

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

**Estratégia para a identificação de proteína(s)
quinase(s) envolvida(s) na ativação da H⁺-ATPase de
membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae***

Autora: Renata Rebeca Pereira

Ouro Preto – Minas Gerais

2011

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

**Estratégia para a identificação de proteína(s) quinase(s)
envolvida(s) na ativação da H⁺-ATPase de membrana
plasmática de *Saccharomyces cerevisiae***

Autora: Renata Rebeca Pereira

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Leoneide Érica Maduro Bouillet

Dissertação 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 Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

P436e

Pereira, Renata Rebeca.

Estratégia para a identificação de proteína (s) quinase (s) envolvida (s) na ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* [manuscrito] / Renata Rebeca Pereira - 2011.

xix, 99f.: il., color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

Co-orientadora: Profa. Dra. Leoneide Érica Maduro Bouillet

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas (NUPEB).

Área de concentração: Biologia Molecular.

1. *Saccharomyces cerevisiae* - Teses.
2. Proteínas - Teses.
3. Membranas (Biologia) - H⁺-ATPase - Teses.
4. Leveduras - Teses.
5. Glicose - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 577.112:582.282.23

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



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



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

**“ESTRATÉGIA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PROTÉINA(S) QUINASE(S)
ENVOLVIDA(S) NA ATIVAÇÃO DA H⁺-ATPase DE MEMBRANA
CITOPLASMÁTICA DE *Saccharomyces cerevisiae*”**

Aos 18 dias do mês de abril de 2011, às 09:00h, na Sala de Seminários do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Renata Rebeca Pereira. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram porAPROVAM..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão
Presidente

Prof. Dr. Antonio Ferreira Pereira
Examinador (UFRJ)

Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 18/04/2011

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 Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão e co-orientação da Prof^a. Dra. Leoneide Érica Maduro Bouillet, com o auxílio financeiro da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais *Marcolino e Aparecida*. Obrigada pela educação e pelos valores – peças fundamentais na construção do meu caráter – e por tudo que fizeram por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão pela orientação, pela confiança e pelo aprendizado científico, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu amadurecimento.

Á Prof^a. Dra Leoneide Bouillet, eu agradeço pelos ensinamentos, críticas e sugestões no desenvolvimento deste trabalho, além da grande amizade.

Á Universidade Federal de Ouro Preto e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto, pela excelente oportunidade de formação.

Ao LBCM por ser o lugar onde cresci como pessoa e como profissional e que me deu oportunidade de conhecer pessoas excelentes.

Ao Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro, agradeço pela disposição em ajudar e colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

Á grande amiga Maria José Magalhães Trópia, pelo excelente apoio técnico, pela presteza e ajuda, além do seu alto astral que contagia todos ao seu redor e que me trouxe forças e momentos de descontração.

Á Erica Milena e ao Fernando, pela contribuição imprescindível para a obtenção dos resultados e pela amizade.

Aos meus colegas e amigos do LBCM, Bruna, Cris e Eduardo. Obrigada pelos favores prestados e pela forte amizade.

Aos demais alunos do LBCM, Laura, Soraya, Ana Maria, Max, Priscila, Érica e Gabriela pela excelente convivência e pelos favores prestados.

Á Thaís, grande amiga, pelas palavras de apoio e pelos momentos de descontração.

Á Maria Aparecida Reis Trópia, secretária do NUPEB, obrigada pelo carinho e pela disponibilidade em ajudar.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da UFOP, pelo apoio e convívio agradável.

Aos professores Dr. Luís Crocco e Dr. Milton Guerra, por terem sempre me atendido muito bem e disponibilizado os laboratórios. Aos demais professores do NUPEB que de alguma forma me apoiaram na realização deste trabalho.

Á minha família, por terem aceitado minhas escolhas, terem compreendido as minhas ausências e sempre terem me incentivado a concretizar os meus objetivos.

Ao Thiago, pelo carinho, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo apoio nos momentos difíceis.

RESUMO

A H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* é uma bomba de prótons que possui um papel importante na fisiologia deste microrganismo, uma vez que ativada é capaz de criar 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, está de alguma maneira ligada ao metabolismo de cálcio. No entanto, a identidade da(s) proteína(s) quinase(s) que leva à ativação da enzima ainda não foi identificada. Neste trabalho, nós mostramos os resultados de uma triagem com as cepas de levedura que apresentam deleções únicas em genes que codificam para proteínas quinases existentes em *Saccharomyces cerevisiae*. Para isso, foi avaliada a variação do pH extracelular durante o crescimento celular, com adição de glicose, de leveduras apresentando deleções únicas em genes que codificam para proteínas quinases conhecidas. As células foram cultivadas em placas de 96 poços em YPD 2%, e cada cultura foi avaliada com o indicador ácido-base púrpura de bromocresol. Nossos resultados demonstraram que das 95 amostras analisadas, 53 foram incapazes de promover a acidificação durante o crescimento celular. Quando a ativação induzida por glicose foi medida por meio da determinação da acidificação extracelular, apenas 20 mutantes apresentaram uma clara redução na taxa de acidificação, quando comparados à linhagem selvagem. Para eliminar as quinases que poderiam estar indiretamente envolvidas na regulação da ATPase, a sinalização de cálcio foi medida e 14 mutantes apresentaram níveis de cálcio normais durante a sinalização induzida por glicose. Posteriormente, nós determinamos as propriedades cinéticas da enzima, em membranas plasmáticas purificadas, de mutantes com deleção em genes que codificam para 7 das 14 proteínas selecionadas como potenciais candidatas ao mecanismo de fosforilação da H⁺-ATPase, incluindo a cepa selvagem correspondente. No entanto, essa abordagem não permitiu esclarecer completamente a(s) identidade(s) da(s) proteína(s) quinase(s) que leva(m) à ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. H⁺-ATPase. Proteína quinase.

ABSTRACT

The *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H⁺-ATPase is a pumping proton that plays an important role in the physiology of this microorganism since activated is able to create an electrochemical gradient essential for nutrient uptake. The presence of glucose triggers post-translational modifications that increase H⁺-ATPase activity. Studies performed in our laboratory demonstrated that the induced activation of this enzyme by glucose is, in some way, related to calcium metabolism. However, the identity of protein kinase (or protein kinases) that leads the H⁺-ATPase activation has not been identified yet. In this work, we show the results of a screening with the yeasts strains with single deletions in genes encoding for protein kinases described to exist in *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, we evaluated the extracellular pH variation during cell growth, with the addition of glucose in yeast with deletions unique in genes to known protein kinases. The cells were grown in 96-well plates in YPD 2% and each culture was assessed with the acid-base indicator bromocresol purple. Our results showed that of 95 samples analyzed, 53 were unable to promote acidification during cell growth. When the induced activation by glucose was measured by determining the extracellular acidification, only 20 mutants showed a clear reduction in the rate of acidification compared to the wild type. To eliminate the kinases that could be indirectly involved in the regulation of H⁺-ATPase, calcium signaling was measured and 14 mutants showed normal levels of calcium during glucose-induced signaling. Subsequently, we determined the enzyme kinetic properties in purified plasma membranes of mutants with deletions in genes coding for 7 of the 14 proteins selected as potential candidates for the H⁺-ATPase phosphorylation mechanism, including the corresponding wild strain. However, this approach does not clarified completely the identify of protein kinase (s) that takes (m) to the activation of H⁺-ATPase of the membrane of *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. H⁺-ATPase. Protein kinase.

LISTA DE ABREVIACOES

μ l	Microlitros
μ moles	Micromoles
<i>ADH1</i>	Gene que codifica para a álcool desidrogenase
<i>AEQ1</i>	Gene que codifica para a apoeaquorina de <i>Phyllorhiza punctata</i>
<i>AKL1</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Akl1 p
Akt/PKB	Proteína serina/treonina quinase que tem papel fundamental em vários processos celulares
Ala	Alanina
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por 5'-AMP
ANSA	1-Amino – 2 – hidroxido – 4 – cido naftaleno sulfnico
Apal p	Proteína envolvida na regulação gênica da H ⁺ -ATPase
Arg	Arginina
Asp	cido aspártico
<i>ATG1</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Atg1 p
ATP	Adenosina 5' Trifosfato
C2	Domínios dependentes de cálcio
Ca ²⁺	on Cálcio
CaMK2	Proteína quinase tipo 2 dependente de Ca ²⁺ /calmodulina
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
Cels	Células
CK1	Caseínas quinases 1
CK2	Caseínas quinases 2
<i>CKA1</i>	Gene que codifica para a subunidade catalítica alfa da caseína quinase 2
<i>CKA2</i>	Gene que codifica para a subunidade catalítica alfa' da caseína quinase 2

<i>CMK2</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Cmk2 p
Co ³⁺	Íon cobalto
C-terminal	Carboxi terminal
DAG	Diacilglicerol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>ELM1</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Elm1 p
ePKs	Proteínas quinases eucarióticas
<i>Euroscarf</i>	European <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Archive for Functional Analysis
Glk1	Glicoquinase 1
Gln3	Fator de transcrição responsável pelo aumento da expressão da H ⁺ -ATPase
Gpa2 p	Proteína G de membrana
GPCR	“G-protein-coupled receptors”, receptor acoplado a protein G
Gpr1 p	Receptor de membrana acoplado a proteína G
GSK3β	Glicogênio sintase 3β-quinase
<i>HAL5</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Hal5 p
HCl	Ácido clorídrico
<i>HRK1</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Hrk1 p
Hxk1	Proteína hexoquinase 1
Hxk2	Proteína hexoquinase 2
<i>HXT 1-7</i>	Genes que codificam para transportadores funcionais de hexose
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
<i>IRE1</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Ire1 p
KDa	Quilodáltons
<i>KKQ8</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Kkq8 p
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis-Menten
LBCM/UFOP	Laboratório de Biologia celular e Molecular/Universidade Federal de Ouro Preto

M	Molar
MAP quinases	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
<i>MCK1</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Mck1 p
Mg ²⁺	Íon Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Mid1 p	Proteína componente do sistema de influxo de cálcio de alta afinidade
Min	Minutos
mL	Mililitros
Mlk1 p	Proteína quinase linhagem mista
mM	Milimolar
Mmol	Milimol
Mn ²⁺	Íon Manganês
Na ₂ S ₂ O ₅	Metabissulfito de Sódio
Na ₂ SO ₃	Sulfato de Sódio
NaN ₃	Azida sódica
N-Terminal	Amino-terminal
ORF	“Open reading frame”, Sequência de leitura aberta
ORFs	“Open reading frames”, Sequências de leitura aberta
Pak1 p	Proteína quinase ativada por p21
<i>PEG</i>	Polietilenoglicol
Pgm2 p	Proteína fosfoglucosutase 2
Pi	Fosfato livre
<i>PKA</i>	Gene que codifica para a proteína quinase dependente de AMPc
Pka p	Proteína quinase dependente de AMPc
<i>PKC</i>	Gene que codifica para a proteína quinase dependente de cálcio
Pkc p	Proteína quinase dependente de cálcio

<i>PKH2</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Pkh2 p
<i>PKP1</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Pkp1 p
<i>PLC1</i>	Gene que codifica para a fosfolipase C
Plc1 p	Proteína fosfolipase C
Plk1p	Proteína quinase pólo-like
<i>PMA1</i>	Gene que codifica para a H ⁺ -ATPase de membrana plasmática
<i>PMA2</i>	Gene que codifica para uma isoforma da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática
Pmc1 p	Ca ²⁺ -ATPase de membrana vacuolar em leveduras
Pmr1 p	Ca ²⁺ /Mn ²⁺ -ATPase presente na membrana do Complexo de Golgi de leveduras
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
<i>PTK2</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Ptk2 p
Ptk2 p	Proteína serina/treonina quinase envolvida na regulação do transporte de íons na membrana plasmática de leveduras
p/v	Peso por volume
<i>RGT2</i>	Gene que codifica para o sensor de glicose Rgt2 p
<i>RIM15</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Rim15 p
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
<i>SAK1</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Sak1 p
Ser	Serina
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genoma Database
<i>SNF3</i>	Gene que codifica para o sensor de glicose Snf3 p
Snf3 p	Proteína que atua como sensor de alta afinidade para glicose e gera um sinal para a expressão do(s) gene(s) <i>HXT</i>
<i>SSK22</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Ssk22 p
<i>STE11</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Ste11 p

TCA	Ácido Tricloroacético
TE	Tampão Tris/EDTA
TECC	Elevação transitória de cálcio citosólico
Thr	Treonina
Tuf/ Rap1/ Grf1	Fator de transcrição do gene <i>PMA1</i>
UAS1/UAS2	Região promotora do gene <i>PMA1</i>
<i>URA3</i>	Gene que codifica para o nucleotídeo uracila
URLs/s	Unidades relativas de luminescência por segundo
Vcx1 p	Canal permutador vacuolar H ⁺ /Ca ²⁺
V_{max}	Velocidade máxima
<i>VPS15</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Vps15 p
<i>YCK1</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Yck1 p
<i>YCK2</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Yck2 p
<i>YGK3</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Ygk3 p
<i>YPK1</i>	Gene que codifica para a proteína quinase Ypk1 p

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da medição do crescimento em microplacas.....	46
Tabela 2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> selecionadas a partir da triagem preliminar no ensaio de acidificação extracelular em microplaca de 96 poços.	50
Tabela 3. Efeito da adição de glicose 100 mM, sobre a extrusão de prótons, na cepa selvagem de <i>S. cerevisiae</i> (BY4741) e nas 53 cepas com deleção em genes que codificam para proteínas quinases.	53
Tabela 4. Parâmetros cinéticos da H ⁺ -ATPase em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na ausência de glicose (AG) e expostas à glicose por 30 minutos (PG) na cepa selvagem (BY4741) e mutantes.	65
Tabela 5. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas nos experimentos.....	89
Tabela 6. Cepas inviáveis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
Tabela 7. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> construídas e utilizadas nos experimentos de sinal de cálcio citosólico livre.	94
Tabela 8. Variação de pH em função do tempo na acidificação extracelular da cepa X....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dendrograma da superfamília de proteínas quinases de leveduras.....	8
Figura 2. Modelo topológico da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática de fungos.....	11
Figura 3. Modelo de fosforilação da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática, induzida por glicose.....	15
Figura 4. Mecanismo hipotético de ativação induzida por glicose da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , via proteína quinase dependente de AMPc (PKA).	17
Figura 5. Mecanismo hipotético de ativação induzida por glicose da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , via proteína quinase dependente de cálcio (PKC).	19
Figura 6. Modelo hipotético da ativação da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediada por íons cálcio.	22
Figura 7. Ensaio de acidificação extracelular em microplaca de 96 poços baseado na adição de solução do indicador de pH púrpura de bromocresol.....	34
Figura 8. Curvas de crescimento das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com mutações nos genes que codificam para proteínas quinases comparadas à curva de crescimento da cepa selvagem correspondente (BY4741).	48
Figura 9. Medida da taxa de bombeamento de prótons, induzida por glicose (100 mM), da cepa selvagem (BY4741) e das cepas mutantes <i>cla4Δ</i> , <i>hal5Δ</i> , <i>pkp1Δ</i> , <i>cka2Δ</i> , <i>yck1Δ</i> , <i>yck2Δ</i> , <i>akl1Δ</i> , <i>elm1Δ</i> , <i>kkq8Δ</i> , <i>stel1Δ</i> , <i>ire1Δ</i> , <i>sak1Δ</i> , <i>ptk2Δ</i> , <i>ssk22Δ</i> , <i>hrk1Δ</i> , <i>cka1Δ</i> , <i>pkh2Δ</i> , <i>ygk3Δ</i> , <i>rim15Δ</i> e <i>ylr063w</i>	56
Figura 10. Sinal de cálcio, induzido por glicose, em cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (Painel A): cepa selvagem e as mutantes <i>plc1Δ</i> , <i>hrk1Δ</i> , <i>ptk2Δ</i> e <i>hal5Δ</i> ; (Painel B): cepa selvagem e as mutantes <i>plc1Δ</i> , <i>yck1Δ</i> , <i>yck2Δ</i> , <i>cka1Δ</i> e <i>cka2Δ</i>	58
Figura 11. Sinal de cálcio, induzido por glicose, em cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (Painel A): cepa selvagem e as mutantes <i>plc1Δ</i> , <i>sak1Δ</i> , <i>elm1Δ</i> e <i>ylr063wΔ</i> ; (Painel B): cepa selvagem e as mutantes <i>plc1Δ</i> , <i>pkp1Δ</i> , <i>ire1Δ</i> e <i>rim15Δ</i>	60
Figura 12. Sinal de cálcio, induzido por glicose, em cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (Painel A): cepa selvagem e as mutantes <i>plc1Δ</i> , <i>stel1Δ</i> , <i>akl1Δ</i> , <i>kkq8Δ</i> , <i>cla4Δ</i> e <i>ssk22Δ</i> ; (Painel B): cepa selvagem e as mutantes <i>plc1Δ</i> , <i>ygk3Δ</i> e <i>pkh2Δ</i>	62

Figura 13. Cinética enzimática da H ⁺ -ATPase em células de <i>S. cerevisiae</i> : cepa selvagem (BY4741) (Painéis A e B) e na cepa mutante <i>ptk2Δ</i> (painéis C e D), na ausência de glicose e expostas à glicose (concentração final de 4%), por 30 minutos após 4 horas de jejum....	64
Figura 14. Rede de interação entre Pma1 p e as 14 proteínas candidatas à sua ativação. ..	74
Figura 15. Representação gráfica de acidificação extracelular para o cálculo da taxa de extrusão de prótons da cepa X.	97

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIACÕES	IX
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XV
1. <i>Introdução</i>	1
1.1. Aspectos gerais.....	2
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo de estudo.....	2
1.3. Sinalização celular	3
1.3.1. Mecanismo de sinalização celular induzido por glicose em leveduras	5
1.4. Fosforilação de proteínas	6
1.5. Proteínas quinases de leveduras	7
1.6. A H ⁺ -ATPase de membrana plasmática de células da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.6.1 Origem, estrutura e função da H ⁺ -ATPase	9
1.6.3. Mecanismos regulatórios da H ⁺ -ATPase	12
1.6.3. Evidências relacionadas ao processo de ativação da H ⁺ -ATPase induzido por glicose	16
2. <i>Justificativa</i>	24
2.1. Justificativa do trabalho	25
3. <i>Objetivos</i>	27
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos Específicos.....	28

4. <i>Materiais e Métodos</i>	29
4.1. Desenho experimental	30
4.2. Pesquisa dos genes que codificam para proteínas quinases em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4.3. Microrganismos e construções utilizadas nos experimentos	31
4.3.1 Procedência das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4.4. Meios de cultura e condições de crescimento	31
4.4.1. Meio de cultura YP	31
4.4.2. Meio mínimo sintético (SD)	32
4.4.3. Condições de Crescimento.....	32
4.5. Ensaio de acidificação extracelular em microplaca de 96 poços	33
4.6. Determinação do crescimento celular	35
4.6.1. Crescimento celular em microplaca de 96 poços.....	35
4.6.2. Curvas de crescimento celular	35
4.7. Medida quantitativa da acidificação extracelular induzida por glicose	35
4.7.1. Determinação do peso seco.....	36
4.7.2. Cálculo da taxa de acidificação extracelular.....	36
4.8. Preparo de células de leveduras competentes e transformação.....	37
4.8.1. Preparo de células de leveduras competentes	37
4.8.2. Transformação de leveduras	37
4.9. Monitoramento “ <i>in vivo</i> ” da concentração de cálcio citosólico livre	38
4.9.1. Método e plasmídeo utilizado.....	38
4.9.2. Medida do sinal de cálcio citosólico livre	38

4.10.	Atividade da H ⁺ -ATPase	39
4.10.1.	Obtenção da fração de membranas citoplasmáticas para o estudo de cinética enzimática.....	39
4.10.2.	Atividade específica da H ⁺ -ATPase e ensaio de cinética enzimática da H ⁺ -ATPase	41
4.10.3.	Dosagem de proteínas	42
4.11.	Análise estatística	42
5.	<i>Resultados</i>	43
5.1.	Seleção preliminar de 53 cepas mutantes com deleção em genes que codificam para proteínas quinases em <i>S. cerevisiae</i>	44
5.2.	Proteínas quinases possivelmente envolvidas com o mecanismo de ativação da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
5.3.	Envolvimento das proteínas quinases com as vias de sinalização de cálcio intracelular.....	57
5.4.	Análise do envolvimento de algumas proteínas quinases candidatas ao mecanismo de fosforilação da H ⁺ -ATPase.....	63
6.	<i>Discussão</i>	67
7.	<i>Conclusão</i>	75
8.	<i>Perspectivas</i>	77
9.	<i>Referências Bibliográficas</i>	79
ANEXO A.	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas nos experimentos	89
ANEXO B.	Cepas inviáveis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
ANEXO C.	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> construídas e utilizadas nos experimentos de sinal de cálcio citosólico livre.....	94
APÊNDICE A.	Cálculo da taxa de extrusão de prótons induzida por glicose.....	96

1. *Introdução*

1.1. Aspectos gerais

As membranas celulares são cruciais para a vida da célula. Ela constitui uma organela essencial que circunda as células, define seus limites e separa o conteúdo intracelular do extracelular. Em todas as células, são criados gradientes de íons através da membrana, estabelecidos pela atividade das proteínas especializadas da membrana, que podem ser usados para sintetizar ATP, direcionar o movimento transmembranar de solutos selecionados ou produzir e transmitir sinais elétricos. A membrana plasmática também contém proteínas que atuam como sensores de sinais externos, permitindo que as células mudem seu comportamento em resposta aos sinais ambientais, incluindo aqueles de outras células (Alberts *et al.*, 2002). As proteínas transmembranares são capazes de detectar estes sinais externos e transmiti-los como um sinal intracelular, gerador de diferentes respostas fisiológicas. Considerando a importância biológica das proteínas de membrana, este trabalho visa estudar o mecanismo de ativação da H^+ -ATPase de membrana plasmática de levedura, uma proteína transmembranar de fungos e plantas sendo a sua atividade indispensável para a viabilidade da célula (Serrano, 1989). Esta enzima constitui um importante alvo final das vias de sinalização celular desencadeadas pela presença de glicose no meio extracelular e vários estudos vem sendo realizados com o intuito de elucidar o mecanismo de ativação desta enzima por glicose (Brandão *et al.*, 1994; Coccetti *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2001; Trópia *et al.*, 2006).

1.2. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo de estudo

As leveduras geralmente são encontradas em ambientes onde açúcares estão presentes, como frutas, flores e cascas de árvores. Há um número de espécies de leveduras que vivem simbioticamente com animais, especialmente insetos, e algumas espécies são patogênicas de animais e humanos. O habitat original das leveduras do gênero *Saccharomyces* é frutas e suco de frutas, mas as leveduras comerciais atualmente diferem das cepas selvagens empregadas em estudos nos laboratórios, porque estas sofreram algumas modificações para se chegar a um microrganismo geneticamente estável para as condições usuais de experimentação. Leveduras de pão e cerveja são provavelmente as

mais bem conhecidas cientificamente de todos os fungos porque elas são células eucarióticas facilmente manipuláveis (Madigan *et al.*, 2010).

Entre as leveduras, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* constitui um organismo extremamente conveniente para estudos genéticos, bioquímicos e moleculares, uma vez que possui uma maquinaria de sinalização celular típica de eucariotos. Outra característica adicional deste microrganismo é o fato de possuir, pelos padrões eucarióticos, um genoma pequeno (Alberts *et al.*, 2002). O genoma de *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro genoma eucariótico a ser seqüenciado (Dujon, 1996; Madigan *et al.*, 2010) o qual possui 12 milhões de pares de bases presentes em pouco mais de 6000 genes e distribuídos em 16 cromossomos (Goffeau *et al.*, 1996). Dois terços de aproximadamente 6000 ORFs identificadas já foram caracterizadas (Kellis *et al.*, 2003).

