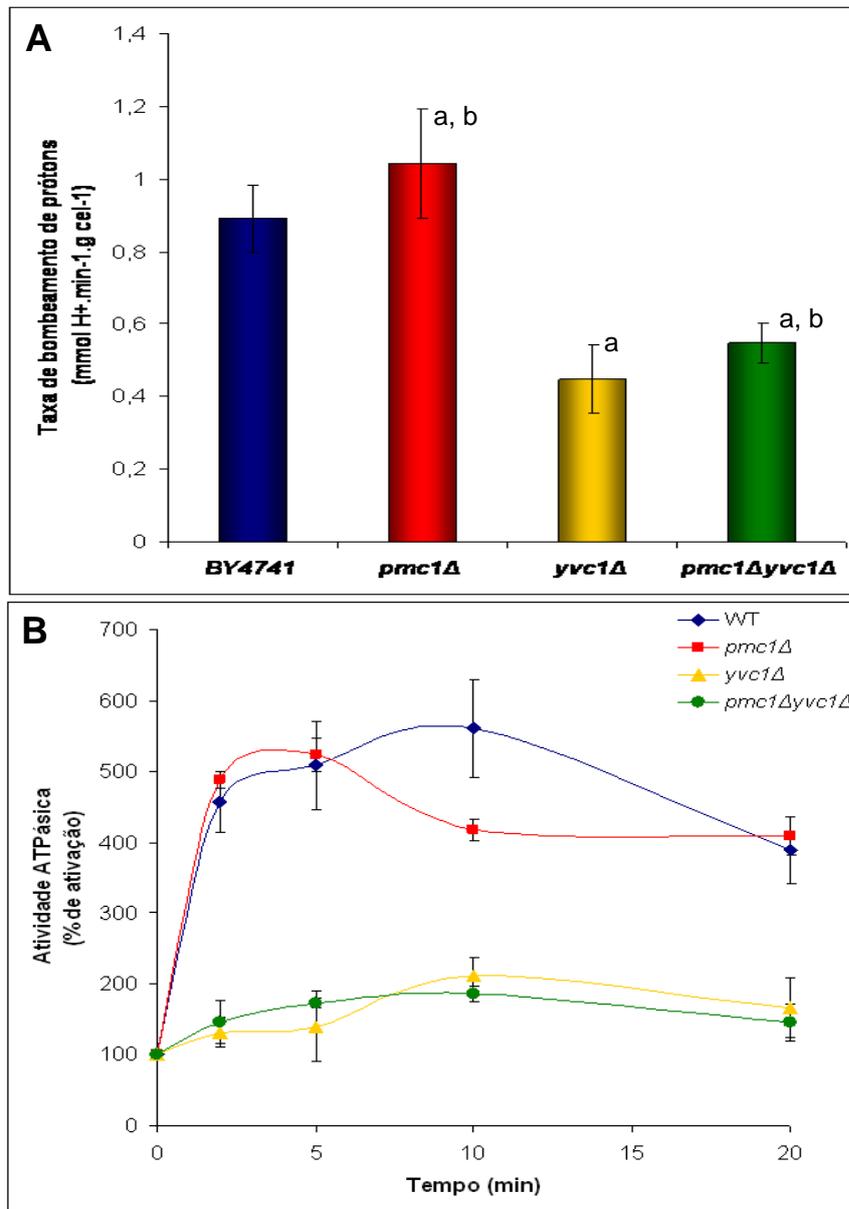


Figura 18 – Medida da ativação, induzida por glicose (100 mM), da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática em células de *S. cerevisiae* crescidas em glicose. As cepas utilizadas foram: selvagem BY4741 e mutantes *pmc1Δ*, *yvc1Δ* e *pmc1Δyvc1Δ*. Painel A – Medida da taxa de bombeamento de prótons. Painel B – Medida da atividade enzimática específica, em % de ativação. O ATP foi utilizado a uma concentração final de 2 mM.

^aAs médias mostradas são estatisticamente diferentes daquela apresentada pela cepa selvagem ($p < 0.05$).

^bAs médias mostradas são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0.05$).

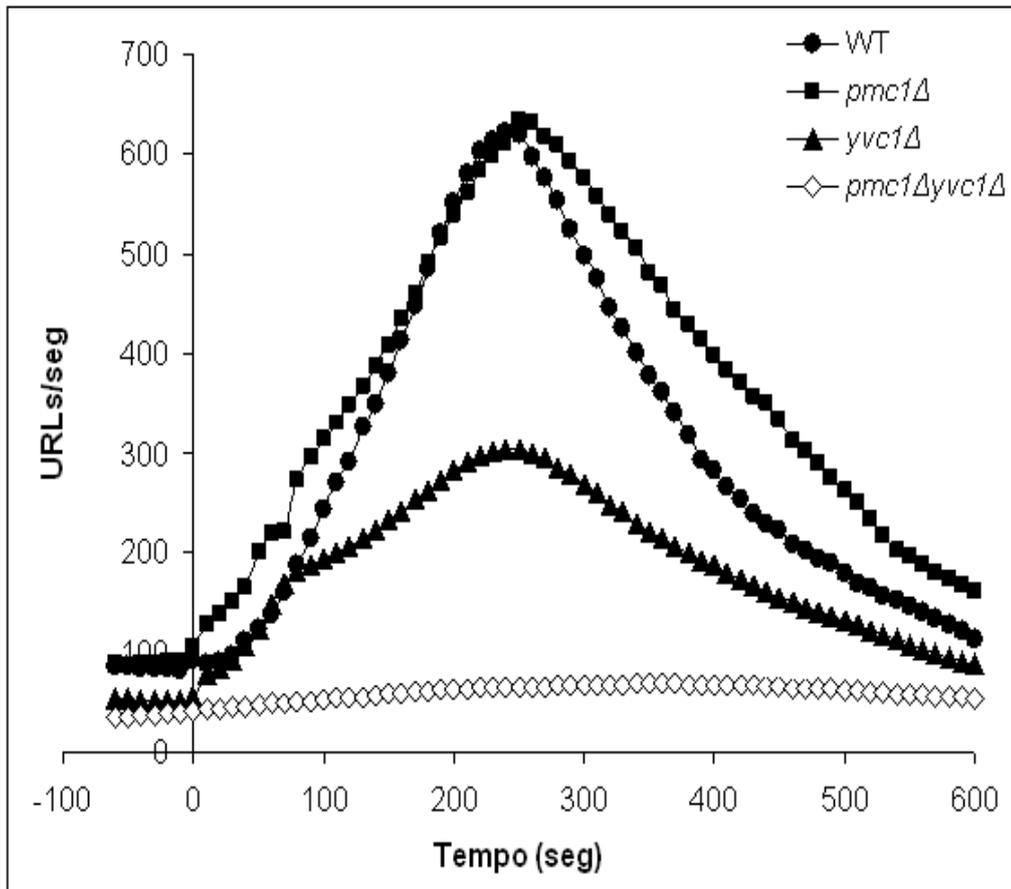


Figura 19 – Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *Saccharomyces cerevisiae*: selvagem BY4741 e mutantes *pmc1Δ*, *yvc1Δ*, e *pmc1Δyvc1Δ*. Células expressando apoaequorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos.

4.3 - Papel do sensor Snf3p na homeostase de cálcio e na ativação, induzida por glicose, da H⁺ - ATPase

Em 2001, Souza, M. A. A. e cols., demonstraram que somente o sensor Snf3p é requerido para uma ativação normal, induzida por glicose, da H⁺-ATPase e que apesar de se trabalhar em condições com alta concentração de glicose, o sensor Rgt2p caracterizado como sendo de baixa afinidade, não compunha essa via de ativação. Ozcan, S. e cols. (1996b), sugeriram que uma mudança conformacional afetaria o domínio C-terminal e este iria interagir com outros componentes da via, transmitindo o sinal não somente para a expressão dos HXTs.

É sabido que a cepa mutante *snf3Δ* apresenta altos níveis de cálcio celular total, mas uma resposta “TECC” significativamente comprometida quando comparada a sua selvagem correspondente, sugerindo que nesta célula o cálcio está estocado no vacúolo e sua liberação não ocorre. Estas respostas são ainda mais acentuadas quando as células são crescidas e posteriormente induzidas com galactose (Trópia, M. J. M. e cols., 2006).

Quando o balanço entre os metabólitos de glicose (glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato) é desfeito em consequência da ausência da fosfoglucomutase 2 (Pgm2p), a ativação da H⁺-ATPase é drasticamente reduzida devido a um sequestro excessivo do cálcio citosólico (Trópia, M. J. M. e cols., 2006).

Diante destes fenótipos apresentados pelo mutante *snf3Δ* e na tentativa de elucidar a ação desta proteína na homeostase de cálcio construímos o duplo mutante *pmc1Δsnf3Δ* baseados também nos relatos de Aiello, D. P. e cols.. (2004) que demonstraram que em uma cepa *pgm2Δ*, os defeitos na homeostase do cálcio eram uma consequência da hiper ativação da Ca²⁺- ATPase vacuolar, Pmc1p. Medimos então neste duplo mutante, a taxa de bombeamento de prótons induzida tanto por glicose quanto por galactose para avaliar o efeito de diferentes condições de regulação de cálcio devido às diferenças nas concentrações de gli-1-P e gli-6-P.

Os níveis de acidificação extracelular apresentados na tabela 6 demonstram que na ausência do gene que codifica para a bomba vacuolar Pmc1p, a deleção de *SNF3* não afetou a taxa de bombeamento de prótons. Sendo que a ativação parcial apresentada pelo mutante *snf3Δ*, é totalmente revertida no duplo mutante em todas as condições e induções avaliadas. É possível observar que principalmente quando as

células foram crescidas e induzidas com galactose, condição de excesso de gli-1-P e maiores níveis de acúmulo de cálcio, na qual a ausência de *SNF3* ocasionava uma queda mais acentuada da atividade enzimática, a falta de *PMC1* retornou a ativação aos níveis apresentados pela cepa selvagem ($p > 0.05$).

Estes resultados reforçam a hipótese de que a cauda C-terminal do sensor *Snf3p*, estimulada pelo balanço entre os níveis de gli-1-p e gli-6-P, atue na inibição de *Pmc1p* e consequente redução do sequestro dos íons cálcio para o vacúolo. Desta forma a garantia de disponibilização de cálcio no citoplasma promoveria a ativação, induzida por glicose, da H^+ -ATPase de membrana.

Tabela 6 – Efeito da adição de açúcares (glicose ou galactose 100 mM) sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de *S. cerevisiae* (BY4741) e seus mutantes *pmc1Δ*, *snf3Δ* e *snf3Δpmc1Δ*.

“Background”	Fonte de crescimento	Indução	Cepa	[mmol H ⁺ .h ⁻¹ (g cel.) ⁻¹]
BY4741	Glicose	Glicose	Selvagem	0.892 ± 0.069
	Galactose	Galactose		0
	Glicose	Glicose	<i>pmc1Δ</i>	0.451 ± 0.031
	Galactose	Galactose		0.259 ± 0.016
	Glicose	Glicose	<i>pmc1Δ</i>	1.143 ± 0.150 ^a
	Galactose	Galactose		0
	Glicose	Glicose	<i>snf3Δ</i>	0.420 ± 0.003
	Galactose	Galactose		0.301 ± 0.007
	Glicose	Glicose	<i>snf3Δ</i>	0.642 ± 0.046 ^{a,b}
	Galactose	Galactose		0
	Glicose	Glicose	<i>pmc1Δsnf3Δ</i>	0.212 ± 0.033 ^{a,b}
	Galactose	Galactose		0.134 ± 0.021 ^{a,b}
Glicose	Glicose	<i>pmc1Δsnf3Δ</i>	0.866 ± 0.038 ^b	
Galactose	Galactose		0	
	Glicose			0.520 ± 0.033 ^b
	Galactose			0.208 ± 0.008

^aAs médias mostradas são estatisticamente diferentes daquelas apresentadas pela cepa selvagem (p<0.05).

^bAs médias mostradas são estatisticamente diferentes entre si (p< 0.05).

4.4 - Controle das duas vias distintas que promovem a ativação, induzida por glicose da H⁺ - ATPase

Considerando que na sinalização celular, vários estímulos podem resultar em um mesmo efeito final, assim como um único sinal externo pode ativar mais de uma via de sinalização, também na elucidação do processo de ativação da H⁺-ATPase essas afirmações foram consideradas. Sendo assim, Trópia, M. J. M. e cols. (2006), sugeriram que ao ser internalizada e fosforilada, a glicose promove a indução de duas vias distintas que contribuem de forma aditiva e independente na ativação da H⁺-ATPase. Estas vias seriam encabeçadas, cada uma, por duas proteínas específicas, O sensor Snf3p poderia estar conectado a sinalização intracelular de cálcio dependente de gli-1-P, ao passo que Gpa2p sensibilizada por níveis de gli-6-P, poderia atuar sobre a fosfolipase C induzindo a produção de DAG e IP₃ e controlando a entrada de cálcio do meio extracelular. O resultado líquido da atuação destas duas vias seria a modulação dos níveis citosólicos de cálcio.

Para uma melhor compreensão destas vias e das proteínas que as compõem novas combinações de duplas deleções foram feitas e suas respostas analisadas.

Primeiramente construímos o duplo mutante *pmc1Δgpa2Δ*, no qual teríamos teoricamente a ausência de uma proteína componente de cada um dos braços distintos para a ativação da ATPase. Os valores de acidificação extracelular encontram-se na tabela 7 e demonstram que o duplo mutante apresentou uma taxa de bombeamento de prótons semelhantes ao mutante *pmc1Δ* ($p > 0.05$) e a sua selvagem correspondente ($p > 0.05$). Como o mutante *gpa2Δ* apresenta uma resposta parcial na ativação da H⁺-ATPase (0.741 mmoles de H⁺.min⁻¹. g de cel⁻¹; Souza, M. A. A. e cols., 2001),

Tabela 7 – Efeito da adição de glicose 100 mM, sobre a extrusão de prótons, em uma cepa selvagem de *S. cerevisiae* (BY4741), seus mutantes *pmc1Δ* e *gpa2Δ* e o duplo mutante *pmc1Δgpa2Δ*.

“Background”	Fonte de crescimento	Indução	Cepa	[mmol H ⁺ .h ⁻¹ (g cel.) ⁻¹]
BY4741	Glicose	Glicose	Selvagem	0.892 ± 0.093
			<i>pmc1Δ</i>	1.143 ± 0.150
			<i>gpa2Δ</i>	0.741 ± 0.034
			<i>pmc1Δgpa2Δ</i>	1.170 ± 0.062

A média mostrada é estatisticamente similar aquela apresentada pela cepa selvagem ($p > 0.05$).

