

INFLUÊNCIA DA CALCINEURINA SOBRE A ATIVAÇÃO DE P E V H<sup>+</sup>-  
ATPases POR pH e GLICOSE EM *Saccharomyces cerevisiae*

**LAYZ RIBEIRO DA SILVA TEIXEIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JULHO, 2016

INFLUÊNCIA DA CALCINEURINA SOBRE A ATIVAÇÃO DE P E V H<sup>+</sup>-  
ATPases POR pH e GLICOSE EM *Saccharomyces cerevisiae*

**LAYZ RIBEIRO DA SILVA TEIXEIRA**

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

Orientador: Lev Alexandrovitch Okorokov

Coorientador: Arnaldo Rocha Façanha

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO, 2016

*“E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida.”*

*(William Shakespeare)*

*Dedico este trabalho a todos aqueles que com amizade, confiança e respeito estiveram ao meu lado durante sua concretização.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por estar ao meu lado durante todos os momentos, me concedendo força para que eu não desistisse.

Ao meu orientador, prof. Dr. Lev Okorokov, pelos conhecimentos compartilhados, pelas revisões e por me ajudar a progredir a cada dia.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha, por compartilhar seus conhecimentos e pela boa vontade em ajudar.

À Dr<sup>a</sup> Livia Marini Palma por aceitar revisar esta tese.

Aos membros da banca, prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos, prof. Dr. André Lacerda de Abreu Oliveira e prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro, por aceitarem ao convite.

Aos membros do nosso grupo de pesquisa e amigos de bancada, Antônio, Bárbara, Camila, Keilla, Larinne, Livia e Renan pela contribuição, por estarem sempre dispostos a ajudar e por tornarem a rotina do laboratório mais descontraída.

Aos professores, funcionários e aos demais alunos do LFBM, pelo apoio e convívio.

Aos professores e à coordenação do Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, por sempre se mostrarem à disposição.

À UENF, CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro.

A minha mãe, Valéria, e a minha irmã, Paula, pelo amor e incentivo. Obrigada pela confiança, por acreditarem em mim e por estarem ao meu lado compartilhando tantos momentos da minha trajetória até aqui!

Ao meu namorado, Sérgio, por ser tão companheiro e compreensivo comigo. Obrigado pelo incentivo nessa reta final!

## EQUIPAMENTOS

Agitador de tubos – Quimis

Autoclave – Quimis modelo 190.24

Balanças:

Analítica – Satorius, BP210S

Analítica – Ohaus, modelo CT1200S

Banho – Quimis modelo 1105 (0 a 110°C)

Centrífugas:

Allegra 6R – Beck Man Coulter

Himac CP 80WX – Hitachi – rotor P50A2 – 45000 x g

Himac CP 80WX – Hitachi – rotor P28S – 140000 x g

Espectrofotômetro – Hitachi – U1100

Espectrofluorímetro – Shimadzu RF-5301 PC

Fluxo laminar – Dwyer Mark II modelo 210 B.27

Freezer (-70 °C) – Revco Ultima II Legaci

Homogeneizador de vidro com pistilo de Teflon – Glas-col

Micropipetas – Gilson

Pipetador automático – Pipet-aid

pHmetro e eletrodo combinado de vidro – Quimis

Shaker – Innova TM 4300 Incubator Shaker New Brunswick Scientific

## ABREVIATURAS

<b>ABS</b>	Absorbância
<b>ACMA</b>	6-amino-6-cloro-2-metoxiacridina
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATPase</b>	Adenosina trifosfatase
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CN</b>	Calcineurina
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetraacético (“ethylenediamine tetraacetic acid”)
<b>E<sub>M</sub></b>	Potencial de membrana
<b>FCCP</b>	4-trifluorometoxifenilhidrazona carbonilcianida (“carbonyl cyanide 4-[trifluoromethoxy] phenylhydrazone”)
<b>F<sub>eq</sub></b>	Fluorescência de equilíbrio, determinada fluorescência do “platô”
<b>F<sub>máx</sub></b>	Amplitude máxima
<b>F<sub>0</sub></b>	Fluorescência dependente de V <sub>0</sub>
<b>G</b>	Gravidade
<b>MOPS</b>	Acido 3-[N-morfolino] propano sulfônico (“3-[N-morpholino] propanesulfonic acid”)
<b>MT</b>	Membranas totais
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>P<sub>i</sub></b>	Fosfato inorgânico
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (“phenylmethylsulfonyl fluoride”)
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>Rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio (“lauryl sulfate sodium salt”)
<b>Tris</b>	Tris-hidroximetil-aminometano (“tris-hydroxymethyl-aminomethane”)
<b>V<sub>máx</sub></b>	Velocidade máxima
<b>V<sub>0</sub></b>	Velocidade inicial do transporte H <sup>+</sup>
<b>YEPD</b>	Extrato de levedura, peptona e dextrose
<b>ΔpH</b>	Gradiente de prótons através da membrana

## RESUMO

Leveduras têm sido usadas como modelos para pesquisa de mecanismos moleculares de diferentes doenças, dentre as quais, mais recentemente, tem se destacado disfunções relacionadas às H<sup>+</sup>-ATPases. Essas enzimas são de extrema importância para a homeostase iônica, participando de diversos processos fisiológicos, em diferentes organismos. Mutações em proteínas-chaves envolvidas na manutenção da homeostase iônica podem provocar desequilíbrios iônicos, causando doenças ou fenômenos patológicos em microrganismos, plantas e animais, inclusive no homem. Este trabalho buscou avaliar o papel do gradiente de H<sup>+</sup> através da membrana plasmática na regulação das H<sup>+</sup>-ATPases pela glicose extracelular, de forma a contribuir no entendimento sobre a sinalização envolvida em disfunções da regulação dessas bombas, que levam a diferentes patologias. Descrevemos, particularmente, os efeitos da mudança do pH extracelular e da presença de desacopladores, como o NH<sub>4</sub>Cl e o FCCP (os quais dissipam o gradiente de H<sup>+</sup>), sobre a atividade das H<sup>+</sup>-ATPases modulada por glicose extracelular. O  $\Delta$ pH estabelecido através das membranas provou ser um fator chave na regulação de P e V H<sup>+</sup>-ATPases de levedura, com o aumento do pH extracelular estimulando ambas as classes de bombas de H<sup>+</sup>. Efeito este, abolido na presença de desacopladores, como o NH<sub>4</sub>Cl e o FCCP, os quais, ao dissiparem o  $\Delta$ pH, impediram a estimulação das bombas tanto na ausência quanto na presença de glicose. Para testar a hipótese da via Ca<sup>2+</sup>/calcineurina (CN), altamente conservada dentro dos eucariotos, estar envolvida na sinalização desta regulação por pH e glicose, investigamos o efeito da CN sobre a regulação de bombas protônicas do tipo P e V. Ambas as bombas de H<sup>+</sup> não foram eficientemente ativadas pela glicose extracelular no mutante *cnb1* $\Delta$  (deficiente para a subunidade regulatória da calcineurina). Os resultados, em conjunto, revelam uma inédita integração entre a sinalização via CN e a ativação de bombas de H<sup>+</sup>, em resposta a mudanças do pH e da glicose no microambiente extracelular, no controle metabólico e nas respostas a estresses.

## ABSTRACT

Yeasts have been used as models for research the molecular mechanisms of different diseases, including, recently, functional defects related to the H<sup>+</sup>-ATPases. These enzymes are extremely important for ion homeostasis, participating in various physiological processes in different organisms. Mutations in key proteins involved in the maintenance of ion homeostasis can cause ionic imbalances, causing illness or pathological phenomena in microorganisms, plants and animals, including humans. The role of the electrochemical H<sup>+</sup> gradient across the plasma membrane in the regulation of H<sup>+</sup>-ATPase by extracellular glucose, was investigated by following the changes of extracellular pH and that promoted by the addition of NH<sub>4</sub>Cl and FCCP (which dissipates the H<sup>+</sup> gradient) on the activity of H<sup>+</sup>-ATPase in the presence of extracellular glucose. We show that the  $\Delta$ pH across membranes is a key factor in the regulation of P and V H<sup>+</sup>-ATPase yeast, since the increase in extracellular pH stimulated both pumps, while the NH<sub>4</sub>Cl and FCCP by abolishing the  $\Delta$ pH, prevented this stimulation in the absence as well as in the presence of glucose. In addition, since P and V<sup>+</sup>-ATPase are important housekeeper systems and that Ca<sup>2+</sup>/calcineurin (CN) pathway is an important signaling pathway, highly conserved within eukaryotes, we investigated the role of CN in the regulation of ion pumps. The results obtained with the *cnb1* $\Delta$  mutant, which is defective to the regulatory subunit of calcineurin, revealed that both H<sup>+</sup> pumps are not efficiently activated by extracellular glucose, suggesting that CN is also implicated in the glucose-induced activation of the H<sup>+</sup> pumps. Taken together, the results shed more light on the mechanisms by which the glucose supply activates the primary systems of energy transduction of the eukaryotic cells and open a new avenue in the elucidation of the role of these systems in the integration of metabolic control during the development and the stress adaptation.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura representativa de uma forma ativa da P H <sup>+</sup> -ATPase, sem sua porção C-terminal auto-inibitória, em associação com o complexo Mg-AMPPCP. ....	7
Figura 2 – Estrutura da V H <sup>+</sup> ATPase. ....	10
Figura 3 – Mecanismo de funcionamento da V H <sup>+</sup> -ATPase. (A) Mecanismo de rotação da V H <sup>+</sup> -ATPase. (B) Mecanismo de transporte de H <sup>+</sup> através de V <sub>0</sub> . ....	12
Figura 4 – Modelo para a regulação hipotética de V H <sup>+</sup> -ATPase pela glicose extracelular. ....	14
Figura 5 – Resumo esquemático do isolamento de membranas.....	24
Figura 6 – Resumo das análises realizadas a partir das membranas isoladas .....	28
Figura 7 – Representação esquemática explicando o decaimento da fluorescência.	31
Figura 8 – Representação esquemática da determinação de velocidade inicial e amplitude máxima do transporte de H <sup>+</sup> .....	32
Figura 9 – Efeito do nitrato sobre a atividade hidrolítica e a velocidade inicial do transporte de H <sup>+</sup> mediada por V H <sup>+</sup> -ATPases ativadas e não ativadas pela glicose extracelular de membranas totais isoladas de <i>S. Cerevisiae</i> (cepa X2180). ....	38
Figura 10 – Efeito do nitrato sobre a capacidade de acoplamento de V H <sup>+</sup> -ATPases ativadas e não ativadas pela glicose extracelular de membranas totais isoladas de <i>S. Cerevisiae</i> (cepa X2180). ....	39
Figura 11 – O nitrato inibe igualmente o <i>steady state</i> do transporte de H <sup>+</sup> mediado por V H <sup>+</sup> -ATPases de organelas da via secretória quando comparamos a mesma forma da bomba, mas revela uma resistência aumentada para a forma ativada em todas organelas. ....	42
Figura 12 – O nitrato revela uma tendência de inibição diferencial da velocidade inicial do transporte de H <sup>+</sup> mediado por bombas ativadas de organelas da via secretória, mas revela inibição igual para bombas não ativadas. ....	43
Figura 13 – O efeito do nitrato sobre as atividades específicas do <i>steady state</i> do transporte de H <sup>+</sup> mediado por V H <sup>+</sup> -ATPases de organelas da via secretória revela diferenças significativas entre elas. ....	44
Figura 14 – O efeito do nitrato sobre as atividades específicas da velocidade inicial do transporte de H <sup>+</sup> mediado por V H <sup>+</sup> -ATPases de organelas da via secretória revela diferenças significativas entre elas. ....	45
Figura 15 – O nitrato revela inibição semelhante para a atividade hidrolítica mediada por bombas ativadas e não ativadas de organelas da via secretória, porém revela uma tendência de inibição mais forte para bombas não ativadas. ....	46

- Figura 16 – Acoplamento das V H<sup>+</sup>-ATPases de organelas da via secretória (V<sub>0</sub> do transporte de H<sup>+</sup>/ATPase V<sub>0</sub>). Acoplamento em membranas dos vacúolos, Golgi e RE, ativadas e não ativadas pela glicose extracelular. ....47
- Figura 17 – Razão do acoplamento das V H<sup>+</sup>-ATPases de organelas da via secretória. Dados encontrados a partir da divisão dos valores de acoplamento de bombas ativadas pelo acoplamento de bombas não ativadas. ....48
- Figura 18 – Acoplamento das subpopulações de moléculas das V H<sup>+</sup>-ATPases de organelas da via secretória, inativadas pela concentrações crescentes de nitrato. ....49
- Figura 19 – Efeito do pH extracelular sobre a estimulação da velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> de P H<sup>+</sup>-ATPases e V H<sup>+</sup>-ATPases pela glicose extracelular, em membranas totais isoladas de *S. Cerevisiae* (cepa X2180).....52
- Figura 20 – Efeito do pH extracelular sobre a estimulação da atividade hidrolítica de P H<sup>+</sup>-ATPases e V H<sup>+</sup>-ATPases pela glicose extracelular, em membranas totais isoladas de *S. Cerevisiae* (cepa X2180). ....53
- Figura 21 – Influência do pH extracelular sobre o acoplamento funcional das H<sup>+</sup>-ATPases, em membranas totais isoladas de *S. Cerevisiae* (cepa X2180).....54
- Figura 22 – Efeito do NH<sub>4</sub>Cl e do FCCP sobre o *steady state* (A) e a velocidade inicial (B) do transporte de H<sup>+</sup> em H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. Cerevisiae* (cepa X2180), em pH 6,0. ....56
- Figura 23 – Efeito do NH<sub>4</sub>Cl e do FCCP sobre a atividade hidrolítica em H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 6,0. ....57
- Figura 24 – Efeito do NH<sub>4</sub>Cl e do FCCP sobre o *steady state* (A) e a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> (B) em H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 7,2. ....58
- Figura 25 – Efeito do NH<sub>4</sub>Cl e do FCCP sobre a atividade hidrolítica em H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 7,2. ....59
- Figura 26 – Efeito do NH<sub>4</sub>Cl e do FCCP sobre o *steady state* (A) e a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> (B) em H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 7,7. ....60
- Figura 27 – Efeito do NH<sub>4</sub>Cl e do FCCP sobre a atividade hidrolítica em H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 7,7. ....61
- Figura 28 – Efeito do NH<sub>4</sub>Cl e do FCCP sobre o *steady state* (A) e a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> (B) em H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 8,2. ....62

- Figura 29 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e do FCCP sobre a atividade hidrolítica em  $\text{H}^+$ -ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 8,2. .... 63
- Figura 30 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e do FCCP sobre a imuno resposta das subunidades A e B da V  $\text{H}^+$ -ATPase de membranas totais ativadas pela glicose extracelular. .... 65
- Figura 31 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre a imuno resposta das subunidades A e B da V  $\text{H}^+$ -ATPase de membranas totais ativadas pela glicose extracelular. .... 65
- Figura 32 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e do FCCP sobre a imuno resposta das subunidades A e B da V  $\text{H}^+$ -ATPase de membranas totais ativadas pela glicose extracelular. .... 66
- Figura 33 – Efeito do FCCP e da ionomicina sobre a imuno resposta das subunidades A e B da V  $\text{H}^+$ -ATPase de membranas totais ativadas pela glicose extracelular. .... 66
- Figura 34 – Acidificação vacuolar é aumentada pela atividade das bombas de  $\text{H}^+$  ativadas pela glicose extracelular e é dependente do gradiente de  $\text{H}^+$  existente nessas membranas. .... 68
- Figura 35 – Comparação das atividades de transporte de  $\text{H}^+$  mediadas por P e V  $\text{H}^+$ -ATPases de MTs isoladas das cepas selvagem e mutante deficiente na subunidade regulatória B da calcineurina. (A) Atividade da velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$ , calculada da seguinte forma: % de  $V_0/\text{min} \times \text{mg}$  de proteína. (B) Atividade do *steady state* do transporte de  $\text{H}^+$ , calculada da seguinte forma: % de fluorescência/mg de proteína. Os dados representam valores de pelo menos 3 experimentos independentes. Barras indicam erro padrão. .... 74
- Figura 36 – Comparação das atividades hidrolíticas mediadas por P e V  $\text{H}^+$ -ATPases de MTs isoladas das cepas selvagem e mutante deficiente na subunidade regulatória B da calcineurina de *S. cerevisiae*. .... 75
- Figura 37 – (A) Comparação da acidificação do meio de incubação dependente de glicose na cepa selvagem e na cepa mutante *cnb1* $\Delta$ . (B) Atividade de transporte de  $\text{H}^+$  da P  $\text{H}^+$ -ATPase de vesículas de MTs isoladas de esferoplastos do mutante *cnb1* $\Delta$ , pré incubados com glicose extracelular. .... 76
- Figura 38 – Comparação da formação dos esferoplastos a partir de células das cepas selvagem e mutante *cnb1* $\Delta$ . .... 77
- Figura 39 – Comparação do crescimento da cultura de células, em meio YEPD, das cepas selvagem e mutante *cnb1* $\Delta$ . .... 78

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iv
EQUIPAMENTOS .....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Homeostase iônica.....	1
1.2 O pH fisiológico e suas alterações .....	3
1.3 P ATPases .....	4
1.4 Bombas protônicas.....	5
1.4.1 P H <sup>+</sup> -ATPases: estrutura, funcionamento e regulação .....	6
1.4.2 V H <sup>+</sup> -ATPases.....	8
1.4.2.1 Estrutura e funcionamento das V H <sup>+</sup> -ATPases .....	10
1.4.2.2 Regulação das V H <sup>+</sup> -ATPases .....	13
1.5 Homeostase de Ca <sup>2+</sup> .....	18
1.6 Calcineurina e as atividades de transportadores .....	19
2. OBJETIVOS .....	21
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
3. MATERIAIS e MÉTODOS .....	22
3.1 Cepas de leveduras .....	22
3.2 Meios de cultura e manutenção da cepa.....	22
3.3 Curva de crescimento .....	22
3.4 Preparo do pré-inóculo.....	23
3.5 Preparo da levedura para o isolamento .....	23
3.6 Isolamento de membranas e fracionamento subcelular .....	23
3.6.1 Obtenção de células .....	24
3.6.2 Obtenção dos esferoplastos .....	24
3.6.3 Pré-incubação dos esferoplastos.....	25
3.6.4 Obtenção de membranas totais.....	27
3.6.5 Obtenção de membranas intracelulares fracionadas em gradiente de densidade de sacarose .....	27
3.7 Determinação do conteúdo proteico.....	29

3.8	Determinação de fosfato inorgânico ( $P_i$ ) .....	29
3.9	Determinação da atividade hidrolítica .....	30
3.10	Determinação do gradiente de $H^+$ ( $\Delta pH$ – transporte de $H^+$ ).....	30
3.11	Eletroforese ( <i>SDS-page</i> ).....	33
3.12	Imunoensaio – <i>western blotting</i> .....	33
3.13	Ensaio de acidificação extracelular .....	33
4.	RESULTADOS.....	34
4.1	Efeito do nitrato sobre $V H^+$ -ATPases ativada e não ativada de pela glicose extracelular .....	34
4.2	A inibição de $V H^+$ -ATPases de organelas da via secretória.....	40
4.3	O papel chave do gradiente protônico ( $\Delta\mu H^+$ ) para a ativação das bombas de $H^+$ .....	50
4.4	O papel da calcineurina na ativação de bombas de $H^+$ .....	69
5.	DISCUSSÃO.....	79
5.1	As diferentes propriedades de bombas ativadas e não ativadas pela glicose extracelular .....	79
5.2	As diferenças e igualdades das $V H^+$ -ATPases ativadas e não ativadas de organelas da via secretória.....	81
5.3	Gradiente protônico e acidificação do citosol como fatores chaves da regulação de P e $V H^+$ -ATPases pela glicose extracelular .....	83
5.4	Calcineurina como coordenador das atividades de P e $V H^+$ -ATPases .....	86
6.	CONCLUSÕES .....	91
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Homeostase iônica

Quando a viabilidade celular é colocada em discussão, deve-se levar em consideração o papel fundamental da homeostase iônica sobre a manutenção dos mais diversos processos fisiológicos. Isto pode ser demonstrado pelo fato de muitas doenças ou fenômenos patológicos (em micro-organismos, plantas e animais) ocorrerem como resultado de desequilíbrios iônicos causados por mutações em proteínas-chaves que controlam a homeostase iônica (Moulard *et al.*, 2001; LaFerla, 2002; Gachet *et al.*, 2005; Codlin *et al.*, 2008). De fato, a homeostase é fundamental para diversos processos, como: biossíntese, degradação, enovelamento, endereçamento e secreção de proteínas; fusão e divisão de membranas; morfogênese de organelas e células; dinâmica de microtúbulos; divisão celular (Okorokova-Façanha *et al.*, 2002).

A homeostase pode ser definida como a tendência da célula ou do organismo em manter-se em um estado estável, mesmo sob qualquer perturbação ambiental, devido às respostas coordenadas dos seus constituintes (Niu *et al.*, 1995). Todas as células desenvolveram mecanismos específicos e altamente sensíveis à transdução de sinais para responderem a um conjunto de estímulos do ambiente, ou seja, todos os organismos, unicelulares e pluricelulares, possuem a capacidade de responderem aos sinais extracelulares que recebem. É a partir de um apurado sistema de sinalização celular que as células comunicam-se umas com as outras e assim, podem ser capazes de desencadear processos como reprodução, obtenção de nutrientes e responder a fatores ambientais adversos (Sanders *et al.*, 2002; Nelson & Cox, 2014).

Normalmente, o fluxo constante de íons para dentro e para fora das células é ajustado para acomodar os requisitos celulares, criando assim a homeostase iônica (Niu *et al.*, 1995). Dessa forma, todos os processos biológicos são realizados de modo que as concentrações intracelulares de íons  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ , fosfato inorgânico (Pi), entre outros, permaneçam em condições ideais, as quais são mantidas pela atividade coordenada de transportadores e canais iônicos (Voet *et al.*, 2014).

Dados anteriores têm fornecido uma mudança de paradigma no que se refere ao modelo de homeostase iônica proposto para células eucarióticas. Este modelo considera somente a ação individualizada de uma bomba iônica na membrana de uma organela intracelular e outra na membrana plasmática. No entanto, foi demonstrado que todas as organelas de via secretória participam da homeostase iônica. Evidenciou-se, por exemplo, que as V H<sup>+</sup>-ATPases funcionam na membrana vacuolar, no retículo endoplasmático (RE), no Golgi e na vesículas secretórias (Okorokov *et al.*, 2001; Samarão *et al.*, 2009). Também foi mostrado que a P H<sup>+</sup>-ATPase encontra-se no seu estado funcional no RE, no Golgi e na vesículas secretórias. No caso do Ca<sup>2+</sup>, a homeostase é mantida por Ca<sup>2+</sup>-ATPases, canais de Ca<sup>2+</sup> de alta e baixa afinidade e por trocadores Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> presentes em todas as organelas da via secretória (Okorokov, 1997; Okorokov & Lehle, 1998; Okorokov *et al.*, 2001; Okorokova-Façanha *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado que tanto o enovelamento como a função das proteínas são dependentes de pH. Alterações no pH podem, por exemplo, ter influência sobre resíduos carregados de cadeias laterais de aminoácidos, o que pode conduzir a alterações no enovelamento de proteínas, resultando em uma redução da atividade (Orij *et al.*, 2011). A estabilidade conformacional das proteínas também mostrou ser dependente do pH e, além disso, foi demonstrado que um pH extremo pode conduzir à desnaturação das proteínas (Pace *et al.*, 1990). O pH também influencia as interações das proteínas com outras proteínas, lipídios e metabólitos (Orij *et al.*, 2011).

Grande parte das proteínas funciona otimamente em uma faixa de pH específica. As enzimas lisossomais, por exemplo, funcionam de forma ótima na faixa de pH em torno de 5, já as enzimas citosólicas atuam melhor em pH neutro (Alberts *et al.*, 2009). Sabendo disso, o pH do citosol e do lúmen das organelas necessita de uma forte regulação para se manter sempre nos níveis considerados ideais, para que sejam mantidas as funções celulares habituais. O trabalho coordenado das bombas protônicas, das Ca<sup>2+</sup>-ATPases e dos trocadores Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> é de extrema importância nesta regulação (Kartner & Manolson, 2016; Manzoor, 2016; Okorokov, 2016).

## 1.2 O pH fisiológico e suas alterações

Muitos trabalhos recentes estão direcionados a explicar a relação entre distúrbios no pH fisiológico e o desenvolvimento de doenças, como por exemplo, doenças neurodegenerativas, epilepsia, malária e diversos tipos de cânceres (Moulard *et al.*, 2001; LaFerla, 2002; Codlin *et al.*, 2008; Webb *et al.*, 2011; Stock & Schwab, 2014; Lehane *et al.*, 2014). Ao mesmo tempo, outros trabalhos buscam testar proteínas chaves da regulação da homeostase iônica como alvos terapêuticos para as diferentes doenças, entre elas, tuberculose e diferentes tipos de cânceres (Fais *et al.*, 2007; Neri & Supuran, 2011; Novoa-Aponte & Ospina, 2014).

As V H<sup>+</sup>-ATPases, por exemplo, estão sendo bastante estudadas com essas finalidades, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento e à progressão do câncer (Fais *et al.*, 2007; Fordyce *et al.*, 2016). Essas enzimas são funcionalmente expressas em membranas de via secretória de células animais e só estão presentes na membrana plasmática de células especializadas, como as células epiteliais (Wieczorek *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2011). No entanto, as V H<sup>+</sup>-ATPases também podem estar ativas na membrana plasmática de células cancerígenas e metastáticas humanas, onde desempenham um papel na manutenção do ambiente ácido favorável à invasão (Hinton *et al.*, 2009). Atualmente, considera-se que o bombeamento de H<sup>+</sup> mediado pela V H<sup>+</sup>-ATPase, o qual resulta na acidificação extracelular, pode promover a ativação de diferentes hidrolases, incluindo proteases, que digerem a matriz extracelular durante o processo de invasão e metástase (Hinton *et al.*, 2009). Além disso, acredita-se que os canais iônicos e as proteínas transportadoras estejam envolvidos na transição epitelial/mesenquimal (EMT), uma etapa inicial da cascata metastática em alguns tipos de câncer, como o carcinoma, por exemplo (Stock & Schwab, 2014).

Estudos recentes vão além do câncer. Foi mostrado que P H<sup>+</sup>-ATPases da *Mycobacterium tuberculosis* podem desempenhar papéis críticos na homeostase iônica e na resposta desta micobactéria a substâncias tóxicas nos fagossomos (Palmgren & Nissen, 2011). Estudos como esse buscam avaliar aspectos relevantes das bombas durante infecções, que possibilitem determinar seu potencial como alvo de drogas (Chène, 2002).

Todos esses estudos apontam a importância sobre o entendimento de alguns aspectos que envolvem a dinâmica da homeostase iônica, como por exemplo, o



potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ), para promover avanços nas pesquisas sobre diferentes doenças, tornando possível o desenvolvimento de novas vacinas ou de novas drogas.

### 1.3P ATPases

As ATPases do tipo P formam uma grande família de transportadores integrais de membrana que tem importância vital para todos os seres vivos, desde as bactérias até o reino animal (Bublitz *et al.*, 2011). Uma característica peculiar dessas enzimas é a formação de um intermediário aspartil- $\gamma$ -fosfato durante o seu ciclo catalítico, por isso são chamadas de P ATPases (Pedersen & Carafoli, 1987; Axelsen & Palmgren, 1998). Os membros dessa família são capazes de gerar e manter um gradiente eletroquímico através das membranas celulares, o qual é crucial para a sobrevivência celular. Esse gradiente pode ser gerado a partir da translocação de cátions, metais pesados e lipídios (Bublitz *et al.*, 2011).

A família das P ATPases está dividida em cinco subfamílias (Palmgren & Axelsen, 1998; Bublitz *et al.*, 2011):

- 1) ATPases da subfamília P1, envolvidas no transporte de metais pesados como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ;
- 2) ATPases da subfamília P2, transportadoras de vários cátions mono e divalentes, incluindo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- 3) ATPases da subfamília P3, transportadoras de  $\text{H}^+$ ;
- 4) ATPases da subfamília P4, envolvidas no transporte de aminofosfolipídeos;
- 5) ATPases da subfamília P5: sabe-se que partilham muitas das funções fisiológicas relacionadas com as subfamílias P<sub>2B</sub> e P<sub>4</sub> – ATPases (Palmgren & Axelsen, 1998; Lustoza *et al.*, 2011; Okorokova-Façanha *et al.*, 2016).

A estrutura primária de uma ATPase do tipo P geralmente é identificada por regiões de sequência conservada em domínios citoplasmáticos. De forma geral, o domínio citoplasmático possui um arranjo que inclui um domínio de ligação ao nucleotídeo, um domínio de fosforilação e um domínio atuador, sendo este último, necessário para a etapa da fosfatase do ciclo catalítico, desempenhando uma função reguladora (Toyoshima *et al.*, 2000; Banci *et al.*, 2009). O domínio transmembrana é composto de seis  $\alpha$ -hélices – uma característica comum de todas as ATPases do tipo P que são conhecidas (Bublitz *et al.*, 2011).

Além dos vários estudos envolvendo ATPases do tipo P de humanos, fungos, bactérias e protozoários, atualmente, essas enzimas também são reconhecidas como alvos promissores para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, devido ao seu papel essencial para o organismo hospedeiro. Por exemplo, H<sup>+</sup>-ATPase e SERCA do *Plasmodium falciparum*, patógeno causador da malária, têm sido vistas como alvos para o desenvolvimento de novas drogas (Cardi *et al.*, 2010; Rottmann *et al.*, 2010; Bublitz *et al.*, 2011).

#### 1.4 Bombas protônicas

As bombas de H<sup>+</sup> ou bombas protônicas transportam substâncias/íons contra um gradiente de concentração, utilizando diretamente a energia da hidrólise de ATP, as quais são denominadas ATPases (Alberts *et al.*, 2009) ou, alternativamente, a energia de nucleotídeos ou pirofosfato (PPi), como as H<sup>+</sup>-pirofosfatases (H<sup>+</sup>-PPiases) presentes em plantas (Venâncio, 2013). A família das H<sup>+</sup>-ATPases transportam exclusivamente íons através das membranas (Nelson, 1992).

As H<sup>+</sup>-ATPases ou bombas de H<sup>+</sup> são capazes de transportar H<sup>+</sup> através das membranas contra o gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup>, usando a energia da hidrólise do complexo ATP-Mg (Nelson, 1992). Essas bombas são consideradas enzimas eletrogênicas, pois transportam carga elétrica (positiva) em forma de H<sup>+</sup>, criando uma diferença de cargas elétricas através da membrana, chamada de potencial de membrana e, simultaneamente, uma diferença dos potenciais químicos de H<sup>+</sup> ou gradiente de concentração de H<sup>+</sup> ( $\Delta\text{pH}$ ) (Pedersen & Carafoli, 1987).

São conhecidos três tipos de ATPases protônicas: H<sup>+</sup>-ATPases do tipo P (P H<sup>+</sup>-ATPases), H<sup>+</sup>-ATPases do tipo V (V H<sup>+</sup>-ATPases) e H<sup>+</sup>-ATPases do tipo F (F H<sup>+</sup>-ATPases) (Pedersen & Carafoli, 1987). As P H<sup>+</sup>-ATPases funcionalmente ativas estão localizadas na membrana plasmática, transportando H<sup>+</sup> para o meio extracelular (Serrano, 1983; Pedersen & Carafoli, 1987), nas vesículas secretórias, transportando H<sup>+</sup> para o seu lúmen (Alves, 2006) e nas organelas da via secretória de levedura (Samarão, 2003). As V H<sup>+</sup>-ATPases são encontradas em membranas intracelulares (Stevens & Forgac, 1997; Samarão *et al.*, 2009) e também na membrana plasmática de células animais especializadas. (Klionsky *et al.*, 1990; Merzendorfer *et al.*, 1997; Nelson & Harvey, 1999; Wieczorek *et al.*, 1999; Beyenbach & Wieczorek, 2006). As ATPases do tipo F estão localizadas em

membranas de bactérias, nas mitocôndrias e nos cloroplastos, funcionando como ATP sintases, pois são responsáveis pela síntese de ATP, mas também são capazes de hidrolisar ATP, *in vitro* (Pedersen & Carafoli, 1987).

As V H<sup>+</sup>-ATPases e as F H<sup>+</sup>-ATPases são estruturalmente similares (Nishi & Forgac, 2002). Entretanto, em relação à energética, elas são diferentes, visto que a F H<sup>+</sup>-ATPase produz ATP e a V H<sup>+</sup>-ATPase hidrolisa ATP em células eucarióticas (Pedersen & Carafoli, 1987), apesar de alguns pesquisadores admitirem que a V H<sup>+</sup>-ATPase também possa sintetizar ATP *in vitro* (Façanha & Okorokova-Façanha, 2008), mas ainda existem poucas evidências sobre isso e elas são pouco aceitas.

O método mais simples de distinguir esses três tipos de H<sup>+</sup>-ATPases é através de ensaios com inibidores. A P H<sup>+</sup>-ATPase, por exemplo, pode ser completamente inibida por ortovanadato, mas não é afetada por azida e oligomicina (inibidores de F H<sup>+</sup>-ATPase), nem por nitrato, bafilomicina A1 e concanamicina A (inibidores de V H<sup>+</sup>-ATPase) (Bowman & Bowman, 1988; Dröse *et al.*, 1993).