Ressalta-se também que as leveduras são microrganismos empregados, biotecnologicamente, na síntese de compostos de grande interesse industrial como o etanol, glicerol, enzimas, bebidas alcoólicas, vitaminas e fermento (Winderickx *et al.*, 2003).

De acordo com todas estas características, pode-se dizer que a espécie *Saccharomyces cerevisiae* satisfaz todas as tarefas que as células eucarióticas podem realizar e o estudo com leveduras, principalmente esta espécie, tem sido úteis para o entendimento de muitos processos cruciais em células eucariotas.

1.3. Sinalização celular

Todos os organismos estão constantemente expostos a uma série de estímulos ambientais capazes de afetar o seu comportamento. As células destes organismos detectam e respondem seletivamente a estes estímulos ou sinais, reagindo a alguns e desconsiderando outros para que possam perceber nutrientes e moléculas nocivas, identificar a presença de fatores de crescimento e hormônios e controlar o ciclo celular e as vias metabólicas.

Os circuitos moleculares das células responsáveis pela detecção, amplificação, integração de diversos estímulos externos e subsequente geração de respostas capazes de controlar fenômenos intracelulares caracterizam o mecanismo de sinalização celular, que embora se diferencie quanto à sua complexidade e componentes celulares, parece obedecer

a certos princípios conservados entre a maioria dos organismos vivos (Hug & Sarre, 1993). Para responder efetivamente a um sinal, a célula precisa ser estimulada por uma molécula sinalizadora que se liga e ativa um receptor protéico que, por sua vez, age como sinalizador. As três principais classes de receptores de superfície celular são:

- Receptores associados a canais iônicos: traduzem um sinal químico diretamente em um sinal elétrico;
- Receptores associados a proteínas G: atuam indiretamente na regulação da atividade de uma proteína ligada à membrana, ativando-a e iniciando uma cadeia de eventos que irão alterar a concentração de mensageiros secundários;
- Receptores associados a enzimas: funcionam diretamente como enzimas através da ação do seu sítio catalítico situado no interior da célula.

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 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 *et al.*, 2002).

Em organismos multicelulares, a maior parte das vias de sinalização tem como objetivo a comunicação entre as células. Os mensageiros extracelulares iniciam as rotas de sinalização modificando o metabolismo, proliferação e desenvolvimento em células alvo. Já os microrganismos utilizam basicamente nutrientes como agentes extracelulares sinalizadores que irão afetar o metabolismo, proliferação e desenvolvimento (Thevelein, 1994). Tem sido sugerido que os nutrientes, que atuam como moléculas sinalizadoras em microrganismos, são recursos que constituem as vias primárias de sinalização, e que posteriormente, estas vias foram duplicadas e/ou modificadas para servir a propósitos mais sofisticados, como a sinalização na presença de feromônios, condição de estresse, dentre outros (Thevelein, 1994).

1.3.1. Mecanismo de sinalização celular induzido por glicose em leveduras

A glicose é uma das moléculas que atua como mensageiro primário e está envolvida em diferentes vias de sinalização em leveduras. Além de exercer função regulatória, a sua disponibilidade no meio é o principal fator capaz de controlar o crescimento e o desenvolvimento das células.

A adição de glicose a células de *Saccharomyces cerevisiae*, previamente cultivadas em fontes de carbono não fermentáveis, como glicerol ou etanol, ou a células em fase estacionária, desencadeia processos regulatórios com o objetivo de potencializar a utilização da fonte de carbono (Bisson *et al.*, 1993; Thevelein, 1994; Rolland *et al.*, 2002). Nestas condições, muitas enzimas e proteínas são ativadas e/ou inativadas a nível pós-transcricional, enquanto que a nível transcricional muitos genes são reprimidos ou induzidos. Um dos principais efeitos regulatórios da glicose é a mudança do metabolismo gliconeogênico/respiratório para o metabolismo fermentativo (Thevelein, 1994). Além destes eventos, a glicose é capaz de promover uma elevação na taxa de crescimento devido a um aumento na síntese de RNA ribossomal e na síntese protéica, podendo levar à repressão de genes que codificam para enzimas envolvidas na captação e metabolização de fontes alternativas de carbono e na resistência a estresse (Thevelein, 1994; Rolland *et al.*, 2002).

Para que a glicose possa exercer seu papel regulatório ela precisa ser transportada para o interior da célula. Este transporte constitui o primeiro passo de uma seqüência de eventos sinalizadores que envolvem sensores específicos para a glicose e uma metabolização parcial do açúcar (fosforilação). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui em seu genoma vinte genes que codificam para proteínas do sistema transportador de glicose, mas somente sete destes genes (*HXT1- HXT7*) são conhecidos por codificarem transportadores funcionais (Carlson, 1998; Ozcan & Johnston, 1999). Células mutantes com deleções em todos estes sete genes são incapazes de crescer em glicose, frutose ou manose (Liang & Gaber, 1996; Boles & Hollenberg, 1997; Reifenberger *et al.*, 1997).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui também genes que codificam para proteínas homólogas dos transportadores de glicose, *SNF3* e *RGT2*, que não são capazes de transportá-la, mas atuam como sensores da mesma e geram um sinal intracelular para a indução da expressão dos genes *HXT*. A proteína Snf3 p apresenta seu segmento C –

terminal citoplasmático contendo 341 aminoácidos e é responsável pela indução da expressão de alguns genes de transportadores de glicose em baixas concentrações da mesma, enquanto que Rgt2 p contém 218 aminoácidos e é importante para a indução de outros genes *HXT* em altas concentrações de glicose. As seqüências citoplasmáticas destes dois sensores são similares apenas em uma região de 25 aminoácidos, já que Snf3 p possui duas destas seqüências de aminoácidos e Rgt2 p possui apenas uma. Acredita-se que este domínio de 25 aminoácidos esteja envolvido na geração do sinal para a indução da expressão dos transportadores (Ozcan *et al.*, 1996; Carlson, 1998; Ozcan *et al.*, 1998).

A fosforilação da glicose, essencial para a sinalização desencadeada por esta hexose, é catalisada em leveduras por três proteínas quinases, Hxk 1, Hxk 2 e Glk 1 (Hohmann *et al.*, 1999).

Em leveduras, várias vias de sinalização já foram demonstradas, sendo que as vias mais estudadas são a via principal de repressão por glicose e a via Ras-adenilato ciclase (Thevelein, 1994). Além destas, vários componentes de uma via do tipo fosfatidilinositol induzida por glicose, similar àquela encontrada em mamíferos, foram descritos (Kaibuchi *et al.*, 1986; Flick & Thorner, 1993; Coccetti *et al.*, 1998) e também vias de sinalização que ativam proteínas quinases homólogas àquelas ativadas por mitógenos em mamíferos (MAP quinases).

1.4. Fosforilação de proteínas

Muitas das vias de sinalização celular são reguladas por processos de fosforilação/desfosforilação de proteínas. A adição ou remoção do grupamento fosfato de uma proteína pode gerar um motivo de reconhecimento para interação proteína-proteína, controle da estabilidade protéica e modular a atividade das enzimas (Zhang, 2002). Em células eucarióticas, a fosforilação é catalisada por quinases, enzimas que adicionam um grupamento fosfato, através da hidrólise do ATP em resíduos de tirosina ou serina e treonina. Estas proteínas atuam regulando tanto negativa como positivamente as vias de sinalização e o controle fisiológico de uma variedade de tecidos (Zhang *et al.*, 2002). Desde a descoberta da regulação da síntese e degradação do glicogênio na década de 70 mediada pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA), as descobertas envolvendo

proteínas quinases mostraram que elas são uma das classes de enzimas mais abundantes e que, através da fosforilação dos substratos, desempenham uma quantidade e variedade de funções (Nestler & Greengard, 1999).

As proteínas quinases constituem aproximadamente 2% dos genes de um organismo eucariótico (Manning *et al.*, 2002). Poucas destas proteínas são constitutivamente ativas no organismo e a atividade não regulada da maioria das quinases pode ser deletéria ou letal para as células; por isso, elas têm desenvolvido mecanismos precisos para controlar a atividade destas enzimas (Rubenstein & Schmidt, 2007).

1.5. Proteínas quinases de leveduras

Em relação aos metazoários, as leveduras expressam um limitado número de proteínas quinases e a maioria destas tem sido parcialmente caracterizadas e, em alguns casos, têm sido completamente caracterizadas. O genoma de levedura codifica 117 proteínas quinases na superfamília de proteínas quinases eucarióticas (ePKs) e 10 quinases adicionais atípicas (Rubenstein & Schmidt, 2007). Em um estudo comparativo entre as famílias de proteínas quinases realizado por Manning *et al.* (2002), foi demonstrado que o maior grupo de quinases e a maior família de quinases está entre os metazoários, e que muitas destas proteínas são também encontradas em leveduras, o que reflete a amplitude das funções conservadas mediadas pelas proteínas quinases.

Hunter & Plowman (1997) foram os primeiros a analisar o conjunto completo de proteínas quinases em *Saccharomyces cerevisiae*. Neste estudo, foi proposto um dendrograma dos domínios de 113 proteínas quinases através do método de parcimônia da sequência protéica, classificando-as em subfamílias com base na relação de parentesco estrutural (Figura 1).

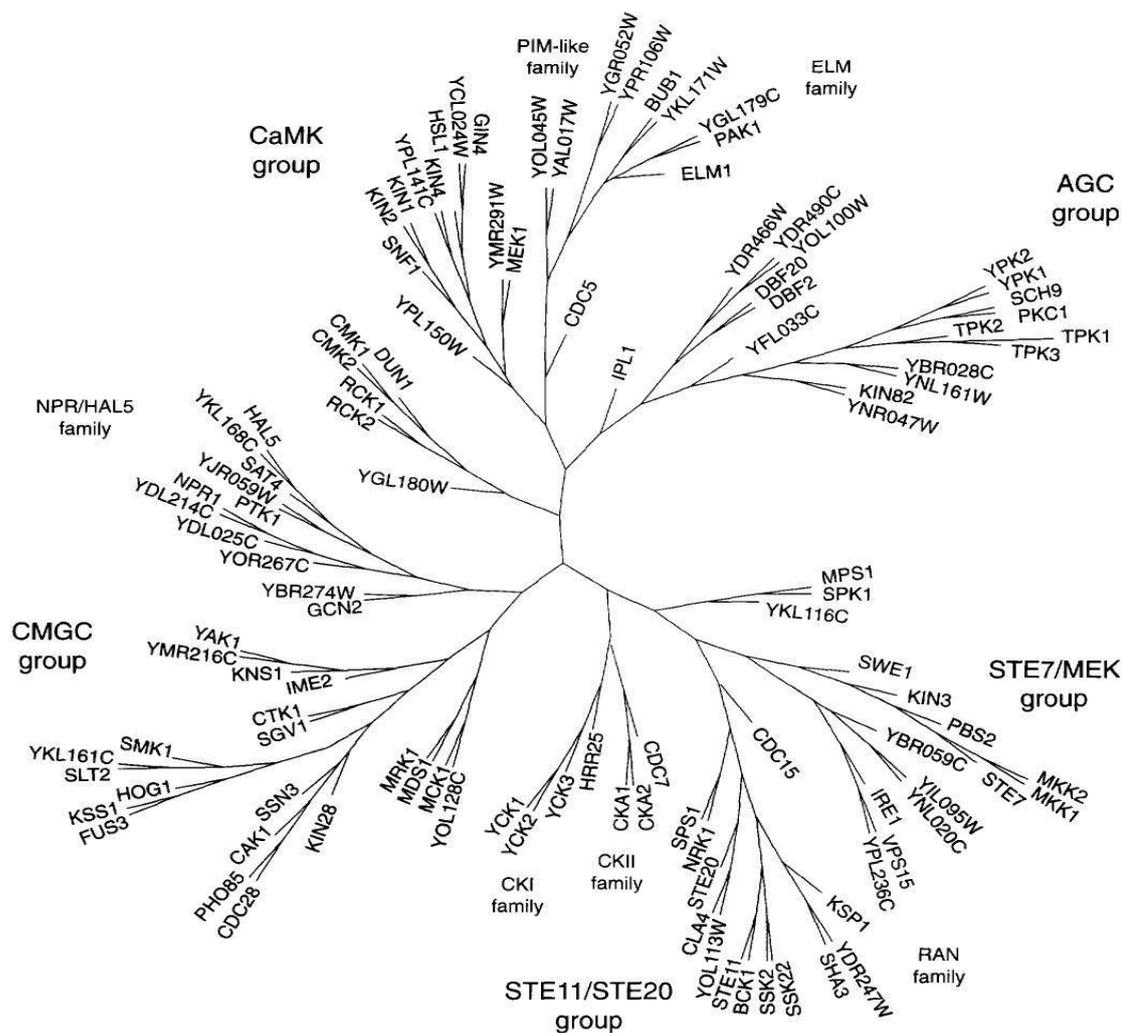


Figura 1. Dendrograma da superfamília de proteínas quinases de leveduras.

O domínio catalítico de 113 proteínas quinases foi alinhado usando SAM³⁹, um programa de alinhamento de múltipla sequência que se aplica ao modelo linear oculto de Markov para possibilitar o reconhecimento de subdomínios dentro de uma família de proteínas.

Fonte: Hunter & Plowman, 1997.

Um estudo comparativo entre os quinomas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* revelou a presença de 7 subfamílias específicas de leveduras que contém 23 proteínas quinases; as outras 97 proteínas quinases pertencem a 55 subfamílias, as quais são compartilhadas por organismos superiores (Manning *et al.*, 2002).

Muitas proteínas quinases humanas possuem ortólogas em leveduras, incluindo a proteína quinase A (Pka p), proteína quinase C (Pkc p), Akt (PKB), proteína quinase tipo 2 dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK2), proteína quinase ativada por 5'-AMP (AMPK), quinases dependentes de ciclinas (CDKs), quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), glicogênio sintase 3 β quinase (GSK3 β), quinase ativada por p21 (Pak1 p), quinase pólo-like (Plk1 p), quinase linhagem mista (Mlk1), e caseínas quinases 1 (CK1) e 2 (CK2) (Brinkworth *et al.*, 2006).

1.6. A H^+ -ATPase de membrana plasmática de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

1.6.1 Origem, estrutura e função da H^+ -ATPase

A H^+ -ATPase é a proteína mais abundante na membrana citoplasmática de fungos e sua atividade é essencial para a viabilidade destes organismos (Goffeau & Slayman, 1981; Ambesi *et al.*, 2000; Portillo, 2000; Trópia *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008). 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 & Carafoli, 1987; Morsomme *et al.*, 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, presente na posição 378, que é covalentemente fosforilado durante o ciclo catalítico formando um intermediário acil-fosfato (Møller *et al.*, 1996; Morsomme *et al.*, 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 demonstrou que este sistema de efluxo de prótons era gerado

por uma bomba presente na membrana citoplasmática das leveduras. As H^+ -ATPases de fungos foram detectadas 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 & Goffeau, 1978), *Saccharomyces cerevisiae* (Malpartida & Serrano, 1980) e *Neurospora crassa* (Addison & Scarborough, 1981; Bowman *et al.*, 1981; Addison, 1986). Esta caracterização demonstrou que as H^+ -ATPases são compostas por uma única cadeia polipeptídica, com massa molecular de 100 KDa, que se encontra inserida na bicamada lipídica.

Estudos que buscavam elucidar a estrutura secundária das P-ATPases em eucariotos sugeriram uma estrutura consenso com dois grandes domínios hidrofílicos e 10 segmentos transmembranares (Serrano & Portillo, 1990). Baseando-se nas sequências de aminoácidos das sequências de bases e análise do perfil de hidropatia, Lutsenko & Kaplan (1995) propuseram um modelo topológico comum para as H^+ -ATPases de *Neurospora crassa*, para a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático e para a Na^+ - K^+ -ATPase de células animais. Segundo este modelo a sequência de 100 KDa está ancorada à membrana por quatro segmentos hidrofóbicos na porção N-terminal e seis segmentos na porção C-terminal. A região central da proteína estende-se para o interior do citoplasma e contém quatro motivos altamente conservados, que representam os domínios catalíticos: 1- domínio de fosfatase; 2 – domínio de fosforilação (onde se encontra o resíduo de aspartato); 3 – domínio de ligação do ATP e de atividade quinase e 4 – domínio regulatório C-terminal (Serrano & Portillo, 1990) (Figura 2). Este modelo topológico condiz com estudos de cristalografia feitos por (Auer *et al.*, 1998) que revelaram um mapa da estrutura tridimensional da H^+ -ATPase contendo 10 α – hélices no domínio da membrana e 4 grandes domínios citoplasmáticos na conformação aberta da enzima sem a presença de ligantes.

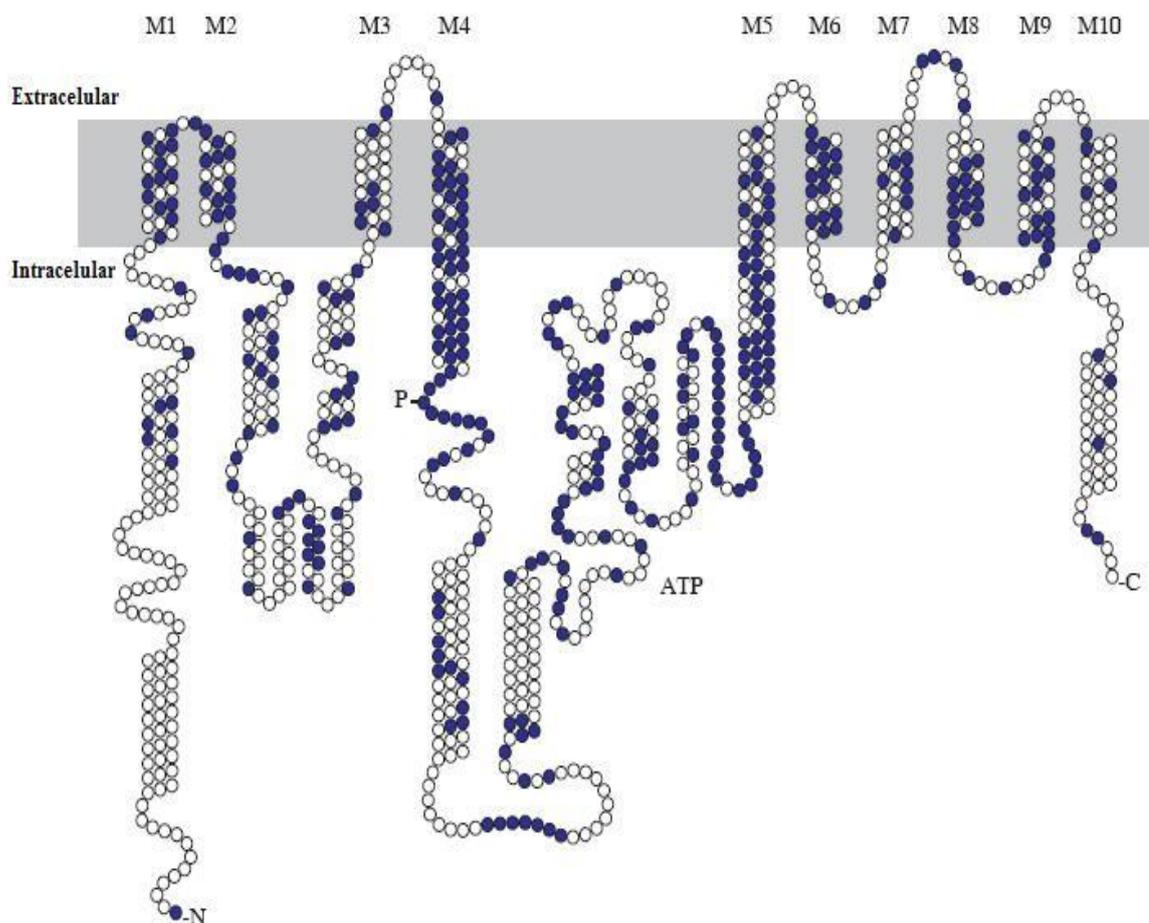


Figura 2. Modelo topológico da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática de fungos.

Os resíduos em azul representam aqueles comuns às H⁺-ATPases de diferentes fungos. M1 a M10 são os segmentos transmembranares. Os domínios catalíticos também se encontram representados na figura: P – sítio de fosforilação; ATP – sítio de ligação do ATP e C – domínio regulatório C-terminal.

Fonte: Adaptado de Ambesi *et al.*, 2000.

As H⁺-ATPases dos fungos *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* são codificadas pelo gene *PMA1* (Serrano *et al.*, 1986; Ghislain *et al.*, 1987), entretanto ambas 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 biológica 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 & Sá-Correia, 1998; Portillo, 2000). Para sua atividade, esta enzima requer Mg²⁺, Mn²⁺ ou Co³⁺ (Dufour & Goffeau, 1978), pH ótimo em torno de 6,0 e apresenta especificidade para ATP (Dufour & Goffeau, 1980). A H⁺-ATPase pode ser regulada por dois principais fatores: glicose e pH ácido; entretanto, situações de estresse desencadeadas pela presença de etanol (Monteiro & Sá-Correia, 1998), presença de ácidos orgânicos (Viegas & Sá-Correia, 1991) e choque térmico (Piper *et al.*, 1997) também são capazes de promover um aumento da atividade da enzima.

1.6.3. Mecanismos regulatórios da H⁺-ATPase

1.6.2.1. Regulação da H⁺-ATPase a nível de expressão gênica

Os processos de regulação da expressão do gene que codifica para a H⁺-ATPase de membrana citoplasmática são ainda pouco conhecidos. Até o momento, somente a região promotora do gene *PMA1* foi caracterizada. Baseando-se no fato do gene *PMA1* ser altamente expresso (Rao *et al.*, 1993) e que a H⁺-ATPase possui uma meia vida relativamente longa (aproximadamente 11 horas) (Benito *et al.*, 1991), sugere-se que mecanismos regulatórios mais precisos, envolvidos na atividade da H⁺-ATPase, ocorram a nível pós-traducional (Portillo, 2000).

Em células de *Saccharomyces cerevisiae*, a regulação transcricional da H⁺-ATPase se dá através da ativação por glicose do fator de transcrição Tuf/ Rap1/ Grf1 (Diffley, 1992) o qual se liga às regiões promotoras UAS1 e UAS2 do gene *PMA1* (Capieaux *et al.*, 1989). García-Arranz *et al.* (1994) demonstraram também a participação da proteína Apa1 na regulação gênica da enzima, induzida por glicose, e sugeriram que esta proteína poderia

estar localizada na membrana e fazer parte de um complexo que detectaria a glicose e através de mecanismos ainda desconhecidos levaria à indução do gene *PMA1*.

Goossens *et al.* (2000) descreveram um fator de transcrição – Gln3 – que seria responsável pelo aumento da expressão da H⁺-ATPase sob condições de jejum por nitrogênio. Esta proteína, Gln3, pertence à família de fatores Zinc-finger e se liga a seqüências GATAA únicas.

1.6.2.2. Regulação pós-traducional da H⁺- ATPase

A H⁺- ATPase de membrana citoplasmática é regulada a nível pós-traducional pelo metabolismo da 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 & Portillo, 1994; De La Fuente *et al.*, 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 (McDonough & Mahler, 1982; Chang & Slayman, 1991; Eraso & Portillo, 1994; Goossens *et al.*, 2000) e/ou degradação de uma hipotética proteína inibitória do processo de ativação (De La Fuente *et al.*, 1997).

