

**NOVA VISÃO SOBRE A REGULAÇÃO DE V H⁺-ATPASE DE
LEVEDURA**

RENAN MODESTO MONTEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

JULHO - 2014

NOVA VISÃO SOBRE A REGULAÇÃO DE V H⁺-ATPASE DE LEVEDURA

RENAN MODESTO MONTEIRO

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

Orientador: Prof. Dr. Lev Alexandrovitch Okorokov

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

JULHO - 2014

NOVA VISÃO SOBRE A REGULAÇÃO DE V H⁺-ATPASE DE LEVEDURA

RENAN MODESTO MONTEIRO

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

Aprovada em 21 de Julho de 2014

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos – UENF

Prof. Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira – UENF

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro - UFF

Prof. Dr. Lev Alexandrovitch Okorokov - UENF

Aos meus pais, Itamar e Luzia,
A minha irmã Karina,
A minha noiva Thatiane
por todo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças para superar todas as dificuldades.

Ao professor Lev, por ter aceitado me orientar; por sua amizade, ensinamentos, paciência e grande dedicação.

Aos meus pais, Itamar e Luzia, por todo amor e por terem me apoiado A minha irmã Karina, por todos os momentos bons e por toda ajuda, suporte e carinho.

A minha noiva Thatiane, por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos, pelos conselhos e principalmente pelo carinho e a toda sua família que já sinto como minha por me apoiar sempre.

Aos professores Alessandro, Logullo e Carlos Eduardo por aceitarem o convite de participar da banca.

A Dra. Livia Palma por revisar a tese.

A todos os membros e amigos do grupo de trabalho: Layz e Camila por colaborarem com esse trabalho e pelo ótimo convívio.

Aos amigos do LFBM pela agradável convivência, especialmente os amigos Antônio, Gabriel e Keilla pelos momentos de descontração;

Aos funcionários do LFBM, Luís, Juliana e Noil pelo suporte técnico

Aos professores do LFBM Anna, Valdirene, João e André pelo convívio e pelos ensinamentos.

À UENF, CNPq e FAPERJ por terem financiado esse projeto e tornado possível a realização do mesmo.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O pH, sua homeostase e importância na célula	1
1.2 Compartimentalização de H ⁺	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 H ⁺ -ATPases.....	7
2.2 P H ⁺ -ATPases	7
2.2.1 Regulação da P H ⁺ -ATPase	8
2.3 V H ⁺ -ATPases	10
2.3.1 Estrutura das V H ⁺ -ATPases	13
2.3.2 Diferentes formas de V H ⁺ -ATPases em distintas organelas.....	16
2.3.3 Regulação das V H ⁺ -ATPases.....	17
2.3.3.1 Regulação da V H ⁺ -ATPase pela glicose extracelular	17
2.3.3.2 Regulação da V H ⁺ -ATPase pela aldolase	18

2.3.3.3	Regulação da V H ⁺ -ATPase (complexo RAVE)	20
2.3.3.4	Formação de ligações dissulfeto	21
2.3.3.5	Atividade de canais aniônicos.....	21
2.3.3.6	Regulação da V-ATPase pelo pH extracelular.....	23
2.3.3.7	Outras formas de regulação	23
2.3.4	Inibidores de V H ⁺ -ATPases	26
2.3.4.1	NH ₄ e a Regulação do pH intracelular	26
3.	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivos Gerais.....	29
3.2	Objetivos específicos	29
4.	MATERIAIS & MÉTODOS	31
4.1.	Cepa de levedura	31
4.2.	Meio de cultura e manutenção da cepa	31
4.3.	Cultura de células.....	31
4.4.	Preparo da levedura para o isolamento	31
4.5.	Isolamento de membranas e fracionamento subcelular	32
4.5.1.	Obtenção dos esferoplastos	32
4.5.2.	Pré-incubação dos esferoplastos com glicose.....	33
4.5.3.	Obtenção de membranas totais.....	33

4.5.4. Obtenção de membranas intracelulares fracionadas em gradiente de densidade de sacarose	33
4.6. Determinação da formação do ΔpH (transporte de H^+)	34
4.7. Determinação do conteúdo de proteína	36
4.8. Determinação da hidrólise de ATP	37
4.9. Solubilização da V H^+ -ATPase para realização de imuno reatividade	38
4.10. Eletroforese (SDS-page) e imunoensaio (western blotting).....	38
4.11. Cinética Enzimática	39
4.12. Determinação de GDPase (enzima marcadora de membranas do Golgi)	40
4.13. Determinação de NADPH óxido-redutase (enzima marcadora do RE)	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1. Efeito do KNO_3 sobre a atividade hidrolítica das V H^+ -ATPases.....	42
5.2. Efeito do KNO_3 sobre o transporte de H^+ mediado pela V H^+ -ATPase.....	47
5.3. Comparação do efeito de diferentes inibidores da V H^+ -ATPase sobre a hidrólise de ATP	60
5.4. Análise cinética da V H^+ -ATPase em membranas totais.....	64
5.5. Imuno reatividade de Subunidade da Enzima Ativada e Não ativada ..	68
5.6. A Energização da Membrana e a Regulação de V e P ATPase.....	69
6. DISCUSSÃO	83

7. CONCLUSÕES.....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

ABREVIATURAS

ACMA	6-amino-6cloro-2-metoxiacridina
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina Trisfosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
E_M	Potencial de membrana
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
F_{máx}	Amplitude máxima do transporte de H ⁺
g	Gravidade
GDP	Guanosina Difosfato
GDPase	Guanosina Difosfatase
H⁺-ATPase	ATPase translocadora de próton
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico
MT	Membranas Totais
pH	Potencial hidrogeniônico
P H⁺-ATPase	ATPase translocadora de próton tipo P
Pi	Fosfato inorgânico
PMSF	Fluoretro de fenilmetilsulfonil (“phenylmethylsulfonyl fluoride”)
RE	Retículo endoplasmático
rpm	Rotação por minuto
V₀	Velocidade inicial do transporte de H ⁺
V H⁺-ATPase	ATPase translocadora de próton tipo V
V_{máx}	Velocidade máxima
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose (meio de cultura)
Δ pH	Gradiente de prótons através da membrana

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Intermediários carregados da via glicolítica e acidificação pela glicose.....	2
Figura 2	Estrutura e mecanismo da $V H^+$ -ATPase.....	14
Figura 3	Esquema mostrando o acoplamento entre a glicólise e a V -ATPase.....	19
Figura 4	Componentes do complexo RAVE e sua interação com o complexo V_1 da $V H^+$ -ATPase.....	20
Figura 5	Mecanismos de regulação das $V H^+$ -ATPases.....	25
Figura 6	Modulação do pH citosólico.....	27
Figura 7	Determinação de velocidade inicial e amplitude máxima do transporte de H^+	36
Figura 8	Modelo de cinética enzimática.....	39
Figura 9	Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.....	40
Figura 10	Hidrólise de ATP pela $V H^+$ -ATPase de membranas totais (MT) A pré-incubadas a $0\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. 1,7mM de ATP, B pré-incubadas a $0\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. 5mM de ATP, C sem pré-incubação no gelo 5mM de ATP	43
Figura 11	Determinação da linearidade da hidrólise de ATP em membranas totais (MT) com glicose.....	45
Figura 12	Hidrólise de ATP pela $V H^+$ -ATPase em membranas totais (MT), sem pré-incubação no gelo 1mM de ATP.....	46
Figura 13	O aumento da concentração de nitrato revela resistência mais alta da enzima ativada.....	48
Figura 14	Efeito do KNO_3 sobre a $F_{\text{máx}}$ de formação do ΔpH	49
Figura 15	Inibição pelo nitrato da hidrólise de ATP e da velocidade inicial de transporte de H^+ mediado pela $V H^+$ -ATPase ativada e não-activada, em membranas totais.....	50
Figura 16	Inibição do acoplamento da $V H^+$ -ATPase pelo nitrato em	

	membranas totais ativadas e não ativadas, revelou o maior acoplamento e maior estabilidade da bomba ativada.....	51
Figura 17	A capacidade de acoplamento de sub-populações de moléculas de V H ⁺ -ATPase inibidas pelo aumento das concentrações de nitrato.....	52
Figura 18	Efeito do KNO ₃ sobre a V ₀ de transporte de H ⁺ mediado pela V H ⁺ -ATPase. Membranas das organelas da via secretória energizadas ou não por glicose extracelular	54
Figura 19	Efeito do KNO ₃ sobre a F _{máx} de formação do ΔpH mediado por V H ⁺ -ATPase em membranas das organelas da via secretória energizadas ou não por glicose extracelular.....	55
Figura 20	Efeito do KNO ₃ sobre a V ₀ de transporte de H ⁺ mediado pela V H ⁺ -ATPase em membranas das organelas da via secretória energizadas ou não por glicose extracelular	57
Figura 21	Efeito do KNO ₃ sobre a F _{máx} de formação do ΔpH mediado pela V H ⁺ -ATPase em membranas das organelas da via secretória energizadas ou não por glicose extracelular.....	58
Figura 22	Efeito do nitrato e da concanamicina A sobre a hidrólise de ATP em membranas totais ativadas e não ativadas pela glicose extracelular.....	61
Figura 23	Análise cinética do transporte de H ⁺ pela V H ⁺ -ATPase em MT energizadas e não energizadas pela glicose.....	64
Figura 24	Análise da F _{máx} do transporte de H ⁺ de V H ⁺ -ATPase em MT energizadas e não energizadas pela glicose.....	65
Figura 25	Análise cinética da hidrólise de ATP pelas V H ⁺ -ATPases em MT energizadas e não energizadas pela glicose.....	66
Figura 26	Comparação das propriedades de V H ⁺ -ATPase ativada e não ativada por glicose extracelular.....	68
Figura 27	Efeito do FCCP e do NH ₄ Cl sobre a F _{máx} de formação do ΔpH (membranas incubadas a pH 8,2).....	70
Figura 28	Efeito do FCCP e do NH ₄ Cl sobre a V ₀ de transporte de H ⁺ (membranas incubadas a pH 8,2).....	71

Figura 29	Efeito do FCCP e do NH_4Cl sobre hidrólise de ATP (membranas incubadas a pH 8,2).....	72
Figura 30	Efeito do FCCP e do NH_4Cl sobre a $F_{\text{máx}}$ de formação do ΔpH (membranas incubadas a pH 7,7).....	74
Figura 31	Efeito do FCCP e do NH_4Cl sobre a V_0 de transporte de H^+ (membranas incubadas a pH 7,7).....	75
Figura 32	Efeito do FCCP e do NH_4Cl sobre hidrólise de ATP (membranas incubadas a pH 7,7).....	76
Figura 33	Efeito do FCCP e do NH_4Cl sobre a $F_{\text{máx}}$ de formação do ΔpH (membranas incubadas a pH 7,2).....	78
Figura 34	Efeito do FCCP e do NH_4Cl sobre a V_0 de transporte de H^+ (membranas incubadas a pH 7,2).....	79
Figura 35	Efeito do FCCP e do NH_4Cl sobre hidrólise de ATP (membranas incubadas a pH 7,2).....	80
Figura 36	Efeito do NH_4Cl e do FCCP sobre a imuno reatividade das subunidades A e B da $V \text{H}^+$ -ATPase de membranas totais ativadas pela glicose extracelular.....	82
Figura 37	Efeito sugerido da glicose extracelular sobre a atividade das $V \text{H}^+$ -ATPases em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
Figura 38	Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk da V_0 de transporte de H^+ de $V \text{H}^+$ -ATPases em MT não energizadas pela glicose..	111
Figura 39	Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk da V_0 de transporte de H^+ de $V \text{H}^+$ -ATPases em MT energizadas pela glicose.....	111
Figura 40	Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk da V_0 de hidrólise de ATP pelas $V \text{H}^+$ -ATPases em MT não energizadas pela glicose.....	112
Figura 41	Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk da V_0 de hidrólise de ATP pelas $V \text{H}^+$ -ATPases em MT energizadas pela glicose.....	112

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Grupos/resíduos funcionais. Ácidos fracos e bases fracas mais comuns de uma célula (Srivastava <i>et al.</i> , 2007 com alterações).....	4
Tabela 2	Atividade específica do transporte de H ⁺ para MT e membranas das organelas da via secretória (1º Isolamento).....	56
Tabela 3	Atividade específica do transporte de H ⁺ para MT e membranas das organelas da via secretória (2º Isolamento).....	59
Tabela 4	Estimulação da V H ⁺ -ATPase com base em diferentes inibidores.....	62
Tabela 5	Hidrólise de ATP utilizando 4,9µg de proteína de membranas do vacúolo sem glicose e 2,1µg de proteína de membranas do vacúolo com glicose	62
Tabela 6	Mudanças em diferentes características de V H ⁺ -ATPase de levedura por glicose extracelular de acordo com o modelo mecanicista e os dados experimentais desse estudo.....	69

RESUMO

A $V H^+$ -ATPase possui um importante papel em vários processos fisiológicos-chaves. Essa enzima é reversivelmente ativada/parcialmente desativada pela adição/retirada de glicose. O modelo atual para esta regulação assume a associação/dissociação reversível de 60-70% dos complexos V_1 e V_0 , os quais são responsáveis pela hidrólise de ATP e pelo transporte de H^+ , respectivamente. O número de complexos associados determina a atividade da bomba, uma vez que complexos dissociados são inativos. O modelo prediz propriedades catalíticas idênticas para moléculas de enzimas ativadas e semi-ativadas. Para verificar as previsões do modelo nós isolamos membranas totais de esferoplastos de levedura que foram incubadas com ou sem glicose. O tratamento das membranas com nitrato revelou uma inibição similar da atividade de hidrólise de ATP para os dois estados da enzima, sugerindo que teriam uma estrutura idêntica que é essencial para a hidrólise de ATP. Contudo, o transporte de H^+ foi inibido mais do que a atividade de ATPase, indicando a ação de desacoplamento do nitrato, que foi significativamente maior para enzima não ativada. Esses achados sugerem que a estrutura da enzima não ativada é menos estável do que a enzima ativada. Além disso, a ativação da bomba pela glicose aumenta a capacidade de acoplamento; o K_m para hidrólise de ATP e afinidade por ATP no transporte de H^+ ; a $V_{máx}$ para o transporte de H^+ em comparação com a $V_{máx}$ para a hidrólise de ATP e a imunoreatividade da subunidade A catalítica e da subunidade B regulatória 9,3 e 2,4 vezes respectivamente. O conteúdo protéico das subunidades A e B não foi alterado pela glicose extracelular. Nós propomos que em vez da dissociação/reassociação dos complexos V_1 e V_0 , mudanças na concentração de glicose extracelular causam mudanças reversíveis e assimétricas na imunoreatividade das subunidades A e B por modificações bioquímicas putativas. Esta resposta assimétrica modula o transporte de H^+ e hidrólise de ATP, exibindo propriedades distintas para enzimas ativadas e não ativadas. Ainda nesse trabalho, buscamos compreender os mecanismos necessários para a ativação das P e V H^+ -ATPases pela glicose extracelular. Para isso, foi verificada a importância da acidificação do citosol e do $\Delta\mu H^+$ através da membrana para a ativação de P e V H^+ -ATPases pela

glicose extracelular. Nos experimentos encontramos uma prevenção da ativação das P e V H⁺-ATPase, tanto do transporte de H⁺ quanto da hidrólise de ATP, quando as membranas foram tratadas com o protonóforo FCCP e com NH₄Cl. Os dados sugerem que a ativação das P e V H⁺-ATPase pela glicose extracelular necessita de uma acidificação moderada do citosol (sinal primário para a ativação) e do $\Delta\mu\text{H}^+$ através da membrana.

ABSTRACT

V H⁺-ATPase has an important role in a variety of key physiological processes. This enzyme is reversibly activated/partly inactivated by the addition/exhaustion of extracellular glucose. The current model of its regulation assumes the reversible disassembly/reassembly of ,60–70% of the V₁ and V₀ membrane complexes, which are responsible for ATP hydrolysis and H⁺ conductance, respectively. The number of assembled complexes determines the pump activity because disassembled complexes are inactive. The model predicts the identical catalytic properties for the activated and semi-active enzymes molecules. To verify the model predictions we have isolated total membranes from yeast spheroplasts that were preincubated either with or without glucose. Nitrate treatment of membranes revealed the similar ATPase inhibition for two enzyme states, suggesting that they have identical structures that are essential for ATP hydrolysis. However, H⁺ transport was inhibited more than the ATPase activities, indicating a nitrate uncoupling action, which was significantly higher for the nonactivated enzyme. This finding suggests that the structure of the non-activated enzyme, which is essential for H⁺ transport, is less stable than that of the activated enzyme. Moreover, the glucose activation of the pump increases i) its coupling capacity; ii) its K_M for ATP hydrolysis and ATP affinity for H⁺ transport; iii) the V_{max} for H⁺ transport in comparison with the Vmax for ATP hydrolysis and iv) the immune reactivity of catalytic subunit A and regulatory subunit B by 9.3 and 2.4 times, respectively. The protein content of subunits A and B was not changed by extracellular glucose. We propose that instead of the dissociation/reassociation of complexes V₁ and V₀, changes in the extracellular glucose concentration cause reversible and asymmetrical modulations in the immune reactivity of subunits A and B by their putative biochemical modifications. This response asymmetrically modulates H⁺-transport and ATP hydrolysis, exhibiting distinct properties for the activated versus non-activated enzymes. Also in this paper we understand the need for activation of the P and V H⁺-ATPase by extracellular glucose mechanisms. For this, we note the importance of acidification of the cytosol and $\Delta\mu\text{H}$ across the membrane for activation of P and V H⁺-ATPase by extracellular glucose. In these experiments it found a prevention of activation of the P and V H⁺-ATPase, both the

transport of H^+ and ATP hydrolysis when the membranes were treated with NH_4Cl and protonóforo FCCP. Which suggests that P and V H^+ -ATPase activation by extracellular glucose requires a moderate acidification of the cytosol (primary signal for activation) and $\Delta\mu H^+$ through the membrane.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O pH, sua homeostase e importância na célula

O pH citosólico determina o estado de protonação relativo de todos os compostos de ácidos fracos do citosol e afeta diversos processos celulares. Sabe-se que o pH citosólico afeta o equilíbrio redox (Veine *et al.*, 1998), reações metabólicas (Goffeau *et al.*, 1982; Roos & Boron, 1981), interações proteína-proteína (Casey *et al.*, 2010; Kooijman *et al.*, 2007; Whitten *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2010) e a transdução de sinal (Cruciat *et al.*, 2010; Simons *et al.*, 2009).

A homeostase do pH citosólico está intrinsecamente ligada a homeostase de outros cátions, ao potencial de membrana e a homeostase energética celular (Arino *et al.*, 2010; Orij *et al.*, 2011). Por exemplo, o K^+ é necessário para diferentes funções fisiológicas, como estabilização do potencial de membrana, regulação do pH intracelular entre outras. O principal mecanismo de antiporter H^+ /íon através de membranas de organelas da via secretória foi mostrada para diferentes cátions, incluindo Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e K^+ usando a membrana vacuolar como exemplo (Okorokov *et al.*, 1985). O transporte de H^+ pelas diferentes formas de $V H^+$ -ATPase para o lúmen das organelas da via secretória foi evidenciado cuidadosamente (Okorokov *et al.*, 2001; Samarão, 2003; Samarão *et al.*, 2009) mostrando a base bioenergética para funcionamento de antiporteres de diferentes cátions. No caso de K^+ ou Na^+ , estes antiporteres foram identificados em vacúolos (Vnx) (Cagnac, *et al.*, 2007), endossomos ($Nhx1$) (Nass, *et al.*, 1997) e Golgi ($Kha1$) (Maresova & Sychrova, 2005). No caso do antiporter Ca^{2+}/H^+ a identificação genética foi feita para membrana vacuolar ($Vcx1$) (Cunningham & Fink, 1994) e a evidencia bioquímica foi apresentada para os antiporteres localizados no Golgi, reticulo endoplasmático e envelope nuclear (Okorokov *et al.*, 2001; Ribeiro, 2010; Silva, 2009). Esses antiporters são de grande importância para a regulação da homeostase citosólica de cátions, manutenção e regulação do pH no interior das organelas e modulação do tráfego proteico através da via secretória e/ou endosomal.

Um exemplo da importância do controle do pH citosólico pode ser evidenciada pela relação existente entre esse pH e a proliferação celular. O pH citosólico aumenta rapidamente na fertilização de oócitos, coincidindo com a proliferação

celular. Do mesmo modo, em estudos com células tumorais, foi encontrado que o pH no citosol dessas células é mais alto do que o pH citosólico de células não transformadas (Casey *et al.*, 2010; Kurkdjian & Guern, 1989) e o aumento do pH citosólico foi suficiente para conferir tumorigenicidade à cultura de fibroblastos (Perona e Serrano, 1988; Perona *et al.*, 1990), levantando a possibilidade de que o pH citosólico alcalino é um pré-requisito ou um gatilho, para a proliferação celular.

O pH citosólico em leveduras é bastante dinâmico, a adição de glicose em células anteriormente privadas desse composto promove a rápida acidificação do citosol em aproximadamente 30 segundos, seguida de uma alcalinização até o pH neutro em aproximadamente 2 min. (den Hollander *et al.*, 1981; Orij *et al.*, 2009) (Figura 1). Acredita-se que esta rápida acidificação é causada pela glicólise (Dechant *et al.*, 2010), e a posterior alcalinização é resultado da ativação da P H⁺-ATPase (Goossens *et al.*, 2000).

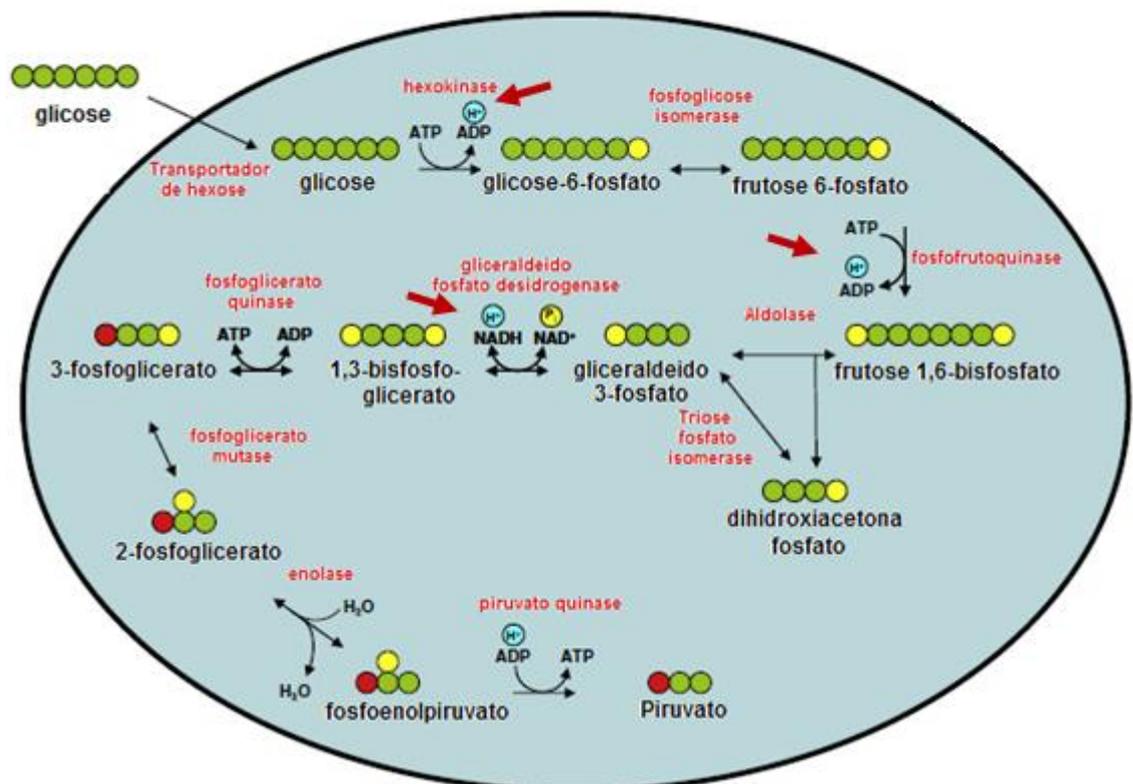


Figura 1 – Intermediários carregados da via glicolítica e acidificação pela glicólise. Para evitar o vazamento espontâneo do interior celular, todos os intermediários glicolíticos são carregados. O rendimento da glicólise é de dois H⁺ por molécula de glicose. A contribuição real desses H⁺ para a acidificação celular também depende do estado redox e do ciclo ATP- ADP. As setas em vermelho indicam os processos onde ocorre a liberação de prótons (Orij *et al.*, 2011 com modificações).

A mudança no pH citosólico após a adição de glicose desempenha um papel na ativação de promotores de proteína quinase A (Thevelein, 1991). Ainda não está totalmente compreendido como funciona a ativação da proteína quinase A pelo pH citosólico, mas sabe-se que o pH citosólico baixo promove a atividade de adenilato ciclase (Cyr1p) e possivelmente o aumento da afinidade de Cyr1p ao ATP em resultado da diminuição do pH citosólico (Purwin *et al.*, 1986). A adenilato ciclase quando ativada, catalisa a conversão de ATP em ADP e AMPc (Nelson & Cox, 2008).

A $V H^+$ -ATPase é de fundamental importância para a manutenção do pH baixo no lúmen das organelas da via secretória (Samarão, 2003; Samarão *et al.*, 2009). O armazenamento de H^+ nas organelas da via secretória ou no vacúolo conserva a energia da célula como potencial de membrana, que é usado para o transporte de vários íons e metabólitos dentro das organelas (Klionsky, *et al.*, 1990; Ohsumi & Anraku, 1981; Okorokov & Lichko, 1983).

Na célula, todas as moléculas fracamente ácidas e básicas constituem juntas um complexo tampão do pH no citosol. Em células vivas, todas as proteínas contêm resíduos de aminoácidos fracamente ácidos ou básicos que podem atuar como tampões. Além das proteínas, metabólitos também podem atuar como tampões (Pick *et al.*, 1990). Um exemplo que pode ser destacado é o fosfato inorgânico (P_i), que pode atuar significativamente como tampão celular. Este possui três valores de pKa (2,12; 7,21 e 12,67) e pode existir em quatro estados diferentes em solução aquosa (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$ e H_3PO_4). Em pH neutro, apenas 62% de HPO_4^{2-} e 38% de $H_2PO_4^-$ estão presentes em quantidades significativas. A diferença funcional das duas formas do íon pode ser significativa, uma vez que em células musculares foi mostrado que HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^-$ ligam-se a Ca^{2+} -ATPase, com afinidade igual, mas apenas a ligação de $H_2PO_4^-$ leva à fosforilação (Khan *et al.*, 1997).

A Tabela 1 apresenta moléculas ou grupos presentes nas células que contribuem para o tamponamento de H^+ no citosol (Srivastava *et al.*, 2007).

Tabela 1 - Grupos/resíduos funcionais. Ácidos fracos e bases fracas mais comuns de uma célula (Srivastava *et al.*, 2007 com alterações).

Resíduo Proteico		pK _a
Amino-terminal	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}^+-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} + \text{H}^+$	8,0
Carboxi-terminal	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{OH} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{O}^- \end{array} + \text{H}^+$	3,1
Ácido aspártico/glutâmico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{OH} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{O}^- \end{array} + \text{H}^+$	4,4
Arginina	$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{H} \\ & & \\ -\text{N}^+-\text{C} & - & \text{N}-\text{H} \\ & & \\ \text{H} & & \text{H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} & & \text{H} \\ & & \\ -\text{N}-\text{C} & - & \text{N}-\text{H} \\ & & \\ \text{H} & & \text{H} \end{array} + \text{H}^+$	12,0
Cisteína	$-\text{S}-\text{H} \rightleftharpoons -\text{S}^- + \text{H}^+$	8,5
Histidina	$\begin{array}{c} \text{CH}-\text{NH} \\ \quad \\ -\text{C} \quad \text{CH} \\ \quad \\ \text{HN}^+-\text{CH} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{CH}-\text{NH} \\ \quad \\ -\text{C} \quad \text{CH} \\ \quad \\ \text{N}-\text{CH} \end{array} + \text{H}^+$	6,5
Lisina	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}^+-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} + \text{H}^+$	10,0
Tirosina	$\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_4-\text{O}^- + \text{H}^+$	10,0
Metabólitos		
Amônio	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{N}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{N}^+-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$	9,2
Fosfato	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{O}-\text{P}-\text{O}^- \\ \\ \text{OH} \end{array} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{O}-\text{P}-\text{O}^- \\ \\ \text{O}^- \end{array} + 3\text{H}^+$	2,1; 7,2; 12,7

Uma única protonação de um grupo básico no sítio ativo de uma enzima, pode alterar a interação com um resíduo vizinho neste local, alterar a afinidade pelo substrato e influenciar reações enzimáticas. Alterações no pH influencia resíduos de cadeias laterais de aminoácidos carregados que podem levar a mudanças no enovelamento de proteínas. A estabilidade conformacional das proteínas, é dependente do pH, e os extremos de pH podem promover a desnaturação de proteínas (Pace *et al.*, 1990). Por exemplo, acidificação a baixo de pH 4,5 causa uma inativação irreversível de P H⁺-ATPase de membrana plasmática de levedura (Goffeau *et al.*, 1982). O pH também influencia interações das proteínas com outras proteínas, lipídeos e metabólitos (Akke & Forsen 1990).

1.2 Compartimentalização de H⁺

Os lúmens de todas as organelas possuem um pH específico, que está associado aos processos que ocorrem nestes compartimentos (Llopis *et al.*, 1998; Roos & Boron, 1981), como é o caso do RE que possui pH em torno de 7,2, os lisossomos com pH 5,0, Golgi pH 6,4 e endossomos variando de pH 6,2 em precoces e pH 5,3 em endossomos tardios (Futai *et al.*, 2000; Mellman *et al.*, 1986).

O pH das organelas é obtido como resultado da interação complexa entre moléculas que agem como tampões, o transporte passivo de H⁺ e a atividade de canais iônicos, bombas de H⁺, antiporter de cátions/H⁺ e simporter de metabolitos/H⁺.

O pH ligeiramente ácido de endossomos precoces (pH 6,2) facilita a dissociação receptor-ligante como no caso da endocitose de LDL em células que necessitam de colesterol para a síntese de membrana (Alberts, 1999). Da mesma forma, o pH baixo dos lisossomos (pH 4,8-5,2) permite a ativação seletiva de hidrolases lisossomais ao atingirem este compartimento. Por exemplo permite a ação de proteases e lipases em células animais (Alberts, 1999). A acidificação também é necessária para algumas funções de células especializadas, tais como processamento de antígeno por células do sistema imunológico (McCoy, 1990). Além disso, muitos vírus e outros patógenos necessitam entrar em compartimentos endossomais ácidos a fim de infectar eficientemente as células (Palokangas *et al.*, 1994; Perez & Carrasco, 1994).

A rede trans Golgi, é um importante local de síntese/modificação de moléculas, e foi mostrado que o pH do seu lúmen é ligeiramente ácido (pH ~6,0)

(Seksek *et al.*, 1995). A acidificação deste compartimento é importante para a separação de enzimas destinadas aos lisossomos, para regulação e secreção de grânulos, secreção de proteínas e secreção de constituintes da membrana (Mellman *et al.*, 1986; Seksek *et al.*, 1995). Foi mostrado primeiramente o transporte de H^+ pela $V H^+$ -ATPase de Golgi em células animais (Moriyama & Nelson, 1989b) e posteriormente foi mostrada sua atividade no Golgi de leveduras (Okorokov *et al.*, 2001; Samarão, 2003; Samarão *et al.*, 2009). Acredita-se que o efluxo de Cl^- do Golgi pode ajudar a controlar o pH desta organela, uma vez que esse efluxo pode alterar o potencial de membrana, alterando assim o controle da $V H^+$ -ATPase (Llopis *et al.*, 1998).

Como dito anteriormente, o controle do pH tanto citosólico quanto do lúmen das organelas é obtido, além de outros, pela ação de diferentes transportadores, sendo as H^+ -ATPases os principais transportadores que atuam nesse sentido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 H⁺-ATPases

As H⁺-ATPases, constituem uma grande família de enzimas que transportam H⁺ através das membranas contra o gradiente eletroquímico deste íon usando a energia da hidrólise do complexo ATP-Mg (Nelson, 1992; Pedersen & Carafoli, 1987).

As H⁺-ATPases são enzimas eletrogênicas, ou seja, possuem a capacidade de criar uma diferença de cargas elétricas através da membrana, sendo essa diferença chamada de potencial de membrana (E_M), assim como pode criar, simultaneamente, um gradiente de concentração de H⁺ (ΔpH) (Pedersen & Carafoli, 1987).

Sabe-se da existência de três tipos de H⁺-ATPases: as H⁺-ATPases do tipo F (F-ATPase ou F₁F₀ H⁺-ATPases), H⁺-ATPases do tipo P (P H⁺-ATPases) e as H⁺-ATPases do tipo V (V H⁺-ATPases ou V₁V₀ H⁺-ATPases) (Pedersen & Carafoli, 1987).

As F₁F₀ H⁺-ATPases estão localizadas nas mitocôndrias, na membrana de bactérias (B₁B₀ H⁺-ATPases) e cloroplastos (C₁C₀ H⁺-ATPases), e são inibidas por azida e oligomicina. Estas enzimas consistem de um setor catalítico F₁, composto das subunidades α , β , γ , δ , ϵ e o setor da membrana, F₀. O domínio F₀ é responsável pelo transporte de H⁺ e é composto pelas subunidades a, b, c (Futai *et al.*, 1989; Boyer, 1997). Funcionalmente, essas H⁺-ATPases são ATP sintases, pois são responsáveis pela síntese de ATP. Foi mostrado que, *in vitro*, elas também podem hidrolisar ATP (Pedersen & Carafoli, 1987). Já as ATPases do tipo P e V utilizam a energia da hidrólise do ATP para criar o gradiente de H⁺ transmembranar (Pedersen & Carafoli, 1987).

2.2 P H⁺-ATPases

As P H⁺-ATPases são enzimas chaves da membrana plasmática de leveduras, fungos filamentosos e plantas (Pedersen & Carafoli, 1987; Serrano, 1983). Esta enzima fornece energia do gradiente de prótons para transportar íons e metabólitos através da membrana plasmática e possui um papel fundamental na

manutenção do pH intracelular (Axelsen & Palmgren, 1998; Gouffeau & Slayman, 1981; Scarborough, 1999).

As P H⁺-ATPases geram um potencial eletroquímico de H⁺ na membrana plasmática, acoplando a hidrólise de ATP ao transporte de H⁺ para o exterior da célula (Serrano, 1993). Além do potencial elétrico formado na membrana plasmática, a bomba de H⁺ também cria um gradiente de pH através da membrana plasmática. A diferença de potencial químico de membrana ($\Delta\psi$) e diferença de pH (ΔpH) através das membranas constituem juntos o gradiente eletroquímico de H⁺ ($\Delta\mu\text{H}^+$), o que é essencial para o transporte íons e outras substâncias (Sanders *et al.*, 1981; Sanders & Slayman, 1982).

Atualmente, é aceito que as P H⁺-ATPases funcionalmente ativas estão localizadas na membrana plasmática, transportando H⁺ para o meio extracelular (Pedersen & Carafoli, 1987; Serrano, 1983), nas vesículas secretórias (Alves, 2006) e nas organelas da via secretória (Samarão, 2003) transportando H⁺ para o lúmen destas organelas e vesículas.

As P H⁺-ATPases estão incluídas na família das P₃-ATPases, cuja família engloba apenas àquelas que transportam H⁺ (Axelsen & Palmgren, 1998; Catty *et al.*, 1997). Possuem apenas um polipeptídeo de aproximadamente 100 KDa, contendo 10 α hélices hidrofóbicas que atravessam a membrana plasmática (Pedersen & Carafoli, 1987). Estas enzimas formam um intermediário fosforilado, o aspartil fosfato, durante a hidrólise de ATP e são inibidas por ortovanadato, um análogo do fosfato inorgânico (Bowman & Bowman, 1986; Goffeau & Slayman, 1981; Pedersen & Carafoli, 1987).

2.2.1 Regulação da P H⁺-ATPase

A atividade das P H⁺-ATPases pode ser aumentada ou diminuída de acordo com a disponibilidade de substrato, do metabolismo e com o pH do meio (Eraso & Gancedo, 1987; Rao, *et al.*, 1993; Serrano, 1983). A ativação da enzima induzida pela glicose provoca mudanças cinéticas, dentre as quais estão: a redução do K_m para o ATP e um aumento da V_{máx} da hidrólise de ATP, ambos provocados pela fosforilação de dois locais diferentes, encontrados no domínio regulatório C-terminal da enzima (Chang & Slayman, 1991; Eraso & Portillo, 1994; Serrano, 1983; Trópia,

et al. 2006). Essa fosforilação modifica a conformação da região C-terminal liberando o sítio de ligação do ATP-Mg (McDonough & Mahler, 1982; Portillo & Mazón, 1985). Parece que um tipo de fosfatidilinositol poderia estar envolvido na ativação da P H⁺-ATPase induzida pela glicose (Trópia, et al., 2006).

As ATPases de membrana plasmática também são ativadas em resposta à diminuição do pH citosólico (Carmelo et al., 1997; Eraso & Gancedo, 1987). Como citado anteriormente a ativação pela glicose é um processo reversível que ocorre através de alterações de $V_{m\acute{a}x}$ e afinidade por ATP e pH ótimo de funcionamento da enzima (Serrano, 1983). Já a ativação por acidificação também ocorre devido a alterações na $V_{m\acute{a}x}$, mas sem qualquer modificação do pH ótimo, sendo esse processo irreversível (Carmelo *et al.*, 1997; Eraso & Gancedo, 1987).

As P H⁺-ATPases recém sintetizadas integram-se à membrana do retículo endoplasmático (RE) sem clivagem da sequência N-terminal e são transportadas para o complexo de Golgi, a partir do qual são enviadas à membrana plasmática (Holcomb *et al.*, 1988).

Os mecanismos necessários para o controle da atividade da P H⁺-ATPase ainda estão sendo estudados e alguns autores sugerem que este controle deve ocorrer através da fosforilação mediada por proteína quinase. McDonough & Mahler (1982) demonstraram que em membranas plasmáticas de levedura, a fosforilação da enzima ocorre por uma proteína quinase.

A fosforilação de sítios específicos da P H⁺-ATPase está associada com o aumento da atividade da ATPase durante o crescimento da levedura na presença de glicose. A desfosforilação ocorre com a retirada da glicose assim como a diminuição da atividade da enzima (Chang & Slayman, 1991).