Ainda estudando a regulação e a importância do funcionamento das duas vias distintas que culminam na ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, realizamos uma interrupção gênica de *PLC1* no mutante *snf3Δ*.

O duplo mutante obtido, *snf3Δplc1Δ*, foi utilizado para as medidas de acidificação extracelular e de atividade enzimática específica, ambas induzidas por glicose.

Surpreendentemente, o duplo mutante apresentou uma resposta similar a sua cepa selvagem correspondente ($p > 0.05$). Na figura 20, painéis A e B, fica claro que a dupla deleção reverteu os fenótipos de ambos os mutantes únicos, já que o mutante *snf3Δ* apresenta uma resposta parcial, ao passo que na cepa *plc1Δ* a ativação da H⁺-ATPase sofre uma redução bastante significativa.

Diante da hipótese de que cada um dos genes deletados codificam para proteínas que estão envolvidas em braços distintos da via de ativação da H⁺-ATPase, esperava-se uma queda drástica nos níveis de resposta do duplo mutante, pois, na ausência do sensor Snf3p a bomba Pmc1p não sofreria nenhuma inibição no sequestro do cálcio citosólico e sem a fosfolipase C a produção de IP₃ estaria comprometida e haveria uma queda tanto na captação quanto na liberação de cálcio para o citoplasma. Todos estes eventos impediriam o aumento dos níveis de cálcio citosólico livre e conseqüentemente a elevação da atividade basal da H⁺-ATPase.

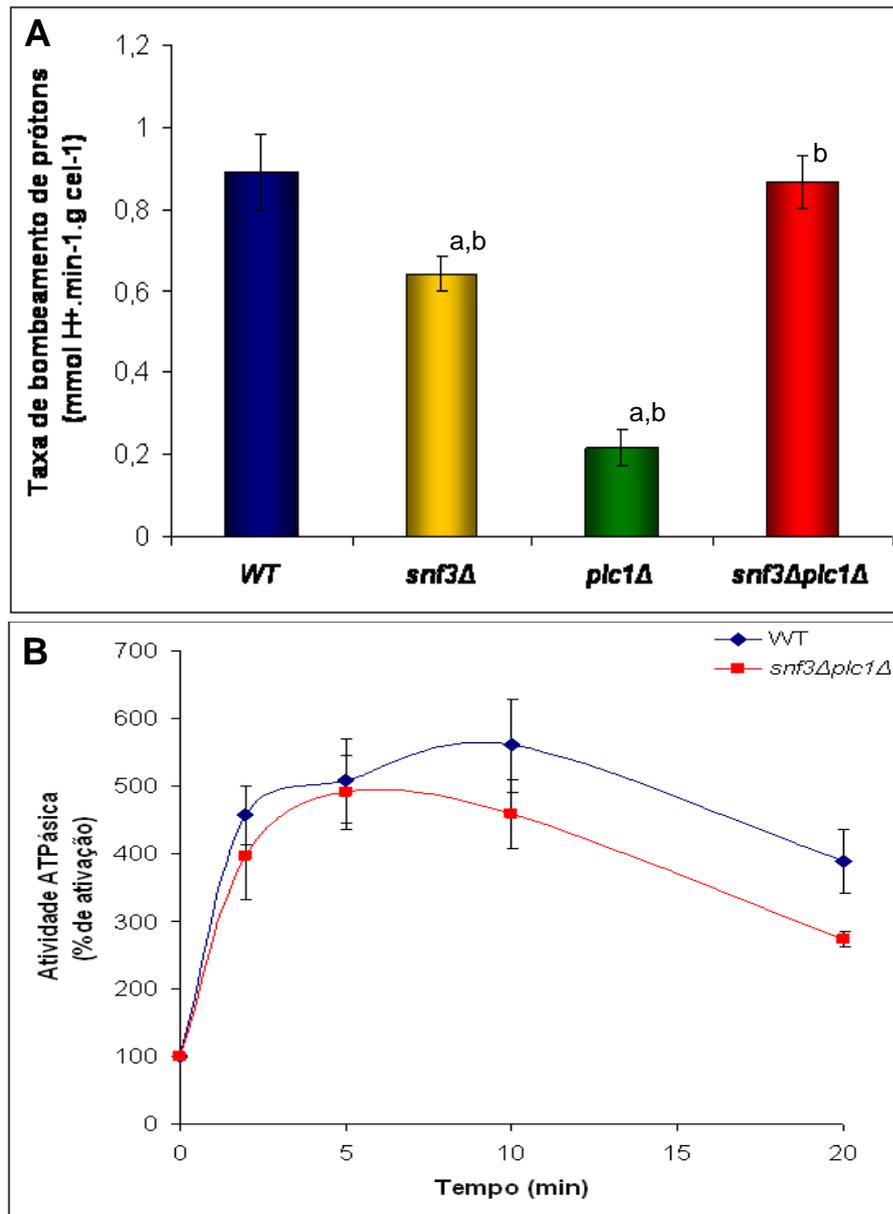


Figura 20 – Medida da ativação, induzida por glicose (100 mM), da H⁺-ATPase de membrana em células de *S. cerevisiae* crescidas em glicose. Painel A – Medida da taxa de bombeamento de prótons das cepas: selvagem BY4741, mutantes *snf3Δ* e *plc1Δ*; e o duplo mutante *snf3Δplc1Δ*. Painel B – Medida da atividade enzimática específica, em % de ativação. O ATP foi utilizado a uma concentração final de 2 mM e as cepas foram: selvagem BY4741 e o duplo mutante *snf3Δplc1Δ*.

^aAs médias mostradas são estatisticamente diferentes daquela apresentada pela cepa selvagem (p<0.05).

^bAs médias mostradas são estatisticamente diferentes entre si (p< 0.05).

Diante dessas controvérsias, e para reforçar a proposição de um modelo de ativação resultante de duas vias distintas, seguimos com novas investigações.

É sabido que o cálcio extracelular possui um papel importante no efluxo de prótons induzido por glicose, já que a presença do quelante de íons Ca^{+2} , não permeável, o EGTA, acarreta uma inibição do bombeamento de prótons (Trópia, M. J. M. e cols., 2006). Apesar disso, não está claro ainda como exatamente, a disponibilidade ou não deste cálcio externo atua no processo de ativação, induzido por açúcar, da H^+ -ATPase de membrana citoplasmática.

Sendo assim, alguns mutantes, com deleção em genes que codificam para importantes componentes desta sinalização foram selecionados e a taxa de bombeamento de prótons foi medida após pré-incubação com EGTA 12 mM.

Alguns resultados obtidos em nosso laboratório sugerem que a via ativada por *Snf3p* esteja mais intimamente envolvida com a mobilização de cálcio estocado, ao passo que o braço estimulado por *Gpa2p* pareça regular o influxo do cálcio extracelular e sugerem ainda que a presença de cálcio livre no meio externo seja importante para sinalizar a regulação dos níveis deste íon no citoplasma (Cardoso, A. S., 2005).

Avaliamos então, o efeito da modulação dos níveis de cálcio livre no meio externo sobre a ausência de cada uma das proteínas estudadas em comparação a resposta exibida pela cepa selvagem. O mutante *snf3Δ* apresentou uma redução significativa do efluxo de prótons, já parcial, quando em condição de indisponibilidade de cálcio extracelular ($p < 0.05$), isto não foi observado no mutante *plc1Δ*, onde a presença do quelante não influenciou na acidificação extracelular da cepa ($p > 0.05$). O mesmo ocorreu quando avaliamos a resposta da cepa *pmc1Δ* já que não houve diferença significativa nos valores obtidos na presença ou não de EGTA 12 mM.

Medimos ainda a taxa de bombeamento no duplo mutante *snf3Δplc1Δ* incubados ou não com o EGTA, e os níveis de extrusão de prótons foram bastante comprometidos nas células com o quelante ($p < 0.05$). Todos os resultados descritos acima se encontram na tabela 8.

Tabela 8 – Efeito da privação de cálcio extracelular sobre a extrusão de prótons, induzida por glicose (100 mM), em uma cepa selvagem de *S. cerevisiae* (BY4741) e seus mutantes *snf3Δ*, *plc1Δ*, *pmc1Δ* e *snf3Δplc1Δ*, pré-incubados com EGTA (12 mM).

“Background”	Fonte de crescimento	Indução	Cepa	[mmol H ⁺ .h ⁻¹ (g cel.) ⁻¹]
BY4741	Glicose	Glicose	Selvagem	0.892 ± 0.093 ^a
		+ 12 mM EGTA		0.541 ± 0.054 ^a
		Glicose	<i>snf3Δ</i>	0.642 ± 0.046
		+ 12 mM EGTA		0.428 ± 0.015 ^a
		Glicose	<i>plc1Δ</i>	0.216 ± 0.043
		+ 12 mM EGTA		0.204 ± 0.008
Glicose	<i>pmc1Δ</i>	1.043 ± 0.150		
+ 12 mM EGTA		0.984 ± 0.060		
Glicose	<i>snf3Δplc1Δ</i>	0.867 ± 0.066 ^a		
+ 12 mM EGTA		0.430 ± 0.033 ^a		

^aAs médias mostradas são estatisticamente diferentes entre si (p<0.05).

Decidimos estudar a influência do EGTA também na sinalização de cálcio em uma cepa selvagem. E com base no fato de ser o vacúolo a principal organela responsável pelo armazenamento deste íon, avaliamos também a resposta em um mutante com deleção no gene que codifica para a proteína responsável pelo sequestro do cálcio para este compartimento. Trabalhamos então com o mutante *pmc1Δ* e as mesmas condições descritas anteriormente foram utilizadas. Na cepa selvagem o sinal de cálcio foi intensamente reduzido na presença do EGTA ao passo que este quelante não teve nenhum efeito inibitório na cepa com deleção no gene *PMC1* (figura 21). Os resultados obtidos são então fortes evidências de que a presença do EGTA afeta claramente também a sinalização de cálcio.

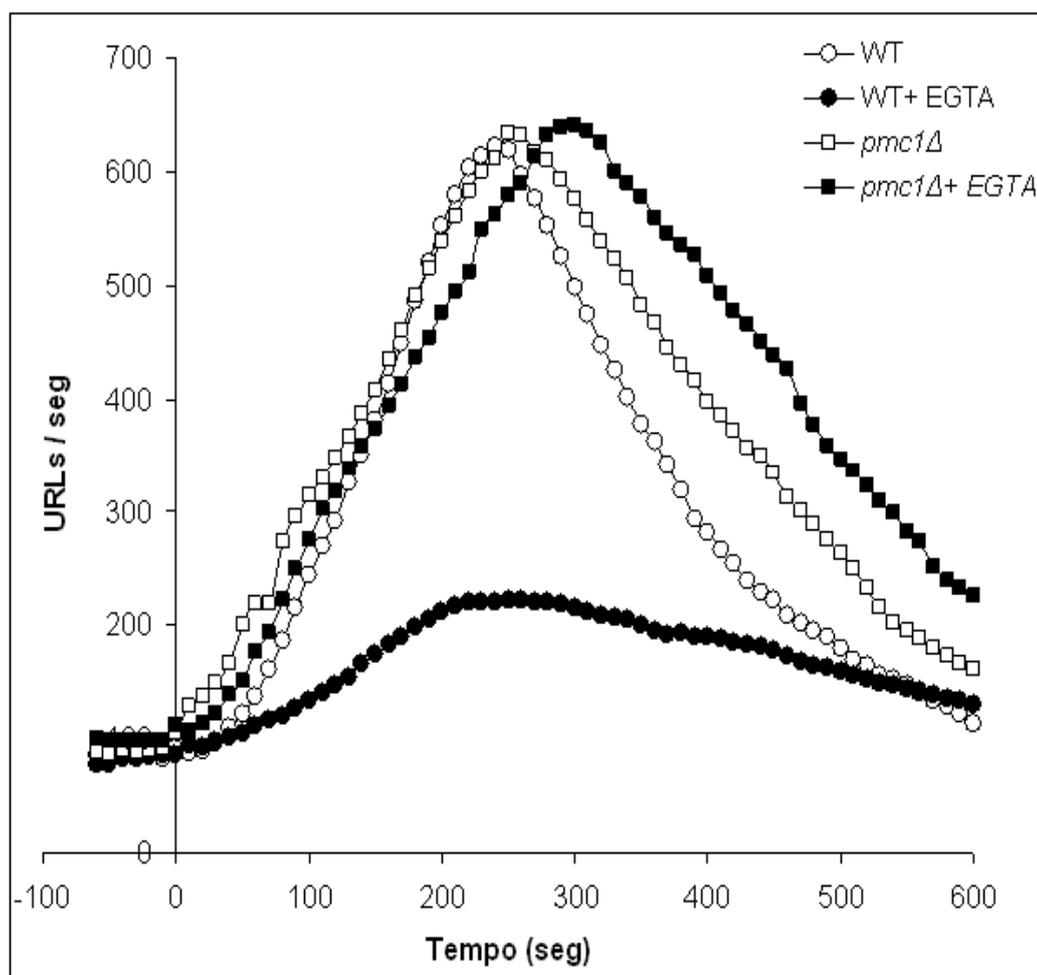


Figura 21 – Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *Saccharomyces cerevisiae*: selvagem BY4741 e mutante *pmc1*Δ; na ausência (símbolos não preenchidos) e na presença (símbolos preenchidos) de EGTA 12 mM. Células expressando apoaequorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente, para esgotamento de todos os nutrientes. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos.

4.5 - Participação de eventos envolvidos na regulação do cálcio intracelular, no mecanismo de ativação da H⁺ - ATPase

Problemas na sinalização de cálcio intracelular ocorrem normalmente, devido à ausência de captação de cálcio externo e/ou a um sequestro rápido e exacerbado do cálcio captado para os compartimentos intracelulares. (Fu, L. e cols., 2000; Tisi, R. e cols. 2002 e 2003 e Tokes-Fuzesi, M. e cols., 2002).

Na tentativa de entender como os mecanismos de acúmulo do cálcio em seus compartimentos, e, portanto, indisponibilidade do íon, podem estar relacionados à ativação da H⁺-ATPase; medimos os níveis de cálcio celular total em um grupo de cepas que apresentaram uma diferença significativa na ativação, induzida por glicose, da enzima, quando comparadas a resposta da cepa selvagem correspondente e também duplos mutantes com reversão dos fenótipos apresentados pelos mutantes únicos.

É possível observar na figura 22, que o mutante *snf3Δ*, quando em presença de galactose, apresentou níveis muito elevados de acúmulo de cálcio, significativamente diferente da cepa selvagem em qualquer uma das fontes de carbono, e do próprio mutante crescido em glicose ($p < 0.05$). A deleção do gene que codifica para a fosfolipase C também resultou em um acúmulo exacerbado do cálcio celular, cerca de três vezes maior que os níveis observados na selvagem correspondente nas mesmas condições ($p < 0.05$). Interessantemente, quando o cálcio celular total foi medido nos duplos mutantes que apresentaram uma recuperação nos níveis de ativação da H⁺-ATPase, este fenótipo de reversão também se repetiu.