Portillo & Serrano (1989) verificaram um papel importante da região C-terminal da enzima. Em 1998, foi observado por Mason *et al.*, que a deleção dos 27 aminoácidos do domínio N-terminal não afetava a atividade da enzima e nem a sua sensibilidade às mudanças do metabolismo em glicose, e que por outro lado, a remoção dos 18 aminoácidos do domínio C-terminal produzia uma enzima constitutivamente ativa. Além disso, observou-se também que a deleção combinada dos dois domínios (N-terminal e C-terminal) induzia um acentuado aumento da atividade da H⁺- ATPase (Mason *et al.*, 1998). Estas evidências sugerem 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 C-terminal que seriam importantes na regulação da H⁺- ATPase (Portillo & Serrano, 1989). Dentre estes, destacam-se dois sítios regulatórios que parecem afetar esta regulação: o sítio envolvendo os aminoácidos Arg-909 e Thr-912, que é

essencial para promover mudanças da V_{max} (aumento) e o sítio envolvendo os resíduos Ser-899 e Glu-901, que é necessário para alterações no K_m (redução) (Mason *et al.*, 1998).

No modelo proposto para explicar a regulação pós-traducional, induzida por glicose da H^+ -ATPase (Figura 3), 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, permitindo à enzima adotar uma conformação ativa. Esta interação, que limita o acesso do ATP e o transporte de prótons, é provavelmente desfeita por fosforilação dos resíduos de serina 899 e treonina 912 por intermédio de uma proteína quinase ainda desconhecida (Diffley, 1992; Mason *et al.*, 1998; Portillo, 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 & Gancedo, 1987).

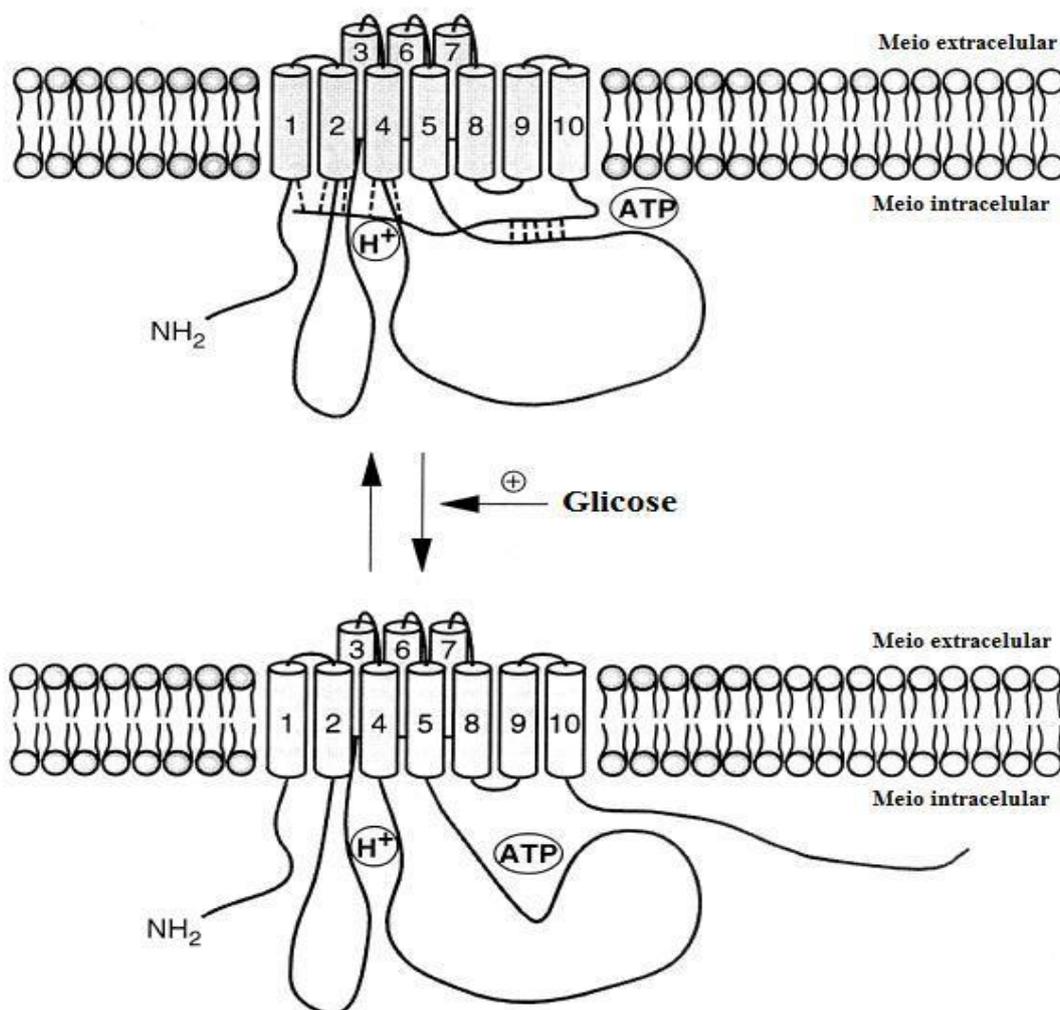


Figura 3. Modelo de fosforilação da H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, induzida por glicose.

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

Fonte: Adaptado de Portillo, 2000.

1.6.3. Evidências relacionadas ao processo de ativação da H⁺-ATPase induzido por glicose

Em 1983, Serrano 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 da atividade da enzima. A via de sinalização responsável por esta ativação intensa da H⁺-ATPase não foi ainda completamente elucidada, entretanto muitos componentes importantes já têm sido identificados, além da confirmação da necessidade de uma fosforilação direta da enzima (Chang & Slayman, 1991; De La Fuente & Portillo, 2000).

Um dos mais bem caracterizados efeitos da glicose, quando adicionada a células em fase estacionária ou crescendo em fontes de carbono não fermentáveis, é o aumento dos níveis de AMPc, o qual leva a uma cascata de fosforilação dependente da ativação da proteína quinase A promovendo uma variedade de efeitos fisiológicos (Thevelein, 1994; Rolland *et al.*, 2002). Baseando-se nisso foi sugerido que a via de sinalização mediada por Pka p estaria envolvida no processo de ativação, por glicose, da H⁺-ATPase e que esta proteína quinase seria responsável por fosforilar a enzima (Ulaszewski *et al.*, 1989) (Figura 4).

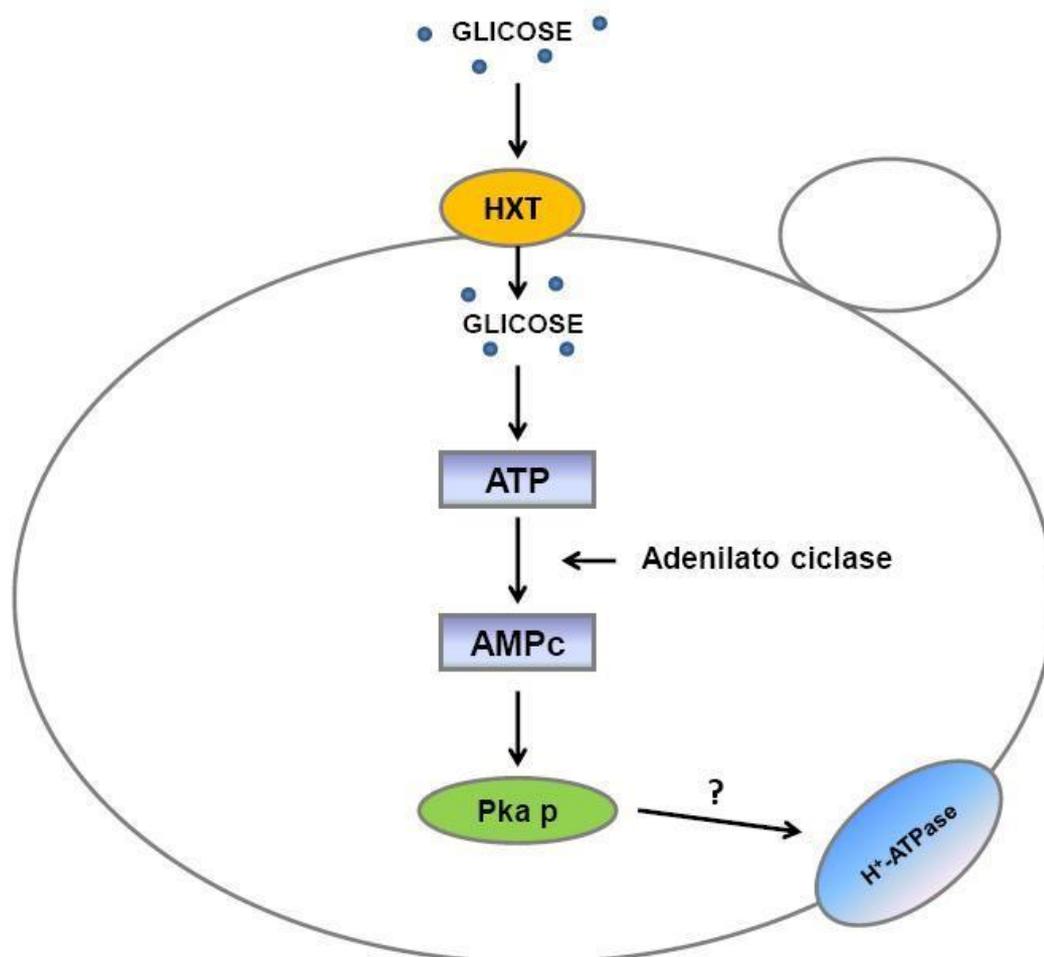


Figura 4. Mecanismo hipotético de ativação induzida por glicose da H⁺-ATPase de membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, via proteína quinase dependente de AMPc (PKA).

Por este mecanismo, a glicose seria internalizada e fosforilada, o que levaria ao aumento dos níveis endógenos de AMPc, sintetizado a partir do ATP pela ação da enzima adenilato ciclase. Um aumento dos níveis de AMPc ativaria a proteína quinase A e esta, por fosforilação, ativaria a H⁺-ATPase.

Apesar de alguns estudos (Portillo & Mazón, 1986; Mazón *et al.*, 1989; Ulaszewski *et al.*, 1989) terem sugerido que para a ativação eficiente da H⁺-ATPase seria necessária uma via Ras-AMPC adenilato ciclase intacta, Dos Passos *et al.* (1992) utilizando diversas cepas contendo mutações na via PKA, demonstraram que a ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose não era mediada pela proteína quinase AMPC dependente. Portanto, era necessário então investigar a participação de outra proteína quinase no processo de ativação da H⁺-ATPase.

Considerando outro efeito da adição de glicose a células de levedura, que é a estimulação do “turnover” do fosfatidilinositol, fosfatidilinositol fosfato e fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (Kaibuchi *et al.*, 1986; Frascotti *et al.*, 1990; Flick & Thorner, 1993), Brandão *et al.* (1994) decidiram estudar o 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 Pkc1 p na ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de levedura. Por este mecanismo, a glicose fosforilada de alguma maneira ativaria a fosfolipase C (Plc1 p), a qual hidrolisaria o fosfatidilinositol bifosfato em IP₃ (fosfatidilinositol) e DAG (diacilglicerol). O aumento dos níveis de IP₃ levaria à liberação de cálcio dos compartimentos intracelulares, o que conduziria à ativação da proteína quinase C, a qual, de alguma maneira, seria responsável pela ativação da H⁺-ATPase (Figura 5).

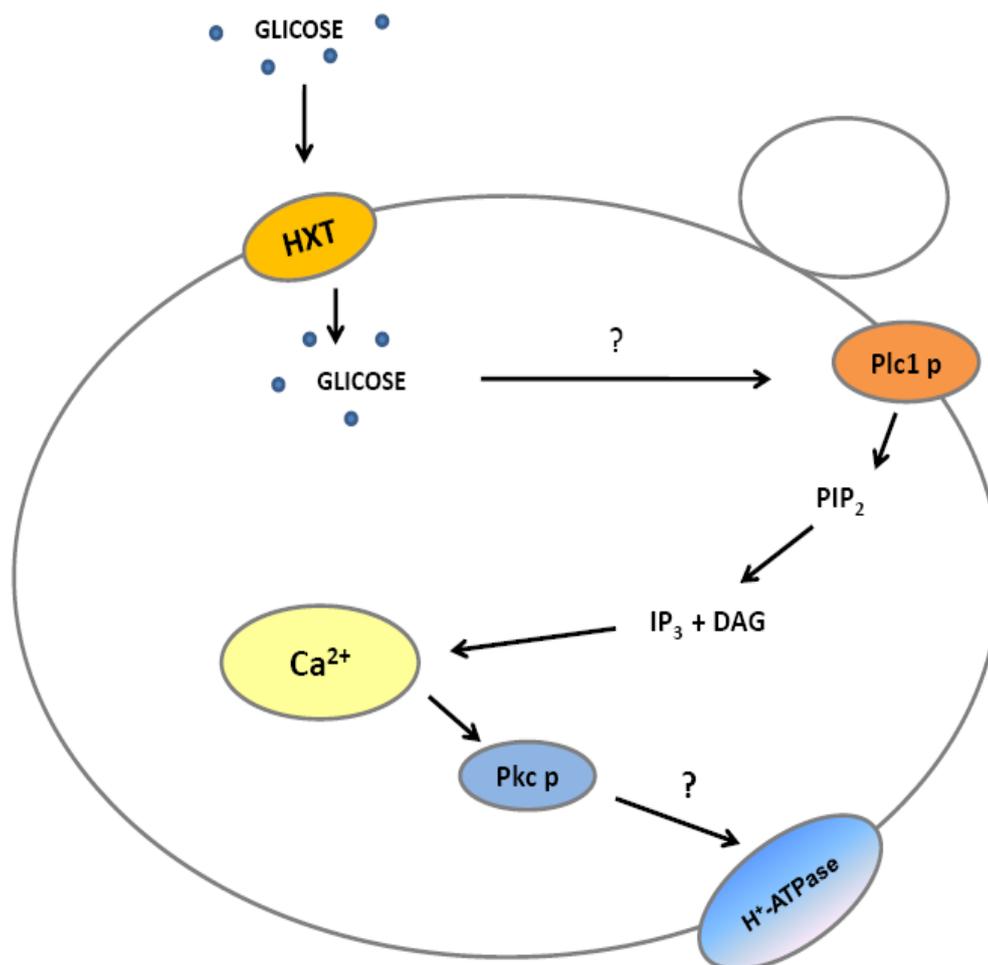


Figura 5. Mecanismo hipotético de ativação induzida por glicose da H⁺-ATPase de membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, via proteína quinase dependente de cálcio (PKC).

Mais tarde, Coccetti *et al.* (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 proteína, o “turnover” do fosfatidilinositol é inibido e a ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose é significativamente reduzida.

Souza *et al.* (2001) demonstraram a participação da proteína G Gpa2 p, do sensor de glicose Snf3 p e a necessidade da entrada e fosforilação da glicose para que a ativação da H⁺-ATPase acontecesse, além de confirmar o envolvimento da Pkc p 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.

Vários estudos também têm demonstrado que a adição de glicose a uma cultura de leveduras está diretamente ligada à homeostase do cálcio, sendo importante para ativar vias que induzem a captação, seqüestro e a liberação deste íon dos seus compartimentos intracelulares (Eilam *et al.*, 1990; Nakajima-Shimada *et al.*, 1991). Nakajima-Shimada *et al.* (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). Fu *et al.* (2000), evidenciaram que esta resposta era dependente da fosfoglucomutase 2 (Pgm2 p), sugerindo que a homeostase do cálcio era fortemente afetada pelos níveis de glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato (Aiello *et al.*, 2002).

Foi também demonstrado que esta sinalização dependente do influxo de cálcio requer a atividade da fosfolipase C e do complexo Gpr1/Gpa2 GPCR (Tisi *et al.*, 2002), bem como o transporte e fosforilação da hexose e a participação do canal Mid1 p (Tökés-Füzesi *et al.*, 2002). Tisi *et al.* (2004), evidenciaram ainda que o inositol-1,4,5- trifosfato (IP₃) funciona como mensageiro secundário no metabolismo de cálcio.

Kellermayer *et al.* (2003) também demonstraram a importância das bombas de Ca²⁺ presentes no vacúolo e no Complexo de Golgi (Vcx1 p, Pmc1 p e Pmr1 p) no controle da resposta TECC em células de *S. cerevisiae* submetidas a glicose, sugerindo que os estoques intracelulares deste íon são também importantes para o evento.

Considerando os vários componentes já estabelecidos na literatura para a homeostase de Ca²⁺ e aqueles envolvidos na ativação da H⁺-ATPase, Trópia *et al.* (2006)

baseando-se no fato de que estas vias possuem muitos componentes em comum, sugeriram uma conexão entre as mesmas propondo o seguinte modelo hipotético: primeiramente a glicose seria internalizada e fosforilada o que geraria um sinal, provavelmente relacionado a um balanço entre os níveis de glicose-1-P e glicose-6-P, o qual seria detectado pelo domínio C-terminal do sensor de glicose Snf3 p. Esta proteína, uma vez estimulada promoveria a inibição da Ca^{2+} -ATPase presente no vacúolo (Pmc1 p) e conseqüentemente alteraria os níveis de Ca^{2+} citosólico. Em paralelo, e atuando em uma via independente daquela com o envolvimento de Snf3 p, a proteína Gpa2 p responderia à presença do açúcar fosforilado estimulando a ativação da Plc1 p. Esta enzima, uma vez ativada, hidrolisaria o PI(3,5)P₂ gerando DAG e IP₃. O inositol-1,4,5- trifosfato, por sua vez, atuaria sobre canais de cálcio presentes na membrana citoplasmática e/ou na membrana de organelas intracelulares, o que acarretaria uma elevação dos níveis de cálcio livre no citosol. Esta elevação seria então o resultado de dois mecanismos: um com o envolvimento de Snf3 p e outro com o da Gpa2 p. A presença dos dois mensageiros secundários, DAG e cálcio, promoveria a ativação da proteína quinase C (Pkc1 p), culminando com a ativação da H^+ -ATPase de membrana citoplasmática por glicose (Figura 6).

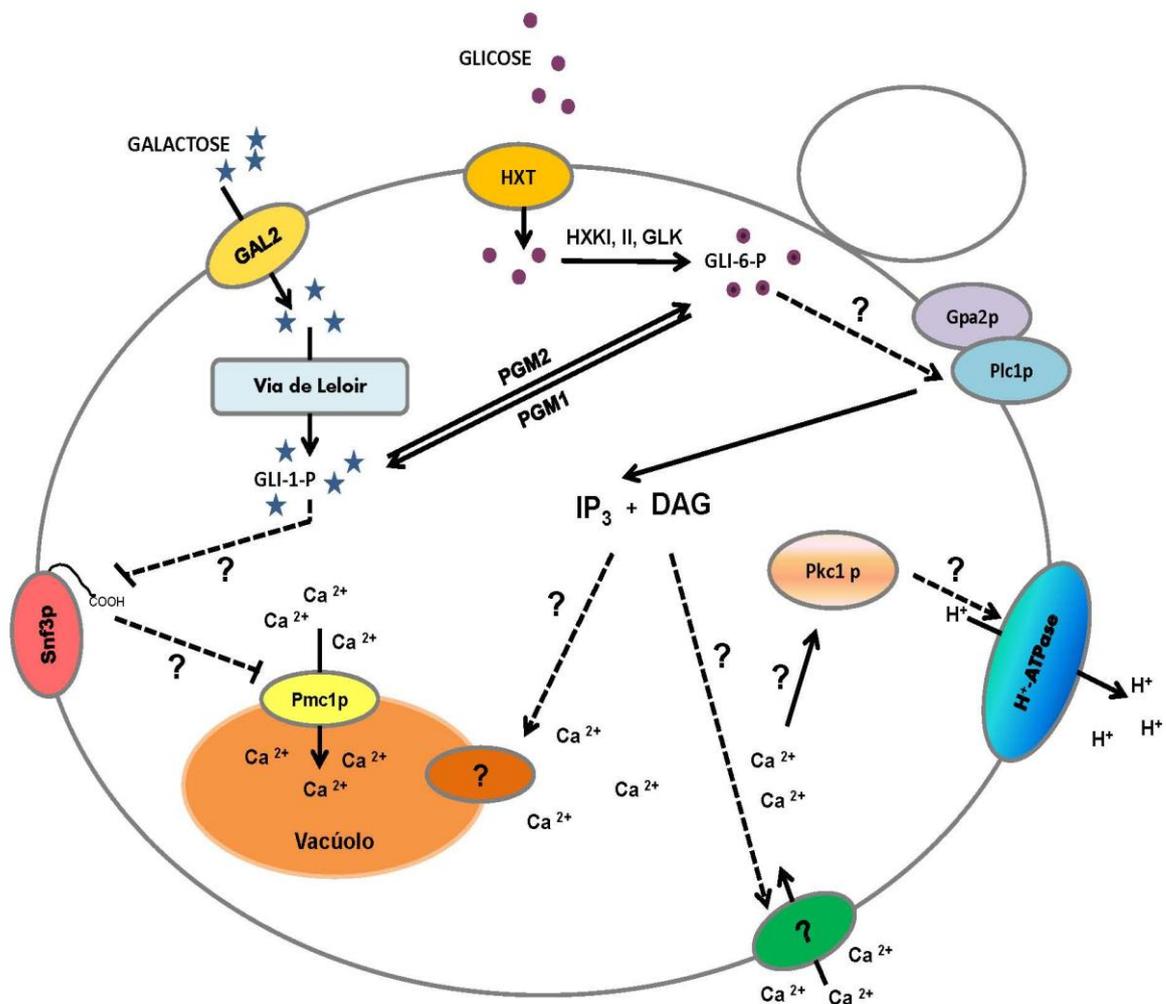


Figura 6. Modelo hipotético da ativação da H^+ -ATPase de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* mediada por íons cálcio.

Um sinal, provavelmente relacionado a um balanço entre os níveis de glicose-1-P e glicose-6-P seria gerado e detectado pelo domínio C-terminal do sensor Snf3 p. Esta proteína atuaria inibindo a Pmc1p, levando ao aumento dos níveis de cálcio citosólico. Atuando em via paralela e independente a Snf3 p, a proteína Gpa2 p responderia a presença do açúcar fosforilado estimulando a ativação da enzima Plc1 p. Esta, por sua vez, hidrolisaria o PI(3,5)P2 gerando DAG e IP₃. Este último atuaria sobre canais de cálcio presentes na membrana plasmática e/ou na membrana de organelas intracelulares, o que acarretaria uma elevação dos níveis de cálcio livre no citosol promovendo assim a ativação da proteína quinase C, a qual seria responsável pela ativação da H^+ -ATPase.

Fonte: (Souza *et al.*, 2001; Trópia *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Cardoso, 2009).

Nesse modelo hipotético de ativação da H⁺-ATPase, proposto a partir de estudos realizados anteriormente no nosso laboratório, foi sugerido que a Pkc1 p estaria envolvida no controle da atividade da H⁺-ATPase (Souza *et al.*, 2001) e que também teria um papel importante na desrepressão de diferentes genes (Salgado *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2005). No entanto, apesar do fato de que a Pkc1 p possui sítios de ligação para diacilglicerol (DAG) e os chamados domínios dependentes de cálcio, C2, há evidências demonstrando que esta proteína não é ativada por estes sinais (Schmitz & Heinisch, 2003).

Com base nas medidas dos parâmetros cinéticos, tem sido sugerido que a Ptk2 p seria a proteína quinase envolvida na modulação da atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática em células de levedura. Aparentemente, esta enzima fosforila o sítio de serina 899, provocando uma redução do valor de K_m para o ATP (Eraso *et al.*, 2006). No entanto, não há indicação clara sobre a quinase que fosforila o sítio de treonina 912. Contudo, como este resíduo é parte de um motivo de reconhecimento clássico para a proteína quinase 2 dependente de Ca²⁺/calmodulina (Goossens *et al.*, 2000) e caseína quinase 2 (Lecchi *et al.*, 2007), sugere-se que tais quinases possam estar envolvidas neste mecanismo de regulação.