Estrada e colaboradores (1996) sugeriram dois mecanismos para a regulação da P H⁺-ATPase. O primeiro é que a atividade da P H⁺-ATPase é inibida através da fosforilação por caseínas quinases (YCK1, em leveduras é homólogo de caseína quinase de mamíferos) cuja função é estimulada com a falta de glicose. Também é possível que a fosforilação de PMA1p mediada por YCK1p possa evitar que a enzima seja ativada pela glicose, através de outra fosforilação quinase dependente.

A porção C-terminal da P H⁺-ATPase de levedura parece atuar como um domínio auto-inibitório, uma vez que a deleção de onze aminoácidos presentes nesta porção, resultou na ativação da enzima (Portillo *et al.*, 1989). Em plantas um

peptídeo formado por trinta e dois aminoácidos e derivado da região C-terminal, inibiu o transporte de H^+ pela enzima (Palmgren *et al.*, 1991). Estes dados sugerem que a porção C-terminal das $P H^+$ -ATPases de fungos e plantas interage com o sítio ativo da enzima para inibir sua atividade. É sugerido um modelo no qual o domínio C-terminal interage, direta ou indiretamente, com a interface entre o setor de membrana e sítio de ligação do ATP, inibindo a atividade enzimática. Este tipo de ligação pode tanto limitar o acesso de H^+ a seus sítios de transporte quanto o acesso do ATP a seu sítio de ligação. Ativadores como a glicose podem provocar mudanças através da fosforilação de serina e treonina na região C-terminal, desfazendo a interação inibitória e permitindo a mudança para uma conformação mais ativa (Portillo, 2000).

Outro mecanismo de regulação da $P H^+$ -ATPase é através da proteína de membrana plasmática Hsp 30, cuja expressão pode ser induzida em resposta a estresses como calor, exposição ao etanol e ácidos orgânicos fracos (Piper *et al.*, 1997). Sugere-se que a proteína Hsp 30 limita o excesso de consumo de ATP pela ATPase durante um estresse prolongado ou limitações de glicose (Piper *et al.*, 1997).

2.3 V H^+ -ATPases

As $V H^+$ -ATPases possuem como função primária acoplar a hidrólise de ATP ao transporte de H^+ através das membranas biológicas. A força próton motriz gerada pelas $V H^+$ -ATPases em organelas de células eucarióticas é usada em vários processos celulares (Nelson & Harvey, 1999). Elas são importantes para o transporte secundário de vários solutos, dirigindo uma variedade de sistemas de transporte ativo através dos co-transportadores e trocadores de H^+ (Beyenbach & Wiczorek, 2006).

O bombeamento de H^+ realizado pelas $V H^+$ -ATPases é de vital importância para vários processos intra e intercelulares, dentre eles a endocitose mediada por receptores, o tráfego de proteínas, neurotransmissões, o transporte ativo e armazenamento de metabólitos (Finbow & Harrison, 1997; Futai *et al.*, 2000; Nelson & Harvey, 1999; Nishi & Forgac, 2002; Stevens & Forgac, 1997).

As $V H^+$ -ATPases foram denominadas ATPases do tipo V por terem sido caracterizadas inicialmente nas membranas vacuolares (Barkla & Pantoja, 1996;

Bowman & Bowman, 1988; Pedersen & Carafoli, 1987; Rea *et al.*, 1987). Dependendo da subunidade e da isoforma a V-ATPase de *S. cerevisiae* apresenta 31-41% de identidade e de 51-60% de similaridade com a do homem (Rahman *et al.*, 2013).

Leveduras mutantes, sem a atividade de V-ATPase são viáveis, mas apresentam uma grande variedade de defeitos de crescimento, especialmente quando são crescidas em pH 5, também são sensíveis a elevados níveis de Ca^{2+} , metais pesados e várias drogas e quando incubadas em pH acima de 7 não sobrevivem (Kane, 2006).

As V H^+ -ATPases estão presentes em uma grande variedade de membranas celulares em eucariotos, como lisossomos, endossomos, vesículas derivadas do Golgi, vesículas secretórias e em membranas plasmáticas de algumas células especializadas (Forgac, 1998; Forgac, 2007; Stevens & Forgac, 1997).

Em leveduras, as V H^+ -ATPases foram descritas não apenas nas membranas vacuolares (Ohsumi e Anraku, 1981) mas também em todas as organelas da via secretória (Okorokov, 1997; Okorokov *et al.*, 2001; Samarão, 2003; Samarão *et al.*, 2009; Teodoro, 2004) e nas vesículas secretórias (Alves, 2006). Elas são essenciais para o acúmulo de aminoácidos básicos como arginina, ácidos orgânicos, purinas, pirimidinas, S-adenosilmetionina, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e fosfato inorgânico (Harvey, 1992; Klonskiy *et al.*, 1990; Okorokov *et al.*, 1980; Okorokov & Lichko, 1983; Okorokov *et al.*, 1985; Ohsumi & Anraku, 1983).

Em plantas assim como em leveduras, as V H^+ -ATPases estão localizadas nas organelas da via secretória (Teodoro, 2004). A V H^+ -ATPase é indispensável para o crescimento de plantas sob condições normais devido ao seu papel na energização do transporte de solutos, endereçamento de proteínas, homeostase de íons/metabólitos, fusão/divisão de vesículas de membranas (Clague *et al.*, 1994; Matsouka *et al.*, 1997; Ratajczak, 2000). Sob condições de estresse como salinidade, seca, frio, estresse ácido, anoxia e excesso de metais pesados no solo a sobrevivência da célula depende da manutenção ou ajuste da atividade das bombas protônicas (Dietz *et al.*, 2001).

As V H^+ -ATPases são também encontradas no *Plasmodium falciparum* (agente causador da malária) e *Toxoplasma gondii* (agente causador da toxoplasmose) (Beyenbach & Wicczorek, 2006; Moriyama *et al.*, 2003). Essas

bombas também foram encontradas na membrana plasmática de intestino de insetos como o *Aedes Aegypti* (Zhuang *et al.*, 1999). Além disso, foi mostrada a atividade de V H⁺-ATPase na membrana plasmática, Golgi e lisossomos de *Aedes aegypti* (Freitas, 2011).

A acidificação do lúmen de organelas dependente da V H⁺-ATPase é crucial para a entrada de alguns vírus e bactérias dentro da célula. A hemaglutinina, proteína capsidial do vírus da gripe, promove a fusão dependente do pH, entre a membrana viral e a membrana endossomal, o que facilita a liberação do material genético do vírus no citoplasma da célula hospedeira (White, 1992). Da mesma forma, as toxinas, tais como a toxina da difteria e a toxina do antraz, contêm subunidades formadoras de poros que, em resposta ao baixo pH endossomal após a sua interiorização, facilita a inserção da parte citotóxica no citoplasma (Kevin *et al.*, 2008).

Em células animais as V H⁺-ATPases podem desempenhar um importante papel na membrana plasmática de células especializadas. Estão envolvidas na maturação e armazenamento de esperma no lúmen epididimal (Beyenbach & Wieczorek, 2006; Breton *et al.*, 1996). Em células renais, são responsáveis pela secreção de íons de H⁺ nas células do ducto coletor, túbulos proximais e segmentos dos néfrons (Gluck, 1992; Gluck *et al.*, 1996). Nos endossomos de células renais de hamster, as V H⁺-ATPases promovem um ambiente ácido que serve como um sinal que ativa a liberação de ligantes internos (lipoproteínas de baixa densidade e insulina) de seus receptores (receptores que foram internalizados). Esta liberação permite que os receptores sejam reciclados para superfície celular, onde eles podem ser reutilizados, enquanto os ligantes são direcionados para os lisossomos para a degradação (Claque, 1994).

As V H⁺-ATPases desempenham um papel importante também nos osteoclastos, os quais são responsáveis pela reabsorção óssea (Toyomura *et al.*, 2003). O meio ácido promovido por essas enzimas dissolve a matriz óssea e ativa proteases que participam na reabsorção óssea. Pacientes com defeitos genéticos na isoforma da V H⁺-ATPase expressa na membrana plasmática de osteoclastos desenvolvem um distúrbio conhecido como osteopetrose (Frattini *et al.*, 2000), que é caracterizado por um aumento na densidade óssea e defeitos de desenvolvimento, devido à impossibilidade de remodelação óssea (Frattini *et al.*, 2000).

As V H⁺-ATPases também possuem um papel importante em células tumorais, nessas células as bombas são direcionadas para a membrana plasmática onde elas criam um ambiente extracelular acidífero, o qual é necessário para a metástase tumoral (Martinez-Zaguilan *et al.*, 1993). As V H⁺-ATPases também estão presentes em células do cérebro, nas vesículas sinápticas (Nelson, 1992). Em vesículas sinápticas, estão envolvidas na transdução de sinal (Beyenbach & Wieczorek, 2006; Bowman & Bowman, 2002; Graham *et al.*, 2000; Inoue & Forgac, 2005).

2.3.1 Estrutura das V H⁺-ATPases

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de elucidar as propriedades estruturais, funcionais e regulatórias dessa enzima (Beyenbach & Wieczorek, 2006; Nishi & Forgac, 2002). Na segunda metade dos anos oitenta, a purificação da V H⁺-ATPase de células animais, de plantas e de fungos revelou a composição das subunidades dessa enzima (Arai *et al.*, 1987; Bowman *et al.*, 1986; Moriyama e Nelson, 1987; Okorokov, *et al.*, 1985; Randall & Sze, 1986; Uchida *et al.*, 1985; Xie & Stone, 1986;).

Nelson & Harvey (1999) baseados em estudos em que foi mostrada a similaridade entre F-ATPase e V-ATPase sugeriram atribuir cada subunidade da V-ATPase a uma das 4 partes da “máquina mecânicoquímica” de Paul Boyer (proposta para a F-ATPase): (1) unidade catalítica, (2) talo, (3) gancho e (4) turbina. Essas nomenclaturas dadas para cada parte esta relacionada à forma como a enzima trabalha, sendo considerada um “bio-motor”, onde o ATP é o combustível e transporte de H⁺ é a ação. O setor catalítico tem a função de ligar e hidrolisar ATP, promovendo uma rotação momentânea do talo, que por sua vez irá rodar a turbina, o talo também tem a função de manter o setor catalítico no lugar. A turbina tem a função de conduzir H⁺ através da membrana e o gancho previne a rotação da unidade catalítica (Figura 2).

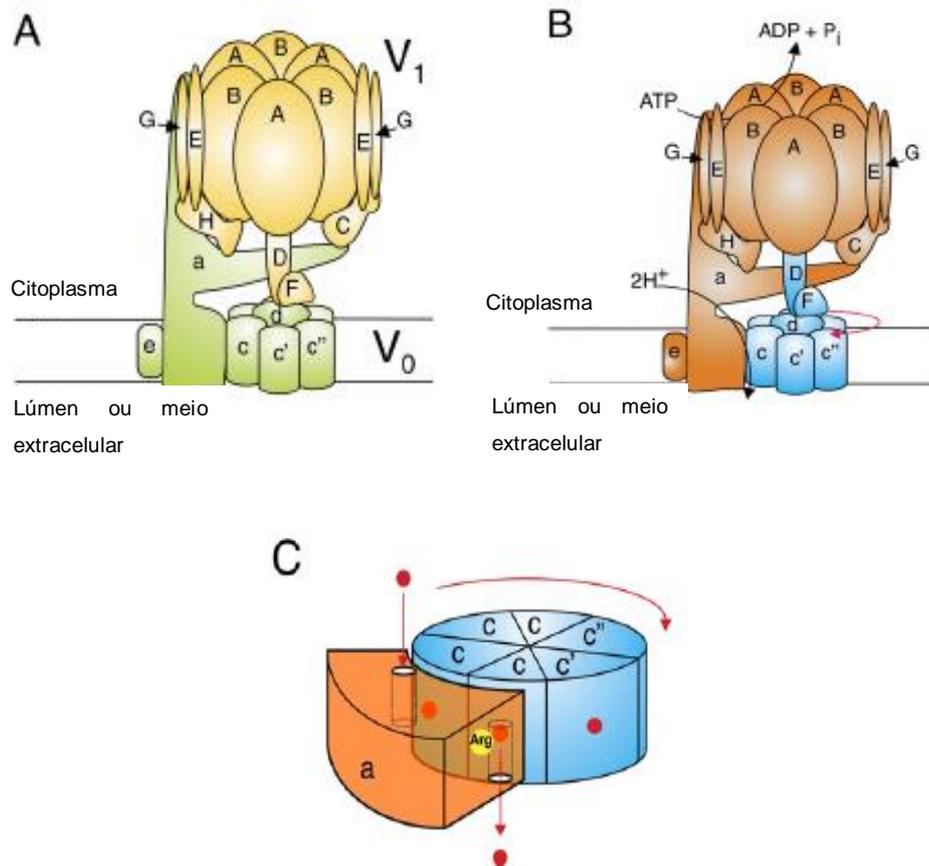


Figura 2 – Estrutura e mecanismo da V-ATPase. Modelo baseado na “máquina mecanoquímica” de Paul Boyer (proposta para F-ATPase). **(A)** Disposição das subunidades da V-ATPase, destacando os domínios V₁ (amarelo) e V₀ (verde). **(B)** Mecanismo de rotação da V-ATPase, as subunidades rotatórias são destacadas em azul, enquanto as estacionárias são mostradas em laranja. A hidrólise de ATP causa mudanças conformacionais na subunidade A, que dirige a rotação do rotor (seta vermelha). **(C)** Mecanismo do transporte de prótons através de V₀. Prótons (pontos vermelhos) entram no complexo V₀ através de um canal hemi citoplasmático (Cipriano, 2008).

A V H⁺-ATPase é dividida em dois domínios: o domínio catalítico hidrofílico (V₁) com aproximadamente 570 KDa e o domínio integral de membrana hidrofóbico (V₀) com aproximadamente 260 KDa (Figura 2).

O complexo V₁ é usualmente descrito como um hexâmero constituído de três cópias de cada uma das subunidades “A” e “B” (alternadas) e cópias simples das demais subunidades (Forgac, 1999a; Graham *et al.*, 2000) (Figura 2). Sabe-se que tanto a subunidade “A” como a “B” são constituintes da unidade catalítica; a subunidade “A” está envolvida na hidrólise de ATP e apresenta similaridade de

seqüências com a subunidade catalítica “ β ” da F₁-ATPase (Finbow & Harrison, 1997). Supõe-se que a subunidade catalítica “A” tenha atividade hidrolítica, desde que os complexos V₁ e V₀ encontrem-se associados. A subunidade “B”, com função reguladora, possui homologia com a subunidade “ α ” de F₁-ATPase. Essa subunidade possui um sítio de ligação de ATP não catalítico. A subunidade “B” pode contribuir com importantes resíduos para a função catalítica da subunidade “A” (Nelson & Harvey, 1999).

O canal de prótons através da membrana é formado pelo setor V₀ que contém cinco diferentes tipos de subunidades: a, c, c', c" e d, com massa molecular de 100 KDa, 16 KDa, 17 KDa, 19-23 KDa e 36-38 KDa, respectivamente. Três dessas subunidades, c, c' e c", são proteolipídeos altamente hidrofóbicos (Finbow e Harrison, 1997; Forgac, 1998; Forgac, 1999a; Graham *et al.*, 2000; Kane, 1992; Maeshima, 2001; Moriyama & Nelson, 1989; Nelson e Harvey, 1999; Ratajczak, 2000) (Figura 2).

Foi proposto que o domínio V₀ das V H⁺-ATPases, com base no estudo da fusão de vacúolos homotípicos de leveduras, participa ativamente na fusão de membranas, independente do seu papel na acidificação promovida pela enzima. É sugerido que V₀ catalisa diretamente a mistura das duas bicamadas lipídicas em virtude da sua composição altamente hidrofóbica (Peters *et al.* 2001).

O domínio V₁ é composto pelas subunidades A e B da cabeça, que tem massa molecular de 67 a 73 KDa e 55 a 60 KDa, respectivamente, e as subunidades do talo, C (40 a 45 KDa), D (32 a 33 KDa), E (28 a 32 KDa), F (13 a 14 KDa), G (12 a 16 KDa) e H (51 a 54 KDa) (Figura 2).

A subunidade D, constituinte do talo, parece ter um papel importante no acoplamento do transporte de H⁺ e hidrólise de ATP (Xu & Forgac, 2000). A subunidade C é um polipeptídeo encontrado no talo, ela atua monômeros de actina, durante o processo de desassociação dos complexos da V H⁺-ATPases (V₀ e V₁) em resposta a ausência de glicose (importante mecanismo de regulação da atividade da V H⁺-ATPases), a subunidade C é liberada, sugerindo que esta possa ter um papel importante neste processo (Nelson *et al.*, 1990). A subunidade H parece ser importante na regulação da atividade enzimática e na comunicação da V H⁺-

ATPases com outros processos celulares (Finbow & Harrison, 1997; Parra *et al.*, 2000).

Acredita-se que a subunidade c (proteolipídica), constituinte da turbina, seja a principal subunidade envolvida na translocação de prótons através da membrana (Hirata *et al.*, 1997). A subunidade d, também constituinte da turbina, está associada ao complexo V_o da enzima e possivelmente tem função na associação dos dois complexos da enzima (V_o e V_1) (Bauerle *et al.*, 1993).

A ausência da subunidade F em mutantes de levedura impede a associação do complexo V_o ao complexo V_1 (Finbow & Harrison, 1997; Graham *et al.*, 1994; Ratajczak, 2000).

2.3.2 Diferentes formas de $V H^+$ -ATPases em distintas organelas

Foi mostrado que existem formas distintas da $V H^+$ -ATPase funcionais nas distintas organelas da via secretória, e a atividade da enzima pode ser diferente em cada organela (Samarão *et al.*, 2009).

Samarão e colaboradores (2009) mostraram através da análise da imunoresposta, que a razão entre a imunoreatividade das subunidades A e B de vacúolos é de 1:1 e em membranas mais densas que o vacúolo essa razão é alterada. Os autores sugerem que modificações pós-transdacionais da subunidade A e/ou da subunidade B podem alterar a conformação de subunidades e, portanto, as suas imunoreatividades e promover o aumento da estequiometria de imunoreatividade B:A alterando a velocidade inicial (V_o) de formação do ΔpH nos diferentes compartimentos da via secretória. A modificação parece ser mais provável na subunidade A, pois sua imunoreatividade foi mais irregular no RE e no Golgi. Contudo a diferença na razão estequiométrica de 1:1 entre as subunidades A e B pode ser causada por outro motivo como a ligação de diferentes subunidades do complexo V_1 com microtúbulos, enzimas glicolíticas como aldolase e proteínas do complexo RAVE. Por exemplo, microtúbulos poderiam se ligar às subunidades B livres, bem como à enzima, todas as subunidades B dissociariam desses complexos, na presença de SDS, aumentando o número total de subunidades B em comparação com as subunidades A (Samarão *et al.*, 2009).

Outra diferença encontrada entre as formas da V H⁺-ATPase esta relacionada à sensibilidade da enzima ao inibidor bafilomicina, onde foi encontrado que em vesículas de membranas do RE a V H⁺-ATPase apresentou maior resistência da velocidade inicial do transporte de H⁺ a este inibidor (inibição de 50 % foi obtida com 4,4 nM), quando comparada com vesículas de membranas do vacúolo e do Golgi (inibição de 50 % foi obtida com 0,03 nM) (Samarão *et al.*, 2009).

2.3.3 Regulação das V H⁺-ATPases

A regulação da V ATPase em resposta a estímulos fisiológicos é um processo “multinível”, que inclui o controle da expressão dos genes das subunidades da V ATPase (Lee *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2004), alvos intracelulares e translocação de vesículas para a membrana plasmática (Bastani *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1992), o controle da atividade enzimática pela glicose extracelular (Kane, 1995), a formação de ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína (Forgac, 1999b), a atividade de canais aniônico para a modulação da atividade da enzima além de outros mecanismos.

2.3.3.1 Regulação da V H⁺-ATPase pela glicose extracelular

Um dos possíveis mecanismos de regulação da V H⁺-ATPase foi sugerido por Summer e colaboradores para V H⁺-ATPase de *Manduca sexta* (Summer *et al.*, 1995) e posteriormente por Kane no caso de levedura (Kane, 1995). Foi considerada a desassociação /associação/ reversível dos complexos V₁ e V₀ na ausência/presença de glicose extracelular como base desta regulação. O transporte de H⁺ feito pela V H⁺-ATPase necessita de uma associação funcional dos complexos V₁ e V₀. A subunidade C, do complexo V₁, pode ser perdida durante o isolamento das membranas das células não pré-incubadas com glicose (Kane, 1995). É importante destacar que para avaliação de forma associada da enzima, Kane e outros autores, usaram a capacidade do detergente E₁₂C₉ de solubilizar junto com as subunidades do complexo V₁, as subunidades do complexo V₀, principalmente a subunidade “a”. O baixo conteúdo desta subunidade (20-30%) detectado depois da a solubilização das membranas das células incubadas sem glicose foi interpretada como indicação de que a maioria dos complexos V₁ dissociou do complexo V₀ e que somente 20-30% não foram dissociados (Kane, 1995).

A possibilidade que o complexo V_1 da enzima não ativada pela glicose extracelular ainda pode estar ligada com V_0 à membrana mais fracamente, já foi proposta (Granato, 2006; Ribeiro, 2010; Samarão, 2003). Foi mostrado que a forte estimulação do transporte de H^+ pela glicose extracelular não necessita de um aumento significativo do número de complexos V_1 . O aumento da velocidade inicial do transporte de H^+ na bomba ativada, comparada com a bomba não ativada, não foi acompanhada por uma diferença equivalente no conteúdo de subunidades A e B do complexo V_1 . Além disso, no modelo proposto por Kane, a dissociação dos complexos V_1 deveria diminuir proporcionalmente tanto a atividade da $V H^+$ -ATPase como a acessibilidade dos epítomos das subunidades A e B do complexo V_1 . Também foi observado que as membranas de vacúolo isoladas de esferoplastos não pré-incubadas com glicose podem perder a atividade do transporte de H^+ , ou ter essa atividade baixa, mas tem quase o mesmo conteúdo de subunidades A e B em comparação com membranas do Golgi e/ou RE nos quais ainda apresentam atividade significativa (Granato, 2006; Samarão, 2003).

2.3.3.2 Regulação da $V H^+$ -ATPase pela aldolase

Além de se especular sobre o papel da glicose na regulação da $V H^+$ -ATPase uma importante enzima da via glicolítica, a aldolase, também parece estar envolvida na regulação desta bomba. A aldolase é uma proteína que se liga a actina (Arnold & Pette, 1970) que exibe uma dinâmica interação com o citoesqueleto.

A VH^+ -ATPase possui estrutura muito parecida com a da ATP sintase e a subunidade E de VH^+ -ATPase não possui uma “equivalente” em F-ATPase, por isso esta subunidade tem sido muito estudada como um alvo de regulação da bomba.

A deleção do gene da aldolase em levedura provocou a dissociação dos complexos V_1 e V_0 . Acredita-se que a aldolase estaria ligada à V -ATPase na célula intacta promovendo a associação física entre a via glicolítica e a bomba de H^+ (Lu *et al.*, 2001). A ligação entre a aldolase e a V -ATPase pode fornecer a célula um meio para a geração localizada de ATP através da glicólise (Lu *et al.*, 2001).

Sabe-se que a glicólise gera dois íons hidrogênio para cada molécula de glicose consumida sendo produzida um íon hidrogênio para cada molécula de ATP produzida, sendo assim a $V H^+$ -ATPase deve ser essencial para a regulação local do pH pelo transporte desses H^+ gerados (Figura 3).

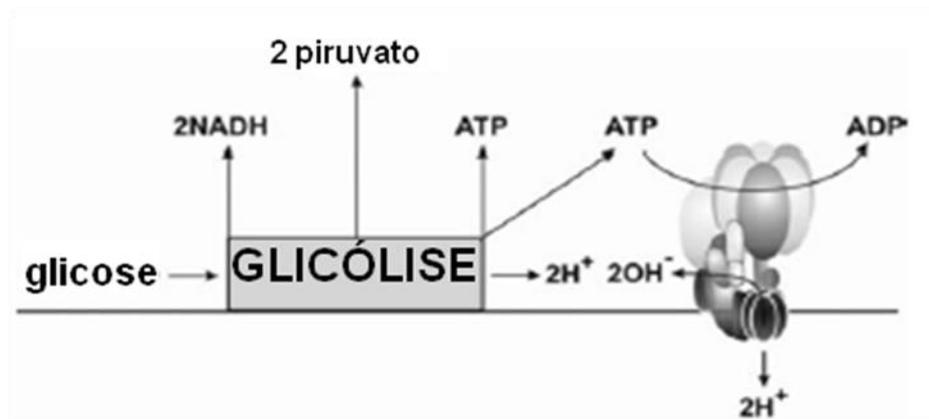


Figura 3 - Esquema mostrando a relação entre a via glicolítica e a V-ATPase. (Ming *et al.*, 2004 com modificações).

Lu & colaboradores (2001) encontraram que a aldolase está concentrada próxima a V-ATPase tanto em osteoclastos ativados quanto em inativados. Em osteoclastos inativados, a V-ATPase está armazenada em compartimentos vesiculares fortemente associados a F-actina. Pelo menos parte desta interação envolve sítios de ligação de alta afinidade a F-actina, localizados no domínio amino-terminal da subunidade B (Holliday *et al.*, 2000). Em osteoclastos ativados, a V-ATPase está inserida nas “dobras” de membrana, e a interação com actina é perdida (Lee *et al.*, 1999). Embora tanto a V-ATPase e a aldolase são capazes de se ligar a F-actina, a interação entre a subunidade E e a aldolase pode manter a associação mesmo em condições na qual a V-ATPase se dissocia do citoesqueleto, fornecendo assim meios para que as enzimas glicolíticas permaneçam localizadas em locais ativos de consumo de ATP.

Posteriormente foi encontrado que aldolase além de interagir com a subunidade E também pode interagir com as subunidades “a” e “B” de V ATPase (Lu *et al.*, 2003).

Foram identificadas três isoformas de aldolase, cada uma diferindo na suas propriedades enzimáticas e expressão (Ali *et al.*, 1998). A principal forma no túbulo proximal é a aldolase B (Wachsmuth *et al.*, 1975). Problemas genéticos na produção de aldolase B produzem uma doença autossômica recessiva, conhecida como intolerância hereditária a frutose (Ali *et al.*, 1998). Pacientes com essa doença desenvolvem problemas na acidificação do túbulo proximal em resposta a

alimentação contendo frutose (Morris, 1968). Esse defeito na acidificação do túbulo proximal causado por essa doença sugere que a interação entre aldolase e V-ATPase possui um papel essencial na função de transporte do túbulo proximal. Talvez o não funcionamento da aldolase B em resposta à ingestão de frutose prejudique o acoplamento entre V-ATPase e a via glicolítica (Lu *et al.*, 2001).

2.3.3.3 Regulação da V H⁺-ATPase (complexo RAVE)

O complexo regulador de ATPase do vacúolo e endossomos (RAVE) liga-se ao complexo V₁ e a subunidade C no citosol promovendo sua ligação com o complexo V₀ ligado à membrana (Seol *et al.*, 2001; Smardon *et al.*, 2002; Smardon & Kane, 2007). Esse complexo é composto pela proteína Skp1p, a qual é encontrada em diversos complexos, além das proteínas Rav1p a Rav2p (Figura 4) (Seol *et al.*, 2001).

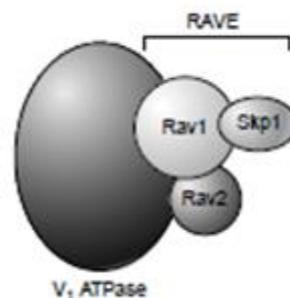


Figura 4- Componentes do complexo RAVE e sua interação com o complexo V₁ da V H⁺-ATPase. Seol *et al.*, 2001.

Análises bioquímicas revelaram que a Rav1p é o componente central do complexo RAVE, possuindo sítios de ligação distintos para Rav2p, Skp1p, subunidade E e/ou G do complexo V₁, e subunidade C do complexo V₁ (Smardon *et al.*, 2002; Smardon & Kane, 2007). A deleção de RAV1 e RAV2 resulta em um defeito de associação dos complexos da V-ATPase de vacúolo, e mutantes *rav1Δ* apresentam defeitos na associação e desassociação dos complexos da V-ATPase em resposta à glicose (Seol *et al.*, 2001; Smardon *et al.*, 2002). Mutantes de levedura *rav1Δ* e *rav2Δ* exibem características de um mutante de Vma parcial, apresentando defeitos de crescimento em pH elevado e em altas concentrações de

Ca^{2+} quando crescidas a 37°C (Seol *et al.*, 2001). A perda da função do complexo RAVE também pode comprometer o transporte entre endossomos precoces e o compartimento pré vacuolar (Sipos *et al.*, 2004).

Existem homólogos de RAV1 em eucariotos superiores, chamados rabconectina-3 α ou proteínas “DMX-like” (Kraemer *et al.*, 1998; Nagano *et al.*, 2002). Apenas fungos possuem homólogos de RAV2, mas eucariotos superiores possuem uma segunda subunidade de rabconectina (rabconectina-3 β), a qual forma um complexo com rabconectina-3 α (Sakisaka & Takai, 2005; Yan *et al.*, 2009). Em *Drosophila* e linhagens de células humanas, a rabconectina-3 α e a rabconectina-3 β estão envolvidas na regulação da acidificação de organelas e tráfego endossomal (Yan *et al.*, 2009).

Sugere-se que o complexo RAVE/rabconectinas possuem uma função conservada na acidificação vacuolar, com Rav1p e seus homólogos possuindo um papel central nesta função.

2.3.3.4 Formação de ligações dissulfeto

Outro mecanismo proposto para regular a atividade de V H⁺-ATPase *in vivo* envolve a formação de ligações dissulfeto reversíveis entre resíduos de cisteína no sítio catalítico das V H⁺-ATPases. Uma ligação dissulfeto inibitória pode ser formada entre o Cys²⁵⁴ e Cys⁵³² na subunidade A bovina, essa ligação leva à inativação reversível da enzima (Figura 5B). Em concordância com essa afirmação, a mutação do resíduo correspondente ao Cys²⁵⁴, em levedura leva a uma enzima que é resistente à oxidação. O interessante é que uma mutação na cisteína na via biosintética de leveduras pode levar a um defeito na acidificação vacuolar e esse defeito pode ser corrigido pela mutação em Cys²⁶¹ Val, sugerindo que a formação de ligações dissulfeto possam causar a inibição da atividade de V H⁺-ATPase *in vivo* (Forgac, 1999b).

2.3.3.5 Atividade de canais aniônicos

O transporte de H⁺ pela V H⁺-ATPase é um processo eletrogênico necessitando de um co-transporte de ânions ou efluxo de H⁺ em troca com outro cátion como Ca²⁺, Na⁺ ou K⁺ para dissipar o potencial de membrana formado pelo H⁺

durante o transporte deste íon (Arai *et al.*, 1989; Kakinuma *et al.*, 1981; Okorokov & Lichko, 1983). As bombas protônicas eletrogênicas são inibidas pelo produto do processo que elas catalisam, ou seja, tanto pelo potencial elétrico da membrana formado pelos íons H^+ ($E_M^{H^+}$) quanto pela diferença de potencial químico de H^+ , ΔpH . Sendo que o efeito inibitório pelo $E_M^{H^+}$ é mais significativo comparando com o efeito do ΔpH . Importante também ressaltar que a conversão de $E_M^{H^+}$ em E_M formado por outro cátion, por exemplo, K^+ , Na^+ ou Ca^{2+} em resultado a troca de H^+ com esses cátions ativa a bomba protônica, ou seja, a libera do controle negativo pelo $E_M^{H^+}$ (Okorokov & Lichko, 1983; Okorokov *et al.*, 1985). A dissipação é realizada por ânions que entram através de um canal de Cl^- , e a sua atividade é controlada por fosforilação dependente de proteína kinase A (Figura 5C). A defosforilação do canal de Cl^- pela proteína fosfatase diminui a sua condutância e a acidificação dependente de ATP, enquanto que a fosforilação pela proteína kinase A aumenta as duas atividades (Mulberg *et al.*, 1991).

O conhecimento da importância do canal aniônico para a modulação da atividade de $V H^+$ -ATPase foi proposta para explicar os efeitos do Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} sobre a atividade de $V H^+$ -ATPase e formação de $\Delta\mu H^+$ em membranas de vacúolos inteiros (Okorokov *et al.*, 1985). Sugeriu-se que o Ca^{2+} poderia fechar o canal aniônico. A troca do Ca^{2+} com o H^+ (trocador de Ca^{2+}/H^+) estimulou a hidrólise de ATP pela $V H^+$ -ATPase em 60% e aumentou o E_M feito pelo Ca^{2+} em 3 vezes, simultaneamente a V_0 e F_{max} da formação de ΔpH foram diminuídas por causa de rápida troca de prótons com Ca^{2+} . O Mn^{2+} apresentou um efeito contrário indicando que este pode abrir o canal aniônico, mas não pode ser transportado rapidamente pelo trocador Mn^{2+}/H^+ . O Mn^{2+} evitou a formação do E_M e transformou este em ΔpH . O Mg^{2+} pode abrir parcialmente o canal aniônico e estimular a formação de ΔpH e de E_M . Assim, cátions bivalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , na levedura *S. carlsbergensis*, podem regular a atividade da $V H^+$ -ATPase e modificar a contribuição de ΔpH e potencial de membrana em $\Delta\mu H^+$ e com isso regular as atividades de transportadores secundários os quais usam o ΔpH (para trocar Ca^{2+} , arginina, lisina ou Zn^{2+}) e E_M (para co-transportar citrato e α -cetoglutarato) (Okorokov *et al.*, 1985). O gradiente eletroquímico ($\Delta\mu H^+$) é a força impulsora

resultante da combinação entre o gradiente de concentração e o gradiente elétrico para cada soluto carregado através da membrana (Alberts *et al.*, 1999).

2.3.3.6 Regulação da V-ATPase pelo pH extracelular

Foi primeiramente sugerido a inter-relação entre a atividade de V H⁺-ATPase e o pH extracelular a partir de estudos com mutantes sem subunidades de V-ATPase (mutante *vma*) (Nelson & Nelson, 1990). O crescimento ótimo de mutantes *vma* em pH 5 foi inicialmente atribuído ao transporte endocítico de meio ácido para o vacúolo (Munn & Riezman, 1994; Nelson *et al.*, 1990;), o que foi posteriormente contestado após terem sido realizados experimentos onde a endocitose foi bloqueada, mas a acidificação do vacúolo se manteve. Foi demonstrado ocorrer uma acidificação parcial dos vacúolos em mutantes *vma* através do transporte de H⁺ passivo.

Diakov e Kane (2010), acharam a mais alta atividade da V H⁺-ATPase em vesículas vacuolares isoladas de células crescidas em pH 7 em relação aquelas crescidas a pH 5 e relativa insensibilidade à dissociação da enzima em resposta à privação de glicose nestas vesículas. Os autores sugerem ainda que os complexos da V-ATPase de levedura são estabilizados em pH extracelular elevado, tornando-os mais ativos e menos suscetíveis à dissociação, mas seus dados não suportam o controle direto da estabilidade da V-ATPase e sua atividade pelo pH citosólico, pois os autores mediram valores quase idênticos do pH citosólico quando as células foram crescidas em pH extracelular 5 e 7. Além disso, os autores não encontraram mudanças na atividade de V-ATPase quando incubaram as vesículas vacuolares em tampão 5,5 e 7,5.

Vale destacar que para medir o efeito da glicose os autores incubaram as células sem glicose de 20 a 30 min. e posteriormente adicionaram glicose e incubaram por 5 min.. Será que o efeito do pH também não seria regulado de forma mais imediata, como no caso da glicose? Então esse efeito poderia ser perdido ao longo do crescimento do organismo.

2.3.3.7 Outras formas de regulação

A atividade da V H⁺-ATPase pode ser modulada pela variação da eficiência de acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte de H⁺, sendo o acoplamento

atribuído às diferentes formas da enzima. Esta diferença na eficiência do acoplamento foi proposta para explicar a diferença no pH das diferentes organelas (Forgac, 2007; Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001; Nelson, 2003; Nishi & Forgac, 2002) (Figura 5D).

Foi proposto também que alguns lipídios específicos podem afetar a atividade das $V H^+$ -ATPase. Mais especificamente, foi mostrado em levedura que esfingolipídeos com um grupo acil C26 são necessários para a geração do complexo V_1 com atividade ATPásica (Chen *et al.*, 2004). Curiosamente, vários inibidores de $V H^+$ -ATPase, mostraram incorporar-se à bicamada lipídica e afetar a flexibilidade estrutural da enzima (Dixon *et al.* 2004; Dixon *et al.* 2008).

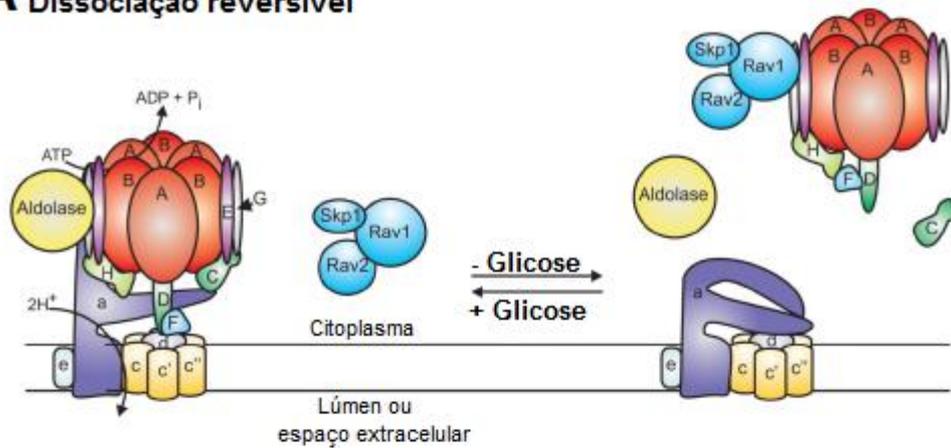
As $V H^+$ -ATPases podem ser inativadas a 0 °C, sendo que nessa temperatura na presença de Mg^{2+} e ATP a atividade de ATPase pode cair 50% em apenas 10 min. Enquanto que em temperatura ambiente a mesma diminuição da atividade é obtida em 60 min. Foi mostrado que a inativação por baixa temperatura da $V H^+$ -ATPase resulta na dissociação do complexo V_1 periférico da membrana (Moriyama & Nelson, 1989).

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

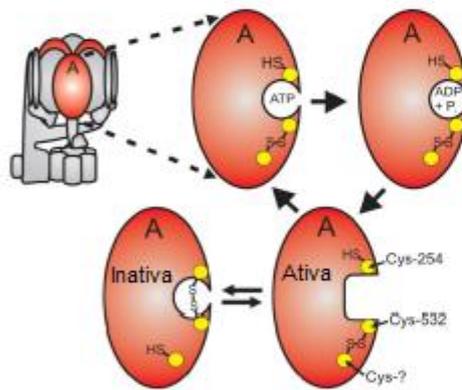
Altas concentrações de ATP causam diminuição no acoplamento funcional entre o transporte de H^+ e a hidrólise de ATP pela $V H^+$ -ATPase, onde a hidrólise do ATP continua a aumentar mas o transporte de H^+ chega ao platô e começa a diminuir (Arai *et al.*, 1989).