#### 1.4.1 P H<sup>+</sup>-ATPases: estrutura, funcionamento e regulação

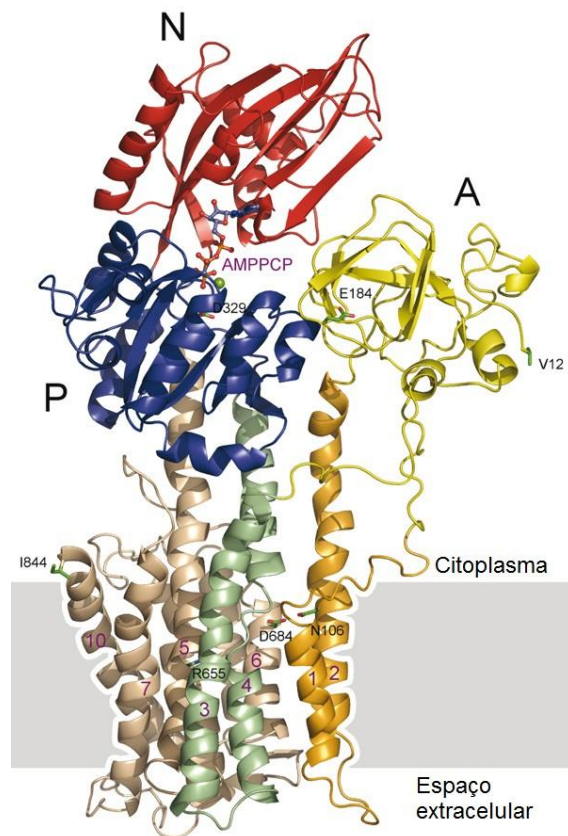
As P H<sup>+</sup>-ATPases são bombas que regulam o pH citoplasmático e geram a força necessária para transportar prótons através da membrana plasmática (MP), sendo essenciais para a viabilidade celular (Serrano *et al.*, 1986; Serrano, 1989; Moller *et al.*, 1996).

A P H<sup>+</sup>-ATPase (expressa na membrana plasmática de plantas e fungos) mantém um potencial de membrana, o qual é essencial para todas as células eucarióticas. Esse potencial de membrana é baseado nas diferentes concentrações de íons nos lados intra e extracelular da membrana. O gradiente eletroquímico criado por essas bombas estimula processos celulares centrais, tais como o transporte secundário de metabólitos, e também fornece a base para a excitação elétrica em neurônios (Moriyama & Futai, 1990). Em leveduras, as P H<sup>+</sup>-ATPases transportam H<sup>+</sup> do citosol para fora da célula, gerando um gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup> necessário para transportar nutrientes (aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos) e produtos metabólicos para dentro e para fora da célula, respectivamente (Goffeau & Slayman, 1981).

Atualmente, é aceito que as P H<sup>+</sup>-ATPases funcionalmente ativas estão localizadas na membrana plasmática, transportando H<sup>+</sup> para o meio extracelular

(Pedersen & Carafoli, 1987; Serrano, 1983), e nas vesículas secretórias (Alves, 2006) e organelas da via secretória (Samarão, 2003), transportando  $H^+$  para seu lúmen.

A figura 1 mostra a estrutura de uma  $P H^+$ -ATPase, a qual apresenta estrutura simples, sendo um peptídeo de 100 kDa, que contém regiões altamente conservadas, especialmente o sítio de ligação do ATP e de fosforilação catalítica (Pedersen & Carafoli, 1987; Fagan & Saier, 1994). A sua extensão N-terminal pode funcionar como um sensor de pH, enquanto que sua porção C-terminal, também chamada de domínio regulatório (R), é autoinibitório e pode ser liberado pela fosforilação ou quando ligado a fatores regulatórios (Kuhlbrandt *et al.*, 2002; Portillo, 2000).



**Figura 1 – Estrutura representativa de uma forma ativa da  $P H^+$ -ATPase, sem sua porção C-terminal auto-inibitória, em associação com o complexo Mg-AMPPCP.** São indicadas dez hélices transmembranas (laranja, verde e marrom); o domínio ligado ao nucleotídeo (N), em vermelho; o domínio de fosforilação (P), em azul; e o domínio ativo (A), em amarelo. Mg-AMPPCP é encontrado na interface entre os domínios N e P e está representado por bolas e traços (Pedersen *et al.*, 2007).

Foi mostrado que existem dois genes que codificam P H<sup>+</sup>-ATPases da MP de *Saccharomyces cerevisiae*: *PMA1* e *PMA2*. A proteína Pma1p, uma das proteínas mais abundantes na MP de *S. cerevisiae* (10-25 % das proteínas da MP), é responsável por assegurar o pH adequado no citosol, sendo essencial para a viabilidade e para o crescimento celular (Serrano *et al.*, 1986; Morsomme *et al.*, 2000).

Em relação à regulação da atividade da P H<sup>+</sup>-ATPase, sabe-se que essa pode ser aumentada ou diminuída de acordo com a disponibilidade e o metabolismo do substrato e com o pH do meio (Serrano, 1983; Eraso & Gancedo, 1987; Rao *et al.*, 1993). Além disso, foi visto que a ativação da enzima induzida pela glicose conduz um efeito combinado nos parâmetros cinéticos que provocam uma redução do K<sub>m</sub> para o ATP e um aumento da V<sub>máx</sub> da hidrólise do ATP, ambos provocados pela fosforilação de dois locais diferentes no domínio C-terminal da enzima (Serrano, 1983; Chang & Slayman, 1991; Eraso & Portillo, 1994; 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 & Mazon, 1985). No entanto, a via de sinalização responsável pela ativação dessa enzima pela glicose ainda não foi totalmente elucidada, ainda que muitos componentes já tenham sido identificados assim como a necessidade da fosforilação direta da H<sup>+</sup>-ATPase (Chang & Slayman, 1991; De la Fuente & Portillo, 2000; Souza *et al.*, 2001). Um dos fatores que parece estar envolvido na ativação da P H<sup>+</sup>-ATPase induzida pela glicose é um tipo de fosfatidilinositol, um fosfolípido encontrado na membrana de células eucarióticas, envolvido em processos de sinalização intracelular (Trópia *et al.*, 2006; Carvalho, 2007).

Adicionalmente, um número crescente de moduladores alostéricos e de proteínas estruturais vem sendo identificados. Eles incluem, por exemplo, a proteína 14-3-3, a qual interage com a H<sup>+</sup>-ATPase de plantas (Jahn *et al.*, 1997) e a calmodulina, a qual interage com a Ca<sup>2+</sup>-ATPase de membrana plasmática (PMCAp) (Enyedi *et al.*, 1989).

#### 1.4.2 V H<sup>+</sup>-ATPases

As V H<sup>+</sup>-ATPases apresentam um papel muito importante na acidificação do lúmen das organelas, sendo, portanto, essenciais para o acúmulo tanto de cátions

( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e aminoácidos) como de ânions (ácidos orgânicos e fosfato inorgânico). Além disso, as  $\text{V H}^+$ -ATPases são de grande importância na regulação do balanço osmótico e no correto endereçamento de proteínas (Harvey, 1992).

As  $\text{V H}^+$ -ATPases foram caracterizadas inicialmente em membranas vacuolares (Barkla & Pantoja, 1996). Porém, atualmente, sabe-se que podem ser encontradas em vários compartimentos intracelulares, como endossomos, lisossomos, Golgi, retículo endoplasmático (RE), vesículas secretórias, vesículas sinápticas, grânulos de cromafina, vesículas cobertas por clatrina, vacúolos de plantas e eucariotos inferiores (Stevens & Forgac, 1997; Inoue & Forgac, 2005; Beyenbach & Wiczorek, 2006; Samarão *et al.*, 2009). Ainda podem ser encontradas em membrana plasmática de células animais especializadas (Klionsky *et al.*, 1990; Merzendorfer *et al.*, 1997; Nelson & Harvey, 1999; Wiczorek *et al.*, 1999; Beyenbach & Wiczorek, 2006), desempenhando papéis importantes.

Em leveduras, o funcionamento de distintas formas da enzima foi evidenciado para todas as organelas da via secretória, incluindo o RE e, provavelmente, o envelope nuclear (Samarão *et al.*, 2009). Em plantas, as  $\text{V H}^+$ -ATPases estão localizadas no tonoplasto e em outros compartimentos intracelulares (Oberbeck *et al.*, 1994; Teodoro, 2004).

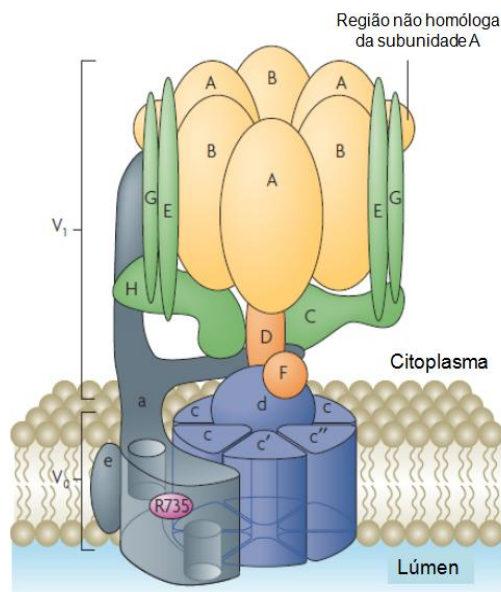
As  $\text{V H}^+$ -ATPases possuem como função primária acoplar a hidrólise de ATP ao transporte de  $\text{H}^+$  através de membranas biológicas. Isso faz com que a força próton motriz gerada pelas  $\text{V H}^+$ -ATPases em organelas de células eucarióticas seja usada como força motriz de vários processos secundários na célula (Nelson & Harvey, 1999). Dessa forma, o bombeamento de prótons realizado pelas  $\text{V H}^+$ -ATPases é de vital importância para vários processos intra e intercelulares, dentre eles a endocitose mediada por receptores, o tráfego de proteínas, neurotransmissões, transporte ativo e armazenamento de metabólitos (Nishi & Forgac, 2002). Além disso, as  $\text{V H}^+$ -ATPases apresentam grande importância na acidificação de organelas da via secretória de plantas e fungos, criando um pH ótimo para diversas hidrolases (Beyenbach & Wiczorek, 2006).

A atividade ótima dessas bombas ocorre entre pH 7,0 e 7,5 (Wilkens *et al.*, 2005), sendo importante para o transporte secundário de vários solutos, dirigindo uma variedade de sistemas auxiliares de transporte ativo através dos co-transportadores de  $\text{H}^+$ , trocadores e canais (Beyenbach & Wiczorek, 2006).

### 1.4.2.1 Estrutura e funcionamento das V H<sup>+</sup>-ATPases

A partir da segunda metade dos anos 80, a purificação de V H<sup>+</sup>-ATPases de células animais, vegetais e de fungos revelou a composição das subunidades dessa enzima (Okorokov, 1985; Uchida *et al.*, 1985; Bowman *et al.*, 1986; Randall & Sze, 1986; Xie & Stone, 1986; Moriyama & Nelson, 1987; Arai *et al.*, 1987). Muitos estudos ainda vêm sendo desenvolvidos para que as propriedades estruturais, funcionais e regulatórias dessa enzima possam ser esclarecidas.

As V H<sup>+</sup>-ATPases, assim como mostra a figura 2, são constituídas de dois complexos proteicos funcionais: o complexo integral hidrofóbico (V<sub>0</sub>), de aproximadamente 260 kDa, e o complexo catalítico hidrofílico (V<sub>1</sub>), de aproximadamente 650 kDa (Forgac, 2007).



**Figura 2 – Estrutura da V H<sup>+</sup> ATPase.** A V H<sup>+</sup> ATPase é composta pelo complexo periférico, V<sub>1</sub> (amarelo e laranja), responsável pela hidrólise de ATP, e pelo complexo integral, V<sub>0</sub> (azul e cinza), envolvido no transporte de prótons através da membrana. Os complexos V<sub>1</sub> e V<sub>0</sub> estão ligados por uma haste central, composta pelas subunidades “D” e “F” (V<sub>1</sub>) e “d” (V<sub>0</sub>), e múltiplas hastes periféricas, compostas pelas subunidades “C”, “E”, “G”, “H” (verde) e o domínio N-terminal da subunidade “a” (Forgac, 2007).

O complexo  $V_0$  é constituído por cinco subunidades (a, c, c', c'', d, e), as quais formam o canal de prótons (Forgac, 1999). A subunidade "a" possui dois hemicanais e um resíduo Arg (R735) crucial, que são necessários para a translocação de prótons através da membrana (Forgac, 2007). Acredita-se que a subunidade "c" seja a principal subunidade envolvida no transporte de prótons através da membrana (Hirata *et al.*, 1997), enquanto a "d" esteja associada ao complexo  $V_0$ , com função de associar os dois complexos da enzima ( $V_0$  e  $V_1$ ) (Bauerle *et al.*, 1993). A subunidade "e" (Vma9p) é uma proteína hidrofóbica pequena que foi primeiramente descrita em vesículas secretórias e microssomos de tecidos bovinos (Ludwig *et al.*, 1998) e em membranas isoladas do intestino e túbulos de Malpighi de insetos (Merzendorfer *et al.*, 1999), sendo confirmada, posteriormente, em leveduras (Sambade & Kane, 2004), sugerindo que esta subunidade é um componente do complexo  $V_0$  presente em todos os eucariotos. Adicionalmente, estudos utilizando leveduras demonstraram que o rompimento dessa subunidade resulta em falha na montagem das subunidades dos complexos  $V_1$  e  $V_0$  do vacúolo (Compton *et al.*, 2006).

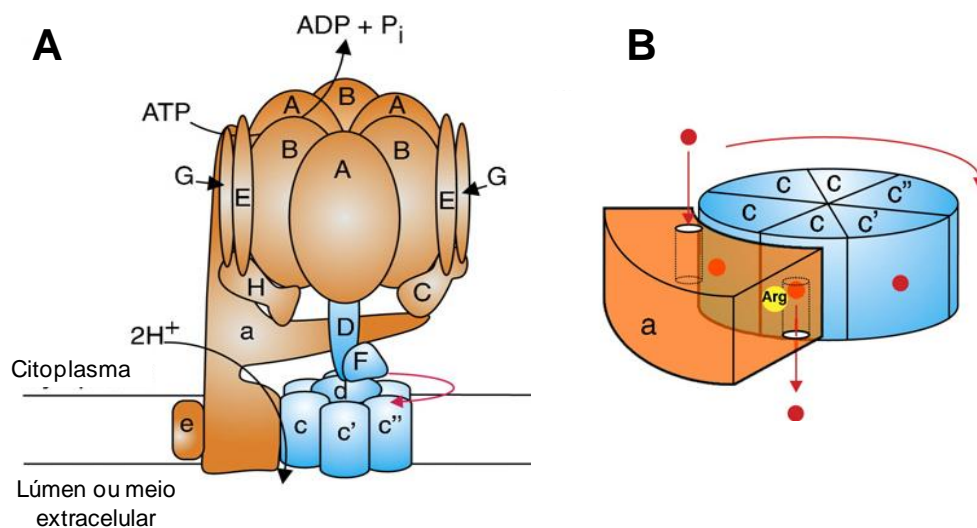
O complexo  $V_1$  é composto por oito subunidades (A, B, C, D, E, F, G e H), as quais são responsáveis pela hidrólise de ATP. Sabe-se que as subunidades "A" e "B" são constituintes da unidade catalítica, com a subunidade "A" envolvida na hidrólise de ATP e a subunidade "B" envolvida na regulação (Finbow & Harrison, 1997). Supõe-se que a subunidade catalítica "A" tenha atividade hidrolítica, desde que os complexos  $V_1$  e  $V_0$  encontrem-se associados (Nelson & Harvey, 1999). Sugere-se que a subunidade "C" realize um papel importante na dissociação entre os complexos  $V_1$  e  $V_0$ , na ausência de glicose (Nelson *et al.*, 1990). Já a subunidade "D", parece ser importante para o acoplamento entre o transporte de  $H^+$  e a hidrólise de ATP (Xu & Forgac, 2000). Este acoplamento se refere ao acoplamento funcional da enzima, ou seja, o sincronismo entre as duas atividades desempenhadas pela  $V H^+$ -ATPase (hidrólise de ATP e transporte de  $H^+$ ). A subunidade "H" parece ser útil na regulação da atividade enzimática e na comunicação da  $V H^+$ -ATPase com diversos processos celulares (Finbow & Harrison, 1997; Parra *et al.*, 2000).

Estudos com  $V H^+$ -ATPases de leveduras mostram a existência de um gene codificando para cada subunidade, com exceção da subunidade "a". Foi mostrado que a interrupção de uma única cópia do gene que codifica a subunidade B do complexo  $V_1$  ou a subunidade c do complexo  $V_0$  resulta na incapacidade de células



de levedura de sobreviverem em pH igual ou maior que 7, elas podem crescer somente em pH 5, aproximadamente (Kakinuma *et al.*, 1981; Nelson, 2003).

Com o intuito de demonstrar o funcionamento das  $V H^+$ -ATPases, Cipriano *et al.* (2008) apresentam, detalhadamente, o mecanismo de transporte de  $H^+$  através de  $V_0$ . Os  $H^+$  entram no complexo  $V_0$  através do hemi-canal citoplasmático e se ligam a resíduos de ácido glutâmico essenciais na subunidade proteolipídica que está alinhada com o hemi-canal. Como o proteolípídios giram, a forma protonada do ácido glutâmico viaja através da bicamada lipídica, retorna para a subunidade “a” e alinha com o hemi-canal do lúmen. O resíduo Arg-735 promove a desprotonação do glutamato e o próton é liberado do hemi-canal para o lúmen (Figura 3).



**Figura 3 – Mecanismo de funcionamento da  $V H^+$ -ATPase. (A)** Mecanismo de rotação da  $V H^+$ -ATPase. As subunidades rotativas são destacadas em azul, enquanto as subunidades estacionárias são mostradas em laranja. A hidrólise de ATP causa mudanças conformacionais nas subunidades “A”, que impulsionam a rotação do rotor (seta vermelha). **(B)** Mecanismo de transporte de  $H^+$  através de  $V_0$ . Os prótons estão representados pelos pontos vermelhos e o resíduo Arg-735 é mostrado em amarelo (Cipriano *et al.*, 2008 - adaptado).

#### 1.4.2.2 Regulação das V H<sup>+</sup>-ATPases

Por ser uma enzima com inúmeras funções em diversos processos fisiológicos, a regulação da atividade da V H<sup>+</sup>-ATPase é de importância crucial. Esta regulação pode estar baseada na resposta a uma diversidade de fatores (Beyenbach & Wieczorek, 2006), o que pode incluir alterações na eficiência de acoplamento de transporte de H<sup>+</sup> com a hidrólise de ATP e o controle da sua localização celular (Forgac, 2007).

##### A) Regulação pela disponibilidade de glicose

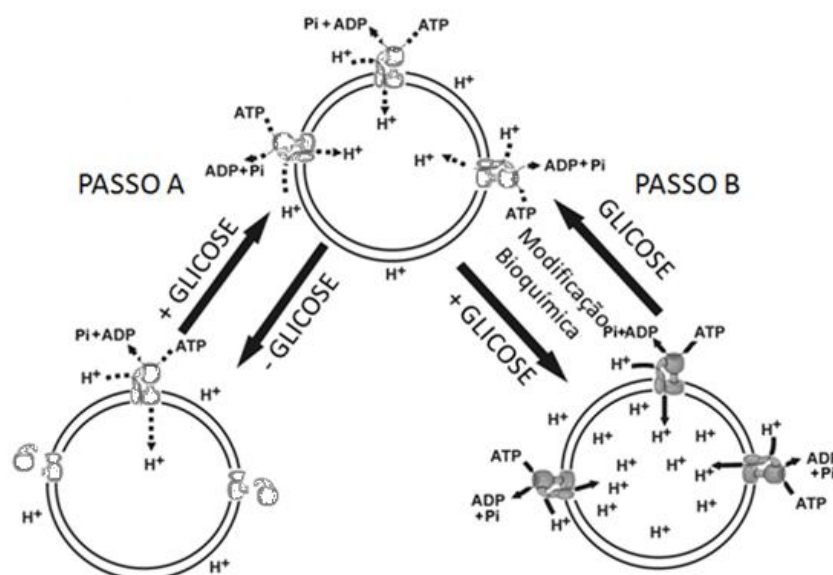
Muitos trabalhos já avaliaram a regulação das bombas protônicas e grande parte deles demonstrou o papel estimulador da glicose extracelular sobre a atividade dessas bombas (Serrano, 1983; Kane, 1995; Ribeiro *et al.*, 2012). Porém ainda não foi esclarecido qual é o sinal responsável por tal estimulação. Alguns pesquisadores vêm buscando responder essa questão a partir de estudos que envolvem o potencial de membrana.

O potencial de membrana é definido como o conjunto de todos os gradientes iônicos através da membrana. O  $\Delta\psi$  da membrana plasmática é considerado a principal força necessária para a translocação de íons e nutrientes (Orij *et al.*, 2011). Em células de mamíferos, o  $\Delta\psi$  através da membrana plasmática é principalmente mantida pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. A energia fornecida pelo gradiente eletroquímico de Na<sup>+</sup> gerado pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase proporciona a força para os trocadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que regulam predominantemente o pH intracelular em células de mamíferos (Casey *et al.*, 2010; Orij *et al.*, 2011). Em leveduras, embora o gradiente eletroquímico de K<sup>+</sup> pareça contribuir para a formação do  $\Delta\psi$  (Madrid *et al.*, 1998; Maresova *et al.*, 2006), é o gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup> que atua como principal formador do  $\Delta\psi$  através da membrana plasmática (Perlin *et al.*, 1988), sendo as bombas protônicas, P e V H<sup>+</sup>-ATPases, as principais responsáveis para a construção deste gradiente (Goossens *et al.*, 2000).

Ao mesmo tempo em que o gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup>, criado pelas bombas protônicas, é importante para a formação do potencial de membrana, tais bombas mostram ter sua atividade afetada por mudanças no  $\Delta\psi$  (Seto-Young & Perlin, 1991). Portanto, é possível afirmar que o gradiente eletroquímico de um

determinado íon pode afetar outros gradientes. Neste sentido, pode-se dizer que o potencial de membrana acopla vários gradientes, de forma a controlar o pH intracelular (Orij *et al.*, 2011).

A disponibilidade de glicose extracelular é um fator chave na regulação das  $V$   $H^+$ -ATPases de diferentes organismos, desde levedura até células animais (Sumner *et al.*, 1995; Kane, 1995; Cipriano *et al.*, 2008). O modelo mecânico de regulação pela glicose extracelular considera que a ausência de glicose extracelular provoca diminuição da atividade enzimática, a partir da dissociação dos complexos  $V_1$  e  $V_0$ , e que o provimento de glicose é capaz de refazer a alta atividade da bomba através a associação destes complexos (Kane, 1995). Assim, quando células de levedura são privadas de glicose, aproximadamente 70 % dos complexos  $V_1$  se dissociam da membrana rapidamente, não sendo necessária a síntese de novas proteínas para reverter este processo (Kane, 1995). Esta dissociação seria, então, responsável pela perda de atividade dos complexos  $V_1$  e  $V_0$ , resultando em uma atividade enzimática residual de 30-40 % (Figura 4, passo A). Neste contexto, apenas o número de complexos catalíticos  $V_1$  ligados aos complexos  $V_0$  da membrana seria o fator determinante da atividade enzimática (Sumner *et al.*, 1995; Kane, 1995).



**Figura 4 – Modelo para a regulação hipotética de  $V$   $H^+$ -ATPase pela glicose extracelular.** Passo A: dissociação e reassociação do complexo catalítico  $V_1$ , de acordo com (Sumner *et al.*, 1995; Kane, 1995); Passo B: modificação bioquímica e mudança conformacional das subunidades do complexo  $V_1$  sem sua dissociação (Ribeiro *et al.*, 2012).

Deste modo, o modelo de dissociação/reassociação dos complexos  $V_1$  e  $V_0$  assume que as moléculas da bomba ativada e não ativada (ou semi ativada) têm as mesmas propriedades, ou seja, idêntica sensibilidade aos inibidores, idêntica afinidade ao ATP e idêntico acoplamento entre o transporte de  $H^+$  e hidrólise de ATP (Figura 4, passo A).

No entanto, alguns pontos foram questionados: 1) Os dois estados da bomba (ativado e não ativado pela glicose) mostram propriedades idênticas no que diz respeito à ação do nitrato, como predito pelo modelo atual (Kane, 1995) da regulação pela glicose extracelular? O nitrato, como ânion caotrópico, é capaz de desestabilizar a estrutura da enzima, causando a dissociação de subunidades dos complexos  $V_1$  e inibindo ambos os processos catalisados pela enzima; 2) A reatividade imunológica e teor de proteína das subunidades A e B, antes e após o tratamento com 100 mM de nitrato, são equivalentes? 3) A afinidade ao ATP em ambos os estados da enzima realmente são idênticos? 4) O acoplamento entre hidrólise de ATP e transporte de  $H^+$  também são idênticos nos dois estados da enzima? (Ribeiro *et al.*, 2012).

Os resultados encontrados por Ribeiro *et al.* (2012) mostram que para diminuir a atividade da enzima na ausência de glicose extracelular não há necessidade da dissociação do complexo  $V_1$ . Os resultados indicaram diferentes propriedades catalíticas, incluindo a diferente capacidade de acoplamento da bomba ativada e não ativada, a modulação desigual da reatividade imunológica das subunidades A e B e as diferentes afinidades ao ATP. Além disso, foi mostrada uma inibição distinta dos dois estados da enzima pelo ânion caotrópico nitrato, o que reflete as diferenças em suas estruturas e conformações (Ribeiro *et al.*, 2012). Os dados apresentados por Ribeiro *et al.* (2012) indicam um novo modelo de regulação da  $V H^+$ -ATPase pela glicose extracelular, sugerindo que o mecanismo de regulação da  $V H^+$ -ATPase pela glicose extracelular *in vivo* é mais complexo do que anteriormente previsto. O modelo anterior, modelo mecânico, assume que a alteração no número de moléculas da bomba com propriedades catalíticas idênticas pode explicar as diferentes atividades da enzima. Ribeiro *et al.* (2012) sugere, portanto, que a regulação da atividade dessa enzima é baseada em uma mudança conformacional, apresentando conformação de baixa atividade e baixo acoplamento na ausência de glicose extracelular e uma conformação de alta atividade e alto acoplamento quando a glicose está disponível (Figura 4, passo B).

## B) Regulação da V H<sup>+</sup>-ATPase em resposta a alterações de pH extracelular

A homeostase do pH citosólico é crítica para a sobrevivência tanto de células de levedura como para as células de todos os outros organismos (Martínez-Muñoz & Kane, 2008). As V H<sup>+</sup>-ATPases e P H<sup>+</sup>-ATPases são enzimas que contribuem para manter essa homeostase, utilizando a energia da hidrólise do ATP para bombear H<sup>+</sup> para fora do citosol. Dessa forma, acredita-se que o aumento da concentração de H<sup>+</sup> no citosol durante a glicólise tenha grande influência sobre a regulação das V H<sup>+</sup>-ATPase através da glicose extracelular. Isso significa que a atividade dessas bombas é sensível ao pH, indicando que tal atividade pode ser ajustada para responder a alterações do pH citosólico *in vivo* (Eraso & Gancedo, 1987). Adicionalmente, foi demonstrado, em células intercaladas dos túbulos renais, que a atividade da V H<sup>+</sup>-ATPase é aumentada em resposta à acidose/alcalose metabólica e a distúrbios eletrolíticos (Chambrey *et al.*, 1994). No entanto, os mecanismos moleculares que levam a esse aumento de atividade não foram elucidados (Wagner *et al.*, 2004).

Com base nesses trabalhos anteriores, recentemente têm-se buscado responder se a atividade de V H<sup>+</sup>-ATPases também é capaz de ser regulada em resposta ao pH extracelular. Recentemente, isso foi mostrado por Martínez-Muñoz & Kane (2008) e por Diakov & Kane (2010). Foi visto que em pH<sub>ext</sub> 5 e na ausência de glicose, células tem um pH citosólico baixo. Com a adição da glicose, o citosol rapidamente torna-se mais alcalino e o pH vacuolar diminui. Além disso, foi mostrado que o pH citosólico de células fornecidas com glicose é relativamente insensível ao pH extracelular, variando de 6,7 (pH<sub>ext</sub> 5) a 7,1 (pH<sub>ext</sub> 7,5) (Martínez-Muñoz & Kane, 2008).

O pH vacuolar também demonstra ser dependente das condições extracelulares. Foi mostrado que, durante o crescimento em meio com pH baixo, a capacidade de acidificar o vacúolo diminui e também ocorre uma redução na montagem das subunidades V<sub>0</sub> e V<sub>1</sub> da V H<sup>+</sup>-ATPase (Padilla-López & Pearce, 2006). Além disso, foi visto que a acidificação vacuolar, em resposta à adição de glicose, é completamente perdida em mutantes *vma1* (mutante deficiente na V H<sup>+</sup>-ATPase) ou em células tratadas com concanamicina A, inibidor da V H<sup>+</sup>-ATPase (Martínez-Muñoz & Kane, 2008). No entanto, a diminuição dos níveis do complexo da V H<sup>+</sup>-ATPase no vacúolo ou a diminuição na montagem das subunidades V<sub>0</sub> e V<sub>1</sub>

não são, sozinhos, os responsáveis pelo transporte de  $H^+$  20 vezes menor observado em pH baixo (Padilla-López & Pearce, 2006). Portanto, 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.

A compartimentalização existente nas células eucarióticas promove uma separação física de metabólitos, proteínas e conseqüentemente processos bioquímicos, o que resulta em diferenças nos valores de pH das diferentes organelas (Roos & Boron, 1981; Llopis *et al.*, 1998). A variação na concentração de íons através da membrana plasmática e das membranas das organelas cria gradientes essenciais para o funcionamento celular (André, 1995; Nishimura *et al.*, 1998; Wipf, *et al.*, 2002). Enquanto o  $H^+$  é importante para gerar o potencial de membrana, este último afeta a atividade das bombas, que contribuem para o gradiente (Seto-Young & Perlin, 1991). As alterações no potencial de membrana podem alterar a ação de transportadores de outros íons que contribuem para a regulação do pH intracelular (Orij *et al.*, 2011).

O importante papel exercido pelo potencial de membrana pode ser avaliado através de análises na presença de ionóforos, o quais são capazes de destruir o gradiente de  $H^+$  através das membranas, aumentando o pH citosólico, e também na presença de  $NH_4Cl$ , o qual é capaz de penetrar na célula através da membrana plasmática por difusão e sofrer dissociação, aumentando a concentração de  $H^+$  dentro do citosol (Eraso & Gancedo, 1987). Estes mecanismos seriam, então, contrários à ativação das bombas de  $H^+$ .

### **C) Regulação da localização celular da $V H^+$ -ATPase**

Em alguns tipos celulares, como em células intercaladas dos túbulos renais, a densidade das  $V H^+$ -ATPases da membrana plasmática na superfície da célula é controlada através da fusão reversível, a partir de exocitose e endocitose, de vesículas intracelulares que contêm uma elevada densidade de  $V H^+$ -ATPases, em resposta a uma carga ácida (Wagner *et al.*, 2004).

## 1.5 Homeotase de $\text{Ca}^{2+}$

A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citosol em células eucarióticas deve ser mantida em níveis muito baixos. Por isso, o controle da concentração deste íon torna-se essencial para as células. Assim o transporte e o estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  são extremamente necessários para que a célula possa manter e regular a baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre, fisiologicamente importante, no citosol (Klionsky *et al.*, 1990; Cunningham & Fink, 1994) e no lúmen de organelas celulares.

Uma mudança da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é capaz de afetar diversos processos celulares, incluindo a transdução de sinais, o controle da secreção de proteínas e o controle do ciclo celular (Campbell, 1983; Johannes *et al.*, 1991; Bush, 1995). Além disso, o  $\text{Ca}^{2+}$  ativa várias proteínas e enzimas reguladoras, tais como: calmodulina, proteínas quinases e proteínas fosfatases (Gadd, 1994). Duas proteínas envolvidas na sinalização pelo  $\text{Ca}^{2+}$  bastante estudadas são a calmodulina e a calcineurina. Estas proteínas mostram-se críticas para o crescimento de células que sobrevivem sob condições de estresse, tais como estresse hiperosmótico, estresse alcalino, estresse térmico e estresse oxidativo (Liu *et al.*, 2015).

O  $\text{Ca}^{2+}$  participa de diversas vias de transdução de sinais e a sinalização dirigida por ele pode conduzir um estímulo bem específico e eficaz dentro dessas vias. No entanto, apesar de ser um sinal necessário, o  $\text{Ca}^{2+}$ , sozinho, pode não ser suficiente para uma determinada resposta, e neste caso, necessita de outro sinal ocorrendo em paralelo, para que a transdução do sinal seja efetiva (Sanders *et al.*, 2002).

A regulação de  $\text{Ca}^{2+}$  é mantida através dos transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  que estão inseridos nas membranas de compartimentos intracelulares e da membrana plasmática, os quais são capazes de responder ao estresse de cálcio. Existem três tipos de transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  que contribuem para essa regulação. (1) os canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , os quais são um tipo de transportador passivo, que realiza o transporte a favor de um gradiente de concentração; (2) as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, também conhecidas como bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  ou transportadores ativos de  $\text{Ca}^{2+}$ , os quais realizam o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  contra um gradiente de concentração, utilizando para isso, a energia de hidrólise de ATP; (3) os trocadores de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , conhecidos como transportadores ativos secundários de  $\text{Ca}^{2+}$ , os quais também realizam o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  contra um gradiente de concentração, porém ao invés de utilizar diretamente

a energia da hidrólise de ATP, utilizam a energia armazenada sobre um gradiente de concentração de  $H^+$ , feito anteriormente por uma bomba de  $H^+$  (Bush, 1995).