Diante destas evidências, este trabalho propôs fazer uso de mutantes com deleção em genes que codificam para proteínas quinases em *Saccharomyces cerevisiae*, com o objetivo de elucidar a proteína quinase responsável pelo processo de ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Justificativa

2.1. Justificativa do trabalho

Os sistemas de transporte presentes nas biomembranas são extremamente importantes para a manutenção da vida da célula. A H^+ -ATPase de membrana plasmática de levedura desempenha função chave na fisiologia destes organismos, uma vez que constitui uma base para processos de transporte de membrana plasmática, devido à formação do gradiente de pH e do potencial elétrico gerado pela bomba. É de suma importância a compreensão da via de sinalização que regula a atividade dessa enzima, cuja atividade é crucial para a vida de microrganismos, como a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que tem sido empregada na indústria alimentícia e de bebidas, bem como na produção de álcool combustível.

O estudo dos aspectos relacionados ao controle do metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* iniciou-se na década de 80 pelo nosso grupo de pesquisa e, dentro desta linha de pesquisa, tem-se investigado o modelo de regulação pelo qual a presença de glicose e de outros açúcares desencadeiam um processo de ativação da H^+ -ATPase de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Ao longo desses anos de pesquisa foram obtidos resultados relevantes que conduziram à elaboração de um modelo de estudo relacionado à ativação desta enzima.

O estudo de identificação de proteínas quinases realizado neste trabalho, além de contribuir para a elucidação do mecanismo de sinalização da H^+ -ATPase, também fornece dados sobre outras proteínas quinases em *Saccharomyces cerevisiae* que podem ser utilizados como referência para estudos em células eucarióticas, já que estas proteínas compreendem uma grande família de enzimas que medeiam respostas em células eucarióticas a estímulos externos, e são moléculas chave em várias vias de sinalização relacionadas com diversos processos biológicos.

3.1. Objetivo Geral

Identificar a(s) proteína quinase(s) responsável(is) pela fosforilação e ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana plasmática em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2. Objetivos Específicos

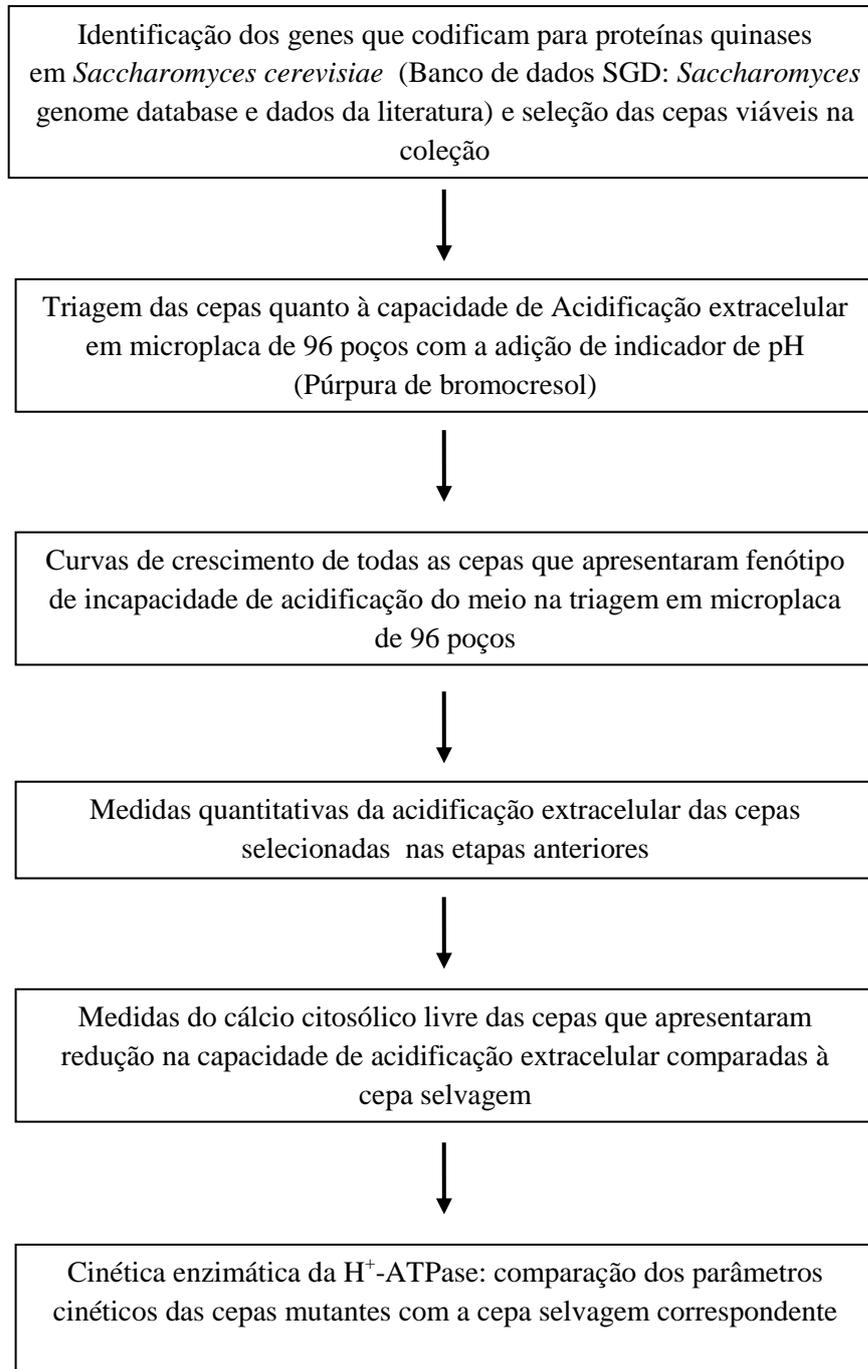
a) Realizar uma triagem com a coleção de mutantes *Euroscarf* (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis) a fim de identificar as quinases existentes em leveduras que podem estar envolvidas na fosforilação da H⁺-ATPase de membrana plasmática;

b) Avaliar a participação destas quinases em eventos envolvidos na sinalização intracelular de cálcio que levam à ativação da H⁺-ATPase;

c) Avaliar o envolvimento desta (s) quinase (s) no processo de ativação da enzima “*in vivo*” medindo a atividade enzimática específica em preparações de membranas plasmáticas em células não expostas e expostas à glicose.

4. *Materiais e Métodos*

4.1. Desenho experimental



4.2. Pesquisa dos genes que codificam para proteínas quinases em *Saccharomyces cerevisiae*

Foi realizada uma busca no banco de dados SGD (*Saccharomyces* Genoma Database - <http://www.yeastgenome.org>) e na literatura (Rubenstein & Schmidt, 2007) para identificar, no genoma da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, os genes que codificam para proteínas quinases.

4.3. Microrganismos e construções utilizadas nos experimentos

Em nossos experimentos foram utilizadas 95 cepas com mutações em diferentes genes que codificam para proteínas quinases em *Saccharomyces cerevisiae*. Em todas as condições experimentais, a cepa selvagem correspondente BY4741 (genótipo: MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0) foi utilizada como controle. A cepa YPL268W (genótipo: BY4741; *plc1::kanMX4*) foi transformada e utilizada como controle nos experimentos de medida do sinal de cálcio citosólico livre. Os Anexos A e C mostram todas as cepas utilizadas nos experimentos.

4.3.1 Procedência das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

As cepas utilizadas neste trabalho são originárias da coleção *Euroscarf* ((European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis).

4.4. Meios de cultura e condições de crescimento

4.4.1. Meio de cultura YP

Foi utilizado o meio YP como meio de cultura, composto por extrato de levedura 1% (p/v) e bactopectona 2% (p/v). Ao meio sólido foi acrescentado Ágar a 1,5% (p/v). A fonte de carbono utilizada foi glicose nas concentrações finais de 2% e 4%. Esta foi

autoclavada separadamente e acrescentada assepticamente ao meio em capela de fluxo laminar.

4.4.2. Meio mínimo sintético (SD)

Os meios líquido e sólido de SD utilizados foram 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. Ao meio sólido foi acrescentado Ágar a 1.5% (p/v) e o pH ajustado com KOH para 6,5. Para o preparo de 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%.

4.4.3. Condições de Crescimento

4.3.3.1. Pré-inóculo para a medida quantitativa de acidificação extracelular e medida da atividade específica da H⁺-ATPase

As células de *Saccharomyces cerevisiae* foram crescidas em tubos de ensaio contendo 4 mL de meio líquido YP glicose 2%, durante 24 h a 28-30° C e sob agitação constante de 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25). Em seguida, o conteúdo destes tubos foi inoculado em 50 mL do mesmo meio líquido, procedendo-se o crescimento nas mesmas condições anteriormente descritas.

4.3.3.2. Inóculo para o ensaio de acidificação extracelular em microplaca de 96 poços

As células de *Saccharomyces cerevisiae* foram pré-inoculadas em microplaca de 96 poços contendo 200 µL de meio líquido YP glicose 2%. Incubou-se a 30°C por 48 horas. Em seguida, as células foram ressuspensas e 30 µL desta suspensão foram inoculados em outra microplaca de 96 poços contendo 170 µL de meio líquido YP glicose 2%. Incubou-se a 30°C por 48 horas.

4.3.3.3. Inóculo para a medida quantitativa de acidificação extracelular

As células de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em pré-inóculo de 50 mL, foram inoculadas em 300 mL de meio líquido YP glicose 2%. Incubou-se a 28-30°C, sob agitação constante de 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25) até o final da fase exponencial de crescimento (entre 19 e 20 horas), quando as células foram coletadas para a execução dos experimentos.

4.3.3.4. Inóculo para a medida da atividade específica da H⁺-ATPase

As células de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em pré-inóculo de 50 mL, foram inoculadas em 1000 mL de meio líquido YP glicose 4%. Incubou-se a 28-30°C, sob agitação constante de 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25) até o final da fase exponencial de crescimento (entre 19 e 20 horas) quando as células foram coletadas para a execução dos experimentos.

4.5. Ensaio de acidificação extracelular em microplaca de 96 poços

Após o crescimento por 48 horas em microplaca de 96 poços, foram adicionados às suspensões celulares 7 µL do indicador ácido-base púrpura de bromocresol, que abaixo de pH 5,2 apresenta coloração amarelada e acima de pH 6,8 apresenta coloração violeta. Após a adição do indicador de pH, homogeneizou-se cuidadosamente a microplaca, com movimentos circulares leves. As suspensões que apresentaram uma cor amarela foram consideradas células capazes de acidificar o meio extracelular, enquanto que as suspensões que apresentaram cor violeta indicaram mutantes com menor atividade da H⁺-ATPase (Figura 7). Foram selecionadas as cepas que apresentaram cor violeta na presença do indicador de pH.

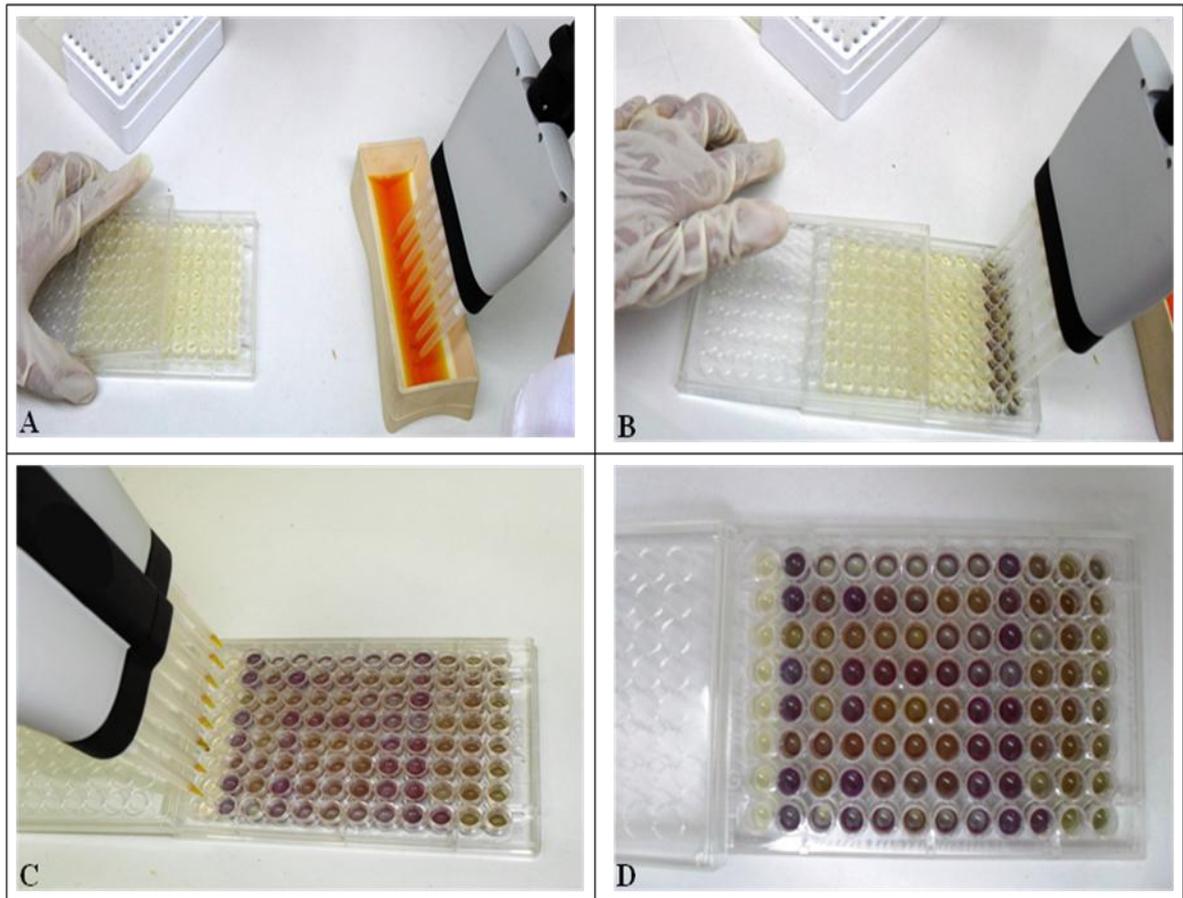


Figura 7. Ensaio de acidificação extracelular em microplaca de 96 poços baseado na adição de solução do indicador de pH púrpura de bromocresol.

(A) cultura de células em microplaca de 96 poços, após 48 horas de crescimento, antes da adição da solução de indicador de pH; (B) início da adição da solução de indicador de pH; (C) término da adição da solução de indicador de pH e (D) foto da microplaca após a adição da solução de indicador de pH: mostrando diferenças entre as colorações violeta (pH alcalino) e amarelada (pH ácido), na coluna 1 ainda não havia sido adicionada a solução de indicador de pH.

4.6. Determinação do crescimento celular

4.6.1. Crescimento celular em microplaca de 96 poços

Após 48 horas de crescimento a 30°C, as microplacas de 96 poços, contendo as suspensões celulares, foram submetidas à leitura da absorbância com comprimento de onda de 655 nm em leitor de Elisa (Model 680 BIO-RAD). Foram selecionadas as cepas que apresentaram um crescimento celular de pelo menos 50% do crescimento celular obtido pela cepa selvagem correspondente (BY4741).

4.6.2. Curvas de crescimento celular

As cepas mutantes que apresentaram o perfil de crescimento superior a 50% do obtido pela cepa selvagem correspondente (BY4741), mas que tiveram uma menor capacidade de acidificação do meio extracelular, foram testadas em crescimento celular em frascos sob agitação constante de 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25) a 28 – 30°C. O crescimento celular foi estimado através de medições da $A_{600\text{nm}}$ por 48 horas, em intervalos de 2 horas em um espectrofotômetro (Biomate 3 – Thermo Scientific).

Para os experimentos posteriores foram selecionadas as cepas cuja mutação não prejudicou o seu crescimento celular e que apresentaram uma cor violeta na presença do indicador de pH.

4.7. Medida quantitativa da acidificação extracelular induzida por glicose

As células de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em meio líquido YP glicose 2% foram coletadas por centrifugação a 2880g, por 5 minutos, a 4°C (centrífuga Beckman Allegra X-12) e lavadas 2 vezes em água destilada gelada. Frações de 0,4 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 4 minutos, cujos valores foram anotados de 30 em 30 segundos (potenciômetro Orion Model 900 A) (Apêndice A).

Em duas das suspensões de células foram adicionados 500 μL de glicose 1 M (concentração final de 100 mM), acompanhando-se a variação do pH por 6 minutos, cujos valores foram anotados de 30 em 30 segundos.

4.7.1. Determinação do peso seco

Ao final de cada experimento de acidificação, 100 μL da suspensão de células foram coletados por filtração a vácuo em membranas Millipore (0,75 μm de porosidade) previamente pesadas. Após a filtração, as membranas contendo as células permaneceram na estufa a 80°C por 24h e, após este intervalo de tempo, foram pesadas. O peso seco final foi determinado pela média de todos os experimentos.

4.7.2. Cálculo da taxa de acidificação extracelular

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

$$\mu\text{moles H}^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1} = \frac{\Delta y \text{ cm} \div \Delta \text{HCl cm} \times 60}{\Delta x \text{ min} \times \text{P.S(g)} \times (50)}$$

Onde:

- $\Delta y \text{ cm}$ = variação de pH em centímetros após um pulso de glicose (100 mM);
- $\Delta \text{HCl cm}$ = variação de pH em centímetros após a adição de 1 $\mu\text{mol H}^+$ (controle);
- $\Delta x \text{ min}$ = tempo referente a 1 minuto, convertido em escala;
- Multiplica-se por 60 para converter para hora;
- P. S = Peso seco em gramas correspondente a 0,1mL da suspensão de células;
- 50 = Fator de correção para o peso seco (o volume final dos experimentos foi de 5 mL).

Um exemplo da aplicação da equação está apresentado no **Apêndice A**.

4.8. Preparo de células de leveduras competentes e transformação

4.8.1. Preparo de células de leveduras competentes

As cepas *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a processo de transformação foram pré-crescidas a 28 – 30°C, 200 rpm durante 24 horas, em 5 mL de YP glicose 2%. O pré-inóculo foi inoculado em 100 mL do mesmo meio e incubado nas mesmas condições de temperatura e agitação descritas acima até que a cultura atingisse um valor de densidade ótica de 0,6. Após crescimento as células foram coletadas por centrifugação a 2880g, por 5 minutos (centrífuga Beckman Allegra X-12). 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 ressuspendidas em 5 mL de TE e 250 µL de Acetato de lítio 2,5 M. A suspensão de células foi incubada a 28 – 30°C sob agitação constante (200 rpm) durante no mínimo 1:30 horas.

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

4.8.2. Transformação de leveduras

Em um tubo de microcentrífuga contendo 300 µL 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 (Thermomixer 5436). Após incubação por 30 minutos em estufa a 30°C (sem agitação), foram adicionados 700 µL de PEG 4.000 (50%), procedeu-se à homogeneização do conteúdo delicadamente e o mesmo foi incubado por 1 hora, sem agitação, a 30°C. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C (banho Maria) por 10 minutos e, em seguida, foram centrifugadas por 1 minuto a 3100 g (centrífuga Eppendorf 5415-D). O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 1 mL de sorbitol 1M. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriormente descritas, 900 µL do sobrenadante foram descartados e as células foram ressuspendidas no sobrenadante residual e plaqueadas com pérolas de vidro em meio sólido seletivo (SD – marcador). As placas foram incubadas a 30°C, por 48 a 72 horas (Ito *et al.*, 1983). Como controle negativo do experimento, utilizamos 300 µL de

leveduras competentes mais 10 μ L de DNA de esperma de salmão (10 mg/mL) previamente desnaturado a 95°C.

4.9. Monitoramento “*in vivo*” da concentração de cálcio citosólico livre

4.9.1. Método e plasmídeo utilizado

Para a medida da concentração de cálcio citosólico livre foi utilizado o método da Aequorina (Tisi *et al.*, 2002). O princípio desse método baseia-se na utilização de uma fotoproteína muito sensível a íons cálcio. Esta proteína, denominada aequorina, é produzida pelo cnidário *Aequorea Victoria* e tem peso molecular de 22 KDa (Brini, 2008). Em sua forma ativa, a aequorina apresenta um polipeptídeo covalentemente ligado ao grupo prostético coelenterazina. Em consequência da ligação de Ca^{2+} a três sítios de alta afinidade, ocorre uma reação irreversível na qual o grupo prostético é liberado e um fóton é emitido.

As cepas analisadas foram transformadas (itens 4.8.1 e 4.8.2) com o plasmídeo contendo o gene que codifica para a apoaequorina, sob regulação do promotor ADH1. O plasmídeo foi obtido com base na família de vetores de expressão de leveduras, oito séries pVT, construída e caracterizada por Vernet *et al.* (1987). O plasmídeo utilizado nestas transformações foi o pVTU-AEQ1, que foi gerado pela inserção do fragmento do gene *AEQ1* obtido com PCR do vetor pYX212-AEQ e que apresenta o gene *URA3* como marcador auxotrófico (Tisi *et al.*, 2002).

4.9.2. Medida do sinal de cálcio citosólico livre

Para o experimento de monitoramento, as células foram pré-incubadas em 4 mL de meio YP glicose 2%, a 28 – 30°C sob agitação constante de 200 rpm (Incubador Rotatório New Brunswick Model G25) até a fase exponencial ($5-6 \times 10^6$ céls/ml). Após serem coletadas por centrifugação a 2880g por 5 minutos (centrífuga Beckman Allegra X-12) e lavadas três vezes com água milli-Q, as células foram ressuspendidas em tampão MES/Tris 0,1M pH 6,5, a uma densidade de 1×10^8 céls/mL e procedeu-se a incubação para esgotamento dos nutrientes (por 90 minutos, à temperatura ambiente). Em seguida, as

células foram centrifugadas a 2880g por 2 minutos (centrífuga Beckman Allegra X-12) e ressuspendidas no mesmo tampão, desta vez a uma densidade de $2,5 \times 10^9$ céls/ml.

Na etapa seguinte, 50 μ M de coelenterazina (Sigma; solução estoque de 1 μ g/ μ L dissolvido em metanol) foram adicionados a um volume final de 30 μ L da suspensão de células e as mesmas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Este procedimento é essencial para a reconstrução da aequorina funcional. Para remover o excesso de coelenterazina, as células foram lavadas três vezes com tampão MES/Tris 0,1M pH 6,5 (200 μ L para cada lavagem) com centrifugação de 2 minutos a 3100g (centrífuga Eppendorf 5415-D). No procedimento de preparo das amostras para leitura no luminômetro Berthold Lumat LB 9501/16, as células foram ressuspendidas em 500 μ L do mesmo tampão citado anteriormente (5×10^7 cels/mL) e, em seguida, a suspensão de células foi transferida 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 da glicose, a luminescência emitida foi monitorada por 6 min. Os dados obtidos foram transferidos e analisados em computador acoplado ao equipamento.