A proteólise também causa diminuição no acoplamento, uma vez que o tratamento com baixas concentrações de tripsina promove uma perda na atividade de transporte de H^+ , mesmo apresentando 50% da hidrólise de ATP (Adachi *et al.*, 1990).

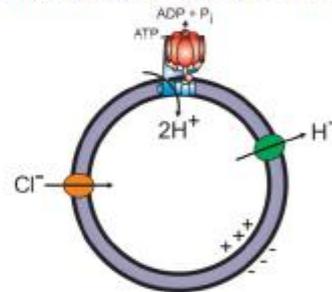
A Dissociação reversível



B Formação de ligações dissulfeto



C Mudança na condutância



D Mudança no acoplamento

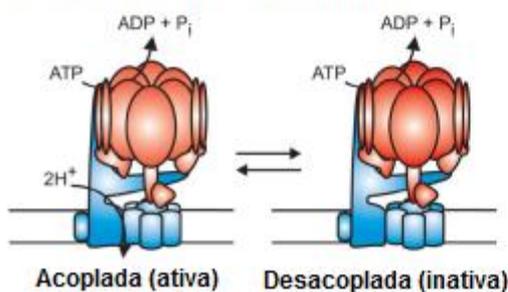


Figura 5 – Mecanismos de regulação das $V H^+$ -ATPases. (A) dissociação reversível da enzima promovida pela glicose extracelular, após o esgotamento da glicose, o complexo V_1 se dissocia do complexo V_0 . (B) a formação de ligações dissulfeto reversíveis entre os resíduos Cys-254 e Cys-532 da subunidade A bloqueia o sítio catalítico em uma conformação que é incapaz de hidrolisar ATP. (C) alterações no potencial de membrana. (D) mudança na eficiência de acoplamento da bomba. (Fonte - Kevin *et al.*, 2008 com modificações)

2.3.4 Inibidores de V H⁺-ATPases

Os inibidores mais estudados das V H⁺-ATPases identificados até agora são os antibióticos Bafilomicina A₁ (Bowman & Bowman, 1988) e Concanamicina A (Dröse *et al.*, 1993).

A Bafilomicina foi o primeiro inibidor específico de V H⁺-ATPase identificado (Bowman *et al.*, 1988), alguns autores afirmam que a Bafilomicina A₁ se liga ao setor V_o da V H⁺-ATPase. Zhang *et al.* (1994) sugerem que a Bafilomicina A₁ impede a atividade do transporte de prótons, ligando-se a subunidade “a” (100 KDa). Contudo, Bowman e Bowman (2002) mostraram que o local de ligação da Bafilomicina A₁ ao setor V_o é na subunidade “c” (16 KDa).

A bafilomicina A₁ inibe a atividade da V H⁺-ATPase de diferentes organismos em concentrações muito baixas (nanomolares). A atividade da P H⁺-ATPase também pode ser inibida por este antibiótico em concentrações mil vezes maiores (Bowman & Bowman., 1988).

A concanamicina A, outro inibidor das V H⁺-ATPases, é mais efetivo que a Bafilomicina A₁. A concentração ótima para inibição da V H⁺-ATPase está em torno de um décimo da concentração de Bafilomicina A₁ (Dröse & Altendorf, 1996; Matsuoka *et al.*, 1997). Em células vegetais a inibição ótima de V H⁺-ATPase por Concanamicina A é obtida com concentrações em torno de 1 nM (Dröse & Altendorf, 1996; Matsuoka *et al.*, 1997).

O ânion caotrópico nitrato em altas concentrações, aproximadamente 100 mM em baixa temperatura (0 °C), libera cinco polipeptídeos do complexo catalítico V₁ inibindo as V H⁺-ATPases, podendo chegar a 70% de inibição nesses casos, contudo na maior parte das condições a inibição é reversível, ou seja depois da retirada do agente a maior parte da atividade da enzima é restaurada (Moriyama & Nelson, 1989a).

2.3.4.1 NH₄ e a Regulação do pH intracelular

As bombas protônicas V H⁺-ATPase e P H⁺-ATPase são ativadas pela glicose extracelular, mas o sinal de sua ativação não é conhecido. Acredita-se que o aumento da concentração de H⁺ no citosol durante a glicólise é o sinal primário da ativação das bombas de H⁺. Sabe-se que a glicólise gera dois íons hidrogênio para cada molécula de glicose consumida (Figura 6).

Os sais amônio exibem propriedades ácidas fracas, assim em pH básico ocorre a dissociação de $\text{NH}_4\text{Cl} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{Cl}^- + \text{H}^+$. Com a entrada de NH_3 no citosol, o NH_3 se liga ao H^+ formando assim NH_4^+ com isso ocorre a diminuição da acidificação do citosol, causada pelo metabolismo de glicose. Dessa forma pode ser prognosticada a prevenção da ativação das H^+ -ATPases (figura 6) considerando as duas possíveis razões: o aumento da concentração de H^+ (substrato da enzima) e aumento do gradiente de H^+ ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) através da membrana plasmática.

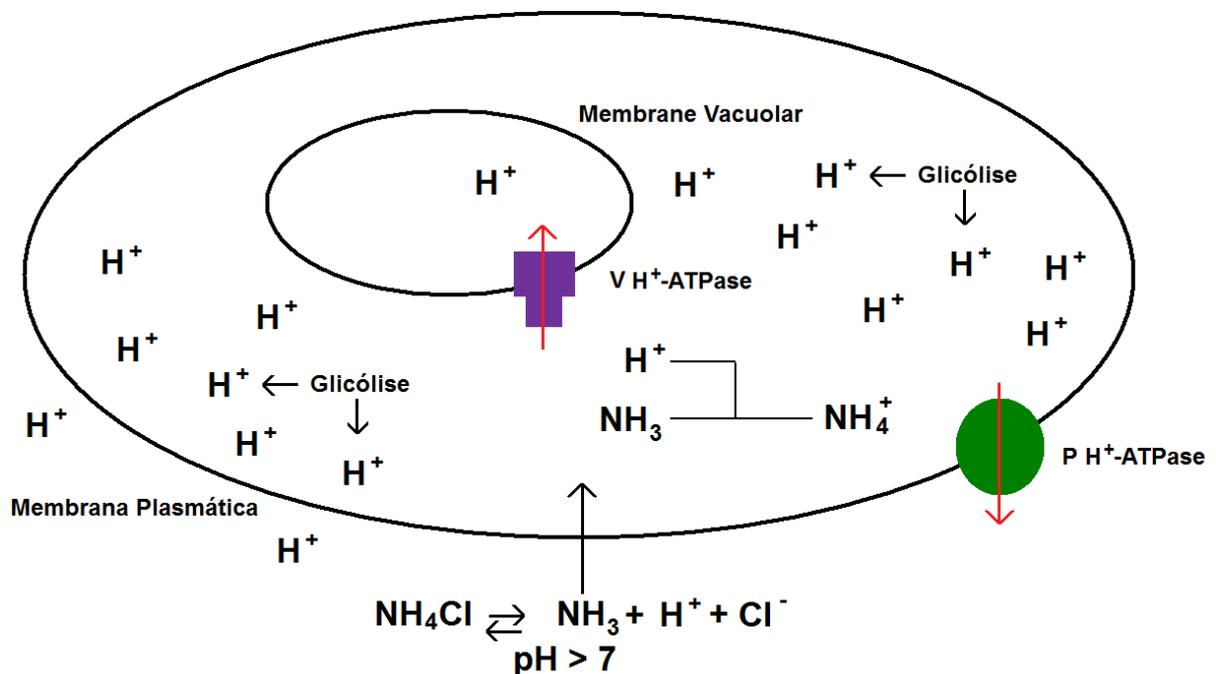


Figura 6- Modulação do pH citosólico. Aumento da quantidade de H^+ provenientes da glicólise. Dissociação do cloreto de amônio, e difusão do NH_3 através da membrana plasmática, posterior ligação do NH_3 a prótons do citosol promovendo o aumento do pH citosólico.

O modelo de dissociação/reassociação dos complexos V_1 e V_0 , assume que as moléculas de enzima ativadas e não ativadas, possuem as mesmas propriedades, ou seja, idêntica sensibilidade aos inibidores, idêntica afinidade ao ATP e acoplamento idênticos entre o transporte H^+ e a hidrólise de ATP. Para testar essas previsões, realizamos vários tipos de experimentos. Comparamos o efeito de diferentes concentrações de nitrato e de ATP sobre a atividade hidrolítica e o

transporte de H^+ nos dois estados da enzima, ativada e não ativada. Comparamos também o efeito de diferentes inibidores sobre a enzima ativada e não ativada.

Outra hipótese de trabalho é que o gradiente de H^+ pode alterar a ativação da $V H^+$ -ATPase e esse conhecimento pode contribuir para o entendimento sobre a sinalização envolvida na ativação da bomba, para isso analisamos o efeito do FCCP e do NH_4Cl sobre a ativação da V e $P H^+$ -ATPase.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

1. Verificar se a regulação da $V H^+$ -ATPase de levedura pela glicose extracelular precisa da dissociação/reassociação dos complexos V_1 e V_0 na ausência/presença de glicose ou se a modulação da atividade enzimática pode ser explicada pela mudança reversível da conformação do complexo V_1 permanentemente ligado com o complexo membranar V_0 .

2. Estudar a importância da energização de membranas pelo gradiente protônico para ativação de $V H^+$ -ATPase e $P H^+$ -ATPase pela glicose extracelular.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se as diferentes concentrações KNO_3 inibem igualmente a hidrólise de ATP e a formação do gradiente protônico pela $V H^+$ -ATPase ativada e não ativada em membranas totais como foi previsto pelo modelo atual da regulação da enzima.
- Verificar o efeito de diferentes concentrações de KNO_3 sobre a atividade hidrolítica e a formação do gradiente protônico pela $V H^+$ -ATPase ativada e não ativada em membranas do Golgi, vacúolo, RE e membranas do envelope nuclear, separadas em gradiente de densidade de sacarose.
- Determinar as propriedades cinéticas da enzima ativada e não ativada para revelar se ela muda somente a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) ou se muda a afinidade ao ATP para hidrólise de ATP e o transporte de H^+ e se ela varia também o acoplamento entre esses dois processos.
- Revelar se a enzima ativada e não ativada pela glicose extracelular muda igualmente a imunoreatividade a anticorpos monoclonais contra as subunidades "A" e "B" como foi previsto pelo modelo atual da sua regulação ou essa mudança é assimétrica.
- Comparar o efeito dos inibidores da $V H^+$ -ATPase, NO_3 e concanamina A, sobre a atividade hidrolítica dessa enzima ativada e não ativada pela glicose extracelular.

- Estudar as consequências do colapso do gradiente de H^+ através da membrana plasmática pelo protonóforo FCCP ou NH_4Cl sobre a capacidade de prevenir a ativação de V H^+ -ATPase e P H^+ -ATPase pela glicose extracelular.
- Comparar a imunoreatividade a anticorpos monoclonais contra as subunidades “A” e “B” da enzima ativada, não ativada pela glicose extracelular e “ativada” na presença de FCCP e glicose ou NH_4Cl e glicose.

4. MATERIAIS & MÉTODOS

4.1. Cepa de levedura

A cepa selvagem X-2180 (genótipo: MATa, gal2, mal, mal) da levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada nesse trabalho. A cepa foi gentilmente doada pelo Prof. Ludwig Lehle (Regensburg, Alemanha).

4.2. Meio de cultura e manutenção da cepa

O meio de cultura utilizado foi o YEPD (*y*east *e*xtract *p*eptone *d*extrose) contendo: 1% de extrato de levedura (Difco ou Oxoid); 2% de glicose (Vetec); 2% de bactopectona (Difco ou Oxoid).

O meio YEPD sólido contém adicionalmente 2% de ágar (Vetec). Os meios foram autoclavados a 0,5 atm (marcados no manômetro), 110 °C por 30 min. O meio sólido foi vazado em placas de Petri estéreis e levado a estufa a 37°C durante 24 horas para a realização do controle de esterilidade. Após este procedimento, algumas colônias de *S. cerevisiae* (X-2180) foram retiradas do meio sólido de estocagem (YEPD) com o auxílio de uma alça bacteriológica e semeadas em um novo meio YEPD sólido.

4.3. Cultura de células

Algumas colônias de levedura foram retiradas do meio sólido YEPD e colocadas em 40 mL do meio YEPD líquido, de forma que a densidade ótica (DO) inicial do pré-inóculo ficasse em torno de 0,1. O comprimento de onda (λ) utilizado foi de 600 nm. As células cresceram a 30°C sob agitação constante de 250 rpm até a fase estacionária, aproximadamente por 24 horas.

4.4. Preparo da levedura para o isolamento

O volume do pré-inóculo a ser adicionado em 200 mL do meio YEPD (erlenmeyers de 1000) foi calculado, considerando o tempo de geração da cepa X-2180 (2h), baseado na com a curva de crescimento. Após a adição de uma alíquota do pré-inóculo em meio YEPD líquido, as células foram incubada a 30 °C sob agitação de 250 rpm até que a cultura atingisse o meio da fase logarítmica. Após o

crescimento celular, foi realizado o isolamento das vesículas de membranas de *S. cerevisiae*.

4.5. Isolamento de membranas e fracionamento subcelular

O isolamento foi realizado de acordo com o método descrito por Okorokov & Lehle (1998), com modificações. Todos os procedimentos foram realizados no gelo. Soluções, tubos, rotores e centrífugas foram previamente resfriados.

4.5.1. Obtenção dos esferoplastos

A suspensão celular foi centrifugada a 4000 x g por 6 min a 4 °C. Em seguida foi feito o descarte do meio e determinado o peso úmido das células. Para cada 1 g de peso úmido de células foi adicionado 5 mL de tampão de esferoplastos (Sorbitol 1,2 M, Tris 10 mM, pH 7,4), 1 mg do complexo de enzimas líticas (liticase) e 12 µL β-mercaptoetanol (concentração final 30 mM). Essa suspensão celular em tampão de esferoplastos foi incubada a 37 °C sob fraca agitação.

O monitoramento cinético da hidrólise da parede celular foi realizado espectrofotometricamente ($\lambda=600$ nm) misturando 10 µL dessa suspensão celular em 990 µL H₂O. Esse monitoramento foi realizado a cada 5 ou 10 min a partir do tempo 0 (zero) de incubação até o tempo máximo de 50 min ou até que a absorbância chegasse ao valor entre 20 a 10% do valor inicial.

O tubo contendo a suspensão de esferoplastos foi transferido para o gelo e a reação de hidrólise da parede celular foi parada pela adição do tampão de parada ("*stop solution*") nas concentrações finais de 10 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 1 mM de EDTA (solução estoque 20 vezes concentrado: Sorbitol 1,2 M, Tris-HCl 200 mM pH 7,4, EDTA 20 mM). Além da solução de parada, foram adicionados inibidores de proteases: benzamidina (concentração final 1 mM) e PMSF (concentração final 1 mM).

A suspensão de esferoplastos foi adicionada sobre uma solução colchão ("*cushion solution*") (Sorbitol 1,4M, Tris-HCl 50 mM pH 7,4) na proporção de 1:2, no tubo de centrífuga. Isto foi feito com o auxílio de uma pipeta, devagar e inclinadamente, evitando a mistura da suspensão de esferoplastos com a solução

colchão. Esse material foi centrifugado a 4000 x g por 6 min a 4°C. Esse passo do procedimento foi realizado com o objetivo de eliminar os resíduos de enzimas líticas.

O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as paredes dos tubos foram secas com papel filtro para evitar que possíveis enzimas líticas atuem nos esferoplastos.

4.5.2. Pré-incubação dos esferoplastos com glicose

Os esferoplastos foram incubados a 30 °C por 10 min com 20 mL de solução de incubação com glicose (glicose 100 mM, sorbitol 1,2 M, MgSO₄ 3 mM, KH₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,2). Uma amostra controle de esferoplastos (sem glicose) também foi incubada sob as mesmas condições em um tampão sem glicose (sorbitol 1,2 M, MgSO₄ 3 mM, KH₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,2). Centrifugou-se a 4000 x g por 6 min a 4 °C.

4.5.3. Obtenção de membranas totais

Os sedimentos obtidos das duas versões (com e sem glicose) foram ressuspensos em 20 mL de tampão de lise (sacarose 12,5% MOPS-KOH 20 mM pH 7,6), DTT 1 mM, 1 µg/mL, coquetel de inibidores de proteases (solução estoque do coquetel de inibidores de proteases é composto de quimiostatina, pepstatina, antipaina, leupeptina e aprotinina na concentração de 1 mg/mL cada um), benzamidina 1 mM e PMSF 1 mM.

A ressuspensão foi homogeneizada, em homogeneizador de vidro com pistilo de teflon (*potter*), com 21 ciclos completos (*strokes*). O homogeneizado foi centrifugado a 4000 x g por 6 min a 4 °C.

O sedimento foi desprezado e o sobrenadante (suspensão de membranas totais) foi transferido para o tubo da ultracentífuga e centrifugada a 45000 x g por 45 min a 4 °C.

4.5.4. Obtenção de membranas intracelulares fracionadas em gradiente de densidade de sacarose

O sedimento (membranas totais) foi ressuspenso em, aproximadamente, 1,5 mL de solução de resuspensão (10 mL do tampão de lise, 1,17g de glicerol, 10 µL de

coquetel de inibidores de proteases a 1 mg/mL, 25 μ L benzamidina a 200 mM, 25 μ L PMSF a 200 mM e 4 μ L DTT a 500 mM). Esse volume foi adicionado gradativamente, geralmente de 300 em 300 μ L misturando bem, até que o volume final determinado fosse atingido. A ressuspensão de membranas totais foi colocada no homogeneizador de vidro com o pistilo de teflon (“*potter*”) e homogeneizada com 7 ciclos completos (“*strokes*”).

Foram adicionados 1,2 mL de ressuspensão de membranas totais sobre um gradiente descontínuo e simplificado de densidade de sacarose com as concentrações de 25, 38 e 50%. Cada concentração de sacarose foi preparada peso/peso (p/p) em tampão MOPS-NaOH 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7,2 e complementadas com glicerol a fim de que todas as bandas formadas por diferentes concentrações de sacarose tivessem a mesma miliosmolaridade que a mais concentrada (50%). Com essas concentrações de sacarose foram obtidas bandas enriquecidas com vesículas equivalentes ao vacúolo (25%), Golgi (38%), RE/MP (50%) e sedimento (membranas mais densa que RE, provavelmente RE/EN/MP). O sedimento foi ressuspensão em sacarose 50%. O gradiente foi centrifugado a 140.000 x g por 2 horas e 45 minutos a 4 °C. O volume de membranas totais restante foi alíquotado em tubos cônicos de 1,5 mL, congelado em nitrogênio líquido e armazenado no freezer a -70 °C até o momento da análise.

As vesículas de membranas separadas em gradiente descontínuo e simplificado de densidade de sacarose foram fracionadas com o auxílio de uma pipeta, coletando apenas as bandas enriquecidas com as membranas citadas anteriormente. Após a distribuição das bandas em tubos cônicos de 1,5 mL, as frações de vesículas de membranas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no freezer a -70 °C até o momento da análise.

4.6. Determinação da formação do Δ pH (transporte de H^+)

A determinação do Δ pH foi realizada baseando-se no protocolo descrito por Okorokov & Lichko (1983). Registrou-se a formação do Δ pH através das membranas das organelas da via secretória, a partir do transporte de H^+ realizado pela $V H^+$ -ATPases ou $P H^+$ -ATPases.

Para tal, foi utilizado tampão de incubação contendo KCl 20 mM, MgSO₄ 2,5 mM, solução de MOPS-KOH (sacarose 12,5 %, MOPS-KOH 20 mM, pH 7,4) em quantidade suficiente para complementar 2,0 mL de volume final, 3 µL de ACMA (estoque de 1 mM dissolvido em etanol) e a suspensão de vesículas de membranas com volume variando entre 10 a 30 µL, dependendo da atividade apresentada, de modo que a amplitude máxima ($F_{m\acute{a}x}$) não ultrapasse o valor de 50%.

Após três minutos de incubação a 30°C (ou o tempo necessário para estabilização da fluorescência), acrescentou-se 1 mM de ATP pH 7,2. Após um tempo aproximado de 600 seg (ou o suficiente para atingir o equilíbrio entre reação), usou-se 50 mM de NH₄Cl para desfazer o gradiente protônico estabelecido. A fluorescência da cinética enzimática foi medida no espectrofluorímetro em um λ de excitação em 415 nm e de emissão em 485 nm, com abertura de 5 nm/10 nm. Utilizamos a fórmula $V_0 = [F_0 / (F_{m\acute{a}x} * T)] * 100$ (Figura 7), onde:

V_0 : velocidade inicial de formação do Δ pH;

F_0 : Fluorescência dependente de V_0 , num tempo "T", determinada pela extrapolação de uma reta tangente à maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

$F_{m\acute{a}x}$: fluorescência máxima (total);

T: tempo em minutos;

$$\Delta F_{m\acute{a}x} = F_{eq} / F_{m\acute{a}x} * 100;$$

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

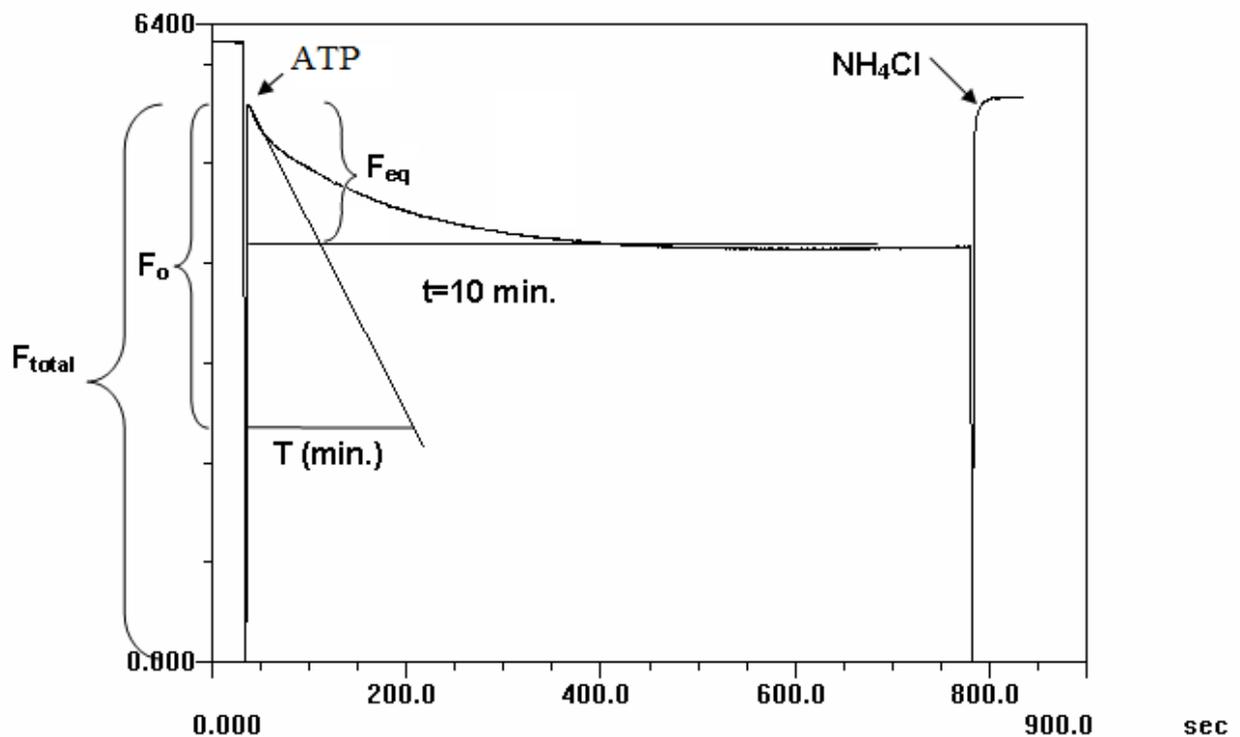


Figura 7. Determinação de velocidade inicial e amplitude máxima do transporte de H⁺ por membranas de *S. cerevisiae*, cepa X-2180. Velocidade inicial ($V_0=[F_0/(F_{total} \cdot T)] \cdot 100$); Amplitude máxima ($\Delta F_{m\acute{a}x}=(F_{eq}/F_{total}) \cdot 100$).

4.7. Determinação do conteúdo de proteína

O conteúdo de proteína foi dosado baseando-se no método descrito por Bradford (1976). Transferem-se 28 mg de comassie brilliant blue G 90% para um becker, devidamente envolvido com papel alumínio a fim de evitar a entrada de luz, contendo 12 mL de etanol absoluto. Deixa-se sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente (25-30 °C). Foram adicionados 25 mL de ácido ortofosfórico (85%) e, após homogeneização, completa-se o volume para 250 mL com água destilada em balão volumétrico. Filtra-se a solução em papel de filtro por três vezes. Armazena-se em um vidro âmbar.

Para determinação da curva padrão foi utilizada uma solução de albumina de soro bovino contendo 1 mg/mL, armazenada em freezer ou congelador. Alíquotas de 2 µL a 20 µL da solução de albumina 1mg/mL foram colocadas em tubos de ensaio e o volume foi completado com água destilada para 100 µL. Adiciona-se 1 mL da

solução de Bradford, em intervalos de 30 em 30 seg. Aguarda-se exatamente 10 min, à temperatura ambiente e procede-se as leituras em espectrofotômetro ($\lambda=595$ nm) obedecendo ao mesmo intervalo utilizado anteriormente.

Determina-se o conteúdo de proteína utilizando-se entre 5 e 15 μL de suspensão de membranas, completando-se o volume para 100 μL com água destilada e adicionando-se 1 mL da solução de Bradford em intervalos de 30 seg. Aguardam-se 10 min. à temperatura ambiente e procede-se as leituras em espectrofotômetro obedecendo ao mesmo intervalo de tempo utilizado anteriormente. Para os valores do conteúdo de proteína que ficaram fora da faixa de linearidade, ou seja, nas extremidades da curva padrão, os seguintes procedimentos serão realizados: (1) o conteúdo de membranas foi aumentado ou (2) as membranas foram diluídas em água destilada, a fim de que essas leituras estivessem preferencialmente entre os valores médios na curva padrão.

4.8. Determinação da hidrólise de ATP

A atividade ATPásica foi medida pelo aumento da quantidade de fosfato inorgânico (P_i) resultante da hidrólise de ATP.

O preparo dos ensaios de hidrólise de ATP (ATPase total) foi feito sob refrigeração (gelo). Nos tubos de ensaio foram colocados 10 μL de suspensão de vesículas de membranas e 230 μL do tampão de hidrólise (MES-KOH 30 mM, MgSO_4 3,75 mM, molibdato de amônio 262 μM pH 6,5 – para obter as concentrações finais de MES 23 mM, MgSO_4 2,1 mM e molibdato de amônio 192 μM), 10 μL de ATP-NaOH 50 mM pH 7,2 (ATP 1,62 mM concentração final) e 50 μL de água destilada necessária para completar 300 μL . O meio de reação foi incubado a 30 °C por 30 min. Após o tempo de incubação, os tubos foram colocados no gelo novamente, completou-se o volume da reação de hidrólise para 1 mL com água destilada gelada, a fim de parar a reação. Foram adicionados 2 mL da solução C (mistura 100:1 da solução A e a solução B), que deve ser preparada próximo à adição desta na reação. A solução A é composta por 0,5% molibdato de amônio, 0,5% SDS, 2% H_2SO_4 . A solução é composta por 10% ácido ascórbico. A solução foi incubada por 10 min, em banho-maria a 30 °C, seguida imediatamente da leitura da absorbância no espectrofotômetro ($\lambda=750$ nm).

4.9. Solubilização da V H⁺-ATPase para realização de imuno reatividade

A fim de se obter quantidade suficiente de membrana para realizar a solubilização da V H⁺-ATPase a partir de membranas isoladas do vacúolo e do Golgi foram realizados seis isolamentos de membranas com fracionamento subcelular (conforme descrito anteriormente). As membranas do vacúolo e do Golgi foram reunidas em tubos da ultracentrífuga e o volume foi completado com tampão (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, glicerol 10%, pH 7,5). Essas membranas foram então centrifugadas a 140.000 x g por 30 min a 0°C. Após essa centrifugação os sedimentados foram ressuspensos em tampão (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, glicerol 10%, pH 7,5, 10 µL de coquetel de inibidores de proteases a 1 mg/mL, 0,5mM de benzamidina, 0,5mM de PMSF, 0,2mM de DTT e 1% do detergente C¹²E⁹) e incubados no gelo por 60 min. Foram colocados 1 mL da ressuspensão de organelas sobre um gradiente descontínuo de densidade de glicerol com as concentrações de 25, 33, 36, 39, 45, 47 e 50% (cada concentração de glicerol foi preparada (p/p) em tampão Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,5).

O gradiente foi centrifugado a 165.000 x g por 14 horas a 0°C. Após a centrifugação, o material foi coletado com a ajuda de um capilar acoplado a uma bomba peristáltica e acondicionado em tubos cônicos, sendo colocado, aproximadamente, 700 µL do material em cada tubo. Em seguida o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado no freezer a -70 °C até o momento da análise.

4.10. Eletroforese (SDS-page) e imunoensaio (western blotting)

Utilizamos gel de SDS-page de acordo com Lichko & Okorokov (1984) para determinar o conteúdo de proteína pela coloração com comassie blue e para avaliação do conteúdo de subunidades da V H⁺-ATPase, do complexo catalítico da enzima: subunidades A e B (do complexo V₁). Para quantificar a imuno reatividade dos anticorpos específicos para essas subunidades foi usado o método descrito por Retamal (1999).

4.11. Cinética Enzimática

Os cálculos das análises cinéticas foram realizados a partir da construção da equação de Lineweaver-Burk, parcialmente descrita abaixo.

Em concentrações relativamente baixas de substrato, a V_0 aumenta quase linearmente com o aumento do substrato. Em altas concentrações de substrato, V_0 aumenta em pequenas quantidades em resposta ao aumento do substrato. Finalmente, é atingido um ponto além do qual um aumento em V_0 é insignificamente pequeno com o aumento do substrato. Esta região de V_0 tipo platô está próxima à velocidade máxima, $V_{m\acute{a}x}$ (Figura 8 - David & Michael, 2011).

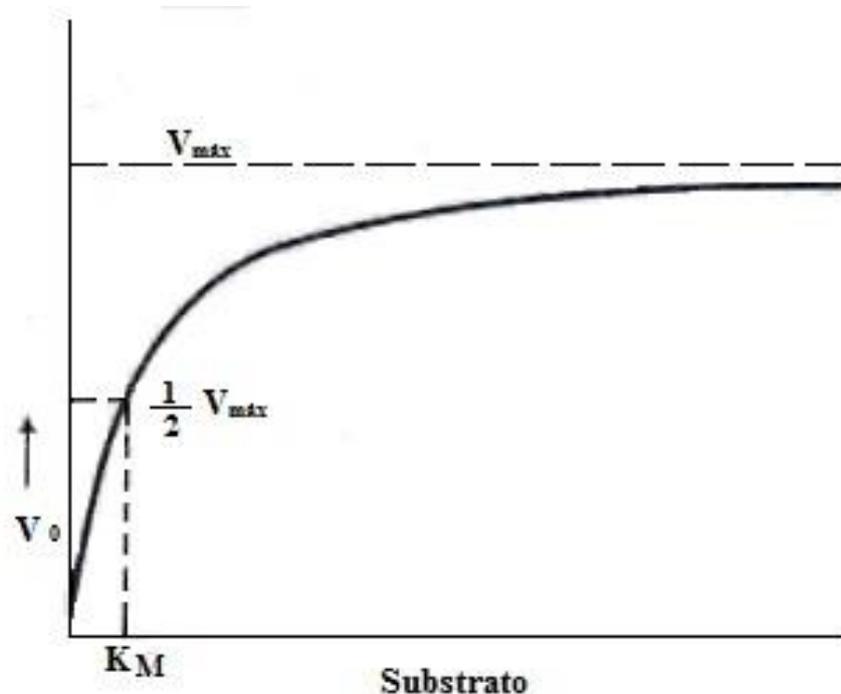


Figura 8. Modelo de cinética enzimática, a velocidade máxima, $V_{m\acute{a}x}$, é extrapolada. A concentração de substrato no qual a V_0 é metade da $V_{m\acute{a}x}$ é referente ao valor do K_m (constante de Michaelis). Adaptado de David & Michael, 2011.

A curva que expressa a relação entre a concentração de substrato ($[S]$) e V_0 tem a mesma forma geral apresentada para a maioria das enzimas, e pode ser expressa algebricamente pela equação de Michaelis-Menten.

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

A equação de Michaelis-Menten pode ser transformada em equações mais úteis para fazer gráficos com dados experimentais. Uma transformação comumente usada é derivada tomando as recíprocas dos dois lados da equação.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{m\acute{a}x} [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Essa forma de equação é denominada de equação de Lineweaver-Burk. No caso de enzimas que obedecem a relação de Michaelis-Menten, um gráfico de $1/V_0$ por $1/[S]$ produz uma linha reta. A representação duplo-recíproca tem a vantagem de permitir uma determinação mais acurada de $V_{m\acute{a}x}$, a qual só pode ser obtida aproximadamente nos gráficos simples de V_0 em relação ao substrato (Figura 9 - David & Michael, 2011).

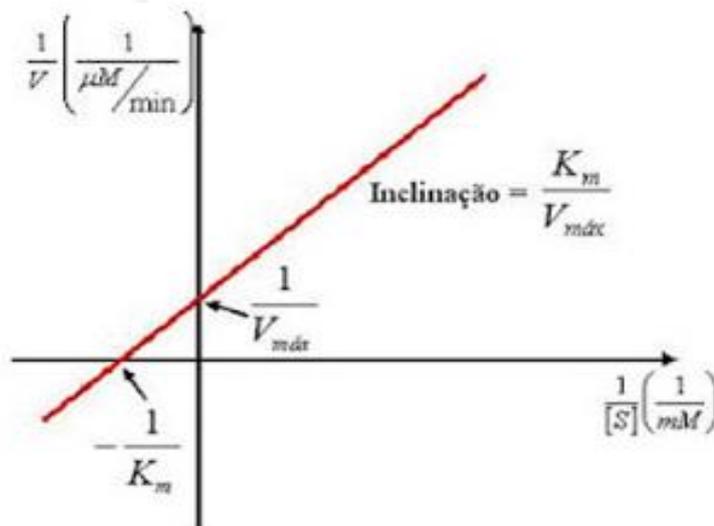


Figura 9. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. Adaptado de David & Michael, 2011.

4.12. Determinação de GDPase (enzima marcadora de membranas do Golgi)

A atividade GDPásica foi detectada pelo aumento da quantidade de fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise de GDP, seguindo o método descrito por Albeijon *et al.* (1989). A preparação para determinação de GDPase foi feita no gelo,

colocando-se 10 μL de imidazol 200 mM pH 7,4; 10 μL de triton X-100 1%; 2 μL CaCl_2 100 mM; 10 μL GDP 70 mM; 58 μL de água destilada; 10 μL de suspensão de membranas. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min. Após esse tempo, as amostras retornaram ao gelo e foram adicionados 10 μL de SDS 5% a fim de paralisar a reação e 880 μL de água destilada gelada. Após a adição de água foram adicionados 2 mL da solução C (adicionados com intervalo de 30 seg de um tubo de reação para outro). Cada reação foi incubada por 10 min a 30°C e submetida imediatamente à leitura de sua absorvância ($\lambda=750$ nm).

4.13. Determinação de NADPH óxido-redutase (enzima marcadora do RE)

A atividade da NADPH citocromo c óxido-redutase foi determinada segundo o método de Feldman *et al.* (1987). A determinação foi feita diretamente na cubeta com 900 μL da solução de citocromo c KCN (sorbitol 0,6 M; KH_2PO_4 50 mM, KCN 400 μM , citocromo c 1 mg/mL, pH 7,4) pré-aquecida a 30°C, 100 μL da solução de NADP-H (sorbitol 0,6 M; KH_2PO_4 50 mM, NADPH 1 mM, pH 7,4) e 30 μL de frações de vesículas de membranas separadas em gradiente de sacarose. O tempo da reação foi iniciado quando as frações de vesículas de membranas foram adicionadas na solução e a cubeta foi invertida aproximadamente 3 vezes (para misturar os componentes da reação). A primeira leitura cinética foi feita no tempo de 10 segundos após a introdução das vesículas de membranas. As leituras da absorvância foram feitas no comprimento de onda de 550 nm com intervalos de 5 segundos até completar o tempo de 180 segundos.

As absorvâncias registradas sob comprimento de onda de 550 nm foram tratadas da seguinte forma: (1) cada DO encontrada entre os intervalos de 5 segundos foi colocada no papel milimetrado; (2) apenas os pontos lineares da curva foram considerados válidos (geralmente os primeiros pontos); (3) foi traçada uma reta de tendência, que foi utilizada para o cálculo da atividade; (4) foi encontrado o Δs (a diferença entre o ponto inicial e o ponto final na reta de tendência) para o tempo de 1 minuto; (5) a velocidade enzimática foi determinada pela razão do Δs e o t (1 minuto). A unidade da velocidade enzimática desta enzima foi especificada como unidades relativas/minuto.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do KNO_3 sobre a atividade hidrolítica das V H^+ -ATPases

A V H^+ -ATPase pode ser inativada, pelo nitrato e outros anions caotrópicos na presença de Mg^{2+} e ATP em baixa temperatura (Moriyama & Nelson, 1989a). O nitrato é um reagente caotrópico que desestabiliza a estrutura enzimática, causando a dissociação de algumas subunidades do complexo V_1 (subunidade A catalítica e subunidade B regulatória), nestas condições a enzima perde as atividades ATPásicas e de transporte de H^+ . A dependência desta inibição pela baixa temperatura ("cold inactivation") foi achada com membranas isoladas de células animais (Moriyama & Nelson, 1989a).

Para verificar se a V H^+ -ATPase pode ser inativada pelo KNO_3 a $0\text{ }^\circ\text{C}$, foi analisado a hidrólise de ATP em membranas totais incubadas ou não com glicose usando $1,7\text{ mM}$ de ATP (figura 10 A) e usando 5 mM de ATP (figura 10 B), variando a concentração de KNO_3 . Foi analisado também o efeito do KNO_3 sem pré-incubação no gelo nas mesmas condições, a fim de compararmos o efeito do KNO_3 a $0\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 10 C).