Não houve diferença significativa na resposta apresentada pela cepa *pmc1Δsnf3Δ*, quando comparada a cepa selvagem em meio de crescimento suplementado com galactose ($p > 0.05$). Isto sugere que uma hiper ativação da bomba Pmc1p seja responsável pelo acúmulo observado no mutante *snf3Δ*, e ainda reforça a ideia de que o sensor Snf3p atue como regulador do sequestro de cálcio mediado por esta Ca⁺²- ATPase vacuolar.

O nível de cálcio total obtido pelo duplo mutante *snf3Δplc1Δ*, crescido em glicose, foi muito baixo, comparável a cepa selvagem ($p > 0.05$) e significativamente menor que o mutante com deleção apenas do gene *SNF3* ($p < 0.05$). Porém, o mais impressionante foi que quando comparada à cepa *plc1Δ*, a resposta deste duplo

mutante foi aproximadamente 10 vezes menor ($p < 0.05$). Este resultado explica a reversão dos baixos níveis de ativação da H^+ -ATPase nos mutantes *snf3Δ* e *plc1Δ*.

As recuperações dos níveis normais de acúmulo de cálcio observadas neste experimento são condizentes com as respostas apresentadas quando a ativação da H^+ -ATPase, induzida por glicose ou galactose, foi avaliada.

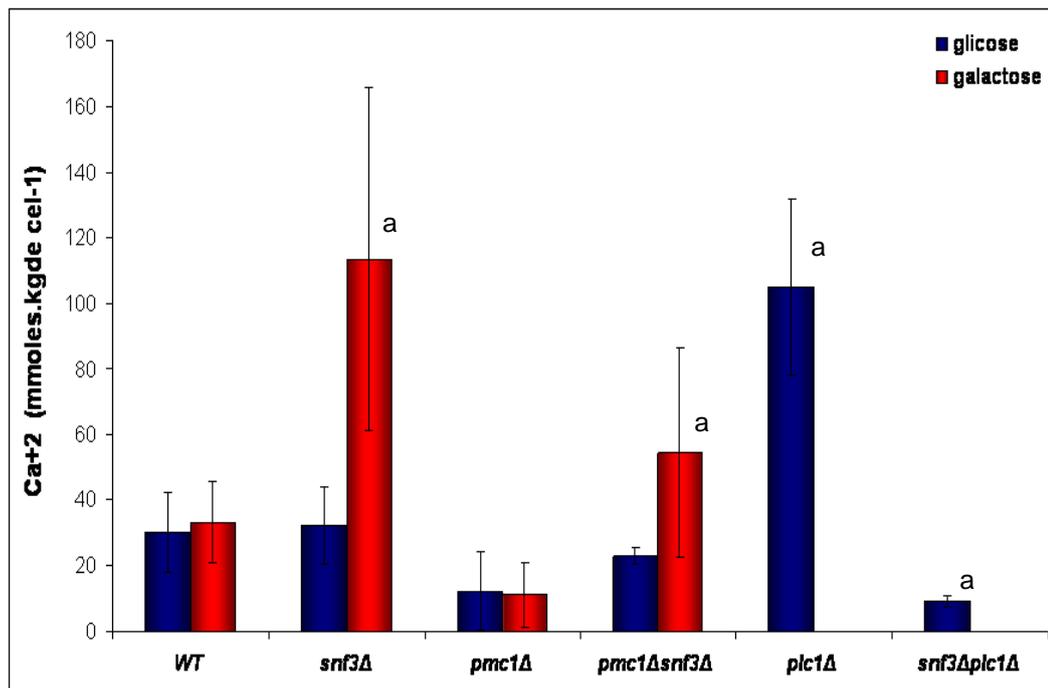


Figura 22 – Concentrações de cálcio celular total em cepas *S. cerevisiae* (background BY4741) crescidas em meio YP glicose (colunas azuis) ou YP galactose (colunas vermelhas). As cepas foram crescidas até a densidade de ± 1 DO_{600nm}/mL. Dez unidades DO_{600nm}, foram coletadas por centrifugação e lavadas com YP fresco. O Ca⁺² total foi então medido por espectrofotometria de absorção atômica.

^aOs valores das médias mostrados são estatisticamente diferentes daqueles apresentados pela cepa selvagem e entre si ($p < 0.05$).

Considerando que a bomba Pmc1p constitui um importante componente no metabolismo de cálcio em leveduras e diante destes resultados quanto ao acúmulo deste íon, optamos por instituir uma metodologia que nos permitisse avaliar a atividade desta Ca^{+2} -ATPase nas cepas e condições de interesse. Para tanto, foi necessária a extração e o fracionamento da membrana subcelular segundo Becherer, K. A. e cols. (1996).

De acordo com Lisman, Q. e cols. (2004), um fracionamento de membrana subcelular de leveduras, em gradiente de sacarose, apresenta algumas propriedades importantes. Nas 20 frações do topo ao fundo do tubo, observam-se, em faixas contínuas, concentrações maiores ou menores das membranas de cada organela. Seus dados demonstram que, a membrana citoplasmática encontra-se mais presente nas frações 17, 18, 19 e 20. Para a membrana do retículo endoplasmático, a coleta das frações de 3 a 11, parece ser a mais confiável, ao passo que na faixa de frações de 8 a 12 provavelmente está em maior proporção a membrana do complexo de golgi,

Diante destes relatos e tendo em vista que a proteína de nosso interesse encontra-se na membrana vacuolar, realizamos um ensaio de atividade ATPásica (Becher dos Passos, J. e cols., 2002), na presença ou não de 500 μM de CaCl_2 , concentração final, com cada uma das frações, isoladamente. Neste peneiramento foram selecionadas as frações que apresentaram níveis de atividade na presença de CaCl_2 significativamente superiores àqueles observados no ensaio realizado na ausência do íon ($p < 0.05$). Ao fim deste processo foram selecionadas as frações 15, 16, 17 e 18.

Para confirmar a presença da Ca^{+2} -ATPase e de uma maior concentração da membrana subcelular de vacúolo, estas frações foram submetidas também a um ensaio de atividade na presença de 500 μM de CaCl_2 acrescidos de 2mM, final, do quelante EGTA. As frações 16 e 17 apresentaram uma redução drástica nos níveis de atividade e na fração 15 essa redução também ocorreu, porém em níveis menos intensos. Por outro lado, a reposta da fração 18 não foi afetada pela presença do quelante. Diante disso passamos a utilizar uma mistura das frações 15, 16 e 17, para a obtenção da ativação da Ca^{+2} -ATPase vacuolar, Pmc1p.

Avaliamos então os efeitos da deleção de genes que codificam para proteínas envolvidas na via de ativação da H^+ -ATPase, sobre a atividade de Pmc1p. Os efeitos

foram também avaliados quanto à fonte de carbono utilizada no crescimento e na indução das células.

Os resultados obtidos na análise da cepa selvagem demonstram que esta atividade Ca^{+2} - ATPásica é significativamente maior em galactose ($p < 0.05$), condição na qual o balanço dos metabólitos de glicose está comprometido. Isto explicaria porque a ativação da H^{+} - ATPase é sempre inferior nestas condições quando comparada a resposta em glicose (Figura 23). Os dados demonstram ainda que as duas cepas mutantes que apresentam baixos níveis tanto da taxa de bombeamento de prótons quanto da atividade enzimática, *snf3Δ* e *plc1Δ*, possuem uma Ca^{+2} - ATPase significativamente mais ativa que a selvagem correspondente ($p < 0.05$).

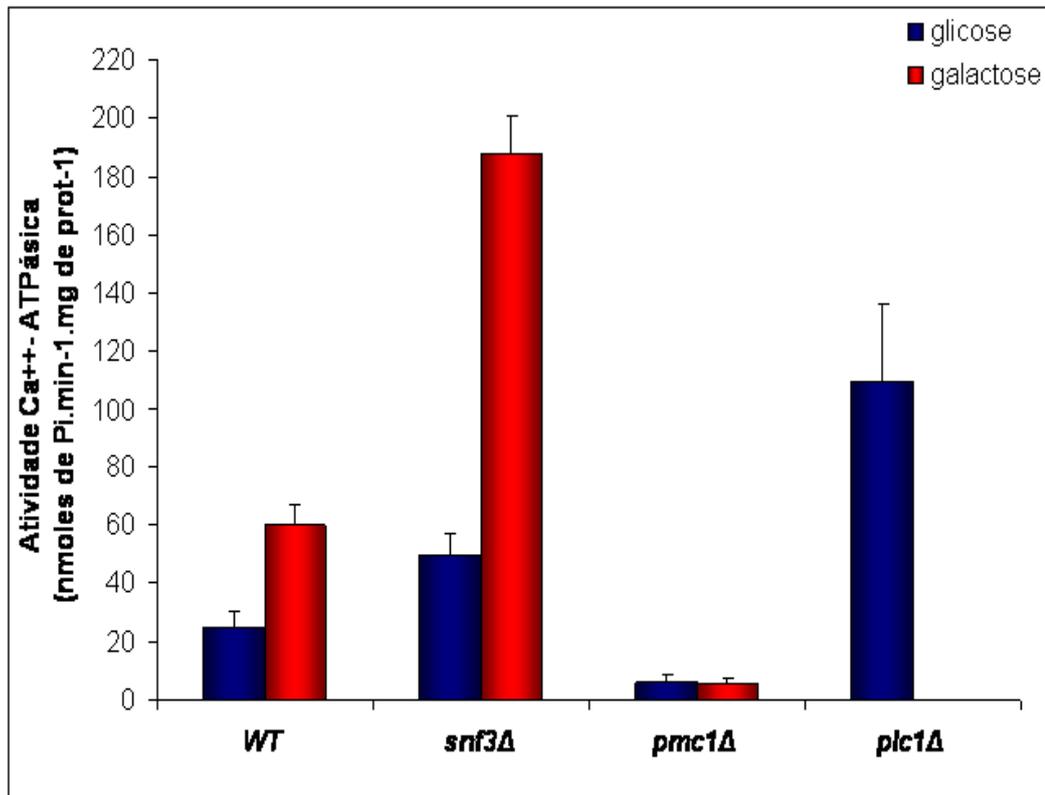


Figura 23 – Medida da atividade enzimática específica da Ca²⁺-ATPase, Pmc1p, em cepas *S. cerevisiae* (background BY4741) crescidas em meio YP glicose e induzidas com glicose 100 mM (colunas azuis) ou YP galactose e induzidas com galactose 100 mM (colunas vermelhas). As cepas foram crescidas em 500 mL de meio rico até atingirem DO_{600nm} = 1.0. O ATP foi utilizado a uma concentração final de 2 mM e a atividade expressa em nmoles de Pi. min⁻¹. mg de proteína⁻¹.

Todos os valores das médias mostrados são estatisticamente diferentes daqueles apresentados pela cepa selvagem em glicose ($p < 0.05$).

4.6 – Envolvimento da proteína quinase C, Pkc1p, na ativação, induzida por glicose, da H⁺ - ATPase de membrana citoplasmática

O metabolismo de glicose, constitui o fator mais importante na regulação pós-transcricional da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática de leveduras (Eraso, P. & Portillo, F., 1994 e De la Fuente, N. e cols., 1997). Ainda que o mecanismo molecular desta regulação não esteja totalmente esclarecido, vários estudos têm relatado a importância de uma fosforilação direta da enzima (Chang, A. & Slayman, C. W., 1991; Eraso, P. & Portillo, F., 1994 e Goosens, A. e cols., 2000).

Esta hipótese se baseia no fato de que a H⁺-ATPase apresenta uma interação inibitória da cauda C-terminal que limita o acesso do substrato e o transporte de prótons. Sendo assim, uma proteína quinase ainda desconhecida, seria responsável pela fosforilação de resíduos de serina e treonina, nas posições 899 e 912, respectivamente. Esta fosforilação desfaz a interação inibitória o que permite à enzima, adotar uma conformação mais ativa. (Diffley, J. F. X., 1992; Mason, A. B. e cols., 1998 e Portillo, F., 2000).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório propuseram a participação da proteína quinase C neste processo de fosforilação, sugerindo a existência de uma bifurcação na via PKC MAP quinase após observarem que a ativação, induzida por glicose, da H⁺ - ATPase, era claramente afetada em uma cepa *pkc1Δ* ao passo que em um mutante com deleção no gene que codifica para a Map quinase quinase, controlada diretamente por Pkc1p, a Bck1p, o processo de ativação da enzima, não estava comprometido quando comparado a cepa selvagem correspondente (Souza, M. A. A. e cols., 2001).

Embora tenha sido demonstrado que a proteína quinase C de leveduras apresenta sítios de ligação para o diacilglicerol e para fosfolipídios, dados obtidos por Schmitz, H. P. & Heinisch, J. J. (2003), sugerem que, ao contrário das outras proteínas quinase C similares, este subtipo não seja ativado por tais sinais.

Diante destes relatos e do fato de que a ativação da H⁺-ATPase é fortemente dependente de cálcio é possível suspeitar que a Pkc1p esteja envolvida na regulação do processo de ativação da enzima através do controle da sinalização de cálcio e não pela fosforilação direta da mesma.

Dentro deste contexto decidimos analisar o envolvimento da proteína quinase C no metabolismo de cálcio após a adição de glicose. Os resultados apresentados na figura 23 sugerem que a Pkc1p seja essencial para que o sinal de cálcio induzido pelo açúcar aconteça normalmente, já que na cepa *pkc1Δ* (figura 24 – painel B) não houve elevação dos níveis de cálcio citosólico livre após adição de glicose 100 mM, e esta elevação pode claramente ser observada quando a cepa selvagem foi induzida pela adição do açúcar (figura 24 – painel A). Novamente este efeito parece ser independente da via PKC MAP quinase, pois, após a indução com glicose, o mutante *bkc1Δ* (figura 24 – painel C) apresentou uma resposta “TECC”, ainda que esta resposta não tenha apresentado o mesmo perfil da cepa selvagem correspondente.