4.10. Atividade da H⁺-ATPase

4.10.1. Obtenção da fração de membranas citoplasmáticas para o estudo de cinética enzimática

Após o crescimento em meio YP glicose 4%, as células foram coletadas por centrifugação a 2880g (centrífuga Beckman Allegra X-12) por 5 minutos e lavadas duas vezes em tampão de incubação (MES 10 mM, pH 6.5 ajustado com Tris Base). Após a centrifugação, 10 g dessas células foram transferidas para dois erlenmeyers, sendo 5 g para o primeiro erlenmeyer (referente à suspensão de células às quais não seria adicionado glicose – tempo 0) e, 5g para o segundo erlenmeyer (referente à suspensão de células às quais seria adicionado glicose à uma concentração final de 4% (Solução estoque 40%) – tempo 30 minutos). No primeiro erlenmeyer adicionou-se 30 ml do tampão de incubação (MES 100 mM, pH 6.5 ajustado com Tris Base) e no segundo erlenmeyer, adicionou-se 27 ml do mesmo tampão de incubação. As suspensões de células foram incubadas em banho Maria a 30°C sob agitação moderada (170 rpm) por 4 horas. Este procedimento é essencial

para exaurir toda a fonte de carbono presente na suspensão celular. Em seguida, a suspensão de células do primeiro erlenmayer foram coletadas em três alíquotas de 10 ml e imediatamente filtradas a vácuo em membranas Millipore (0,75 μ m de porosidade) e ao mesmo tempo, adicionou-se 3 ml de glicose (solução estoque 40%) ao segundo erlenmayer. Após 30 minutos, procedeu-se a coleta da suspensão de células do segundo erlenmayer conforme a coleta da suspensão de células do primeiro. A massa celular obtida nesta coleta foi congelada em nitrogênio líquido e depois divididas em 6 frações, sendo estas transferidas para tubos de ensaio contendo 1,5g de pérolas de vidro (1,5 mm de diâmetro) e 0,5 ml de tampão de extração (Tris/HCl 50mM, EDTA 1 mM, β – mercaptoetanol 8 mM, sorbitol 200 mM e PMSF 5 mM) e, em seguida, rompidas sob agitação em vórtex (3 ciclos de 90 segundos) com intervalos de resfriamento em gelo como descrito por (Dos Passos *et al.*, 1992). Após este ciclo de agitação, adicionou-se mais 0,5 ml do tampão de extração e repetiu-se o mesmo ciclo de agitação em vórtex, obtendo-se um homogenato.

A fração de membranas citoplasmáticas foi obtida por centrifugação fracionada do homogenato. Inicialmente, procedeu-se uma centrifugação a 2880g (centrífuga Beckman Allegra X-12) por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado em 6 tubos a 15000g por 30 minutos (centrífuga Beckman L7-65- rotor 55,2 Ti). O sedimento obtido em cada um dos tubos foi ressuspenso com 1 ml de tampão glicerol (Glicerol 20%; Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, β -Mercaptoetanol 1 mM, pH 7.5) e, em seguida, centrifugou-se em gradiente de sacarose (3 ml de sacarose 53,5% + 6 ml de sacarose 43,5%) a 100000g por 2 horas (centrífuga Beckman L7-65- rotor SW-40 Ti). Na interface do gradiente foi coletada a fração contendo a membrana citoplasmática e esta foi diluída e homogeneizada em 10 mL de água mili-Q gelada. Em seguida, centrifugou-se novamente a 100000g por 30 minutos (centrífuga Beckman L7-65- rotor SW-40 Ti). O sedimento final foi ressuspenso em 300 μ L de tampão glicerol sendo utilizado para determinação da atividade específica da H^+ -ATPase (Dos Passos *et al.*, 1992).

4.10.2. Atividade específica da H⁺-ATPase e ensaio de cinética enzimática da H⁺-ATPase

A determinação da atividade específica da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática foi realizada utilizando-se 40µg de proteína em um volume final de reação de 250µL. Para determinação dos parâmetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ e K_m), dos extratos enriquecidos com membranas plasmáticas foram realizadas medidas da atividade enzimática empregando-se o ATP nas concentrações de 0,2 mM a 3,2 mM, com um excesso de Mg²⁺ sobre o ATP de 5mM, de acordo com (Eraso *et al.*, 2006) e (Lecchi *et al.*, 2005) com modificações. Para isso, foram selecionados 7 tubos de ensaio para determinação da atividade das proteínas não incubadas com glicose e 7 tubos de ensaio para determinação da atividade das proteínas incubadas com glicose (a uma concentração final de 4% por 30 minutos). Em cada um dos tubos adicionou-se, respectivamente, MgCl₂ (solução estoque 100 mM) para obter as concentrações de 5,2 mM, 5,4 mM, 5,8 mM, 6,0 mM, 6,6 mM, 7,0 mM e 8,2 mM e completou-se com tampão de incubação (Hepes 50 mM, NaN₃ 10 mM que inibe ATPase mitocondrial e Molibdato de amônio 5mM, pH 6,5), até atingir o volume de 125µL. Esta mistura foi pré-incubada por 10 minutos a 30°C em banho Maria. Em seguida, adicionou-se ATP nas concentrações finais de 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM, 1,0 mM, 1,6 mM, 2,0 mM e 3,2 mM, respectivamente. A reação foi interrompida após 10 minutos com a adição de 250 µL de ácido tricloroacético 10% (p/v). Imediatamente, adicionou-se 450 µL de molibdato de amônio 5 mM em HCl 0,8 N (para complexar 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 min à temperatura ambiente procedeu-se a leitura. As absorbâncias a 710 nm foram obtidas em um espectrofotômetro (Biomate 3 – Thermo Scientific) (Dos Passos *et al.*, 1992). Como padrão utilizou-se uma solução de Na₃HPO₄.

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

$$\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} = \frac{\left(\frac{\text{Abs.}_{710\text{nm}} - a}{b} \right)}{50(\mu\text{g}) \times 10} \times 1000$$

Sendo que:

- Abs.710 nm = valor da absorbância relativa à hidrólise de ATP.
- a = intercepto da curva padrão de fosfato.
- b = inclinação da curva padrão de fosfato.
- 50 μg = quantidade de proteína na amostra.
- 1000 = multiplica-se por 1000 para obter o resultado em $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

4.10.3. Dosagem de proteínas

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

4.11. 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, com exceção dos experimentos de cinética enzimática da H^+ -ATPase.

5. Resultados

5.1. Seleção preliminar de 53 cepas mutantes com deleção em genes que codificam para proteínas quinases em *S. cerevisiae*

Foram identificados 117 genes responsáveis por codificarem proteínas quinases em *Saccharomyces cerevisiae* e, para a realização dos experimentos, foram desconsideradas as cepas cuja deleção em algum gene que codifica para proteína quinase tornou-as inviáveis (Anexo B).

Dessa forma, na triagem inicial, realizada pelo ensaio de acidificação extracelular em microplaca de 96 poços, foram analisadas 95 cepas mutantes viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentavam deleções em genes que codificam para proteínas quinases. Este procedimento foi eficiente na seleção dos mutantes pela capacidade de acidificação do meio extracelular, na presença de glicose, como um indicativo preliminar do funcionamento normal da H^+ -ATPase de membrana plasmática. Após 48 horas de crescimento das células em microplacas de 96 poços, ao ser adicionada a solução de indicador de pH, ocorreu mudança de coloração do meio, alguns poços apresentaram coloração violeta (ou púrpura), indicando pH alto (alcalino), enquanto outros poços apresentaram coloração amarelada, indicando pH baixo (ácido). A seleção das cepas foi realizada com base na mudança de coloração do meio; sendo consideradas as cepas que apresentaram coloração violeta após a adição da solução de indicador de pH e cuja reprodutibilidade se apresentou em triplicata. A cepa selvagem BY4741, utilizada como controle, apresentou coloração amarelada confirmando a sua alta capacidade de acidificação do meio extracelular.

O indicador de pH proporcionou leitura visual fácil e rápida, contudo, foi observado que a adição do indicador de pH nos poços em que havia pouco ou quase nenhum crescimento celular, a coloração se apresentava amarelada. Dessa forma, para evitar que fossem desconsideradas cepas na triagem devido à dificuldade de crescimento e não pela capacidade ou não de acidificação do meio externo, antes da adição da solução de indicador de pH, foram realizadas leituras das absorvâncias com comprimento de onda de 655 nm em leitor de Elisa para quantificar o crescimento. A tabela 1 mostra os valores de absorvâncias obtidos por umas das microplacas analisadas.

Tabela 1. Resultado da medição do crescimento em microplacas.

Os valores de absorvância de todas as cepas mutantes aparecem nas linhas A (1 a 12) a H (1 a 11). Nas linhas E-11 e G-12 estão destacados valores de absorvância de algumas das cepas mutantes que apresentaram um baixo crescimento. Na linha H-12 está em destaque o valor da absorvância da cepa selvagem correspondente BY4741.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,053	1,020	1,092	1,009	1,083	1,009	1,065	0,990	1,079	1,026	0,887	0,893
B	1,019	1,026	1,027	0,915	1,058	1,039	0,981	0,970	1,016	0,844	0,773	0,841
C	1,064	0,972	1,014	0,960	1,017	1,030	0,941	0,932	0,750	0,907	0,875	0,459
D	1,020	1,042	1,014	1,006	0,950	0,821	0,893	0,839	0,865	0,716	0,772	0,694
E	0,997	0,992	0,998	0,936	0,836	0,892	0,901	0,833	0,758	0,696	0,232	0,474
F	0,958	1,025	0,985	1,000	0,921	0,929	0,880	0,797	0,735	0,727	0,650	0,461
G	0,985	1,019	1,023	1,004	1,019	0,978	0,899	0,741	0,763	0,430	0,844	0,354
H	0,802	0,941	0,445	0,705	0,597	0,949	0,970	0,261	0,765	0,965	0,888	0,961

Baseando-se no crescimento celular a 655nm em microplaca de 96 poços e na mudança de coloração após a adição da solução de indicador de pH, foi estabelecido o seguinte critério para a seleção das cepas: as cepas incapazes de acidificar o meio externo e que apresentaram um crescimento celular na microplaca de 96 poços correspondente a pelo menos 50% do crescimento obtido pela cepa selvagem correspondente (BY4741) foram selecionadas para experimentos posteriores.

Diante do fato de que a condição ideal para o crescimento de leveduras é o crescimento em meio líquido sob agitação, todas as cepas selecionadas de acordo com o critério estabelecido para a triagem em microplaca de 96 poços foram analisadas em curvas de crescimento celular por 48 horas, à 28°C-30°C, em meio líquido sob agitação. Todas as 53 cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* analisadas apresentaram um perfil de crescimento próximo ou superior ao crescimento da cepa selvagem correspondente (BY4741). Algumas destas curvas de crescimento estão apresentadas na figura 8 (Painéis A, B, C e D).

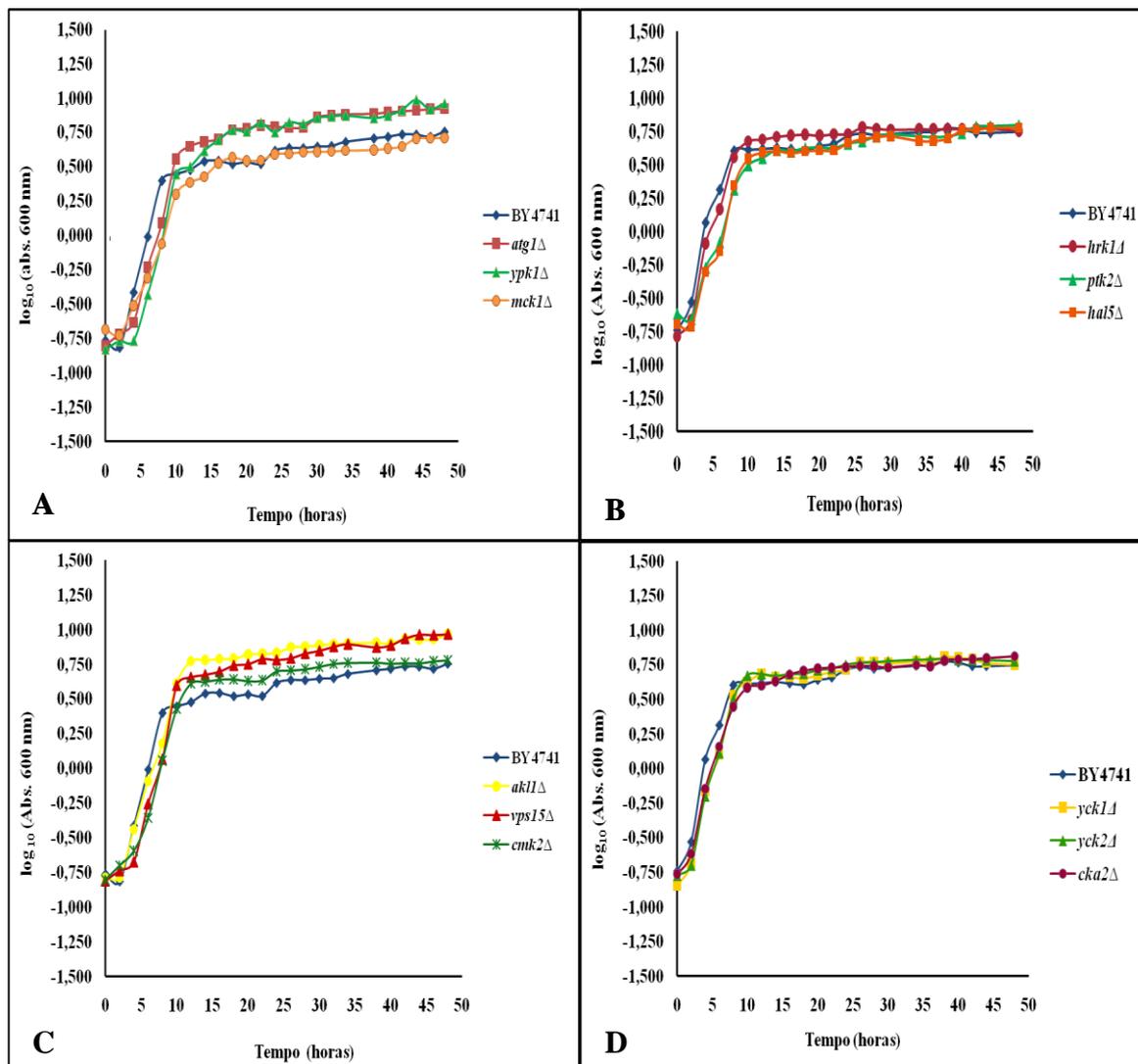


Figura 8. Curvas de crescimento das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com mutações nos genes *ATG1*, *YPK1* e *MCK1* (Painel A), *HRK1*, *PTK2* e *HAL5* (Painel B), *AKL1*, *VPS15* e *CMK2* (Painel C) e *YCK11*, *YCK2* e *CKA2* (Painel D) comparadas à curva de crescimento da cepa selvagem correspondente (BY4741).

Esta triagem inicial permitiu a seleção 53 genes, cujas mutações únicas interferiram na capacidade de acidificação do meio externo pelas células, o que pode ser um indicativo preliminar do envolvimento dos mesmos com o mecanismo de ativação da H⁺-ATPase. A tabela 2 mostra as cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas nesta triagem.

Tabela 2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas a partir da triagem preliminar no ensaio de acidificação extracelular em microplaca de 96 poços.

Nome	Genótipo	Origem
YAL017W	BY4741; <i>psk1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YPL203W	BY4741; <i>tpk2::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YNL307C	BY4741; <i>mck1::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YNL298W	BY4741; <i>cla4::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YJL187C	BY4741; <i>swe1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YHJL165C	BY4741; <i>hal5::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YIL042C	BY4741; <i>pkp1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YOL045W	BY4741; <i>psk2::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YOR061W	BY4741; <i>cka2::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YIL035C	BY4741; <i>cka1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YHR135C	BY4741; <i>yck1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YNL154C	BY4741; <i>yck2::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YNL183C	BY4741; <i>npr1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YPL150W	BY4741; <i>ypl150w::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YLR096W	BY4741; <i>kin2::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YPL026C	BY4741; <i>sks1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YBL088C	BY4741; <i>tel1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YBR028C	BY4741; <i>ypk3::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YBR059C	BY4741; <i>akl1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YBR097W	BY4741; <i>vps15::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YDL214C	BY4741; <i>prp2::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YDL159W	BY4741; <i>ste7::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YDR466W	BY4741; <i>pkh3::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YDR109C	BY4741; <i>ydr109c::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YDR490C	BY4741; <i>pkh1::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YGL059W	BY4741; <i>pkp2::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YGL179C	BY4741; <i>tos3::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YGL180W	BY4741; <i>atg1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YKL048C	BY4741; <i>elm1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YKL126W	BY4741; <i>ypk1::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>

YKL168C	BY4741; <i>kkq8::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YKL171W	BY4741; <i>nnk1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YKL198C	BY4741; <i>ptk1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YLR362W	BY4741; <i>ste11::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YLR248W	BY4741; <i>rck2::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YNL020C	BY4741; <i>ark1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YHR079C	BY4741; <i>ire1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YKL161C	BY4741; <i>mlp1::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YER123W	BY4741; <i>yck3::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YER129W	BY4741; <i>sak1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YOL016C	BY4741; <i>cmk2::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YGR188C	BY4741; <i>bub1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YJR059W	BY4741; <i>ptk2::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YJL128C	BY4741; <i>pbs2::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YCR073C	BY4741; <i>ssk22::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YMR104C	BY4741; <i>ypk2::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YOR267C	BY4741; <i>hrk1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YOL100W	BY4741; <i>pkh2::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YOL128C	BY4741; <i>ygk3::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YFL033C	BY4741; <i>rim15::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YLR063W	BY4741; <i>ylr063w::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YHR082C	BY4741; <i>ksp1::KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>
YDL079C	BY4741; <i>mrk1::kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf.</i>

5.2. Proteínas quinases possivelmente envolvidas com o mecanismo de ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae* .

Para verificar o envolvimento das proteínas quinases na ativação da H⁺-ATPase, testou-se a acidificação extracelular induzida por glicose, de forma quantitativa, através de medidas na taxa de bombeamento de prótons das 53 cepas mutantes selecionadas nas etapas anteriores, comparadas à cepa selvagem. Nesta etapa, foram selecionadas as cepas que apresentaram uma taxa de bombeamento de prótons inferior a 50% da taxa de bombeamento de prótons obtida pela cepa selvagem correspondente (BY4741). Na tabela 3 estão apresentadas as taxas de bombeamento de prótons obtidas por estas cepas e estão destacadas em vermelho as taxas referentes a 20 cepas mutantes, com deleção nos respectivos genes *RIM15*, *KKQ8*, *AKL1*, *HRK1*, *CKA1*, *CKA2*, *CLA4*, *YCK1*, *YCK2*, *YGK3*, *STE11*, *IRE1*, *SAK1*, *PTK2*, *HAL5*, *PKP1*, *ELM1*, *SSK22*, *PKH2* e da ORF não caracterizada YLR063W. Estes resultados mostram que a deleção de qualquer um destes genes interferiu na taxa de bombeamento de prótons da H⁺-ATPase comparada à taxa obtida pela cepa selvagem correspondente. As demais cepas analisadas tiveram uma ativação da H⁺-ATPase semelhante ou até mesmo superior à ativação obtida pela cepa selvagem correspondente.

Tabela 3. Efeito da adição de glicose 100 mM, sobre a extrusão de prótons, na cepa selvagem de *S. cerevisiae* (BY4741) e nas 53 cepas com deleção em genes que codificam para proteínas quinases.

"Background"	Fonte de Crescimento	Indução	Cepa	[mmol H ⁺ · min ⁻¹ · (g de cel) ⁻¹] ^a
BY4741	Glicose	Glicose	Selvagem	0,964 ± 0,106
			<i>psk1</i> Δ	1,048 ± 0,060
			<i>tpk2</i> Δ	0,608 ± 0,054
			<i>npr1</i> Δ	0,835 ± 0,169
			<i>swe1</i> Δ	0,655 ± 0,094
			<i>psk2</i> Δ	0,761 ± 0,063
			<i>ksp1</i> Δ	0,941 ± 0,182
			<i>mrk1</i> Δ	0,611 ± 0,055
			<i>mck1</i> Δ	0,586 ± 0,025
			<i>ypl150w</i> Δ	0,805 ± 0,145
			<i>kin2</i> Δ	0,832 ± 0,043
			<i>sks1</i> Δ	1,076 ± 0,275
			<i>tel1</i> Δ	1,021 ± 0,067
			<i>ypk3</i> Δ	0,805 ± 0,105
			<i>vps15</i> Δ	0,854 ± 0,185
			<i>prp2</i> Δ	0,917 ± 0,039
			<i>ste7</i> Δ	1,248 ± 0,419
			<i>pkh3</i> Δ	0,927 ± 0,188
			<i>ydr109c</i> Δ	0,696 ± 0,138
			<i>pkh1</i> Δ	0,710 ± 0,054
			<i>pkp2</i> Δ	0,872 ± 0,041
			<i>tos3</i> Δ	0,666 ± 0,060
			<i>atg1</i> Δ	0,615 ± 0,015
			<i>ypk1</i> Δ	0,929 ± 0,015
			<i>nnk1</i> Δ	0,721 ± 0,058
			<i>ptk1</i> Δ	0,758 ± 0,191
			<i>rck2</i> Δ	0,651 ± 0,076
			<i>ark1</i> Δ	0,598 ± 0,046
			<i>mlp1</i> Δ	0,783 ± 0,184
			<i>yck3</i> Δ	0,886 ± 0,223
			<i>cmk2</i> Δ	0,857 ± 0,058
			<i>bub1</i> Δ	0,989 ± 0,185
			<i>pbs2</i> Δ	0,954 ± 0,228
			<i>ypk2</i> Δ	0,745 ± 0,125
			<i>rim15</i> Δ	0,498 ± 0,133
			<i>kkq8</i> Δ	0,493 ± 0,091
			<i>akl1</i> Δ	0,576 ± 0,161

BY4741	Glicose	Glicose	<i>hrk1Δ</i>	0,336 ± 0,119
			<i>cka1Δ</i>	0,412 ± 0,037
			<i>cka2Δ</i>	0,403 ± 0,025
			<i>cla4Δ</i>	0,323 ± 0,082
			<i>yck1Δ</i>	0,292 ± 0,014
			<i>yck2Δ</i>	0,217 ± 0,039
			<i>ygk3Δ</i>	0,426 ± 0,130
			<i>ste11Δ</i>	0,480 ± 0,103
			<i>ire1Δ</i>	0,464 ± 0,031
			<i>sak1Δ</i>	0,378 ± 0,038
			<i>ptk2Δ</i>	0,308 ± 0,040
			<i>hal5Δ</i>	0,429 ± 0,034
			<i>pkp1Δ</i>	0,226 ± 0,122
			<i>elm1Δ</i>	0,440 ± 0,129
			<i>ssk22Δ</i>	0,384 ± 0,052
<i>pkh2Δ</i>	0,277 ± 0,039			
<i>ylr063wΔ</i>	0,496 ± 0,185			

^a Os experimentos foram realizados em triplicata e as médias mostradas pelas cepas em destaque (valores em vermelho) apresentaram uma taxa de bombeamento de H⁺. min⁻¹.(g de cel)⁻¹ inferior a 50% da taxa de bombeamento apresentada pela cepa selvagem correspondente (BY4741) e são estatisticamente diferentes da média apresentada pela cepa selvagem conforme teste estatístico *t* de Student (p<0.05).

Pelos dados apresentados na figura 9 é possível observar que alguns mutantes, tais como as cepas *yck2Δ*, *pkh2Δ* e *ptk2Δ* tiveram uma redução expressiva na ativação da H⁺-ATPase, ao passo que outras cepas como *akl1Δ* e *ylr063w* apresentaram uma redução menos expressiva na ativação da enzima, porém significativa ($p < 0,05$).

Diante dos resultados e considerando o critério de seleção estabelecido, foram selecionadas para a próxima etapa da triagem as cepas *rim15Δ*, *kkq8Δ*, *akl1Δ*, *hrk1Δ*, *cka1Δ*, *cka2Δ*, *cla4Δ*, *yck1Δ*, *yck2Δ*, *ygk3Δ*, *ste11Δ*, *ire1Δ*, *sak1Δ*, *ptk2Δ*, *hal5Δ*, *pkp1Δ*, *elm1Δ*, *ssk22Δ*, *pkh2Δ* e *ylr063wΔ*.