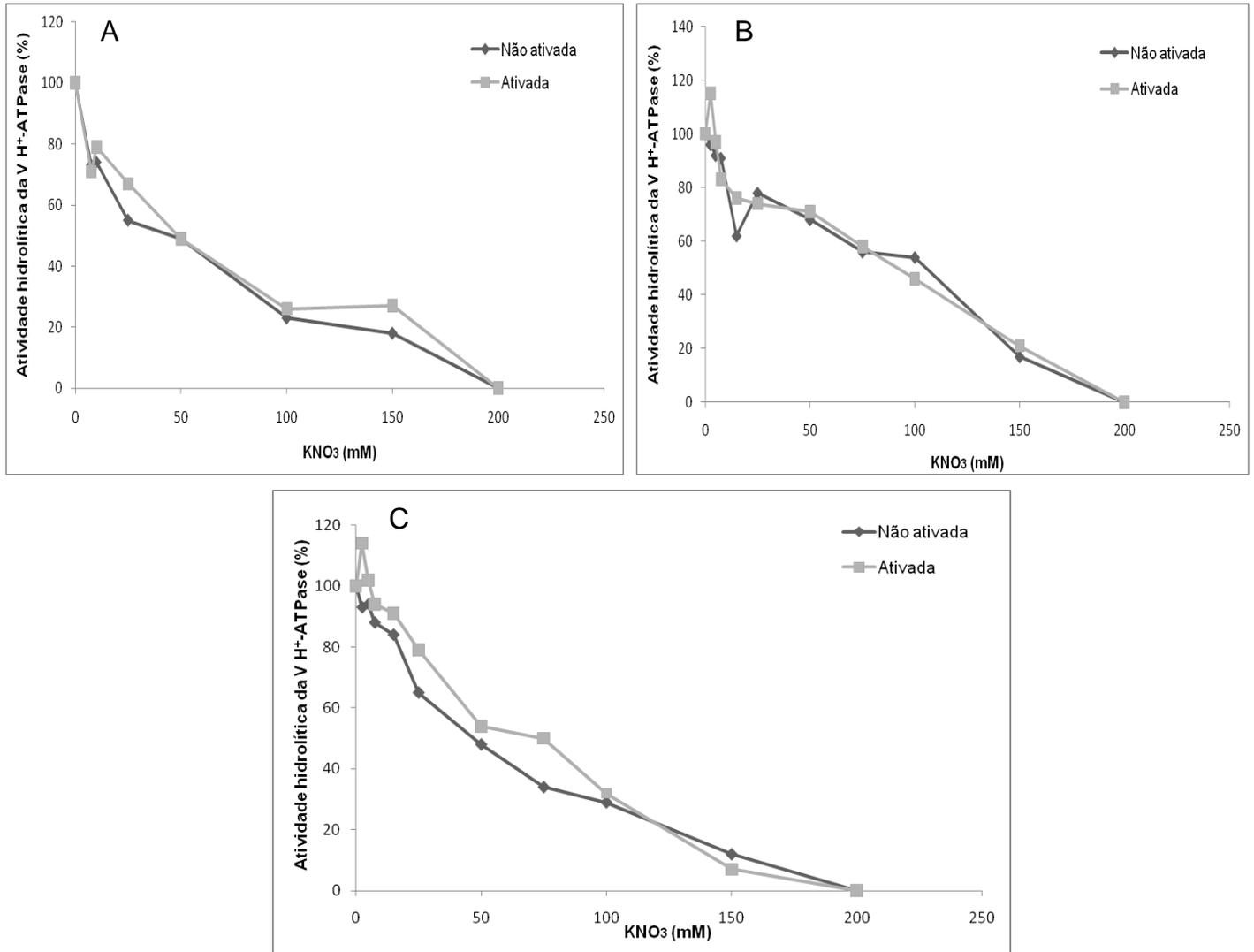


Figura 10. (A) Hidrólise de ATP pela V H⁺-ATPase de membranas totais (MT) pré-incubadas a 0°C por 30 min. 1,7mM de ATP. na presença do tampão de incubação, contendo 4,25mM de Mg²⁺, 50mM de KCl e ATP (foi usado 1,7 mM de ATP), a hidrólise foi feita incubando 30 min. a 30 °C). A ativação para transporte de H⁺ foi: V₀=4,4x, F_{máx}=7x e ATPase=2,6x; 100% da atividade de V H⁺-ATPase correspondem a atividade inibida por 200mM de KNO₃ que não ativada = 2,54 μmol de Pi/mg de proteína x min. e ativada = 7,84 μmol de Pi/mg de proteína x min.. **B) Hidrólise de ATP pela V H⁺-ATPase de membranas totais (MT) pré-incubadas a 0 °C por 30 min. 5mM de ATP.** na presença do tampão de incubação, contendo 12,5mM de Mg²⁺, 50mM de KCl e ATP (foi usado 5 mM de ATP, a hidrólise foi feita incubando 30 min. a 30 °C). A ativação para transporte de H⁺ foi: V₀=2,2x, F_{máx}=1,6x e ATPase=1,1x; 100% da atividade de V H⁺-ATPase correspondem a atividade inibida por 200mM de KNO₃ que não ativada = 15,15 μmol de Pi/mg de proteína x min. e ativada = 16,55 μmol de Pi/mg de proteína x min.. **(C) Hidrólise de ATP pela V H⁺-ATPase de membranas totais (MT) sem pré-incubação no gelo 5mM de ATP.** Foram usados 12,5mM de Mg²⁺, 50mM de KCl (foram usados 5 mM de ATP, a hidrólise foi feita incubando 30 min. a 30 °C). A ativação foi: V₀=2,2x, F_{máx}=1,6x e

Verificamos que tanto em membranas ativadas com glicose (membranas isoladas de esferoplastos pré-incubados na presença de glicose) como em não ativadas (membranas isoladas de esferoplastos pré-incubados na ausência de glicose), a hidrólise de ATP diminuiu de acordo com o aumento da concentração de KNO_3 e a inibição de 50% foi obtida com aproximadamente 50 mM de KNO_3 para as duas versões (Figura 10 A). Os dados mostram que não ocorreu diferença entre a enzima ativada e não ativada pela glicose extracelular, o que pode significar que a integridade da estrutura da enzima que determina a atividade hidrolítica em ambos os estados, ativada e não ativada, é muito similar.

Na figura 10 B também não notamos diferença em relação ao efeito inibitório do KNO_3 sobre a enzima ativada ou não. A inibição de 50% da bomba foi obtida com aproximadamente 100 mM de KNO_3 para as ambas as versões. Mas com o aumento da concentração de ATP verificamos um aumento da atividade específica de bomba para hidrólise de ATP de 6 vezes na enzima não ativada e de 2,1 vezes na enzima ativada, acredito que esse menor aumento na enzima não ativada foi causado por uma diferença de afinidade ao ATP entre as duas formas da enzima

Na figura 10 C novamente não podemos notar diferença, em relação a inibição por KNO_3 entre as formas ativada e não ativada da enzima, sendo que a inibição de 50% foi obtida com aproximadamente 50 mM para cada estado da enzima. Imaginamos se a temperatura de 30°C, na qual realizamos a hidrólise, não teria um efeito “secundário” ativando proteases, o que causaria uma diminuição nessa atividade, mascarando assim o efeito do KNO_3 .

Nos experimentos seguintes o tempo da hidrólise foi alterado com o alvo de obtermos uma linearidade na hidrólise de ATP (Figura 11). A concentração de ATP foi diminuída para 1mM e a de Mg^{2+} para 2,5mM sendo essas concentrações iguais à utilizada nos experimentos de transporte de H^+ . A mudança desses dois parâmetros foi feita para podermos comparar melhor o efeito do KNO_3 no transporte com a hidrólise.

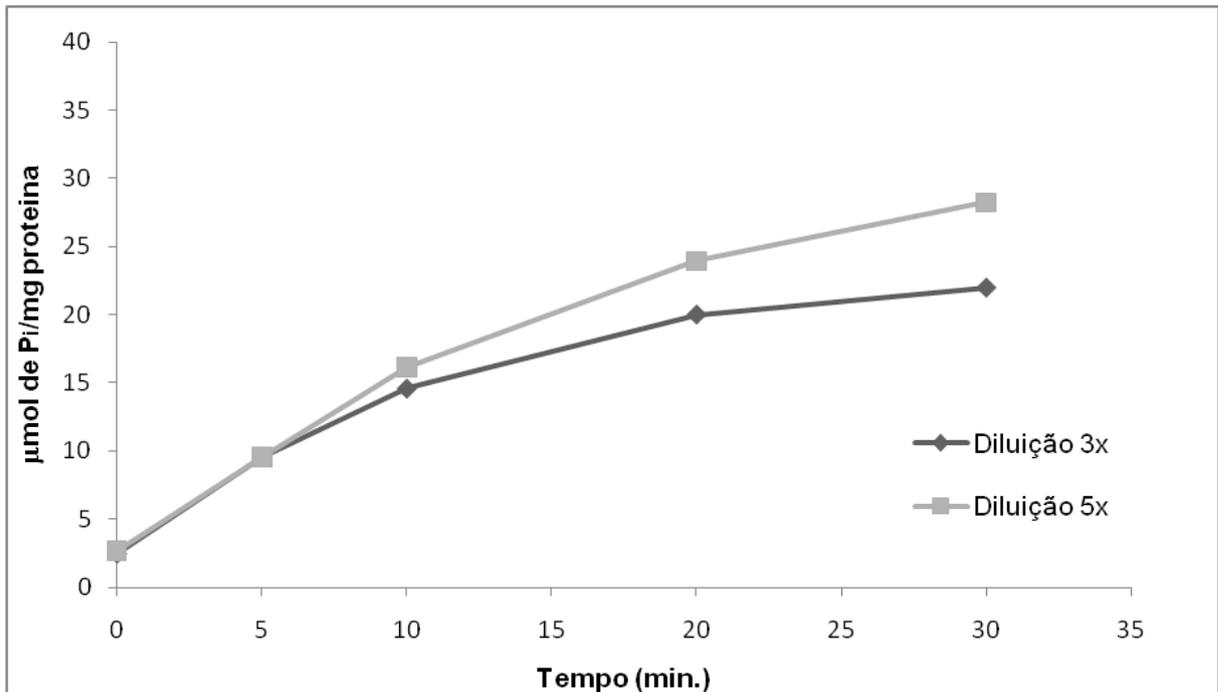


Figura 11. Determinação da linearidade da hidrólise de ATP em membranas totais (MT) com glicose. As MT foram diluídas 3x e 5x variando o tempo de hidrólise (incubação a 30 °C). A atividade hidrolítica é linear até os 10 min. de hidrólise.

Pode-se notar na figura 11 até os primeiros 10 minutos, há uma linearidade na hidrólise de ATP. Logo após esse tempo, aos 15 minutos começou a ocorrer a diminuição na hidrólise de ATP e entre os 20 e 30 minutos a hidrólise de ATP ficou mais próxima da saturação. Dessa forma, o protocolo foi mudado para permitir a comparação da velocidade inicial de transporte de H^+ com a hidrólise de ATP mais eficientemente.

Analizamos então a hidrólise de ATP em MT, sendo usado 1mM de ATP e 2,5mM de Mg^{2+} sem pré-incubação no gelo, e o tempo de hidrólise foi de 15 min. a 30 °C (Figura 12).

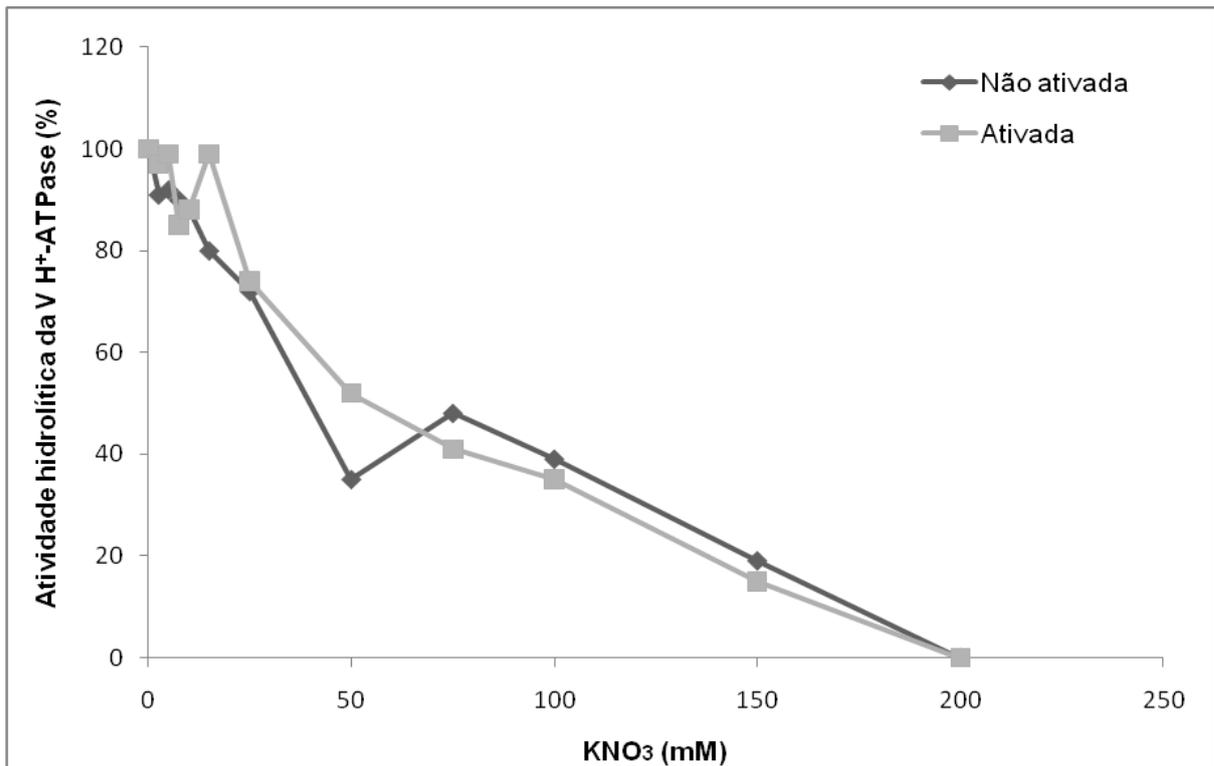


Figura 12. Hidrólise de ATP pela V H⁺-ATPase em membranas totais (MT), sem pré-incubação no gelo 1mM de ATP, média de dois experimentos. As MT, foram usados 2,5mM de Mg²⁺, 50mM de KCl (foi usado 1 mM de ATP, a hidrólise foi feita incubando 15 min. a 30 °C). Isolamento do dia 26/11/08, onde a ativação foi: V₀=2,8x, F_{máx}=2,4x e ATPase=1,9x; 100% da atividade de V H⁺-ATPase correspondem a atividade inibida por 200mM de KNO₃, que não ativada = 3,66 μmol de Pi/mg de proteína x min. e ativada = 7,3 μmol de Pi/mg de proteína x min..

Na Figura 12, podemos observar que também não ocorreu diferença entre o efeito inibitório do KNO₃, sobre as formas ativada e não ativada da enzima e a inibição de 50% da enzima foi obtida com aproximadamente 50 mM de KNO₃.

Após a análise de todos os resultados de hidrólise de ATP pode-se notar que a inibição da bomba pelo nitrato não mostra alteração significativa entre os estados ativado e a não ativado, mesmo quando foram usadas altas concentrações de ATP (5 mM) ou quando incubamos a 0 °C. Os dados sugerem que, em leveduras a incubação no gelo não promove a inativação da enzima, o que é contrário aos dados de Moriyama & Nelson (1989a), os quais mostram que a 0°C há inibição da bomba em células animais. No entanto, os dados aqui apresentados estão de acordo com os dados apresentados por Kane *et al.* (1989), também em levedura.

Como a $V H^+$ -ATPase só apresenta atividade hidrolítica quando o complexo catalítico V_1 está ligado ao complexo V_0 formado pelas proteínas integrais da membrana e responsável pelo transporte de H^+ , os dados sugerem que ambos os estados da enzima apresentam uma interação/ligação semelhante entre as subunidades do complexo V_1 e membrana. A estrutura da enzima, que é essencial à atividade hidrolítica, parece ser semelhante para os dois estados da enzima (ativado e não ativado), baseado na sua desestabilização do complexo catalítico V_1 por ânions caotrópicos.

5.2. Efeito do KNO_3 sobre o transporte de H^+ mediado pela $V H^+$ -ATPase

Primeiramente foi analisado o transporte de H^+ pela $V H^+$ -ATPase em membranas totais, energizadas ou não pela glicose extracelular. As concentrações de KNO_3 foram variadas, afim de identificar possíveis inibições diferenciadas pelo nitrato na atividade da $V H^+$ -ATPase (ativada e não-ativada).

Pode-se observar que a velocidade inicial (V_0) do transporte de H^+ pela $V H^+$ -ATPase foi inibida pelo nitrato de maneira diferente para os dois estados da enzima, revelando, ainda, uma maior resistência da enzima ativada (Figura 13). A inibição de 50% da V_0 de formação do ΔpH pela enzima não ativada foi obtida com aproximadamente 10 mM de KNO_3 enquanto que nas enzimas ativadas pela glicose extracelular essa inibição foi atingida acima de 25 mM de KNO_3 . Observamos também que a enzima não ativada apresentou baixa atividade de transporte de H^+ na presença de 100 mM de nitrato, enquanto a enzima ativada ainda apresenta aproximadamente 30% da V_0 e 50% de “*steady state*” de transporte de H^+ . Os dados também revelam a inibição mais efetiva do transporte de H^+ em comparação com a inibição da atividade hidrolítica, ou seja, a ação desacopladora do nitrato.

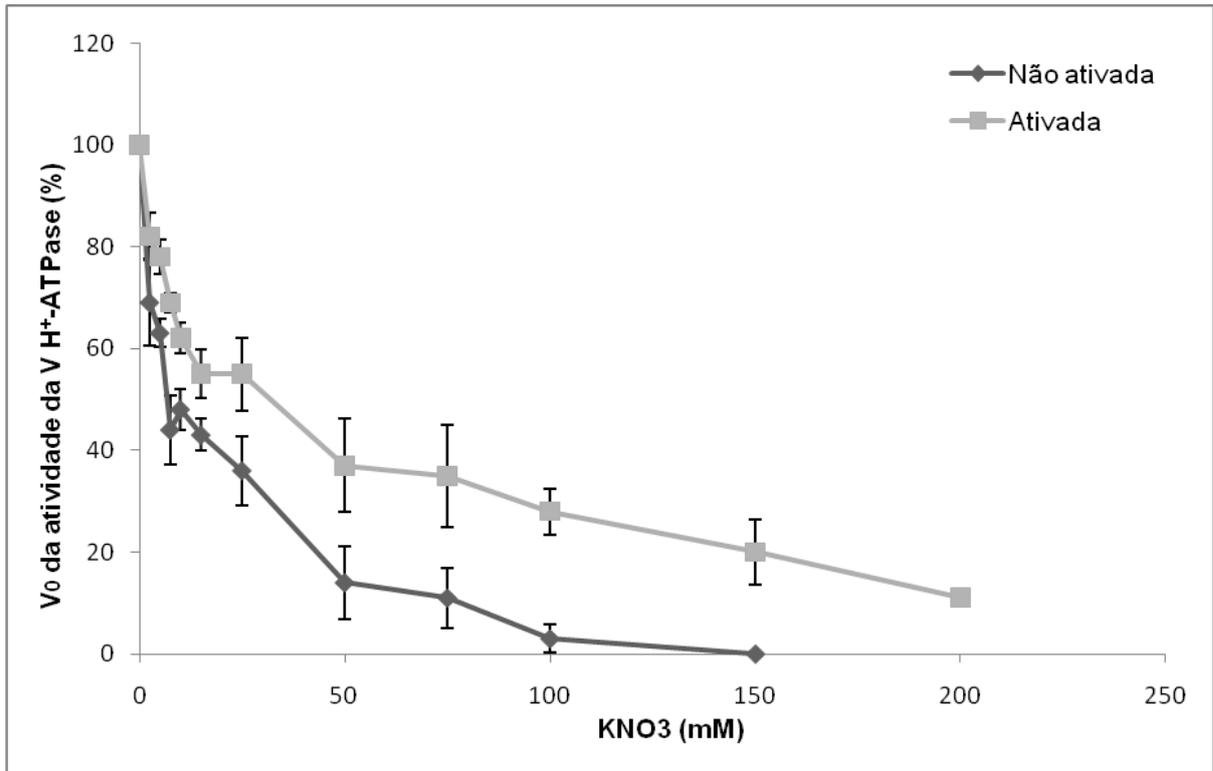


Figura 13. O aumento da concentração de nitrato revela resistência mais alta da enzima ativada. Dados de três experimentos feitos com membranas totais energizadas ou não por glicose extracelular, as análises foram feitas na presença de 1mM de ATP, 2,5mM de Mg²⁺ e 300μM de VO₄⁻³ para inibir a P H⁺-ATPase. As barras apresentam o erro padrão. 100% de V₀ não ativada = 232,9 mg/mL e 100% de V₀ ativada = 541 mg/mL

A $F_{\text{máx}}$ de formação do ΔpH também foi inibida com o aumento da concentração de KNO_3 , mas a inibição da $F_{\text{máx}}$ foi menos efetiva do que a inibição da V_0 tanto em membranas energizadas quanto em não energizadas pela glicose. A $F_{\text{máx}}$ de formação do ΔpH em membranas não ativadas foi inibida 50% com aproximadamente 25 mM de KNO_3 enquanto nas membranas ativadas essa inibição foi obtida com 50 mM de KNO_3 (Figura 14).

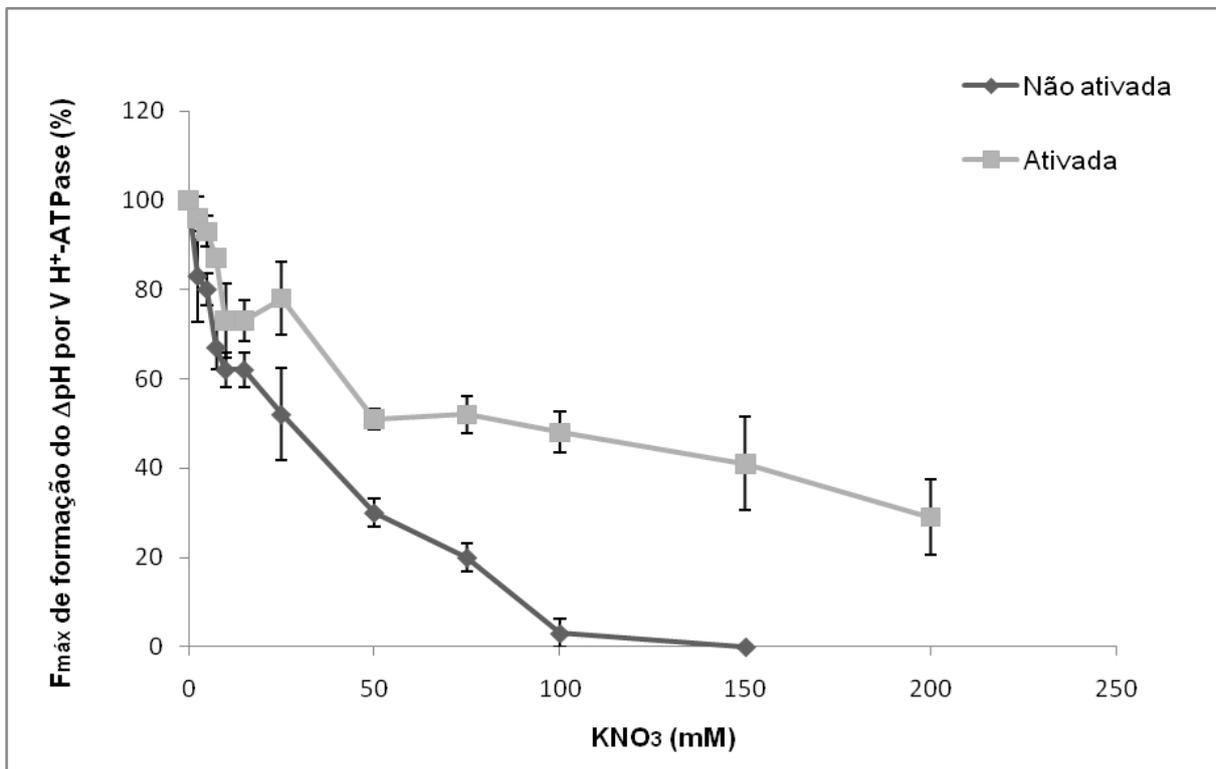


Figura 14. Efeito do KNO_3 sobre a $F_{\text{máx}}$ de formação do ΔpH . Dados de três experimentos feitos com membranas totais energizadas ou não por glicose extracelular, as análises foram feitas na presença de 1mM de ATP, 2,5mM de Mg^{2+} e 300 μM de VO_4^{-3} para inibir a P H^+ -ATPase. As barras apresentam o erro padrão. 100% de V_0 não ativada = 172 mg/mL e 100% de V_0 ativada = 332 mg/mL.

Os dados da Figura 13 juntamente com dados similares obtidos por Camila Cruz, Layz Ribeiro e Flávia Paiva foram analisados em conjunto e deram origem à figura 15, a qual relaciona a inibição pelo nitrato da atividade hidrolítica e da V_0 de transporte de H^+ em membranas totais ativadas e não-ativadas pela glicose. Pode-se observar que a transporte de H^+ é inibido de forma mais eficiente que a hidrólise

de ATP e quando analisamos a razão entre a velocidade inicial de transporte de H^+ da enzima ativada com a enzima não ativada é possível notar um aumento dessa razão em resposta ao aumento da concentração de nitrato (insert Figura 15). Este achado indica que o nitrato, mesmo em baixas concentrações (mas na presença de 50 mM de Cl^- , um ânion caotrópico fraco, usado para transformar o potencial de membrana em ΔpH), desacopla a hidrólise de ATP e o transporte de H^+ em enzimas ativadas e não ativadas. Essa ação de desacoplamento por nitrato, que foi relatada anteriormente em grânulos de cromafina de glândulas supra-renais de bovinos (Moriyama & Nelson, 1987), foi menos significativa na enzima ativada (Figura 15).

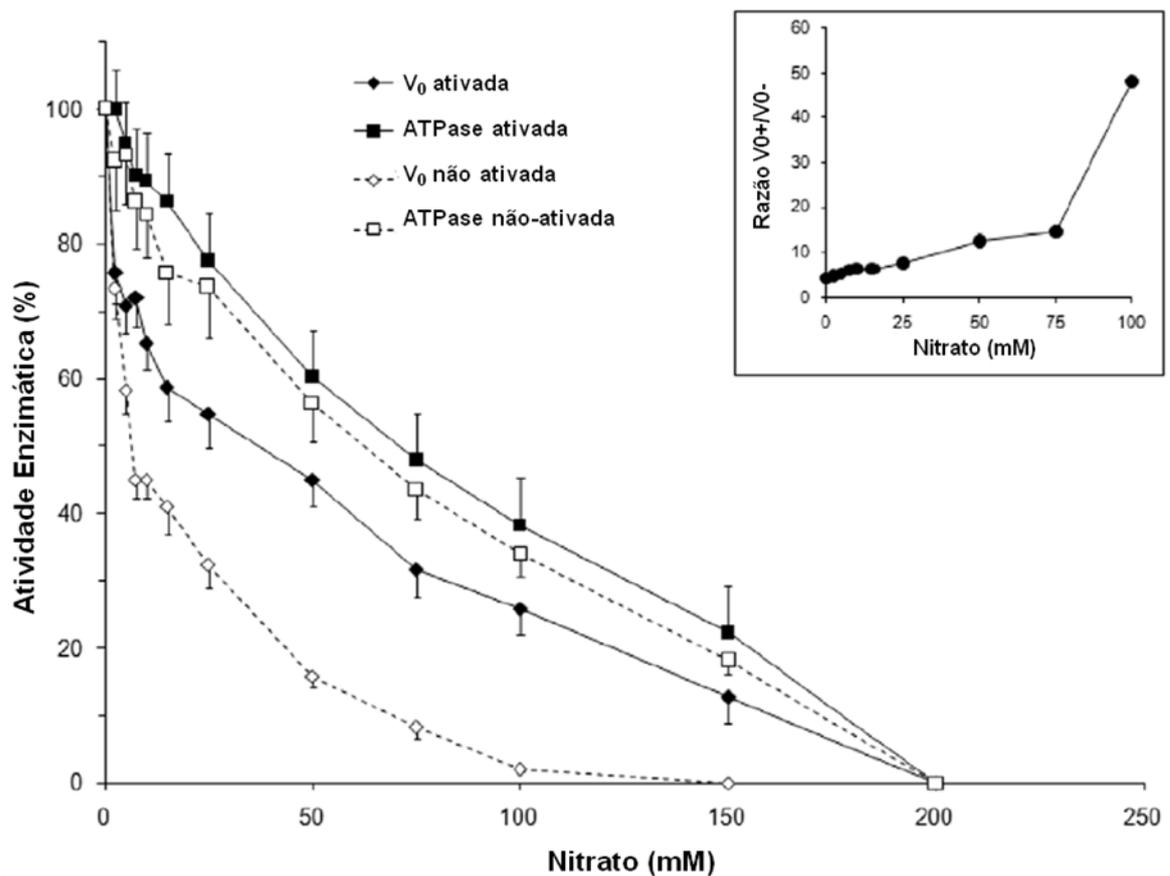


Figura 15. Inibição pelo nitrato da hidrólise de ATP e da velocidade inicial de transporte de H^+ mediado pela $V H^+$ -ATPase ativada e não ativada, em membranas totais. A atividade específica de ATPase de enzima não-ativada e ativada foram de 0,76 e 0,46 $\mu\text{mol}/\text{mg} \times 10 \text{ min.}$, respectivamente, enquanto as velocidades iniciais foram de 743 \pm 68 e 200 \pm 17, porcentagens quenchng de fluorescência/ $\text{mg} \times \text{min.}$ Insert: O efeito do nitrato na razão entre a velocidade inicial do transporte de H^+ em enzima ativada (V_0^+) e enzima não-ativada (V_0^-).

A capacidade de acoplamento da bomba foi aumentada pela glicose extracelular (Figura 16). De acordo com o modelo mecânico, o aumento do número de moléculas de enzima associadas deve ser igual ao crescimento das atividades das duas reações catalisadas pela bomba, isto é, a glicose extracelular não poderia ser capaz de modificar o acoplamento da enzima. Em contradição com esta previsão da hipótese atual, os nossos dados sobre a capacidade de acoplamento dos dois estados da bomba revelou que essa diferença é de pelo menos duas vezes maior para enzima não ativada (Figura 16).

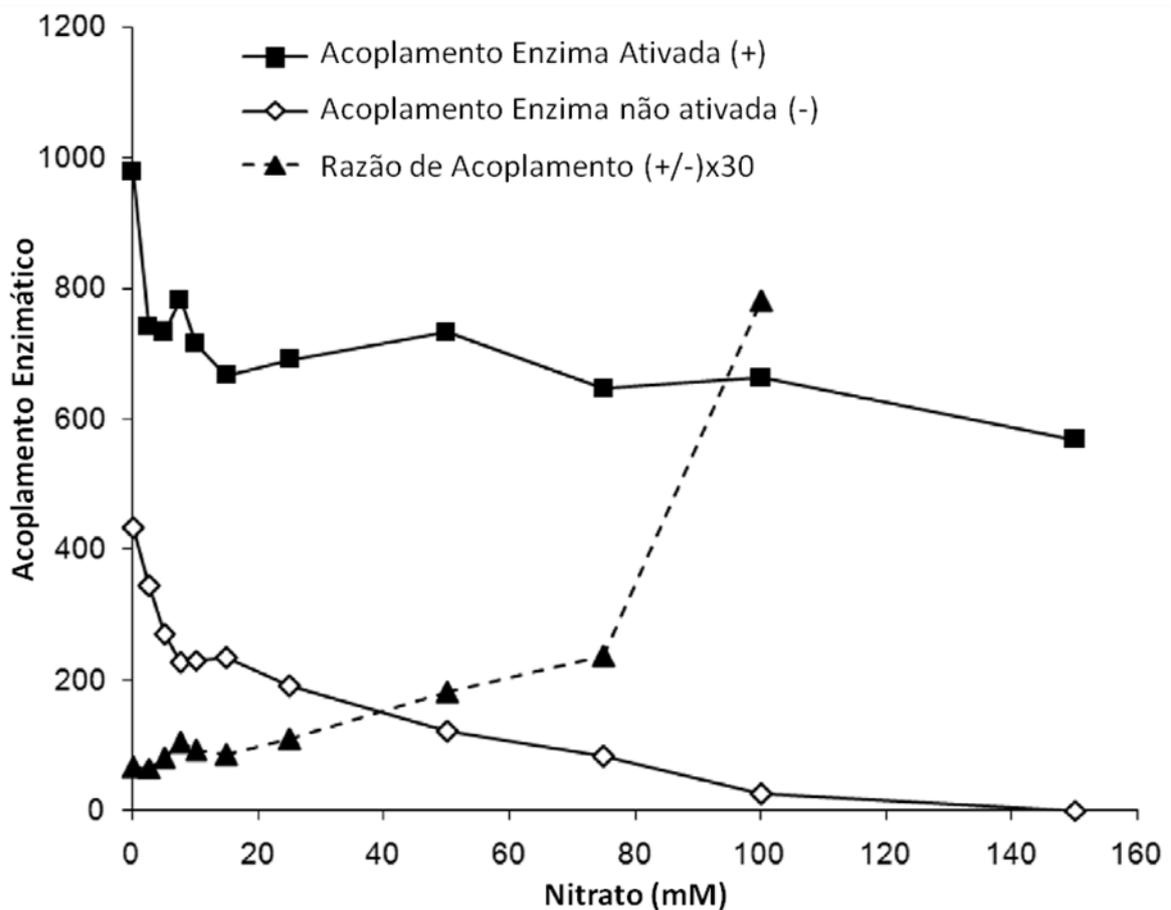


Figura 16. Inibição do acoplamento da $V H^+$ -ATPase pelo nitrato em membranas totais ativadas e não ativadas, revelou o maior acoplamento e maior estabilidade da bomba **ativada**. A capacidade de acoplamento ($V_o/ATPase$) é dada como porcentagem de quenching de fluorescência/ μ mol de ATP.

Para a bomba ativada, 2,5 mM de nitrato diminuiu a velocidade inicial de transporte de H^+ em 24% sem que ocorresse a perda da sua atividade ATPásica. Sob as mesmas condições, o nitrato diminuiu a atividade ATPásica e a velocidade inicial de transporte de H^+ catalisada pela enzima não ativada em 7,7% e 26,6%, respectivamente. A uma concentração de 5mM, o nitrato inibiu 29% e 42% da velocidade inicial de transporte de H^+ em enzimas ativadas e não ativadas, respectivamente. Por outro lado, as atividades ATPásicas correspondentes só foram reduzidas em 5,3% e 6,7% para as bombas ativadas e não ativadas, respectivamente. O interessante é que as eficiências de acoplamento destas pequenas populações, encontradas em ambos os estados da enzimas, inibidas por 5 mM de nitrato, foram 5,5 e 6,2 vezes maior do que a eficiência de acoplamento para todas as bombas na ausência de nitrato (Figura 17).

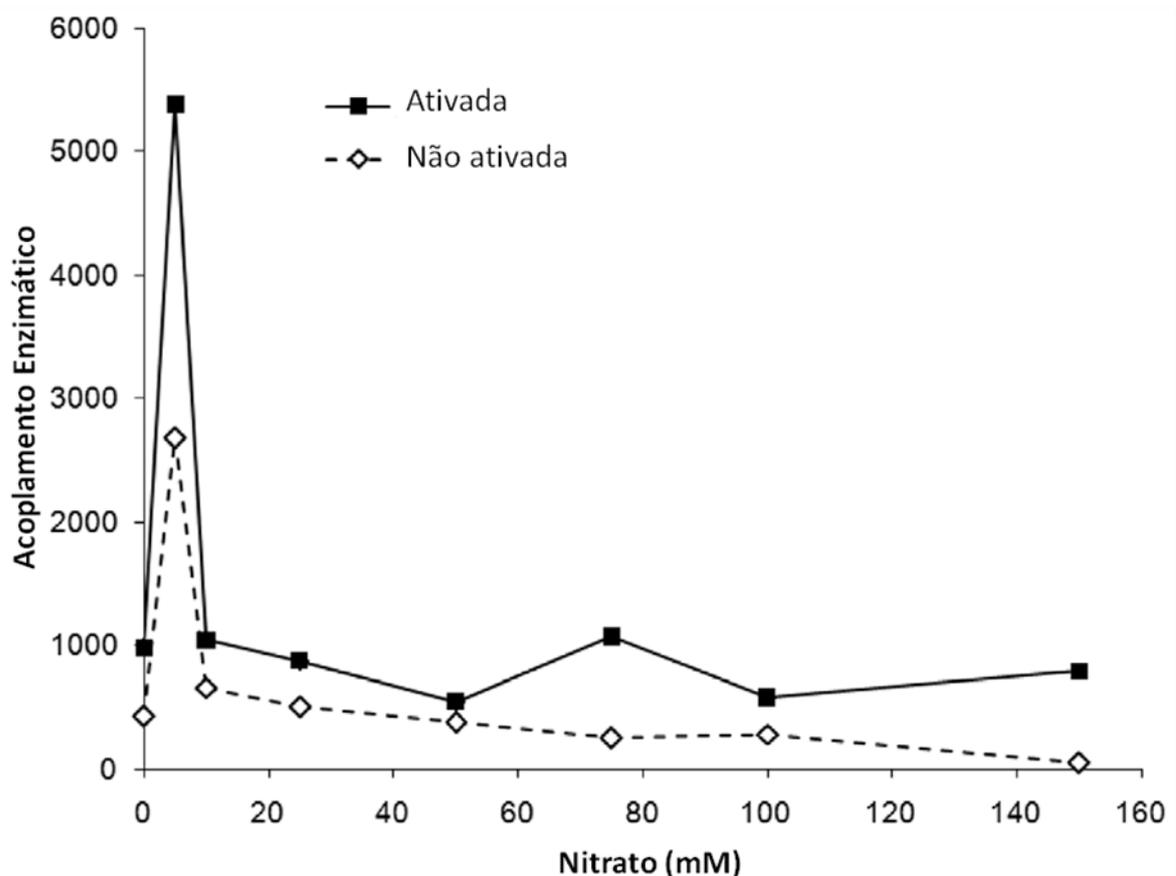


Figura 17. A capacidade de acoplamento de sub-populações de moléculas de $V H^+$ -ATPase inibidas pelo aumento das concentrações de nitrato. Para cada concentração de nitrato, a razão de acoplamento foi calculada dividindo-se a diferença das velocidades iniciais de transporte de H^+ (V_0) pela diferença da hidrólise de ATP da mesma concentração de nitrato.