Leveduras também possuem transportadores de  $Ca^{2+}$  envolvidos na regulação de  $Ca^{2+}$ . Atualmente é aceito que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui apenas duas bombas de  $Ca^{2+}$ , Pmc1p na membrana vacuolar (Cunningham & Fink, 1994) e Pmr1p na membrana de Golgi (Rudolph *et al.*, 1989), e apenas um trocador  $Ca^{2+}/H^+$  dependente de  $V H^+$ -ATPase, Vcx1p/Hum1p, localizado em membranas vacuolares (Cunningham & Fink, 1996). No entanto, diversas linhas de evidência sugerem que organelas da via secretória de levedura apresentam outras  $Ca^{2+}$ -ATPases e trocadores  $Ca^{2+}/H^+$ , além dos transportadores já descritos (Okorokov, 2016). Além disso, é provável que cada organela da via secretória possua sua  $Ca^{2+}$ -ATPase e seu trocador  $Ca^{2+}/H^+$  próprios, ao passo que já foi mostrado que  $Ca^{2+}$ -ATPases e trocadores  $Ca^{2+}/H^+$  derivados de vesículas de diferentes organelas da via secretória mostraram propriedades diferentes, tais como diferente ativação pela glicose extracelular e diferente sensibilidade ao vanadato (Okorokov, 2016).

Estresses internos ou externos geram respostas intracelulares que são capazes de provocar o influxo ou efluxo de  $Ca^{2+}$ . Isso resulta na abertura dos canais de cálcio e na ativação de  $Ca^{2+}$ -ATPases e trocadores  $Ca^{2+}/H^+$  presentes na membrana plasmática ou nas membranas intracelulares para possibilitar a regulação da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  (Liu *et al.*, 2015).

### 1.6 Calcineurina e as atividades de transportadores

A calcineurina é uma proteína fosfatase que apresenta um papel regulador chave na homeostase de diferentes íons, como  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  etc. (Matsumoto *et al.*, 2002). Esta proteína é um heterodímero que consiste de uma subunidade catalítica de 61 kDa, calcineurina A, e outra regulatória de 19 kDa, calcineurina B (Cohen, 1989). Os genes para as subunidades A e B da calcineurina têm sido identificados em leveduras, fungos filamentosos, protozoários, insetos e mamíferos (Rusnak & Mertz, 2000). Em *S. cerevisiae* há dois genes para a sua subunidade A (*CNA1* e *CNA2*) e um para a sua subunidade B (*CNB1*) (Rusnak & Mertz, 2000).

A perda da regulação desta proteína está associada a diversas doenças humanas, incluindo a doença de Alzheimer, doença de Huntington, câncer, síndrome



de Down, diabetes e esquizofrenia. Também já foi mostrado que sua alta atividade é responsável por várias doenças reumáticas no homem (Rusnak & Mertz, 2000; Cyert & Philpott, 2013; Goldman *et al.*, 2014; Thewes, 2014).

A sinalização  $\text{Ca}^{2+}$ /calcineurina (CAN)-Crz1 é altamente conservada entre os eucariotos, incluindo leveduras, fungos, parasitas e o homem (Thewes, 2014). Esta sinalização é importante para diversas funções dentro da célula: resistência a íons metálicos; resistência a pH elevado; ciclo celular; morfologia celular, integridade da parede celular, resistência a drogas, a virulência, etc. (Thewes, 2014).

Tem sido demonstrado que, em células de levedura, a calcineurina é necessária para a resistência a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Li}^+$ , além de ser importante para a homeostase iônica e a resistência a medicamentos (Thewes, 2014). Em diferentes organismos, a cascata de sinalização da calcineurina, envolvendo o fator de transcrição Crz1 pode ser ativado por diferentes estímulos externos, tais como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ , etanol, cafeína, temperatura, pH, luz azul e antifúngicos. Todos estes sinais causam a elevação transitória da  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico livre (Thewes, 2014), que é formado pela atividade coordenada de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases e trocadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ . Assim, pode-se dizer que a via de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ /calcineurina consiste em vários canais, transportadores, bombas, bem como outras proteínas ou enzimas (Liu *et al.*, 2015).

Sabendo que P e V  $\text{H}^+$ -ATPases são importantes contribuintes para processos celulares essenciais e da importância da calcineurina na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ , investigamos o papel da calcineurina sobre a regulação dessas bombas iônicas. A partir disso, buscamos responder se a sinalização  $\text{Ca}^{2+}$ /calcineurina (CAN)-Crz1 pode estar envolvida na ativação de P e V  $\text{H}^+$ -ATPases pela glicose extracelular, regulando também a homeostase de  $\text{H}^+$ .

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a regulação das atividades de P e V H<sup>+</sup>-ATPases de levedura dependente da glicose extracelular, pH extracelular, nível da energização da membrana plasmática e da calcineurina.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o mecanismo de regulação de V H<sup>+</sup>-ATPases, antes e depois da energização das membranas com glicose extracelular, a partir da determinação da velocidade inicial ( $V_0$ ) e da amplitude máxima ( $F_{m\acute{a}x}$ , *steady state*) do transporte de H<sup>+</sup> e da atividade hidrolítica, em membranas totais isoladas de levedura.
- Avaliar o papel do gradiente de H<sup>+</sup> na efetividade da ativação de P e V H<sup>+</sup>-ATPases, a partir da determinação de suas atividades, em membranas totais isoladas de esferoplastos pré-incubados, ou não, com glicose extracelular, e também a partir de esferoplastos pré-incubados com glicose extracelular na presença de NH<sub>4</sub>Cl ou FCCP.
- Determinar a atividade de P e V H<sup>+</sup>-ATPases e sua regulação pela glicose extracelular na ausência do gene *CNB1* da subunidade regulatória da calcineurina (mutante *cnb1Δ*), com o objetivo de entender o papel da calcineurina como coordenador positivo das atividades dessas bombas.

### 3. MATERIAIS e MÉTODOS

#### 3.1 Cepas de leveduras

- Levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa X2180 (genótipo MATa, gal2, mal), doada ao Prof. Ludwig Lehle (Regensburg, Alemanha) pelo Prof. Hans Rudolph (*Institut für Biochemie der Universität Stuttgart*, Alemanha).
- Levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa K601 (genótipo MATa ade2-1 can1-100 his3-11,14 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1), doada pelo Dr. Kyle Cunningham (*Johns Hopkins University*, EUA).
- Levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa K603 (mutante deficiente na subunidade regulatória da calcineurina), genótipo (W303-1A *cnb1::LEU2*), doada pelo Dr. Kyle Cunningham (*Johns Hopkins University*, EUA).

#### 3.2 Meios de cultura e manutenção da cepa

O meio de cultura YEPD (*yeast extract peptone dextrose*) líquido contém 1 % de extrato de levedura (Difco ou Oxoid), 2 % de bactopectona (Difco ou Oxoid) e 2 % de glicose, acrescido de 2 % de ágar (Vetec) para meios sólidos.

Os meios foram autoclavados a 121 °C por 30 min. O meio sólido foi vazado em placas de Petri e levado à estufa a 37 °C durante 24 horas para a realização do controle de esterilidade. Após este procedimento, algumas colônias foram retiradas do meio YEPD sólido de estocagem e semeadas em um novo meio YEPD sólido.

#### 3.3 Curva de crescimento

O crescimento da cultura de células ocorreu a 30 °C no agitador orbital Inova 4300 (*New Brunswick Scientific*) sob agitação constante de 250 rpm até 48 horas de incubação. O crescimento da cultura de células foi acompanhado a partir de leituras

em espectrofotômetro (*BEL photonics LGS53*), realizadas com intervalos de duas em duas horas, em comprimento de onda de 600 nm. As leituras que ultrapassaram 0,200 unidades foram diluídas em água e uma nova leitura foi realizada.

### **3.4 Preparo do pré-inóculo**

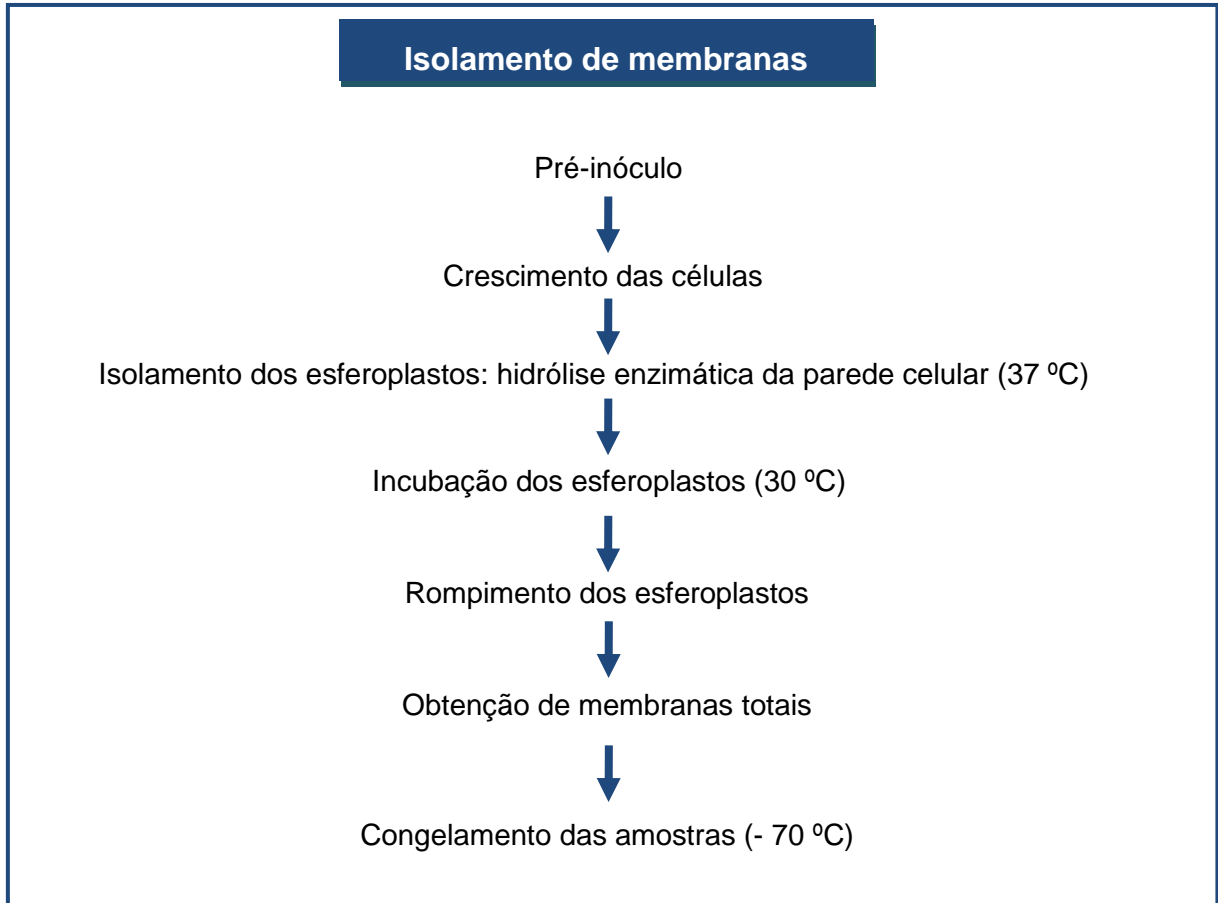
As colônias de levedura foram retiradas do meio sólido YEPD e colocadas em 40 mL do meio YEPD líquido, de forma que a leitura inicial do pré-inóculo no espectrofotômetro (comprimento de onda de 600 nm) apresentasse densidade ótica em torno de 0,1. As células cresceram a 30 °C sob agitação constante de 250 rpm até a fase estacionária.

### **3.5 Preparo da levedura para o isolamento**

O volume do pré-inóculo adicionado em 200 mL ou 400 mL do meio YEPD, distribuídos em erlenmeyers de 1000 mL ou 2000 mL, respectivamente, foi calculado considerando o tempo de geração da cepa utilizada, de acordo com sua curva de crescimento. Dessa forma, após aproximadamente 15 h a 30 °C sob agitação de 250 rpm, as células cresceram até o meio da fase logarítmica.

### **3.6 Isolamento de membranas e fracionamento subcelular**

O isolamento de membranas foi realizado de acordo com o método descrito por Okorokov & Lehle (1998) com modificações (Figura 5).



**Figura 5 – Resumo esquemático do isolamento de membranas** (modificado a partir do protocolo descrito por Okorokov & Lehle, 1998).

### 3.6.1 Obtenção de células

As células foram inoculadas em meio YEPD e colocadas para crescer sob agitação até o meio da fase logarítmica. A cultura de suspensão celular foi centrifugada por 5 min a 5.000 x g. Em seguida, foi feito o descarte do meio e a determinação do peso úmido das células.

### 3.6.2 Obtenção dos esferoplastos

Para cada 1 g de peso úmido de células foi adicionado 5 mL de tampão de esferoplastos (sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 10 mM; pH 7,4), 0,9 mg do complexo enzimático lítico (liticase) e 12  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol (concentração final de 30

mM). Esta suspensão celular em tampão para esferoplastos foi incubada a 37 °C sob fraca agitação (manual).

O monitoramento cinético da hidrólise da parede celular foi realizado com o espectrofotômetro (comprimento de onda de 600 nm) misturando 10 µL da suspensão celular em 990 µL de H<sub>2</sub>O. Este monitoramento foi feito 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 chegue a 20% do valor inicial.

O tubo com a suspensão de esferoplastos foi transferido para o gelo e a reação de hidrólise da parede celular foi finalizada pela adição do tampão de parada (*stop solution* – sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 200 mM; EDTA 20 mM; pH 7,4), benzamidina (0,2 M) e PMSF (0,2 M). A suspensão de esferoplastos foi adicionada ao tubo da centrífuga sobre uma solução colchão (tampão *cushion* – sorbitol 1,4 M; Tris-HCl 50 mM; pH 7,4). Isso foi feito com auxílio de uma pipeta, devagar, evitando a mistura entre a suspensão e a solução colchão. Este material foi centrifugado a 5000 x g por 5 min para que fosse possível eliminar os resíduos de enzimas líticas. O sobrenadante foi descartado e as paredes dos tubos foram secas com papel para evitar que possíveis enzimas hidrolíticas atuassem nos esferoplastos.

### 3.6.3 Pré-incubação dos esferoplastos

Os esferoplastos foram divididos para posterior incubação em tampões de incubação específicos, de acordo com o tratamento escolhido. Os esferoplastos, em suspensão, foram incubados a 30 °C em tempos específicos.

Para comparar, posteriormente, as propriedades das enzimas ativadas e não ativadas, os esferoplastos foram divididos em dois grupos.

**1)** Esferoplastos incubados em tampão sem glicose: incubados com 20 mL de tampão de incubação (sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 50 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 3 mM; pH 7,2) durante 30 min.

**2)** Esferoplastos incubados em tampão com glicose: incubados com 20 mL de tampão de incubação (sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 50 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 3 mM; glicose 100 mM; pH 7,2) durante 30 min.

Para avaliar o papel do gradiente de  $H^+$  e da glicose extracelular na ativação de P e V  $H^+$ -ATPases de membranas totais (MT), os esferoplastos foram divididos em quatro grupos.

**1)** Esferoplastos incubados em tampão sem glicose: incubados com 10 mL de tampão de incubação (sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 50 mM;  $KH_2PO_4$  1 mM;  $MgSO_4$  3 mM; pH 6,0 ou 7,2 ou 7,7 ou 8,2) durante 10 min. Após esse tempo, os esferoplastos foram incubados com 10 mL do mesmo tampão de incubação por mais 10 min.

**2)** Esferoplastos incubados em tampão com glicose: incubados com 10 mL de tampão de incubação (sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 50 mM;  $KH_2PO_4$  1 mM;  $MgSO_4$  3 mM; pH 6,0 ou 7,2 ou 7,7 ou 8,2) durante 10 min. Após esse tempo, esses esferoplastos foram incubados com 10 mL de tampão de incubação (sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 50 mM;  $KH_2PO_4$  1 mM;  $MgSO_4$  3 mM; glicose 200 mM; pH 6,0 ou 7,2 ou 7,7 ou 8,2) por mais 10 min.

**3)** Esferoplastos incubados em tampão com glicose e  $NH_4Cl$ : incubados com 10 mL de tampão de incubação (sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 50 mM;  $KH_2PO_4$  1 mM;  $MgSO_4$  3 mM; pH 6,0 ou 7,2 ou 7,7 ou 8,2) e  $NH_4Cl$  (100mM) durante 10 min. Após esse tempo, os esferoplastos foram incubados com 10 mL de tampão de incubação (sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 50 mM;  $KH_2PO_4$  1 mM;  $MgSO_4$  3 mM; glicose 200 mM; pH 6,0 ou 7,2 ou 7,7 ou 8,2) e  $NH_4Cl$  (100mM), por mais 10 min.

**4)** Esferoplastos incubados em tampão com glicose e FCCP: incubados com 10 mL de tampão de incubação (sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 50 mM;  $KH_2PO_4$  1 mM;  $MgSO_4$  3 mM; pH 6,0 ou 7,2 ou 7,7 ou 8,2) e FCCP (20  $\mu$ M) durante 10 min. Após esse tempo, foram incubados com 10 mL de tampão de incubação (sorbitol 1,2 M; Tris-HCl 50 mM;  $KH_2PO_4$  1 mM;  $MgSO_4$  3 mM; glicose 200 mM; pH 6,0 ou 7,2 ou 7,7 ou 8,2) e FCCP (20  $\mu$ M), por mais 10 min.

Após as incubações, as versões foram centrifugadas a 3500 x g por 8 min a 4 °C (cetrífuga Allegra 6R – BeckMan Coulter).

#### 3.6.4 Obtenção de membranas totais

O sedimento obtido de cada uma das versões foi ressuspensionado em solução de lise, composta por: tampão de lise (sacarose 12,5 %; MOPS-KOH 20 mM; pH 7,6), DTT 1 mM, coquetel de inibidores de proteases 1  $\mu\text{g/mL}$  (quimistatina, pepstatina, antipaína, leupeptina e aprotinina na concentração de 1  $\text{g/mL}$  cada um), benzamidina 1 mM e PMSF 1 mM.

A ressuspensão de cada versão foi homogeneizada, em um homogeneizador de vidro com pistilo de teflon (*potter*), com 21 ciclos completos (*strokes*). Foram adicionados 10 mL da solução de lise e glicerol (1,17 g de glicerol para cada 10 mL de tampão) ao homogeneizado, o qual foi centrifugado a 3500 x g por 8 min a 4 °C (cetrífuga Allegra 6R – BeckMan Coulter).

O sedimento foi desprezado e o sobrenadante (suspensão de membranas totais) foi transferido para o tubo da ultracentrífuga (Himac 80WX, rotor P50A2) e centrifugado a 100000 x g por 45 min a 4 °C. O sedimento (membranas totais) foi ressuspensionado com uma solução de ressuspensão, composta por: tampão de lise (sacarose 12,5 %; MOPS-KOH 20 mM; pH 7,6), 1,17 g de glicerol, coquetel de inibidores de proteases 1  $\mu\text{g/mL}$ , benzamidina 0,5 mM, PMSF 0,5 mM e DTT 0,2 mM.

A ressuspensão de membranas totais foi colocada no homogeneizador de vidro com o pistilo de teflon (*potter*) e homogeneizada com 15 ciclos completos (*strokes*). O volume de membranas totais foi aliqotado em volumes de 100  $\mu\text{L}$ , congelado em nitrogênio líquido e armazenado no freezer a -70 °C até o momento das análises (Figura 6).

#### 3.6.5 Obtenção de membranas intracelulares fracionadas em gradiente de densidade de sacarose

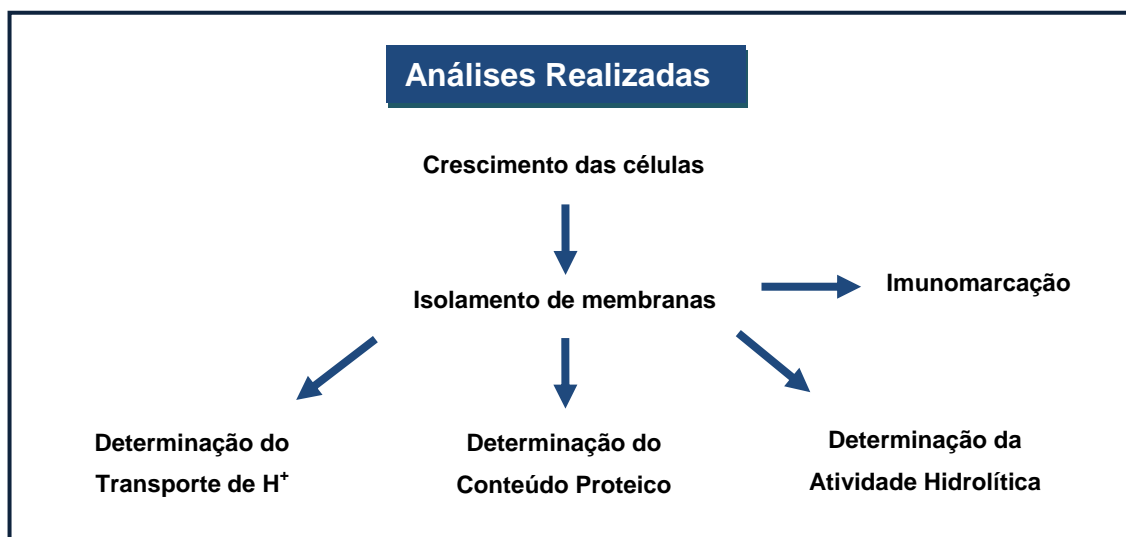
O sedimento (membranas totais) foi ressuspensionado em aproximadamente 1,5 mL de solução de ressuspensão (para, aproximadamente, 1,0 mL do conteúdo de membranas), composta por tampão de lise (Sacarose 12,5%; MOPS-KOH 20 mM; pH 7,6), 1,17 g de glicerol, 1  $\mu\text{g/mL}$  do coquetel de inibidores de proteases, benzamidina 0,5 mM, PMSF 0,5 mM e DTT 0,2 mM. Este volume foi adicionado gradativamente ao sedimentado, até que o volume final determinado fosse atingido.



A ressuspensão de membranas totais foi colocada no homogeneizador de vidro com um pistilo de teflon (*potter*) e homogeneizada com 15 ciclos completos (*strokes*).

Um volume de 1,2 mL a 1,6 mL de ressuspensão de membranas totais foi colocado sobre um gradiente descontínuo de sacarose com as concentrações de 25%, 38% e 50% de sacarose. Cada concentração de sacarose foi diluída peso/peso (p/p) em tampão MOPS-NaOH (MOPS-NaOH 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1mM; pH 7,2). O gradiente foi centrifugado a 140000 x g por 2 h e 45 min a 4 °C (centrífuga Himac 80WX, rotor P28S). O volume de membranas totais restante foi aliqotado em volumes de 100 µL. Estas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no freezer a -70 °C até o momento das análises.

As vesículas de membranas separadas no gradiente descontínuo de sacarose foram fracionadas manualmente com ajuda de uma micropipeta. Dessa forma, as primeiras frações de vesículas de membranas coletadas representam as vesículas de membranas menos densas e as últimas frações, as vesículas de membranas mais densas. Após o fracionamento, cada fração foi aliqotada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada no freezer a -70 °C até o momento das análises (Figura 6).



**Figura 6 – Resumo das análises realizadas a partir das membranas isoladas.**

Depois de cultivar as células e isolar suas membranas, foram realizadas análises como determinação do transporte de H<sup>+</sup>, determinação da atividade hidrolítica, determinação do conteúdo proteico e imunomarcacão.

### 3.7 Determinação do conteúdo proteico

O conteúdo de proteína foi determinado seguindo o protocolo descrito por Bradford (1976) e modificado por Read & Northcote (1981) usando albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

O reagente de Bradford foi preparado a partir da adição de *comassie brilliant blue* G 90 % mg a etanol absoluto. Essa solução foi agitada por 1 hora e 30 min, protegida da luz. Posteriormente, adicionou-se ácido ortofosfórico 85 % a essa solução. Após homogeneização da solução, o volume final foi completado com água destilada. A solução foi filtrada 3 vezes em filtro de papel. A albumina de soro bovina 1 mg/mL foi utilizada como padrão de proteína.

Para determinar a curva de proteína, foram utilizados volumes entre 2 a 20  $\mu$ L da solução de BSA (1 mg/mL) e estes foram completados com quantidades suficientes de água destilada para um volume final de 100  $\mu$ L. Após este procedimento foi adicionado 1 mL da solução de Bradford. Cada reação foi incubada à temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, foram feitas as leituras de cada amostra no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

### 3.8 Determinação de fosfato inorgânico ( $P_i$ )

A solução estoque de  $KH_2SO_4$  0,5  $\mu$ mol/mL (previamente desidratado a uma temperatura entre 40 °C e 60 °C por 2 – 3 h) foi usada como padrão do conteúdo de fosfato inorgânico ( $P_i$ ). Volumes entre 50 e 1000  $\mu$ L dessa solução foram utilizados para determinar a curva padrão. Os volumes abaixo de 1000  $\mu$ L foram completados com quantidade suficiente de água destilada para completar o volume final de 1 mL. A solução de  $P_i$  foi incubada a 30 °C por 30 min. Após esta incubação, 2 mL da solução C foi adicionada. Cada amostra foi incubada por exatamente 10 min a 30 °C, seguida imediatamente da leitura no espectrofotômetro (comprimento de onda de 750 nm).

A solução C consiste em uma mistura de 100:1 da solução A (molibdato de amônio 0,5 %; SDS 0,5 %;  $H_2SO_4$  2 %) e a solução B (ácido ascórbico 10 %), respectivamente, preparada no momento próximo a sua adição. A solução C foi

utilizada em iguais condições e proporções para a determinação de hidrólise do ATP.

### 3.9 Determinação da atividade hidrolítica

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

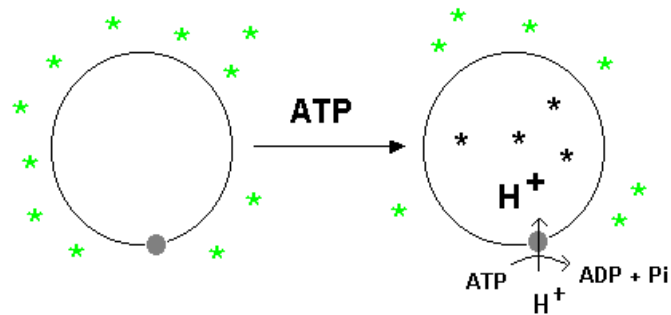
O preparo dos ensaios de hidrólise de ATP foi feito sob refrigeração. Nos tubos de ensaio foram colocados tampão de hidrólise (sorbitol 100 mM; MOPS-KOH 30 mM;  $MgSO_4$  9,5 mM; molibdato de amônio 262  $\mu M$ ; pH 7,2); 50 mM de KCl; volumes retirados da suspensão de vesículas de membranas; 5 mM de ATP-NaOH, pH 7,2; água destilada para completar o volume do meio de reação. O meio de reação foi incubado a 30 °C por 30 min. Após o tempo de incubação, os tubos foram colocados no gelo novamente, o volume da reação de hidrólise foi completado para 1 mL com água destilada gelada. Depois adicionou-se 2 mL da solução C e incubou-se por 10 min a 30 °C, seguida imediatamente da leitura da absorbância a 750 nm.

### 3.10 Determinação do gradiente de $H^+$ ( $\Delta pH$ – transporte de $H^+$ )

Para determinar o gradiente de  $H^+$  foi utilizado o protocolo de Okorokov & Lichko (1983). A determinação foi realizada no espectrofluorímetro (Hitachi F 45000 ou Shimadzu RF-5301 PC) com abertura de 5/10 nm e comprimento de onda de excitação 415 nm e de emissão 485 nm.

A solução utilizada para a determinação do gradiente de  $H^+$  foi preparada com 2,5 mM de  $MgSO_4$ ; 20mM de KCl; vesículas de membranas (volume dependente da atividade); tampão MOPS-KOH para completar o volume final de 2 mL. Foram adicionados 3  $\mu L$  de ACMA 1 mM (estoque dissolvido em etanol). Esta solução foi preparada direto na cubeta e incubada diretamente no fluorímetro a 30 °C por 5 min. Após a incubação, iniciou-se a reação no aparelho, aguardando 50s (tempo de estabilização do platô da fluorescência) e adicionou-se imediatamente 1mM de ATP-NaOH, pH 7,2. A cinética de extinção de fluorescência (*quenching*) foi observada até o tempo de aproximadamente 600 s (ou o tempo necessário para

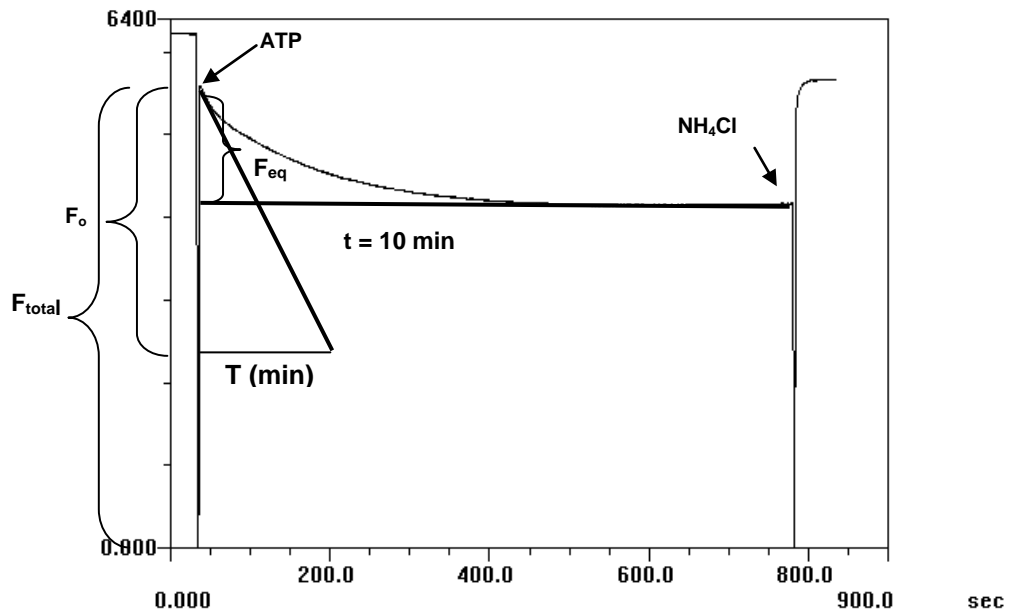
atingir a extinção completa da fluorescência), sendo sequencialmente adicionado 20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , a fim de refazer a fluorescência inicial, ou seja, desfazer o gradiente de  $\text{H}^+$  formado. O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca e quando não protonado tem capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica da membrana. A protonação da base do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Então a sonda distribui-se através da membrana em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. Assim, as concentrações de  $\text{H}^+$  e também de ACMA no exterior da célula se tornam menores, resultando no decaimento da fluorescência (Figura 7). O gradiente é dissipado com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,5 mM.



**Figura 7 – Representação esquemática explicando o decaimento da fluorescência.**

A determinação da velocidade inicial ( $V_0$ ) e da fluorescência máxima ( $\Delta F_{\text{máx}}$ ) na suspensão de vesículas de membranas foi feita utilizando os dados dos gráficos obtidos nas análises (Figura 8).

Sample :delta pH 1 grad isol 22/08/00  
 Comment :ATP 1,0mM NH4Cl 20mM fr9



**Figura 8 – Representação esquemática da determinação de velocidade inicial e amplitude máxima do transporte de H<sup>+</sup>.** Velocidade inicial ( $V_0 = [F_0 / (F_{total} * T)] * 100$ ); Amplitude máxima ( $\Delta F_{max} = (F_{eq} / F_{total}) * 100$ ).

Utilizamos as seguintes fórmulas:

- $V_0 = [F_0 / (F_{m\acute{a}x} * t)] * 100$ , onde:

$V_0$ : velocidade inicial de formação do  $\Delta pH$  (%);

$F_0$ : fluorescência dependente de  $V_0$  num tempo  $t$ , determinado pela extrapolação da maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

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

- $\Delta F_{m\acute{a}x} = F_{eq} / F_{m\acute{a}x} * 100$ , onde:

$F_{eq}$ : fluorescência de equilíbrio determinada como fluorescência do “platô” que reflete o equilíbrio entre o influxo e o efluxo de H<sup>+</sup> nas vesículas.

### 3.11 Eletroforese (*SDS-page*)

O gel de *SDS-page* foi utilizado de acordo com Lichko & Okorokov (1984) e utilizado para eletroforese a fim de avaliar as subunidades da  $V H^+$ -ATPase, do complexo catalítico da enzima: subunidades A e B (do complexo  $V_1$ ).

### 3.12 Imunoensaio – *western blotting*

A imuno resposta das subunidades A e B foi detectada utilizando baixo conteúdo de proteína para evitar uma saturação de reação cruzada. Proteínas de MTs (10 mg) foram separadas através de *SDS-page* 10 %, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpos monoclonais específicos para a subunidade A (anti- $H^+$ -ATPase 69 kDa subunidade 8B1-F3, *Molecular Probes*) ou subunidade B (anti- $H^+$ -ATPase de 60 kDa subunidade 13D11, *Molecular Probes / Invitrogen*) de  $V H^+$ -ATPase de levedura. Proteínas com reação cruzada foram detectadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (*GE Healthcare*). A densidade das bandas foi detectada como descrito em Retamal *et al.* (1999).

### 3.13 Ensaio de acidificação extracelular

O ensaio de acidificação extracelular induzido por glicose foi realizado de acordo com o método de Hemenway *et al.* (1995) com algumas modificações.