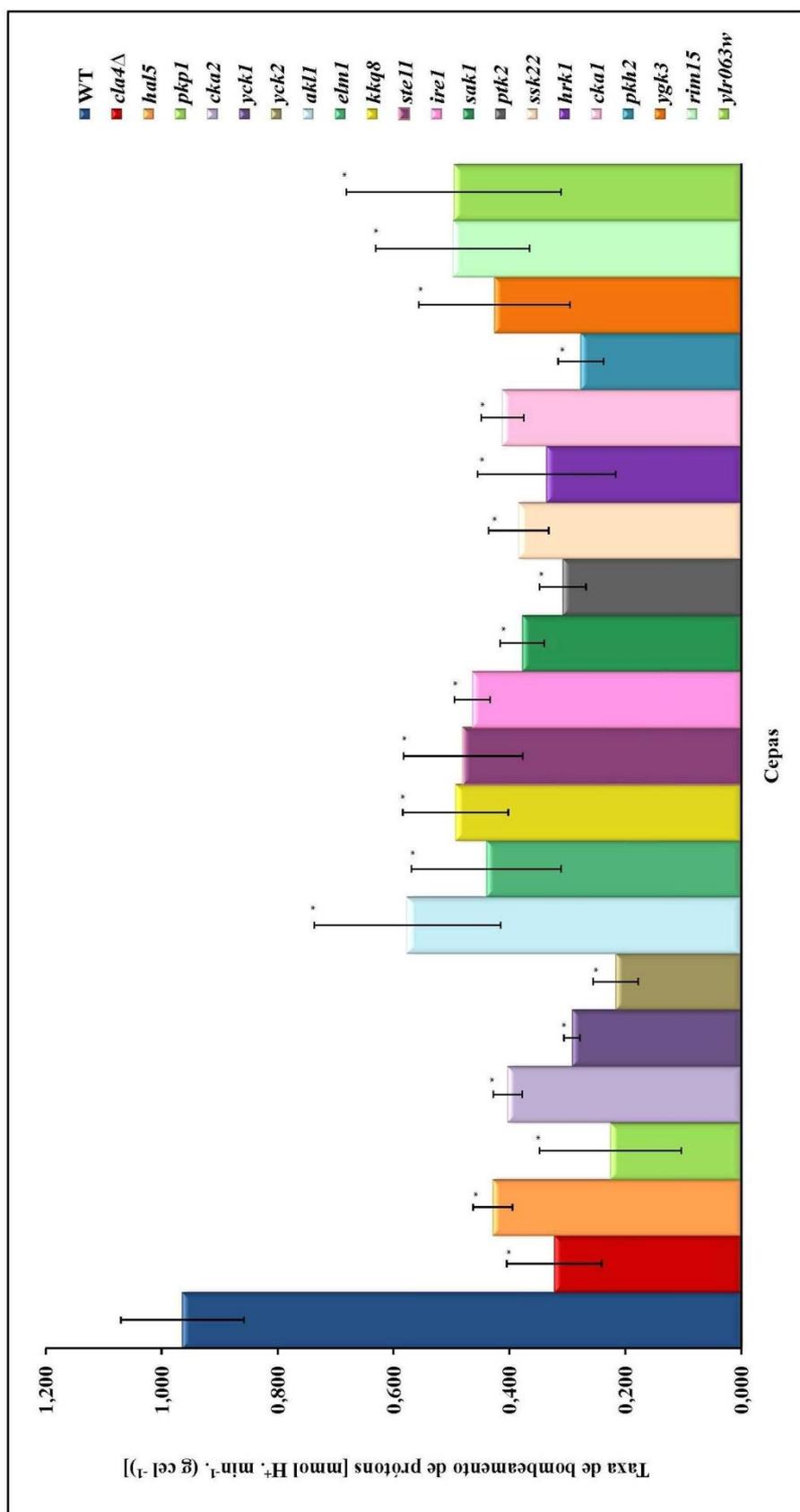


Figura 9. Medida da taxa de bombeamento de prótons, induzida por glicose (100 mM), da cepa selvagem (BY4741) e das cepas mutantes *cla4Δ*, *hal5Δ*, *pkp1Δ*, *cka2Δ*, *yck1Δ*, *yck2Δ*, *akl1Δ*, *elm1Δ*, *kkq8Δ*, *ste11Δ*, *ire1Δ*, *sak1Δ*, *ptk2Δ*, *ssk22Δ*, *hrk1Δ*, *cka1Δ*, *pkh2Δ*, *ygk3Δ*, *rim15Δ* e *ytr063w*.

* As médias mostradas são estatisticamente diferentes daquela apresentada pela cepa selvagem conforme teste estatístico *t* de Student ($p < 0,05$).

5.3. Envolvimento das proteínas quinases com as vias de sinalização de cálcio intracelular

Conforme já demonstrada a clara conexão entre o metabolismo de cálcio e a ativação da H⁺-ATPase (Trópia *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Cardoso, 2009), foram realizadas medidas do sinal de cálcio intracelular, induzido por glicose, para as 20 cepas mutantes selecionadas na última etapa da triagem. O intuito da obtenção destas medidas era observar as proteínas que possivelmente estariam envolvidas na via de sinalização de cálcio e que não estariam diretamente relacionadas com o controle de ativação da H⁺-ATPase por fosforilação. Para padronizar estes experimentos, utilizamos uma cepa com deleção no gene *PLC1* como uma cepa indicativa de um sinal de cálcio citosólico livre pouco expressivo, uma vez que os resultados do monitoramento do sinal de cálcio obtidos por Cardoso *et al* (2009) demonstram que o sinal de cálcio é reduzido na ausência desse gene. Para a seleção das cepas nesta etapa foi estabelecido o seguinte critério: foram selecionadas as cepas cuja deleção nos genes que codificam para as proteínas quinases não interferiu no sinal de cálcio intracelular e desconsiderou-se as cepas que apresentaram um comportamento próximo ou semelhante ao obtido pela cepa *plc1Δ*.

De acordo com os resultados mostrados na figura 10 (painel A), é possível observar que a ausência de qualquer um dos genes que codificam para as proteínas Hrk1 p, Ptk2 p e Hal5 p (painel A) não comprometeu a elevação dos níveis de cálcio citosólico livre após a adição de glicose 100 mM (concentração final). O mesmo efeito também pode ser observado nas células que apresentavam deleção em qualquer um dos genes que codificam para as proteínas Yck1 p, Yck2 p e Cka2 p (Figura 11: painel B), demonstrando que a deleção destes genes não prejudicou o sinal de cálcio intracelular.

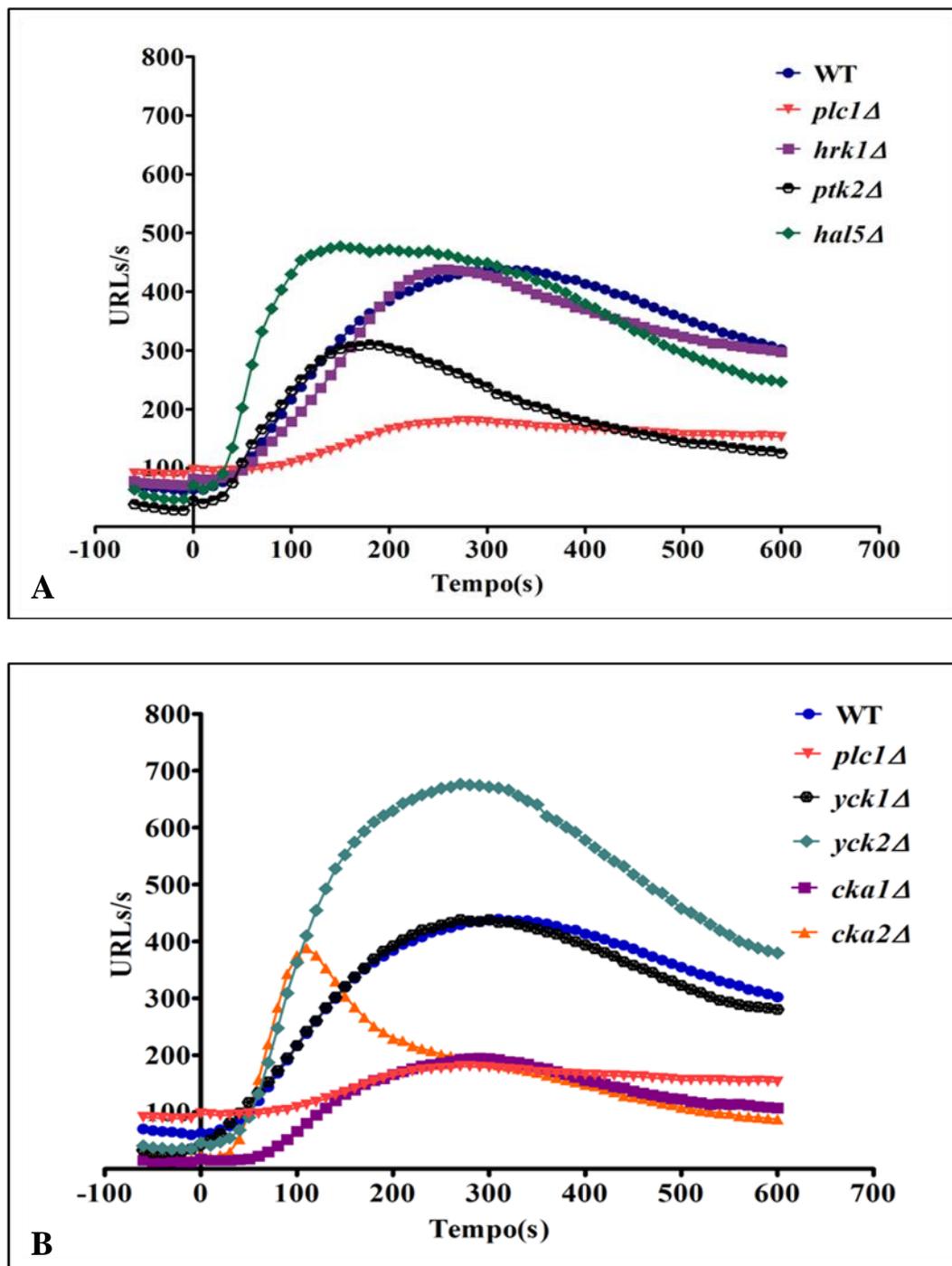


Figura 10. Sinal de cálcio, induzido por glicose, em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. (Painel A): cepa selvagem e as mutantes *plc1Δ*, *hrk1Δ*, *ptk2Δ* e *hal5Δ*; (Painel B): cepa selvagem e as mutantes *plc1Δ*, *yck1Δ*, *yck2Δ*, *cka1Δ* e *cka2Δ*.

Células expressando apoaquorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos. Após este intervalo de tempo, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos.

A figura 11 (painel A) apresenta o sinal de cálcio obtido pelas cepas com deleção nos genes que codificam para as proteínas sak1 p, elm1 p e para a ORF YLR063W. Estes resultados mostram que a deleção única dos genes *SAK1*, *ELM1* e da ORF YLR063W não prejudicou a elevação de cálcio citosólico. Os nossos resultados também mostraram que as cepas com deleção única nos genes *PKP1*, *IRE1* e *RIM15* exibiram curvas de luminescência superiores à curva obtida pela cepa *plc1Δ*, demonstrando que, após o estímulo (glicose 100 mM na concentração final) ocorreu aumento do cálcio citosólico livre (Figura 11: painel B).

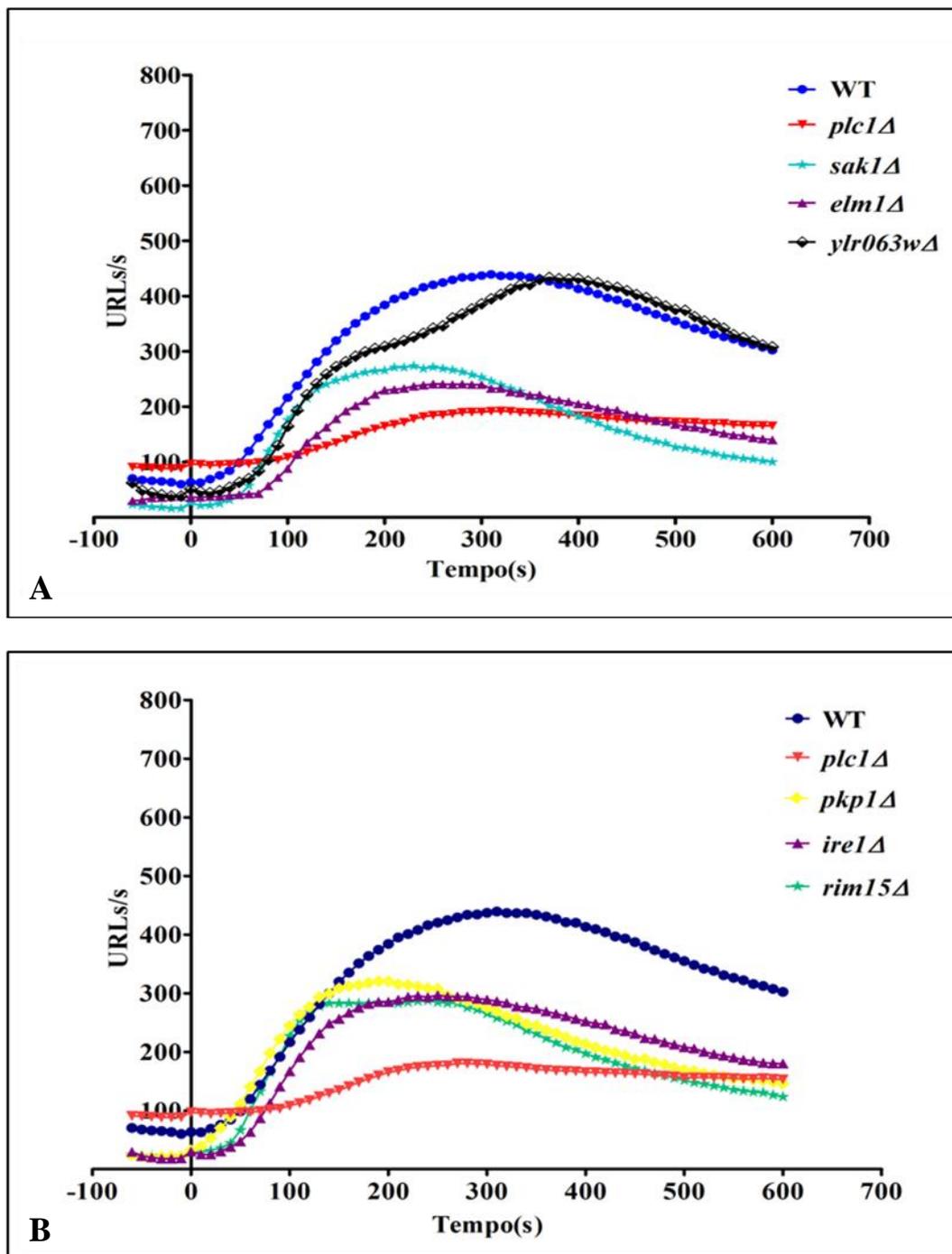


Figura 11. Sinal de cálcio, induzido por glicose, em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. (Painel A): cepa selvagem e as mutantes *plc1Δ*, *sak1Δ*, *elm1Δ* e *ylr063wΔ*; (Painel B): cepa selvagem e as mutantes *plc1Δ*, *pkp1Δ*, *ire1Δ* e *rim15Δ*.

Células expressando apoaequorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos. Após este intervalo de tempo, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos.

Ao analisarmos o sinal de cálcio das cepas com deleção nos genes que codificam para as proteínas quinases Ste11 p, Ak11 p, Kkq8 p, Cla4 p e Ssk22 p (Figura 12: painel A) observou-se que, após o estímulo (glicose 100 mM na concentração final), o sinal intracelular de cálcio nestas cepas foi prejudicado em comparação ao sinal de cálcio gerado pela cepa selvagem correspondente. Os resultados apresentados na figura 12 (painel A), também mostram que apesar de apresentar níveis basais de cálcio elevados, o sinal de cálcio obtido pela cepa *ste11Δ* foi muito baixo em relação à cepa selvagem. Além disso, foi observado que as luminescências geradas pela cepa *ak11Δ* foram decrescentes após o estímulo, demonstrando que esta cepa não respondeu ao estímulo, o que prejudicou a sinalização intracelular de cálcio.

Na figura 12 (painel B) estão mostrados os sinais de cálcio intracelulares obtidos pelas cepas com deleção nos genes *YGK3* e *PKH2*. É possível observar que houve um atraso na elevação do cálcio intracelular, após a adição de glicose, em relação às demais cepas analisadas. Contudo, após 3 minutos aproximadamente ao estímulo ocorreu um aumento considerável do sinal de cálcio intracelular em comparação com a cepa selvagem.

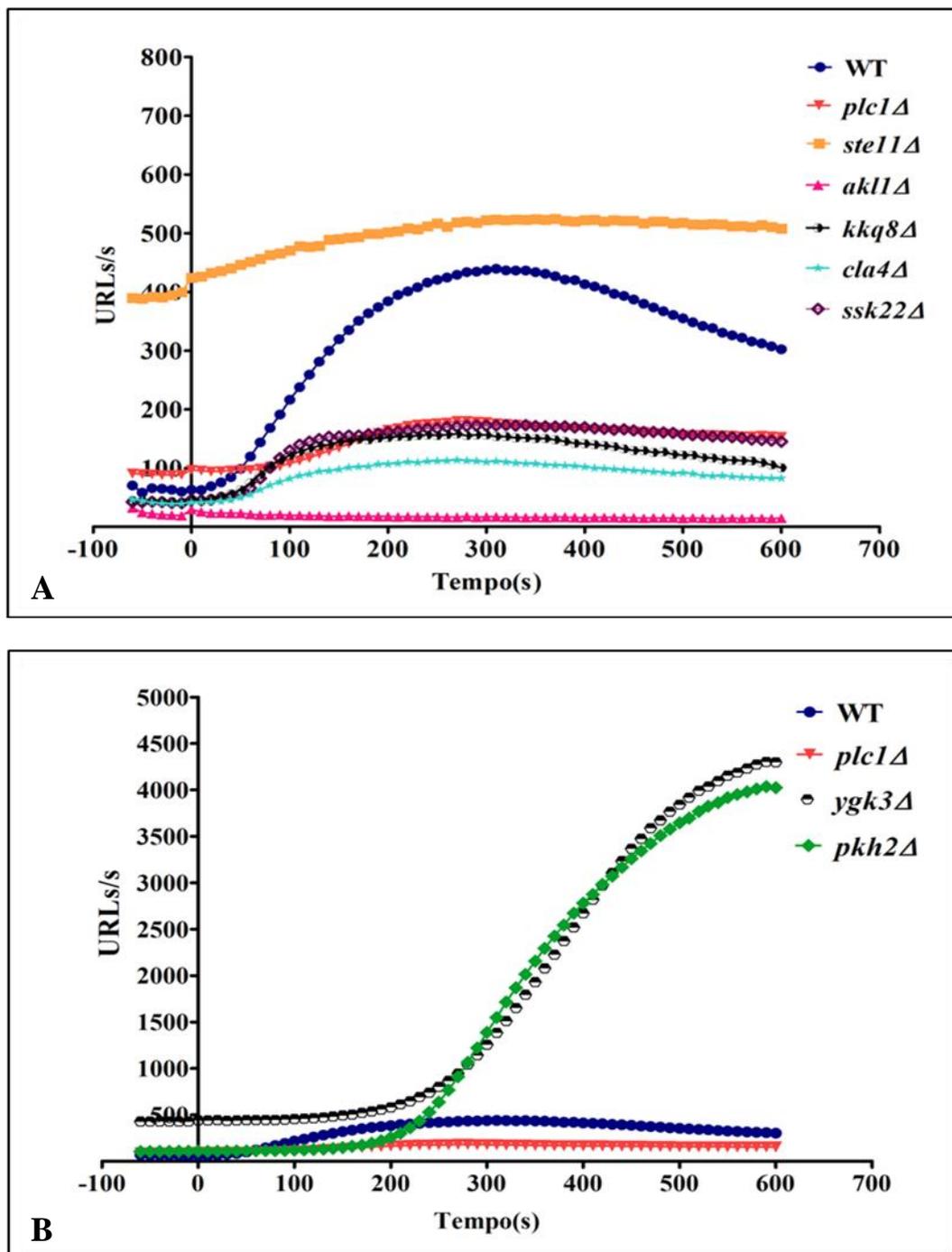


Figura 12. Sinal de cálcio, induzido por glicose, em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. (Painel A): cepa selvagem e as mutantes *plc1Δ*, *ste11Δ*, *ak11Δ*, *kkq8Δ*, *cla4Δ* e *ssk22Δ*; (Painel B): cepa selvagem e as mutantes *plc1Δ*, *ygk3Δ* e *pkh2Δ*.

Células expressando apoaequorina, tratadas com coelenterazina, foram incubadas por 90 minutos. Após este intervalo de tempo, glicose 100 mM (concentração final) foi adicionada no tempo zero e a bioluminescência foi monitorada por 10 minutos.

Os resultados obtidos no monitoramento do sinal de cálcio intracelular permitiram selecionar as proteínas Ptk2 p, Hrk1 p, Hal5 p, Yck1 p, Yck2 p, Cka2 p, Sak1 p, Elm1 p, Ylr063w p, Pkp1 p, Ire1 p, Rim15 p, Ygk3 p e Pkh2 p por não demonstrarem envolvimento com as vias de sinalização de cálcio intracelular.

5.4. Análise do envolvimento de algumas proteínas quinases candidatas ao mecanismo de fosforilação da H⁺-ATPase

Com base no que foi evidenciado por Serrano (1983) que a adição de glicose a células de levedura sem a presença de fonte de carbono provocava uma clara ativação pós-transcricional da H⁺-ATPase de membrana plasmática caracterizada por uma redução do K_m para o ATP, bem como por um aumento da V_{max} para hidrólise de ATP, resolvemos investigar os parâmetros cinéticos da H⁺-ATPase em algumas cepas com deleção nos genes que codificam para as proteínas quinases candidatas ao mecanismo de fosforilação da H⁺-ATPase, comparadas aos parâmetros cinéticos da cepa selvagem correspondente.

De acordo com os resultados apresentados na figura 13 (painéis A e B) e na tabela 5, após 30 minutos de incubação com glicose (concentração final de 4%), foi observado um aumento de 3 vezes na atividade da H⁺-ATPase da cepa selvagem BY4741 seguida de uma diminuição do K_m . Ao ser avaliado o efeito da deleção do gene que codifica para a proteína Ptk2 p na ativação da H⁺-ATPase, foi verificado que também ocorreu um aumento na ativação da enzima nas células incubadas com glicose, contudo, a mutação de *PTK2* bloqueou a mudança da afinidade (K_m) da H⁺-ATPase induzida por glicose (Figura 13: painéis C e D e tabela 4).