A Figura 17 mostra que as enzimas exibem a maior capacidade de acoplamento, quando foram inibidas por 5 mM de nitrato em ambos estados da bomba.

Posteriormente, foi realizada a análise do efeito do KNO_3 sobre a formação do ΔpH nas membranas isoladas das organelas da via secretória energizadas ou não pela glicose extracelular, afim de sabermos se essas organelas apresentam V H^+ -ATPases com as mesmas características cinéticas ao longo da via secretória (figuras 18 e 19).

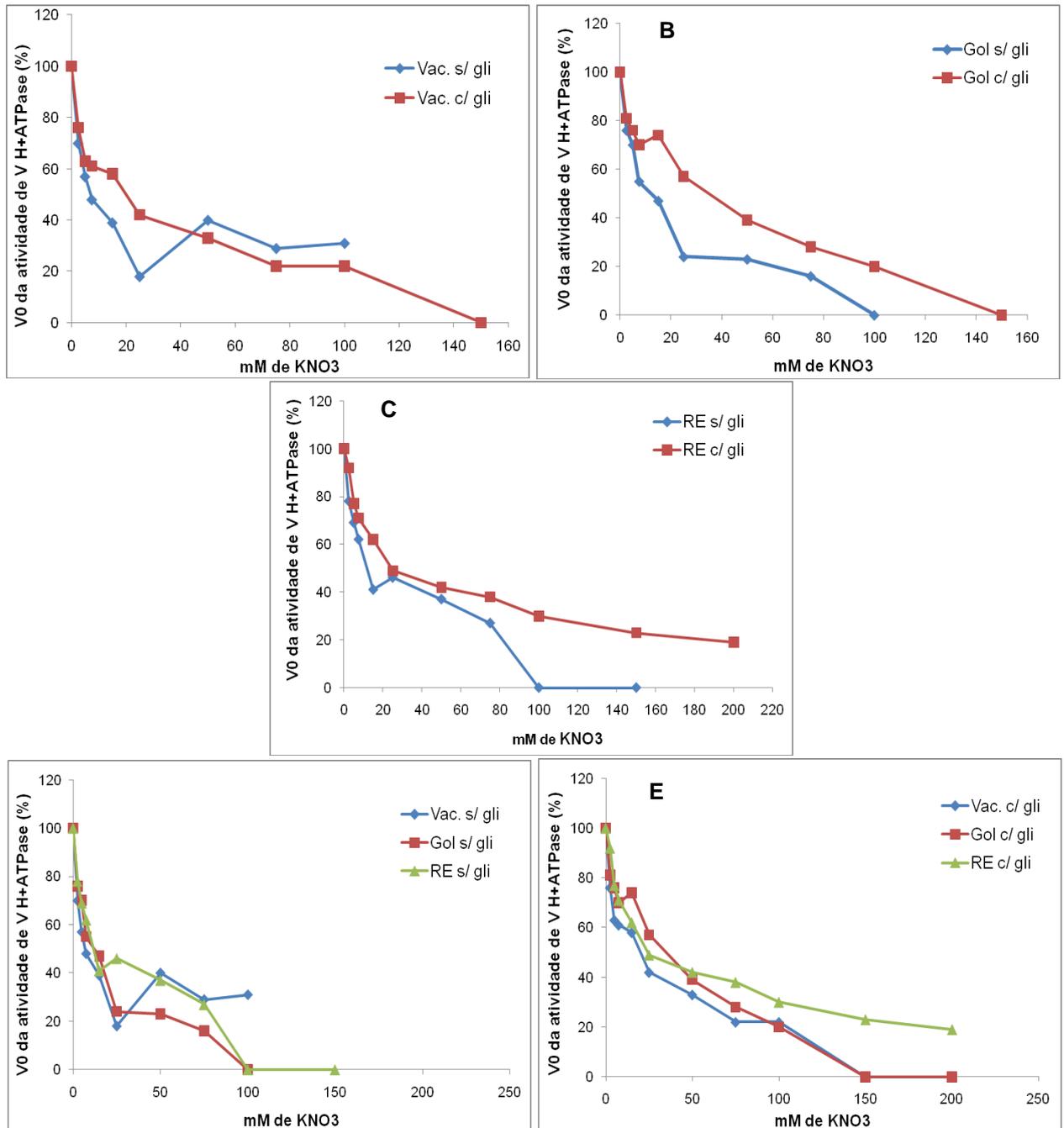


Figura 18. Efeito do KNO₃ sobre a V_o de transporte de H⁺ mediado pela V H⁺-ATPase. **Membranas das organelas da via secretória energizadas ou não por glicose extracelular:** A) vacúolo, B) Golgi, C) RE, D) membranas não energizadas, E) membranas energizadas, as análises foram feitas na presença de 300 μM de VO₄⁻³ para inibir a P H⁺-ATPase. (1^o Isolamento)

Podemos observar na figura 18 que o esperado assim como em membranas totais a V_o de transporte de H⁺ foi inibida pelo KNO₃ de forma dependente da concentração. Podemos observar também que as organelas da via secretória foram inibidas de forma diferenciada.

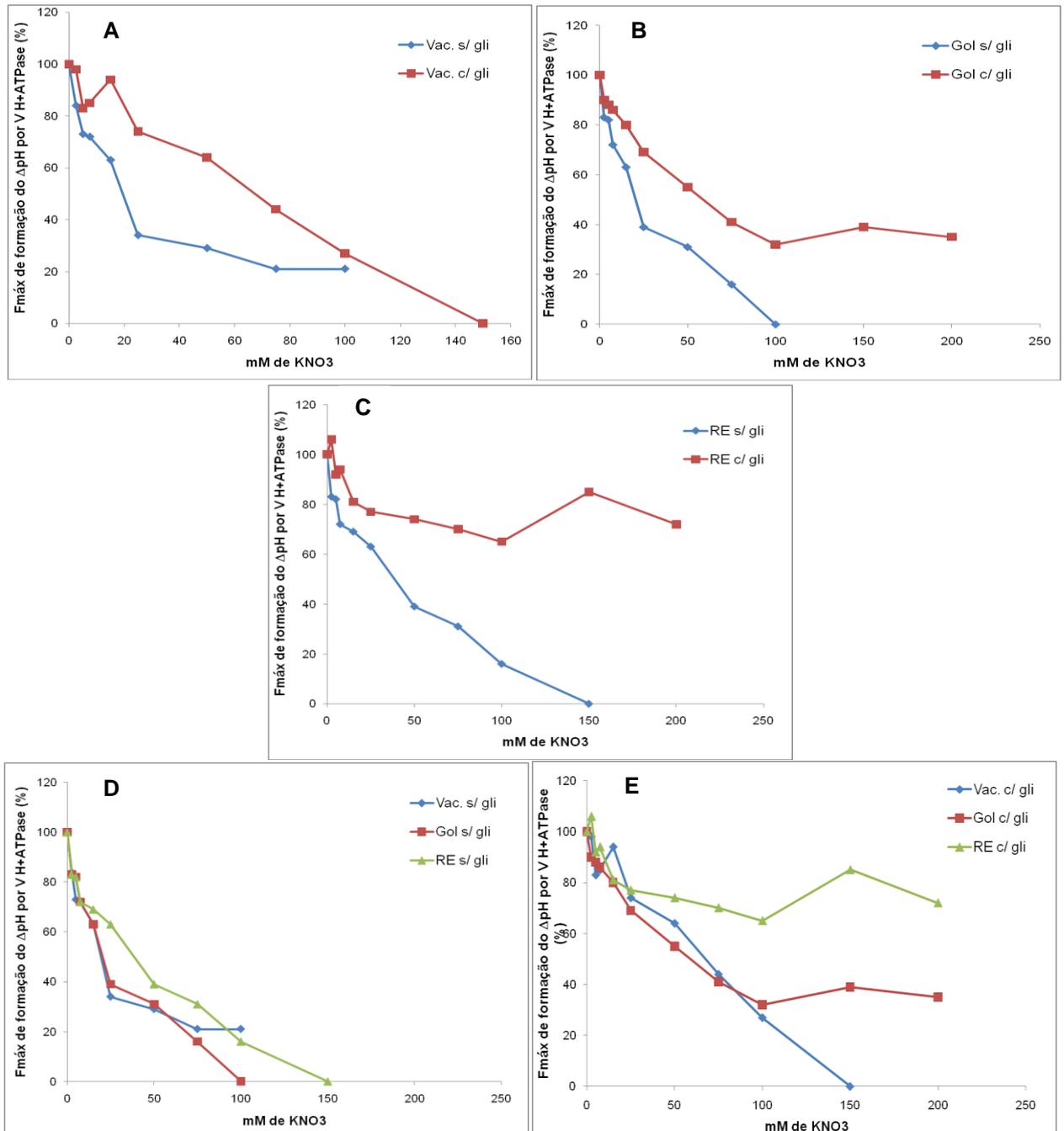


Figura 19. Efeito do KNO₃ sobre a F_{máx} de formação do ΔpH mediado por V H⁺-ATPase em membranas das organelas da via secretória energizadas ou não por glicose extracelular: A) vacúolo, B) Golgi, C) RE, D) membranas não energizadas, E) membranas energizadas, as análises foram feitas na presença de 300μM de VO₄⁻³ para inibir a P H⁺-ATPase.(1º Isolamento)

A F_{máx} de formação do ΔpH também foi inibida de forma diferenciada em frações enriquecidas com membranas das organelas da via secretória em decorrência da utilização de KNO₃, sendo que o RE foi mais resistente a essa inibição (Figura 19). Assim como em MT a inibição da F_{máx} foi menos efetiva do que

a inibição da V_o tanto em membranas energizadas quanto em não energizadas pela glicose.

Tabela 2: Atividade específica do transporte de H^+ para MT e membranas das organelas da via secretória (1º Isolamento). Os dados apresentados estão em unidade/mg de proteína.

	MT	Vacúolo	Golgi	RE
$F_{m\acute{a}x}$ s/ gli	153	392	953	157
$F_{m\acute{a}x}$ c/ gli	347	445	1151	245
V_o s/ gli	250	479	1151	232
V_o c/ gli	662	936	2076	464

No 1º isolamento encontramos uma estimulação da $V H^+$ -ATPase em relação à V_o de transporte de H^+ promovida pela glicose de aproximadamente 2 vezes nas organelas da via secretória e de aproximadamente 2,5 vezes em membranas totais (tabela 2).

A fim de verificar se a tendência de inibição pelo KNO_3 em organelas da via secretória pode ser reproduzida e que não é apenas uma variação experimental fizemos novas análises do efeito do KNO_3 sobre a formação do ΔpH nas organelas da via secretória energizadas ou não pela glicose extracelular (Figuras 20 e 21).

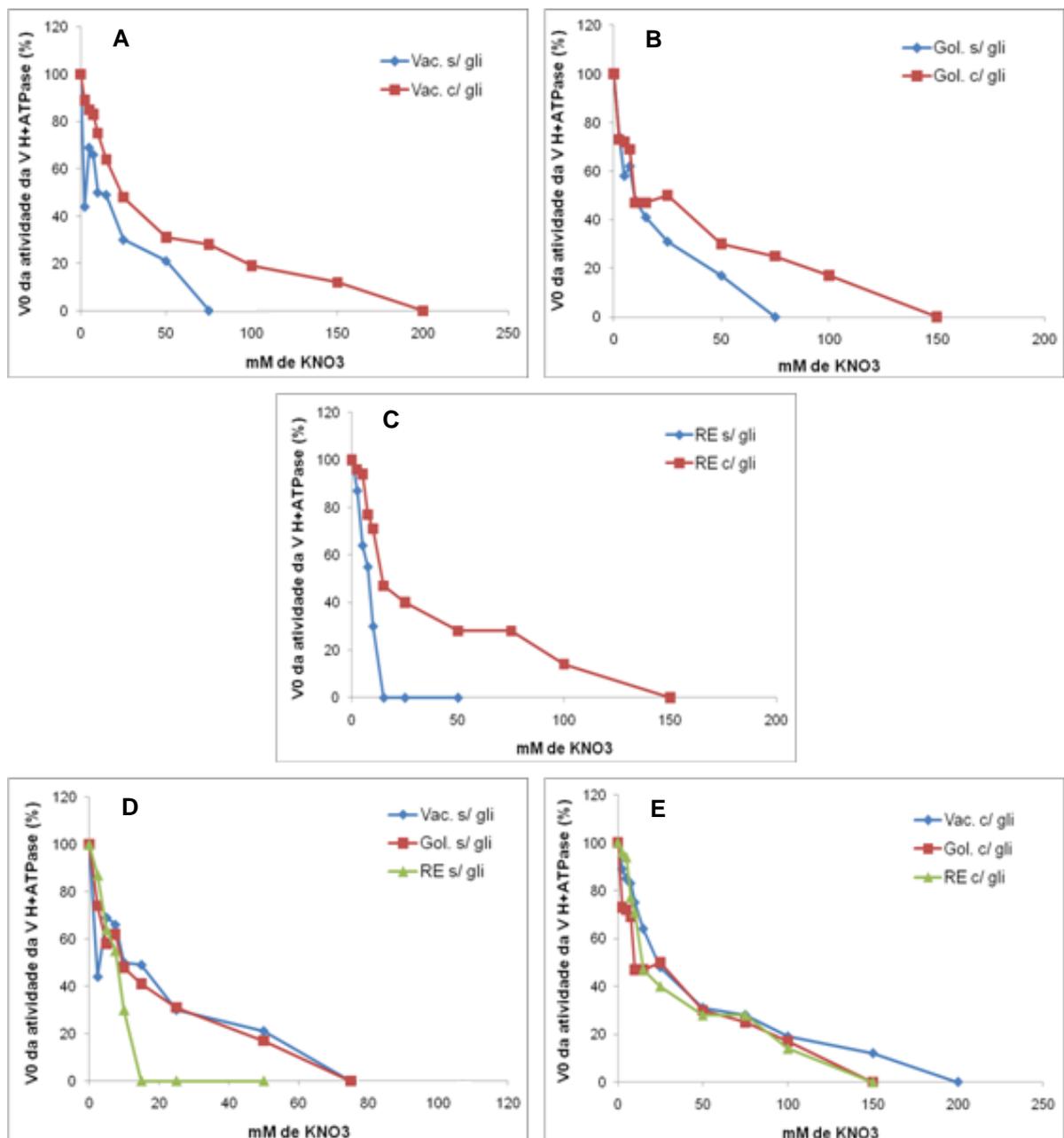


Figura 20. Efeito do KNO_3 sobre a V_0 de transporte de H^+ mediado pela $V \text{H}^+\text{-ATPase}$ em membranas das organelas da via secretória energizadas ou não por glicose extracelular: A) vacúolo, B) Golgi, C) RE, D) membranas não energizadas, E) membranas energizadas, as análises foram feitas na presença de $300\mu\text{M}$ de VO_4^{3-} para inibir a $P \text{H}^+\text{-ATPase}$. (2º Isolamento)

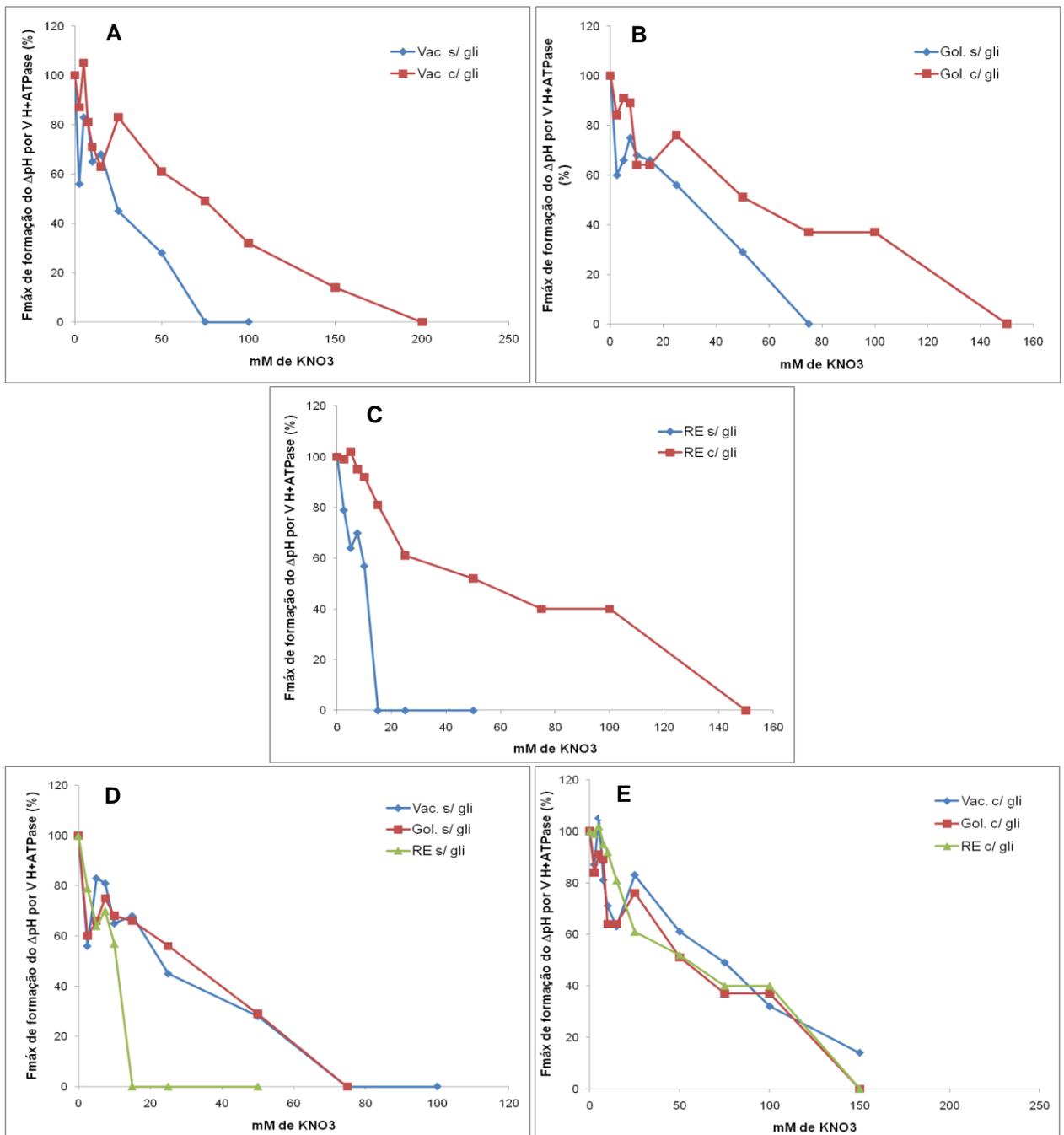


Figura 21. Efeito do KNO₃ sobre a F_{máx} de formação do ΔpH mediado pela V H⁺-ATPase em membranas das organelas da via secretória energizadas ou não por glicose extracelular: A) vacúolo, B) Golgi, C) RE, D) membranas não energizadas, E) membranas energizadas, as análises foram feitas na presença de 300 μM de VO₄⁻³ para inibir a P H⁺-ATPase. (2^o Isolamento)

Novamente é possível observar que tanto a V₀ do transporte de H⁺ (figura 20) quanto a amplitude máxima de formação do ΔpH (figura 21), foram inibidas pelo KNO₃, e essa inibição ocorreu de forma diferenciada nas diferentes organelas da via

secretória, sendo que dessa vez não verificamos uma maior resistência à inibição no RE. Esses dados estão em concordância com os dados obtidos no primeiro isolamento, mostrando assim um padrão de inibição pelo nitrato, tanto em enzimas ativadas quanto em não ativadas.

Nesta última análise foi encontrada uma estimulação da V_{H^+} -ATPase em relação à V_0 de transporte de H^+ promovida pela glicose de aproximadamente 1,4 vezes em MT, no Golgi e no RE e de 1,9 vezes no vacúolo (tabela 3).

Tabela 3: Atividade específica do transporte de H^+ para MT e membranas das organelas da via secretória (2º Isolamento). Os dados apresentados estão em unidade/mg de proteína.

	MT	Vacúolo	Golgi	RE
$F_{máx} \text{ s/ gli}$	276	556	405	114
$F_{máx} \text{ c/ gli}$	315	632	488	120
$V_0 \text{ s/ gli}$	354	640	499	132
$V_0 \text{ c/ gli}$	514	1223	728	183

Observamos que tanto a V_0 quanto a $F_{máx}$ de formação do ΔpH em membranas totais e nas membranas das organelas da via secretória foram inibidas pelo KNO_3 de maneira menos eficiente na forma ativada da enzima, sugerindo que a glicose deixa a enzima mais estável. Como dito anteriormente é conhecido que o nitrato é um reagente caotrópico que desestabiliza a estrutura enzimática, causando a dissociação de algumas subunidades do complexo V_1 (subunidade A catalítica e subunidade B regulatória) (Moriyama e Nelson, 1989a). Portanto concluímos que a enzima ativada pela glicose extracelular tem uma estrutura mais sólida e sua integridade necessária para transporte de H^+ e acoplamento dos dois processos é mais estável.

Comparando os resultados de inibição pelo KNO_3 sobre a hidrólise de ATP e o transporte de H^+ , nós observamos que o transporte de H^+ diminuiu mais rapidamente do que a hidrólise de ATP, tanto para enzima ativada quanto para a enzima não ativada. Isto evidencia que o nitrato desacopla os dois processos

catalisados pela bomba. A mudança no acoplamento entre as duas reações catalisadas pela $V H^+$ -ATPase não ativada foi descrito para leveduras e vacúolos de plantas (Moriyama & Nelson, 1987; Moriyama & Nelson, 1988; Muller et al., 1999; Kettner et al., 2003), mas até o momento nunca foi descrito que o efeito de desacoplamento foi menos eficiente para enzima ativada.

5.3. Comparação do efeito de diferentes inibidores da $V H^+$ -ATPase sobre a hidrólise de ATP

Os dados obtidos em relação à inibição pelo nitrato e pela concanamicina, chamaram a atenção, na maneira como a $V H^+$ -ATPase era inibida por esses dois compostos, e considerando que a concanamicina A inibe a $V H^+$ -ATPase reagindo com o complexo integral de membrana V_0) e que o nitrato é um reagente caotrópico que desestabiliza a estrutura enzimática, causando a dissociação de algumas subunidades do complexo V_1 (subunidade A catalítica e subunidade B regulatória), nestas condições a enzima perde sua capacidade de hidrolisar ATP e transportar H^+ . Foram então realizadas novas análises para identificar se existe uma diferença na atividade de hidrólise de ATP em relação a diferentes inibidores da $V H^+$ -ATPase e se essa atividade pode ser alterada pela energização da bomba, resolvemos comparar o efeito de inibidores da $V H^+$ -ATPase conhecidos e amplamente utilizados (concanamicina A e NO_3^-) em membranas energizadas ou não pela glicose extracelular (figura 22).

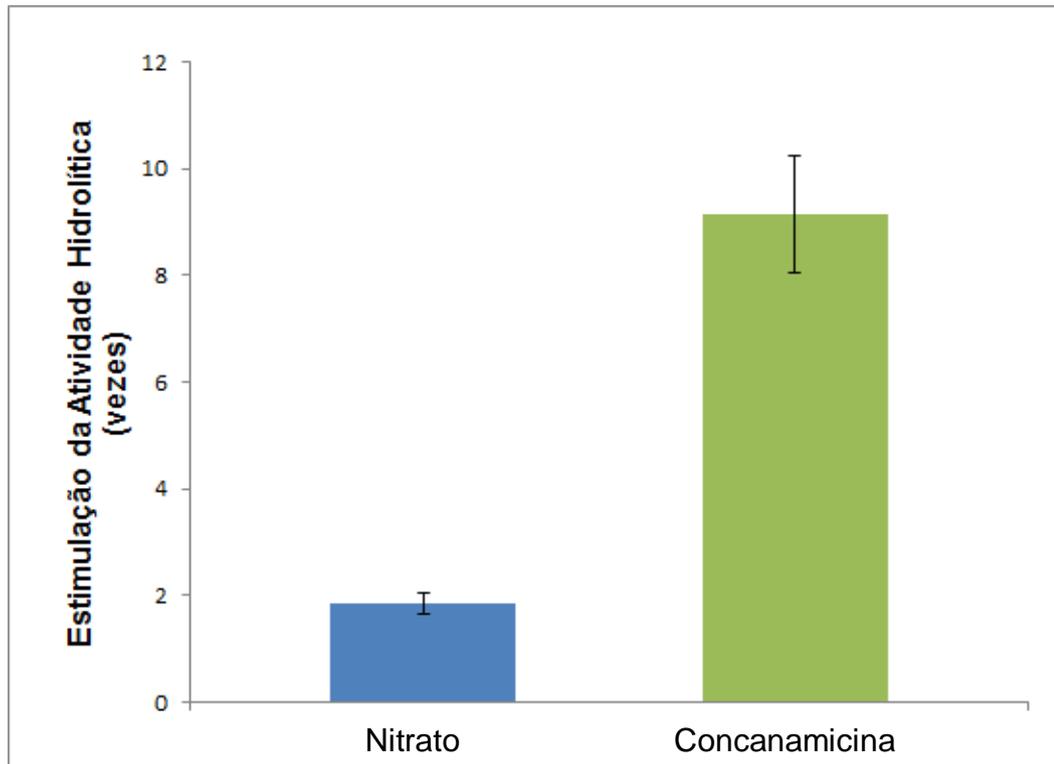


Figura 22. Efeito do nitrato e da concanamicina A sobre a hidrólise de ATP. A atividade obtida para membranas totais ativadas foi dividida pela atividade em membranas totais não ativadas pela glicose extracelular. Foi utilizado 100 nM de concanamicina e 200 mM de KNO_3 .

Como é possível ver na Figura 22 a concanamicina inibi mais a enzima ativada, então isso aparenta uma maior estimulação da $V \text{H}^+$ -ATPase quanto comparada a inibição por esse inibidor. Sugerimos que a ligação da concanamicina com o complexo V_0 pode dificultar a rotação do complexo V_1 e portanto a sua atividade hidrolítica. Essa sugestão tem uma consequência lógica, ou seja, se a enzima ativada possui a estrutura mais rígida e a ligação entre V_0 e V_1 mais forte, a inibição da hidrólise de ATP pela concanamicina deve ser mais efetiva. Isto significa que a atividade hidrolítica da enzima não ativada vai ser “rebaixada” enquanto a enzima ativada vai ser aumentada. Achamos que a ativação da atividade hidrolítica determinada na base da inibição pela concanamicina foi de 9,15 vezes quando determinada na base da inibição pelo nitrato foi de 1,87 vezes (Tabela 4). Em fim, o nitrato que inibe a hidrólise no nível de V_1 é independente do estado de ativação da enzima (Figuras 10 e 12) mostrou a ativação da hidrólise pela glicose extracelular ~2 vezes. É provável que a mudança conformacional da enzima em resultado da sua

ativação pela glicose extracelular direcionada exatamente para a ligação física entre V_1 e V_0 causa o aumento do acoplamento da bomba.

Tabela 4: Estimulação da V H^+ -ATPase com base em diferentes inibidores. Foram usados 200mM de KNO_3 , 110nM de concanamicina A e 200mM de vanadato.

	Hidrólise	V_0	$F_{máx}$
Nitrato	1,87	----	----
Concanamicina A	9,15	2,99	3,56
Vanadato	----	3,24	3,88

Em seguida foi realizada a hidrólise de ATP com a utilização de anticorpos monoclonais contra a subunidade B regulatória em membranas do vacúolo energizadas ou não pela glicose extracelular, utilizamos para essas análises membranas do vacúolo para diminuir a “contaminação” com outras ATPases (Tabela 5).

Tabela 5: Hidrólise de ATP utilizando 4,9 μ g de proteína de membranas do vacúolo sem glicose e 2,1 μ g de proteína de membranas do vacúolo com glicose.

	Vacúolo Sem Gli μ mol pi/mg ptn	Vacúolo Com Gli μ mol pi/mg ptn
ATPase total	13,5	38,9
V H^+-ATPase sensível a Concanamicina (22nM)	1,2	6,6
V H^+-ATPase sensível a KNO_3 (200mM)	5,2	15,8
V H^+-ATPase resistente a Azida (5mM) + VO_4^{3-} (200μM)	5,5	13,8
V H^+-ATPase sensível a Anticorpo (1μg)	6,6	5,4

Foi utilizado 1 μg de anticorpos, pois a quantidade de proteína da fração enriquecida com membranas do vacúolo usada foi de aproximadamente 5 μg para membranas não energizadas e de aproximadamente 2 μg para membranas energizadas, sabe-se que a porção de proteína referente a V H⁺-ATPase no vacúolo é de aproximadamente 10%, sendo assim deveríamos ter aproximadamente 0,5 μg de V H⁺-ATPase e acreditamos com isso que a utilização de 1 μg de anticorpo seria suficiente para inibir a enzima.

A tabela 5 mostra que o nitrato continua inibindo a hidrólise de ATP mais eficientemente do que a concanamicina. A concentração de anticorpo utilizada não foi capaz de inibir de forma eficiente a hidrólise de ATP em membranas energizadas, acreditamos que isso pode ter ocorrido por termos utilizado anticorpos que haviam sido descongelados e congelados novamente.

5.4. Análise cinética da $V H^+$ -ATPase em membranas totais

Resolvemos verificar se a estimulação da $V H^+$ -ATPase pela glicose altera a especificidade da enzima pelo substrato, uma vez que o modelo mecânico prevê uma modulação idêntica de $V_{m\acute{a}x}$ para a hidrólise de ATP e transporte de H^+ e uma idêntica afinidade ao ATP para as duas formas da enzima e também porque estas propriedades das enzimas não foram comparadas anteriormente. Na figura 23 temos a análise cinética da V_o do transporte de H^+ em MT ativadas ou não ativadas pela glicose, onde variamos a concentração de ATP mantendo a proporção de ATP e Mg de 1:2,5.

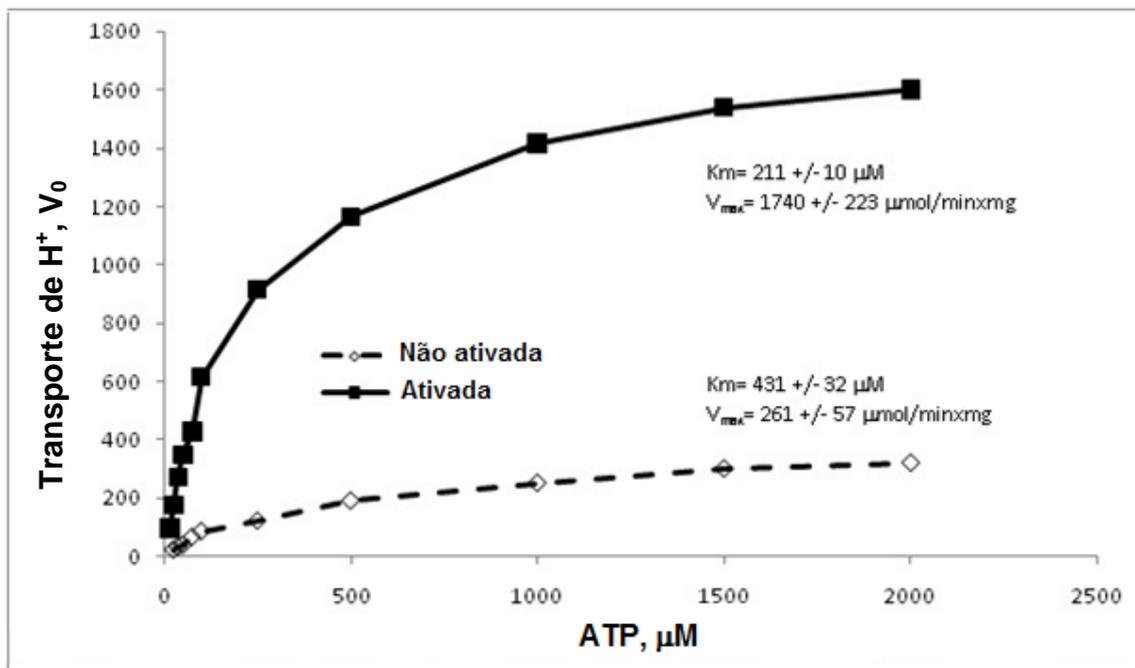


Figura 23. Análise cinética do transporte de H^+ pela $V H^+$ -ATPase em MT ativadas e não ativadas pela glicose. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ apresentados foram obtidos como a média de três experimentos, sendo apresentado juntamente o erro padrão. Todas as análises foram realizadas na presença de $200\mu M$ de vanadato. As membranas foram incubadas a $30^\circ C$, os dados apresentados estão em % de extinção de fluorescência/ min. x mg de proteína. Gráfico representativo de um experimento.

Na figura 23 pode-se observar que o K_m da enzima não ativada é 2 vezes maior do que o K_m da enzima ativada, enquanto a $V_{m\acute{a}x}$ é aproximadamente 6,5 vezes maior na enzima ativada. Esses dados mostram que existe uma diferença entre as duas formas da enzima, ou seja, a enzima ativada tem afinidade mais alta ao ATP e funciona mais rápido enquanto a enzima não ativada está operando lentamente e economiza ATP menos disponível (K_m aumentado). Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ apresentados na Figura 23 foram obtidos através de gráficos de Lineweaver-Burk (apêndice Figuras 38 e 39).

A figura 24 apresenta a análise da $F_{m\acute{a}x}$ do transporte de H^+ pela $V H^+$ -ATPase em MT energizadas ou não pela glicose, onde variamos a concentração de ATP mantendo a proporção das concentrações de ATP e Mg^{2+} de 1:2,5. Verificamos que em MT energizadas a atividade de $F_{m\acute{a}x}$ da $V H^+$ -ATPase foi aproximadamente 7 vezes maior comparado com as MT não energizadas.

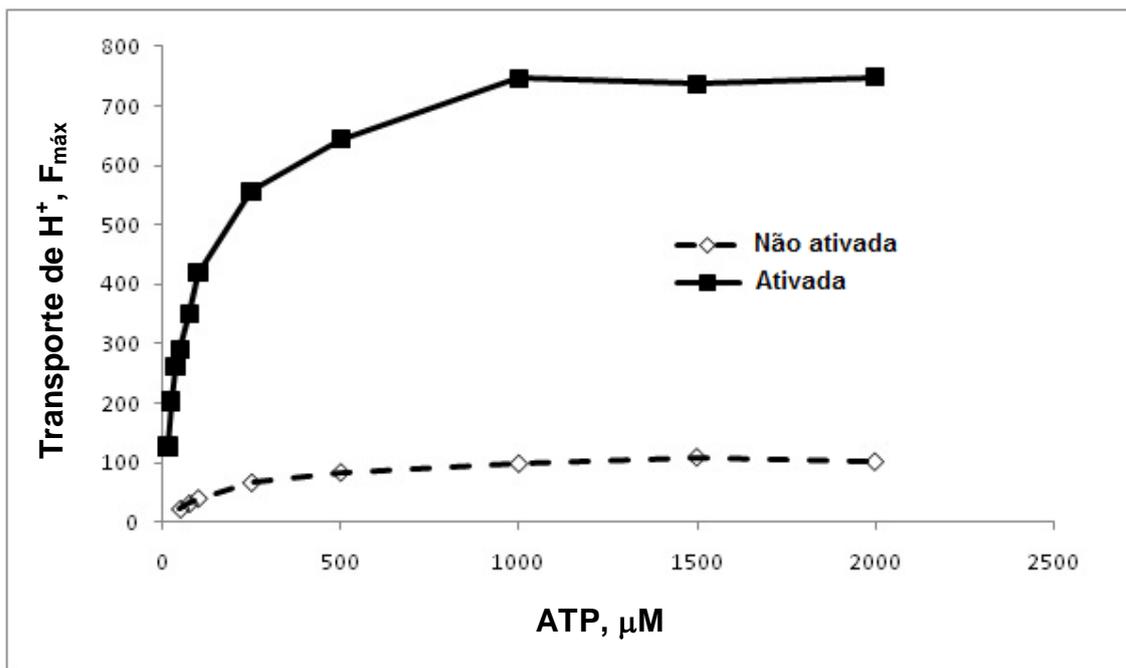


Figura 24. Análise da $F_{m\acute{a}x}$ do transporte de H^+ de $V H^+$ -ATPase em MT energizadas e não energizadas pela glicose. Todas as análises foram realizadas na presença de $200\mu M$ de vanadato. As membranas foram incubadas a $30^\circ C$, os dados apresentados estão em % de extinção de fluorescência/ mg de proteína. Gráfico representativo de um experimento de três.

Foi analisado também a cinética da V H^+ -ATPase em relação à atividade hidrolítica, afim de verificar se existe uma diferença no K_m em relação à atividade hidrolítica dessas formas da enzima (figura 25).

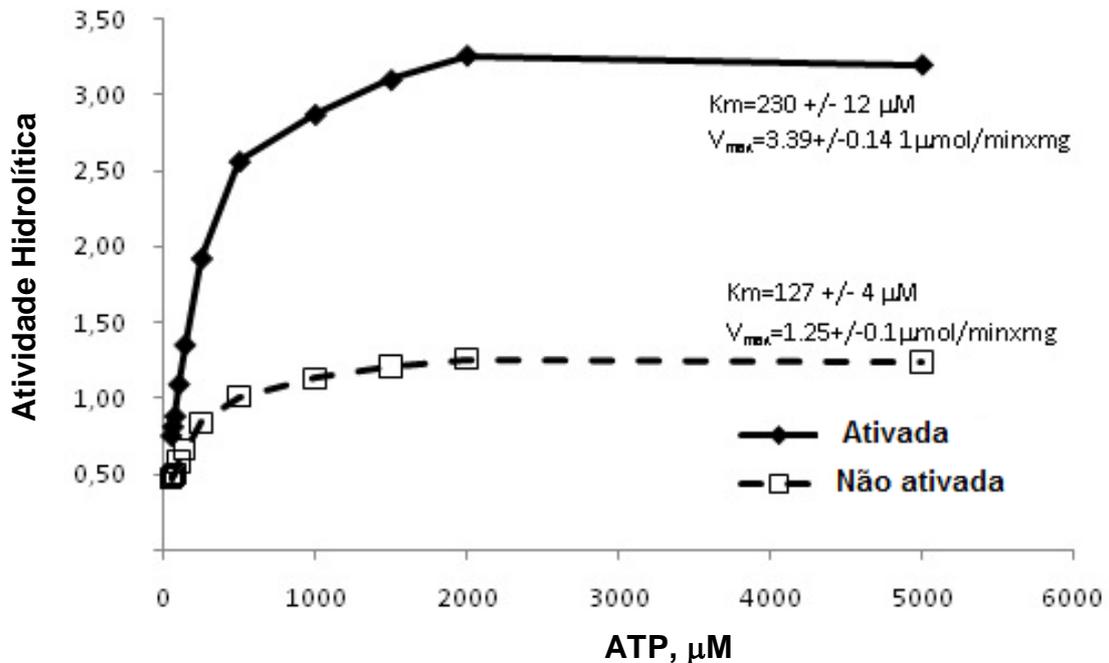


Figura 25. Análise cinética da hidrólise de ATP pelas V H^+ -ATPases em MT energizadas e não energizadas pela glicose. Os valores de K_m e $V_{máx}$ apresentados foram obtidos como a média de três experimentos, sendo apresentado juntamente o erro padrão. Todas as análises foram realizadas na presença de 200μ M de vanadato. A V_0 de hidrólise de ATP foi determinada medindo o P_i liberado após 10 min. de incubação. Os dados estão em μ mol de P_i /mg de proteína x 10 min. Gráfico representativo de um experimento.