Células de levedura cresceram em meio YEPD até o meio da fase logarítmica. Essas células foram centrifugadas e lavadas 2 vezes em água destilada. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em água destilada, na concentração de 100 mg de peso úmido de células por mL, homogeneizadas e colocadas no gelo durante o experimento. Após esses procedimentos, foi preparada uma suspensão de células, contendo 4 mL de células lavadas e 14 mL de água destilada. O pH da suspensão foi ajustado com HCl diluído para 4, a 25 °C. Foi adicionado 2 mL glicose à suspensão no tempo 0 (para uma concentração final equivalente a 2 %) e logo em seguida foi iniciada a medição do pH do meio, de 20 em 20 segundos, durante 25 min.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito do nitrato sobre $V H^+$ -ATPases ativada e não ativada de pela glicose extracelular

Dado o crescente reconhecimento do papel chave de diferentes bombas iônicas como causa ou alvos moleculares de várias condições patológicas, a elucidação dos principais fatores envolvidos na regulação destes sistemas transdutores de energia transmembranares, tem sido abordada como um objetivo prioritário e estratégico. Neste contexto, se insere a presente tese a qual foi estruturada para prover uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação por pH e glicose das principais bombas protônicas da célula eucariótica, usando a levedura *S. cerevisiae* como modelo.

Durante a primeira etapa do presente trabalho, verificamos questões não resolvidas pelo modelo de regulação da  $V H^+$ -ATPase até então aceito, o qual assume que esta enzima é ativada e inativada de forma reversível a partir da adição ou exaustão da glicose, respectivamente, por meio de uma dissociação e reassociação física de aproximadamente 60–70 % dos complexos  $V_1$  e  $V_0$  (Kane, 1995). O número de complexos associados seria o fator determinante da modulação da atividade da bomba. Ainda de acordo com este modelo, as propriedades catalíticas seriam idênticas para tanto para enzimas ativadas quanto para as não ativadas pela glicose extracelular (Kane, 1995).

A partir dessas premissas, em concordância com a hipótese de Kane (1995), as enzimas ativadas e não ativadas deveriam apresentar sensibilidades iguais aos inibidores da bomba, uma vez que as mesmas se diferenciariam somente pelo número de moléculas do complexo  $V_1$  associadas, ou não, ao complexo  $V_0$ . Para verificar a validade e a abrangência do mecanismo proposto por Kane (1995), dando continuidade a um esforço conjunto com outros colegas do grupo (Ribeiro *et al.*, 2012), completamos uma análise detalhada do efeito inibitório do nitrato sobre os dois processos catalisados pela enzima, ou seja, sobre a hidrólise de ATP e o transporte de  $H^+$ .

Ao comparar a sensibilidade das  $V H^+$ -ATPases de membranas totais (MT) ao nitrato, revelamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre as atividades hidrolíticas dos estados das enzimas ativadas e não ativadas (Figura 9),

sugerindo que eles têm estruturas idênticas que são essenciais para a hidrólise de ATP. Este resultado está de acordo com a previsão do modelo atualmente aceito (Kane, 1995), a qual preconiza que os dois estados da bomba não implicariam em mudanças relevantes nas propriedades cinéticas da enzima.

De acordo com a sensibilidade quase idêntica entre as atividades hidrolíticas dos dois estados da enzima e de acordo com a visão inicialmente proposta por Kane (1995) sobre a regulação da bomba pela glicose extracelular, era esperado que o transporte de  $H^+$  catalisado pela bomba nos dois estados também fosse inibido igualmente pelo nitrato. No entanto, isso não aconteceu.

Revelamos que o nitrato inibiu mais eficientemente a velocidade inicial do transporte de  $H^+$  quando comparado com a atividade hidrolítica, indicando uma função desacopladora do nitrato, a qual foi significativamente mais forte para as enzimas não ativadas pela glicose extracelular (Figura 9). Para diminuir a velocidade inicial do transporte de  $H^+$  catalisado pela enzima não ativada em 50 %, por exemplo, foi necessária uma concentração de nitrato cerca de 6 vezes mais baixa, do que aquela necessária para inibir a velocidade inicial do transporte de  $H^+$  catalisado pela enzima ativada (Figura 9). Dados similares foram obtidos no caso do estado estacionário (*steady state*) do transporte de  $H^+$ .

Este resultado sugere uma diferença no acoplamento funcional (acoplamento entre as duas atividades desempenhadas pelas bombas: hidrólise de ATP e transporte de  $H^+$ ) entre os dois estados da enzima, revelando um estímulo da eficiência catalítica da bomba associada a um acoplamento maior da energia liberada pela hidrólise de ATP na promoção das mudanças conformacionais importantes para o transporte ativo de  $H^+$  pela enzima ativada por glicose extracelular (Figura 10).

É possível ver, na figura 9, que as baixas concentrações de nitrato bloquearam significativamente a velocidade inicial do transporte de  $H^+$  mediado por ambos os estados da enzima, enquanto a hidrólise de ATP foi fracamente inibida. Na concentração de 5 mM de nitrato, por exemplo, a velocidade inicial do transporte de  $H^+$  catalisada pela bomba ativada e não ativada foi inibida em 29 % e 42 %, respectivamente, em contraste com apenas 5,3 % e 6,7 % da atividade de hidrólise de ATP. As concentrações crescentes de nitrato também revelaram uma diferença significativa da capacidade de acoplamento entre os dois estados da bomba (Figura 10). Na presença de 100 mM de nitrato, o acoplamento da enzima ativada foi 26



vezes maior do que o acoplamento da bomba não ativada (Figura 10). Além disso, a bomba não ativada perdeu a atividade do transporte de  $H^+$  em concentrações de nitrato maiores que 100 mM, enquanto manteve cerca de 30 % da atividade ATPásica e, portanto, pode-se dizer que a bomba estava funcionando de forma desacoplada (Moriyama & Nelson, 1988; Muller *et al.*, 1999).

De acordo com a visão atual sobre a regulação da bomba pela glicose extracelular, era esperado que as moléculas de enzimas ativadas e não ativadas mostrassem capacidade de acoplamento idêntica. No entanto, a eficácia do acoplamento nos dois estados da bomba, ativada e não ativada, revelou-se pelo menos duas vezes maior para a enzima ativada (Figura 10).

Esses resultados sugerem que a conformação da enzima, ou seja, a interação entre  $V_1$  e  $V_0$ , é essencial para a sua atividade hidrolítica, e muito semelhante para ambos os estados da enzima, do ponto de vista da sua desestabilização pelo nitrato, enquanto sua estrutura essencial para a catálise do transporte de  $H^+$ , em bombas não ativadas, não é tão firmemente construída como a estrutura do estado ativado da bomba, sugerindo que a estrutura da enzima não ativada é menos estável do que a estrutura da enzima ativada pela glicose extracelular.

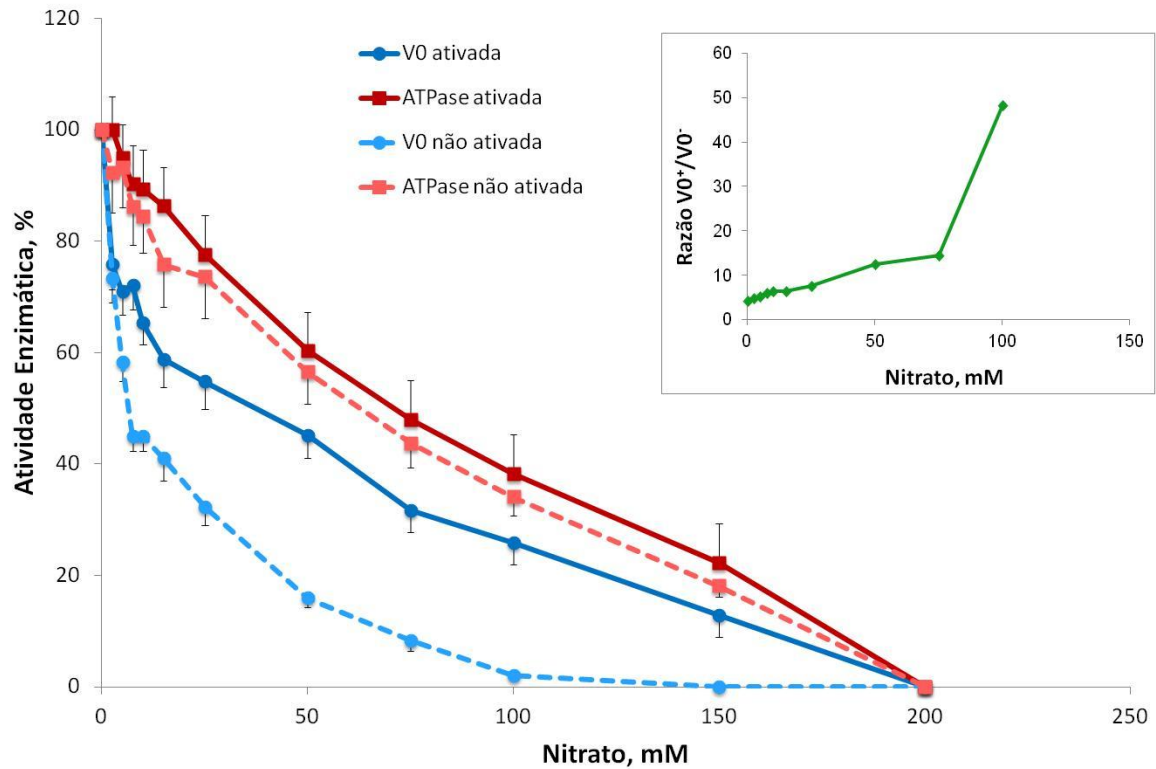
É importante notar o fato de que o nitrato inibiu as velocidades iniciais do transporte de  $H^+$  mais eficientemente do que a hidrólise do ATP, tanto para as enzimas ativadas como para as enzimas não ativadas (Figura 9). Isso indica que o nitrato, mesmo em baixas concentrações, desacopla as atividades de hidrólise de ATP e de transporte de  $H^+$ , catalisadas por ambos estados da enzima (Figura 10).

Com base nesses dados, parece que as moléculas de bombas com melhor acoplamento são mais resistentes à inibição pelo nitrato. No entanto, isso só acontece quando se compara as bombas ativadas e não ativadas pela glicose extracelular (Figura 10), pois é possível revelar que tanto as bombas ativadas como as bombas não ativadas apresentam pequenas subpopulações de moléculas que são muito sensíveis ao nitrato, mas que possuem alta capacidade de acoplamento, comparadas à maioria das moléculas da bomba (Ribeiro *et al.*, 2012).

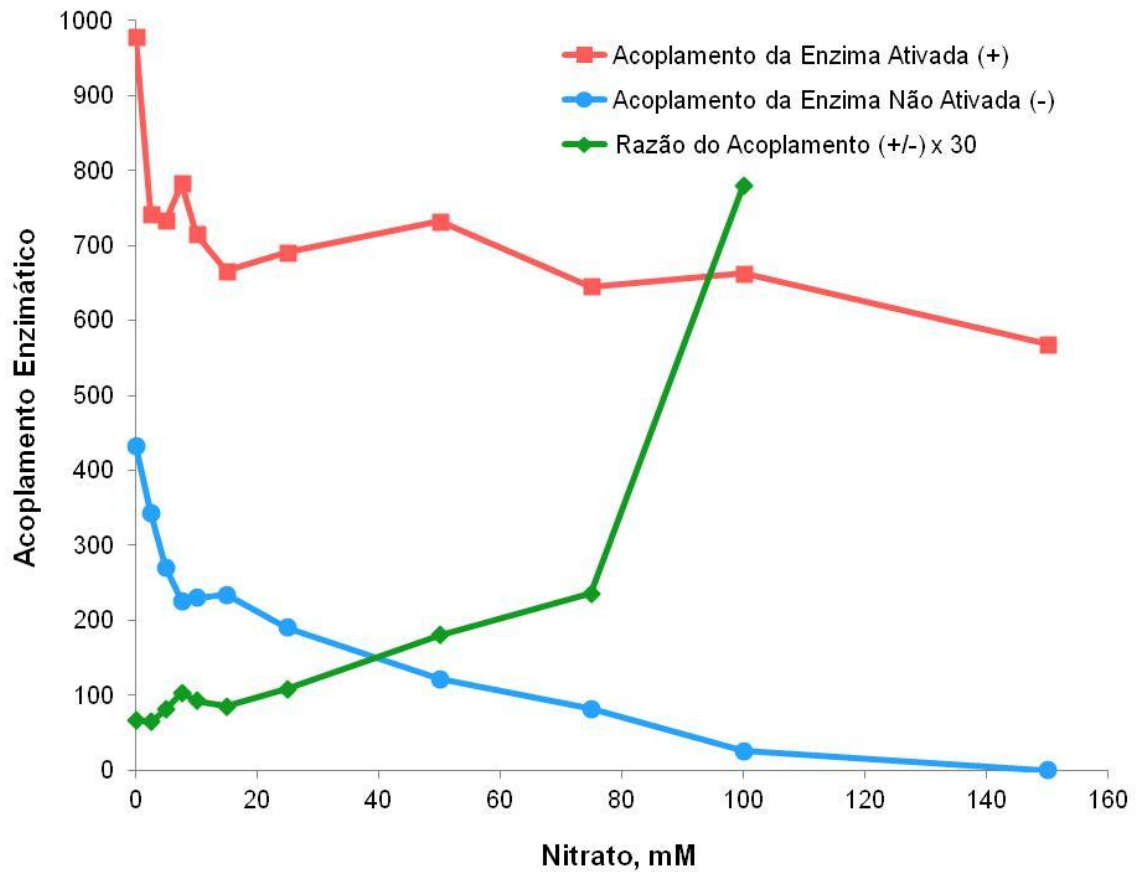
Previamente, já havíamos verificado a equivalência entre a reatividade imunológica e o teor de proteína das subunidades A e B, as quais fazem parte do complexo  $V_1$  da  $V H^+$ -ATPase, antes e após o tratamento com 100 mM de nitrato (Ribeiro *et al.*, 2012). O conteúdo protéico das subunidades A e B não foi modificado

pela glicose extracelular e não se mostrou equivalente à reatividade imunológica (Ribeiro *et al.*, 2012).

As indicações de diferentes propriedades catalíticas, incluindo a diferente capacidade de acoplamento da bomba ativada e não ativada pela glicose extracelular, a modulação desigual da reatividade imunológica das subunidades A e B e as diferentes afinidades ao ATP (Ribeiro *et al.*, 2012), nos leva a propor que a ocorrência de mudanças na concentração de glicose seja capaz de causar modulações assimétricas e reversíveis na reatividade imune das subunidades A e B, através de modificações bioquímicas ao invés da dissociação e reassociação dos complexos  $V_1$  e  $V_0$ , como até então era proposto.



**Figura 9 – Efeito do nitrato sobre a atividade hidrolítica e a velocidade inicial do transporte de  $H^+$  mediada por  $V H^+$ -ATPases ativadas e não ativadas pela glicose extracelular de membranas totais isoladas de *S. Cerevisiae* (cepa X2180). Inserção: Razão do efeito do nitrato entre as velocidades iniciais do transporte de  $H^+$  catalisadas pela enzima no estado ativado ( $V_0^+$ ) e a enzima no estado não ativado ( $V_0^-$ ). Os dados representam valores de pelo menos 7 experimentos independentes. Em cada experimento, as atividades enzimáticas foram determinadas em triplicatas.**



**Figura 10 – Efeito do nitrato sobre a capacidade de acoplamento de V H<sup>+</sup>-ATPases ativadas e não ativadas pela glicose extracelular de membranas totais isoladas de *S. Cerevisiae* (cepa X2180).** A capacidade de acoplamento ( $V_0/\text{ATPase}$ ) é dada como uma porcentagem do decaimento da fluorescência/ $\mu\text{mol}$  de ATP.

#### 4.2A inibição de V H<sup>+</sup>-ATPases de organelas da via secretória

A determinação do transporte de H<sup>+</sup> em membranas enriquecidas com vacúolo, Golgi e RE mostrou a sensibilidade das V H<sup>+</sup>-ATPases ao nitrato em cada uma dessas membranas, na presença ou na ausência de glicose extracelular.

Analisando as Figuras 11 e 12, podemos ver que em baixas concentrações de nitrato, como em 7,5 mM, ocorre uma inibição de 33%, 32%, 30% e 43%, 45%, 39% para o *steady state* e a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> em vacúolos, Golgi e RE não ativados pela glicose, respectivamente. Este fato nos leva a sugerir que em todas as organelas, as enzimas não ativadas apresentam uma inibição notável (como em MT) e quase igual, já em baixas concentrações do nitrato. Além disso, nossos resultados mostram que o *steady state* e a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> da bomba não ativada foi mais sensível à inibição pelo nitrato para todas as concentrações utilizadas, especialmente na concentração de 25 mM, onde encontramos uma diferença de inibição entre os estados ativado e não ativado de 28%, 22%, 23% e 25%, 11%, 21% para o *steady state* e a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> em vacúolos, Golgi e RE, respectivamente (Figuras 11 e 12).

Fazendo uma comparação entre as três organelas analisadas, podemos observar que não houve diferenças significativas entre elas, tanto no que se refere ao *steady state* como à velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> (Figuras 11 e 12). Estes resultados, vistos a partir das porcentagens de inibição, podem indicar que as V H<sup>+</sup>-ATPases destas três organelas da via secretória apresentam propriedades semelhantes. Entretanto, a análise destes dados a partir de valores absolutos das atividades específicas revelam diferenças entre as bombas das organelas (Figuras 13 e 14). Essa diferença vista para as atividades específicas, provavelmente, reflete a diferença do número de moléculas em cada organela.

Também analisamos a atividade hidrolítica das V H<sup>+</sup>-ATPases, determinando sua sensibilidade ao nitrato em cada organela da via secretória, ativada ou não pela glicose extracelular. Nossos resultados mostram que o nitrato não afeta tanto a atividade hidrolítica de ATP como afeta a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup>, chegando a inibição máxima correspondente a 58% apenas na concentração de 25 mM, em membranas do Golgi não ativadas (Figura 15).

Outro fato importante a se observar é que para a atividade hidrolítica de ATP não ocorre grande inibição pelo nitrato nas enzimas não ativadas, comparadas às

enzimas ativadas, assim como também foi visto para membranas totais. A maior diferença entre os estados ativado e não ativado ocorre em vacúolos, apenas nas concentrações de 15 mM e 25 mM de nitrato, a qual foi de 15% e 16%, respectivamente (Figura 15). Além disso, a forma ativada da enzima apresentou praticamente a mesma sensibilidade ao nitrato em todas as organelas. Isto também é verdade para as enzimas não ativadas (Figura 15).

Assim como para as membranas totais, os resultados obtidos para o transporte de  $H^+$  e a hidrólise de ATP das  $V H^+$ -ATPases de organelas da via secretória nos indicaram um maior acoplamento funcional para as enzimas ativadas pela glicose extracelular (Figura 16). A partir disso, calculamos o acoplamento entre estas duas atividades catalisadas pela enzima, nas diferentes concentrações de nitrato utilizadas. O resultado destes cálculos confirmou o esperado. O estado ativado da enzima realmente possui maior acoplamento entre as atividades, em todas as três organelas analisadas (Figura 16), como foi visto para membranas totais. O acoplamento diminuiu na seguinte ordem: vacúolo, Golgi e RE, tanto para a forma da bomba ativada como para a forma não ativada.

Adicionalmente, comparamos a razão do acoplamento visto para as três organelas analisadas. No geral, esta razão permaneceu próxima a 2 vezes, para as três organelas ao longo das concentrações crescentes de nitrato, como foi encontrado para MT. Isso só não ocorreu para o vacúolo, na concentração de nitrato de 7,5 mM, que chegou a quase 4 vezes e para o RE, na concentração de 25 mM de nitrato, chegando a quase 6 vezes (Figura 17).

Verificamos, também, se cada organela apresenta uma pequena população de moléculas de  $V H^+$ -ATPases que mostram alto acoplamento e alta sensibilidade ao nitrato, assim como foi encontrado para MT. Encontramos uma pequena população de  $V H^+$ -ATPase com alta sensibilidade à inibição pelo nitrato e alto acoplamento nos vacúolos, ativados e não ativados (Figura 18). O acoplamento destas pequenas populações dos vacúolos, inibidas por 5 mM de nitrato, é 4,8 e 7,9 vezes maior do que o acoplamento encontrado na ausência de nitrato, para a bombas ativadas e não ativadas, respectivamente (Figura 18). No entanto, não encontramos estas pequenas populações para o Golgi e o RE. Isso pode indicar a existência de propriedades diferentes entre as organelas da via secretória, diferentemente do que é sugerido na hipótese de Kane (1995).

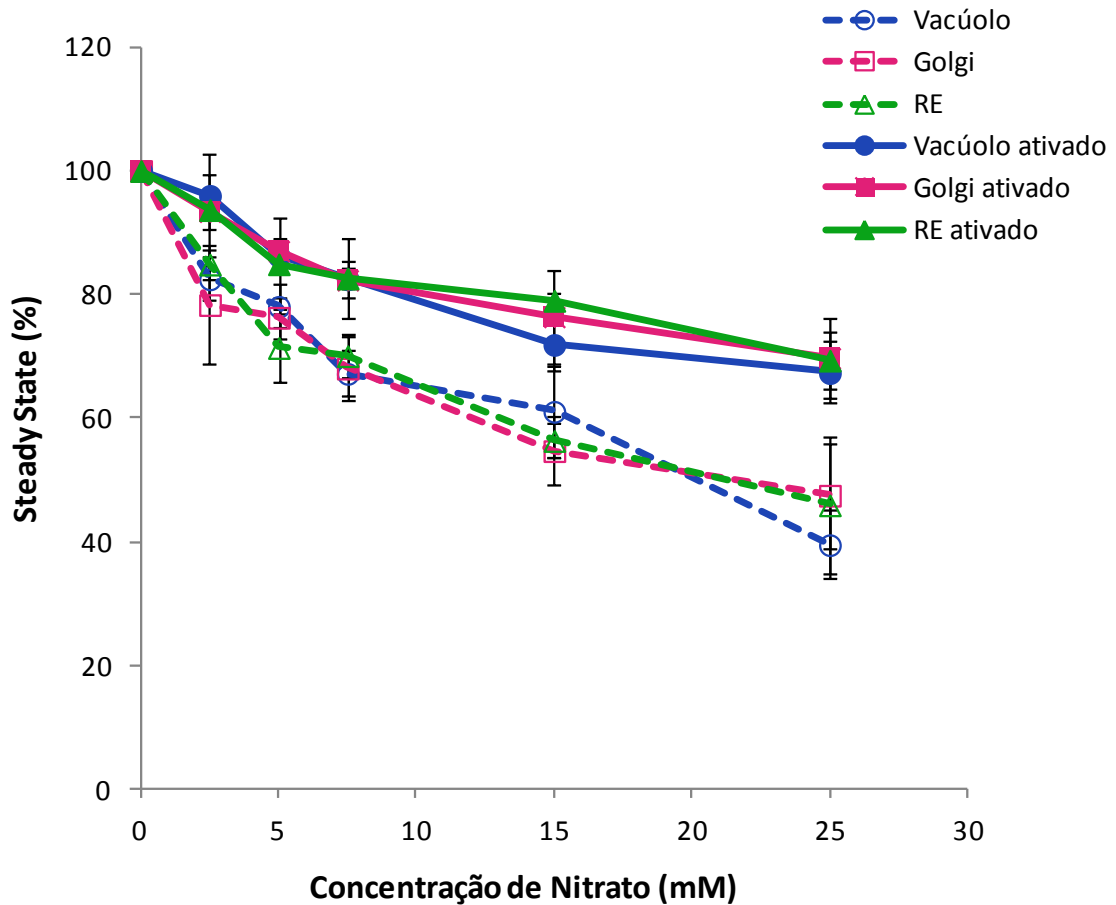


Figura 11 – O nitrato inibe igualmente o *steady state* do transporte de  $H^+$  mediado por  $V H^+$ -ATPases de organelas da via secretória quando comparamos a mesma forma da bomba, mas revela uma resistência aumentada para a forma ativada em todas organelas. Dados obtidos a partir da média de 6 experimentos. Barras indicam erro padrão.

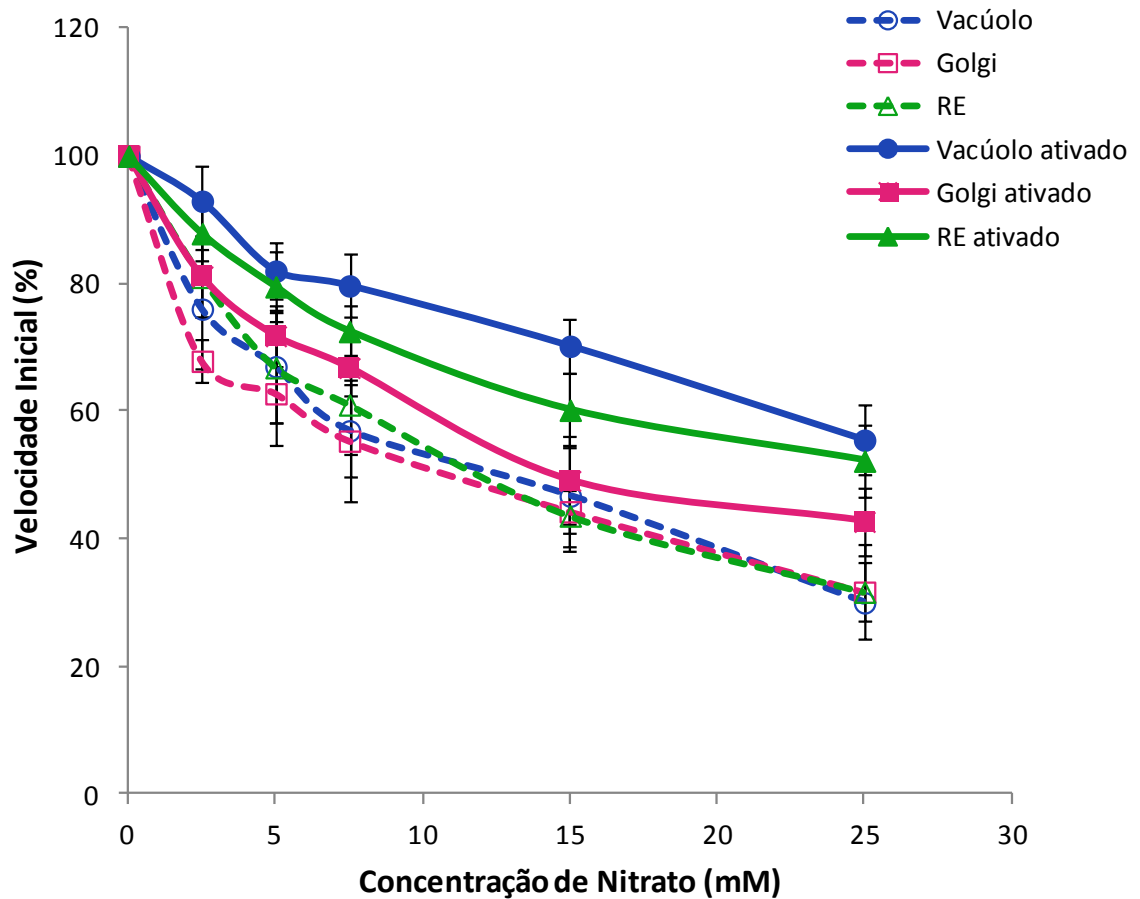
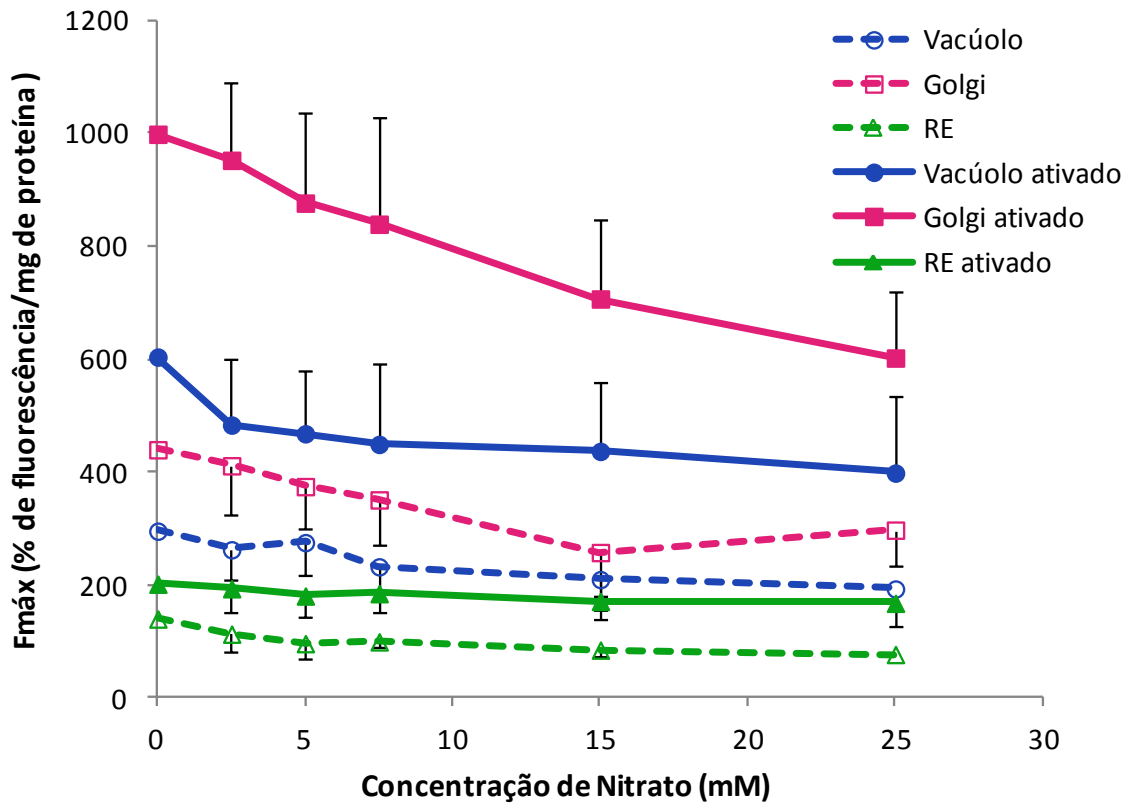
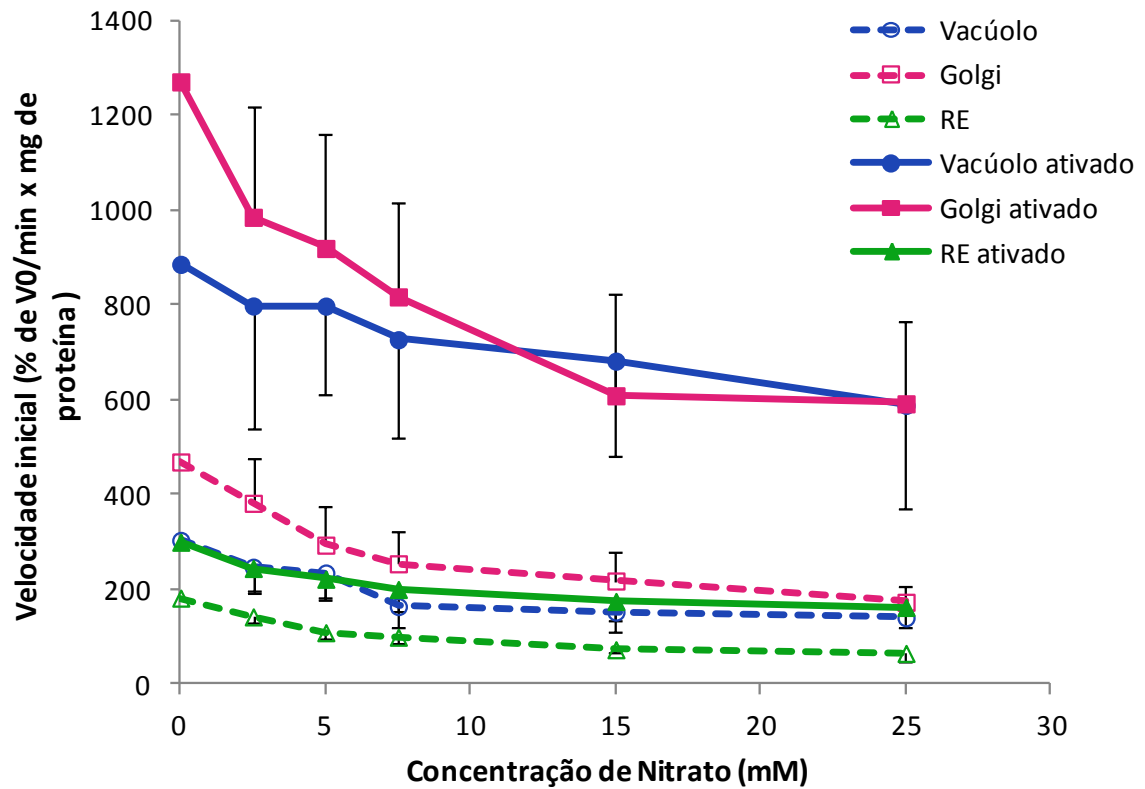


Figura 12 – O nitrato revela uma tendência de inibição diferencial da velocidade inicial do transporte de  $H^+$  mediado por bombas ativadas de organelas da via secretória, mas revela inibição igual para bombas não ativadas. Dados obtidos a partir da média de 6 experimentos. Barras indicam erro padrão.