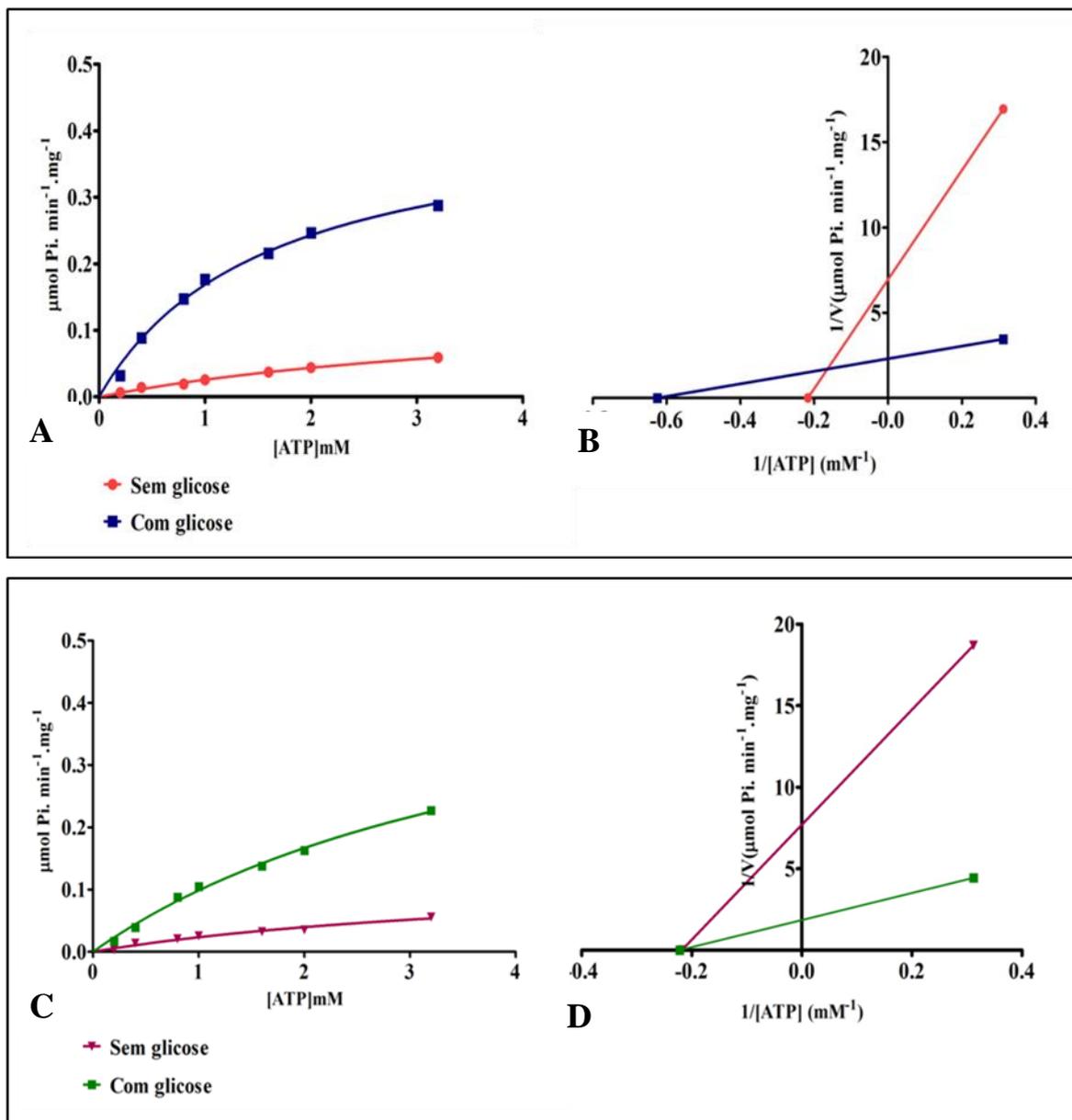


Figura 13. Cinética enzimática da H^+ -ATPase em células de *S. cerevisiae*: cepa selvagem (BY4741) (Painéis A e B) e na cepa mutante *ptk2\Delta* (painéis C e D), na ausência de glicose e expostas à glicose (concentração final de 4%), por 30 minutos após 4 horas de jejum.

Os gráficos foram plotados no programa GraphPad Prism 5.

(A) e (C) Curvas de saturação de Michaelis-Menten para a H^+ -ATPase de membrana plasmática com concentrações de ATP de 0,2 mM a 3,2 mM com um excesso de Mg^{2+} sobre o ATP de 5 mM. A atividade ATPásica foi realizada em pH 6,5, a 30°C, por 10 minutos.

(B) e (D) Gráficos de duplo-recíproco do efeito das concentrações de ATP sobre a H^+ -ATPase de membrana plasmática. A atividade ATPásica foi realizada em pH 6,5, a 30°C, por 10 minutos.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos da H⁺-ATPase em células de *Saccharomyces cerevisiae* na ausência de glicose (AG) e expostas à glicose por 30 minutos (PG) na cepa selvagem (BY4741) e mutantes.

Cepa	Genótipo	AG		PG	
		K_m^a (mM)	V_{max}^a ($\mu\text{mol Pi. Min}^{-1}\text{.mg}^{-1}$)	K_m^a (mM)	V_{max}^a ($\mu\text{mol Pi. Min}^{-1}\text{.mg}^{-1}$)
BY4741	selvagem	4,58	0,14	1,58	0,43
YOR267C	<i>hrk1</i> Δ	1,12	0,05	1,06	0,05
YJR059W	<i>ptk2</i> Δ	4,59	0,13	4,50	0,54
YHR135C	<i>yck1</i> Δ	1,75	0,11	1,62	0,86
YNL154C	<i>yck2</i> Δ	2,39	0,15	1,49	0,66
YOR061W	<i>cka2</i> Δ	0,50	0,11	0,17	0,35
YJL165C	<i>hal5</i> Δ	4,78	0,27	1,58	1,16

^a A atividade ATPásica de membranas plasmáticas foram ensaiadas a pH 6,5, por 10 minutos, com concentrações de Mg²⁺ e ATP variando de 0,2 a 3,2 mM com um excesso de Mg²⁺ sobre o ATP de 5 mM. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.

Foi também analisada a participação da proteína Hrk1 p no mecanismo de ativação da H⁺-ATPase e, nas nossas condições experimentais, os resultados mostram que a deleção do gene que codifica para esta proteína desencadeou uma diminuição na atividade ATPásica tanto nas células não incubadas com glicose quanto nas células incubadas com glicose por 30 minutos, não havendo diferença nos valores de V_{max} entre as células expostas e não expostas à glicose (concentração final de 4%) (Tabela 4).

As demais cepas testadas com deleção nos genes que codificam para as proteínas Yck1 p, Yck2 p (isoformas da caseína quinase 1), Cka2 p (uma subunidade catalítica da caseína quinase 2) e para a proteína Hal5 p também tiveram um aumento na ativação da H⁺-ATPase, após incubação com glicose por 30 minutos, contudo o valor de K_m da cepa Yck1p referente às membranas incubadas e não-incubadas com glicose permaneceu praticamente o mesmo (Tabela 4).

6. Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho representam uma contribuição para o entendimento do mecanismo de ativação pós-traducional da H⁺-ATPase de membrana plasmática, em células de *Saccharomyces cerevisiae* expostas à glicose.

Diante do fato de que a H⁺-ATPase desempenha um papel crucial na fisiologia de fungos e plantas (Serrano, 1989 e 1991; Portillo, 2000), a atividade controlada desta bomba eletrogênica de prótons deve ser finamente regulada a fim de corresponder aos requisitos para captação de nutrientes e a outros mecanismos fisiológicos como o balanço osmótico, a homeostase de íons e a tolerância ao stress.

Nos últimos anos, vários trabalhos foram realizados em nosso laboratório com o objetivo de elucidar a via de sinalização responsável pela regulação pós-traducional da H⁺-ATPase de levedura, mediada pelo metabolismo de glicose, uma vez que foi evidenciado que em *S. cerevisiae*, o metabolismo de glicose ativa a H⁺-ATPase (Serrano, 1983) e aumenta a eficiência da bomba de prótons (Venema & Palmgren, 1995). Alguns trabalhos foram realizados (Dos Passos *et al.*, 1992; Brandão *et al.*, 1994; Coccetti *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2001) tentando identificar não somente a via de sinalização envolvida, como também identificar uma proteína quinase que estivesse direta ou indiretamente envolvida na regulação desta atividade.

Pouco se sabe sobre os mecanismos que medeiam a ativação da H⁺-ATPase por fosforilação. A hipótese que já está bem evidenciada é que a ativação, induzida por glicose, desta enzima resulta do efeito combinado nos parâmetros cinéticos da enzima incluindo a diminuição do K_m e um aumento da V_{max} (Serrano, 1983; Portillo, 2000). Diversos estudos foram realizados em paralelo com o objetivo de identificar o(s) domínio(s) e os respectivos resíduos de aminoácidos que participavam da regulação, dependente do metabolismo de glicose, da H⁺-ATPase. Chang & Slayman (1991) evidenciaram que a fosforilação da enzima “in vivo” está associada com o aumento da atividade ATPásica durante o crescimento em glicose e que esta fosforilação ocorre em um ou mais resíduos de serina e treonina, mas não detectaram tirosina. Foi observado também que a remoção dos últimos 18 aminoácidos da enzima por mutagênese levou à ativação da H⁺-ATPase, mesmo na ausência de glicose (Portillo & Serrano, 1989; Mason *et al.*, 1998). Consistente com esta observação foi proposto o domínio C-terminal como sendo o domínio regulatório da enzima e mutações neste domínio afetando os resíduos Ser-899 e Thr-912 aboliram as mudanças do K_m ou V_{max} dependente do metabolismo de glicose (Portillo *et al.*, 1991;

Eraso & Portillo, 1994). Lecchi *et al.* (2005) demonstraram que na região C-terminal da proteína, a cauda rica em resíduos de Lisina e Arginina encontra-se protegida da ação da tripsina nas membranas das células crescidas na ausência de fonte de carbono, mas a proteína torna-se acessível à ação da tripsina nas amostras das membranas cujas células tiveram um crescimento na presença de glicose. Todos estes estudos apontam a glicose como principal indutora da atividade da H⁺-ATPase e a região C-terminal como o domínio regulatório da enzima.

Ainda neste contexto, foi observado que substituições dos aminoácidos na cauda C-terminal, especialmente a Thr-912, reduziu a ativação por glicose de uma maneira que poderia ser suprimida por mutações em sítios secundários em outro local da proteína (Portillo *et al.*, 1991; Eraso & Portillo, 1994). A substituição de Thr-912 por Ala (para evitar a fosforilação) levou a ATPase a uma conformação que a tornou resistente à tripsina, característica de células selvagens não expostas à glicose, enquanto que, a substituição por Asp (para imitar a fosforilação) conduziu a ATPase a um estado de conformação que permitiu a ação da tripsina, típico de células selvagens ativadas por glicose (Lecchi *et al.*, 2005). Slayman *et al.* (2007) identificou os resíduos de Ser-911 e Thr-912 como os dois principais sítios de fosforilação que estão claramente relacionados à ativação por glicose da H⁺-ATPase.

Em estudos prévios, Brandão *et al.* (1994) demonstraram o envolvimento da Pkc1 p na ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose. Além disso, Souza *et al.* (2001) confirmaram o envolvimento da Pkc1 p na ativação desta enzima induzida por glicose e ainda demonstraram que a via MAP quinase não está envolvida nesta ativação, sugerindo, dessa forma, uma bifurcação depois da Pkc1 p, e que esta seria, possivelmente, a quinase envolvida na regulação da H⁺-ATPase de membrana plasmática. No entanto, embora tenha sido demonstrado que a Pkc1 p de leveduras apresenta sítios de ligação para o diacilglicerol e para fosfolipídeos, dados obtidos por (Schmitz & Heinisch, 2003) sugerem que, ao contrário de outras proteínas quinase C similares, este subtipo não seja ativado por tais sinais. Cardoso (2009), trabalhando com uma cepa mutante no gene que codifica para a Pkc1 p, confirmou os achados anteriores sobre o envolvimento desta proteína na ativação da H⁺-ATPase, entretanto, foi observado que a presença da mesma é essencial para que o sinal de cálcio, induzido pelo açúcar aconteça normalmente, sugerindo que a Pkc1 p esteja

envolvida na regulação do processo de ativação da H⁺-ATPase através do controle da sinalização de cálcio e não pela fosforilação direta da enzima.

Os primeiros resultados obtidos neste trabalho, demonstram que 20 proteínas são importantes para o mecanismo de ativação da H⁺-ATPase induzido por glicose. Quando a atividade da H⁺-ATPase foi medida de forma indireta, em medidas quantitativas da extrusão de prótons, 20 cepas com deleções únicas em genes que codificam para proteínas quinases apresentaram uma redução significativa na ativação da enzima, quando comparada à cepa selvagem. Estes resultados sugerem que as proteínas Rim15 p, Kkq8 p, Akl1 p, Hrk1 p, Hal5 p, Cka1 p, Cla4 p, Cka2 p, Yck1 p, Yck2 p, Pkp1 p, Elm1 p, Ste11 p, Ire1 p, Sak1 p, Ptk2 p, Ssk22 p, Pkh2 p, Ylr063 p e Ygk3 p estão de alguma maneira envolvidas com o mecanismo de ativação da H⁺-ATPase. Este resultado também nos leva a considerar um envolvimento destas proteínas em outras vias de sinalização que possuem alguma relação com a ativação da bomba de prótons.

Um dos eventos de sinalização que tem sido muito estudado em células de leveduras é a sinalização de cálcio. A disponibilidade deste íon no citoplasma é extremamente importante para a sobrevivência destas células (Ton & Rao, 2004) e estudos têm demonstrado que a adição de glicose em células de *S. cerevisiae* promove um aumento da concentração de cálcio livre intracelular (Tisi *et al.*, 2002) e que a ativação das vias de sinalização de cálcio estão diretamente envolvidas com a ativação da H⁺-ATPase, ambas induzidas por glicose (Trópia *et al.*, 2006; Cardoso, 2009).

Diante desta abordagem, utilizamos neste trabalho o método da aequorina, que tem sido largamente utilizado para estudar o cálcio intracelular (Allen & Blinks, 1978; Cobbold, 1980) e que nos permitiu identificar, de forma eficiente, entre as 20 proteínas quinases que demonstraram uma relação com a ativação da H⁺-ATPase, quais poderiam estar envolvidas com as vias de sinalização de cálcio intracelular.

Pelos dados de monitoramento do sinal de cálcio obtidos podemos inferir que as proteínas Ptk2 p, Hrk1 p, Hal5 p, Yck1 p, Yck2 p, Cka2 p, Sak1 p, Elm1 p, Pkp1 p, Ire1 p, Rim15 p, Ylr063w p, Ygk3 p e Pkh2 p não estão envolvidas com as vias de sinalização de cálcio interno, o que sugere que elas podem participar do mecanismo de ativação da H⁺-ATPase por fosforilação. É possível sugerir também que as proteínas Ste11 p, Cla4 p e Ssk22 p estão mais relacionadas, de forma direta ou indireta, com as vias de sinalização de

cálcio na célula e que o envolvimento das mesmas com a H⁺-ATPase está ligado ao metabolismo de cálcio intracelular.

Entre as proteínas analisadas neste trabalho, as proteínas Yck1 p e Yck2 p (isoformas da caseína quinase 1) demonstraram estar envolvidas com o mecanismo de ativação da H⁺-ATPase. Estes dados são reforçados por evidências que sugerem que a ativação da H⁺-ATPase é modulada pela combinação de um efeito regulatório pouco expressivo pela fosforilação, dependente da Caseína quinase 1, do domínio de ligação MgATP e uma regulação mais expressiva pela fosforilação do domínio C-terminal. Além disso, foi mostrado que a atividade da caseína quinase 1 resulta da função combinada de Yck1 p e Yck2 p (Estrada *et al.*, 1996)

Diante desta evidência, podemos considerar que os nossos experimentos para seleção das quinases foi eficiente, uma vez que a deleção de apenas um dos genes que codificam para as isoformas da caseína quinase 1 prejudicou a taxa de bombeamento de prótons da enzima. Entretanto, quando medimos a atividade ATPásica em membranas plasmáticas purificadas dos mutantes *yck1Δ* e *yck2Δ* não ocorreu redução na ativação da enzima, mas o valor de K_m da proteína Yck1 p tanto para as membranas não-incubadas e incubadas com glicose permaneceu praticamente o mesmo, sugerindo que esta proteína pode estar envolvida com mudança neste parâmetro cinético.

Outra proteína identificada como candidata ao mecanismo de fosforilação da H⁺-ATPase foi a Ptk2 p. Os dados da taxa de bombeamento de prótons do mutante *ptk2Δ* mostraram uma redução significativa na ativação da H⁺-ATPase comparada à cepa selvagem. Além disso, foi observado que esta proteína não está envolvida com o sinal cálcio interno e que, na ausência da mesma não ocorre aumento de afinidade da enzima pelo substrato com a adição de glicose. Juntos, estes resultados sugerem que esta proteína pode ser uma potencial candidata ao mecanismo de ativação da H⁺-ATPase por fosforilação, envolvida na mudança do K_m , permitindo assim uma melhor ativação da enzima. Estes dados podem ser confirmados por outros estudos que demonstraram a associação de Ptk2 p com a ativação da H⁺-ATPase. Goossens *et al.* (2000) mostraram que a Ptk2 p é requerida para a ativação da H⁺-ATPase por glicose e Eraso *et al.* (2006) evidenciaram que esta mesma proteína fosforila “in vitro” o resíduo de Ser-899 no domínio C-terminal da H⁺-ATPase.

Goossens *et al.* (2000) também reportaram que a Ptk2 p também é necessária para a sensibilidade das células de levedura a diversos cátions tóxicos, incluindo lítio, sódio, higromicina B, manganês, tetrametilamônio e poliaminas e que, esta proteína atua no transporte de cátions por um mecanismo indireto. Ativando a H⁺-ATPase, Ptk2 p aumenta o potencial de membrana das células de levedura e este parâmetro biofísico determina a captação de cátions tóxicos mediado pelos diferentes sistemas de transporte.

Foram indicadas por Goossens *et al.* (2000) outras duas proteínas, Ptk1 p e Hrk1 p, como sendo importantes na modulação da atividade da H⁺-ATPase. Os nossos resultados também apontaram esta última proteína como sendo necessária para a ativação normal da H⁺-ATPase.

Análises mutacionais têm indicado que o mecanismo de regulação do V_{max} é mais complexo do que uma simples fosforilação (Eraso & Portillo, 1994). Contudo, tem sido sugerido que o aumento do V_{max} da H⁺-ATPase depende de Arg-909 e Thr-912, definidos como potenciais sítios de fosforilação para a proteína quinase 2 dependente de Ca²⁺/calmodulina (Goossens *et al.*, 2000). Lecchi *et al.* (2007) também sugeriram o resíduo de Thr-912 como sendo parte de um motivo de reconhecimento para a caseína quinase 2. Na triagem das cepas realizadas neste trabalho, não identificamos a proteína quinase 2 dependente de Ca²⁺/calmodulina como envolvida no mecanismo de ativação da H⁺-ATPase; no entanto, a caseína quinase 2 (Cka2 p) foi identificada como sendo necessária para a ativação da enzima, mas parece ser por um mecanismo indireto.

Complementando os nossos achados, inserimos em um banco de dados (<http://visant.bu.edu>) as 14 proteínas que demonstraram estar envolvidas com a ativação da H⁺-ATPase e analisamos a rede de interação existente entre estas e a H⁺-ATPase. Com base nesta rede de interação (figura 14) e os nossos dados, podemos fazer especulações considerando uma participação direta da Ptk2 p na ativação da H⁺-ATPase e, que as demais proteínas (Hrk1 p, Ygk3 p, Rim 15 p e Hal5 p) estão ligadas à H⁺-ATPase por um mecanismo indireto de ativação, talvez pelo envolvimento das mesmas com Ptk2 p. No entanto, até o momento os nossos dados não permitem fazer esta correlação de forma conclusiva. A indicação que temos, a partir da análise da rede de interação entre as proteínas é que 12 destas proteínas quinases candidatas selecionadas, interagem de forma direta ou indireta com a H⁺-ATPase, corroborando com os nossos achados. Isso também mostra que as metodologias de identificação utilizadas neste trabalho conseguiram

selecionar, de forma positiva, as possíveis candidatas ao mecanismo de ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *S. cerevisiae*.

Assim, os dados obtidos neste trabalho permitiram identificar 14 proteínas como potenciais candidatas ao mecanismo de fosforilação da H⁺-ATPase. Entre estas, somente a Ptk2 p, Hrk1 p e Yck1 p demonstraram estar envolvidas com a ativação da H⁺-ATPase por fosforilação. No entanto, outros estudos são necessários para compreender o processo de regulação da enzima de forma detalhada.

6. *Conclusão*

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- ✓ As proteínas Ptk2 p, Hrk1 p, Hal5 p, Yck1 p, Yck2 p, Cka2 p, Sak1 p, Pkp1 p, Elm1 p, Ylr063w p, Ire1 p, Rim15 p, Ygk3 p e Pkh2 p estão, de alguma maneira, envolvidas com o mecanismo de ativação, induzido por glicose, da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *S. cerevisiae*;
- ✓ As proteínas Ste11 p, Ak11 p, Kkq8 p, Cla4 p, e Ssk22 p participam indiretamente da ativação da H⁺-ATPase, pelo envolvimento das mesmas com as vias de sinalização de cálcio intracelular que levam à ativação da enzima;
- ✓ As proteínas Yck2 p, Hal5 p, Rim15 p e Cka2 p parecem não estar envolvidas com o mecanismo de ativação da H⁺-ATPase por fosforilação do domínio regulatório;
- ✓ As proteínas Yck1 p e Hrk1 p podem estar envolvidas com o mecanismo de ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *S. cerevisiae* por fosforilação do domínio regulatório;
- ✓ A proteína Ptk2 p parece estar envolvida com a ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *S. cerevisiae* por fosforilação do domínio C-terminal, atuando de maneira a permitir um aumento da afinidade da enzima pelo substrato.

Diante do fato de que a identidade da(s) proteína(s) quinase(s) que fosforila(m) a H⁺-ATPase ainda não ter sido completamente revelada, tornam-se necessários experimentos adicionais para que seja possível elucidar, mais detalhadamente, o mecanismo de regulação, induzido por glicose, da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*.

Neste sentido, julgamos necessários os seguintes experimentos complementares:

- ✓ Verificar se as proteínas Sak1 p, Elm1 p, Ylr063w p, Pkp1 p, Ire1 p, Ygk3 p e Pkh2 p estão envolvidas na fosforilação da região C-terminal da H⁺-ATPase, por meio de medidas nos parâmetros cinéticos da enzima;
- ✓ Isolar a H⁺-ATPase das cepas com deleção nos genes que codificam para as proteínas candidatas à fosforilação, em amostras incubadas e não incubadas com glicose, para posterior identificação dos sítios fosforilados (Serina899/Treonina-912), por meio de espectrometria de massa, relacionando estes sítios com a atividade ATPásica desencadeada por glicose;
- ✓ A partir de ensaios de fosforilação “in vitro”, verificar o envolvimento das proteínas quinases na fosforilação da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *S. cerevisiae* identificando os sítios de fosforilação por meio da espectrometria de massa.