Na figura 25 podemos observar que o K_m da enzima ativada é aproximadamente 2 vezes maior do que o K_m da enzima não ativada, enquanto a $V_{máx}$ é aproximadamente 2,7 vezes maior para enzima ativada. Os valores de K_m e $V_{máx}$ apresentados na Figura 25 foram obtidos através de gráficos de Lineweaver-Burk (apêndice, Figuras 40 e 41).

O efeito da glicose extracelular na afinidade de ATP para os dois estados da enzima foi seletivo. Embora o K_m para o transporte de H^+ tenha aumentado com a diminuição da $V_{m\acute{a}x}$ em resposta à ausência da glicose, a afinidade (K_m) para a hidrólise de ATP aumentou na presença de glicose (Figuras 23 e 25). Essa mudança de afinidade da enzima não ativada com tendências contrárias (diminuição e aumento para transporte de H^+ e hidrólise de ATP respectivamente) possui senso fisiológico. Ela é causada pela potencial diminuição da síntese de ATP em condições de defeito energético (ausência de glicose). Portanto a célula precisa aumentar a afinidade no caso de hidrólise de ATP. Esse déficit energético, ou seja, “apagão” da glicólise leva a uma diminuição na produção de H^+ , portanto a enzima não necessita de alta afinidade ao ATP no caso de transporte de H^+ .

A Glicose extracelular aumentou a $V_{m\acute{a}x}$ para a hidrólise de ATP 2,7 vezes (figura 25), como o esperado pelo modelo proposto por Kane (1995); no entanto, a $V_{m\acute{a}x}$ para o transporte H^+ aumentou 6,7 vezes (figura 23), o que é significativamente maior do que o previsto pelo modelo. A enzima revela sua dinâmica e elasticidade, modificando a sua afinidade ao ATP dependente da situação energética e ainda varia o acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte de H^+ . Os dados de cinética junto com efeitos inibitórios sobre os dois processos catalizados pela $V H^+$ -ATPase corroboram com a idéia, que existe uma diferença conformacional entre as duas formas da enzima. O modelo mecânico atual não é capaz de explicar as novas propriedades e diferenças entre a forma ativada e não ativada da enzima descobertas nesse trabalho.

5.5. Imuno reatividade de Subunidade da Enzima Ativada e Não ativada

Determinamos a imuno reatividade da subunidade A catalítica e da subunidade B regulatória, como resultado da ativação/ inativação parcial da enzima, dependente da disponibilidade de glicose extracelular (figura 26).

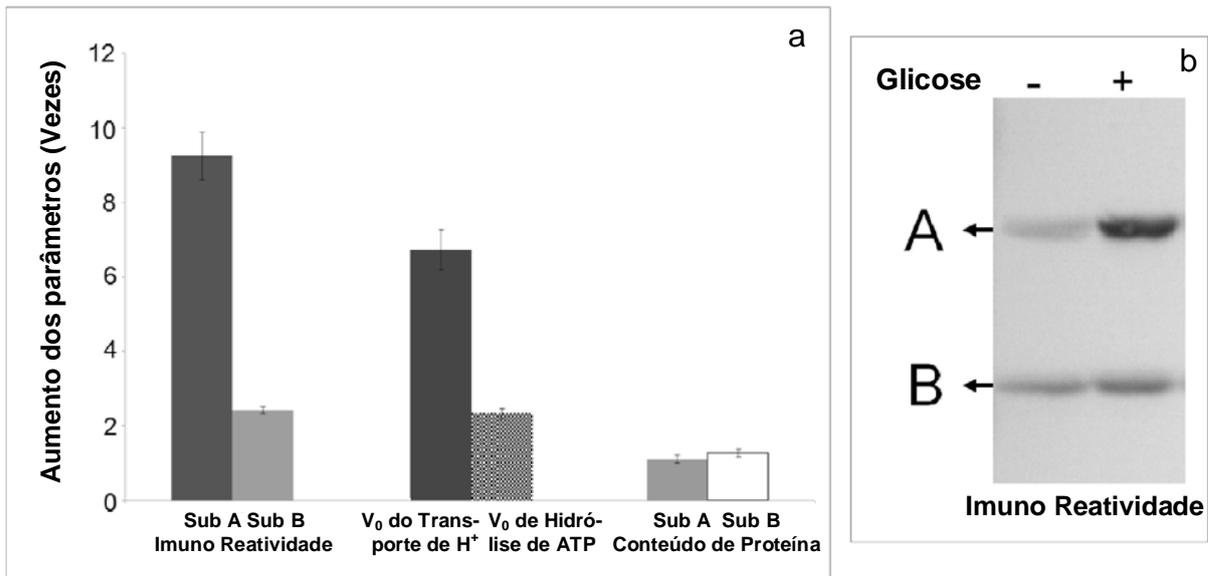


Figura 26 – Comparação das propriedades de $V H^+$ -ATPase ativada e não ativada por glicose extracelular. (a) A glicose extracelular causa o aumento assimétrico na imuno reatividade das subunidades A e B, bem como da velocidade inicial de transporte de H^+ e hidrólise de ATP. O conteúdo protéico dessas subunidades não mudou em contradição com o modelo mecanicista. (b) Imunoblot de enzimas ativadas e não ativadas; foram adicionados nos poços 30 mg e 15 mg de proteína nos poços (-) e (+) glicose respectivamente. Experimentos feitos em colaboração com Camila Cruz e Layz Ribeiro.

A imuno reatividade das subunidades A e B de membranas totais, foi aumentada em 9,3 e 2,4 vezes respectivamente. A imuno reatividade mais elevada da subunidade A catalítica correlaciona com o aumento na velocidade inicial do transporte de H^+ , enquanto a imuno reatividade da subunidade B correlaciona melhor com a modulação da atividade hidrolítica (Figura 26).

De acordo com a hipótese de dissociação/reassociação dos complexos V_1 e V_0 o aumento da imuno reatividade dessas subunidades deve ser igual para as ambas subunidades A e B, ou seja, a proporção da imuno reatividade dessas subunidades não poderia ser diferente de 1:1 e não ultrapassar o aumento de V_0 da

atividades. Entretanto achamos uma modificação assimétrica na imuno reatividade, que esta contra as predição do modelo de Kane (1995). Isto ainda pode acontecer em resultado a modificações proteicas. Neste caso, o conteúdo proteico de subunidades do complexo V_1 também deve ser aumentado a 2-3 vezes, o que não achamos (Figura 26a) (Tabela 6).

Tabela 6 – Mudanças em diferentes características de $V H^+$ -ATPase de levedura por glicose extracelular de acordo com o modelo mecanicista e os dados experimentais desse estudo.

	Hidrolise de ATP		Transporte de H^+		Acoplamento	Imuno Reatividade			Conteúdo Proteico	
	K_M^*	V_{max}	K_M^*	V_{max}	Transporte H^+ /ATPase	Subunidade A	Subunidade B	Subunidade A:B	Subunidade A	Subunidade B
Predições do modelo Mecanicista	1	2,6	1	2,6	1	2,6	2,6	1	2,6	2,6
Dados Experimentais	1,8	2,7	0,5	6,7	2,5	9,3	2,4	3,9	1,1	1,2

*Todas as mudanças nas características para o estado ativado da enzima estão relacionadas com a respectiva característica para o estado não ativado, tomados como unidade.

5.6. A Energização da Membrana e a Regulação de V e P ATPase

Tem sido demonstrado que a P H^+ -ATPase de membrana plasmática de levedura pode ser ativada pela glicose extracelular apenas se a membrana está energizada (Petrov & Okorokov, 1992). A interrupção do $\Delta\mu H^+$ por protonóforos quase impede a ativação de enzimas (hidrólise de ATP). Verificamos como a energização da membrana é importante para a ativação da $V H^+$ -ATPase através do efeito do protonóforo FCCP e do NH_4Cl sobre a ativação de P e $V H^+$ -ATPase. Esses compostos foram escolhidos, pois o FCCP é capaz de destruir o gradiente de H^+ através das membranas, aumentando o pH citosólico, e o NH_4Cl extracelular pode se dissociar em NH_3 o qual pode entrar no citosol e se ligar aos prótons presentes no mesmo, diminuindo assim o gradiente protônico. Essas análises foram realizadas em colaboração com a aluna de doutorado Layz Ribeiro e com a aluna de IC Mariana Miranda.

Foi avaliado o efeito do FCCP e do NH_4Cl sobre a estimulação pela glicose extracelular da P e da V H^+ -ATPase em MT. As membranas foram incubadas em pH 8,2 na presença e na ausência de glicose e na presença de glicose acrescentado de FCCP ou NH_4Cl (figuras 27, 28 e 29).

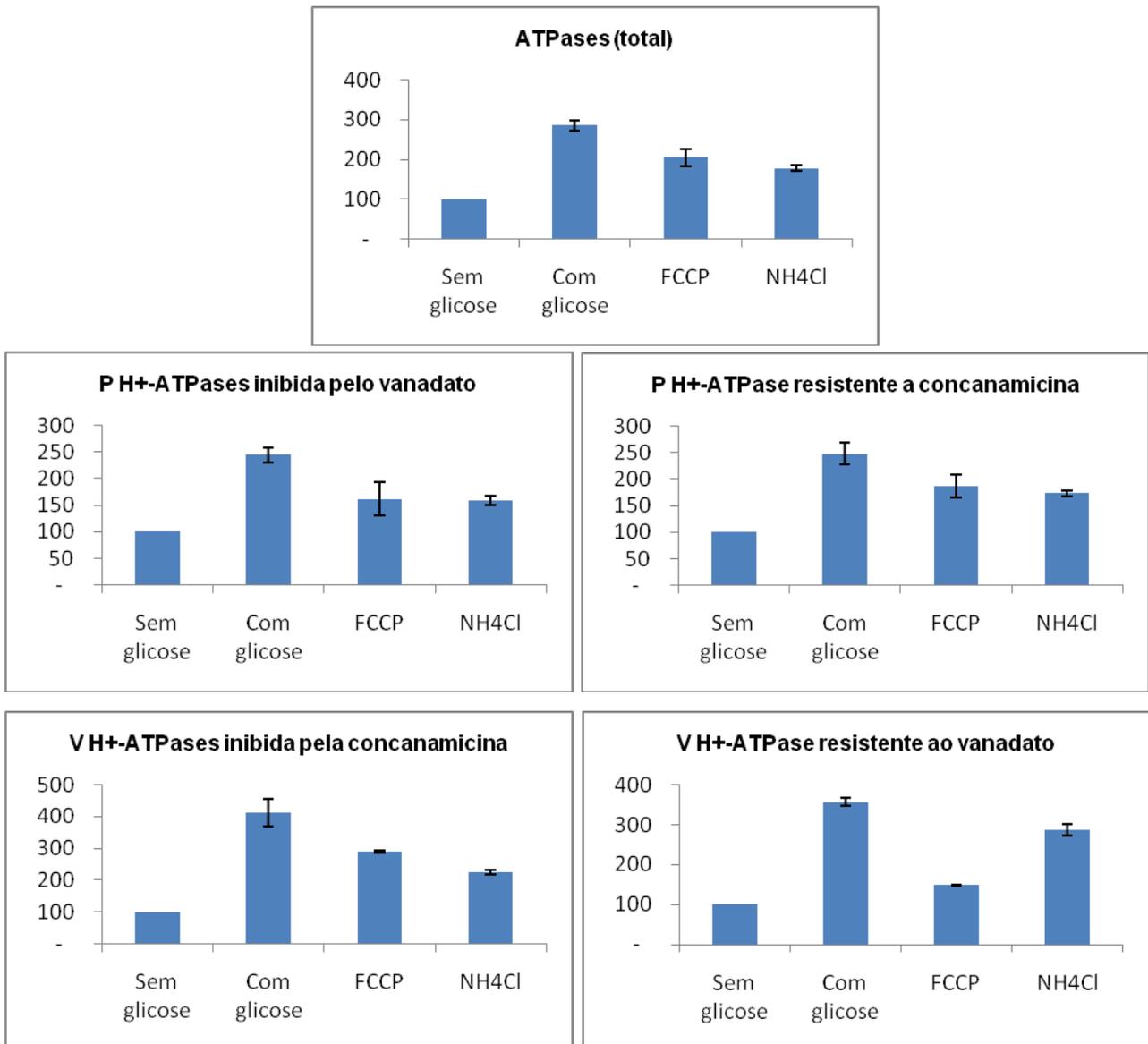


Figura 27. Efeito do FCCP e do NH_4Cl sobre a $F_{\text{máx}}$ de formação do ΔpH (membranas incubadas a pH 8,2). Na versão **sem glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas mais 10 min. sem glicose. Na versão **com glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas 10 min. com glicose. Na versão **com FCCP** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença de 10mM de FCCP logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 10mM de FCCP. Na versão com **NH_4Cl** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença 100mM de NH_4Cl logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 100mM de NH_4Cl . A temperatura de incubação foi de 30°C. Para as análises na presença de vanadato e concanamicina usamos 300mM e 110nM de cada inibidor respectivamente. Os dados foram normalizados como 100% de atividade para os valores obtidos para membranas incubadas sem glicose.

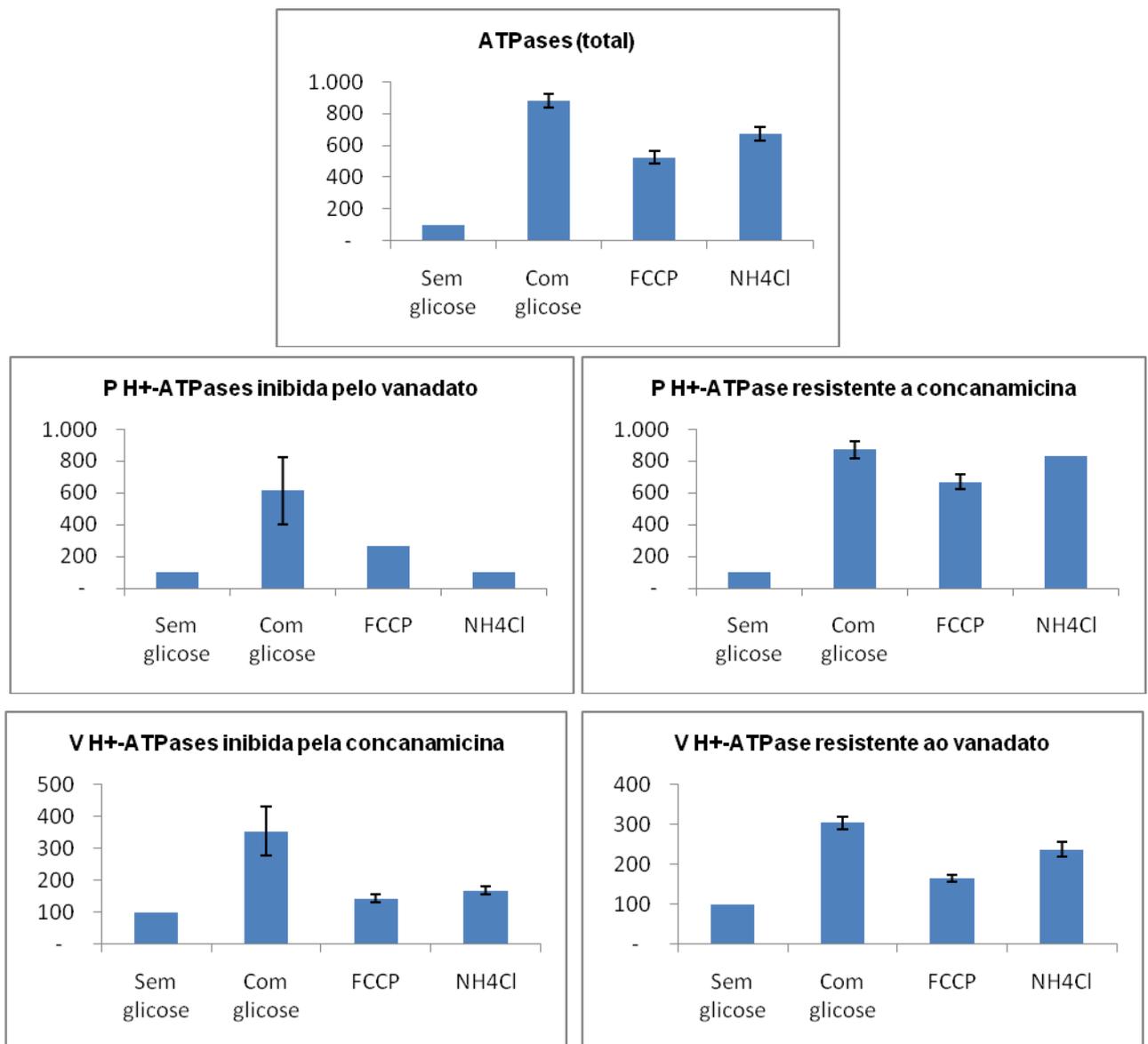


Figura 28. Efeito do FCCP e do NH₄Cl sobre a V₀ de transporte de H⁺ (membranas incubadas a pH 8,2). Na versão **sem glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas mais 10 min. sem glicose. Na versão **com glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas 10 min. com glicose. Na versão **com FCCP** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença de 10mM de FCCP logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 10mM de FCCP. Na versão com **NH₄Cl** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença 100mM de NH₄Cl logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 100mM de NH₄Cl. A temperatura de incubação foi de 30°C. Para as análises na presença de vanadato e concanamicina usamos 300mM e 110nM de cada inibidor respectivamente. Os dados foram normalizados como 100% de atividade para os valores obtidos para membranas incubadas sem glicose.

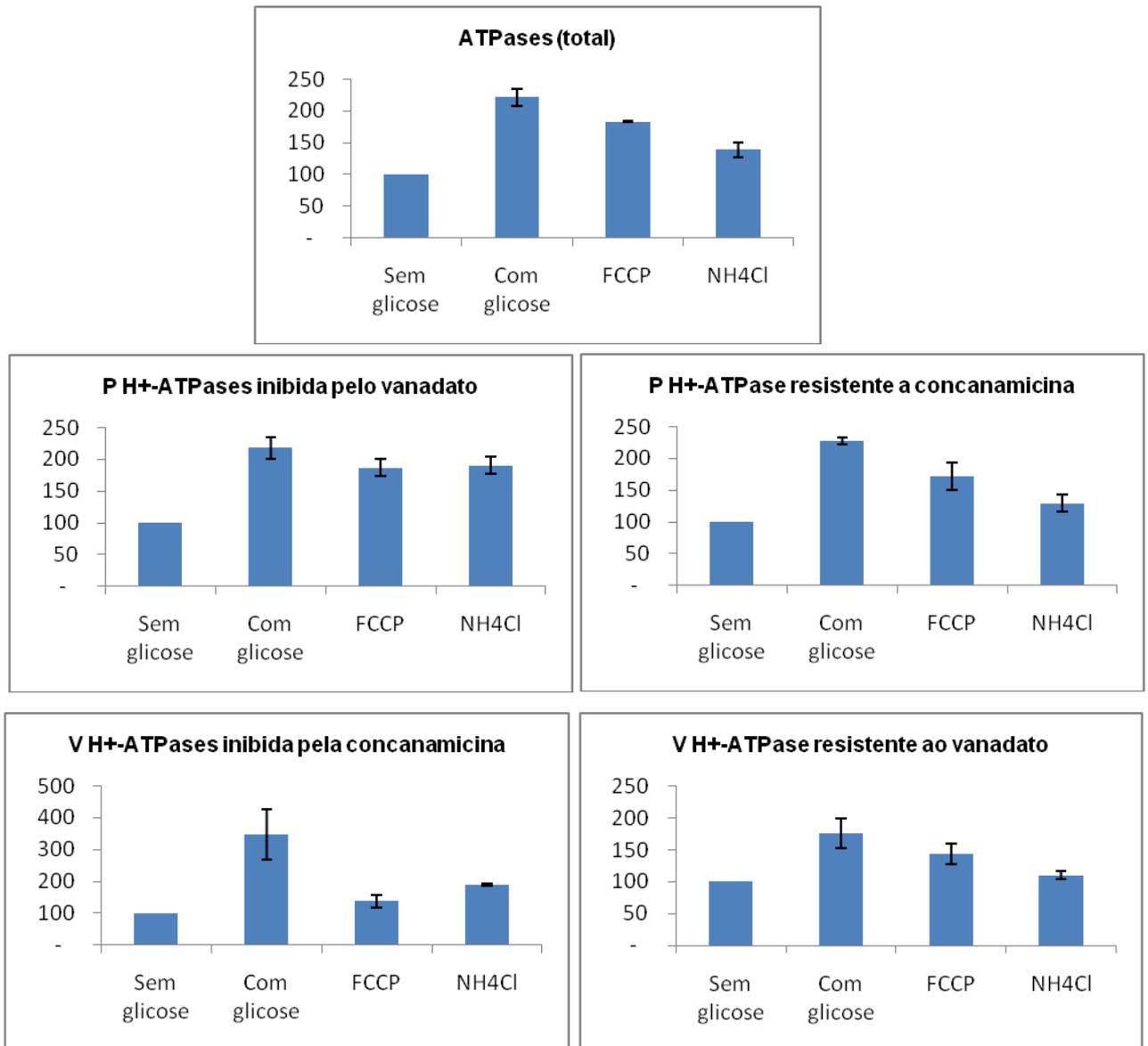


Figura 29. Efeito do FCCP e do NH₄Cl sobre hidrólise de ATP (membranas incubadas a pH 8,2). Na versão **sem glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas mais 10 min. sem glicose. Na versão **com glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas 10 min. com glicose. Na versão **com FCCP** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença de 10mM de FCCP logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 10mM de FCCP. Na versão com **NH₄Cl** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença 100mM de NH₄Cl logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 100mM de NH₄Cl. A temperatura de incubação foi de 30°C. Para as análises na presença de vanadato e concanamicina usamos 300mM e 110nM de cada inibidor respectivamente. Os dados foram normalizados como 100% de atividade para os valores obtidos para membranas incubadas sem glicose.

Pode-se observar que tanto o FCCP quanto o NH_4Cl preveniram parcialmente a estimulação por glicose extracelular, e essa prevenção ocorreu tanto para o transporte de H^+ quanto para hidrólise de ATP, sendo que a prevenção da hidrólise de ATP por $\text{P H}^+\text{-ATPase}$ não foi significativa (figura 29). Em seguida resolvemos analisar se essa prevenção da estimulação por FCCP e NH_4Cl , poderia ser modulada pela mudança do pH, uma vez que o NH_4Cl pode se dissociar melhor em pH mais baixo, por isso mudamos o pH de incubação para 7,7 (figuras 30, 31 e 32).

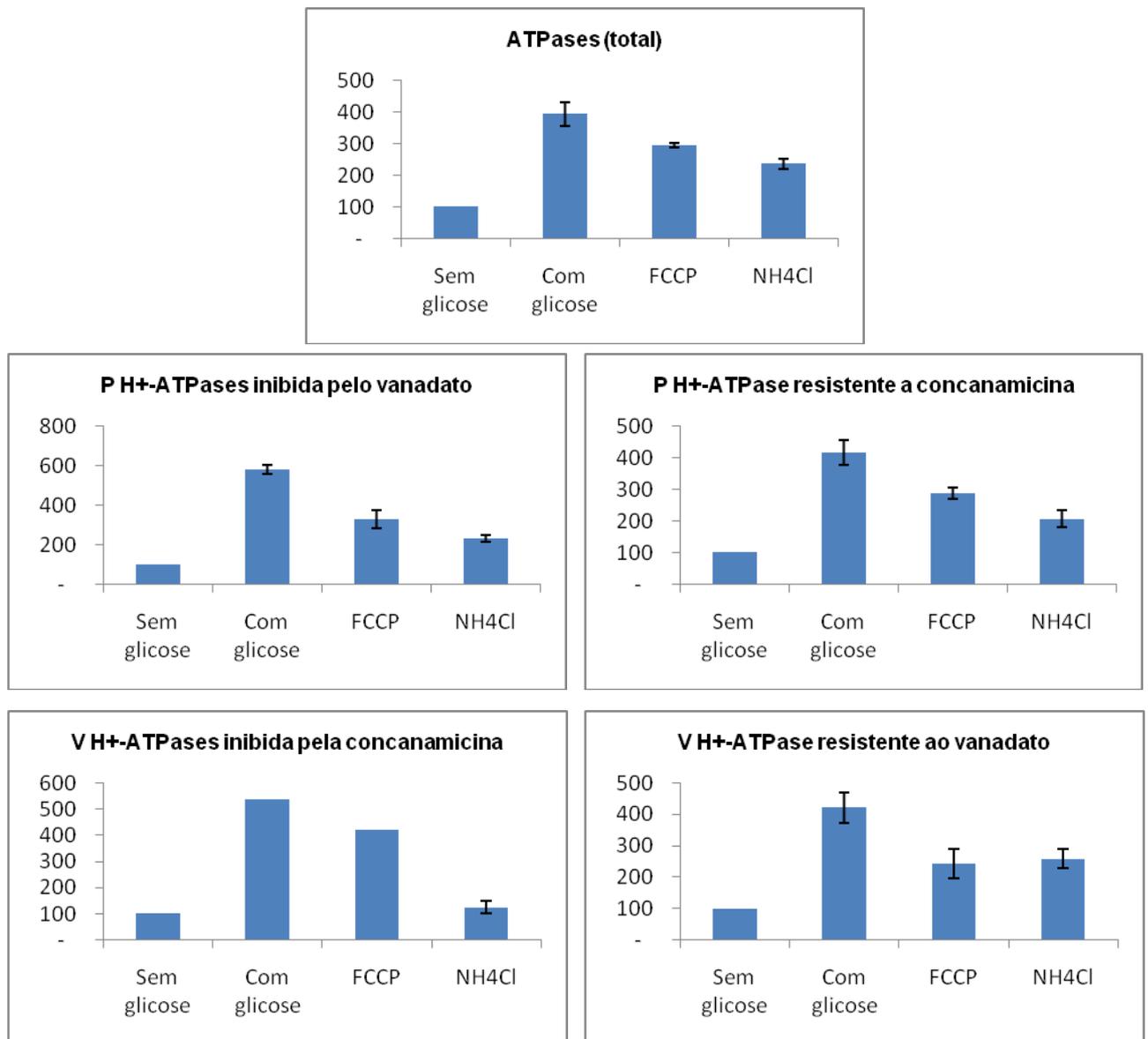


Figura 30. Efeito do FCCP e do NH₄Cl sobre a F_{máx} de formação do ΔpH (membranas incubadas a pH 7,7). Na versão **sem glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas mais 10 min. sem glicose. Na versão **com glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas 10 min. com glicose. Na versão **com FCCP** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença de 10mM de FCCP logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 10mM de FCCP. Na versão com **NH₄Cl** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença 100mM de NH₄Cl logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 100mM de NH₄Cl. A temperatura de incubação foi de 30°C. Para as análises na presença de vanadato e concanamicina usamos 300mM e 110nM de cada inibidor respectivamente. Os dados foram normalizados como 100% de atividade para os valores obtidos para membranas incubadas sem glicose.

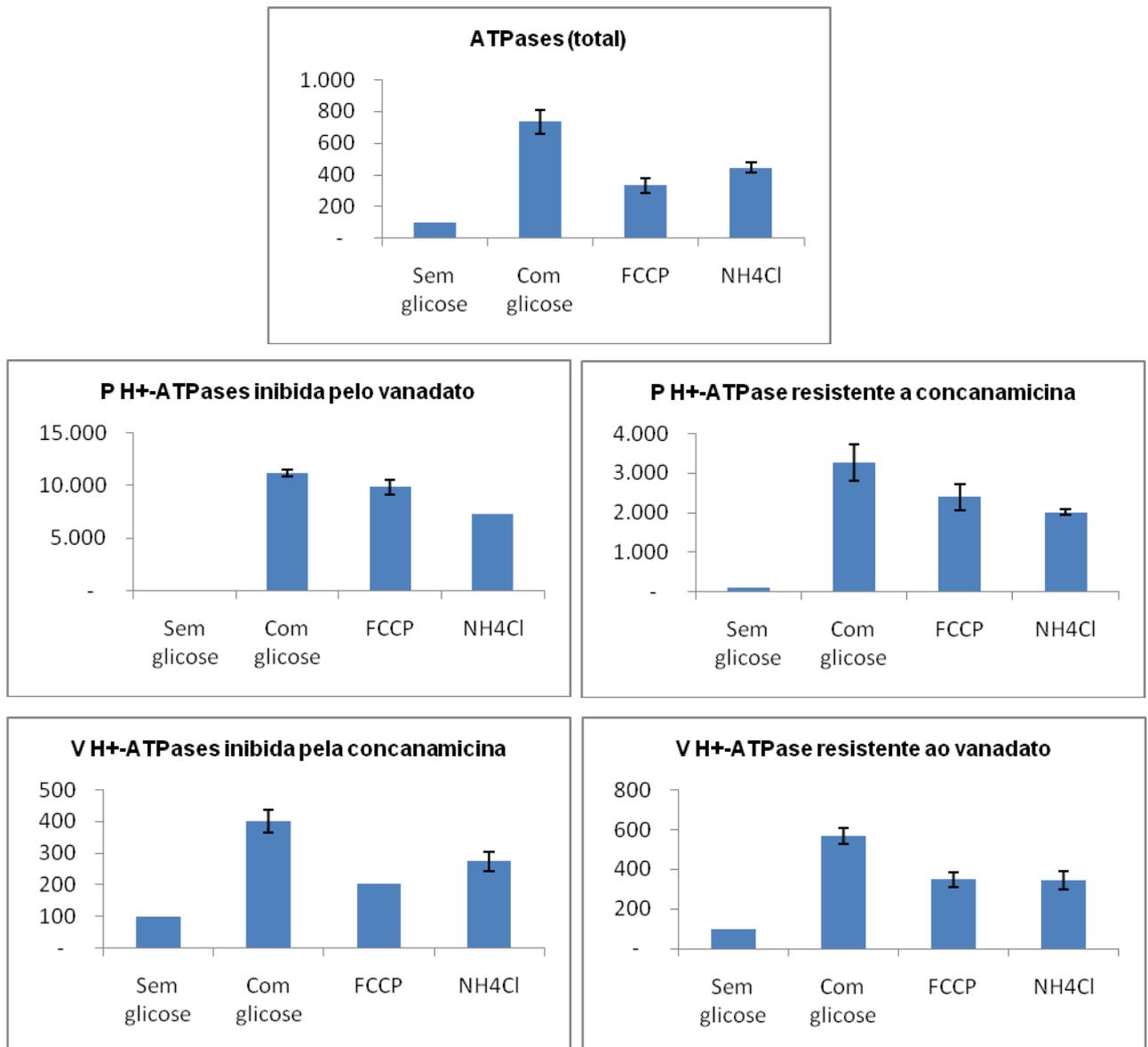


Figura 31. Efeito do FCCP e do NH₄Cl sobre a V₀ de transporte de H⁺ (membranas incubadas a pH 7,7). Na versão **sem glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas mais 10 min. sem glicose. Na versão **com glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas 10 min. com glicose. Na versão **com FCCP** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença de 10mM de FCCP logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 10mM de FCCP. Na versão com **NH₄Cl** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença 100mM de NH₄Cl logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 100mM de NH₄Cl. A temperatura de incubação foi de 30°C. Para as análises na presença de vanadato e concanamicina usamos 300mM e 110nM de cada inibidor respectivamente. Os dados foram normalizados como 100% de atividade para os valores obtidos para membranas incubadas sem glicose.

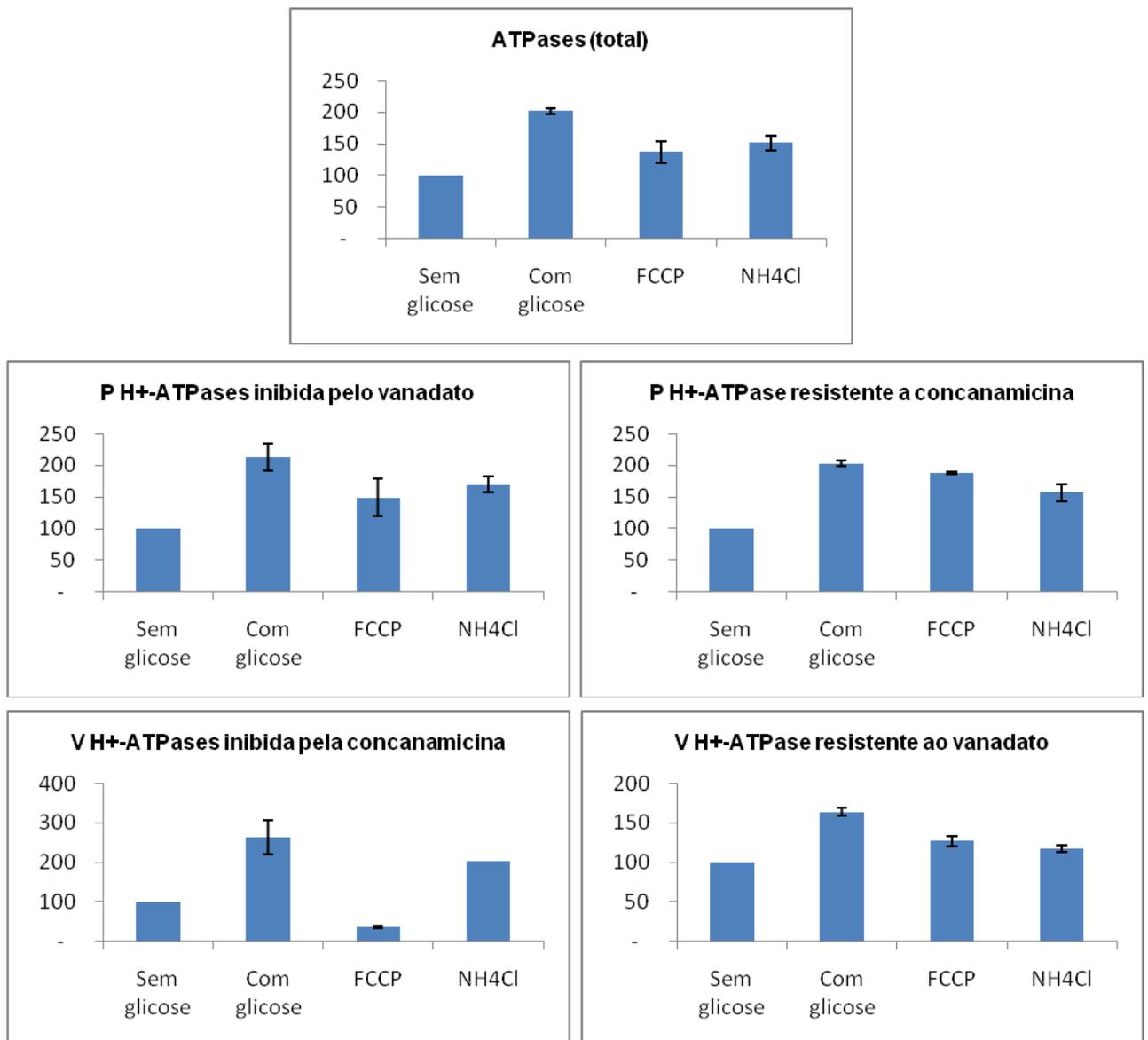


Figura 32. Efeito do FCCP e do NH₄Cl sobre hidrólise de ATP (membranas incubadas a pH 7,7). Na versão **sem glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas mais 10 min. sem glicose. Na versão **com glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas 10 min. com glicose. Na versão **com FCCP** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença de 10mM de FCCP logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 10mM de FCCP. Na versão com **NH₄Cl** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença 100mM de NH₄Cl logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 100mM de NH₄Cl. A temperatura de incubação foi de 30°C. Para as análises na presença de vanadato e concanamicina usamos 300mM e 110nM de cada inibidor respectivamente. Os dados foram normalizados como 100% de atividade para os valores obtidos para membranas incubadas sem glicose.

Em pH 7,7 também ocorreu uma prevenção da estimulação do transporte de H^+ e da mesma forma que foi observado em membranas incubadas em pH 8,2 não verificamos uma prevenção da estimulação significativa sobre a hidrólise de ATP em nenhuma das duas bombas (Figura 32). Acreditamos que a dissociação de NH_4Cl em $NH_3 + H^+$ aumenta do pH 7,2 para o pH 8,2, pois o H^+ liberado na reação deve se ligar a OH^- formando H_2O e aumentando assim o número de NH_3 . Esperamos que a estimulação aumente com o aumento do pH, ou entre em saturação e o efeito do FCCP deve diminuir do pH 7,2 para o pH 8,2, porque a diminuição de H^+ que é necessária para o seu efeito está diminuída, se houverem efeitos colaterais do aumento do pH.