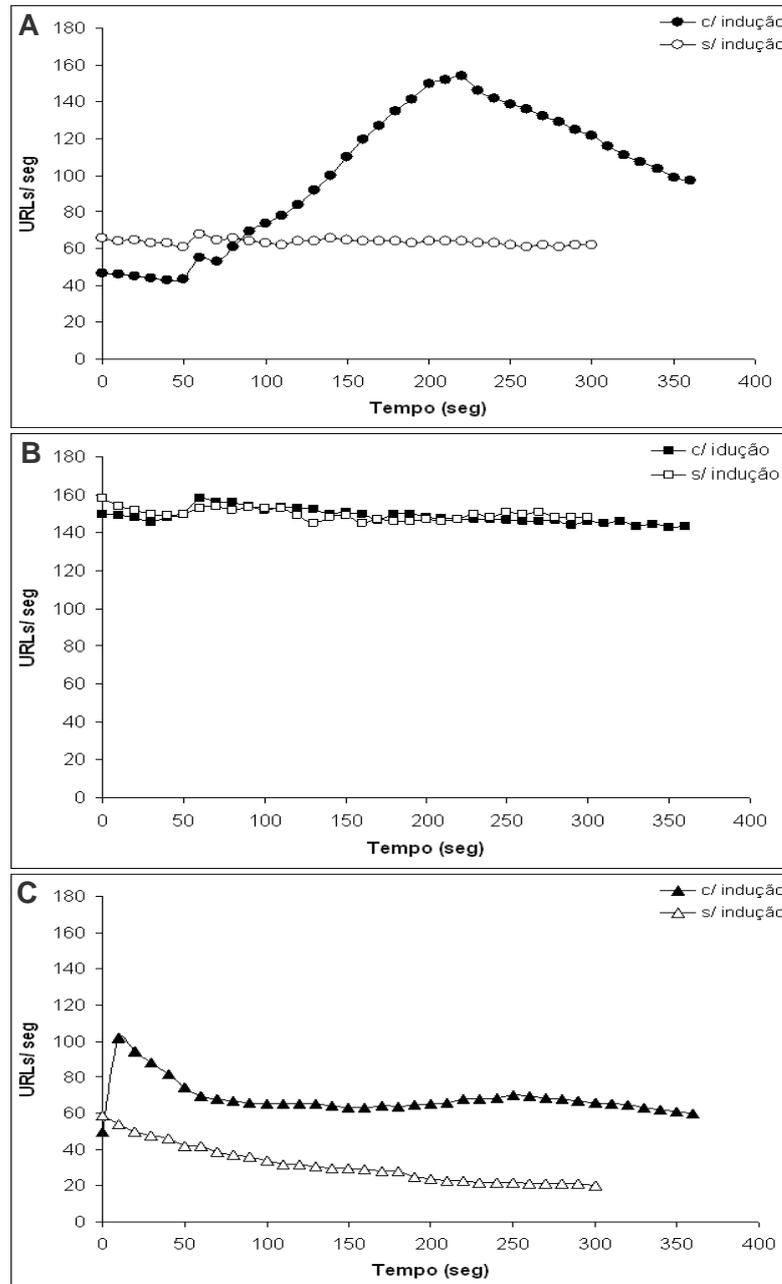


Figura 24 – Sinal de cálcio induzido por glicose em cepas *S. cerevisiae*: selvagem W303 (painel A) e mutantes *pkc1Δ* (painel B) e *bck1Δ* (painel C). Símbolos preenchidos representam as respostas após a adição de glicose e símbolos não preenchidos representam a resposta basal das células. Células expressando apoaquorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos, a temperatura ambiente. Então, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 6 minutos.

Discussão

5 – Discussão

Dentre os diversos sinais e estímulos presentes nos diferentes ambientes em que se encontram células de *Saccharomyces cerevisiae*, a glicose constitui a molécula sinalizadora mais importante, já que a re-adição da mesma a células com esgotamento de nutrientes produz uma gama de eventos de sinalização intracelular e induz a iniciação do processo de proliferação celular tal qual acontece em células de mamíferos na presença dos fatores de crescimento (Kaibuchi, K. e cols., 1986).

A ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática (Eraso, P. & Portillo, F., 1994 e De la Fuente, N. e cols., 1997), a indução de um sinal de cálcio citosólico (Nakajima-Shimada, J. e cols., 1991) bem como a ativação da proteína quinase C (Souza, M. A. A. e cols., 2001) e da proteína quinase A (Kaibuchi, K. e cols., 1986), são apenas alguns exemplos de importantes vias induzidas por glicose neste microorganismo.

Diante do fato de ser a H⁺-ATPase a principal e mais abundante proteína presente na membrana citoplasmática de fungos e que sua atividade eficiente é essencial para a viabilidade da célula (Portillo, 2000 e Ambesi, A. e cols., 2000); a compreensão das vias de regulação desta enzima com uma meia vida relativamente longa (Benito, B. e cols., 1991) constitui uma área de estudo muito importante.

Nos últimos anos vários trabalhos realizados em nosso laboratório têm procurado elucidar a via de sinalização responsável pela regulação pós-transcricional da H⁺-ATPase de levedura, mediada pelo metabolismo de glicose. Dentre outros relatos, já está claro que este processo é fortemente dependente do metabolismo do cálcio (Trópia, M. J. M. e cols., 2006).

A sinalização de cálcio em células de leveduras é composta de várias vias envolvidas em diferentes processos, por isso o controle da disponibilidade deste íon no citoplasma é extremamente importante para a sobrevivência dessas células (Ton, V. & Rao, R., 2004). Vários trabalhos na literatura têm relatado a enorme similaridade existente entre a estrutura dos mecanismos de homeostase do cálcio em *S. cerevisiae* e os eucariotos superiores. Porém, ao passo que em células de mamíferos o envolvimento do metabolismo do fosfatidilinositol na sinalização de cálcio está claro e muito bem elucidado (Athenstaedt, K. & Daum, G., 1997 e Athenstaedt, K. e cols.,

1999), em leveduras pouco se sabe desse processo que não tem sido extensivamente estudado.

Neste trabalho nós procuramos investigar a interação entre os mecanismos de regulação da homeostase do cálcio e a ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para que pudéssemos alcançar este objetivo utilizamos uma técnica muito eficiente que nos permitiu medir as concentrações de cálcio em paralelo às medidas de acidificação extracelular e atividade ATPásica. Desta forma foi possível acompanhar a sinalização de cálcio em nossas cepas de *S. cerevisiae*, nas diversas condições estudadas.

O princípio básica deste método, essencialmente recomendado para análises de população de células, baseia-se na utilização de uma fotoproteína muito sensível a íons cálcio. Esta proteína, produzida pelo celenterado *Aequorea victoria*, é constituída de 22 kDa e é denominada aequorina (Brini, M. 2008). Em sua forma ativa ela apresenta um polipeptídeo covalentemente ligado ao grupo prostético coelenterazina. Em consequência da ligação de Ca²⁺ a três sítios de alta afinidade, ocorre uma reação irreversível na qual o grupo prostético é liberado e um fóton é emitido. Devido à emissão de luz desencadeada pela ligação do Ca²⁺, a aequorina tem sido largamente utilizada para estudar o cálcio intracelular (Allen, D. G. & Blinks, J. R. 1978 e Cobbold, P. H., 1980). O Método da Aequorina apresenta algumas vantagens muito interessantes:

- a proteína permite realizar medidas com uma faixa abrangente de concentração deste íon, variando de 10⁻⁷ a 10⁻³ M;
- a aequorina tem um efeito tamponante de Ca²⁺ muito baixo e é insensível a variações de pH e das concentrações de Mg²⁺;
- sua proporção sinal/*debris*, é bem elevada;
- e por fim, o equipamento requerido para a medida da luminescência apresenta um funcionamento bastante simples.

Diante do fato de que Trópia, M. J. M. e cols. (2006) relataram a necessidade da disponibilidade de cálcio no meio extracelular para que o sinal de cálcio e a ativação da H⁺-ATPase, ambos induzidos por glicose, fossem produzidos eficientemente, nós optamos por avaliar inicialmente, o verdadeiro envolvimento desse

cálcio externo analisando o comportamento de mutantes com deleção em genes que codificam para transportadores de membrana.

Três proteínas já foram identificadas mediando esse transporte de cálcio, Mid1p que juntamente com Cch1p compõe o sistema de captação de cálcio de alta afinidade (Locke, E. G. e cols., 2000); Fig1p, componente do sistema de baixa afinidade (Muller, E. M. e cols., 2003) e Pdr5p, uma proteína primordial nos processos de multirresistência a drogas (Tutulan-Cunita, A. C. e cols., 2005).

Nossos primeiros resultados sugerem que a captação de cálcio por esses transportadores, Mid1p, Fig1p e Pdr5p; parece não ser requerida para a ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática. Porém, no que diz respeito à indução de uma resposta “TECC” produzida pela adição de glicose, a atuação dos sistemas tanto de alta quanto de baixa afinidade, parece ser importante para que o sinal de cálcio atinja o seu pico máximo em um curto espaço de tempo.

Apesar disso, o pequeno atraso observado na elevação do cálcio citosólico na ausência de Mid1p ou de Fig1p, não comprometeu significativamente os níveis de ativação da H⁺-ATPase. A proteína ABC, Pdr5p, apesar de funcionar como um facilitador do influxo de cálcio (Egner, R., e cols., 1998) não atua diretamente nas duas respostas induzidas por glicose, ativação da H⁺-ATPase e sinal de cálcio citosólico.

Para confirmar essas suposições, analisamos o efeito da ausência concomitante de duas proteínas mediadoras da captação de cálcio, e os resultados obtidos sugerem que a ausência de um dos transportadores não está sendo compensada pela ativação de outro, reforçando a hipótese de que estas três proteínas investigadas não participam da via de ativação da H⁺-ATPase.

É possível então propor que, a não ser que haja outro transportador de cálcio presente na membrana citoplasmática, ainda não descrito na literatura, o papel deste íon no meio extracelular seria de sinalização para a regulação do cálcio intracelular, assim, a detecção e não a captação do cálcio externo seria o evento chave importante para a ativação da H⁺-ATPase. Isto condiz com os relatos de Kellermayer, R. e cols. (2003), de que a privação de cálcio extracelular induz o sequestro do cálcio citosólico sendo este fenótipo revertido pela restauração de altos níveis deste íon no meio externo.

Sendo assim, prosseguimos estudando a interação entre os eventos e componentes da sinalização intracelular de cálcio e a via de ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana.

O estudo dos metabólitos de fosfatidilinositol, tem se revelado nos últimos anos um campo de investigação muito promissor, sobretudo, com a constatação de que estas moléculas são consideradas importantes precursores de mensageiros secundários envolvidos nos processos de sinalização intracelular e não desempenham apenas um papel estrutural, (Balsinde, J. e cols., 1999). Em leveduras, estes metabólitos estão relacionados à regulação de diversos eventos em nível transcricional, além do tráfego vesicular, proliferação celular e controle de vias de sinalização dependentes de glicose, sobre os quais existem poucos relatos na literatura (Kaibuchi, K. e cols., 1986; Flick, J. S. & Thorner, J., 1993; Brandão, R. L. e cols. 1994; Cocetti, P. e cols., 1998; Chi, Z. M. e cols., 2004; York, J. D., 2006; Trópia, M. J. M. e cols., 2006).

Nos últimos anos, alguns estudos relataram a participação de uma via do tipo fosfatidilinositol mediada pela fosfolipase C, bem como o envolvimento da proteína quinase C no processo de ativação da H⁺-ATPase induzido por glicose (Brandão, R. L. e cols., 1994; Cocetti, P. e cols., 1998 e Souza, M. A. A. e cols., 2001). Tisi, R. e cols. (2002) demonstraram que a atividade de Plc1p é requerida para um aumento dos níveis de cálcio citosólico livre em *S. cerevisiae*, bem como a presença da proteína G, Gpa2p e do receptor Gpr1p.

Em 2004, também Tisi, R. e cols., evidenciaram, pela primeira vez em leveduras, um papel para o inositol-1,4,5-trifosfato como um mensageiro secundário para o sinal de cálcio induzido por glicose, isto porque demonstraram que a despeito do fato de que o IP₃ seja rapidamente fosforilado a IP₄ e IP₅ por uma quinase (Arg82p), produto do gene *ARG82*, a deleção deste gene foi capaz de gerar uma elevação dos níveis de inositol-1,4,5-trifosfato e, ainda, um aumento significativo do sinal intracelular de cálcio. Saiardi, A. e cols. (2000), também haviam relatado que a ausência da proteína Arg82p gerava o acúmulo do inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃).

Trópia, M. J. M. e cols. (2006) observaram que na ausência desta quinase mediadora da conversão do IP₃, a ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática era intensificada a níveis até duas vezes maiores que o observado na

cepa selvagem. Todos estes relatos juntos reforçam a hipótese de uma conexão entre a sinalização do fosfatidilinositol e a ativação da nossa via de estudo.

Uma vez que a deleção do gene que codifica para a fosfolipase C (*PLC1*) promove também no mutante *arg82Δ*, uma acentuada redução nos níveis de IP₃ (Resnick, A. C. e cols., 2005), nós construímos um duplo mutante *arg82Δplc1Δ* para elucidar os fenótipos apresentados na ausência desta inositol multiquinase, a Arg82p. E os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o comportamento do mutante com deleção do gene que codifica para Arg82p, ocorre realmente em consequência do acúmulo de IP₃ em seu citoplasma. Este IP₃ deve mediar um aumento dos níveis de cálcio citosólico livre. Por isso, ao abolirmos a produção do mensageiro secundário via fosfolipase C, a ausência de Arg82p foi incapaz de influenciar a magnitude do sinal de cálcio e também da ativação da H⁺-ATPase de membrana. Com a dupla deleção de *ARG82* e de *PLC1* observamos um fenótipo semelhante aquele obtido com o mutante *plc1Δ*.

Se o inositol trifosfato atua na sinalização de cálcio também em leveduras, seguimos verificando se seu papel neste microorganismo seria semelhante ao que ele desempenha em células de mamíferos. Nos eucariotos superiores, está claro que este mensageiro é o principal mediador da liberação de cálcio dos estoques intracelulares. Sendo assim, ainda que não tenham sido descritos receptores para IP₃ em leveduras, homólogos àqueles encontrados em mamíferos (Wera, S. e cols., 2001), *S. cerevisiae* deve possuir alguma proteína responsável pela liberação de cálcio dos compartimentos e sensível à presença do IP₃. Tal proteína estaria provavelmente presente na membrana do vacúolo, já que Belde, P. J. M. e cols., (1993) sugeriram que o IP₃ estaria envolvido na liberação de cálcio de vesículas de membrana vacuolar em *S. cerevisiae*.

Esta proteína poderia ser o canal vacuolar da família TRP (receptor de potencial transitório), o Yvc1p. Quando avaliamos o fenótipo de um mutante *yvc1Δ*, esta suposição se fortaleceu, pois na ausência deste canal tanto a resposta “TECC”, quanto a ativação da ATPase estão claramente reduzidas. Tudo isto parece indicar que o Yvc1p pode realmente responder às variações nos níveis de IP₃ sendo então estimulado a liberar o cálcio compartimentalizado.