8. *Referências Bibliográficas*

1. ADDISON, R. (1986). Primary structure of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase deduced from the gene sequence. Homology to Na⁺/K⁺, Ca²⁺, and K⁺-ATPase. *J Biol Chem.* **261**: 14896-14901.
2. ADDISON, R. & SCARBOROUGH, G. A. (1981). Solubilization and purification of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem.* **256**: 13165-13171.
3. 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.
4. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J. D. (2002). *Molecular Biology of the Cell*: 15: 721-785.
5. ALLEN, D. G. & BLINKS, J. R. (1978). Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature.* **273**: 509-513.
6. 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.
7. AUER, M., SCARBOROUGH, G. A. & KÜHLBRANDT, W. (1998). Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature.* **392**: 840-843.
8. BENITO, B., MORENO, E. & LAGUNAS, R. (1991). Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* **1063**: 265-268.
9. BISSON, L. F., COONS, D. M., KRUCKEBERG, A. L. & LEWIS, D. A. (1993). Yeast sugar transporters. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **28**: 259-308.
10. BOLES, E. & HOLLENBERG, C. P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* **21**: 85-111.
11. 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.
12. BRANDÃO, R., DE MAGALHÃES-ROCHA, N., ALIJO, R., RAMOS, J. & THEVELEIN, J. (1994). Possible involvement of a phosphatidylinositol-type signaling 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.
13. BRINI, M. (2008). Calcium-sensitive photoproteins. *Methods*. **46**: 160-166.
 14. BRINKWORTH, R. I., MUNN, A. L. & KOBE, B. (2006). Protein kinases associated with the yeast phosphoproteome. *BMC Bioinformatics*. **7**: 47.
 15. 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.
 16. CARDOSO, A. S. (2009). 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. Núcleo de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Ouro Preto, Universidade Federal de Ouro Preto.
 17. CARLSON, M. (1998). Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr Opin Genet Dev*. **8**: 560-564.
 18. 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.
 19. COBBOLD, P. H. (1980). Cytoplasmic free calcium and amoeboid movement. *Nature*. **285**: 441-446.
 20. COCCETTI, P., TISI, R., MARTEGANI, E., SOUZA TEIXEIRA, L., LOPES BRANDÃO, R., DE MIRANDA CASTRO, I. & 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.
 21. DE LA FUENTE, N., MALDONADO, A. M. & PORTILLO, F. (1997). Glucose activation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase requires the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *FEBS Lett*. **411**: 308-312.
 22. 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.

23. DIFFLEY, J. F. (1992). Global regulators of chromosome function in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **62**: 25-33.
24. DOS PASSOS, J. B., 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.
25. 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.
26. 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.
27. DUJON, B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet*. **12**: 263-270.
28. EILAM, Y., OTHMAN, M. & HALACHMI, D. (1990). Transient increase in Ca²⁺ influx in *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose: effects of intracellular acidification and cAMP levels. *J Gen Microbiol*. **136**: 2537-2543.
29. ERASO, P. & GANCEDO, C. (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett*. **224**: 187-192.
30. ERASO, P., MAZÓN, M. J. & PORTILLO, F. (2006). Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates in vitro the C-terminal peptide of the H⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. **1758**: 164-170.
31. ERASO, P. & PORTILLO, F. (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H(+)-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J Biol Chem*. **269**: 10393-10399.
32. ESTRADA, E., AGOSTINIS, P., VANDENHEEDE, J. R., GORIS, J., MERLEVEDE, W., FRANÇOIS, J., GOFFEAU, A. & GHISLAIN, M. (1996). Phosphorylation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by casein kinase I. *J Biol Chem*. **271**: 32064-32072.

33. 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.
34. FRASCOTTI, 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.
35. GARCÍA-ARRANZ, M., MALDONADO, A. M., MAZÓN, M. J. & PORTILLO, F. (1994). Transcriptional control of yeast plasma membrane H(+)-ATPase by glucose. Cloning and characterization of a new gene involved in this regulation. *J Biol Chem.* **269**: 18076-18082.
36. GHISLAIN, M., SCHLESSER, A. & GOFFEAU, A. (1987). Mutation of a conserved glycine residue modifies the vanadate sensitivity of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* **262**: 17549-17555.
37. GOFFEAU, A., BARRELL, B., BUSSEY, H., DAVIS, R., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J., JACQ, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E., MEWES, H., MURAKAMI, Y., PHILIPPSEN, P., TETTELIN, H. & OLIVER, S. (1996). Life with 6000 genes. *Science.* **274**: 546, 563-547.
38. GOFFEAU, A. & SLAYMAN, C. W. (1981). The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim Biophys Acta.* **639**: 197-223.
39. GOMES, K. N., FREITAS, S. M., PAIS, T. M., FIETTO, J. L., TOTOLA, A. H., ARANTES, R. M., 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.
40. 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.
41. HOHMANN, S., WINDERICKX, 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. *Microbiology.* **145** (Pt 3): 703-714.

42. HUG, H. & SARRE, T. F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J.* **291** (Pt 2): 329-343.
43. ITO, H., FUKUDA, Y., MURATA, K. & KIMURA, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* **153**: 163-168.
44. 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 U S A.* **83**: 8172-8176.
45. KELLIS, M., PATTERSON, N., ENDRIZZI, M., BIRREN, B. & LANDER, E. S. (2003). Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature.* **423**: 241-254.
46. LECCHI, S., ALLEN, K. E., PARDO, J. P., MASON, A. B. & SLAYMAN, C. W. (2005). Conformational changes of yeast plasma membrane H(+)-ATPase during activation by glucose: role of threonine-912 in the carboxy-terminal tail. *Biochemistry.* **44**: 16624-16632.
47. LECCHI, S., NELSON, C., ALLEN, K., SWANEY, D., THOMPSON, K., COON, J., SUSSMAN, M. & SLAYMAN, C. (2007). Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase leads to glucose-dependent activation. *J Biol Chem.* **282**: 35471-35481.
48. LIANG, H. & GABER, R. F. (1996). A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. *Mol Biol Cell.* **7**: 1953-1966.
49. LUTSENKO, S. & KAPLAN, J. H. (1995). Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry.* **34**: 15607-15613.
50. MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. & DUNLAP, P. V. (2010). *Microbiologia de Brock.* HALL, P. Porto Alegre, Artmed: 1160.
51. MALPARTIDA, F. & SERRANO, R. (1980). Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent. *FEBS Lett.* **111**: 69-72.
52. MANNING, G., PLOWMAN, G. D., HUNTER, T. & SUDARSANAM, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci.* **27**: 514-520.

53. MASON, A. B., KARDOS, T. B. & MONK, B. C. (1998). Regulation and pH-dependent expression of a bilaterally truncated yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. **1372**: 261-271.
54. MAZÓN, M. J., BEHRENS, M. M., PORTILLO, F. & PIÑÓN, R. (1989). cAMP- and RAS-independent nutritional regulation of plasma-membrane H⁺-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*. **135**: 1453-1460.
55. MCDONOUGH, J. P. & MAHLER, H. P. (1982). Covalent phosphorylation of the Mg²⁺-dependent ATPase of yeast plasma membranes. *J Biol Chem*. **257**: 14579-14581.
56. MØLLER, J. V., JUUL, B. & LE MAIRE, M. (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta*. **1286**: 1-51.
57. 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.
58. 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.
59. 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 Natl Acad Sci U S A*. **88**: 6878-6882.
60. NESTLER, E. J. & GREENGARD, P. (1999). Serine and threonine phosphorylation. Philadelphia, Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.
61. OZCAN, S., DOVER, J. & JOHNSTON, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. **17**: 2566-2573.
62. OZCAN, S., DOVER, J., ROSENWALD, A. G., WÖLFL, S. & JOHNSTON, M. (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 12428-12432.

63. OZCAN, S. & JOHNSTON, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**: 554-569.
64. PEDERSEN, P. L. & CARAFOLI, E. (1987). Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function., *Trends Biochem. Sci* **12**: 146-150.
65. 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.* **8**: 622-630.
66. 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.
67. PORTILLO, F. (2000). Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta.* **1469**: 31-42.
68. PORTILLO, F., ERASO, P. & SERRANO, R. (1991). Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett.* **287**: 71-74.
69. PORTILLO, F. & MAZÓN, M. J. (1986). The *Saccharomyces cerevisiae* start mutant carrying the *cdc25* mutation is defective in activation of plasma membrane ATPase by glucose. *J Bacteriol.* **168**: 1254-1257.
70. 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.
71. 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.
72. REIFENBERGER, E., BOLES, E. & CIRIACY, M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem.* **245**: 324-333.
73. ROLLAND, F., WINDERICKX, J. & THEVELEIN, J. M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* **2**: 183-201.

74. RUBENSTEIN, E. M. & SCHMIDT, M. C. (2007). Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. **6**: 571-583.
75. SALGADO, A. P., SCHULLER, D., CASAL, M., LEÃO, 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.
76. SCHMITZ, H. P. & HEINISCH, J. J. (2003). Evolution, biochemistry and genetics of protein kinase C in fungi. *Curr Genet*. **43**: 245-254.
77. SERRANO, R. (1989). STRUCTURE AND FUNCTION OF PLASMA-MEMBRANE ATPASE. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 61-94.
78. 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.
79. 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.
80. SOUZA, M., TRÓPIA, M. & BRANDÃO, R. (2001). New aspects of the glucose activation of the H⁽⁺⁾-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **147**: 2849-2855.
81. THEVELEIN, J. M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast*. **10**: 1753-1790.
82. TISI, R., BALDASSA, S., BELOTTI, F. & MARTEGANI, E. (2002). Phospholipase C is required for glucose-induced calcium influx in budding yeast. *FEBS Lett*. **520**: 133-138.
83. TÖKÉS-FÜZESI, M., BEDWELL, D. M., REPA, I., SIPOS, K., SÜMEGI, B., RAB, A. & MISETA, A. (2002). Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. **44**: 1299-1308.
84. TON, V. K. & RAO, R. (2004). Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-transporting ATPases. *Am J Physiol Cell Physiol*. **287**: C580-589.

85. TRÓPIA, M., CARDOSO, A., TISI, R., FIETTO, L., FIETTO, J., MARTEGANI, E., CASTRO, I. & BRANDÃO, R. (2006). Calcium signaling and sugar-induced activation of plasma membrane H(+)-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **343**: 1234-1243.
86. ULASZEWSKI, S., HILGER, F. & GOFFEAU, A. (1989). Cyclic AMP controls the plasma membrane H⁺-ATPase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **245**: 131-136.
87. VENEMA, K. & PALMGREN, M. G. (1995). Metabolic modulation of transport coupling ratio in yeast plasma membrane H(+)-ATPase. *J Biol Chem.* **270**: 19659-19667.
88. VIEGAS, C. A. & SÁ-CORREIA, I. (1991). Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J Gen Microbiol.* **137**: 645-651.
89. WINDERICKX, J., HOLSBEEKS, I., LAGATIE, O., GIOTS, F., THEVELEIN, J. & WINDE, H. (2003). From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast., *Topics in Current Genetics*.
90. ZHANG, Z. Y. (2002). Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **42**: 209-234.
91. ZHANG, Z. Y., ZHOU, B. & XIE, L. (2002). Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol Ther.* **93**: 307-317.

ANEXO A

Tabela 5. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas nos experimentos

Nome	Genótipo	Origem
BY4741	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YAR018C	BY4741; kin3:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YNL020C	BY4741; ark1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YJL106W	BY4741; ime2:: kanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YBR059C	BY4741; akl1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YHR135C	BY4741; yck1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YNL154C	BY4741; yck2:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YER123W	BY4741; yck3:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPR161C	BY4741; sgv1:: kanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOR061W	BY4741; cka2:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YJL165C	BY4741; hal5:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YKL168C	BY4741; kkq8:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YCR008W	BY4741; hal4:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YJR059W	BY4741; ptk2:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YKL198C	BY4741; ptk1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YNL183C	BY4741; npr1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDL214C	BY4741; prr2:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDL025C	BY4741; ydl025c:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOR267C	BY4741; hrk1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YER129W	BY4741; sak1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YGL179C	BY4741; tos3:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YKL048C	BY4741; elm1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPL026C	BY4741; sks1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDR247W	BY4741; vhs1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YHR082C	BY4741; ksp1:: KanMX4	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .

YAL017W	BY4741; <i>psk1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOL045W	BY4741; <i>psk2</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YHR079C	BY4741; <i>ire1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YBR097W	BY4741; <i>vps15</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPL236C	BY4741; <i>ypl236c</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YGL180W	BY4741; <i>atg1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YJL187C	BY4741; <i>swe1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YKL139W	BY4741; <i>ctk1</i> :: <i>kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YLR362W	BY4741; <i>ste11</i> :: <i>kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YGR262C	BY4741; <i>bud32</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YGR188C	BY4741; <i>bub1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YKL171W	BY4741; <i>nnk1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YGR052W	BY4741; <i>fmp48</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
TGR080W	BY4741; <i>twf1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YJR066W	BY4741; <i>tor1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YJL095W	BY4741; <i>bck1</i> :: <i>kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YBL088C	BY4741; <i>tell</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YNR031C	BY4741; <i>ssk2</i> :: <i>kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YIL042C	BY4741; <i>pkp1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YCR073C	BY4741; <i>ssk22</i> :: <i>kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDR109C	BY4741; <i>ydr109c</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YJR061W	BY4741; <i>ylr061w</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YLR063W	BY4741; <i>ylr063w</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YML059C	BY4741; <i>nte1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YMR192W	BY4741; <i>gyl1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YGL059W	BY4741; <i>pkp2</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YGL227W	BY4741; <i>vid30</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YJL164C	BY4741; <i>tpk1</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPL203W	BY4741; <i>tpk2</i> :: <i>KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YMR216C	BY4741; <i>sky1</i> :: <i>kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .

YKL126W	BY4741; <i>ypk1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YMR104C	BY4741; <i>ypk2:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YCR091W	BY4741; <i>kin82:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YNR047W	BY4741; <i>fpk1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YGR092W	BY4741; <i>dbf2:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPR111W	BY4741; <i>dbf20:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPL140C	BY4741; <i>mkk2:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDR490C	BY4741; <i>pkh1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDR466W	BY4741; <i>pkh3:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YNL298W	BY4741; <i>cla4:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YBR028C	BY4741; <i>ypk3:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YFR014C	BY4741; <i>cmk1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOL016C	BY4741; <i>cmk2:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YLR248W	BY4741; <i>rck2:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YLR096W	BY4741; <i>kin2:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOR233W	BY4741; <i>kin4:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPL141C	BY4741; <i>ypl141c:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPL150W	BY4741; <i>ypl150w:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YCL024W	BY4741; <i>kcc4:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDL159W	BY4741; <i>ste7:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YHR030C	BY4741; <i>slt2:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YKL161C	BY4741; <i>mlp1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YJL128C	BY4741; <i>pbs2:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YNL307C	BY4741; <i>mck1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOR231W	BY4741; <i>mkk1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDL079C	BY4741; <i>mrk1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YLL019C	BY4741; <i>kns1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .

YJL141C	BY4741; <i>yak1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YIL095W	BY4741; <i>prk1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YIL035C	BY4741; <i>cka1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YLR240W	BY4741; <i>vps34:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YFR019W	BY4741; <i>fab1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDL107W	BY4741; <i>mss2:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOL100W	BY4741; <i>pkh2:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YFL033C	BY4741; <i>rim15:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YKL116C	BY4741; <i>prr1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YBR274W	BY4741; <i>chk1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YKL166C	BY4741; <i>tpk3:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YHL007C	BY4741; <i>ste20:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOL128C	BY4741; <i>ygk3:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPR054W	BY4741; <i>smk1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YKL101W	BY4741; <i>hsl1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPL268W	BY4741; <i>plc1:: kanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .

ANEXO B

Tabela 6. Cepas inviáveis de *Saccharomyces cerevisiae*.

Nome	Genótipo	Origem
YPL204W	BY4743; <i>hrr25:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDL017W	BY4743; <i>sas1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YMR001C	BY4743; <i>cdc51:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPL209C	BY4743; <i>ipl1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPL153C	BY4743; <i>rad531:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDL028C	BY4743; <i>mps1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YKL203C	BY4743; <i>tor2:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YNL267W	BY4743; <i>pik1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YLR305C	BY4743; <i>stt4:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YBR136W	BY4743; <i>mec1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDR208C	BY4743; <i>mss4:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDR454C	BY4743; <i>guk1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YIL147C	BY4743; <i>sln1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YOR287C	BY4743; <i>yor287c:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YBL105C	BY4743; <i>pkc1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDR477W	BY4743; <i>snf1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YBR160W	BY4743; <i>cdc28:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDL108W	BY4743; <i>kin28:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YPR161C	BY4743; <i>sgv1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YDR523C	BY4743; <i>sps1:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YAR019C	BY4743; <i>cdc15:: KanMX4</i>	Coleção de cepas <i>Euroscarf</i> .
YHR099W	BY4741; <i>tra1:: KanMX4</i>	----- *

* Cepa ausente na coleção *Euroscarf*.

ANEXO C

Tabela 7. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* construídas e utilizadas nos experimentos de sinal de cálcio citosólico livre.

Nome	Genótipo	Origem
LBCM602	BY4741; <i>ptk2:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM603	BY4741; <i>hrk1:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM604	BY4741; <i>pkp1:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 605	BY4741; <i>pkh2:: kanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 606	BY4741; <i>hal5:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 607	BY4741; <i>ygk3:: kanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 608	BY4741; <i>yck2:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 609	BY4741; <i>ylr063w:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 610	BY4741; <i>plc1:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 611	BY4741; <i>cka2:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 612	BY4741; <i>ire1:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 613	BY4741; <i>cka1:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 614	BY4741; <i>yck1:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho

		trabalho
LBCM 615	BY4741; <i>plc1:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 616	BY4741; <i>sak1:: KanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 617	BY4741; <i>rim15:: kanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 618	BY4741; <i>cla4:: kanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 619	BY4741; <i>ste11:: kanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 620	BY4741; <i>ssk22:: kanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 621	BY4741; <i>kkq8:: kanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 622	BY4741; <i>elm1:: kanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho
LBCM 623	BY4741; <i>akl1:: kanMX4 + pVTU AEQ1</i>	Obtida durante o desenvolvimento do trabalho

APÊNDICE A

Cálculo da taxa de extrusão de prótons induzida por glicose

Tabela 8. Variação de pH em função do tempo na acidificação extracelular da cepa X.

Tempo	Pulso de glicose	Peso seco	Tempo	Pulso de HCl	Peso seco
00:00:30	5,614	0,0034g	00:00:30	5,529	0,0034g
00:01:00	5,597		00:01:00	5,528	
00:01:30	5,582		00:01:30	5,518	
00:02:00	5,568		00:02:00	5,510	
00:00:00	5,556		00:00:00	5,509	
00:00:30	5,548		00:00:30	5,244	
00:01:00	5,478		00:01:00	5,235	
00:01:30	5,386		00:01:30	5,234	
00:02:00	5,278		00:02:00	5,232	
00:02:30	5,097		00:02:30	5,229	
00:03:00	4,901		00:03:00	5,227	
00:03:30	4,659		00:03:30	5,225	
00:04:00	4,409		00:04:00	5,223	
00:04:30	4,152				
00:05:00	3,969				
00:05:30	3,714				
00:06:00	3,685				

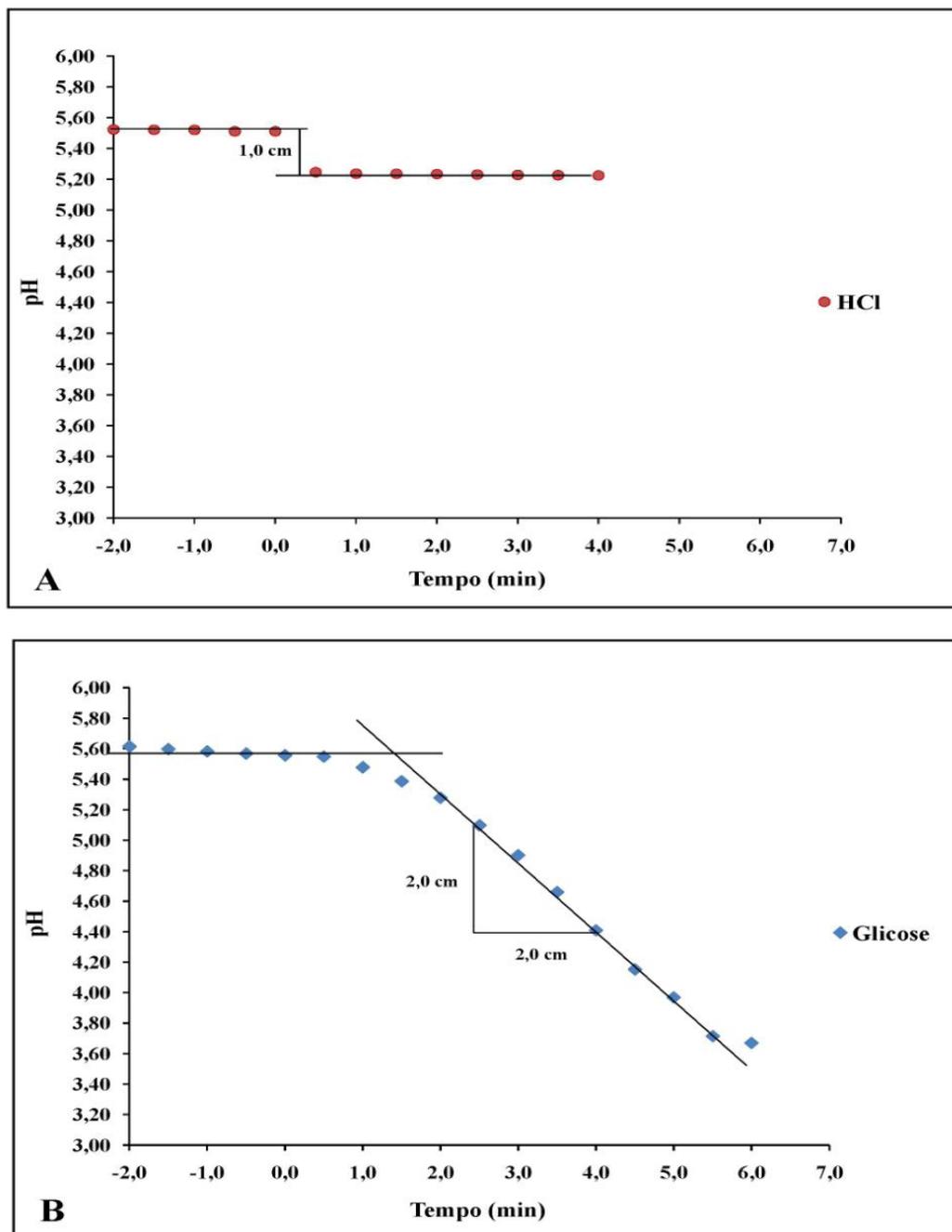


Figura 15. Representação gráfica de acidificação extracelular para o cálculo da taxa de extrusão de prótons da cepa X (valores de pH anotados na Tabela 6).

Painel A: Controle com HCl 10 mM.

Painel B: Acidificação por glicose 100 mM.

Cálculo da taxa de bombeamento de H^+ . h^{-1} . (g de células) $^{-1}$:

$$\mu\text{moles } H^+ h^{-1} g^{-1} = \frac{\Delta y \text{ cm} \div \Delta HCl \text{ cm} \times 60}{\Delta x \text{ min} \times P.S(g) \times (50)}$$

Onde:

- g) $\Delta y \text{ cm}$ = variação de pH em centímetros após um pulso de glicose (100 mM);
- h) $\Delta HCl \text{ cm}$ = variação de pH em centímetros após a adição de 1 $\mu\text{mol } H^+$ (controle);
- i) $\Delta x \text{ min}$ = tempo referente a 1 minuto, convertido em escala;

$$\begin{array}{r} 1 \text{ min} \dots\dots\dots 1,0 \text{ cm} \\ x \dots\dots\dots 1,7 \text{ cm} \\ x = 1,7 \text{ min} \end{array}$$

- j) Multiplica-se por 60 para converter para hora;
- k) P. S = Peso seco em gramas correspondente a 0,1 mL da suspensão de células;
- l) 50 = Fator de correção para o peso seco (o volume final dos experimentos foi de 5 mL).

Exemplo da aplicação do cálculo (de acordo com a figura 16):

$$\mu\text{moles } H^+ h^{-1} g^{-1} = \frac{2,0 \div 1,0 \times 60}{1,7}$$

$$\mu\text{moles } H^+ h^{-1} g^{-1} = 415,2 \mu\text{mol de } H^+ h^{-1} (\text{g de células})^{-1} \text{ ou } 0,415 \text{ mmol de } H^+ h^{-1} (\text{g de células})^{-1}.$$