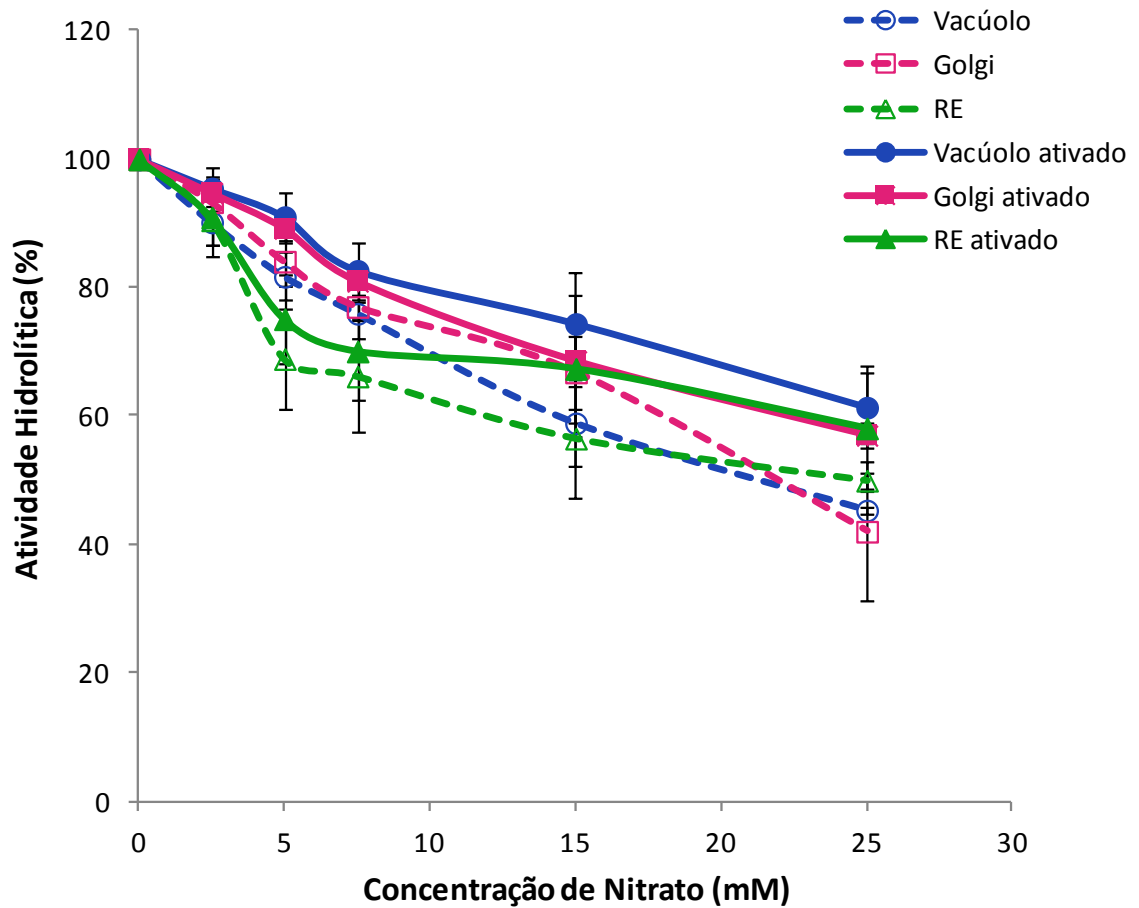




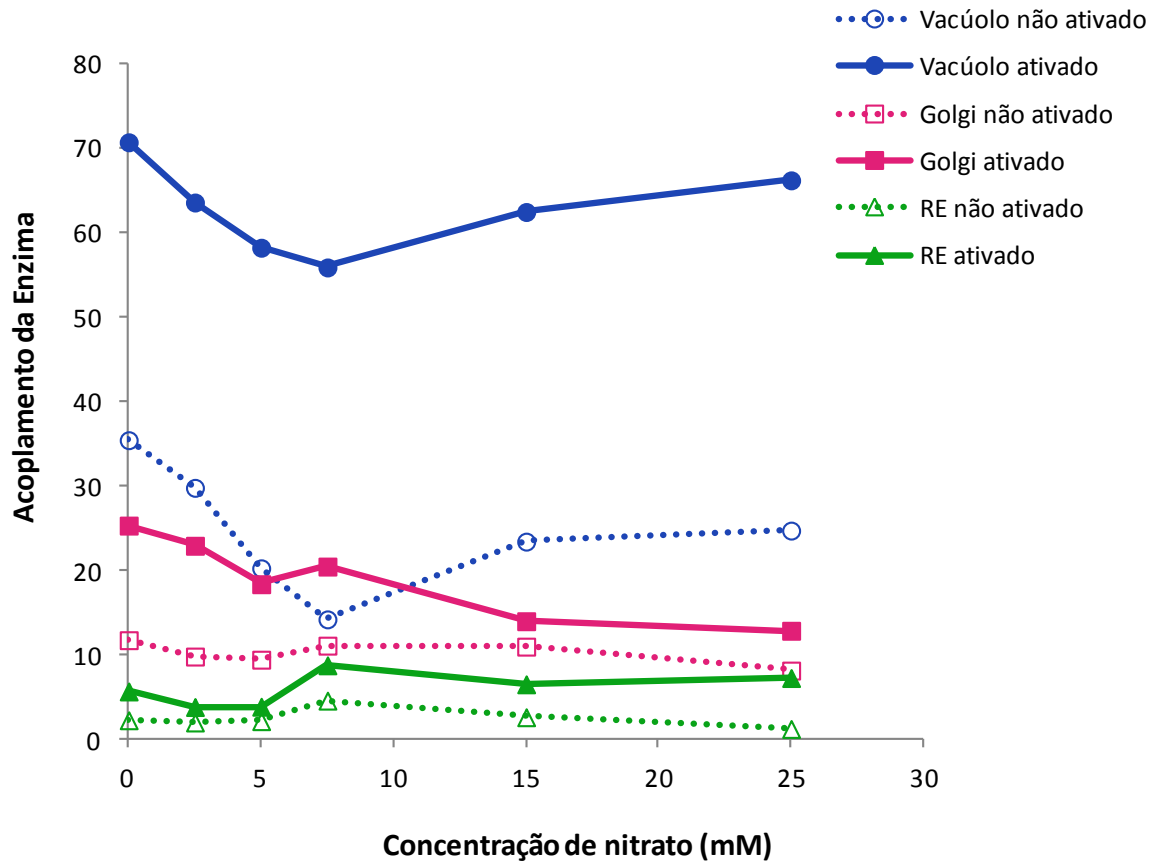
**Figura 13 – O efeito do nitrato sobre as atividades específicas do *steady state* do transporte de  $H^+$  mediado por  $V H^+$ -ATPases de organelas da via secretória revela diferenças significativas entre elas. Dados obtidos a partir da média de 6 experimentos. Barras indicam erro padrão.**



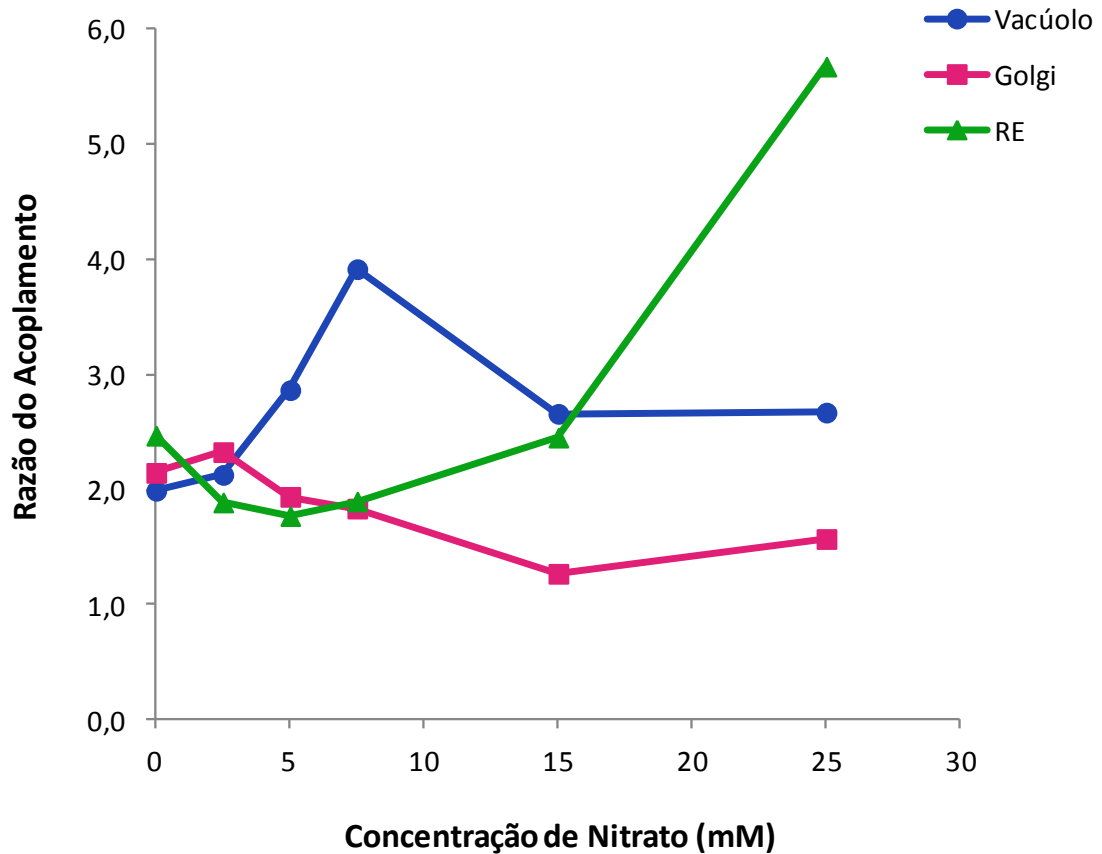
**Figura 14 – O efeito do nitrato sobre as atividades específicas da velocidade inicial do transporte de  $H^+$  mediado por  $V H^+$ -ATPases de organelas da via secretória revela diferenças significativas entre elas. Dados obtidos a partir da média de 6 experimentos. Barras indicam erro padrão.**



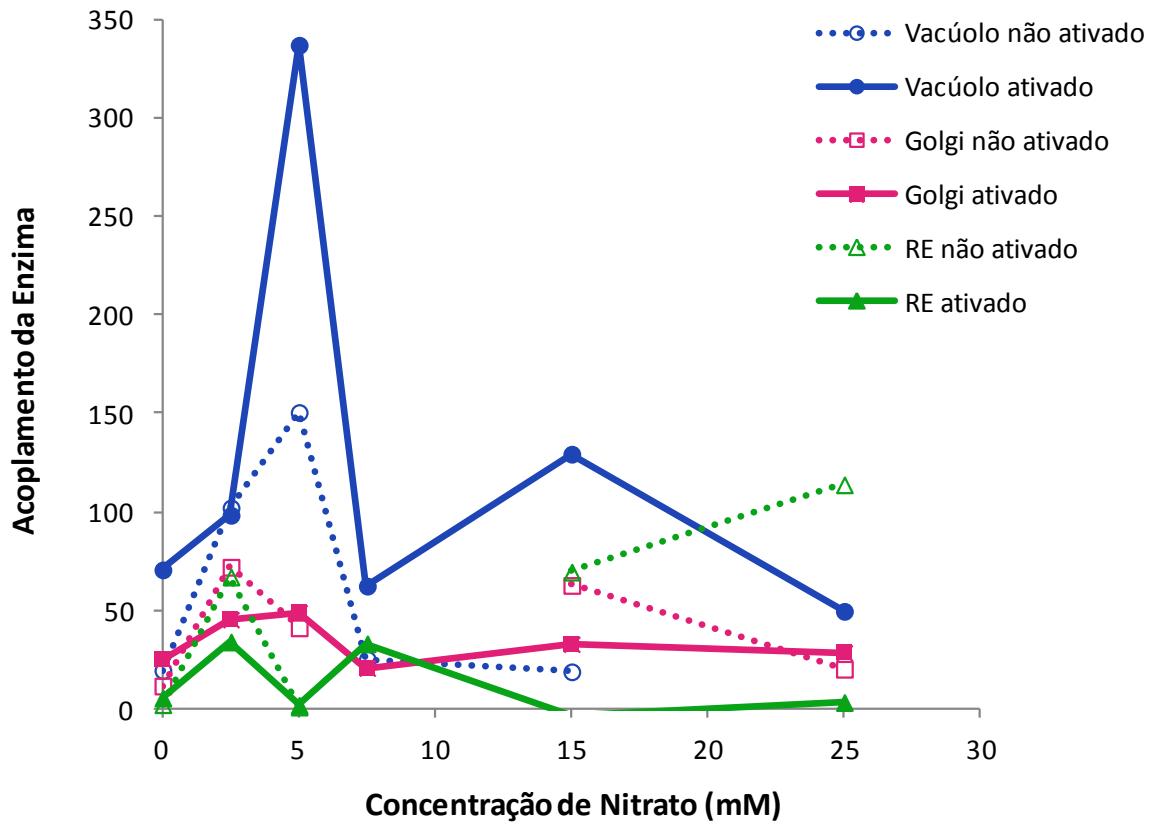
**Figura 15 – O nitrato revela inibição semelhante para a atividade hidrolítica mediada por bombas ativadas e não ativadas de organelas da via secretória, porém revela uma tendência de inibição mais forte para bombas não ativadas. Dados obtidos a partir da média de 7 experimentos. Barras indicam erro padrão.**



**Figura 16 – Acoplamento das  $V H^+$ -ATPases de organelas da via secretória ( $V_0$  do transporte de  $H^+$ /ATPase  $V_0$ ).** Acoplamento em membranas dos vacúolos, Golgi e RE, ativadas e não ativadas pela glicose extracelular. Dados obtidos a partir da média de 4 experimentos.



**Figura 17 – Razão do acoplamento das V H<sup>+</sup>-ATPases de organelas da via secretória.** Dados encontrados a partir da divisão dos valores de acoplamento de bombas ativadas pelo acoplamento de bombas não ativadas. Dados obtidos a partir da média de 4 experimentos.



**Figura 18 – Acoplamento das subpopulações de moléculas das  $V H^+$ -ATPases de organelas da via secretória, inativadas pela concentrações crescentes de nitrato.** Para cada concentração de nitrato, o acoplamento foi calculado dividindo a diferença das velocidades iniciais do transporte de  $H^+$  encontrado para concentrações vizinhas pela diferença similar da hidrólise de ATP. Cálculos:  $(V_0 \text{ em } 0 \text{ mM de nitrato} - V_0 \text{ em } 2,5 \text{ mM de nitrato}) / (\text{ATPase em } 0 \text{ mM} - \text{ATPase em } 2,5 \text{ mM})$ .

#### 4.3 O papel chave do gradiente protônico ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) para a ativação das bombas de $\text{H}^+$

Independentemente da prevalência do modelo clássico (Kane, 1995) ou deste novo que ora propomos, o mecanismo regulatório da ativação de P e V  $\text{H}^+$ -ATPases pela glicose extracelular, desde a sua descoberta (Sumner *et al.*, 1995; Kane, 1995), permanece sem uma descrição adequada de todos os fatores envolvidos neste processo complexo e de grande importância para as células eucarióticas. Até o momento, foram identificados entre os fatores mais importantes envolvidos neste processo, o pH extracelular (Eraso & Gancedo, 1987; Padilla-López & Pearce, 2006; Martínez-Muñoz & Kane, 2008; Diakov & Kane, 2010) e a formação de ilhas de interações funcionais de proteínas nas membranas (*rafts*) com domínios enriquecidos em esfingolipídios (Permyakov *et al.*, 2012).

Foi descrito também, que a desenergização da MP induzida por protonóforos previne a estimulação da P  $\text{H}^+$ -ATPase pela glicose extracelular (Petrov & Okorokov, 1992). Outra observação relevante ao processo foi a acidificação do citosol como resultado da presença de glicose extracelular (Nicolay *et al.*, 1982). Tal decréscimo do pH citosólico foi relacionado à ativação de proteínas quinases que estimulariam a atividade de transporte de  $\text{H}^+$  pelas P  $\text{H}^+$ -ATPases (Nicolay *et al.*, 1982; Lecchi *et al.*, 2005; Eraso *et al.*, 2006; Lecchi *et al.*, 2007) e V  $\text{H}^+$ -ATPases (Voss, *et al.*, 2007; Bond & Forgac, 2008). Ambas as bombas de  $\text{H}^+$  também podem ser ativadas devido à diminuição do gradiente de  $\text{H}^+$  através das membranas intracelulares e da membrana plasmática, como resultado da acidificação do citosol durante, aproximadamente, os primeiros 5 min, pois esta diminuição do  $\Delta\mu\text{H}^+$  deve liberar as bombas de  $\text{H}^+$  de sua inibição (Lichko & Okorokov, 1984).

Também é conhecido que o aumento de íons  $\text{H}^+$  no citosol é capaz de estimular V  $\text{H}^+$ -ATPase (Nicolay *et al.*, 1982) e P  $\text{H}^+$ -ATPase (Serrano, 1993) devido, provavelmente, a alterações no potencial de membrana (Orij *et al.*, 2011). Além disso, foi evidenciado que a destruição de  $\Delta\mu\text{H}^+$ , através da MP, previne a ativação da atividade hidrolítica de ATP pela P  $\text{H}^+$ -ATPase (Petrov & Okorokov, 1992).

Sabendo que a glicose extracelular é capaz de estimular as atividades da hidrólise de ATP e do transporte de  $\text{H}^+$ , mediadas por P e V  $\text{H}^+$ -ATPases e que o potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) pode apresentar importância considerável nesta ativação, para a segunda etapa deste trabalho, resolvemos investigar o papel do

$\Delta\mu\text{H}^+$  através da membrana plasmática na ativação dessas bombas pela glicose extracelular, utilizando o FCCP e o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . O FCCP é um protonóforo capaz de destruir o gradiente de  $\text{H}^+$  através das membranas, podendo, então, prevenir a ativação das bombas de  $\text{H}^+$ . Os íons amônio exibem propriedades ácidas e, em pH básico, sua dissociação gera a formação de  $\text{NH}_4^+$  no citosol, o qual diminuirá a acidificação citosólica, causada pela glicólise. Buscamos, assim, demonstrar que a alta força protônica, ou seja,  $\Delta\mu\text{H}^+$  através das membranas, está envolvido na ativação de P e V  $\text{H}^+$ -ATPases.

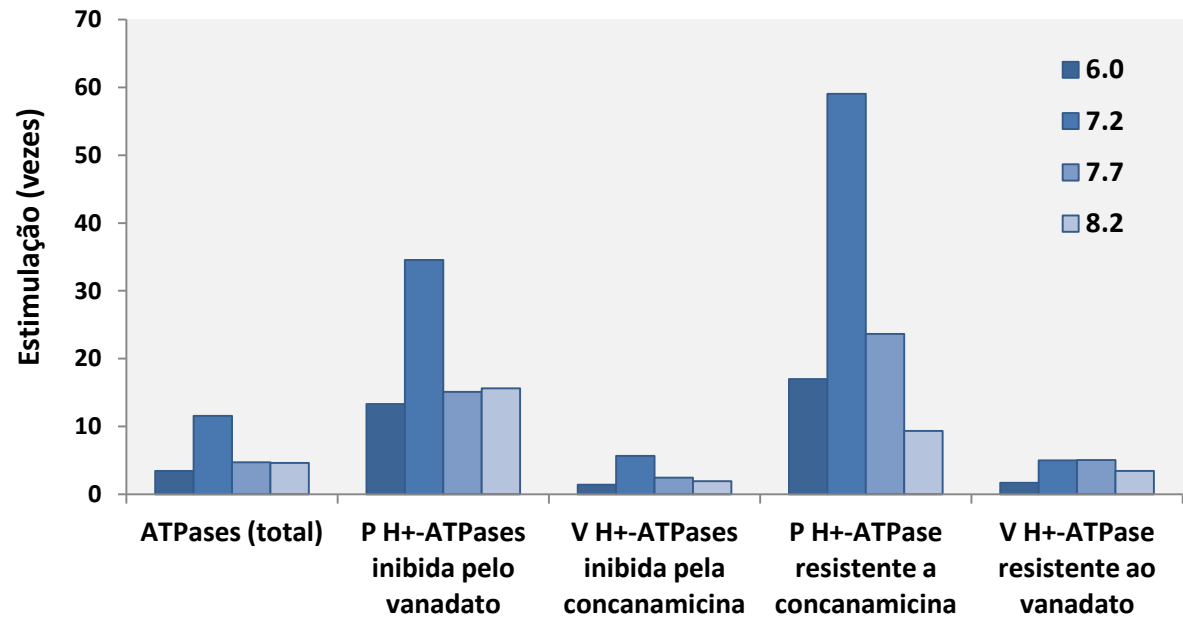
Para verificar a atividade das bombas de  $\text{H}^+$ , P e V  $\text{H}^+$ -ATPases, foi necessária a realização da análise das atividades de transporte de  $\text{H}^+$  e de hidrólise de ATP catalisadas por ambas as bombas. Os valores das atividades específicas obtidos foram calculados levando em consideração o volume de vesículas de membranas utilizado e o conteúdo proteico existente em cada versão.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi mostrado que a glicose extracelular estimula as atividades da hidrólise de ATP e do transporte de  $\text{H}^+$ , mediadas por P e V  $\text{H}^+$ -ATPases, tanto em pH 7,2 quanto em pH 7,7 (Abreu, 2011). Adicionalmente, foi estabelecido que íons  $\text{NH}_4^+$  extracelulares preveniram esta estimulação (Abreu, 2011).

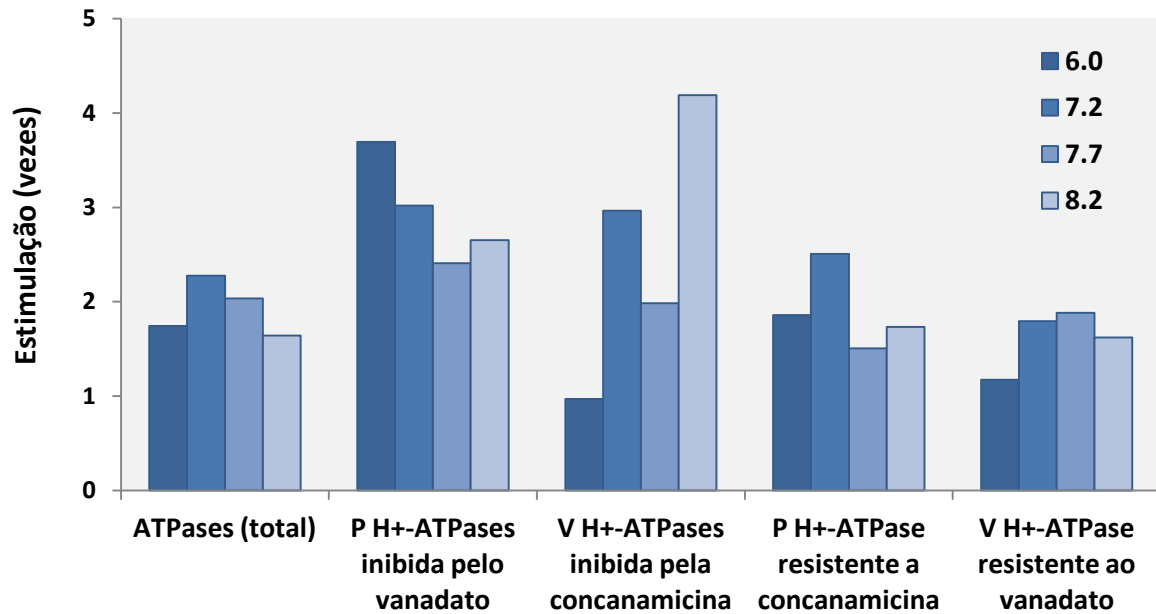
Decidimos avaliar, então, se isso também ocorre em pH 6,0 e pH 8,2. Em pH 6,0, as estimulações da velocidade inicial encontradas tanto para P  $\text{H}^+$ -ATPases como para V  $\text{H}^+$ -ATPases foram as menores observadas (Figura 19). Em pH 8,2, as estimulações das P e V  $\text{H}^+$ -ATPases para a velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$ , foram 9,3 e 3,4 vezes, respectivamente. Ainda nesse mesmo pH, vimos que a estimulação da atividade hidrolítica se assemelha àquela encontrada em pH 7,2, ou ainda, chega a ser mais alta, no caso da V  $\text{H}^+$ -ATPase sensível à concanamicina (Figuras 19 e 20). Assim, mostramos que P  $\text{H}^+$ -ATPases e V  $\text{H}^+$ -ATPases de membranas totais podem ser ativadas pela glicose em pH extracelular diferente de 7,2 e 7,7. No entanto, a estimulação da velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$  ocorreu mais efetivamente na faixa de pH 7,2, tanto para P  $\text{H}^+$ -ATPase como para V  $\text{H}^+$ -ATPase.

Também foi verificado o acoplamento funcional das  $\text{H}^+$ -ATPases em função da mudança do pH extracelular. Na figura 13, é possível observar o maior acoplamento funcional em pH 7,7. Isso demonstra a influência do pH extracelular sobre a atividade dessas enzimas.

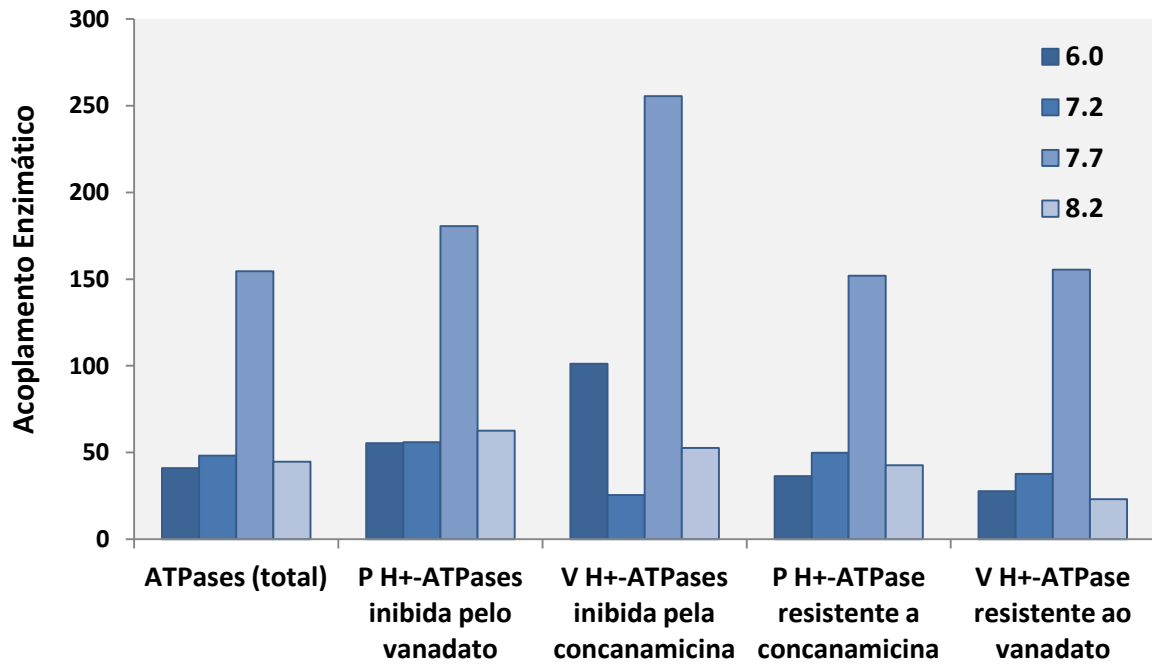




**Figura 19 – Efeito do pH extracelular sobre a estimulação da velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> de P H<sup>+</sup>-ATPases e V H<sup>+</sup>-ATPases pela glicose extracelular, em membranas totais isoladas de *S. Cerevisiae* (cepa X2180). Os dados representam a razão entre os valores médios das atividades das bombas ativadas e das bombas não ativadas pela glicose extracelular.**



**Figura 20 – Efeito do pH extracelular sobre a estimulação da atividade hidrolítica de P H<sup>+</sup>-ATPases e V H<sup>+</sup>-ATPases pela glicose extracelular, em membranas totais isoladas de *S. Cerevisiae* (cepa X2180). Os dados representam a razão entre os valores médios das atividades das bombas ativadas e das bombas não ativadas pela glicose extracelular.**



**Figura 21 – Influência do pH extracelular sobre o acoplamento funcional das H<sup>+</sup>-ATPases, em membranas totais isoladas de *S. Cerevisiae* (cepa X2180). A capacidade de acoplamento ( $F_{\text{máx}}/\text{ATPase}$ ) é dada como uma porcentagem do decaimento da fluorescência/ $\mu\text{mol}$  de ATP.**

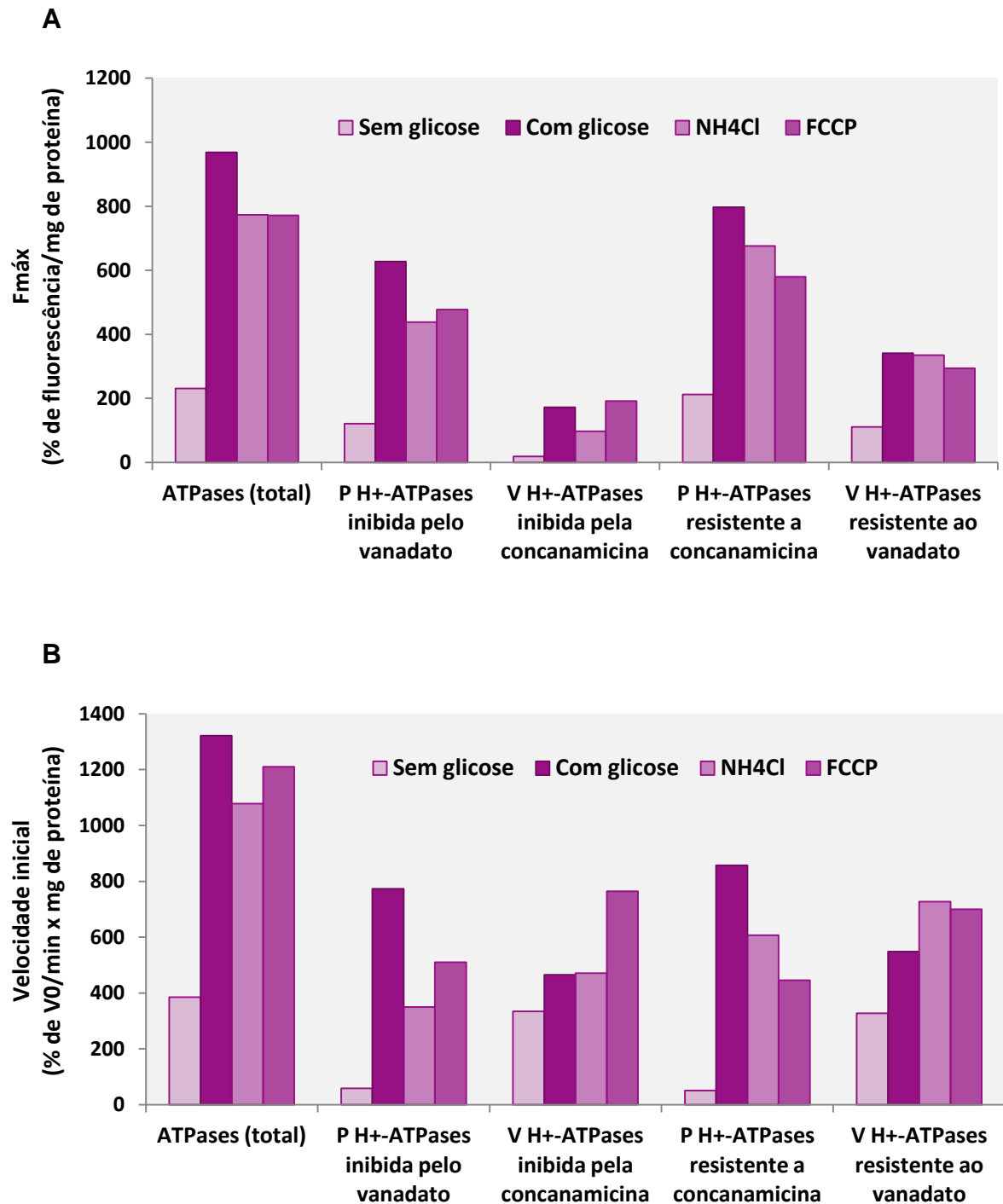
Depois de compararmos as propriedades das bombas de membranas totais nas diferentes faixas de pH extracelular (Figuras 19, 20 e 21), investigamos o efeito do FCCP e do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para as bombas ativadas pela glicose extracelular, para tentar desvendar se o gradiente de  $\text{H}^+$  através da membrana plasmática é um fator importante para a ativação de  $\text{V H}^+$ -ATPases.

Nossos resultados também apresentam o efeito preventivo significativo do FCCP e do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre essa ativação. Essa prevenção pôde ser observada, tanto para o transporte de  $\text{H}^+$  como para a atividade hidrolítica, para ambas as bombas (Figuras 22 a 29).

Em geral, a maior prevenção ocorreu em pH 7,7. Neste caso, a atividade das  $\text{P H}^+$ -ATPases foi prevenida pelo FCCP e pelo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , respectivamente, em torno de 30 % e 45 %, para o *steady state* e em 41 % e 31 %, para a velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$ . Enquanto a atividade das  $\text{V H}^+$ -ATPases foi prevenida pelo FCCP e pelo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , respectivamente, em torno de 32 % e 39 %, para o *steady state* e em 47 % e 44 %, para a velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$  (Figura 26). Nesse mesmo pH, vimos que a atividade hidrolítica de  $\text{P H}^+$ -ATPases e a  $\text{V H}^+$ -ATPases foi prevenida pelo o FCCP, em 32 % e 33 %, respectivamente, enquanto o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  preveniu tal atividade em 30 %, para ambas as bombas (Figura 27).