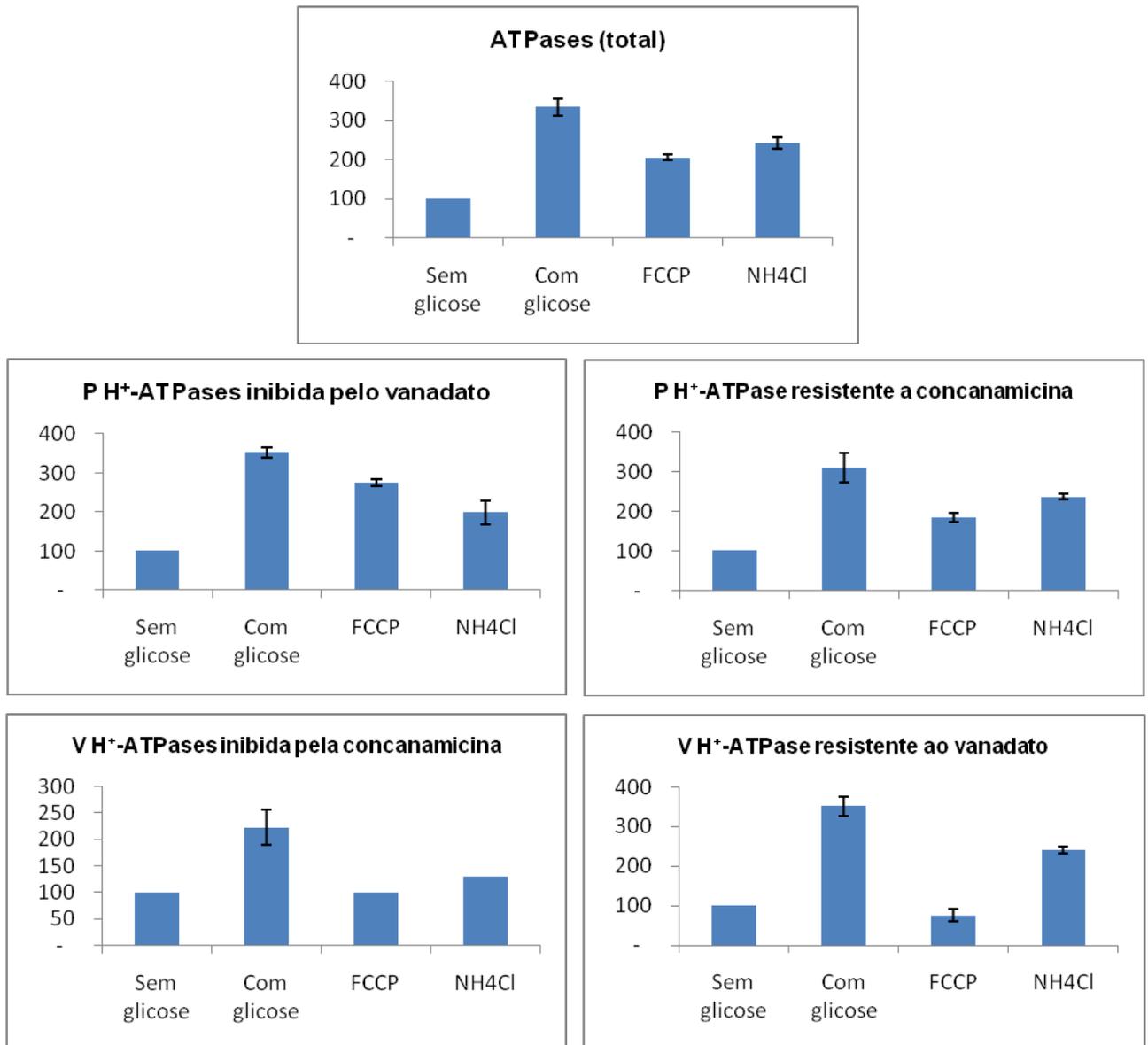


Figura 33. Efeito do FCCP e do NH₄Cl sobre a F_{máx} de formação do ΔpH (membranas incubadas a pH 7,2). Na versão **sem glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas mais 10 min. sem glicose. Na versão **com glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas 10 min. com glicose. Na versão **com FCCP** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença de 10mM de FCCP logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 10mM de FCCP. Na versão com **NH₄Cl** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença 100mM de NH₄Cl logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 100mM de NH₄Cl. A temperatura de incubação foi de 30°C. Para as análises na presença de vanadato e concanamicina usamos 300mM e 110nM de cada inibidor respectivamente. Os dados foram normalizados como 100% de atividade para os valores obtidos para membranas incubadas sem glicose.

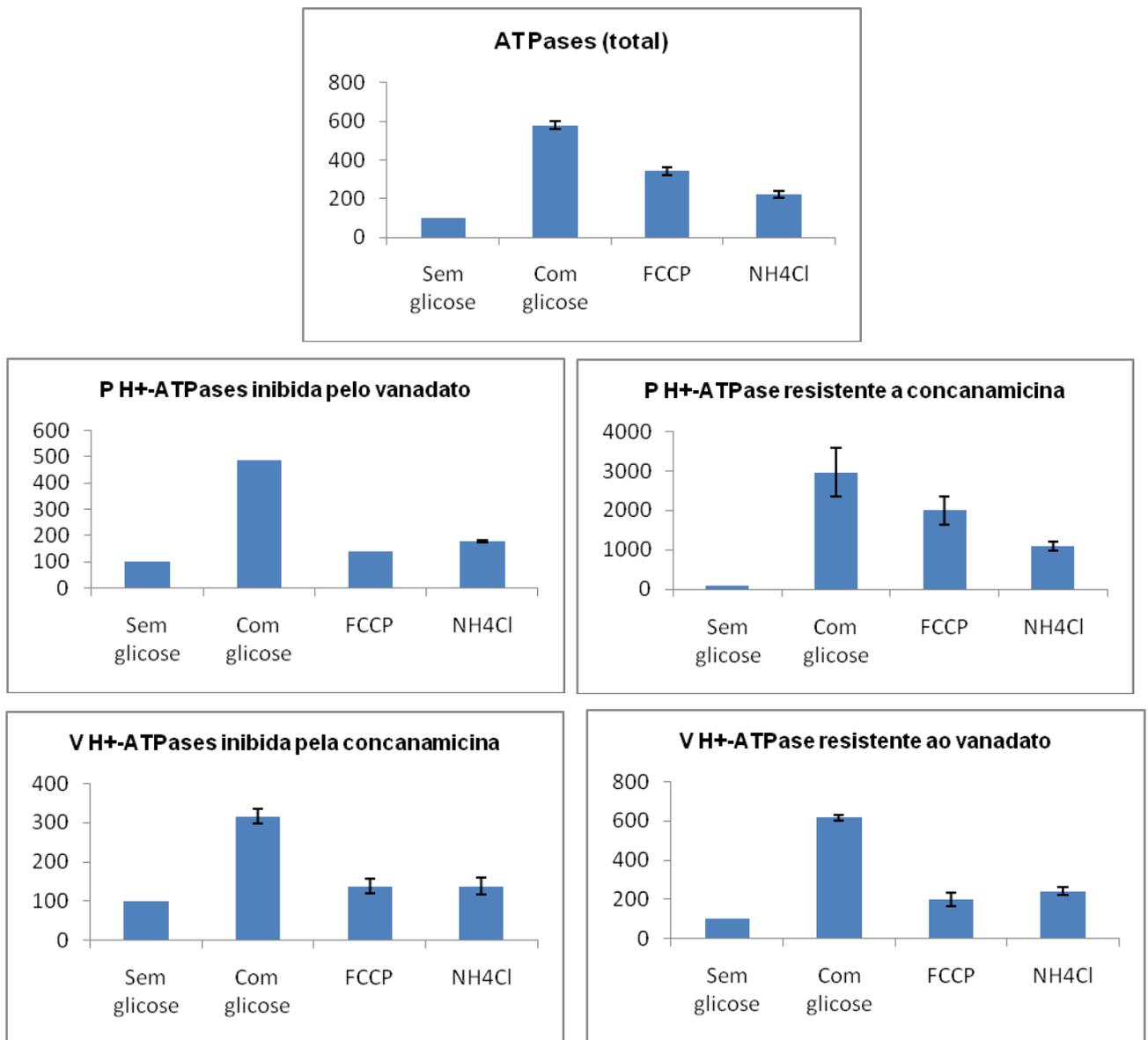


Figura 34. Efeito do FCCP e do NH₄Cl sobre a V₀ de transporte de H⁺ (membranas incubadas a pH 7,2). Na versão **sem glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas mais 10 min. sem glicose. Na versão **com glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas 10 min. com glicose. Na versão **com FCCP** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença de 10mM de FCCP logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 10mM de FCCP. Na versão com **NH₄Cl** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença 100mM de NH₄Cl logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 100mM de NH₄Cl. A temperatura de incubação foi de 30°C. Para as análises na presença de vanadato e concanamicina usamos 300mM e 110nM de cada inibidor respectivamente. Os dados foram normalizados como 100% de atividade para os valores obtidos para membranas incubadas sem glicose.

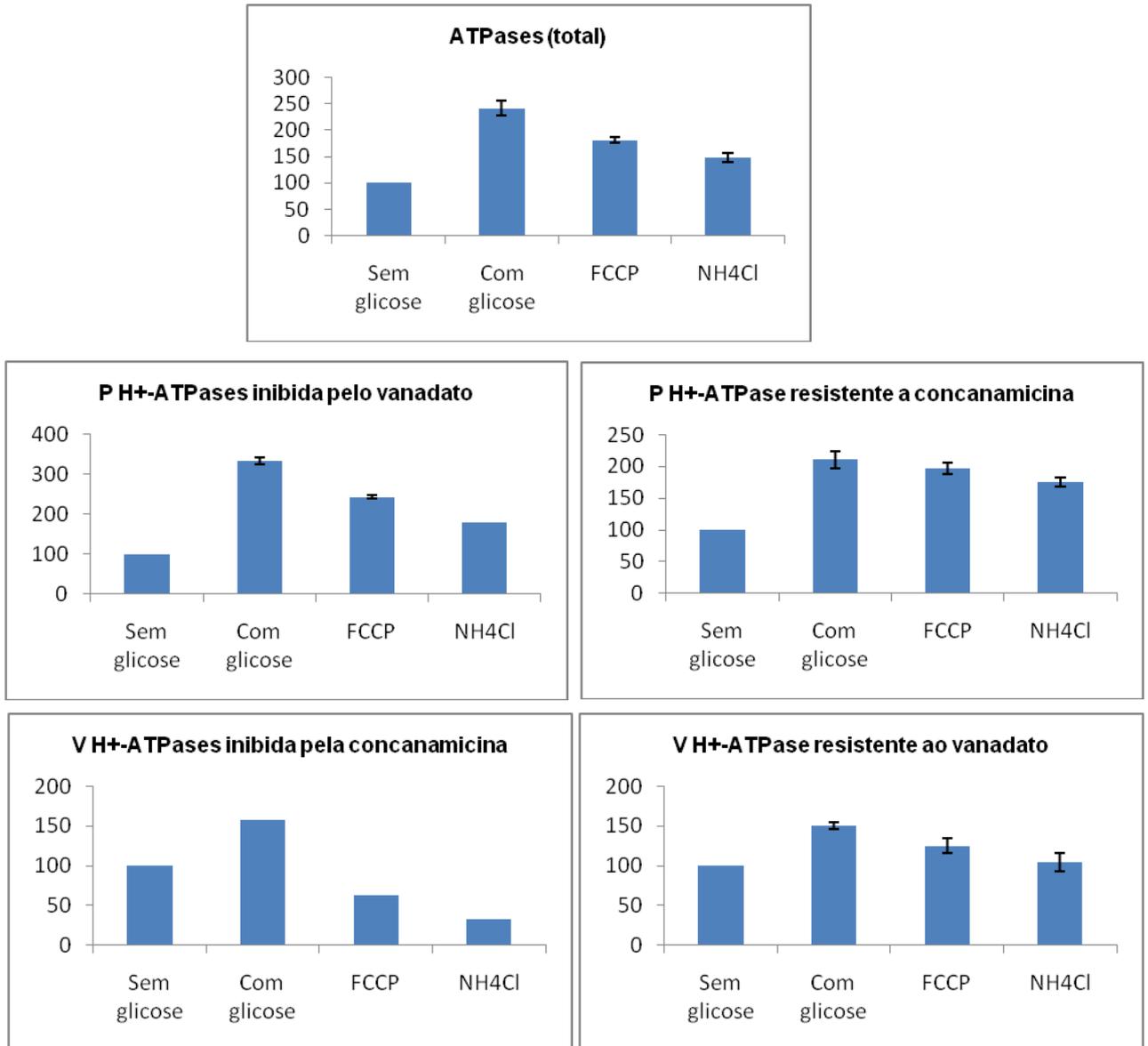


Figura 35. Efeito do FCCP e do NH₄Cl sobre hidrólise de ATP (membranas incubadas a pH 7,2). Na versão **sem glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas mais 10 min. sem glicose. Na versão **com glicose** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose em seguida foram incubadas 10 min. com glicose. Na versão **com FCCP** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença de 10mM de FCCP logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 10mM de FCCP. Na versão com **NH₄Cl** as MT foram incubadas 10 min. sem glicose na presença 100mM de NH₄Cl logo após foram incubadas 10 min. com glicose na presença de 100mM de NH₄Cl. A temperatura de incubação foi de 30°C. Para as análises na presença de vanadato e concanamicina usamos 300mM e 110nM de cada inibidor respectivamente. Os dados foram normalizados como 100% de atividade para os valores obtidos para membranas incubadas sem glicose. Para ATPase total temos 13,94μol Pi/mg prot x 30min para 100%; Para P ATPase inibida por vanadato temos 7,21μol Pi/mg prot x 30min para 100%; Para P ATPase resistente a concanamicina temos 15,06μol Pi/mg prot x 30min para 100%; Para V ATPase inibida por concanamicina temos 1,94μol Pi/mg prot x 30min para 100%; Para V ATPase resistente a vanadato temos 6,73μol Pi/mg prot x 30min para 100%.

Assim como o previsto tanto a $F_{m\acute{a}x}$ quanto V_0 de transporte de H^+ foram estimuladas pela glicose extracelular em pH 7,2 e essa estimulação foi parcialmente prevenida pela adição do protonóforo FCCP e do NH_4Cl , podemos verificar também que a prevenção da estimulação do transporte de H^+ pelas bombas foi maior em pH 7,2 e o FCCP e o NH_4Cl preveniram de forma similar a estimulação das bombas (figuras 33 e 34).

Realizamos western blotting usando anticorpos monoclonais para as subunidades A e B do complexo V_1 de $V H^+$ -ATPase para cada versão do experimento, a fim de verificarmos se existe alguma mudança na imuno reatividade dessas bombas promovida pela alteração no pH pelo FCCP e NH_4Cl na presença de glicose (Figura 36). Nestas condições mudamos a amplitude de gradiente protônico através da membrana, deixando o pH de incubação constante.

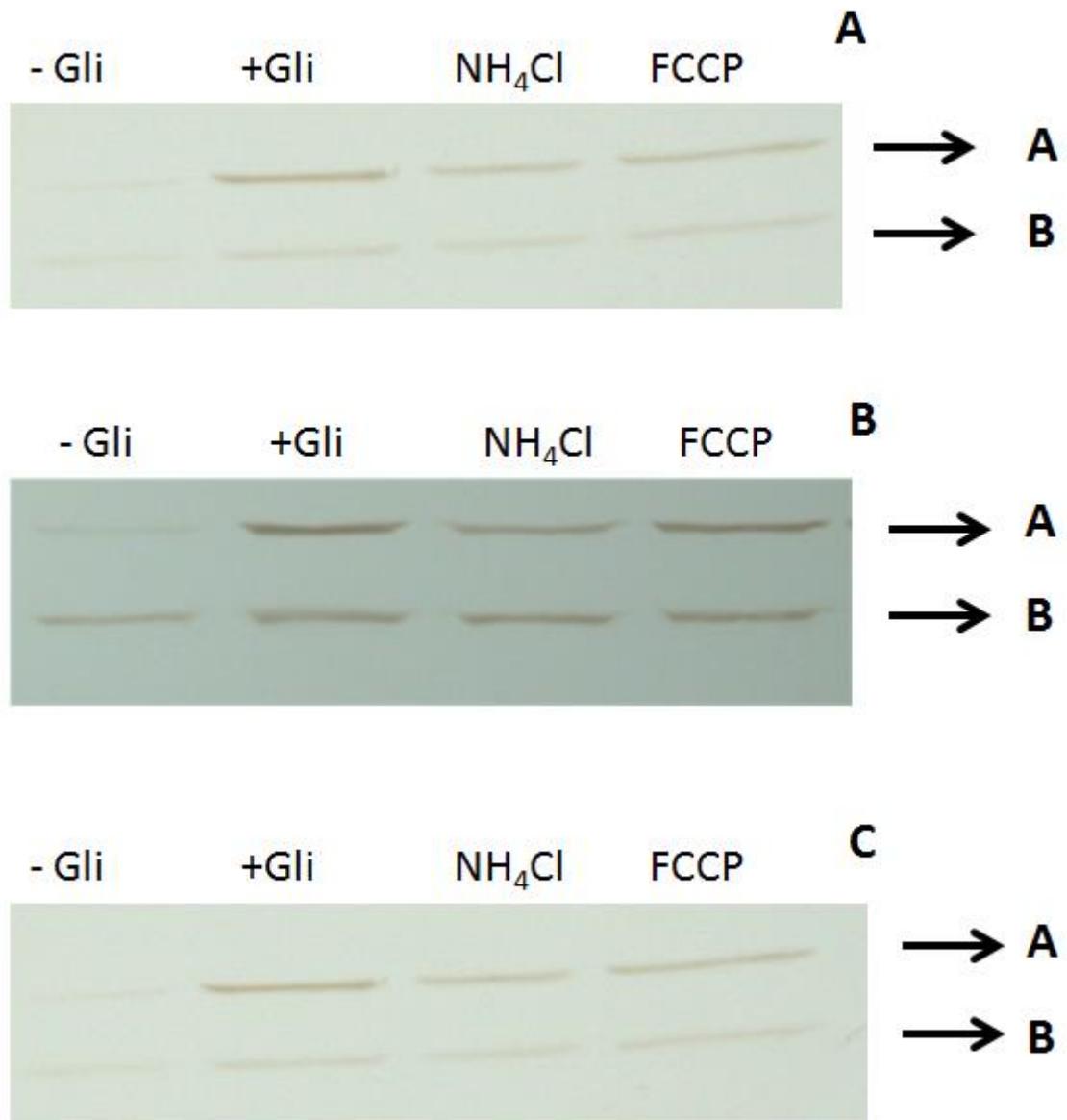


Figura 36 – Efeito do NH₄Cl e do FCCP sobre a imuno reatividade das subunidades A e B da V H⁺-ATPase de membranas totais ativadas pela glicose extracelular. (A) Membranas obtidas a partir de esferoplastos incubados em pH 7,2; (B) Membranas obtidas a partir de esferoplastos incubados em pH 7,7; (C) Membranas obtidas a partir de esferoplastos incubados em pH 8,2.

A imuno reatividade para as subunidades A e B se mostrou mais fraca para as membranas obtidas a partir da incubação dos esferoplastos com FCCP e NH₄Cl (mesmo estes estando na presença de glicose), quando comparadas àquelas obtidas a partir da incubação somente com glicose, para os três valores de pH testados (7,2, 7,7 e 8,2) (Figura 36).

6. DISCUSSÃO

A modulação das atividades tanto de P H⁺-ATPase quanto de V H⁺-ATPase não necessitam de nova síntese de proteína e ocorre após a tradução em cerca de 5 min. (Serrano, 1983; Kane, 1995; Summer *et al.*, 1995; Li & Kane, 2009; Cipriano *et al.*, 2008). No entanto, a regulação de P H⁺-ATPase, baseia-se em modificações bioquímicas, mudança conformacional, modulação da afinidade por ATP e afinidade por seu inibidor o vanadato (Serrano, 1983; Serrano, 1993; Eraso *et al.* 2006, Lecchi *et al.*, 2007). A regulação da atividade de V H⁺-ATPase é considerada como a dissociação física completa/ reassociação de 60-70% entre o complexo catalítico V₁ e o complexo da membrana V₀ (Figura 37, passo A), associação essa que é necessária para o transporte de H⁺ (Beyenbach & Wieczorek, 2006; Li & Kane, 1995; Summer *et al.*, 1995).

Ao analisar todos os resultados de hidrólise de ATP pode-se notar que a inibição da bomba pelo nitrato não mostra alteração significativa entre a enzima ativada e a não ativada, mesmo quando foi usado altas concentrações de ATP (5 mM) ou quando (figuras 10 e 12). Como podemos notar parece que em levedura a incubação no gelo não promove a inativação da enzima, isto é contrário ao obtido por Moriyama & Nelson (1989a), em V H⁺-ATPase de células animais. Esses dados confirmam as previsões do modelo atual para a regulação da V H⁺-ATPase por glicose extracelular. A partir dos dados obtidos onde foi encontrado uma sensibilidade quase idêntica da atividade hidrolítica ao nitrato, nos dois estados da enzima e de acordo com as sugestões do modelo atual da regulação da bomba pela glicose extracelular *in vivo*, o transporte de H⁺ catalisado pelos dois estados da bomba deveria ser igualmente inibido pelo nitrato. No entanto, os dados apresentados aqui não suportam esta previsão do modelo.

1) A igual inibição da atividade hidrolítica pelo nitrato; 2) A sensibilidade mais alta do transporte de H⁺ catalisado pela enzima não ativada ao nitrato; 3) A sensibilidade mais fraca da atividade hidrolítica da enzima não ativada a concanamicina e seu aumento no caso da enzima ativada; 4) A inibição completa do transporte de H⁺ já com baixas concentrações de concanamicina (11-22nM), enquanto a hidrólise é inibida fracamente (20% da inibição com 100 nM enquanto o

nitrate inibe ~100% no caso de enzima não ativada); 5) O aumento de acoplamento entre o transporte de H^+ e a hidrólise de ATP da enzima ativada. Visto que a concanamicina reage/interfere com V_1 indiretamente através da sua ligação com V_0 , a inibição da atividade hidrolítica de V_1 tem dependência completa da força de interação entre V_1 e V_0 . Portanto é lógico sugerir que o conjunto destas razões nos permite concluir que a ativação da enzima pela glicose extracelular aumenta a força de interação entre V_1 e V_0 .

Comparando os resultados sobre a hidrólise de ATP e o transporte de H^+ , pode-se observar que o transporte de H^+ diminuiu mais rapidamente do que a hidrólise de ATP, tanto para enzima ativada quanto para a enzima não ativada. Isto evidencia que o nitrate desacopla os dois processos catalisados pela bomba. A mudança no acoplamento entre as duas reações catalisadas pela $V H^+$ -ATPase não ativada foi descrito para leveduras e vacúolos de plantas (Moriyama & Nelson, 1987; Moriyama & Nelson, 1988; Muller et al., 1999; Kettner et al., 2003), mas até o momento nunca foi descrito que o efeito de desacoplamento foi menos eficiente para enzima ativada. A capacidade de acoplamento da enzima foi aumentada pela glicose extracelular (Figura 16). De acordo com o modelo atual, o aumento no número de moléculas de enzima associadas é igual ao aumento na atividade dos dois processos, transporte e hidrólise de ATP promovido pela bomba (Figura 37, passo A), e a glicose extracelular não pode modificar o acoplamento da enzima. Em contradição com a previsão do modelo atual, os dados obtidos mostram que a capacidade de acoplamento entre os dados estados da bomba foi maior na enzima ativada (Figura 16) e essa diferença na capacidade de acoplamento entre os dois estados da bomba foi maior com o aumento da concentração de nitrate.

Foi encontrado uma pequena subpopulação de enzimas que é inibida com 5 mM de KNO_3 nos dois estados da enzima em que a eficiência de acoplamento foi de 5,5 e 6,2 vezes maior do que a eficiência de acoplamento para os dois estados na ausência de nitrate (Figura 17). Contudo o aumento na concentração de nitrate revelou que o restante das moléculas da enzima exibiram o acoplamento similar com o apresentado quando as enzimas não foram tratadas com KNO_3 (Figura 17).

Os dados de transporte de H^+ , promovida pela $V H^+$ -ATPase em organelas da via secretória, foi observado que essas bombas podem ser inibidas (reguladas) de

forma diferenciada pelo nitrato, o que está de acordo com a existência de formas distintas e funcionais da enzima nas organelas da via secretória de levedura (Figuras 18-21) (Samarao *et al.* 2009).

Sobre a cinética da V H^+ -ATPase, o modelo mecânico prevê uma modulação idêntica de $V_{m\acute{a}x}$ para a hidrólise de ATP e transporte de H^+ (Figura 37, passo A), uma afinidade idêntica ao ATP para as reações catalisadas pela enzima nos dois estados. Em nossas análises foi verificado que a glicose extracelular aumentou a $V_{m\acute{a}x}$ para a hidrólise de ATP 2,7 vezes (figura 25), como era o esperado pelo modelo mecânico; No entanto, a $V_{m\acute{a}x}$ para o transporte de H^+ aumentou 6,7 vezes (figura 23), o que é significativamente maior do que o previsto pelo modelo.

O modelo atual prevê que a V H^+ -ATPase deve apresentar uma modulação idêntica da $V_{m\acute{a}x}$ para hidrólise de ATP e transporte de H^+ e uma afinidade idêntica para as duas reações catalisadas por ambos os estados da bomba. O efeito encontrado no presente trabalho foi que a afinidade de ATP para os dois estados de enzima foi seletiva. Embora o K_m para o transporte de H^+ tenha aumentado com a diminuição da $V_{m\acute{a}x}$ em resposta à ausência de glicose, a sua afinidade para a hidrólise de ATP aumentou (Figuras 23 e 25). Esta propriedade da V H^+ -ATPase difere da apresentada por P H^+ -ATPase, na qual foi evidenciado a diminui da $V_{m\acute{a}x}$, mas também o aumento do K_m para atividade hidrolítica em condições de deficiência de glicose (Serrano, 1983). Esta diferença entre as duas bombas provavelmente ocorre devido à sua especificidade fisiológica. Considerando que a P H^+ -ATPase energiza a MP para o transporte de solutos, durante o crescimento e divisão celular, utilizando H^+ fornecidos pela glicólise, quando a glicose está disponível, e que tem que diminuir essa atividade quando a glicose acaba. A V H^+ -ATPase deve continuar as suas funções mesmo com o “decrécimo” de glicose, energizando as membranas da via secretória, para que a mesma não pare completamente, por exemplo, transportando a invertase e as fosfatases, proteases etc. com alvo de fornecer os novos substratos.

Um importante resultado foi o aumento da imuno reatividade da subunidade A catalítica e da subunidade B regulatória, promovida pela glicose extracelular (Figura 26). Segundo o modelo atual, os aumentos na imuno reatividade destas subunidades reflete a reassociação dos V_1 e V_0 , por conseguinte, não pode ser diferente da proporção de 1:1 entre as subunidades do complexo V_1 (Sumner *et al.*,

1995; Kane, 1995). A modulação assimétrica da imuno reatividade das subunidades A e B encontrados em nossos experimentos contradiz o atual modelo de regulação da enzima (Figura 37, passo A). Interessante, que mesmo a equipe de Kane achou recentemente que a modulação da imuno resposta de subunidades C ,A, B não é simétrica e portanto, esta em contradição com o seu modelo de regulação da enzima. É estranho que este fato não chamou a atenção adequada dos autores (Diakov & Kane, 2010).

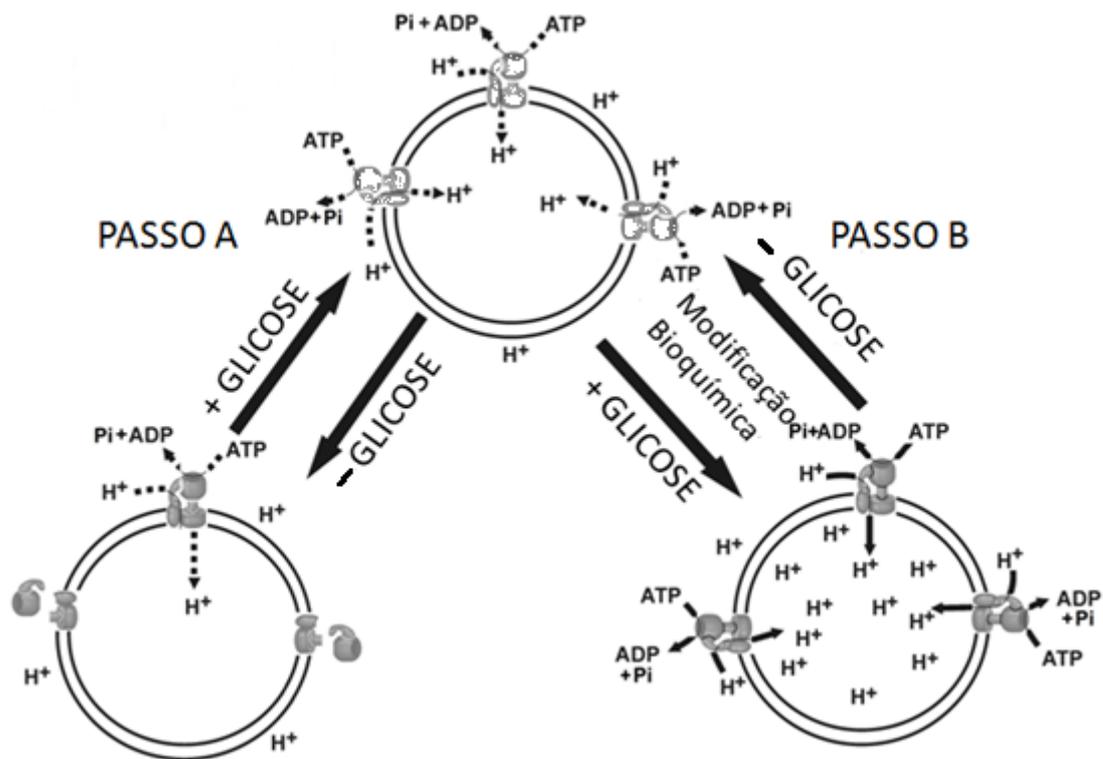


Figura 37 - Efeito sugerido da glicose extracelular sobre a atividade das V H⁺-ATPases em *Saccharomyces cerevisiae*.

A P H⁺-ATPase, em particular, é ativada em resposta a acidificação citosólica (Lu *et al.*, 2004) e, provavelmente, este modo de regulação é importante para a manutenção do pH citosólico em um pequeno intervalo de tempo.

Vários trabalhos investigaram se a atividade de V H⁺-ATPases também responde ao pH extracelular (Padilla-López & Pearce, 2006; Martínez-Muñoz & Kane, 2008; Diakov & Kane, 2010). Foi mostrado que a capacidade de acidificar o

vacúolo é regulada negativamente durante o crescimento em meio com pH baixo (Padilla-López & Pearce, 2006). Adicionalmente, foi demonstrado que há uma diminuição na montagem das subunidades V_0 e V_1 da $V H^+$ -ATPase quando as células são cultivadas em pH baixo. No entanto, a diminuição dos níveis do complexo da $V H^+$ -ATPase no vacúolo ou a diminuição na montagem das subunidades V_0 e V_1 não são unicamente responsáveis pela diminuição do transporte de H^+ em pH baixo (Padilla-López & Pearce, 2006). Acredita-se que outros mecanismos de regulação não identificados possam estar envolvidos na regulação da atividade da $V H^+$ -ATPase e na manutenção do pH vacuolar, em meio com pH baixo.

Até o presente, a razão chave, ou seja o sinal/condição principal ou uma das principais sobre a estimulação da atividade de ambas bombas protônicas não foi revelada. Foi achado que as conhecidas vias da sinalização não estão envolvidas neste importante processo (Martinez-Munoz & Kane, 2008). No caso da ativação da atividade hidrolítica de $P H^+$ -ATPase foi demonstrado que a existência de gradiente protônico através de MP é crucial. Foi achado também que a curta incubação de esferoplastos com glicose (~10 minutos) na presença de ionóforos como nigericina ou CCCR preveniu fortemente o aumento da atividade enzimática determinada na presença apenas de glicose (Petrov & Okorokov, 1992). Recentemente foi também comunicado que o crescimento de levedura em pH 7 aumenta a atividade de $V H^+$ -ATPase em comparação com a enzima quando o crescimento foi em pH 5,0 (Martinez-Munoz & Kane, 2008). Portanto, foi verificado se a incubação curta de esferoplastos com pH 7,2-8,2 já é suficiente para ativação da enzima mais efetiva ou o gradiente de H^+ através de MP é crucial. A partir desse conhecimento tentamos verificar como alterações no pH intracelular promovido por FCCP e NH_4Cl podem alterar a estimulação das bombas por glicose extracelular, o FCCP é capaz de destruir o gradiente de H^+ através das membranas, aumentando o pH citosólico, e o NH_4Cl extracelular pode se dissociar em NH_3 o qual pode entrar no citosol e se ligar aos prótons presentes no mesmo, diminuindo assim o gradiente protônico. Verificamos que tanto o FCCP quanto o NH_4Cl podem prevenir parcialmente a estimulação das bombas por glicose extracelular (Figuras 27 – 35), sendo que essa prevenção é maior sobre o transporte de H^+ e também podem alterar (diminuir) a imuno reatividade das subunidade A e B, quando comparados com a imuno

reatividade de esferoplastos incubados com glicose (Figura 36), era esperado encontrar que a dissociação de NH_4Cl em $\text{NH}_3 + \text{H}^+$ aumenta do pH 7,2 para o pH 8,2, pois o H^+ liberado na reação deve se ligar a OH^- formando H_2O e aumentando assim o número de NH_3 . Era esperado também que a estimulação aumente com o aumento do pH, ou entre em saturação e o efeito do FCCP deveria diminuir do pH 7,2 para o pH 8,2, porque a diminuição de H^+ que é necessária para o seu efeito está diminuída, se não houverem efeitos colaterais do aumento do pH, mas nesses experimentos não mostram uma mudança significativa entre o efeito do FCCP e efeito do NH_4Cl variando o pH, o que se pode observar claramente é efeito de prevenção da estimulação pela glicose desses dois compostos, mostrando assim o papel da energização da membrana para a ativação de P e V H^+ -ATPases.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi aprofundado o conhecimento sobre: 1) o mecanismo de regulação da V H^+ -ATPase pela glicose extracelular usando a levedura como modelo e 2) as condições-chaves e o “gatilho” desta regulação.

I. O modelo atual da regulação da enzima baseado na dissociação/associação dos complexos V_1 e V_0 (Kane1995), predisse um aumento igual a 2-3 vezes da atividade hidrolítica, a velocidade de transporte de H^+ , a imunoreatividade das subunidades A e B e de seu conteúdo proteico. Sem qualquer modificação das suas propriedades cinéticas e acoplamento entre a hidrólise e o transporte de H^+ . Foi achado que este modelo não é capaz de explicar as novas propriedades da enzima descobertas em nosso trabalho, ou seja:

a) O nitrato, um inibidor da enzima no nível do complexo catalítico V_1 , inativou igualmente as atividades hidrolíticas da enzima de membranas totais ativadas e não ativadas, mas revelou uma sensibilidade significativamente maior da inativação do transporte de H^+ catalisada pela enzima não ativada.

b) O nitrato desacoplou as duas atividades de V H^+ -ATPase mais efetivamente no caso da enzima não ativada.

c) Os diferentes efeitos de nitrato sobre a enzima ativada ou não de membranas totais foram reproduzidos com membranas de Vacúolos, Golgi e Reticulo Endoplasmático. Foi adicionalmente achado que a enzima não ativada de RE é extremamente sensível à inibição pelo nitrato;

d) Em resposta a variações de condições energéticas a V H^+ -ATPase modifica não somente sua velocidade máxima mas também a sua afinidade ao ATP;

e) A enzima ativada apresenta um aumento assimétrico da imunoreatividade de subunidade A (até 9,3 vezes) e subunidade B (até 2,4 vezes), que combina respectivamente com o aumento assimétrico da velocidade inicial de transporte de H^+ (até 6,7 vezes) e de hidrólise de ATP (até 2,7 vezes).

f) A ativação da V H^+ -ATPase pela glicose extracelular aumenta também assimetricamente a imunoreatividade das suas subunidades A e B ou seja, até 9,3 e 2,4 vezes respectivamente sem nenhum aumento do seu conteúdo proteico.

g) A sensibilidade a concanamicina da atividade hidrolítica da enzima ativada aumentou quase 5 vezes comparando com a o nitrato, refletindo o aumento significativo da força de interação entre os complexos V_1 e V_0 .

Estas novas propriedades da $V H^+$ -ATPase rejeitam o atual modelo mecânico da sua regulação pela glicose extracelular baseado na completa dissociação/reassociação física dos complexos V_1 e V_0 . Elas justificam uma nova concepção sobre a regulação, ou seja, a enzima ativada muda sua conformação que causa um pacote de novas propriedades enzimáticas, incluindo as modificações da sensibilidade aos inibidores, de afinidade ao ATP tanto de hidrólise de ATP quanto do transporte de H^+ e aumento da força de ligação entre V_1 e V_0 com o seguinte aumento do acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte de H^+ .

II. Sabendo que nenhuma via de regulação conhecida até o momento em levedura esta envolvida na regulação de $V H^+$ -ATPase pela glicose extracelular (Kane, 2006) e que a ativação de atividade hidrolítica de $P H^+$ -ATPase necessita da energização da membrana plasmática (Petrov & Okorokov, 1992) verificamos a possível importância da energização da membrana para ativação de $V H^+$ -ATPase e $P H^+$ -ATPase. Os dados da prevenção parcial tanto da ativação das (V e $P H^+$ -ATPases) de ambas H^+ -ATPases pelo NH_4Cl FCCP que dissipam os gradientes protônicos e aumentam a imuno reatividade das subunidades A e B indicam que:

a) a energização da membrana plasmática e provavelmente de membranas da via secretória é uma condição chave para ativação destas bombas de H^+ ;

b) o “gatilho” desta ativação é a acidificação do citosol como resultado da glicólise quando as membranas tem um gradiente de H^+ .

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, I., Arai, H, Pimentel, R., Forgac, M. (1990). Proteolysis and orientation on reconstitution of the coated vesicle próton pump. *J. Biol. Chem.* 265: 960-966.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (1999). *Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula.* 1 ed. Artmed, 1999.
- Akke, M., Forsen, S. (1990). Protein stability and electrostatic interactions between solvent exposed charged side chains. *Proteins* 8: 23–29.
- Ali, M., Rellos, P., Cox, T.M. (1998). Hereditary fructose intolerance. *J Med Genet* 35: 353-365.
- Alves, O. T. (2006). Estudo dos transportadores de H⁺ e Ca²⁺ em vesículas secretórias do mutante *sec6-4* da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Monografia apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, para obtenção do título de biólogo, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases, Rio de Janeiro.
- Arai, H., Berne, M., Terres, G., Terres, H., Puopolo, K., Forgac, M. (1987). Subunit composition and ATP site labeling of the coated vesicle próton-translocating adenosinetrisphosphatase. *Biochem.* 26(21):6632-8.
- Arino, J., Ramos, J., Sychrova, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 74: 95-120.
- Arnold, H., Pette, D. (1970). Binding of Aldolase and Triosephosphate Dehydrogenase to F-Actin and Modification of Catalytic Properties of Aldolase. *European Journal of Biochemistry* 15: 360–366.
- Axelsen, K.B., Palmgren, M.G. (1998). Evolution of Substrate Specificities in the P-Type ATPase Superfamily. *Journal of Molecular Evolution* 46: 84-101.