Como Tisi, R. e cols. (2004) evidenciaram, sabemos que na ausência de Arg82p (mutante *arg82Δ*) as células apresentam um acúmulo significativo de IP₃ em

seu citoplasma. Nestas condições, deletamos o gene que codifica para o Yvc1p e produzimos um duplo mutante *arg82Δyvc1Δ*, esta cepa deve apresentar um acúmulo de IP₃, mas não possui o canal responsável pela liberação do cálcio vacuolar.

Quando trabalhamos com este mutante, interessante observamos que a ausência do Yvc1p comprometeu todas as respostas exacerbadas que haviam sido obtidas com a deleção do *ARG82*. Isto porque, o acúmulo de IP₃ não teve nenhum efeito sobre o sinal de cálcio e a ativação da H⁺-ATPase, ambos induzidos por glicose. De acordo com a nossa hipótese a detecção do inositol trifosfato presente no citoplasma não aconteceria e conseqüentemente, a sinalização seria interrompida, pois a mediação de uma resposta “TECC” via cálcio vacuolar não seria possível.

Diver, J. M. e cols. (2001), estudando a sinalização de cálcio em plaquetas humanas, sugeriram que um antagonista de receptores de inositol trifosfato, o 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB), poderia atuar como um bloqueador de canais de cálcio capaz de atravessar a membrana plasmática. Em 2002, trabalhando também com células animais, Bootman, M. D. e cols., constataram que o 2-APB, é um fidedigno bloqueador do efluxo de cálcio dos estoques para o citoplasma, e que embora sua inibição da liberação de cálcio induzida por IP₃ não esteja ainda elucidada, esta droga pode ser muito útil na compreensão de determinados aspectos da sinalização de cálcio em eucariotos.

Sendo assim, nas análises realizadas na presença deste modulador de receptores de IP₃ (o 2-APB) em células de mamíferos (Ascher-Landsberg, J. e cols., 1999), foi possível visualizar um claro efeito inibitório sobre ambas as sinalizações induzidas por glicose, o sinal de cálcio e a ativação da H⁺-ATPase. Nossos dados demonstram que apesar de ocorrer uma significativa redução nas respostas do mutante *arg82Δ* a presença do 2-APB não foi capaz de abolir por completo, nem o sinal de cálcio nem o efluxo de prótons. Esta inibição limitada pode ser explicada pelo fato de que um aumento das concentrações de inositol trifosfato no citoplasma seria capaz de competir com o modulador e produzir um efeito inibitório apenas parcial (Bootman, M. D. e cols., 2002).

A ausência deste efeito somente no duplo mutante *arg82Δyvc1Δ*, ajuda a reforçar a ideia de que o Yvc1p atua em conexão à sinalização do fosfatidilinositol e que há uma participação efetiva do inositol-1,4,5-trifosfato, na via de ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana, e que esta participação se dá,

provavelmente, via estimulação do canal Yvc1p. Contudo nossos dados não nos permitem afirmar se tal conexão ocorre de forma direta ou se outro componente também é requerido nesta interação. Uma conexão indireta entre o Yvc1p e o IP₃ explicaria o fato de que Palmer, C. P. e cols., em 2001, não encontraram evidências de que o Yvc1p seria modulado por IP₃.

Todos estes achados que ajudam a elucidar o papel do inositol trifosfato em *S. cerevisiae* corroboram os resultados de Silverman-Gavrila, L. B. & Lew, R. R. (2003), que relataram a sensibilidade à presença do IP₃, em dois canais de cálcio em células de *Neurospora crassa* e propuseram então, pela primeira vez, a existência de receptores para este mensageiro em fungos.

Por constituir o principal estoque de cálcio em células de levedura (Halachmi, D. & Eilam, Y., 1989 e Dun, N. J. e cols., 1994), é condizente o fato de o vacúolo apresentar em sua membrana, proteínas responsáveis tanto pelo sequestro, Vcx1p e Pmc1p (Pozos, T. C. e cols., 1996), quanto pela liberação deste íon estocado, Yvc1p (Palmer, C. P. e cols., 2001). Está claro que além da Ca²⁺-ATPase Pmc1p (Trópia, M. J. M. e cols., 2006), o canal vacuolar TRP, Yvc1p, também possui um papel importante na regulação pós-transcricional da H⁺-ATPase, porém o grau de participação de cada uma destas proteínas não está ainda bem elucidado.

Assim, os dados obtidos com o mutante *pmc1Δyvc1Δ*, sugerem que a estimulação do Yvc1p para desencadear um aumento dos níveis de cálcio citosólico livre através da liberação dos estoques, seja mais efetiva no aumento da indução da H⁺-ATPase, por glicose, do que a inibição do sequestro deste mensageiro secundário para o interior do vacúolo, via Pmc1p. Isto porque a dupla deleção produziu um fenótipo estatisticamente semelhante à deleção única de *YVC1* e não de *PMC1*. No entanto, estes dois eventos parecem ser reguladores da indução da enzima. A completa ausência de um sinal de cálcio apresentada pelo duplo mutante *pmc1Δyvc1Δ*, não foi ainda explicada.

Ainda no que diz respeito à elucidação das conexões entre a sinalização intracelular de cálcio e a ativação da H⁺-ATPase após a adição de glicose, a atuação do sensor Snf3p constitui um ponto chave. Este sensor é essencial para a ativação da enzima (Souza, M. A. A. e cols., 2001), está envolvido na sinalização de cálcio e a presença apenas do seu domínio C-terminal foi capaz de restaurar a atividade da H⁺-ATPase e o sinal de cálcio, induzidos por açúcar (Trópia, M. J. M. e cols., 2006).

O papel do domínio C-terminal de Snf3p mediando a sinalização ativada por glicose foi também observado por Vagnoli, P. e cols. em 1998, que relataram que este papel era desempenhado mesmo quando esta porção do sensor era expressa independentemente do domínio acoplado a membrana plasmática. Dlugai, S., e cols. (2001), sugeriram um possível envolvimento de Snf3p na detecção de Gli-6-P e esta suposição foi reforçada quando Aiello, D. P. e cols. (2002), demonstraram que os metabólitos fosforilados não agem diretamente na homeostase do cálcio; sendo, provavelmente, requerida uma proteína específica para detectar os níveis adequados destes metabólitos e assim regular a variação da concentração do cálcio citosólico.

Nas análises realizadas neste trabalho foi possível notar que a interrupção gênica simultânea de *SNF3* e de *PMC1*, foi capaz de recuperar a ativação da H⁺-ATPase antes reduzida pela ausência do sensor. Esta reversão após a abolição do sequestro de cálcio via Pmc1p já foi observada no mutante *pgm2Δ* (Trópia, M. J. M. e cols., 2006) que por apresentar um acúmulo dos níveis de Gli-1-P possuía um sinal de cálcio danificado (Aiello, D. P. e cols., 2004) e uma atividade da H⁺-ATPase bastante comprometida principalmente na presença de galactose (Trópia, M. J. M. e cols., 2006).

Também quando medimos os níveis de acúmulo de cálcio neste duplo mutante (*pmc1Δsnf3Δ*), as células apresentaram um fenótipo semelhante à cepa selvagem (figura 21), ou seja, sem a atuação da Ca²⁺-ATPase vacuolar, a deleção de *SNF3* não resultou em uma elevação dos níveis de acúmulo do íon.

Estes resultados juntamente com os relatos de Moriya, H. & Johnston, M. (2004), de que a cauda C-terminal dos sensores de glicose não é essencial para a detecção do açúcar no meio extracelular corrobora a hipótese de que na via de ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase, a porção citoplasmática do sensor Snf3p possui outro papel importante além do fato de sinalizar a indução da expressão dos genes que codificam para os transportadores do açúcar. Nós acreditamos que esta proteína atuaria provavelmente na conexão entre os sinais para desencadear a ativação da enzima.

Deste modo, Snf3p agiria na comunicação entre o alvo final da via, a H⁺-ATPase de membrana, e os mecanismos de homeostase de cálcio, regulando negativamente a atividade da bomba Pmc1p e interferindo na capacidade da célula em acumular cálcio no interior do vacúolo. Este processo ocorreria provavelmente em

resposta ao balanço entre os dois metabólitos fosforilados e seria inibido pela elevação das concentrações de glicose-1-fosfato em relação aos níveis de glicose-6-fosfato.

Desde que cepas mutantes passaram a ser utilizadas no estudo da via de ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana (Coccetti, P. e cols., 1998; Souza, M. A. A. e cols., 2001 e Kotyk, A. e cols., 2003), foi observado que enquanto a deleção de alguns genes resultava em uma completa abolição da ativação da enzima, em outros mutantes esta ativação era observada, porém em níveis parciais quando comparada a magnitude da resposta da cepa selvagem correspondente.

Quando em 2006, Trópia, M. J. M. e cols., construíram um duplo mutante *snf3Δgpa2Δ*, observaram que o mesmo apresentava um maior comprometimento da ativação da H⁺-ATPase, quando comparada à resposta parcial apresentada pelos respectivos mutantes únicos, foi sugerido que estas proteínas atuam em vias distintas que contribuem de forma aditiva e independente na ativação da ATPase de membrana. De acordo com esta proposição, Snf3p estaria conectada a sinalização intracelular de cálcio, ao passo que Gpa2p, sensibilizada por níveis de Gli-6-P, poderia estimular a fosfolipase C e controlar a captação de cálcio extracelular, bem como a liberação dos estoques.

Dentro deste contexto a construção de um duplo mutante *pmc1Δgpa2Δ*, resultaria em um efeito sobre ambas as vias paralelas. Diante do fato de que esta cepa apresentou uma taxa de efluxo de prótons semelhante ao mutante *pmc1Δ*, e, portanto similar a cepa selvagem, podemos sugerir que ao reduzir significativamente o sequestro de cálcio para o vacúolo houve uma compensação quanto à ausência da proteína estimuladora da fosfolipase C e por isso não observamos um comprometimento da ativação da H⁺-ATPase. Pode-se propor ainda, que a proteína G, Gpa2p, seja intensificadora da atividade de hidrólise de Plc1p, mas não seja essencial para que tal evento aconteça.

Prosseguindo com a avaliação da relevância dos eventos particulares a cada um dos braços da via de ativação da ATPase, estudamos o fenótipo das células na ausência de duas proteínas muito importantes neste processo, o sensor Snf3p e a fosfolipase C. Ao esperar uma drástica redução na capacidade de bombear prótons, fomos surpreendidos pela completa recuperação da taxa de acidificação extracelular e

de atividade ATPásica a níveis similares aqueles obtidos pela selvagem correspondente.

Tudo isto abre novas e importantes questões:

1) Como as ausências do sensor que inibe Pmc1p, e da enzima responsável pela hidrólise de PIP₂, suprem completamente a falta uma da outra nos testes aqui realizados?

2) Como explicar uma resposta normal em condições onde não há nem inibição do sequestro de cálcio para o vacúolo nem produção de inositol-1,4,5-trifosfato?

É sabido que a disponibilidade de cálcio externo é indispensável tanto para a ativação da H⁺-ATPase, quanto para o sinal de cálcio citosólico (Trópia, M. J. M. e cols., 2006), avaliamos o efeito da privação de cálcio extracelular e mais uma vez esta cepa, *snf3Δplc1Δ*, apresentou um comportamento semelhante à selvagem correspondente demonstrando uma forte sensibilidade a indisponibilidade de cálcio no meio externo através do comprometimento dos níveis de extrusão de prótons na presença do quelante não permeável, EGTA.

Estes resultados são fortes evidências de que a surpreendente resposta apresentada por este duplo mutante ocorra devido a um restabelecimento do nível de cálcio citosólico comprometido quando ou o sensor Snf3p ou a fosfolipase C, não se encontra presente na célula.

Ao medirmos os níveis de cálcio celular total, observamos que ambos os mutantes, *snf3Δ* e *plc1Δ*, apresentavam um acúmulo de cálcio significativamente maior que a cepa selvagem. No mutante com deleção no gene que codifica para a fosfolipase C o conteúdo deste íon na célula foi aproximadamente três vezes maior do que o valor obtido na análise da cepa selvagem.

Esta mesma medida foi realizada também na ausência concomitante de Snf3p e de Plc1p, e este acúmulo de cálcio observado nos mutantes únicos, não aconteceu e assim o fenótipo dos mesmos foi completamente revertido (figura 21). O duplo mutante apresentou um total de cálcio significativamente menor do que o observado na cepa selvagem.

Tendo em vista todas essas repostas, sugerimos que a condição de estresse gerada por uma inicial queda acentuada nos níveis de cálcio citosólico livre conduza a célula a uma via alternativa para mobilização do cálcio para o citoplasma. Sendo assim, este “choque de cálcio” poderia desencadear um efeito rebote no

comportamento celular. Pois, assim como altas concentrações de cálcio livre no citoplasma resultam em uma toxicidade para a célula (Cunningham, K. M. & Fink, G. R., 1994), também uma drástica redução destas concentrações, já extremamente baixas, seria prejudicial às funções fisiológicas na levedura (Kellermayer, R. e cols., 2003).

Diante da evidente importância da disponibilidade de cálcio no meio extracelular, a privação do mesmo foi também analisada em outras cepas e por outro ponto de vista. Deste modo observamos que a presença do EGTA não acarretou nenhum efeito na ausência da proteína componente do braço regulado por Gpa2p, a fosfolipase C, isto corrobora a possível influência deste braço sobre o cálcio extracelular. Porém na ausência do regulador do braço da via provavelmente envolvido na sinalização intracelular do íon, Snf3p, a ativação, já parcial da ATPase, sofreu uma redução estatisticamente significativa, isto porque nesta condição é possível supor que ambas as vias paralelas estão comprometidas.

A influência da indisponibilidade de cálcio externo também foi analisada no mutante *pmc1Δ*, e na ausência da Ca^{2+} -ATPase vacuolar o quelante não teve nenhum efeito sobre a taxa de bombeamento de prótons exibida pela cepa (tabela 8). Quando comparamos a resposta deste mutante com sua selvagem correspondente, em relação à indução do sinal de cálcio, na presença ou não do EGTA, nenhum efeito inibitório do quelante, sobre a resposta “TECC” foi observado na cepa mutante, ao contrário da intensa redução apresentada pela cepa selvagem nesta condição (figura 20).

Esta resposta é condizente com outras análises realizadas com este mutante. Além disso, o fato de não haver acúmulo de cálcio em tais condições, sugere uma conexão entre o cálcio extracelular e a atividade da bomba vacuolar, Pmc1p. Nossos dados reforçam ainda, a hipótese da importância de Pmc1p na homeostase do cálcio embora não tenha sido identificado ainda qual o mecanismo sensor para as oscilações quanto à disponibilidade de cálcio externo que atua controlando a atividade da Ca^{+2} -ATPase e desencadeando o acúmulo de cálcio.