Embora seja possível observar a prevenção da estimulação pela glicose conduzida pelos ionóforos, podemos notar que as atividades tanto de  $\text{P H}^+$ -ATPases como de  $\text{V H}^+$ -ATPases, na presença desses ionóforos, não chegaram aos níveis de atividade encontrados para as bombas não ativadas, nem tampouco, ficaram abaixo de tais níveis. Isso pode ser visto quando comparamos os dados das atividades das bombas ativadas, na presença de FCCP e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , com as atividades encontradas nas bombas não ativadas, também na presença do FCCP e do  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

A presença de FCCP e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  não previne totalmente a estimulação pela glicose, vemos ainda mais claramente que eles não são capazes de inibir as atividades das bombas, ou seja, não chegam a níveis abaixo dos encontrados para bombas não ativadas. Isso pode evidenciar que o FCCP e o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  não foram capazes de desenergizar completamente as membranas em nossas condições de experimentos, ou seja, destruir, completamente, o gradiente de  $\text{H}^+$ .



**Figura 22 – Efeito do NH<sub>4</sub>Cl e do FCCP sobre o *steady state* (A) e a velocidade inicial (B) do transporte de H<sup>+</sup> em H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. Cerevisiae* (cepa X2180), em pH 6,0. Os dados representam valores de pelo menos 2 experimentos independentes.**

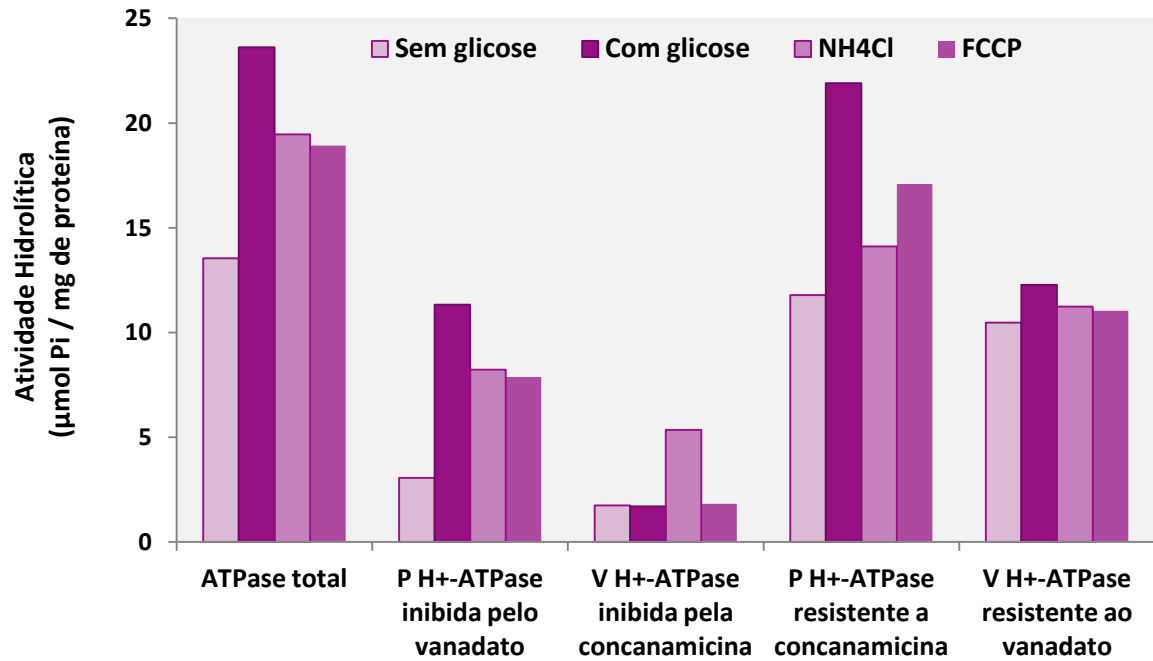


Figura 23 – Efeito do NH<sub>4</sub>Cl e do FCCP sobre a atividade hidrolítica em H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 6,0. Os dados representam valores de pelo menos 2 experimentos independentes.

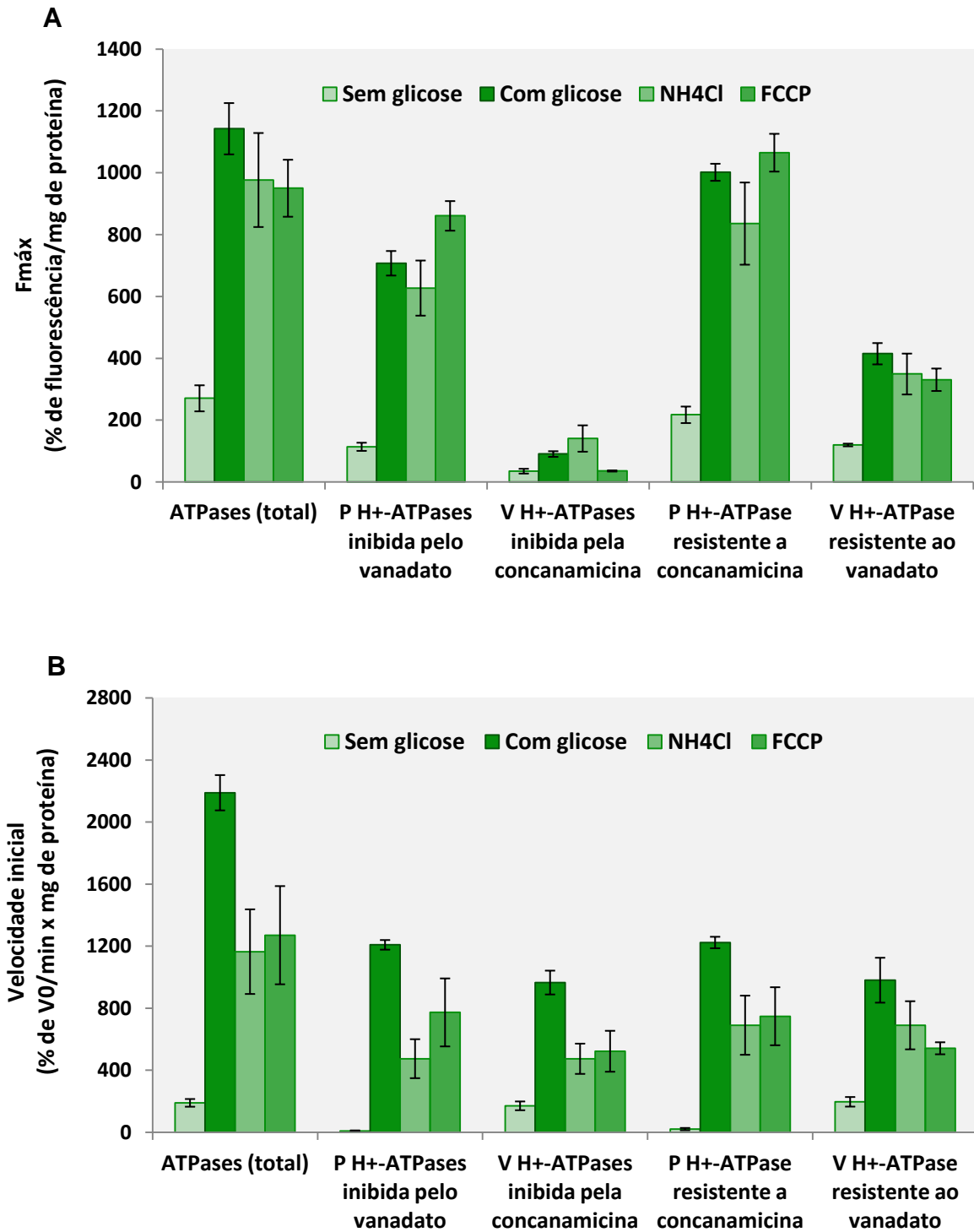
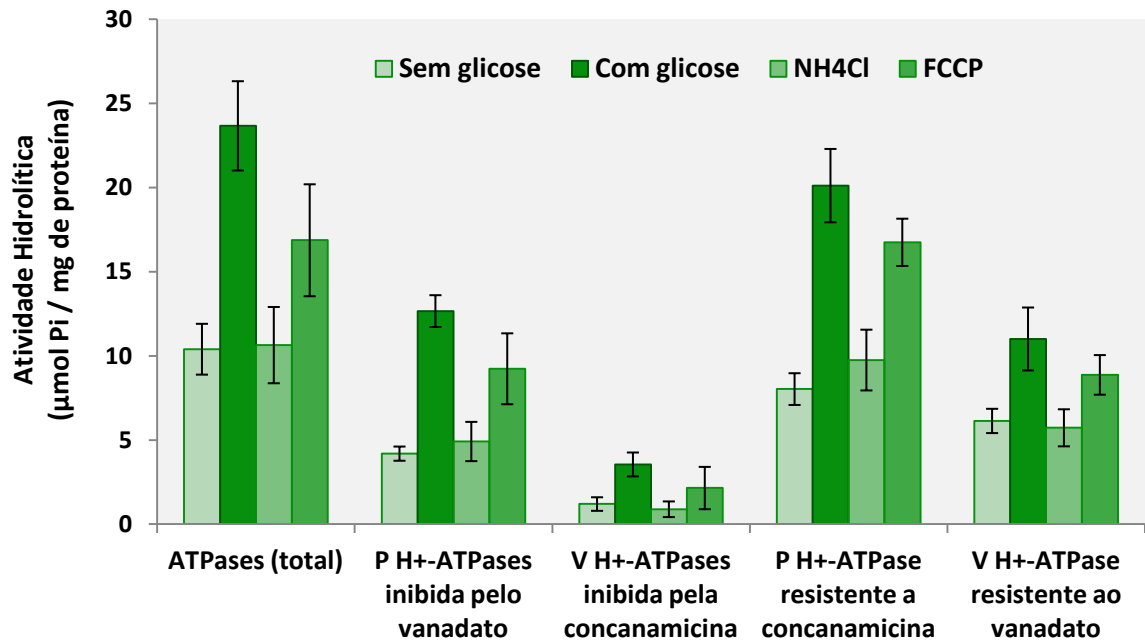
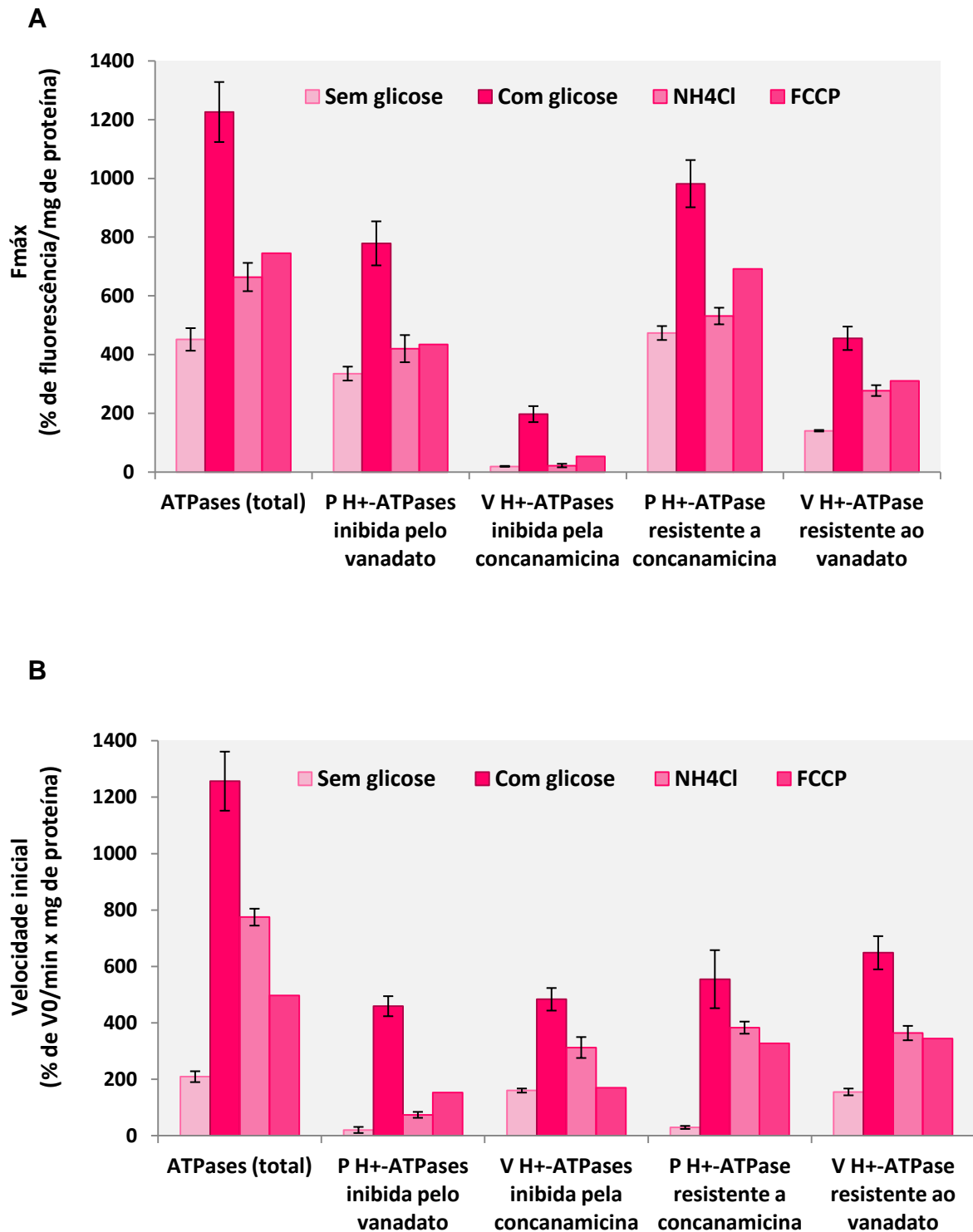


Figura 24 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e do FCCP sobre o *steady state* (A) e a velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$  (B) em  $\text{H}^+$ -ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 7,2. Os dados representam valores de pelo menos 4 experimentos independentes. Barras indicam erro padrão.



**Figura 25 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e do FCCP sobre a atividade hidrolítica em  $\text{H}^+$ -ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 7,2. Os dados representam valores de pelo menos 4 experimentos independentes. Barras indicam erro padrão.**





**Figura 26 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e do FCCP sobre o *steady state* (A) e a velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$  (B) em  $\text{H}^+$ -ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 7,7. Os dados representam valores de pelo menos 7 experimentos independentes. Barras indicam erro padrão.**

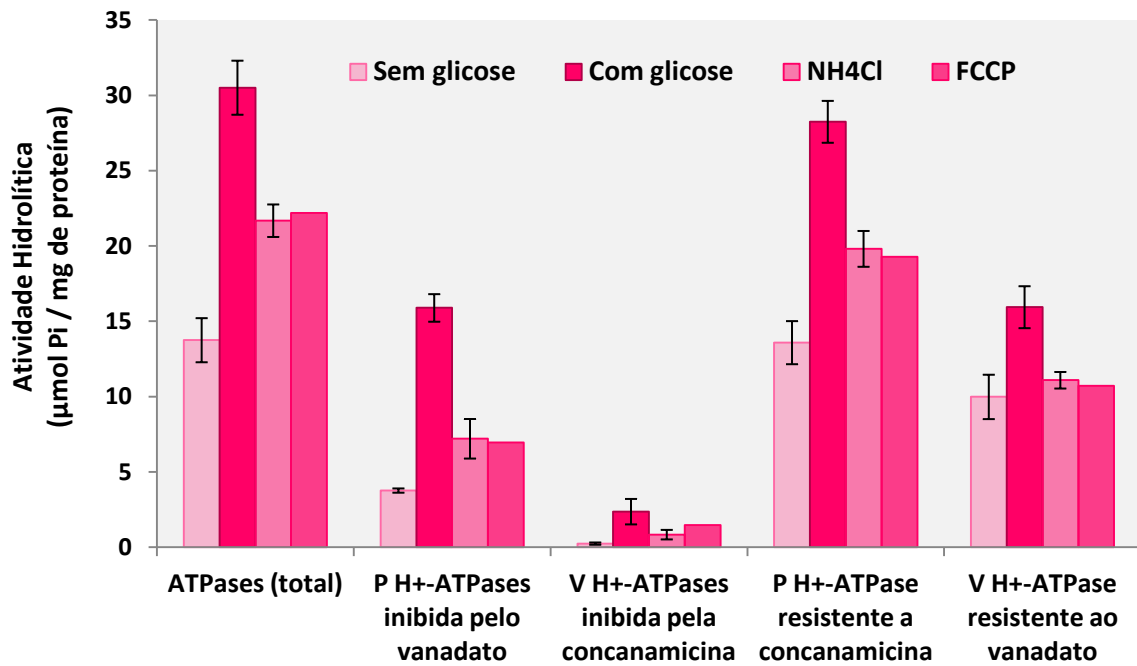
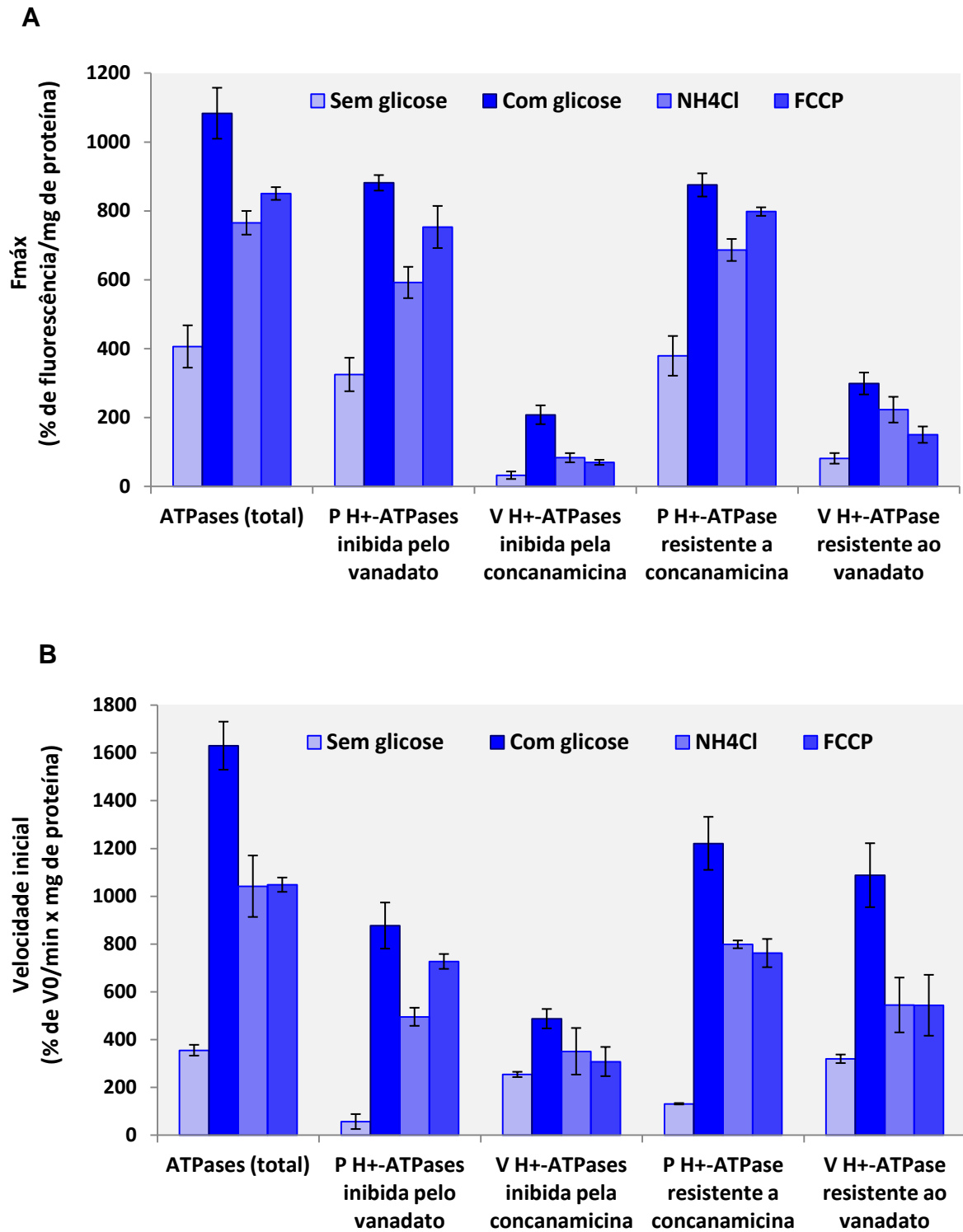
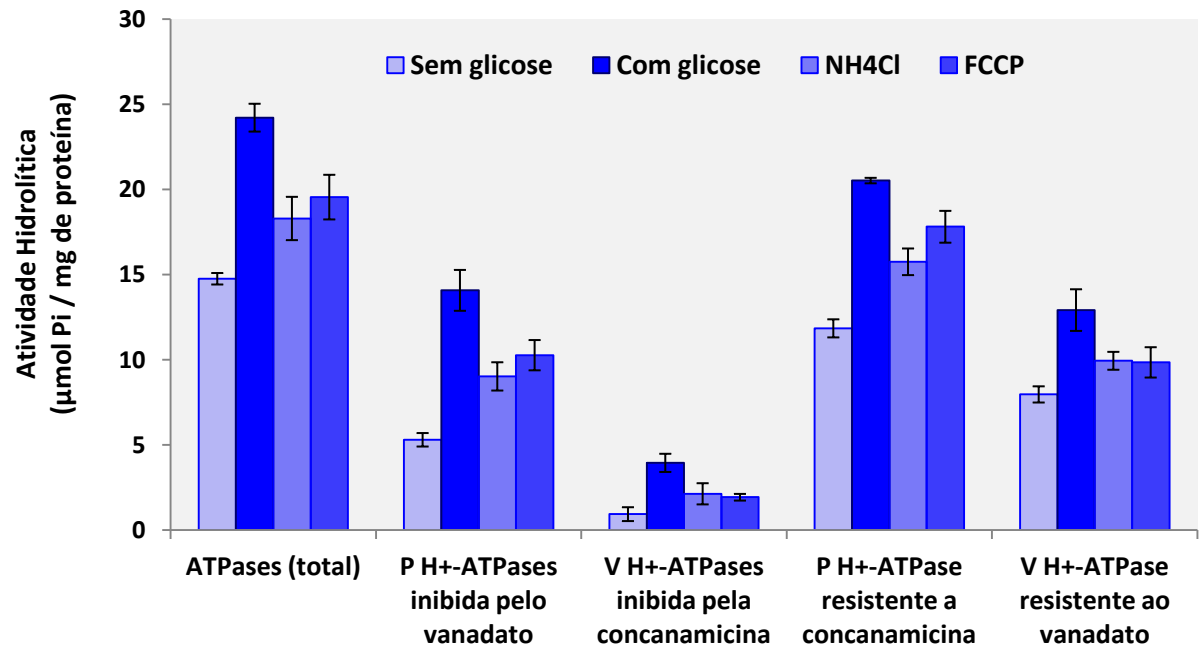


Figura 27 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e do FCCP sobre a atividade hidrolítica em  $\text{H}^+$ -ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 7,7. Os dados representam valores de pelo menos 7 experimentos independentes. Barras indicam erro padrão.



**Figura 28 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e do FCCP sobre o *steady state* (A) e a velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$  (B) em  $\text{H}^+$ -ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 8,2. Os dados representam valores de pelo menos 7 experimentos independentes. Barras indicam erro padrão.**

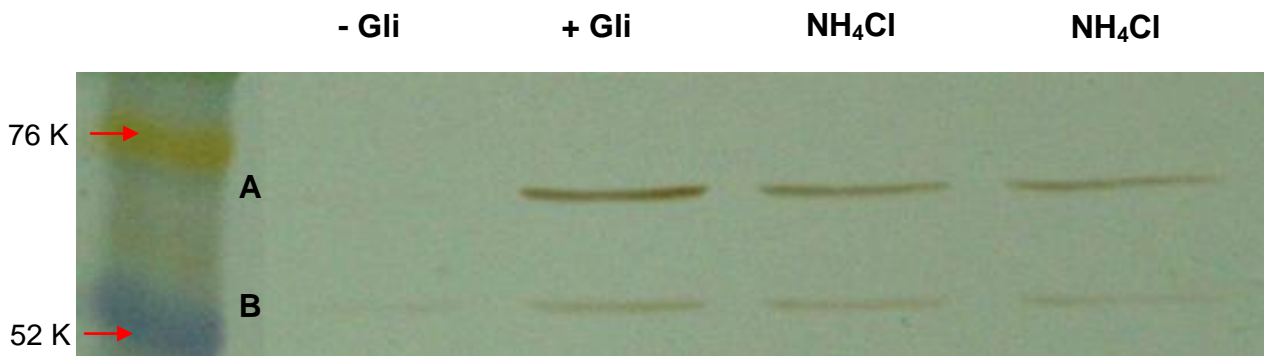


**Figura 29 – Efeito do NH<sub>4</sub>Cl e do FCCP sobre a atividade hidrolítica em H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular de membranas totais obtidas de *S. cerevisiae* (cepa X2180), em pH 8,2. Os dados representam valores de pelo menos 7 experimentos independentes. Barras indicam erro padrão.**

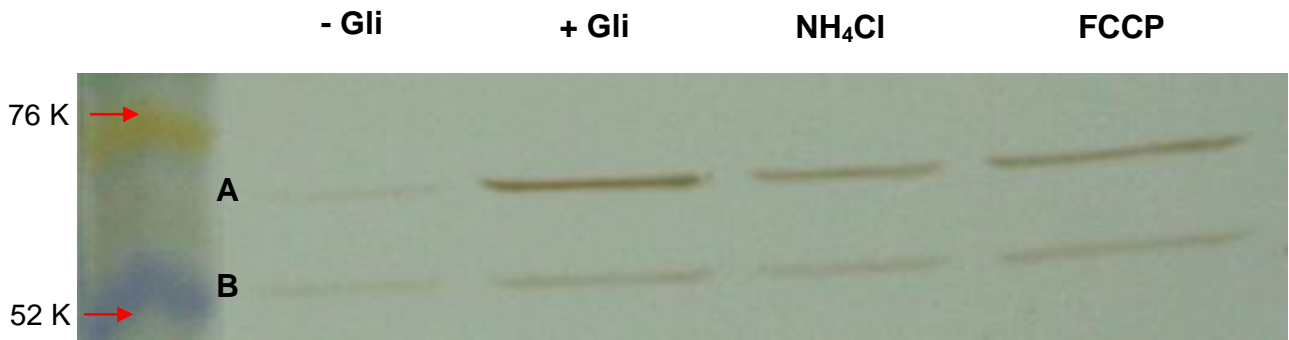
Os resultados descritos acima puderam ser confirmados a partir do *western blotting*, no qual observamos a imuno resposta para as subunidades A e B da V H<sup>+</sup>-ATPase. Nas figuras 30, 31 e 32 podemos ver que a imuno resposta para essas subunidades se mostrou mais fraca para as membranas obtidas a partir da incubação dos esferoplastos com FCCP e NH<sub>4</sub>Cl (mesmo estes estando na presença de glicose), quando comparadas àquelas obtidas a partir da incubação somente com glicose, para três faixas de pH analisadas (7,2, 7,7 e 8,2). Um resultado também expressivo foi verificado na presença de ionomicina, um ionóforo que atua como trocador Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>, em pH 8,2 (Figura 33).



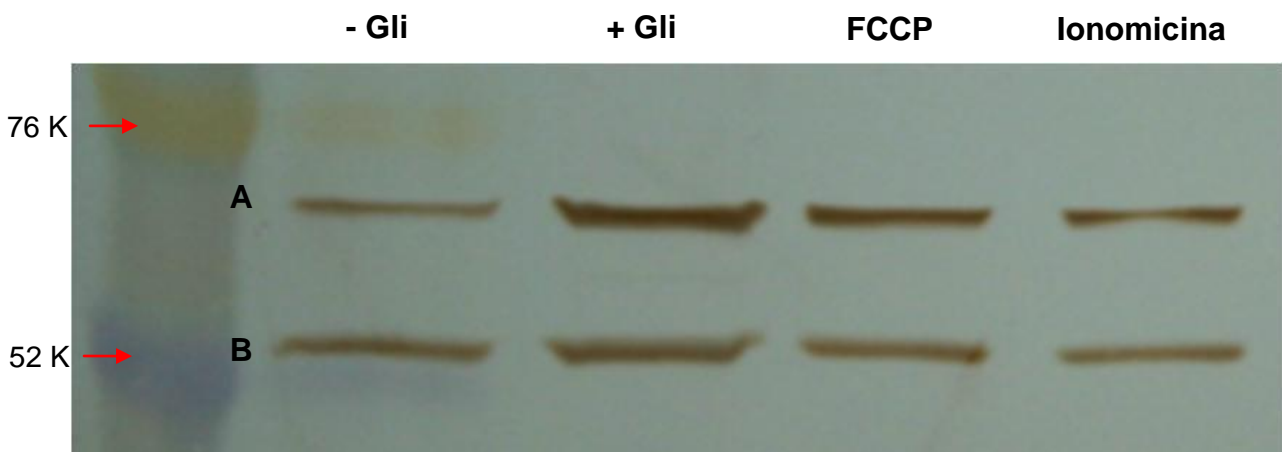
**Figura 30 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e do FCCP sobre a imuno resposta das subunidades A e B da  $\text{V H}^+$ -ATPase de membranas totais ativadas pela glicose extracelular.** Proteínas de MTs (10 mg) foram submetidas a SDS-PAGE 10 % e imunotransferência com o anticorpo para a subunidade A ou B (69 kD e 60 kD, respectivamente) de  $\text{V H}^+$ -ATPase de levedura. Proteínas com reação cruzada foram detectadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Membranas obtidas a partir de esferoplastos incubados em pH 7,2.



**Figura 31 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre a imuno resposta das subunidades A e B da  $\text{V H}^+$ -ATPase de membranas totais ativadas pela glicose extracelular.** Proteínas de MTs (10 mg) foram submetidas a SDS-PAGE 10 % e imunotransferência com o anticorpo para a subunidade A ou B (69 kD e 60 kD, respectivamente) de  $\text{V H}^+$ -ATPase de levedura. Proteínas com reação cruzada foram detectadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Membranas obtidas a partir de esferoplastos incubados em pH 7,7.



**Figura 32 – Efeito do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e do FCCP sobre a imuno resposta das subunidades A e B da  $\text{V H}^+$ -ATPase de membranas totais ativadas pela glicose extracelular.** Proteínas de MTs (10 mg) foram submetidas a SDS-PAGE 10 % e imunotransferência com o anticorpo para a subunidade A ou B (69 kD e 60 kD, respectivamente) de  $\text{V H}^+$ -ATPase de levedura. Proteínas com reação cruzada foram detectadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Membranas obtidas a partir de esferoplastos incubados em pH 8,2.



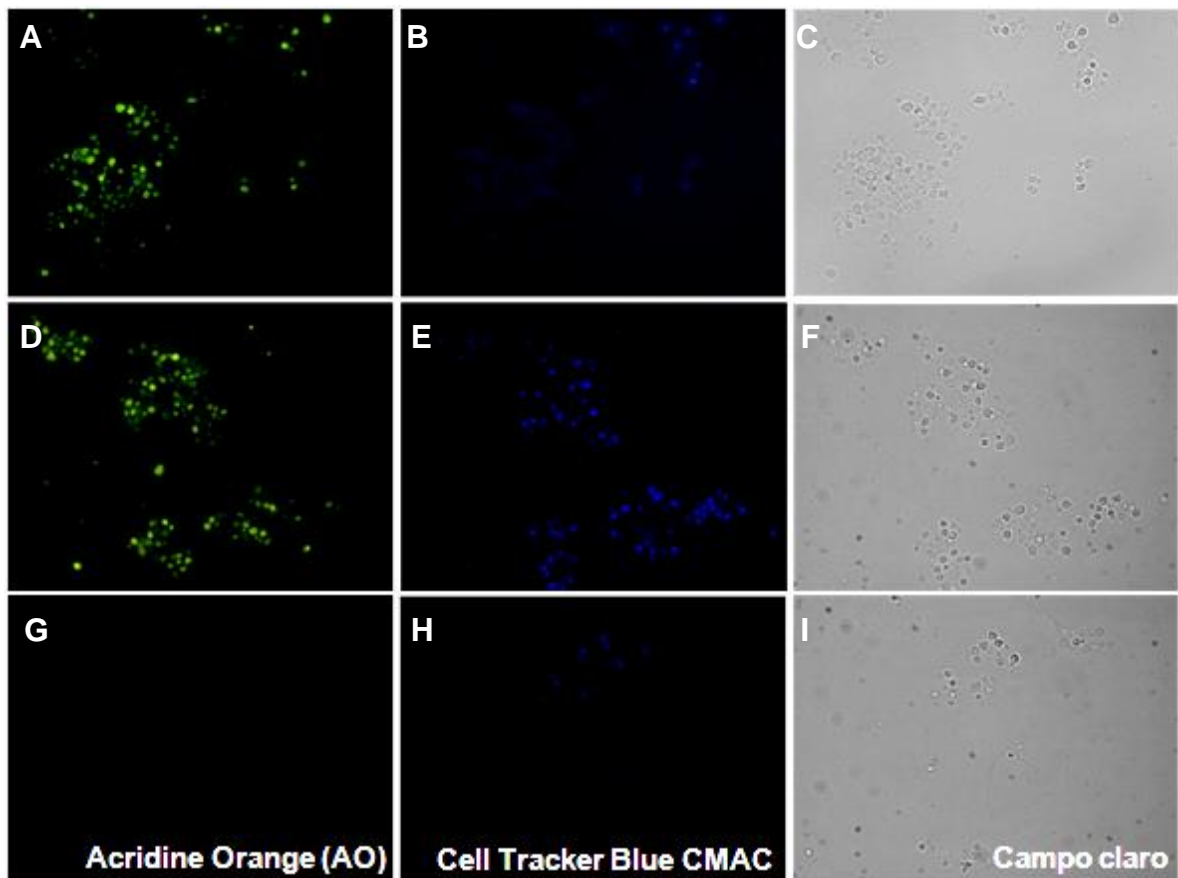
**Figura 33 – Efeito do FCCP e da ionomicina sobre a imuno resposta das subunidades A e B da  $\text{V H}^+$ -ATPase de membranas totais ativadas pela glicose extracelular.** Proteínas de MTs (10 mg) foram submetidas a SDS-PAGE 10 % e imunotransferência com o anticorpo para a subunidade A ou B (69 kD e 60 kD, respectivamente) de  $\text{V H}^+$ -ATPase de levedura. Proteínas com reação cruzada foram detectadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Membranas obtidas a partir de esferoplastos incubados em pH 8,2.