- Barkla, B.J., Pantoja, O. (1996). Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:159-184.
- Bastani, B., Purcell, H., Hemken, P., Trigg, D., Gluck, S. (1991). Expression and distribution of renal vacuolar proton-translocating adenosine triphosphatase in response to chronic acid and alkali loads in the rat. *J. Clin. Invest.* 88(1): 126–136.
- Bauerle, C., HO, M. N., Lindorfer, M. A., Stevens, T. H. (1993). The *Sccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-KDa subunit of the vacuolar H⁺-ATPase membrane sector. *J. Biol. Chem.* 268: 12749-12757.
- Beyenbach, K.W & Wiczorek, H. (2006). The V-type H⁺-ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Experimental Biology* 209: 577-589. (Review).
- Brown, D., Sabolic, I., Gluck, S. (1992). Polarized targeting of V-ATPase in kidney epithelial cells. *J. exp. Biol.* 172: 231-243.
- Bowman, E. J., Mandala, S., Taiz, L. And Bowman, B. J. (1986). Structural studies of the vacuolar membrane ATPase from *Neurospora crassa* and comparison with the tonoplast membrane ATPase from *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 48-52.
- Bowman, B.J., Bowman, E.J. (1988). Purification of vacuolar membranes, mitochondria, and plasma membranes from *Neurospora crassa* and modes of discriminating among the different H⁺-ATPases. *Methods Enzymol.*, 157:562-73.
- Bowman, E. J., Siebers, A. and Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7972-7976.
- Bowman, B.J., Bowman, E.J. (2002). Mutations in subunit C of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site. *J Biol Chem.* 277(6): 3965-72.

- Boyer, P.D. (1997). The ATP synthase-a splendid molecular machine. *Annu Rev. Biochem.* 67: 717-749.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72: 248-254.
- Breton, S., Smith, P., Lui, B., Brown, D. (1996). Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Natl. Med.* 2: 470-473.
- Cagnac, O., Leterrier, M., Yeager, M., Blumwald, E. (2007). Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282: 24284–24293.
- Carmelo, V., Santos, H., Sa´-Correia, I. (1997). Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1325: 63–70
- Casey, J. R., Grinstein, S., Orlowski, J. (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 50-61.
- Catty, P., d'Exaerde, A. K., Goffeau, A. (1997). The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett.*, 409: 325-332.
- CHANG, A., SLAYMAN, C. W., (1991). Maturation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell. Biol.* 115(2), 289-295
- Chen SH, Bubb MR, Yarmola EG, Zuo J, Jiang J, et al. (2004). Vacuolar H⁺-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B. *J. Biol. Chem.* 279: 7988–7998.

- Cipriano, D. J., Wang, Y., Bond, S., Hinton, A., Jefferies, KC., Qi, J. and Forgac, M. (2008). Structure and Regulation of the Vacuolar ATPases, *Biochim Biophys Acta*. 1777: 599–604.
- Clague, M. J., Urbe, S., Aniento, F., Gruenberg, J. (1994). Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 269: 21-24.
- Cruciat, C. M., Ohkawara, B., Acebron, S. P., Karaulanov, E., Reinhard, C., Ingelfinger, D., Boutros, M., Niehrs, C. (2010). Requirement of prorenin receptor and vacuolar H⁺-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science* 327: 459-463.
- Cunningham, K. W., Fink, G. R. (1994). Ca²⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Exp. Biol.* 196: 157-166.
- David, L N., Michael, M. C., (2011). Pricípios de Bioquímica de Lehninger. 5 ed. Artmed, 2011.
- Dechant, R., Binda, M., Lee, S. S., Pelet, S., Winderickx, J., Peter, M. (2010) Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *EMBO J* 29: 2515-2526.
- Den Hollander, J. A., Ugurbil, K., Brown, T. R., Shulman, R. G. (1981). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the effect of oxygen upon glycolysis in yeast. *Biochemistry* 20: 5871-5880.
- Diakov, T. T., Kane, P. M. (2010). Regulation of vacuolar proton-translocating ATPase activity and assembly by extracellular pH. *J. Biol. Chem.* 30;285(31):23771-8.
- Dietz, K. J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S. S., Harris, G. C., Chardonens, A. N., Golldack, D. (2001). Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J. Exp. Bot.*, 52: 1969-1980.

Dixon N, Pali T, Kee TP, Ball S, Harrison MA, et al. (2008) Interaction of spinlabeled inhibitors of the vacuolar H⁺-ATPase with the transmembrane Vosector. *Biophys. J.* 94: 506–514.

Dixon N, Pali T, Kee TP, Marsh D (2004) Spin-labelled vacuolar-ATPase inhibitors in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1665: 177–183.

Dröse, S., Bindseil, K.U., Bowman, E.J., Siebers, A.Zeeck,A., Altendorf, K.(1993). Inhibitor effect of modified bafilomycins and concanamycin on P and V type adenosinetrisphosphatases. *Biochem.* 32: 3902-3906.

Dröse, S., Altendorf, K., (1996). Bafilomycins and concanamycin as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J.Exp. Biol.* 200: 1-8.

Eraso, P., Gancedo, C. (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* 224: 187–192

Eraso, P., Mazón M. J. and Portillo, F. (2006). Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates in vitro the C-terminal peptide of the H⁺-ATPase. *Biochi.Biophys.Acta-Biomembranes.1758:* 164-170.

Eraso & Portillo, (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H(+)-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *FEBS Lett.* 156, 11-14.

Finbow, M.E., Harrison, M.A. (1997). The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem. J.* 324: 697-712.

Forgac, M. (1998). Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺) ATPase. *FEBS Lett.* 440 (3): 258-63.

Forgac, M. (1999a). Structure and properties of the vacuolar H⁺-ATPase. *J. Ext. Chem.* 274(19): 12951-12954.

Forgac, M. (1999b). Structure, mechanism and regulation of the chalcone-coated vesicle on yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J. Exp. Biol.* 203: 71-80.

Forgacs M (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 917–929.

Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, Giliani S, Abinun M, Mattsson JP, Keeling D. J., Andersson AK, Wallbrandt P, Zecca L, Notarangelo LD, Vezzoni P, Villa A. (2000). Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat. Genet.* 25: 343–346.

Freitas, F. P. (2011). Estudo de V H⁺-ATPase de larvas de *Aedes Aegypti*: Efeito de substâncias larvicidas, regulação e localização. Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases, Rio de Janeiro.

Futai, M., Noumi, T., Maeda, M. (1989) ATP synthase (H⁺-ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu Rev. Biochem* 58: 111-136.

Futai, M., Oka, T., Sun-Wada, G. H., Moriyama, Y., Kanazawa, H., Wada, Y. (2000). Luminal acidification of diverse organelles by V H⁺-ATPase in animal cells *J. Exp. Biol.* 203, 107-116.

Gluck, S. L. (1992). The structure and biochemistry of the vacuolar H⁺-ATPase in proximal and distal urinary acidification. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 231-360.

Gluck S. L., Underhill D. M., Lyori M., Holliday M., Kostrominova T. Y., Lee B. S., (1996). Physiology and Biochemistry of the kidney vacuolar H⁺-ATPase. *Ann. Rev. Physiol.* 58: 427-445.

Goffeau A., Amory A., Villalobo A., Dufour J. P., (1982). The H⁺-ATPase of the yeast plasma membrane. *Ann N Y Acad Sci.* 402: 91-98.

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.

Graham L. A., Hill, K. J., Stevens, T. H. (1994). VMA7 encodes a novel 14-KDa subunit of the *Sacharomyces cerevisiae* vacuolar H⁺-ATPase complex. *J. Biol. Chem.* 269: 25974-25977.

Graham L. A., Powel B, Stevens T.H. (2000). Composition and assembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase complex. *J. Exp. Biol.* 203: 61-70.

Granato, T. M. (2006). Localização intracelular e regulação pela glicose in vivo de P e V H⁺-ATPases em leveduras. Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases, Rio de Janeiro.

Harvey, W.R., (1992). The physiology of V-ATPases. *J. Exp. Biol.* 172, 1-17.

Hirata, R., Graham, L.A., Takatsuki, A., Stevens, T.H., Anraku, Y. (1997). VMA11 and VMA16 Encode Second and Third Proteolipid Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* Vacuolar Membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272: 4795–4803.

Holcomb, C.L., Hansen, W.J., Etchverry, T., Schekman, R. (1988). Secretory vesicles externalize the major plasma membrane ATPase in yeast . *J. Cell Biol* 106 :641-648

Holliday, L. S., Lu, M. Leei, B.S., Nelson, R.D., Solivan, S., Zhang, L. and Gluck, S. L. (2000) The Amino-terminal Domain of the B Subunit of Vacuolar H⁺-ATPase Contains a Filamentous Actin Binding Site. *J.Biol.Chem.* 275: 32331–32337.

Inoue, T., and Forgac, M. (2005). Cysteine-mediated Cross-linking Indicates That Subunit C of the V-ATPase Is in Close Proximity to Subunits E and G of the V1 Domain and Subunit a of the V0 Domain. *The J. of Biol. Chem.* 280: 27896 –27903.

Kakinuma, Y., Ohsumi, Y., Anraku (1981). Properties of H⁺-translocating adenosine triphosphate in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256: 10859-10863.

- Kane, P., Yamashiro, C., Stevens, T. (1989). Biochemical Characterization of the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 264: 19236-19244.
- Kane, P. (1992). Biogenesis of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J. Exp. Biol.*, 172: 93-103.
- Kane, P., (1995). Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H-ATPase *in vivo*, *J. Biol. Chem.* 270: 17025-17032.
- Kane, P. M. (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 177–191
- Kawasaki-Nishi S., Bowers K., Nishi T., Forgac M, Stevens T.H. (2001) The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and *in vivo* dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 276: 47411–47420.
- Kettner, A.C., Bertl, G., Obermeyer, Slayman, C., Bihler H. (2003). Electrophysiological analysis of the yeast V-type proton pump: Variable coupling ratio and proton shunt. *Biophys. J.* 85: 3730–3733.
- Kevin, C. Jefferies, Daniel J. Cipriano, and Michael Forgac (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Arch Biochem Biophys.* 476(1): 33–42.
- Khan, Y. M., East, J. M., Lee, A. G. (1997). Effects of pH on phosphorylation of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum by inorganic phosphate. *Biochem J.* 321: 671-676.
- Klionsky, D. J., Herman, P. K., Emr, S. D. (1990). The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54: 266-292.
- Kooijman, E. E., Tieleman, D. P., Testerink, C., Munnik, T., Rijkers, D. T., Burger, K. N., de Kruijff, B. (2007). An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the

specific interaction of phosphatidic acid with proteins. *J Biol Chem.* 282: 11356-11364.

Kraemer, C., Weil, B., Christmann, M., Schmidt, E.R. (1998). The new gene DmX from *Drosophila melanogaster* encodes a novel WD-repeat protein. *Gene* 216, 267–276.

Kurkdjian, A., Guern, J. (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 271–303.

Lecchi, S., Nelson, C.J., Allen, K.E., Swaney, D.L., Thompson, K.L., Coon, J.J., Sussman, M.R., Slayman, C.W. (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.

Lee, B.S., Gluck, S.L., Holliday, L.S. (). Interaction between Vacuolar H⁺-ATPase and Microfilaments during Osteoclast Activation. *J. Biol. Chem.* 274: 29164–29171.

Lee, B.S., Underhill, D.M., Crane, M.K., Gluck, S.L. (1995). Transcriptional Regulation of the Vacuolar H⁺-ATPase B2 Subunit Gene in Differentiating THP-1 Cells. *J. Biol. Chem.* 270: 7320-7329.

Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., Tsien, R. Y. (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6803–6808.

Lu, M., Yuri Y. Sautin, L. Holliday, S., Gluck, S.L. (2004). The Glycolytic Enzyme Aldolase Mediates Assembly, Expression, and Activity of Vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 279: 8732–8739.

Maeshima, M. (2001). Tonoplast transporters: Organization and function. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52: 469-497.

Maresova, L., and Sychrova, H. (2005). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants. *Mol. Microbiol.* 55: 588–600.

Martinez-Munoz, G. A., Kane, P. (2008). Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol. Chem.* 283: 20309-20319.

Martinez-Zaguilan, R., Lynch, R.M., Martinez, R.M., Gillies, R.J. (1993). Vacuolar-type H⁽⁺⁾-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *American J. of Phys. - Cell Physiology* 265(4): 1015-1029.

Matsuoka, K., Higushi, T., Maeshima, M., Nakamura, K. (1997). A vacuolar-type H⁺-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell.* 9: 533-546.

McCoy K. L. (1990). Contribution of endosomal acidification to antigen processing. *Semin Immunol.* 2:239–246.

MC Donough, J.P. AND Mahler, H.P. (1982). Covalente phosphorylation of the Mg²⁺-dependent ATPase of yeast plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 257, 14579-14581.

Mellman, I., Fuchs, R., Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev. Biochem.* 55:663–700.

Moriyama, Y And Nelson, N. (1987). The purified ATPases from chromaffin granule membranes is an anion-dependent proton pump. *J. Biol. Chem.* 262: 9175-9180.

Moriyama, Y. and Nelson N. (1988) The vacuolar H⁺-ATPase, a proton pump controlled by a slip. In *The Ion Pumps: Structure, Function and Regulation.* W. D. Stein, editor. Alan R. Liss, Inc., New York. 387–393.

Moriyama, Y. And Nelson, N. (1989a). Cold Inactivation of Vacuolar Proton-ATPases. *J. Biol. Chem.* 264: 3577-3582.

Moriyama, Y. And Nelson, N. (1989b). H⁺-translocating ATPase in Golgi-apparatus- characterisation as vacuolar H⁺-ATPase and its subunit structures. *J. Biol. Chem.* 264: 18445-18450.

Moriyama, Y., Hayashi, M., Yatsushiro, S., Yamamoto, A. (2003). Vacuolar proton pumps in malaria parasite cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35: 367-375.

Morris, R.C. (1968). An experimental renal acidification defect in patients with hereditary fructose intolerance. *J Clin Invest.* 47(6): 1389–1398.

Mulberg, A. E., Tulk, B. M., Forgacs, M. (1991). Modulation of coated vesicle chloride channel activity and acidification by reversible protein kinase A-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266: 20590-20593.

Muller, M.L., Jensen M., Taiz L. (1999). The vacuolar H⁺-ATPase of lemon fruits is regulated by variable H⁺/ATP coupling and slip. *J. Biol. Chem.* 274: 10706–10716.

Munn, A.L., Riezman, H. (1994). Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *The Journal of Cell Biology.* 127(2): 373-386.

Nagano, F., Kawabe, H., Nakanishi, H., Shinohara, M., Deguchi-Tawarada, M., Takeuchi, M., Sasaki, T., Takai, Y. (2002). Rabconnectin-3, a novel protein that binds both GDP/GTP exchange protein and GTPase-activating protein for Rab3 small G protein family. *J. Biol. Chem.* 277, 9629–9632.

Nass, R., Cunningham, K. W., Rao, R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na/H exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J. Biol. Chem.* 272: 26145–26152.

Nelson, D. L., Cox, M. M. (2008). Genes and chromosomes. In: _____. Lehninger: principles of biochemistry. 15th ed. New York: W. H. Freeman and Company. 947-974.

Nelson, H., Mandiyan, S., Noumi, T., Moriyama, Y., Miedel, M.C., Nelson, N. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the C subunit of H(+)-ATPase from bovine chromaffin granules. *J. Biol Chem.* 265(33): 20390-20393.

Nelson N. (1992). The vacuolar H⁺-ATPases- one of the most fundamental ion pumps in nature. *J. Exp. Biol.* 172: 19-27.

Nelson. N., Harvey, W.R. (1999). Vacuolar and plasma membrane proton adenosine triphosphatases. *Physiol Rev.*: 79(2): 361-289.

Nelson N (2003) A journey from mammals to yeast with vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase). *J. Bioenerg. Biomembr.* 35: 281–289.

Nishi, T., Forgac, M. (2002). The vacuolar (H⁺)-ATPases: nature most versatile proton pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biol* 3: 94-103.

Ohsumi, Y., Anraku, Y., (1981). Active-transport of basic-amino-acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane-vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol Chem* 256: 2079-2082.

Okorokov, L. A., Lichko, L. P., Kulaev, I. S. (1980). Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J. Bacteriol.* 144(2): 661-665.

Okorokov, L. A. And Lichko, L. P.(1983). The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*; ATPases is electrogenic H⁺ translocase. *FEBS Letters.* 155: 102-106.

Okorokov, L. A., Kulakovskaya, T. V., Lichko, L. P., Polorotova, E. V. (1985). H⁺/ion antiport as the principal mechanism of transport systems in the vacuolar membrane of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *FEBS Lett.* 192(2): 303-6.

Okorokov, L.A., (1997). Diversity of Ca²⁺-transporters and Ca²⁺ store compartments in yeast: possible role in protein targeting and in signal transduction. *Folia Microbiol.* 42: 244-245.

Okorokov, L. A., Lehle (1998). Ca²⁺-ATPases of *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and possible role in protein sorting. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 83-91.

Okorokov, L. A., Silva, F. E., Façanha, A. L. O. (2001). Ca²⁺ and H⁺ homeostasis in fission yeast: a role of Ca²⁺/H⁺ exchange and distinct V_H⁺ - ATPases of secretory pathway organelles *FEBS Lett.* 505:321-324.

Orij, R., Brul, S., Smits, G. J. (2011). Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1810: 933-944.

Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S., Smits, G. J. (2009). In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* 155: 268-278.

Pace, C. N., Laurents, D. V., Thomson, J. A. (1990). pH dependence of the urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease A and ribonuclease T1. *Biochemistry* 29: 2564–2572.

Padilla-Lo´ Pez S. and Pearce D. A. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* Lacking Btn1p Modulate Vacuolar ATPase Activity to Regulate pH Imbalance in the Vacuole. *J. of Biological Chemistry* 281: 10273–10280.

Palmgren, M.G., Sommarin, M., Serrano, R., Larsson, C. (1991). Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H(+)-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 20470-20475.

Palokangas, H., Metsikko K., Vaananen K. (1994). Active vacuolar H⁺ATPase is required for both endocytic and exocytic processes during viral infection of BHK-21 cells. *J. Biol. Chem.* 269:17577–17585.

Parra, K. J, Keenan, K. L., Kane, P. M. (2000). The H subunit (Vma13p) of the yeast V-ATPase inhibits the ATPase activity of cytosolic V₁ complexes. *J. Biol. Chem.* 275(28): 21761-7.

Pedersen, P.L., Carafoli, E. (1987). Ion motive ATPase. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends Biochem. Science.* 12, 146-150.

Perez, L., Carrasco, L. (1994). Involvement of the vacuolar H⁺-ATPase in animal virus entry. *J Gen Virol* 75:2595–2606.

Perona, R., Portillo, F., Giraldez, F., Serrano, R. (1990). Transformation and pH homeostasis of fibroblasts expressing yeast H(+)-ATPase containing site-directed mutations. *Mol Cell Biol* 10: 4110–4115.

Perona, R., Serrano, R. (1988). Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* 334: 438–440.

Peters C, Bayer MJ, Bühler S, Andersen JS, Mann M, Mayer A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature*. 409: 581-588.

Petrov V.V., Okorokov L.A. (1992). Energizing plasmalemma of yeasts is necessary for activation of its H⁺-ATPase by glucose. *Biokhimiia* (Moscow, Russia) 57(11):1705-1711

Pick, U., Bental, M., Chitlaru, E., Weiss, M. (1990). Polyphosphate-hydrolysis—a protective mechanism against alkaline stress? *FEBS Lett.* 274: 15–18.

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(1): 12-24.

Portillo, F. (2000). Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1469: 31–42.

Portillo, F. AND Mazón, M.J. (1985). Activation of yeast plasma membrane ATPase by phorbol ester. *FEBS Lett.* 1, 95-8.

Portillo, F., Inigo, F., de Larrinoa, Serrano, R. (1989). Deletion analysis of yeast plasma membrane H⁺-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. *Febs Letters*, 247: 381–385.

Purwin, C., Nicolay, K., Scheffers, W. A., Holzer, H. (1986). Mechanism of control of adenylate cyclase activity in yeast by fermentable sugars and carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *J. Biol. Chem.* 261: 8744-8749.

Rahman, S., Yamato, I., Saijo, S., Mizutani, K., Ishizuka-Katsura, Y., Ohsawa, N., (2013). Biochemical and biophysical properties of interactions between subunits of the peripheral stalk region of human V-ATPase. *PLoS ONE* 8:e55704. doi:10.1371/journal.pone.0055704

Randall, S. K. And Sze, H. (1986). Properties of the partially purified tonoplast H⁺ pumping ATPase. From oat roots. *J. Biol. Chem.* 261, 1364-1371.

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* 10, 1075-84.

Ratajczak, R. (2000). Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺ translocating ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 17-36.

Rea, P. A., Griffith, C.J., Sanders, D. (1987). Purification of the N,N'-dicyclohexylcarbo-diimide-binding proteolipid of a higher plant tonoplast H⁺-ATPase. *J. Biol Chem.* 25(30):14745-52.

Ribeiro, C. C., Bernardes, N. R., Freitas, F. P., Monteiro, R. M., Retamal, C. A., Teixeira, L. R. S., Samarao, S. S., Granato, Thais M., Silva, F. E., Façanha, A. R., Okorokova-Façanha, A. L., Okorokov, L. A. (2010). New insights into the glucose-dependent regulation of the yeast V H⁺-ATPase *in vivo*: the coupling modulation without the V₁ dissociation from membrane. *BBA Biomemb.* Submitted.

Ribeiro, C. C. (2010). Nova visão sobre a regulação pela glicose extracelular e as propriedades dos transportadores de H⁺ e Ca²⁺ na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases, Rio de Janeiro.

Roos, A., Boron W. F. (1981) Intracellular pH. *Physiol Rev.* , 61:296-434.

Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., Le Vitre, J., Davidow, L. S., Jen-I-Mao, Moir, D. T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutation in PMR1, a member of Ca²⁺-ATPase family. *Cell.*, 55: 133-145.

Samarão, S.S.(2003). “Caracterização das atividades das V H⁺-ATPase nas organelas de via secretória de levedura e regulação destas enzimas pela glicose extracelular” Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases, Rio de Janeiro.

Samarão S.S., Teodoro C.E., Silva F.E., Ribeiro C.C., Granato T.M., Bernardes N.R., Retamal C.A., Façanha A.R., Okorokova-Façanha A.L., Okorokov L.A. (2009). V H(+)-ATPase along the yeast secretory pathway: Energization of the ER and Golgi membranes. *Biochim Biophys Acta* 1788(2): 303-13.

Sanders, D., Hansen, U.P, Slayman, C.L. (1981). Role of the plasma membrane proton pump in pH regulation in non-animal cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* 78: 5903-5907.

Sanders, D., Slayman, C.L. (1982). Control of intracellular pH. Predominant role of oxidative metabolism, not proton transport, in the eukaryotic microorganism *Neurospora*. *The Journal of Cell Biology*, 80 no.3 377-402.

Scarborough, G.A. (1999). Structure and function of the P-type ATPases. *Current Opinion in Cell Biology*. 11: 517–522.

Seksek, O., Biwersi, J., Verkman, A. S. (1995). Direct measurement of trans-Golgi pH in living cells and regulation by second messengers. *J. Biol. Chem.* 270:4967–4970.

Seol, J.H., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Deshaies, R.J. (2001). Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly. *Nature Cell Biology*. 3: 384 – 391.

Serrano, R. (1983). In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* 156(1): 11-14.

Serrano, R. (1993). Structure,function and regulation of plasma membrane H⁺-ATPase, *FEBS Lett.* 325: 108-111.

Silva, F. E. (2009). “Homeostase de Ca²⁺ na levedura *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes condições fisiológicas: A dinâmica das Ca²⁺-ATPases e dos trocadores Ca²⁺/H⁺ das organelas da via secretória e o papel da calcineurina.” Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases, Rio de Janeiro.

Simons, M., Gault, W. J., Gotthardt, D., Rohatgi, R., Klein, T. J., Shao, Y., Lee, H. J., Wu, A. L., Fang, Y., Satlin, L. M., Dow, J. T., Chen, J., Zheng, J., Boutros, M., Mlodzik, M. (2009). Electrochemical cues regulate assembly of the Frizzled/Dishevelled complex at the plasma membrane during planar epithelial polarization. *Nat Cell Biol.* 11: 286-294.

Sipos, G., Brickner, J.H., Brace, E.J., Chen, L., Rambourg, A., Kepes, F., Fuller, R.S. (2004). Soi3p/Rav1p Functions at the Early Endosome to Regulate Endocytic Trafficking to the Vacuole and Localization of Trans-Golgi Network Transmembrane Proteins. *Molecular Biology of the Cell.* 15: 3196–3209.

Smardon, A.M., Kane, P.M. (2007). RAVE Is Essential for the Efficient Assembly of the C Subunit with the Vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 282(36): 26185–26194.

Smardon, A.M., Tarsio, M., Kane, P.M. (2002). The RAVE Complex Is Essential for Stable Assembly of the Yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277(16): 13831–13839.

Srivastava, J., Barber, D. L., Jacobson, M. P. (2007). Intracellular pH sensors: design principles and functional significance. *Physiology (Bethesda)* 22: 30–39.

Stevens, T. H., Forgac, M. (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar H⁺-ATPase. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13:779-808

Summer, J. P., Dow J. A., Earley, F. G., Klein, U., Jager, D., Wieczorek, H. (1995). Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. *J. Biol. Chem.* 270: 5649-5653.

Teodoro, C. E. S. (2004). Bombas protonicas de organelas de via secretória: comparação entre leveduras e plantas. Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases, Rio de Janeiro.

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

Toyomura T, Murata Y, Yamamoto A, Oka T, Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M. (2003). From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H⁺ -ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J. Biol. Chem.* 278: 22023–22030.

Trópia, M.J., Cardoso, A.S., Tisi, R., Fietto, L.G., Fietto, J.L., Martegani, E., Castro, I.M., Brandão, R.L. (2006). Calcium signaling and sugar-induced activation of plasma membrane H(+)-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 19;343(4):1234-43.

Uchida, E., Ohsumi, Y. And Anraku, Y. (1985). Purification and properties of H⁺-translocating, Mg²⁺-adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 260: 1090-1095.

Veine DM, Arscott LD, Williams CH Jr: (1998). Redox potentials for yeast, *Escherichia coli* and human glutathione reductase relative to the NAD^+/NADH redox couple: enzyme forms active in catalysis. *Biochemistry*. 37:15575-15582.

White, J. M. (1992). Membrane fusion. *Science* 258: 917-924.

Whitten, S. T., Garcia-Moreno, E. B., Hilser, V. J (2005). Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 4282-4287.

Xie, X. S. And Stone, D. K. (1986). Isolation and reconstitution of the clathrin-coated vesicle proton translocating complex. *J. Biol. Chem.* 261: 2492-2495.

Xu, T., Forgac, M. (2000). Subunit D (Vma8p) of the yeast V-ATPase plays a role in coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 275: 22075-22081.

Yan, Y., Deneff, N., Schüpbach, T. (2009). The Vacuolar Proton Pump, V-ATPase, Is Required for Notch Signaling and Endosomal Trafficking in *Drosophila*. *Developmental Cell* 17: 387–402.

Young, B. P., Shin, J. J., Orij, R., Chao, J. T., Li, S. C., Guan, X. L., Khong, A., Jan, E., Wenk, M. R., Prinz, W. A., Smits, G. J, Loewen, C. J. (2010). Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism. *Science*, 329: 1085-1088.

Zhang, J., Feng, Y., Forgac, M. (1994). Proton Conduction and Bafilomycin Binding by the V_0 Domain of the Coated Vesicle V-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 269: 23523-25523

Zhuang, Z., Linser, P. J., Harvey, W. R. (1999). Antibody to H^+ V-ATPase subunit E colocalizes with portosomes in alkaline larval midgut of a freshwater mosquito (*Aedes Aegypti* L.). *J. Exp. Biol.* 202: 2449-2460.

APÊNDICE

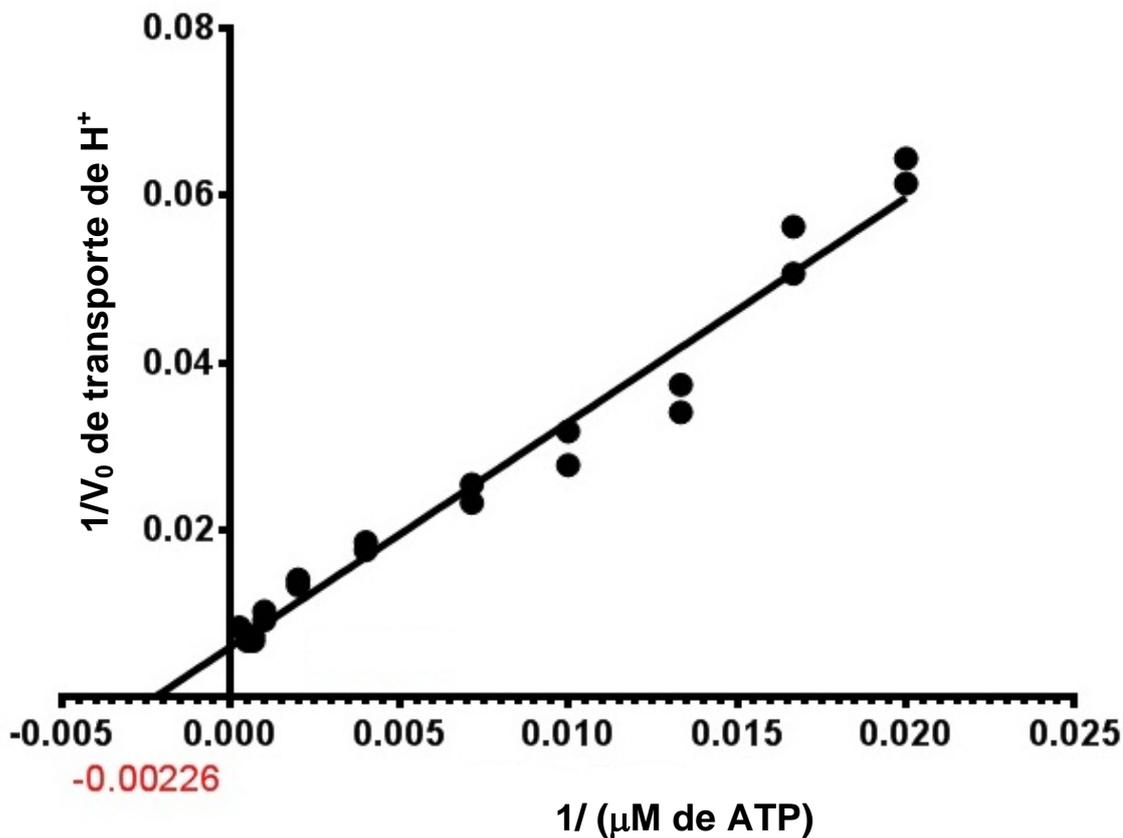


Figura 38. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk da V_0 de transporte de H^+ de $V H^+$ -ATPases em MT não energizadas pela glicose. O valor em vermelho representa o ponto onde a reta toca o eixo x, que é o valor de $-1/K_m$. Gráfico representativo de um experimento de três.

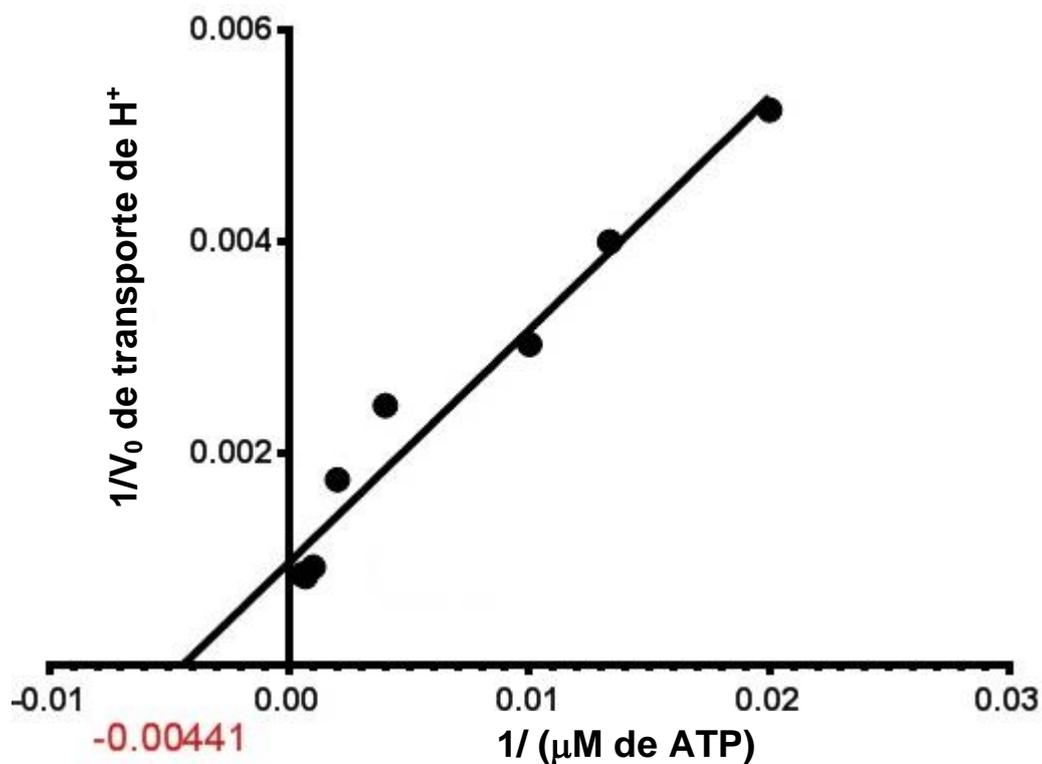


Figura 39. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk da V_0 de transporte de H^+ de $V H^+$ -ATPases em MT energizadas pela glicose. O valor em vermelho representa o ponto onde a reta toca o eixo x, que é o valor de $-1/K_m$. Gráfico representativo de um experimento de três.

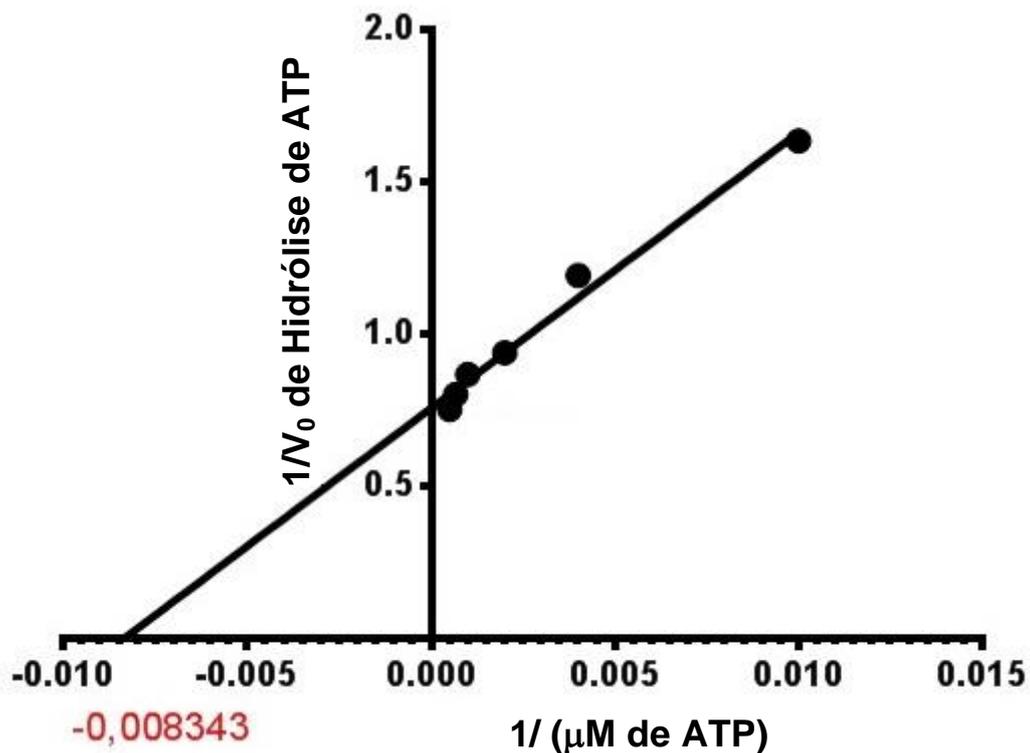


Figura 40. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk da V_0 de hidrólise de ATP pelas $V H^+$ -ATPases em MT não energizadas pela glicose. O valor em vermelho representa o ponto onde a reta toca o eixo x, que é o valor de $-1/K_m$. Gráfico representativo de um experimento de três.

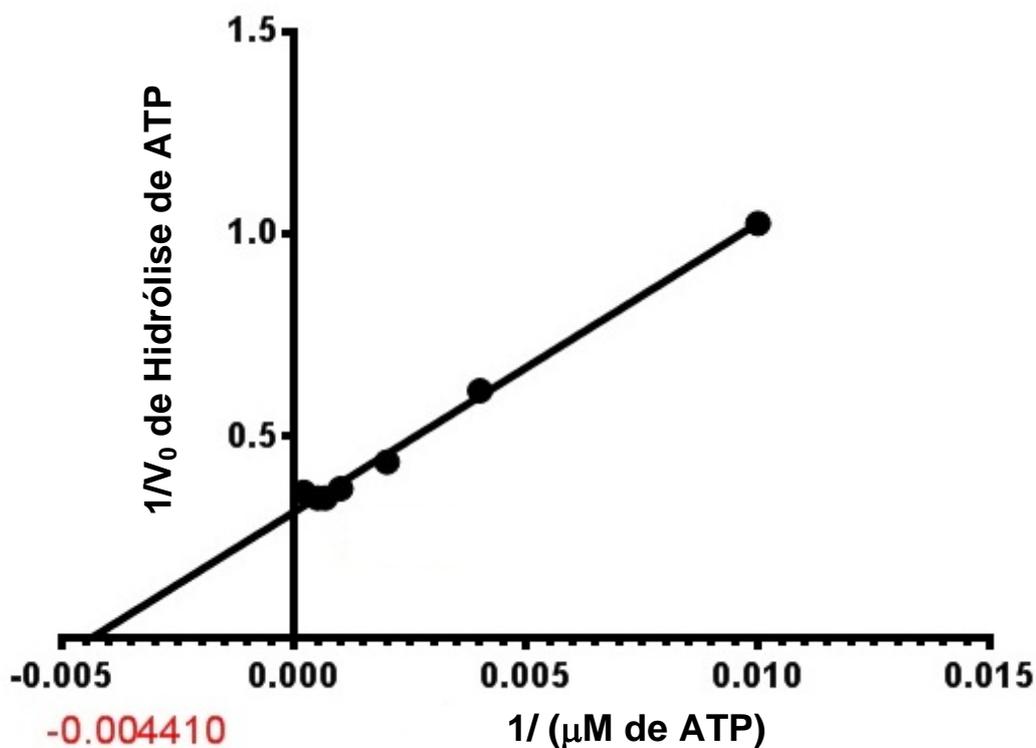


Figura 41. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk da V_0 de hidrólise de ATP pelas $V H^+$ -ATPases em MT energizadas pela glicose. O valor em vermelho representa o ponto onde a reta toca o eixo x, que é o valor de $-1/K_m$. Gráfico representativo de um experimento de três.