Juntamente com estes resultados, o fato deste mutante apresentar uma concentração de cálcio total inferior a cepa selvagem, tanto em glicose quanto em galactose (figura 21), sugere uma ligação entre a liberação de cálcio interno e a atividade de Pmc1p. Assim, variações na intensidade e/ou velocidade de ativação de

Pmc1p devem explicar as evidentes diferenças quanto à disponibilidade de cálcio no citoplasma observadas em nossos diversos resultados, isto é claro, em conjunto com o controle da liberação do cálcio estocado.

Ainda estudando o papel da Ca^{+2} -ATPase vacuolar, Pmc1p, verificamos a atividade da mesma em algumas cepas mutantes, cuja deleção dos genes específicos, acarretou uma redução significativa do sinal de cálcio e da ativação da ATPase de membrana após a indução por glicose. Após instituímos uma metodologia específica para esta análise, o homogenato de membrana vacuolar foi utilizado nos ensaios de atividade Ca^{2+} -ATPásica.

Observando uma maior atividade da enzima quando as células foram crescidas e induzidas com galactose, propusemos mais uma vez a sensibilidade indireta desta bomba quando os níveis de Gli-1-P estão acentuados. A resposta exacerbada, apresentada pelo mutante *snf3Δ* nas duas fontes de carbono utilizadas, reforçou a ideia de que esta proteína inibiria o sequestro de cálcio para o vacúolo. Pois, os níveis de atividade da Ca^{+2} -ATPase foram muito maiores na ausência do sensor, principalmente quando a fonte de carbono utilizada foi a galactose.

Este mesmo fenótipo foi também observado em glicose, nas células que não apresentavam o gene que codifica para a fosfolipase C. Isto sugere que o comprometimento da ativação, induzida por glicose, da H^{+} -ATPase de membrana nesta cepa (*plc1Δ*) deve-se à ausência de uma resposta "TECC", conseqüente não somente da falta do mensageiro IP_3 , mas também de uma elevação do sequestro de cálcio para o vacúolo, via Pmc1p.

Deste modo, podemos dizer que uma hiper atividade de Pmc1p, resultaria em baixos níveis de cálcio citosólico livre e em uma conseqüente redução na ativação normal da H^{+} -ATPase de membrana citoplasmática. Esta suposição é reforçada por resultados obtidos em nosso laboratório que demonstram que em condições de baixa ativação da ATPase de membrana, não há um nível de expressão do gene *PMC1* maior do que o nível apresentado pela cepa selvagem (Cardoso, A. S., 2005) e que, portanto não seria essa a causa do acúmulo intenso de cálcio e atividade reduzida da H^{+} -ATPase.

Um ponto essencial para o funcionamento desta via de sinalização é a necessidade da participação de uma proteína quinase mediando a fosforilação da porção C-terminal da H^{+} -ATPase (Chang & Slayman, 1991; Eraso, P. & Portillo, F.,

1994 e Goosens, A. e cols., 2000) Esta fosforilação se faz necessária no rompimento da interação inibitória apresentada nesta porção da enzima e que é a responsável pela limitação do acesso do ATP ao seu sitio de ligação.

Por fim, nós verificamos se a proteína quinase C estaria realmente envolvida na ativação, induzida por açúcar, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática. E nossos resultados demonstram que esta proteína é requerida para a indução de uma resposta “TECC”, após a adição de glicose. Assim sendo é provável que a participação de Pkc1p no controle da atividade da enzima, seja através da regulação dos níveis de cálcio citosólico.

Loukin, S. e cols., (2008), sugeriram um modelo de sinalização propondo que condições de estresse da parede celular, por exemplo, a ausência do gene *PKC1*, gera um aumento significativo do sequestro de cálcio para o vacúolo, mediado por Pmc1p. Este relato corrobora a nossa hipótese de que na ausência desta proteína quinase há um comprometimento da mobilização do cálcio, e mesmo após a indução das células com glicose não é possível observar nem um sinal de cálcio normal, nem a ativação da H⁺-ATPase.

Deste modo, nos foi possível retomar a ideia da participação efetiva da Pkc1p na ativação da H⁺-ATPase após a adição de glicose. Estes dados reforçam ainda a necessidade de analisar a fosforilação da enzima tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em uma cepa *pkc1Δ*, bem como a investigação de novas quinases que poderiam estar diretamente relacionadas à fosforilação da cauda C-terminal da enzima.

Juntos, todos os resultados obtidos neste trabalho nos possibilitam a proposição de um novo modelo no qual há um evidente envolvimento do canal vacuolar Yvc1p, fortalecendo a hipótese de que a mobilização intracelular de íons cálcio seja um evento primordial nesta via de ativação. A necessidade desta mobilização pode ser ainda sugerido ao notarmos que na ausência da proteína quinase C, mesmo apresentando altos níveis basais de cálcio citosólico, não há uma elevação destes níveis após a adição do açúcar e a ativação da H⁺-ATPase também não é observada. Além disso, a forte conexão entre o sensor Snf3p e o metabolismo de cálcio, foi mais uma vez demonstrada de forma convincente.

Conclusão

6 – Conclusão

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, e os elementos já estabelecidos quanto à sinalização e homeostase do cálcio, em resposta à adição de glicose, propusemos um modelo hipotético para a via de sinalização relacionada à ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática (figura 25).

Em nosso modelo, a internalização seguida da fosforilação da glicose geraria um sinal, provavelmente relacionado a um balanço entre os níveis de glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato, que deve ser detectado pelo domínio C-terminal do sensor Snf3p. Esta proteína assim estimulada seria responsável pela inibição do sequestro de cálcio citosólico mediado pela Ca²⁺-ATPase vacuolar Pmc1p. Por outro lado, e atuando em uma via paralela àquela da Snf3p, a proteína Gpa2p responderia a presença do açúcar fosforilado (glicose-6-P) estimulando a ativação da fosfolipase C que hidrolisando o fosfatidilinositol geraria DAG e IP₃. O inositol-1,4,5- trifosfato por sua vez, atuaria, de forma direta ou não, sobre o canal de cálcio TRP, Yvc1p, presente na membrana do vacúolo e/ou em transportadores não identificados presentes na membrana citoplasmática. Isto acarretaria uma elevação dos níveis de cálcio livre no citoplasma. O aumento dos níveis de cálcio citosólico poderia ainda ser mantido pela inibição de Pmc1p, mediada por uma sinalização gerada pelo cálcio extracelular.

É possível concluir então que esta elevação seria o resultado de dois mecanismos: um com o envolvimento de Snf3p e outro com o da proteína G, Gpa2p. A mobilização e presença do mensageiro secundário, cálcio, levaria, de uma maneira ainda não elucidada, à ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática.

Ainda que esta via não tenha sido completamente elucidada, todos os dados apresentados aqui, reforçam a hipótese de uma clara conexão entre o sinal intracelular de cálcio, induzido por glicose, e a regulação pós-transcricional da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática de levedura. E, além disso, sugerem uma participação efetiva do IP₃ estimulando a liberação do cálcio vacuolar, via canal Yvc1p.

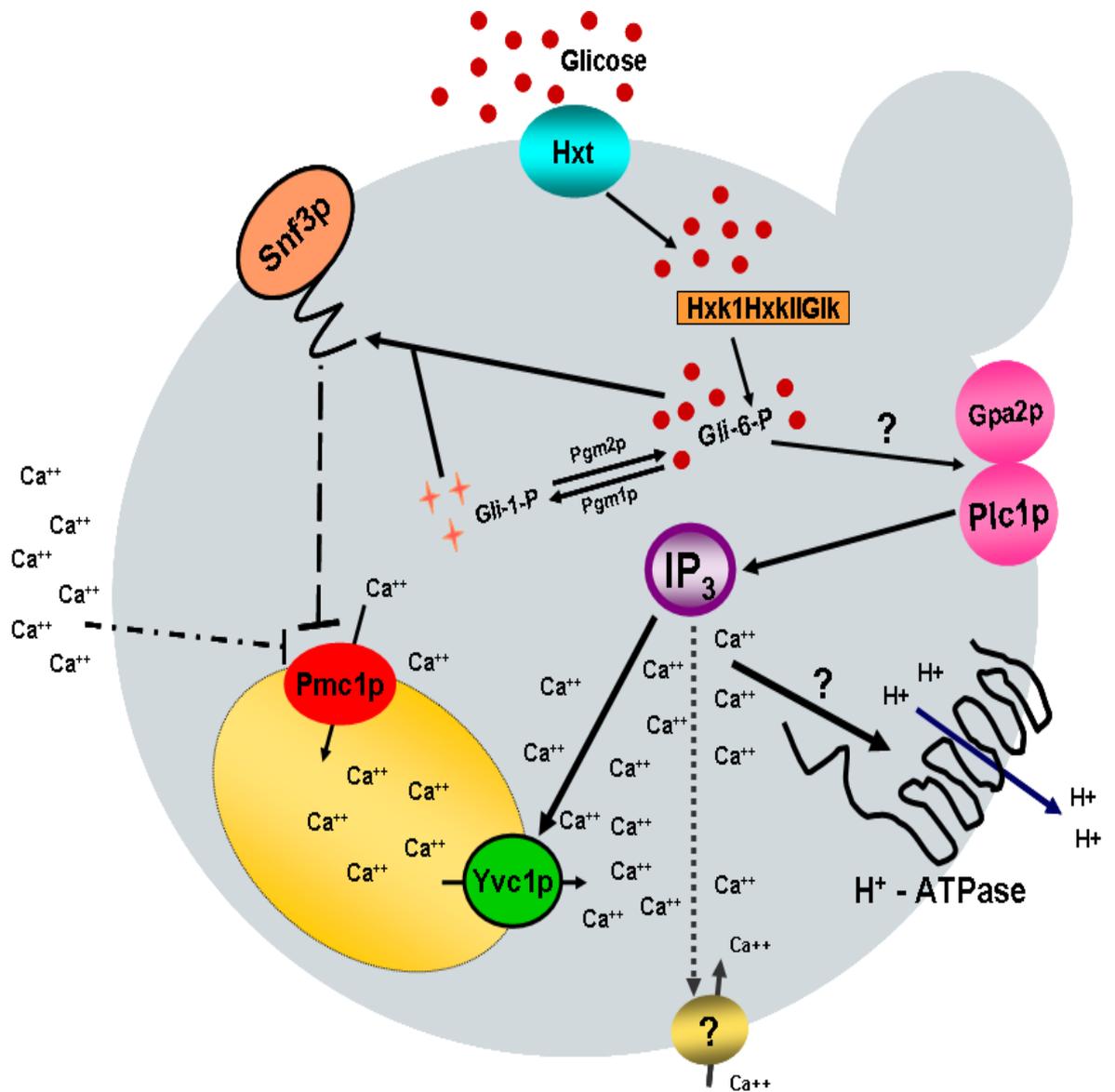


Figura 25 – Modelo hipotético da ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática mediada por íons cálcio, via Yvc1p e regulação do sequestro mediado por Pmc1p, dos íons Ca²⁺.

7 – Perspectivas

Diante do fato de que a via de sinalização proposta neste trabalho está provavelmente incompleta, experimentos adicionais são necessários para que seja então possível elucidar, mais detalhadamente, o mecanismo de interação entre a homeostase do cálcio e a ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Entre estes, destacam-se:

- Construir uma cepa selvagem capaz de super expressar o gene que codifica para o canal vacuolar, Yvc1p. Depois de construída esta cepa será então submetida aos testes de acidificação extracelular e medida do sinal de cálcio, na presença ou ausência do inibidor para receptores de IP₃, o 2-APB. A concentração utilizada será a mesma descrita neste trabalho, 50 μM, final;
- Comprovar a atividade específica da Ca²⁺-ATPase vacuolar Pmc1p nas frações avaliadas, utilizando um inibidor específico para a mesma buscando obter um segundo controle negativo que não somente o quelante de cálcio, EGTA. Após a confirmação medir a atividade Ca²⁺-ATPásica em outros mutantes de interesse;
- Construir um triplo mutante com deleção dos genes que codificam para os transportadores de cálcio de membrana plasmática, Mid1p, Fig1p e Pdr5p. E avaliar os fenótipos de resposta do mesmo para elucidar o papel do cálcio extracelular. Sendo este mutante inviável submeter os duplos mutantes *fig1Δmid1Δ* e *pdr5Δmid1Δ*, à pré-incubação com uma droga que possa inibir a ativação do terceiro;
- Construir um triplo mutante *snf3Δplc1Δyvc1Δ* para verificar se o canal Yvc1p está ou não, envolvido na reversão do fenótipo apresentada pelo duplo *snf3Δplc1Δ*;
- Realizar novas combinações de duplas deleções para elucidar o funcionamento dos dois braços paralelos da via de ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana plasmática. Como por exemplo, os duplos *snf3Δyvc1Δ* e *pmc1Δplc1Δ*.

Referências Bibliográficas

8 – Referências Bibliográficas

- ADDISON, R. & SCARBOROUGH, G. A. (1981). Solubilization and purification of the *Neurospora crassa* plasma-membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **257**, 10421-10426.
- ADDISON, R. (1986). Primary structure of the *Neurospora crassa* plasma membrane H⁺-ATPase deduced from gene sequence. *J. Biol. Chem.* **261**, 14896-14901.
- AIELLO, D.P., FU, L., MISETA, A. & BEDWELL, D.M. (2002). Intracellular glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate levels modulate Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 45751-45758.
- AIELLO, D. P.; FU, L.; MISETA, A.; SIPOS, K.; BEDWELL, D. M. (2004). The Ca²⁺ homeostasis defects in a *pgm2Delta* strain of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by excessive vacuolar Ca²⁺ uptake mediated by the Ca²⁺-ATPase Pmc1p. *J. Biol. Chem.* **279**, 38495 – 38502.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J. D. (1999). Cell Signaling. In: *Molecular Biology of the Cell*. **15**, 721-785.
- ALLEN, D. G. & BLINKS, J. R. (1978). Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature*. **273**, 509 – 513.
- AMBESI, A., MIRANDA, M., PETROV, V.V. & SLAYMAN, C.W. (2000). Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**, 155-160.
- ANSARI, K., MARTIN, S., FARKASOVSKY, M., ELSEBRECHT, I.M. & KUNTZEL, H. (1999). Phospholipase C binds to the receptor-like Gpr1 protein and controls pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**, 30052-30058.
- ASCHER-LANDSBERG, J.; SAUNDERS, T.; ELOVITZ, M. & PHILLIPPE, M. (1999). The effects of 2-aminoethoxydiphenyl borate, a novel inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor modulator on myometrial contractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 979 – 982.
- ATHENSTAEDT, K. & DAUM, G. (1997). Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **24**, 7611 – 7616.
- ATHENSTAEDT, K.; ZWEYTICK, D.; JANDROSITZ, A.; KOHLWEIN, S. D. & DAUM, G. (1999). Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **20**, 6441 – 6448.
- AUER, M., SCARBOROUGH, G.A. & KUHLBRANDT, W. (1998). Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature* **392**, 840-843.

- BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A. & DENNIS, E. A. (1999). Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxic.* **39**, 175-189.
- BANUETT, F. (1998). Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 249-274.
- BATIZA, A. F., SCULZ, T. & MASSON, P. H. (1996). Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *J. Biol. Chem.* **271**, 23357-23362.
- BAUER, B. E.; WOLFGER, H. & KUCHLER, K. (1999). Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)*. **1461**, 217 – 236.
- BECHER DOS PASSOS, J., VANHALEWYN, M., BRANDÃO, R.,L., CASTRO, I.M., NICOLI, J.R. & THEVELEIN, J. M. (1992). Glucose-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affected in cAMP metabolism, cAMP-dependent protein phosphorylation and the initiation of glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta*. **1136**, 57-67.
- BECHERER, K. A.; RIEDER, S. E.; EMR, S. D. & JONES, E. W. (1997). Novel syntaxin homologue, Pep12p, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast. *Mol. Biol. Cell*. **4**, 579 – 594.
- BELDE, P. J. M.; VOSSEN, J. H.; BORST-PAUWELS, G. W. F. H. & THEUVENET, A. P. R. (1993). Inositol 1,4,5- triphosphate releases Ca²⁺ from vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS*. **323**, 113-118.
- BENITO, B., MORGADO, E. & LAGUNAS, R. (1991). Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta*. **1063**, 265-268.
- BERRIDGE, M.J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J*. **220**, 345–360.
- BISSON, L. F., COONS, D. M., KRUCKEBERG, A. L. & LEWIS, D. A. (1993). Yeast sugar transporters. *Biochem. Mol. Biol.* **28**, 259-308.
- BOOTMAN, M. D.; COLLINS, T. J.; MACKENZIE, L.; RODERICK, H. L. BERRIDGE, M. J. & PEPPIATT, C. M. (2002). 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced Ca²⁺ release. *FASEB J*. **10**, 1145 – 1150.
- BOWMAN, B.J., BLASCO, F. & SLAYMAN, C.W. (1981). Purification and characterization of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **256**, 12343-12349.
- BRANDÃO, R.L., MAGALHÃES-ROCHA, N.M., ALIJO, R., RAMOS, J. & THEVELEIN, J. M. (1994). Possible involvement of a phosphatidylinositol-type signalling

- pathway in glucose-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase and cellular proton extrusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys Acta*. **1223**, 117-124.
- BRANDÃO, R. L., ETCHEBEHERE, L., QUEIROZ, C. C., TRÓPIA, M. J., ERNANDES, J. R., GONÇALVES, T., LOUREIRO-DIAS, M. C., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J. M., LEIPER, F. C., CARLING, D. & CASTRO, I. M. (2002). Evidence for involvement of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C in glucose induction of HXT genes and derepression of SUC2. *FEMS Yeast Res.* **2**, 93- 102.
- BRINI, M. (2008). Calcium-sensitive photoproteins. *Methods*. **46**, 160 – 166.
- CAPIEAUX, E. VIGNAIS, M. L., SENTENAC, A. & GOFFEAU, A. (1989). The yeast H⁺-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J. Biol. Chem.* **264**, 7437-7446.
- CARAFOLI, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 395-433.
- CARDOSO, A. S. *Participação do cálcio no processo de ativação, induzido por carboidratos, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática de Saccharomyces cerevisiae*. Ouro Preto, 2005. 144p. Dissertação (Mestrado). Núcleo de Pós-graduação Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.
- CARLSON, M. (1998). Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 560-564.
- CHANG, A. & SLAYMAN, C.W. (1991). Maturation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell Biol.* **115**, 289-295.
- CHI, Z .M.; LI, J. F.; WANG, X. H. & YAO, S. M. (2004). Inositol and phosphatidylinositol mediated glucose derepression, gene expression and invertase secretion in yeasts. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **36**, 443 – 449.
- COBBOLD, P. H. (1980) Cytoplasmic free calcium and amoeboid movement. *Nature*. **285**, 441 – 446.
- COCCHETTI, P., TISI, R., MARTEGANI, E., TEIXEIRA, L.S., BRANDÃO, R.L., CASTRO, I.M. & THEVELEIN, J. M. (1998). The *PLC1* encoded phospholipase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is essential for glucose-induced phosphatidylinositol turnover and activation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1405**, 147-154.
- COOPER, G. M. & HAUSMAN, R. E. (2000). Cell Signaling. In: *The Cell – A Molecular Approach*. **13**, 533 - 570.

- CUNNINGHAM, K. M. & FINK, G. R. (1994). Ca^{2+} Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Exp. Biol.* **196**, 157-166.
- CUNNINGHAM, K. M. & FINK, G. R. (1994). Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca^{2+} -ATPases. *J. Cell. Biol.* **124**, 351-363.
- CUNNINGHAM, K. M. & FINK, G. R. (1996). Calcineurin inhibits VCX1-dependent $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and induces Ca^{2+} -ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2226-2237.
- DAVENPORT, K., SOHAKEY, M. & GUSTIN, M. C. (1994). Hypotonic shock increase tyrosine phosphorylation of Slt2P/ Mpk1 p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast genetics and molecular biology meeting, Seattle, USA*. Abstract **114 B**.
- DE LA FUENTE, N., MALDONADO, A.M. & PORTILLO (1997). Glucose activation of the yeast plasma membrane H^+ -ATPase requires the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *FEBS Lett.* **411**, 308-312.
- DE LA FUENTE, N. & PORTILLO, F. (2000). The cell wall integrity/remodeling MAPK cascade is involved in glucose activation of the yeast plasma membrane H^+ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1509**, 189-194.
- DENIS, V. & CYERT, M. S. (2002). Internal Ca^{2+} release in yeast is triggered by a TRP channel homologue. *J. Cell. Biol.* **156**, 29-34.
- DIFFLEY, J. F. X. (1992). Global regulators of chromosome function in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **62**, 25-33.
- DIVER, J. M.; SAGE, S. O. & ROSADO, J. A. (2001). The inositol trisphosphate receptor antagonist 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) blocks Ca^{2+} entry channels in human platelets: cautions for its use in studying Ca^{2+} influx. *Cell Calcium.* **30**, 323 – 329.
- DLUGAI, S.; HIPPLER, S.; WIECZORKE, R. & BOLES, E. (2001). Glucose-dependent and -independent signalling functions of the yeast glucose sensor Snf3. *FEBS Letter.* **505**, 389 – 392.
- DUFOUR, J.-P. & GOFFEAU, A. (1978). Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **253**, 7026-7032.
- DUFOUR, J.-P. & GOFFEAU, A. (1980). Molecular and kinetic properties of the purified plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **105**, 145-154.
- DUJON, B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet.* **7**, 263 – 270.

- DUN, N J.; HUANG, R.; DUN, S. L. & FORSTERMANN, U. (1994). Infrequent co-localization of nitric oxide synthase and calcium binding proteins immunoreactivity in rat neocortical neurons. *Brain Res.* **2**, 289 – 294.
- EGNER, R., ROSENTHAL, F. E., KRALLI, A., SANGLARD, D. & KUCHLER, K. (1998). Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. *Mol. Biol. Cell.* **2**, 523 – 543.
- EILAM, Y. & OTMAN, M. (1990). Activation of Ca²⁺ influx by metabolic substrates in *Saccharomyces cerevisiae*: role of membrane potential and cellular ATP levels. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 861-867.
- EILAM, Y., OTMAN, M. & HALACHMI, D. (1990). Transient increase in Ca²⁺ influx in *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose: effects of intracellular acidification and cyclic AMP levels. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2537-2543.
- ENTIAN, K. D. & BARNETT, J. A. (1992). Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Bioch. Sci.* **17**, 506-510.
- ERASO, P. & GANCEDO, C. (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* **224**, 187-192.
- ERASO, P. & PORTILLO, F. (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose. *J. Biol. Chem.* **269**, 10393-10399.
- FIETCHER, A., FUHRMANN, G. F. & KAPPELI, O. (1981). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Advances in Microbial Phys.* Acad. Press, London. **22**, 123-183.
- FISCHER, M., SCHNELL, N., CHATTAWAY, J., DAVIES, P., DIXON, G. & SANDERS, D. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Lett.* **419**, 259 – 262.
- FLICK, J.S. & THORNER, J. (1993). Genetic and biochemical characterization of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5861-5876.
- FRANCESCOTTI, G., BARONI, D. & MARTEGANI, E. (1990). The glucose-induced polyphosphoinositides turnover in *Saccharomyces cerevisiae* is not dependent on the CDC25-RAS mediated signal transduction pathway. *FEBS Lett.* **274**, 19-22.
- FU, L., MISETA, A., HUNTON, D., MARCHASE, R. B. & BEDWELL, D. (2000). Loss of the major isoform of phosphoglucomutase results in altered calcium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 5431-5440.

- GANCEDO, J. M. (1992). Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **206**, 297-313.
- GANCEDO, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 334-361.
- GHISLAIN, M., SCHLESSER, A. & GOFFEAU, A. (1987). Mutation of conserved glycine residue modifies the vanadate sensitivity of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Shizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **262**, 17549-17555.
- GOFFEAU, A., BARREL, B. G., BUSSEY, H., DAVIS, R., DUJON, B., FELDMAN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J. D., JACQ, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E. J., MEWES, H., MURAKAMI, Y., PHILIPPSEN, P., TETTELIN, H. & OLIVIER, S. G. (1997). Life with 6000 genes. *Science.* **275**, 1051-1052.
- GOMES, K. N., FREITAS, S. M. A. C., PAIS, T. M., FIETTO, J. L. R., TOTOLA, A. H., ARANTES, R. M. E., MARTINS A., LUCAS, C., SCHULLER, D., CASAL, M., CASTRO, I. M., FIETTO, L. G. & BRANDÃO, R. L. (2005). Deficiency of Pkc1 activity affects glycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **5**, 767 – 776.
- GOOSSENS, A., DE LA FUENTE, N., FORMENT, J., SERRANO, R. & PORTILLO, F. (2000). Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7654-7661.
- HALACHMI, D. & EILAM, Y. (1989). Cytosolic and vacuolar Ca²⁺ concentrations in yeast cells measured with the Ca²⁺-sensitive fluorescence dye indo-1. *FEBS Lett.* **256**, 55 – 61.
- HOFER, M. (1997). In: *Yeasts in natural and artificial habitats*. Eds. J.F.T. Spencer/ D. M. Spencer. **7**, 95-132.
- HOHMANN, S. & MAGER, W. H. (1997). Yeasts stress response. *Molecular Biology Intelligence Unit*.
- HOHMANN, S. WINDERICK, J., DE WINDE, J. H., VALCKX, D., COBBAERT, P., LUYTEN, K., DE MEIRSMAN, C., RAMOS, J. & THEVELEIN, J. M. (1999). Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of *SUC2*. *Microbiol.* **145**, 703-714.
- HOLBEEKS, I.; LAGATIE, O.; VAN NULAND A.; VAN DE VELDE, S. & THEVELEIN, J. M. (2004). The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *Trends Biochem Sci.* **10**: 556 – 564.
- HOLZER, H. (1976). Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **1**, 178-181.
- HUBBARD, M., BRADLEY, M., SULLIVAN, P., SHEPHERD, M. & FORRESTER, I. (1982). Evidence for the occurrence of calmodulin in the yeasts *Candida albicans*

- and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **137**, 85-88.
- HUBBARD, M.; BRADLEY, M.; SULLIVAN, P.; SHEPHERD, M. & FORRESTER, I. (1982). Evidence for the occurrence of calmodulin in the yeasts *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **137**, 85 – 88.
- IIDA, H., YAGAWA, Y. & ANRAKU, Y. (1990b). Essential role for induced Ca^{2+} influx followed by $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise in maintaining viability of yeasts cells late in the mating pheromone response pathway. A study of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in single *Saccharomyces cerevisiae* cells with imaging of fura-2. *J. Biol. Chem.* **265**, 13391-13399.
- IIDA, H., NAKAMURA, H., ONO, T., OKUMURA, M. S. & ANKARU, Y. (1994). MID1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for Ca^{2+} influx and mating. *J. Bacteriol.* **177**, 3087-3094.
- ITO, H., FUKUDA, Y., MURATA, K. & KIMURA, A. (1983). Transformation of yeast cells treated with alkali cation. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- JIANG, H., MEDINTZ, I., ZHANG, B., MICHELS, C.A. (2000). Metabolic signals trigger glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* **182**, 647-654.
- JOHNSTON, M. & CARLSON, M. (1992). Regulation of carbon and phosphate utilization. In: *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Eds. E. W. Jones, J. Pringle & J. R. Broach, 193-281.
- KAIBUCHI, K., MIYAJIMA, A., ARAI, K. & MATSUMOTO, K. (1986). Possible involvement of RAS-encoded proteins in glucose-induced inositolphospholipid turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8172-8176.
- KANIAK, A.; XUE, Z.; MACCOOL, D; KIM, J. H. & JOHNSTON, M. (2004). Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eucaryotic Cell.* **1**, 221 – 231.
- KELLERMAYER, R., AIELLO, D. P., MISETA, A. & BEDWELL, D. M. (2003). Extracellular Ca^{2+} sensing contributes to excess Ca^{2+} accumulation and vacuolar fragmentation in a *pmr1 Δ* mutant of *S. cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* **116**, 1637 – 1646.
- KOHLWEIN, S. D.; DAUM, G.; SCHNEITER, R. & PALTAUF, F. (1996). Phospholipids: synthesis, sorting, subcellular traffic - the yeast approach. *Trends Cell Biol.* **7**, 260 – 266.
- KOTYK, A.; LAPATHITIS, G. HORÁK, J. (2003). Critical findings on the activation cascade of yeast plasma membrane H^+ -ATPase. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**, 175 – 180.
- KRAAKMAN, L., LEMAIRE, K., MA, P., TEUNISSEN, A.W.R.H., DONATON, M.C. V.,