Sabendo que a glicose extracelular estimula a atividade de V H<sup>+</sup>-ATPases, as quais estão presentes em organelas da via secretória, incluindo os vacúolos de levedura, avaliamos, através da microscopia de fluorescência, se a presença de glicose extracelular aumenta a acidificação vacuolar. Adicionalmente, após observarmos que o gradiente protônico é importante para a estimulação dessas bombas pela glicose, avaliamos se a presença de NH<sub>4</sub>Cl seria capaz de prevenir a acidificação vacuolar, como resultado da diminuição da atividade de V H<sup>+</sup>-ATPases presentes nessa organela. Utilizamos duas sondas: *acridine orange*, a qual é capaz de marcar a acidificação no vacúolo e *cell tracker blue CMAC*, a qual é capaz de marcar o lúmen do vacúolo.

O resultado observado na microscopia de fluorescência mostra que, a presença de glicose (Figura 34 – D, E, F) favorece a acidificação do lúmen vacuolar devido à estimulação da atividade da V H<sup>+</sup>-ATPase, quando comparada à ausência de glicose (Figura 34 – A, B, C). Além disso, a microscopia mostrou uma menor acidificação do lúmen vacuolar quando os esferoplastos ativados pela glicose estão na presença de NH<sub>4</sub>Cl, (Figura 34 – G, H, I), indicando que este possa prevenir a estimulação da V H<sup>+</sup>-ATPase proporcionada pela glicose extracelular. Ou seja, a acidificação vacuolar é dependente do gradiente de H<sup>+</sup> existente nas membranas dessas organelas.

Juntos, os resultados da atividade enzimática, da resposta imunológica e da microscopia de fluorescência confirmam a estimulação pela glicose e, sobretudo, mostram a prevenção dessa estimulação quando a membrana é desenergizada, fortalecendo a nossa hipótese de que o  $\Delta\mu\text{H}^+$  é muito importante para a regulação de ambas as bombas.





**Figura 34 – Acidificação vacuolar é aumentada pela atividade das bombas de  $H^+$  ativadas pela glicose extracelular e é dependente do gradiente de  $H^+$  existente nessas membranas.** Microscopia de fluorescência realizada com esferoplastos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa X2180). Foram utilizadas duas sondas: *Acridine Orange* (1ª coluna), a qual é capaz de marcar a acidificação no vacúolo e *cell tracker blue CMAC* (2ª coluna), a qual é capaz de marcar o lúmen do vacúolo. Para comprovar a existência de esferoplastos, foi utilizado o campo claro (3ª coluna). Foram utilizadas 3 versões de esferoplastos: esferoplastos incubados na ausência de glicose (A, B, C); esferoplastos incubados na presença de glicose (D, E, F); esferoplastos incubados na presença de glicose e de  $NH_4Cl$  (G, H, I).

#### 4.4 O papel da calcineurina na ativação de bombas de H<sup>+</sup>

O conhecimento dos mecanismos regulatórios das bombas de H<sup>+</sup> é de grande importância, para que mais adiante seja possível entender os mecanismos envolvidos do desenvolvimento de diversas doenças. Um dos mecanismos regulatórios dessas bombas mais significativo é a sua ativação pela glicose extracelular e a diminuição de sua atividade na ausência da glicose extracelular.

No caso da P H<sup>+</sup>-ATPase, esta tem suas propriedades cinéticas alteradas após a ativação pela glicose. A sua atividade hidrolítica apresenta aumento da sua afinidade tanto para o ATP como para seu inibidor específico, o vanadato, sugerindo uma modificação pós-transducional e uma alteração conformacional da enzima (Serrano, 1983). Já no caso da V H<sup>+</sup>-ATPase, de acordo com o modelo inicial proposto para explicar sua regulação, o déficit de glicose provoca a dissociação de aproximadamente 60 % do complexo catalítico (V<sub>1</sub>) do complexo de membrana (V<sub>0</sub>) responsável pelo transporte de H<sup>+</sup>, resultando na respectiva diminuição da atividade hidrolítica (Kane, 1995). No entanto, já na primeira etapa deste trabalho, juntamente ao trabalho de outros membros do nosso grupo de pesquisa, evidenciamos que os complexos V<sub>1</sub> e V<sub>0</sub> da V H<sup>+</sup>-ATPase não dissociam/associam durante esta regulação, e sim, que V<sub>1</sub> sofre a modulação da conformação, causando mudanças catalíticas (Ribeiro *et al.*, 2012).

Além de bombas de H<sup>+</sup>, a glicose extracelular ativa também as Ca<sup>2+</sup>-ATPases e os trocadores Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> das organelas da via secretória de levedura (Okorokov, 2016). Mecanismos moleculares da ativação sincronizada de H<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>-ATPases e de trocadores Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> não foram estabelecidos. No entanto, foi demonstrado que células de levedura com depleção de glicose também mostraram aumento transitório de Ca<sup>2+</sup> citosólico livre durante os primeiros 120 segundos depois da readição de glicose (Tisi *et al.*, 2002).

Adicionalmente, na segunda etapa do presente trabalho, mostramos que tanto a ativação do transporte de H<sup>+</sup> quanto da hidrólise de ATP mediada por P e V H<sup>+</sup>-ATPases pode ser prevenida quando a membrana plasmática é desenergizada, ou seja, quando o gradiente protônico é desfeito por ionóforos ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, nos permitindo sugerir que a membrana energizada é um fator necessário para a transdução de sinais em geral, incluindo a regulação de P e V H<sup>+</sup>-ATPases pela glicose extracelular.

Sabendo que os trocadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  utilizam o gradiente químico de  $\text{H}^+$  ( $\Delta\text{pH}$ ) formado por V  $\text{H}^+$ -ATPases (Kakinuma *et al.*, 1981; Okorokov *et al.*, 1985a; Okorokov *et al.*, 1985b; Okorokov *et al.*, 2001); que a P  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática de levedura e V  $\text{H}^+$ -ATPases das organelas da via secretória são ativadas pela glicose extracelular (Serrano, 1983; Kane, 1995); e que o aumento no  $\text{Ca}^{2+}$  livre resulta na ativação calcineurina (Liu *et al.*, 2015), avaliamos o envolvimento da proteína fosfatase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e de calmodulina, calcineurina, na regulação das bombas de  $\text{H}^+$  pela glicose extracelular, buscando responder se a sinalização  $\text{Ca}^{2+}$ /calcineurina (CAN)-Crz1 pode estar envolvida na ativação de P e V  $\text{H}^+$ -ATPases pela glicose extracelular, regulando também a homeostase de  $\text{H}^+$ .

Nossos resultados mostram que as atividades de P e V  $\text{H}^+$ -ATPases foram diminuídas no mutante deficiente na subunidade regulatória da calcineurina (*cnb1* $\Delta$ ) tanto na presença como na ausência de glicose extracelular (Figuras 35 e 36).

A figura 27A mostra que a atividade total da velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$  mediado por P e V  $\text{H}^+$ -ATPases de membranas totais, não estimuladas pela glicose extracelular, foi igual para a cepa selvagem e para a cepa mutante *cnb1* $\Delta$ . Este resultado supõe um número igual de moléculas das  $\text{H}^+$ -ATPases nas MTs de ambas as cepas. No entanto, a velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$  catalisada pelas bombas em células selvagens foi estimulada pela glicose extracelular por 5,3 vezes, enquanto que a velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$  das bombas do mutante *cnb1* $\Delta$  foi estimulada pela glicose extracelular em 3,4 vezes.

A análise da atividade total do *steady state* do transporte de  $\text{H}^+$ , mediado pelas bombas de  $\text{H}^+$  em MTs que não foram energizadas pela glicose extracelular, mostrou uma menor atividade do transporte de  $\text{H}^+$  (36 %) no mutante *cnb1* $\Delta$  em comparação com a cepa selvagem (Figura 35B). Além disso, a glicose extracelular estimulou o *steady state* do transporte de  $\text{H}^+$  em MTs isoladas a partir de células mutantes *cnb1* $\Delta$  em 60 %, mas foi apenas 19 % maior do que nas MTs isoladas a partir das células de tipo selvagem na ausência de glicose e 1,9 vezes menor do que o *steady state* do transporte de  $\text{H}^+$  mostrado pelas bombas ativadas a partir das células selvagens (Figura 35B).

Estas descobertas para as atividade totais das  $\text{H}^+$ -ATPases foram quase reproduzidas quando observamos a velocidade inicial do transporte de  $\text{H}^+$  catalisada pela P  $\text{H}^+$ -ATPase sensível ao vanadato ao compararmos as duas cepas de

leveduras (Figura 35A). As velocidades iniciais iguais demonstradas pela P H<sup>+</sup>-ATPase para as MTs não energizadas das duas cepas provavelmente refletem o número igual de moléculas da enzima.

A P H<sup>+</sup>-ATPase de MTs do mutante *cnb1Δ*, por exemplo, mostrou ativação significativa para a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> pela glicose extracelular (4,8 vezes). No entanto, foi inferior em comparação com a ativação encontrada para a P H<sup>+</sup>-ATPase de MTs da cepa selvagem, a qual foi equivalente a 7,1 vezes (Figura 35A). É interessante destacar que a glicose extracelular causou um aumento semelhante no *steady state* do transporte de H<sup>+</sup> mediado pela P H<sup>+</sup>-ATPase a partir das cepas selvagem e mutante *cnb1Δ* (1,9 e 2,2 vezes, respectivamente). No entanto, o *steady state* da bomba ativada do mutante *cnb1Δ* foi 1,9 vezes menor do que para a P H<sup>+</sup>-ATPase ativada da cepa selvagem (Figura 35B). Dados semelhantes foram obtidos para as atividades da P H<sup>+</sup>-ATPase resistente à concanamicina (Figura 35). Sugerimos, primeiramente, que a modificação pós-transducional da P H<sup>+</sup>-ATPase do mutante *cnb1Δ* foi de alguma forma comprometida, resultando na diminuição da sua atividade de transporte de H<sup>+</sup>. Por outro lado, pode haver um mecanismo adicional, e ainda não caracterizado, independente da calcineurina para a ativação da P H<sup>+</sup>-ATPase pela glicose extracelular, que pode aumentar a atividade enzimática do mutante e que não ativa a bomba da cepa selvagem.

Na figura 35A, as velocidades iniciais iguais encontradas para as V H<sup>+</sup>-ATPase não ativadas do mutante *cnb1Δ* e da cepa selvagem (provavelmente refletindo o número igual das bombas do tipo V em MTs das duas cepas) foram diferencialmente ativadas pela glicose extracelular demonstrando, novamente, que a ativação é mais eficiente para as bombas presentes na cepa selvagem, indicando uma possível modificação pós-transducional (Ribeiro *et al.*, 2012). Notavelmente, a V H<sup>+</sup>-ATPase sensível à concanamicina ativada de MTs do mutante *cnb1Δ* apresentou menor atividade do *steady state* do transporte de H<sup>+</sup> (2,1 vezes) quando comparada àquela das MTs do tipo selvagem. O seu valor é similar ao do estado não ativado da V H<sup>+</sup>-ATPase da cepa selvagem, apenas 29 % mais elevado (Figura 35B).

A comparação das atividades hidrolíticas das bombas de H<sup>+</sup> na cepa selvagem e na cepa mutante *cnb1Δ* mostra bastante semelhança aos resultados encontrados para o estado estacionário (*steady state*) do transporte de H<sup>+</sup> (Figuras

35B e 36). Notavelmente, em contraste com as bombas do tipo selvagem que foram ativadas aproximadamente 2 vezes, as bombas de  $H^+$  do mutante *cnb1* $\Delta$  não foram ativadas (V  $H^+$ -ATPase sensível à concanamicina) ou mostraram fraca ativação (V  $H^+$ -ATPase sensível ao nitrato). A única exceção foi para P  $H^+$ -ATPase que apresentou ativação de aproximadamente 2 vezes em ambas as cepas. Além disso, as atividades de P e V  $H^+$ -ATPases ativadas do mutante *cnb1* $\Delta$  não foram maiores do que as bombas não ativadas da cepa do tipo selvagem (Figura 36).

Adicionalmente, observamos que a estimulação de P e V  $H^+$ -ATPases de membranas totais de levedura pela glicose extracelular no mutante *cnb1* $\Delta$  foi diminuída aproximadamente 2 e 3 vezes, respectivamente, quando comparada à estimulação vista na cepa selvagem (Figuras 35 e 36).

Os dados recebidos, nos permitem sugerir que a ausência da calcineurina funcional nas células de *S. cerevisiae* diminui significativamente a ativação de P e V  $H^+$ -ATPases dependente de glicose extracelular e a sua capacidade em formar o gradiente de  $H^+$ , tanto através da membrana plasmática como através das membranas de organelas da via secretória, respectivamente. Isso pode resultar em uma energização mais fraca dessas membranas e, portanto, interferir na energização de numerosos transportadores e canais que operam nessas membranas.

A forte diminuição do *steady state* do transporte de  $H^+$  mediado pela P  $H^+$ -ATPase a partir do mutante *cnb1* $\Delta$  (Figura 35B) prevê a possibilidade de uma menor capacidade das células mutantes *cnb1* $\Delta$  em acidificar o meio de incubação na presença de glicose. A comparação dessa capacidade de acidificação foi realizada para o mutante *cnb1* $\Delta$  e a cepa selvagem e revelou uma diferença significativa entre essas duas cepas (Figura 37A). As células mutantes *cnb1* $\Delta$  alcançaram a acidificação máxima após 22 min e, em seguida, mostraram uma diminuição fraca, enquanto que as células da cepa selvagem continuaram uma acidificação eficiente.

A acidificação mais fraca do meio pela P  $H^+$ -ATPase vista com as células do mutante *cnb1* $\Delta$  é provavelmente explicada pela sua capacidade limitada de formar o gradiente de  $H^+$  somente até um valor restrito do gradiente. Quando este valor é alcançado, a atividade da bomba é regulada negativamente pelo próprio produto (controle de  $H^+$ ), resultando em um nível de acidificação constante, o qual reflete o equilíbrio entre o efluxo e o influxo de  $H^+$ . Os dados já mostrados suportam essa possibilidade. De fato, a acidificação do meio dependente de glicose pelas células

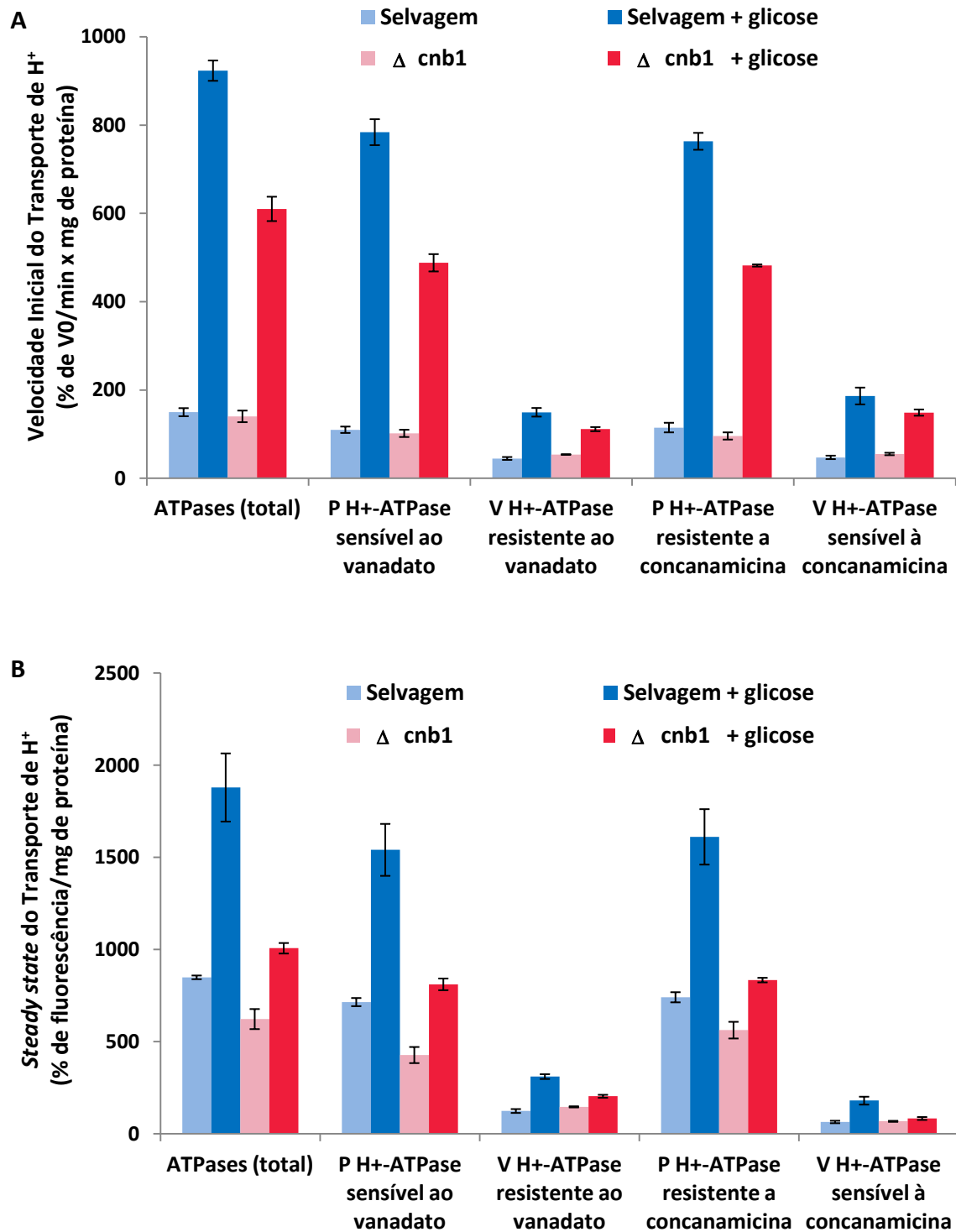
do mutante *cnb1Δ* alcançou um platô após 22 min e só então mostrou uma diminuição fraca (Figura 37A).

Sabendo que a biossíntese da parede celular depende da função correta de V H<sup>+</sup>-ATPases e transportadores de Ca<sup>2+</sup> presentes nas vesículas secretoras, verificamos a contribuição da sinalização pela calcineurina para a integridade da parede celular, comparando a formação de esferoplastos das células selvagens e mutantes *cnb1Δ*. Surpreendentemente, a formação de esferoplastos a partir das células selvagens foi mais eficiente do que a partir das células mutantes *cnb1Δ* (Figura 38). O tempo para a formação de 50 % dos esferoplastos obtidos a partir de células selvagens foi de aproximadamente 20 min, enquanto que para as células mutantes *cnb1Δ* foi de aproximadamente 45 min.

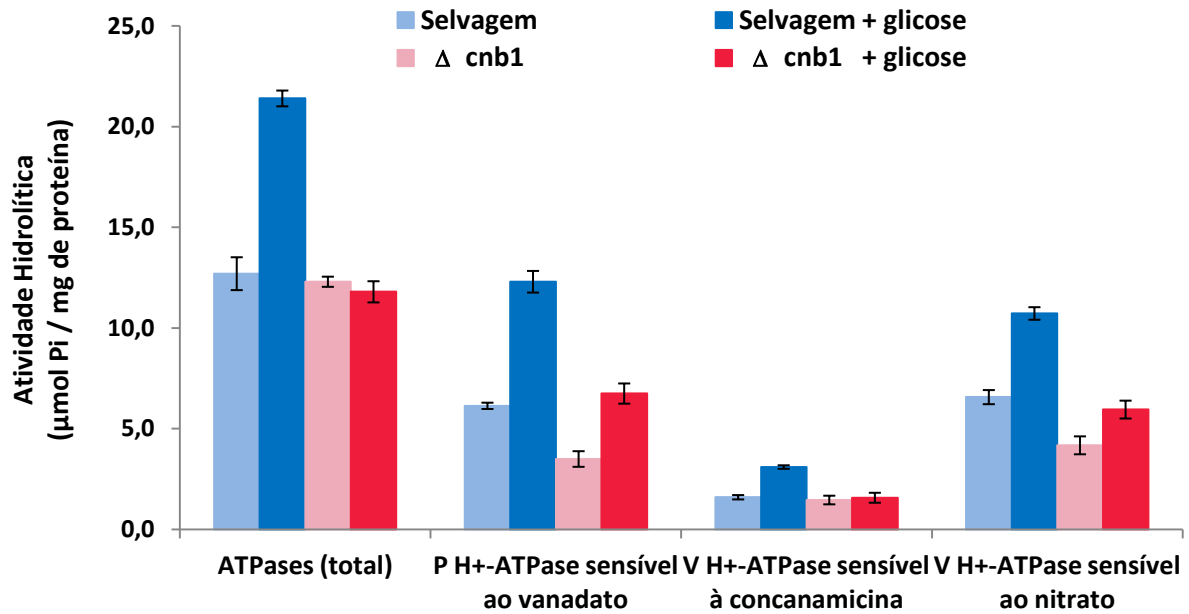
Finalmente, as consequências integradas da ausência da calcineurina funcional podem ser estimadas pela comparação do crescimento das culturas das cepas mutantes *cnb1Δ* com a cepa selvagem. À primeira vista, o aumento da capacidade dos dois tipos de bombas de H<sup>+</sup> da cepa selvagem em criar o gradiente de H<sup>+</sup> transmembrana pode fornecer o melhor crescimento para essa cepa. No entanto, um resultado inesperado foi relatado, o qual mostra que o mutante *cnb1Δ* pode crescer mais rapidamente em comparação com a cepa selvagem em condições normais de laboratório, sugerindo a inibição do crescimento da levedura por esta proteína fosfatase (Cunningham & Fink, 1994). Encontramos resultados similares: o mutante *cnb1Δ*, na ausência de estresse, apresentou maior crescimento em comparação com a cepa do tipo selvagem (Figura 39).

Sugerimos, a partir desse resultado, que sob condições favoráveis, o mutante *cnb1Δ* pode crescer melhor em comparação com a cepa selvagem, gastando mais energia, enquanto que em condições de estresse, o mutante *cnb1Δ* não tem potencial para aumentar o nível de energização das membranas e perde a capacidade de crescer, pois não tem a mesma capacidade de mobilizar bombas de H<sup>+</sup> através da sua ativação mais eficiente dependente de glicose e calcineurina, como as células selvagens. Essa constatação divulga um novo papel de integração da calcineurina no controle metabólico e na resistência a estresses.

Todos esses resultados reforçam nossa hipótese de que a calcineurina é um fator crucial para a ativação das bombas de H<sup>+</sup> em levedura pela glicose extracelular.

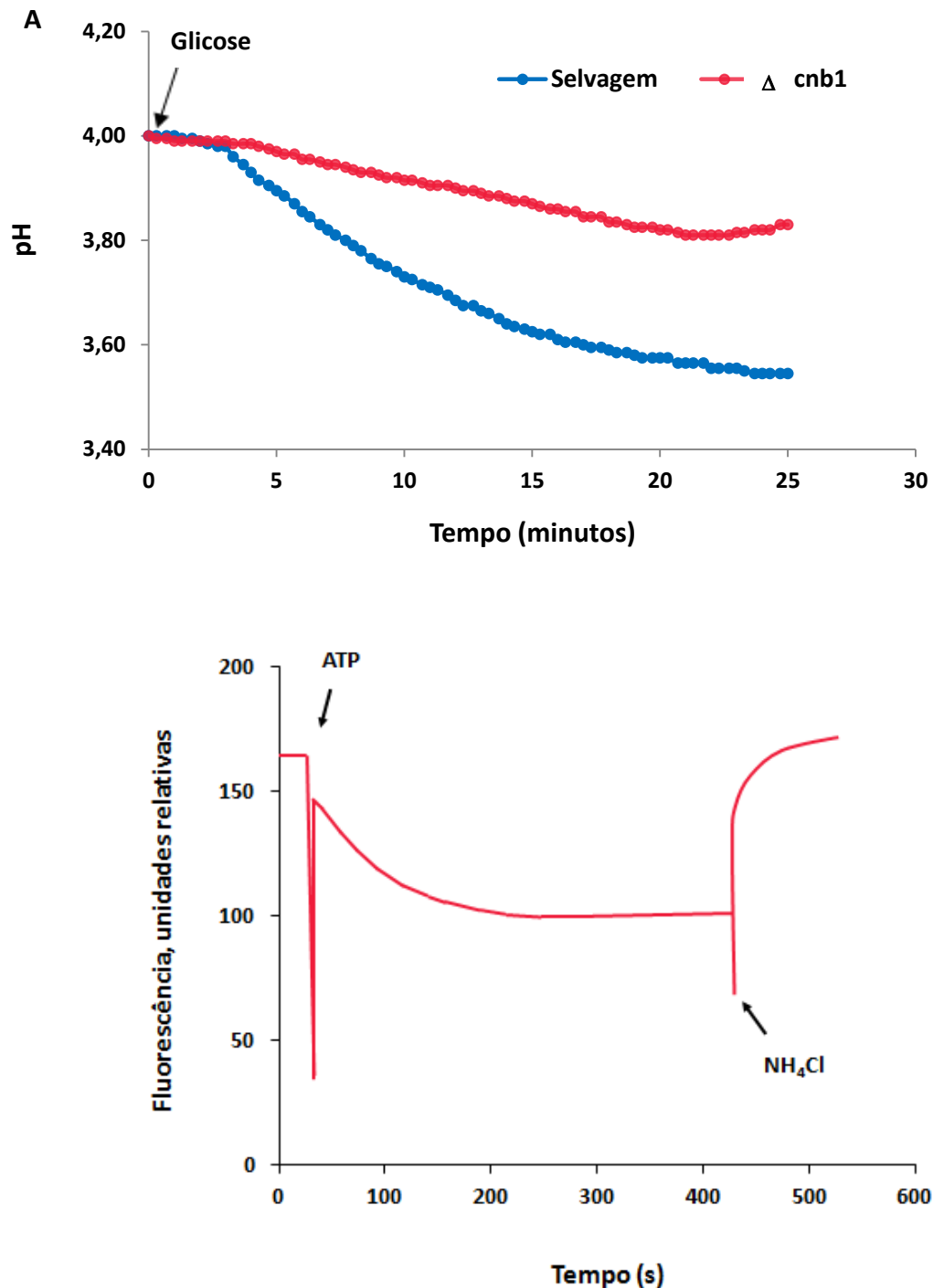


**Figura 35 – Comparação das atividades de transporte de H<sup>+</sup> mediadas por P e V H<sup>+</sup>-ATPases de MTs isoladas das cepas selvagem e mutante deficiente na subunidade regulatória B da calcineurina. (A) Atividade da velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup>, calculada da seguinte forma: % de V<sub>0</sub>/min x mg de proteína. (B) Atividade do *steady state* do transporte de H<sup>+</sup>, calculada da seguinte forma: % de fluorescência/mg de proteína. Os dados representam valores de pelo menos 3 experimentos independentes. Barras indicam erro padrão.**

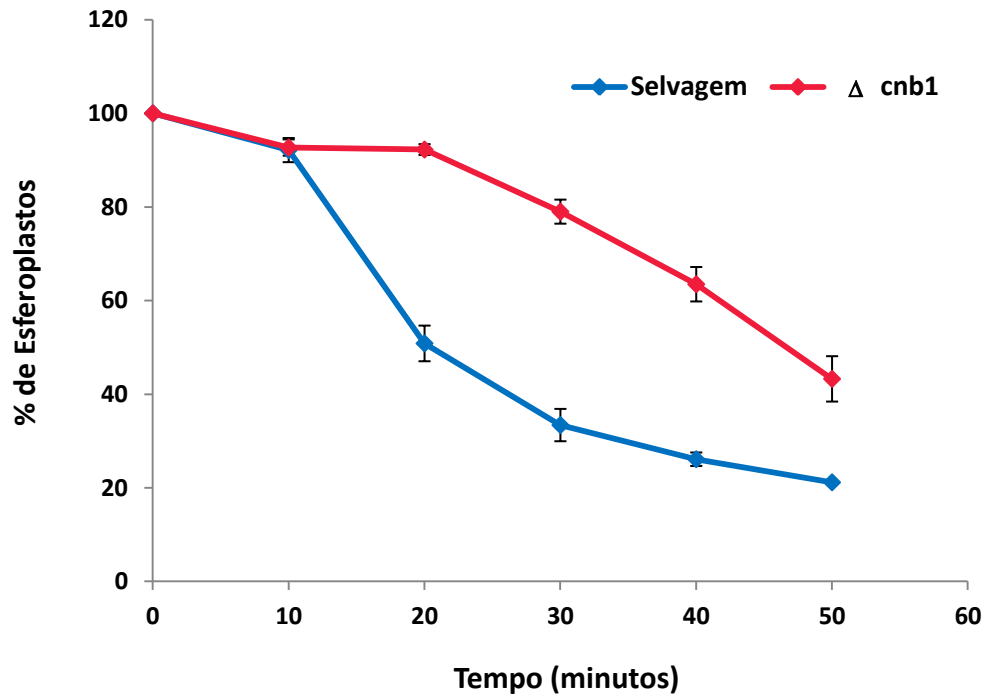


**Figura 36 – Comparação das atividades hidrolíticas mediadas por P e V H<sup>+</sup>-ATPases de MTs isoladas das cepas selvagem e mutante deficiente na subunidade regulatória B da calcineurina de *S. cerevisiae*. Os dados representam valores de pelo menos 3 experimentos independentes. Barras indicam erro padrão.**

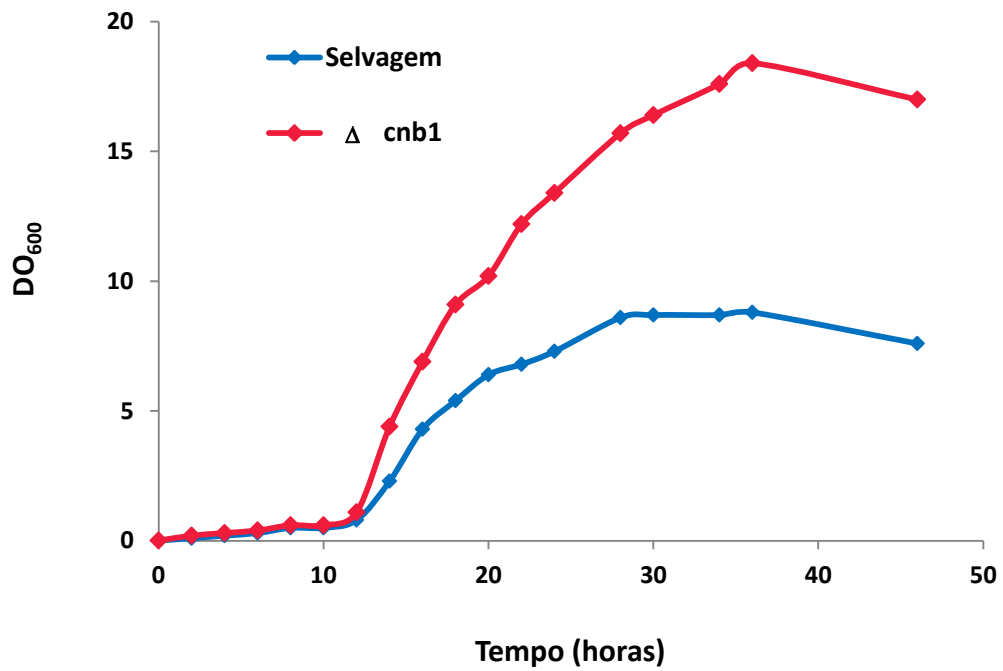




**Figura 37 – (A) Comparação da acidificação do meio de incubação dependente de glicose na cepa selvagem e na cepa mutante *cnb1 $\Delta$ .*** Os dados representam a média dos valores de 3 experimentos independentes. **(B) Atividade de transporte de H<sup>+</sup> da P H<sup>+</sup>-ATPase de vesículas de MTs isoladas de esferoplastos do mutante *cnb1 $\Delta$ , pré incubados com glicose extracelular.*** Tal atividade é representada pela queda da fluorescência do ACMA na presença de 1 mM de ATP e 22 nM de concanamicina A. Os dados representam a média dos valores de 6 experimentos independentes.



**Figura 38 – Comparação da formação dos esferoplastos a partir de células das cepas selvagem e mutante *cnb1* $\Delta$ .** Os dados representam valores de pelo menos 3 experimentos independentes.



**Figura 39 – Comparação do crescimento da cultura de células, em meio YEPD, das cepas selvagem e mutante *cnb1Δ*. Os dados representam valores de pelo menos 3 experimentos independentes.**

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 As diferentes propriedades de bombas ativadas e não ativadas pela glicose extracelular

A partir dos resultados obtidos para a atividade hidrolítica, sugerimos que a ligação entre as subunidades do complexo  $V_1$  e a ligação deste complexo com a membrana são semelhantes em ambos os estados da enzima. Em outras palavras, a estrutura da enzima, essencial para a sua atividade hidrolítica, é muito semelhante para ambos os estados da enzima, do ponto de vista da sua desestabilização pelo nitrato.