- VAN DIJCK, P., WINDERICKX, J., DE WIND, J. H. & THEVELEIN, J. M. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* **32**, 1002-1012.
- LEVIN, D.E., BOWERS, B., CHEN, C., KAMADA, Y. & WATANABE, M. (1994). Dissecting the protein kinase C / MAP kinase signaling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 229-239.
- LESTER, R. L. & STEINER, M. R. (1968). The occurrence of diphosphoinositide and triphosphoinositide in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **243**, 4889-4893.
- LISMAN, Q.; URLI-STAM, D. & HOLTHUIS, J. C. M (2004). *HOR7*, a multicopy suppressor of the Ca²⁺- induced growth defect in sphingolipid mannosyltransferase-deficient yeast. *The J. of Biol. Chem.* **279**, 36390 – 36396.
- LOCKE, E. G., BONILLA, M., LIANG, L., TAKITA, Y. & CUNNINGHAM, K. (2000). A Homolog of voltage-gated Ca²⁺ channels stimulated by depletion of secretory Ca²⁺ in yeast. *Mol. Cel. Biol.* **20**, 6686-6694.
- LODISH, H., BALTIMORE, D., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P. & DARNEL, J (2007). Cell to Cell Signaling. In: *Molecular Cell Biology.* **20**, 783 – 818.
- LONDESBOROUGH, J. (1989). Purification of a Ca²⁺/ calmodulin-dependent protein kinase from baker's yeast. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 3373-3383.
- LOUKIN, S.; ZHOU, X.; KUNG, C. & SAIMI, Y. (2008). A genome-wide survey suggests an osmoprotective role for vacuolar Ca²⁺ release in cell wall-compromised yeast. *FASEB J.* **22**, 2405 – 2415.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- LUTSENKO, S. & KAPLAN, J.H. (1995). Organization of P-Type ATPases: significance of structural diversity. *Biochem.* **34**, 15607-15613.
- MALPARTIDA, F. & SERRANO, R. (1980). Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent. *FEBS Lett.* **111**, 69-72.
- MANIVASAKAM, P; WEBWR, S. C.; MCELVER, J. & SCHIEST, R. H. (1995). Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **14**, 2799 – 27800.
- MARSHALL, C.J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Genet. & Develop.* **4**, 82-89.
- MARUYAMA, T.; KANAJI, T.; NAKADE, S.; KANNO, T. & MIKOSHIBA, K. (1997). 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of

- Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J. Biochem.* **122**, 498 – 505.
- MASON, A.B., KARDOS, T.B. & MONK, B.C. (1998). Regulation and pH expression of a bilaterally truncated yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1372**, 261-271.
- MATSUMOTO, K., UNO, I. & ISHIKAWA, T. (1984). Identification of the structural gene and nonsense alleles for adenylate cyclase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180**, 2253-2256.
- MICHALAK, M., ROBERT PARKER, J. M. & OPAS, M. (2002). Ca²⁺ signalling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* **32**, 269-278.
- MISETA, A., FU, L., KELLERMAYER, R., BUCKLEY, J. & BEDWELL, D. M. (1999a). The Golgi apparatus plays a significant role in the maintenance of Ca²⁺ homeostasis in the vps33Δ vacuolar biogenesis mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**, 5939-5947.
- MISETA, A., KELLERMAYER, R., AIELLO, D. P., FU, L. & BEDWELL, D. M. (1999b). The vacuolar H⁺/Ca²⁺ exchanger Vcx1 p/Hum1 p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **451**, 132-136.
- MITCHEL, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.
- MONTEIRO, G.A. & SÁ-CORREIA I. (1998). In vivo activation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by ethanol: effect on the kinetic parameters and involvement of the carboxyl-terminus regulatory domain. *Biochim. Biophys. Acta* **1370**, 310-316.
- MØLLER, J. V., JUUL, B. & LE MAIRE, M. (1996). Structural organization, ion transport, an energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 1-51.
- MORIYA, H. & JOHNSTON, M. (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* **6**, 1572 – 1577.
- MORSOMME, P., SLAYMAN, C.W. & GOFFEAU, A. (2000). Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 133-157.
- MULLER, E. M.; LOCKE, E. G. & CUNNINGAM, K. W. (2001). Differential regulation of two Ca(2+) influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **4**, 1527 – 1538.
- MULLER, E. M.; MACKIN, N. A.; ERDMAN, S. E. & CUNNINGHAM, K. W. (2003). Fig1p facilitates Ca²⁺ influx and cell fusion during mating of

- Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 38461 – 38469.
- NAKAJIMA-SHIMADA, J., IIDA, H., TSUJI, F. I. & ANRAKU, Y. (1991). Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* **88**, 6878-6882.
- NEWCOMB, L. L.; DIDERICH, J. A.; SLATTERY, M. G. & HEIDEMAN, W. (2003). Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eucaryotic Cell.* **1**, 143 – 149.
- NOH, D-Y, SHIN, S. H. & RHEE, S. G. (1995). Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signalling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1242**, 99-114.
- NONAKA, H., TANAKA, K. HIRANO, H., FUJIWARA, T., KOHNO, H. & UMIKAWA, M. (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, wich leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO. J.* **14**, 5931-5938.
- OHYA, Y., KAWASAKI, H., SUZUKI, K., LONDESBOROUGH, J. & ANKARU, Y. (1991). Two yeast genes encoding calmodulin-dependent protein kinase-isolation, sequencing, and bacterial expression of CMK1 and CMK2. *J. Biol. Chem.* **266**, 12784-12794.
- OLIVER, S. G. (1996). From DNA sequence to biological function. *Nature* **379**, 597-600.
- ÖZCAN, S., DOVER J., J. ROSENWALD, A.G., WOLF, S. & JOHNSTON, M. (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA*, 124228-124232.
- ÖZCAN, S., DOVER J. & JOHNSTON, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**, 2566-2573
- ÖZCAN, S & JOHNSTON, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* **63**, 554-569.
- PAL, M.; ISHIGAKI, Y.; NAGY, E. & MAQUAT, L. E. (2001). Evidence that phosphorylation of human Upfl protein varies with intracellular location and is mediated by a wortmannin-sensitive and rapamycin-sensitive PI 3-kinase-related kinase signaling pathway. *RNA.* **1**, 5 -15.
- PALMER, C. P.; ZHOU, X. L.; LIN, J.; LOUKIN, S. H.; KUNG, C. & SAIMI, Y. (2001). A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca(2+)-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **14**, 7801 – 7805.

- PATTON, J. L. & LESTER, R. L. (1992). Phosphatidylinositol phosphate, phosphatidylinositol bi-phosphate, and the phosphoinositol sphingolipids are found in the plasma membrane and stimulate the plasma membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**, 70-76.
- PAYNE, W. E. & FITZGERALD-HAYES, M. (1993). A mutation in PLC1, a candidate phosphoinositide specific phospholipase C gene from *Saccharomyces cerevisiae*, causes aberrant mitotic chromosome segregation. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4351-4364.
- PEDERSEN, P. L. & CARAFOLI, E. (1987). Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 146-150.
- PEDERSEN, B. P.; BUCH-PEDERSEN, M. J.; MORTH, J. P.; PALMGREN, M. G. & NISSEN, P. (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature.* **450**, 1111 – 1114.
- PEREIRA, M. B.; TISI, R.; FIETTO, L. G.; CARDOSO, A. S.; FRANÇA, M. M.; CARVALHO, F. M.; TRÓPIA, M. J.; MARTEGANI, E.; CASTRO, I. M. & BRANDÃO, R. L. (2008) Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone induced calcium signaling and activation of plasma membrane H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **4**, 622 – 630.
- PIPER, P.W., ORTIZ-CALDERON C, HOLYOAK C, COOTE P, COLE M. (1997). Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase. *Cell. Stress Chaperones.* **2**, 12-24.
- PORTILLO, F. & SERRANO, R. (1989). Growth control strength and active site of yeast plasma membrane ATPase studied by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **186**, 501-507.
- PORTILLO, F., DE LARRINOA, I. F., SERRANO, R. (1989). Deletion analysis of yeast plasma membrane H⁺-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. *FEBS Lett.* **247**, 381-385.
- PORTILLO, F. (2000). Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1469**, 31-42,
- POZOS, T. C.; SEKLER, I. & CYERT, M. S. (1996). The product of *HUM1*, a novel yeast gene, is require for vacuolar Ca⁺²/ H⁺ exchange and is related to mammalian Na⁺/ Ca⁺² exchangers. *Mol. and Cell. Biol.* **16**, 3730 – 3741.
- RAO, R., DRUMMOND-BARBOSA, D. & SLAYMAN, C.W. (1993). Transcriptional regulation by glucose of the yeast *PMA1* gene encoding the plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast* **9**, 1075-1084.
- RASMUSSEN, H. (1986). The calcium messenger system (1). *N. Engl J. Med.* **314**, 1094-1101.

- RESNICK, A. C., SNOWMAN, A. M., KANG, B. N., HURT, K. J., SNYDER, S. H. & SAIARDI, A. (2005). Inositol polyphosphate multikinase is a nuclear PI3-kinase with transcriptional regulatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . **102**, 12783 – 12788.
- ROLLAND, F., WINDE, J.H., LEMAIRE, K., BOLES, E., THEVELEIN, J. M. & WINDERICKX, J. (2000). Glucose-induced cAMP signaling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol. Microbiol.* **38**, 348-358.
- ROLLAND, F., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J. M. (2002). Glucose-sensing and signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* **1457**, 1-19.
- RUDOLPH, H. K., ANTEBI, ^a, FINK, G. R., BUCKLEY, C. M., DORMAN, T. E., LE VITRE, J., DAVIDOW, L. S., MAO, J. I. & MOIR, D. T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺-ATPase family. *Cell.* **58**, 133-145.
- SAAVEDRA-MOLINA, A.; VILLALOBOS, R. & BORBOLLA, M. (1983). Calcium uptake during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **1-2**, 195 – 197.
- SAIARDI, A., CAFFREY, J. J., SNYDER, S. H. & SHEARS, S. B. (2000). Inositol polyphosphate multikinase (ArgR11) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **468**, 28 – 32. Erratum in: *FEBS Lett.* **469**, 213.
- SALGADO, A. P., SCHULLER, D., CASAL, M., LEO, C., LEIPER, F. C., CARLING, D., FIETTO, L. G., TRÓPIA, M. J., CASTRO, I. M. & BRANDÃO, R. L. (2002). Relationship between protein kinase C and derepression of different enzymes. *FEBS Lett.* **532**, 324-332.
- SCHMITZ, H. P. & HEINISCH, J. J. (2003). Evolution, biochemistry and genetics of protein kinase C in fungi. *Curr. Genet.* **43**, 245 – 254.
- SERRANO, R. (1983). In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* **156**, 11-14.
- SERRANO, R., KIELLAND-BRANDT, M.C. & FINK, G.R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺, K⁺), K⁺ and Ca²⁺-ATPases. *Nature* **319**, 689-693.
- SERRANO, R., & PORTILLO, F. (1990). Catalytic and regulatory sites of yeast plasma membrane H⁺-ATPase studied by directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1018**, 195-199.
- SILVERMAN-GAVRILA, L. B. & LEW, R. R. (2001). Regulation of the tip-high [Ca²⁺] gradient in growing hyphae of the fungus *Neurospora crassa*. *Eur J Cell Biol.* **6**, 379 – 390.

- SOUZA, M.A.A., TRÓPIA, M.J., BRANDÃO, R.L. (2001). New aspects of glucose activation of the H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* **147**, 2849-2855.
- TANIDA, I., HASEGAWA, A., IIDA, H., OHYA, Y. & ANRAKU, Y. (1995). Cooperation of calcineurin and vacuolar H⁺-ATPase in intracellular Ca²⁺ homeostasis of yeast cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 10113-10119.
- THEVELEIN, J. M. (1988). Regulation of threalase activity by phosphorylation-dephosphorylation during development transitions in fungi. *Exp. Mycol.* **12**, 1-12.
- THEVELEIN, J. M. (1991). Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol. Microbiol.* **5**, 1301-1307.
- THEVELEIN, J. M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast* **10**, 1753-1790.
- THEVELEIN, J. M. & HOHMANN, S. (1995). Threalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends. Bioch. Sci.* **20**, 1-48.
- TISI, R., BALDASSA, S., BELOTTI, F. & MARTEGANI, E. (2002). Phospholipase C is required for glucose-induced calcium influx in budding yeast. *FEBS Lett.* **26142**, 1-6.
- TISI, R., BALDASSA, S., BELOTTI, F., WERA, S., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J. M., J. M. & MARTEGANI, E. (2004). Evidence for inositol triphosphate as a second messenger for glucose-induced calcium signalling in budding yeast. *Curr. Gen.* **45**, 83-89.
- TOKÉS-FUZESI, M., BEDWELL, D.M., REPA, I, SIPOS, K., SUMEGI, B., RAB, A. & MISETA, A. (2002). Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1 p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **44**, 1299-1308.
- TON, V. & RAO, R. (2004). Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca⁺² signaling and Ca⁺²- transporting ATPases. *Am. J. Physiol.* **287**, 580 – 589.
- TRÓPIA, M. J. M., CARDOSO, A. S., TISI, R., FIETTO, L. G., FIETTO, J. L.R., MARTEGANI, E., CASTRO, I. M. & BRANDÃO, R. L. (2006). Relationship between calcium metabolism and sugar-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **343**, 1234-1243.
- TRUMBLY, R. J. (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**, 15-21.

- TUTULAN-CUNITA, A. C.; OHNISHI, T.; MIZUNUMA, M.; HIRATA, D. & MIYAKAWA, T. (2005). Involvement of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p ATP-binding cassette transporter in calcium homeostasis. *J* **4**, 857 – 860.
- ULASZEWSKI, S., HILGER, F. & GOFFEAU, A. (1989). Cyclic AMP controls the plasma membrane H⁺-ATPase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **245**, 131-136.
- VAGNOLI, P.; COONS, D. M. & BISSON, L. F. (1998). The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 31 – 36.
- VERNET, T.; DIGNARD, D. & THOMAS, D. Y. (1987). A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. *Gene.* **52**, 225 – 233.
- VIEGAS, C. A. & SÁ-CORREIA, I. (1991). Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 645-651.
- WALKER, G. M. (1998). *Yeast physiology and Biotechnology*. John Wiley and Sons. England. 350.
- WERA, S., BERGSMA, J.C.T. & THEVELEIN, J. M. (2001). Phosphoinositides in yeast: genetically tractable signaling. *FEMS Yeast Res.* **1**, 9-13.
- YOKO-O, T., MATSUI, Y., YAGISAWA, H., NOJIMA, H. UNO, I. & TOH-E, A. (1993). The putative phosphoinositide specific phospholipase C gene, PLC1, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is important for cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 1804-1808.
- YORK, J. D. (2006). Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochim Biophys Acta.* **1761**, 552 – 559.
- ZHOU, X.L.; BATIZA, A. F.; LOUKIN, S. H.; PALMER, C. P.; KUNG, C. & SAIMI, Y. (2003). The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is mechanosensitive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **12**, 7105 – 7110.