A comparação da inibição dos dois processos catalisados pela enzima, tanto a ativada como a não ativada, revelou que o transporte de  $H^+$  foi mais sensível em comparação com a hidrólise de ATP. Estes resultados indicam que o nitrato, mesmo em baixas concentrações, desacoplou as atividades de hidrólise de ATP e de transporte de  $H^+$ , catalisadas por ambos os estados da enzima. Pela primeira vez, a ação seletiva do nitrato foi mostrada, sendo mais significativa no estado não ativado da enzima (Figura 9) (Ribeiro *et al.*, 2012).

Além disso, ao contrário do que era esperado como consequência da hipótese de “dissociação/reassociação” proposta por Kane (1995), o nitrato inibiu mais eficientemente tanto a velocidade inicial como o estado estacionário do transporte de  $H^+$  mediados pela bomba não ativada, em comparação com as atividades do transporte de  $H^+$  catalisadas pela bomba ativada (Figura 9). Isso pode significar que o estado não ativado da enzima está mais susceptível à inibição do transporte de  $H^+$  pelo nitrato. Ou seja, sua estrutura essencial para a catálise do transporte de  $H^+$  não é tão firmemente construída como a estrutura do estado ativado da bomba, comparada a sua estrutura essencial para a hidrólise de ATP.

De acordo com o modelo atual de regulação da  $V H^+$ -ATPase pela glicose extracelular seria esperado que as moléculas de enzimas ativadas e não ativadas mostrassem a mesma capacidade de acoplamento na ausência do inibidor. No entanto, a eficácia do acoplamento revelou-se pelo menos duas vezes maior para a enzima ativada (Figura 10). Além disso, as concentrações crescentes de nitrato revelaram uma diferença significativa de sensibilidade da capacidade de acoplamento dos dois estados de bomba (Figura 10).

Os resultados obtidos com membranas totais mostram que a enzima ativada apresenta propriedades bioquímicas bem diferentes da enzima não ativada, em óbvia discordância com a hipótese atual (Sumner *et al.*, 1995; Kane, 1995). Entre essas diferenças estão o acoplamento mais alto da bomba ativada e sua maior resistência à ação desacopladora do nitrato.

Desde que o modelo de regulação da  $V H^+$ -ATPase pela glicose extracelular foi proposto, a ideia de dissociação/reassociação reversível dos complexos  $V_1$  e  $V_0$  (Kane, 1995) determinou a principal linha de investigações. Entretanto, algumas questões não foram colocadas, discutidas e resolvidas. Em primeiro lugar, como a enzima pode ser rapidamente reativada pela difusão do super complexo  $V_1$  através do citosol? Como é possível explicar a possibilidade de relocalização do complexo  $V_1$  de uma organela para outra (considerada vantajosa no modelo de dissociação/reassociação), enquanto essa possibilidade contradiz a especificidade conhecida das  $V H^+$ -ATPases de organelas distintas, estabelecida durante a evolução (Ribeiro *et al.*, 2012). E por último, e mais importante: por que e como cerca de 30 % de todas as moléculas de enzimas ativadas pode conservar sua atividade e suas estruturas e os outros 70 % devem ser submetidos a dissociação de  $V_1$  do complexo  $V_0$  da membrana e perder a atividade?

Além disso, estudos sobre a regulação da  $V H^+$ -ATPase pela glicose extracelular até então mostrados não levaram em conta alguns fatos importantes: i) a eficácia do acoplamento da  $V H^+$ -ATPase na presença de glicose extracelular *in vivo*; ii) o acoplamento maior da enzima ativada comparada à bomba não ativada (Figura 10); iii) a maior resistência do transporte de  $H^+$  ao nitrato para o estado ativado da  $V H^+$ -ATPase, sugerindo maior integridade e estabilidade do complexo molecular da bomba neste estado (Figura 9).

Dessa forma, os presentes dados indicam que a regulação das  $V H^+$ -ATPases acontece a partir de modificação(s) bioquímica(s) da enzima e interações dinâmicas entre as subunidades do super complexo  $V_1V_0$  e outros complexos de enzimas/moléculas, ao invés do modelo de dissociação/reassociação dos complexos  $V_1$ . Ou seja, sugerimos uma nova hipótese baseada nos resultados aqui apresentados e já publicados (Ribeiro *et al.*, 2012), propondo que o ponto chave da modulação da atividade da  $V H^+$ -ATPase é a modificação bioquímica da enzima. Esta modificação pode aumentar simultaneamente tanto a hidrólise de ATP como o transporte de  $H^+$  porém, predomina a atividade hidrolítica, resultando no aumento do

acoplamento. Sugerimos, portanto, um novo modelo de regulação das  $V H^+$ -ATPases pela glicose extracelular.

## **5.2 As diferenças e igualdades das $V H^+$ -ATPases ativadas e não ativadas de organelas da via secretória.**

Dados obtidos com membranas totais revelaram as seguintes diferenças entre as bombas ativadas e não ativadas: a  $V H^+$ -ATPase ativada apresenta acoplamento mais alto e o transporte de  $H^+$  catalisado por ela é mais resistente à inibição pelo nitrato.

Adicionalmente e curiosamente, a desestabilização/desestruturação da  $V H^+$ -ATPase de membranas totais pelo nitrato revelou que a população de moléculas da enzima é heterogênea (Figuras 9 e 10). O caráter heterogêneo da bomba é ilustrado pelas variações da sua capacidade de acoplamento e pela inativação contínua da sua atividade pelo amplo intervalo de concentrações de nitrato (Figuras 9 e 10).

A existência dessas diferenças entre bombas ativadas e não ativadas e, também, da sua heterogeneidade nos fez levantar as seguintes questões: 1) Será que estas diferenças são típicas apenas de algumas organelas ou todas as organelas da via secretória apresentam tais diferenças? 2) Qual é a origem/natureza das moléculas de enzima que tem propriedades diferentes? Sugerimos que existam pelo menos duas possibilidades para explicar a natureza heterogênea das moléculas da bomba. A primeira é a existência de formas distintas da enzima nas organelas da via secretória da levedura (Okorokov *et al.*, 2001; Samarão *et al.*, 2009). A segunda é o fato de estarmos lidando com uma cultura de levedura não sincrônica. Mesmo após o isolamento de esferoplastos, ainda pode haver células crescendo com velocidade diferente e enzimas possuindo, portanto, atividade diferente. Membranas totais isoladas a partir de tais esferoplastos representam um conjunto de organelas do mesmo tipo, mas com bombas de atividades variáveis. Isto significa que um caráter heterogêneo das moléculas da bomba pode ser encontrado para o mesmo tipo de organelas e entre organelas distintas.

A partir destas hipóteses, nós buscamos identificar a origem desta subpopulação de moléculas da enzima. Uma vez que a existência desta pequena subpopulação de moléculas não depende da presença de glicose extracelular,

acreditamos que ela pertença, provavelmente, ao mesmo tipo de organela(s). Além disso, dado que a capacidade máxima de acoplamento foi encontrada para a bomba em membranas com  $\Delta pH$  muito baixo (Kettner *et al.*, 2003) especulamos que tal subpopulação possa ser localizada em novas membranas formadas ou em organelas diferentes. Para tentar resolver tanto esta questão quanto a primeira questão indicada acima, analisamos a sensibilidade de bombas de organelas da via secretória ao nitrato, e a sua capacidade de acoplamento.

Primeiramente, nossos resultados mostram que as enzimas presentes em todas as três organelas são estimuladas pela glicose extracelular. Isso é bem importante, porque a presença da  $V H^+$ -ATPase ativada e regulada pela glicose extracelular, em organelas diferentes dos vacúolos, não é considerada nem mesmo na literatura, exceto pela nossa equipe (Samarão, 2003; Granato, 2006, Samarão *et al.*, 2009). Além disso, segundo Kawasaki-Nishi & colaboradores (2001), a bomba presente nas membranas do Golgi não é regulada pela glicose extracelular.

Ao analisar o efeito do nitrato sobre as atividades das  $V H^+$ -ATPases das diferentes organelas, tanto no que se refere ao transporte de  $H^+$  como à atividade hidrolítica, vimos que a estabilidade da enzima e a sua sensibilidade à inibição pelo nitrato é semelhante em todas as organelas. No entanto, a forma não ativada da enzima é menos estável em cada uma delas (Figuras 11, 12 e 15). Isto indica que, na presença de glicose extracelular, o funcionamento da bomba em diferentes organelas é, de alguma maneira, sincronizado, ou seja, ocorre uma ativação simultânea das  $V H^+$ -ATPases das principais organelas da via secretória. Da mesma forma que, na ausência da glicose, a diminuição da atividade enzimática da  $V H^+$ -ATPase ocorre simultaneamente nessas organelas.

Além disso, como foi visto em MT, nossos resultados mostram uma diferença significativa entre o efeito do nitrato sobre a atividade hidrolítica e o que foi encontrado para o transporte de  $H^+$  (Figuras 11, 12 e 15). As enzimas não ativadas pela glicose extracelular são mais sensíveis à inibição pelo nitrato para o bombeamento de  $H^+$  do que para a hidrólise de ATP. Isso indica que as  $V H^+$ -ATPases de vacúolos, Golgi e RE apresentam uma propriedade similar àquela encontrada em MT e, portanto, refletem uma forma generalizada de regulação desta bomba, que muda a sua sensibilidade ao nitrato.

Adicionalmente, achamos a existência de uma pequena população de  $V H^+$ -ATPase com alta sensibilidade à inibição pelo nitrato e alto acoplamento nos

vacúolos (Figura 18). Em nossas condições experimentais ela não foi detectada no Golgi e no RE. Análises futuras devem verificar se este fato se deve apenas às baixas atividades da enzima em membranas do RE ou se isto é uma característica destas. Seria interessante, também, verificar se esta população reflete a existência de membranas específicas das vesículas secretórias que podem co-migrar com membranas de Golgi e vacúolos em nossas condições, durante o isolamento de membranas.

Os resultados relacionados ao acoplamento da bomba de cada organela da via secretória revelam que ela aumenta seu acoplamento na presença de glicose extracelular (Figuras 16 e 19), em contradição ao que é esperado de acordo com a hipótese de Kane (1995) sobre a regulação da  $V H^+$ -ATPase pela glicose extracelular. De acordo com esta hipótese a enzima não muda seu acoplamento. No entanto, nossos resultados obtidos com membranas totais e com membranas de organelas da via secretória indicam que a modulação da capacidade de acoplamento da bomba pela glicose extracelular é um fator importante de regulação. Essa modulação do acoplamento, junto com outras diferenças entre as propriedades de  $V H^+$ -ATPases ativada e não ativada, é uma descoberta importante que chama a atenção para a necessidade de uma revisão crítica do modelo atual de regulação dessa enzima.

Juntos, estes resultados nos levam a supor que a regulação das  $V H^+$ -ATPases pela glicose extracelular acontece através de uma mudança conformacional da enzima, e não através da dissociação dos complexos, como Kane (1995) afirmou. Dessa forma, o presente trabalho confirma os trabalhos anteriores do nosso grupo e propõe novas propriedades para as enzimas de organelas da via secretória, as quais ainda não foram sugeridas na literatura.

### **5.3 Gradiente protônico e acidificação do citosol como fatores chaves da regulação de P e $V H^+$ -ATPases pela glicose extracelular**

A fim de investigar o sinal/processo primário que determina a modulação da atividade de P e  $V H^+$ -ATPases pela glicose extracelular, tentamos responder de que maneira o pH extracelular e o gradiente de  $H^+$  influenciam na atividade de ambas as bombas, ativadas ou não ativadas pela glicose extracelular.



Alguns trabalhos já mostraram a importância do pH extracelular para a regulação de P e V H<sup>+</sup>-ATPases de levedura (Eraso & Gancedo, 1987; Padilla-López & Pearce, 2006; Martínez-Muñoz & Kane, 2008; Diakov & Kane, 2010).

A ativação da P H<sup>+</sup>-ATPase (Pma1p) em pH extracelular ácido, particularmente na presença de ácidos permeáveis, está bem estabelecida e é crítica para manutenção do pH citosólico (Eraso & Gancedo, 1987). A P H<sup>+</sup>-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 intervalo estreito.

Vários trabalhos investigaram se a atividade de V H<sup>+</sup>-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 da montagem das subunidades V<sub>0</sub> e V<sub>1</sub> da V H<sup>+</sup>-ATPase quando as células são cultivadas em pH baixo. No entanto, a diminuição dos níveis do complexo da V H<sup>+</sup>-ATPase no vacúolo ou a diminuição na montagem das subunidades V<sub>0</sub> e V<sub>1</sub> não são unicamente responsáveis pela diminuição do transporte de H<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>-ATPase e na manutenção do pH vacuolar, em meio com pH baixo.

Já foi mostrada a resposta da V H<sup>+</sup>-ATPase ao pH extracelular e à presença de glicose (Martínez-Muñoz & Kane, 2008). Neste trabalho foi visto que, em pH<sub>ext</sub> 5 e na ausência de glicose, células tem um pH citosólico baixo. Com a adição da glicose, o citosol rapidamente torna-se mais alcalino e o pH vacuolar diminui. Foi mostrado também que o pH citosólico de células fornecidas de glicose é relativamente insensível ao pH extracelular, variando de 6,7 (pH<sub>ext</sub> 5) a 7,1 (pH<sub>ext</sub> 7,5) (Martínez-Muñoz & Kane, 2008). O aumento do pH citosólico após a adição de glicose reflete a disponibilidade de ATP e H<sup>+</sup> gerados metabolicamente e a ativação da P H<sup>+</sup>-ATPase (Serrano, 1983) e da V H<sup>+</sup>-ATPase (Kane, 1995) pela glicose.

Em um trabalho anterior do nosso grupo, foi mostrado que a glicose extracelular estimula as atividades da hidrólise de ATP e do transporte de H<sup>+</sup>,

mediadas por P e V H<sup>+</sup>-ATPases, tanto em pH 7,2 quanto em pH 7,7 (Abreu, 2011), onde foi visto que a ativação em pH 7,7 é mais acentuada para o transporte de H<sup>+</sup> (Abreu, 2011). No presente trabalho, continuamos a investigar as atividades da hidrólise de ATP e do transporte de H<sup>+</sup>, mediadas por P e V H<sup>+</sup>-ATPases, em diferentes faixas pH e corroboramos com o que foi mostrado no trabalho de Abreu (2011), evidenciando o papel importante do  $\Delta$ pH através de membrana plasmática para esta ativação.

Assim como no trabalho de Abreu (2011), a metodologia empregada neste trabalho se diferencia da que foi utilizada nos trabalhos dos grupos de Pearce (2006) e de Kane (2008 e 2010). No trabalho deles, a mudança do pH foi realizada no meio de crescimento das células, enquanto nos nossos trabalhos essas mudanças foram realizadas durante a incubação dos esferoplastos, ou seja, em um intervalo de tempo muito menor (10 min). Além disso, quando o pH é modificado durante o crescimento das células, pode ocorrer uma adaptação/nivelamento por parte dessas células com relação ao pH (devido à síntese proteica, entre outros fatores).

Encontramos que o protonóforo FCCP e o NH<sub>4</sub>Cl foram capazes de diminuir a estimulação tanto da atividade hidrolítica como da sua capacidade de transportar H<sup>+</sup>, em ambas as bombas. Sabendo que eles foram adicionados aos esferoplastos antes da glicose, esperávamos que eles pudessem inibir completamente a capacidade de P e V H<sup>+</sup>-ATPases formarem o gradiente de H<sup>+</sup>. Entretanto, em praticamente todos os casos, a atividade das bombas na presença do FCCP e do NH<sub>4</sub>Cl não chegou ao nível visto para as bombas não ativadas e nem, muito menos, conseguiram inibir sua atividade (Figuras 22 a 29). Sugerimos, então, que a pré-incubação dos esferoplastos tanto com FCCP como com NH<sub>4</sub>Cl destruiu o gradiente de H<sup>+</sup>, mas a adição subsequente de glicose causou sua ativação, embora menos efetiva. Assim, o isolamento de vesículas de membranas, provavelmente, “liberou” as membranas do FCCP e do NH<sub>4</sub>Cl, permitindo detectar o transporte de H<sup>+</sup> já diminuído.

Com base nisso, e também sabendo que a simples acidificação do citosol na ausência de glicose a partir de ácidos fracos em pH 3,5 e 5,5 não foi um fator de ativação de ambas as bombas, ao contrário, induziu inibição (Abreu, 2011), podemos sugerir que a simples acidificação do citosol, por si só, não seja o fator suficiente, mas sim uma condição limitante, sem a qual não ocorre a ativação de nenhuma das bombas H<sup>+</sup>. Acreditamos que seja necessária a existência do

gradiente de  $H^+$  ( $\Delta\mu H^+$ ) através da membrana plasmática e, provavelmente, das membranas de via secretória para a modulação de ambas as bombas, em levedura.

Nossos resultados nos permitem sugerir, dessa forma, que o gradiente de  $H^+$  através da membrana plasmática e o pH extracelular sejam fatores chaves na ativação de P e V  $H^+$ -ATPases pela glicose extracelular.

#### 5.4 Calcineurina como coordenador das atividades de P e V $H^+$ -ATPases

Os dados recebidos com o mutante *cnb1 $\Delta$* , nos permitem sugerir que a ausência da calcineurina funcional nas células de *S. cerevisiae* diminui significativamente a ativação de P e V  $H^+$ -ATPases dependente de glicose extracelular e a sua capacidade em formar o gradiente de  $H^+$ , tanto através da membrana plasmática como através das membranas de organelas da via secretória, respectivamente (Figuras 35 e 36). Isso pode resultar em uma energização mais fraca dessas membranas e, portanto, interferir na energização de numerosos transportadores e canais que operam nessas membranas.

Na membrana plasmática, por exemplo, existem canais e transportadores de  $Ca^{2+}$  para uma variedade de nutrientes, metais pesados, medicamentos, entre outros. Já nas membranas intracelulares estão incluídos canais e trocadores de  $Ca^{2+}$  não só para diferentes cátions de metais, mas também para diferentes cátions orgânicos (como aminoácidos, purinas e pirimidinas), ânions como o fosfato inorgânico e ânions de ácidos orgânicos (citrato, isocitrato, ácido  $\alpha$ -cetogluturato, por exemplo) (Kakinuma *et al.*, 1981; Okorokov *et al.*, 1985; Klionsky *et al.*, 1990; Kulakovskaya *et al.*, 1991; Kulakovskaya *et al.*, 1993), em outras palavras, a calcineurina desempenha um papel importante não só na homeostase do  $Ca^{2+}$ , mas também controla a energização de membranas e a homeostase de  $H^+$  por meio da regulação positiva de P  $H^+$ -ATPase e V  $H^+$ -ATPases da via secretória de leveduras.

Dado o papel fundamental de ambos os tipos de  $H^+$ -ATPases na homeostase de  $H^+$ , para a energização de numerosos transportadores secundários e canais iônicos e para a homeostase de  $Ca^{2+}$ , bem como a importância vital das V  $H^+$ -ATPases para processos fisiológicos importantes, como transporte de solutos, triagem de proteína, fusão/fissão de vesículas de membrana, proliferação de células tumorais, fusão celular, morfologia celular e virulência de fungos patogênicos a

humanos, novos mecanismos moleculares que dirigem o papel chave da calcineurina no metabolismo/sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  para diferentes eucariotos e na multiplicidade dos fenótipos revelados para os mutantes de calcineurina tem sido apresentados (Yoshimoto *et al.*, 2002; Chatfield-Reed *et al.*, 2016). Evidências crescentes para a multiplicidade de processos fisiológicos surpreendentemente controlados pela calcineurina (Rusnak & Mertz, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2002; Cyert & Philpott, 2013; Goldman *et al.*, 2014; Thewes, 2014; Chatfield-Reed *et al.*, 2016), em que a V  $\text{H}^+$ -ATPase é o fator importante (Nelson, 2003; Beyenbach & Wieczorek, 2006; Kane, 2006; Forgac, 2007; Holliday, 2014; Fordyce *et al.*, 2016; Marshansky, 2016), sugerem que a calcineurina regula os processos de modulação da atividade da V  $\text{H}^+$ -ATPase. Além disso, a regulação de V  $\text{H}^+$ -ATPases pela calcineurina, diferente das P  $\text{H}^+$ -ATPases e sistemas de transporte secundários pode ser uma razão importante para o *crosstalk* entre muitas vias de sinalização. Além disso, a constatação de que calcineurina controla o metabolismo de leveduras e fungos através da ativação de bombas de  $\text{H}^+$  e de transportadores de íons/metabólitos pela glicose extracelular pode contribuir para o futuro desenvolvimento de novos agentes antifúngicos novos (Steinbach *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015).

Em contrapartida, um fato importante desta parte do trabalho é que podemos sugerir que existe um ou mais mecanismos de ativação adicionais, independentes de calcineurina ou Cnb1p, para ambas as P  $\text{H}^+$ -ATPase e V  $\text{H}^+$ -ATPases pela glicose extracelular. De fato, as velocidades iniciais do transporte de  $\text{H}^+$  mediada por essas bombas foram significativamente aumentadas pela glicose extracelular nas células mutantes *cnb1Δ*, embora em menor grau quando comparadas àquelas observadas para a cepa selvagem (Figura 35A). O *steady state* do transporte de  $\text{H}^+$  mediado pela P  $\text{H}^+$ -ATPase do mutante *cnb1Δ* também foi aumentado pela glicose extracelular, mas alcançou apenas o nível daquele encontrado para a enzima não ativada a partir da cepa selvagem (Figura 35B).

O nível relativamente baixo do *steady state* do transporte de  $\text{H}^+$  revelado para as membranas isoladas de células mutantes *cnb1Δ* que crescem na presença de glicose aponta à incapacidade do mecanismo independente de calcineurina/Cnb1p em atingir o *steady state* do transporte de  $\text{H}^+$  encontrado na cepa selvagem. Este fato pode ser explicado pelo aumento da sensibilidade das bombas do mutante *cnb1Δ* ao controle de  $\text{H}^+$  (uma inibição por *feedback* das bombas pelo gradiente de  $\text{H}^+$  que elas formam) que provavelmente resultou de uma modificação pós-

transducional da enzima, a qual é provavelmente diferente da bomba da cepa selvagem. Um aumento da permeabilidade das membranas ao  $H^+$  em mutantes pode ser uma razão adicional (ver abaixo). Experimentos futuros irão revelar o(s) mecanismo(s) responsável pela ativação das bombas de  $H^+$  pela glicose extracelular independente de calcineurina/Cnb1p. É de particular interesse descobrir se Cna1p e Cna2p ou Pma2p de membrana plasmática e umas das formas da  $V H^+$ -ATPase em organelas da via secretória (Samarão *et al.*, 2009) podem estar envolvidas nessa estimulação.

Uma vez que a sinalização de  $Ca^{2+}$ /calcineurina controla eficientemente a ativação dependente de glicose de P ATPases que transportam  $Ca^{2+}$  e  $H^+$ , bem como de trocadores  $Ca^{2+}/H^+$ , assumimos também que essa sinalização pode estar envolvida na ativação dependente de glicose de  $Cu^{2+}$ -ATPases,  $Na^+$ -ATPases e diferentes trocadores  $Mn^+/H^+$  de eucariotos inferiores, bem como de  $Na^+/K^+$ -ATPase e de trocadores  $Ca^{2+}/H^+$  de células animais. Tal possibilidade para a regulação de  $Na^+/K^+$ -ATPase e de trocadores  $Ca^{2+}/Na^+$  já foi parcialmente documentado (Aperia *et al.*, 1992; de Lores Arnaiz & López Ordieres, 2014; Chou *et al.*, 2015; Aperia *et al.*, 2016).

O fato da atividade do *steady state* do transporte de  $H^+$  mediado pela P  $H^+$ -ATPase de células mutantes *cnb1Δ* ter sido bem mais fraca do que a observada em células selvagens (Figura 35B) pode indicar uma menor capacidade das células mutantes *cnb1Δ* em acidificar o meio de incubação na presença de glicose. Por isso, comparamos a capacidade de acidificação das cepas selvagem e mutante *cnb1Δ* e revelamos as células mutantes *cnb1Δ* mostraram uma acidificação mais fraca/lenta que as células da cepa selvagem (Figura 37A).

Essa acidificação mais fraca do meio pode ser explicada pela capacidade limitada das células mutantes *cnb1Δ* em formar o gradiente de  $H^+$  somente até um valor restrito do gradiente. Quando este valor é alcançado, a atividade da bomba é regulada negativamente pelo próprio produto, resultando em um nível de acidificação constante. A diminuição dessa acidificação, até mesmo forte, foi relatada (Hemenway *et al.*, 1995). Mas isso não exclui um aumento na permeabilidade da membrana plasmática ao  $H^+$  nas células mutantes. No entanto, a formação do  $\Delta pH$  pela P  $H^+$ -ATPase de MTs isoladas das células mutantes *cnb1Δ* mostrou o *steady state* estável (Figura 37B), embora o procedimento de isolamento de membranas possa comprometer (aumentar) a sua baixa permeabilidade ao  $H^+$

natural. Por consequência, concluímos que o mau funcionamento da calcineurina resulta, principalmente, na fraca atividade de hidrólise de ATP e de transporte de  $H^+$  mediado pela  $P H^+$ -ATPase, enquanto que o aumento da permeabilidade da sua membrana plasmática ao  $H^+$  é provavelmente um fator adicional, o qual pode ser investigado adicionalmente.

Uma vez que o mutante *cnb1* $\Delta$  mostra uma redução significativa na atividade da  $V H^+$ -ATPase e de transportadores de  $Ca^{2+}$  da via secretória, incluindo o Golgi e que a biossíntese da parede celular depende da função correta das vesículas secretoras equipadas com esses transportadores, sugerimos que o isolamento dos esferoplastos a partir das células mutantes *cnb1* $\Delta$  pode ser facilitado em comparação com o isolamento dos esferoplastos da cepa selvagem, como foi encontrado para o mutante *pmr1*, que perdeu a  $Ca^{2+}$ -ATPase do Golgi (Okorokov & Lehle, 1998). Uma razão adicional para tal suposição é o fato de já ter sido demonstrada a contribuição da sinalização pela calcineurina para a integridade da parede celular (Garrett-Engele *et al.*, 1995; Stathopoulos & Cyert, 1997; Garcia *et al.*, 2004).

Mostramos que a formação de esferoplastos a partir das células selvagens foi mais eficiente do que a partir das células mutantes *cnb1* $\Delta$  (Figura 38). Estes dados estão de acordo com He *et al.* (2016), no qual foi mostrado que a expressão do gene *FKS1*, que codifica para uma  $\beta$ -1,3-glucano sintase, foi diminuída no mutante  $\Delta$ *CRZ1* de *Valsa pyri* e aumentou simultaneamente a expressão de dois genes da quitina sintetase. Nossos dados nos permitem sugerir que a calcineurina, além de ser importante para a modulação das atividades de  $V H^+$ -ATPases e de transportadores de  $Ca^{2+}$ , também contribui para a manutenção da integridade da parede celular.

Finalmente, comparamos o crescimento de células selvagens e mutantes *cnb1* $\Delta$ . Nossos resultados mostraram que as células mutantes *cnb1* $\Delta$  cresceram mais eficientemente, em nossas condições experimentais, assim como foi mostrado em Cunningham & Fink, (1994). No entanto, este fato não foi explicado por enquanto. Na tentativa de elucidar o intrigante enigma, voltamos à atenção para a diminuição simultânea tanto do *steady state* do transporte de  $H^+$  como da hidrólise de ATP das bombas encontradas nas células mutantes *cnb1* $\Delta$  na presença de glicose extracelular (Figuras 35B e 36). A avaliação das capacidades de acoplamento das  $P H^+$ -ATPases para as duas cepas a partir do *steady state* (o qual acreditamos refletir mais o estado fisiológico) revelou que é idêntico para as suas

formas ativadas: 125 % e 119 % da extinção da fluorescência/ $\mu\text{mol ATP} \times (\text{mg de proteína})^{-1}$  para a cepa selvagem e do mutante *cnb1 $\Delta$* , respectivamente.

Notavelmente, para atingir tal eficiência, a P H<sup>+</sup>-ATPase do mutante *cnb1 $\Delta$*  precisa de 1,9 vezes menos ATP em comparação com a bomba da cepa do tipo selvagem, ou seja, a bomba do mutante *cnb1 $\Delta$*  é mais eficiente do ponto de vista energético, em condições normais de laboratório. As V H<sup>+</sup>-ATPases ativadas do mutante *cnb1 $\Delta$*  também tiveram capacidade de acoplamento semelhante a da cepa do tipo selvagem (53 % e 58 % da extinção da fluorescência/ $\mu\text{mol ATP} \times (\text{mg de proteína})^{-1}$ , respectivamente), mas também necessitam de menos ATP (2,1 vezes) para atingir tal capacidade.

Portanto, sugerimos que as bombas de H<sup>+</sup> do mutante *cnb1 $\Delta$*  são capazes de atingir o nível de energização da membrana plasmática e das membranas das organelas da via secretória, o qual é suficiente para todos os transportadores de soluto sob condições normais de crescimento. Sob estas condições favoráveis, o mutante *cnb1 $\Delta$*  pode crescer melhor em comparação com a cepa selvagem, a qual é relativamente dispendiosa do ponto de vista energético. No entanto, sob diferentes condições de estresse, o mutante *cnb1 $\Delta$*  não tem o potencial para aumentar o nível de energização das membranas e perde a capacidade de crescer. Em contraste com as células do mutante *cnb1 $\Delta$* , as células selvagens têm uma capacidade adicional (reserva de defesa) de mobilizar bombas de H<sup>+</sup> através da sua ativação mais eficiente dependente de glicose e calcineurina sob condições de estresse e, portanto, crescem melhor do que as células do mutante.

A nossa descoberta da calcineurina como forte regulador positivo de H<sup>+</sup>-ATPases, adicionada ao seu papel já conhecido sobre a regulação de Ca<sup>2+</sup>-ATPases e Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases, em células animais, faz dela uma “superenzima” reguladora da homeostase da maioria (se não todos) dos íons e de vários processos fisiológicos e patológicos, os quais precisam da homeostase iônica.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho tentamos desvendar pontos importantes sobre a regulação de P e V H<sup>+</sup>-ATPases pela glicose extracelular. Para isso, primeiramente, foi importante responder o que realmente acontece com as propriedades bioquímicas das V H<sup>+</sup>-ATPases após sua ativação pela glicose extracelular, ou seja, pretendíamos entender se as essas propriedades são iguais para as enzimas ativadas e não ativadas pela glicose extracelular, de acordo com o que foi preconizado pela hipótese atual, ou se essas enzimas apresentam diferenças entre si.

Nossos primeiros resultados mostraram que as V H<sup>+</sup>-ATPases ativadas pela glicose extracelular apresentam acoplamento mais alto e apresentam transporte de H<sup>+</sup> mais resistente à inibição pelo nitrato. Estas descobertas evidenciam as diferenças entre V H<sup>+</sup>-ATPases ativadas e não ativadas, indicando uma necessidade de revisão da hipótese atual, baseada na dissociação/reassociação de complexos V<sub>1</sub> e V<sub>0</sub> e na igualdade das propriedades bioquímicas de ambos os estados da bomba.

Em seguida, buscamos responder se o gradiente de H<sup>+</sup> através de membrana plasmática é o fator chave para ativação de H<sup>+</sup>-ATPases. Mostramos que P H<sup>+</sup>-ATPases e V H<sup>+</sup>-ATPases de membranas totais podem ser ativadas pela glicose não só em pH extracelular 7,2 e 7,7, mas também em pH 8,2. Essa estimulação foi mais significativa com aumento de pH. Adicionalmente, encontramos que o NH<sub>4</sub>Cl e o protonóforo FCCP, foram capazes de diminuir a estimulação tanto da atividade hidrolítica como da sua capacidade de transportar H<sup>+</sup>, em ambas as bombas. Evidenciamos, com isso, que os ionóforos previnem a ativação da P H<sup>+</sup>-ATPases e V H<sup>+</sup>-ATPases pela glicose extracelular. Acreditamos, portanto, que o gradiente de H<sup>+</sup> ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) através da MP e, provavelmente, das membranas de via secretória seja um fator necessário para a modulação de ambas as bombas, em levedura.

Finalmente, na última parte do trabalho, tentando encontrar um possível intermediário da transdução de sinal da ativação de P e V H<sup>+</sup>-ATPase pela glicose extracelular, avaliamos o papel da calcineurina, buscando responder se a sinalização Ca<sup>2+</sup>/calcineurina (CAN)-Crz1 pode estar envolvida na ativação de P e V H<sup>+</sup>-ATPases pela glicose extracelular, regulando não só a homeostase de Ca<sup>2+</sup> mas, também, a homeostase de H<sup>+</sup>.

Os nossos resultados indicam que a calcineurina influencia a ativação de P e V H<sup>+</sup>-ATPases pela glicose, reforçando, assim, a nossa hipótese de que a calcineurina é um fator crucial para a ativação das bombas de H<sup>+</sup> pela glicose



extracelular, em levedura. Essa nossa descoberta adicionada ao seu papel já conhecido sobre a regulação de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases, em células animais, faz dela um importante regulador da homeostase da maioria (se não todos) dos íons e de vários processos fisiológicos e patológicos.

Sabendo que P e V  $\text{H}^+$ -ATPases desempenham papéis extremamente importantes em processos fisiológicos chaves, incluindo algumas patologias/doenças, os resultados do nosso trabalho são de grande importância para o desenvolvimento de pesquisas futuras sobre os mecanismos moleculares de tais patologias e doenças.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. M. (2011). *Regulação de V H<sup>+</sup>-ATPase e P H<sup>+</sup>-ATPase da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por diferentes modificadores do pH citosólico: o papel da sinalização por H<sup>+</sup>*. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 49p.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2009). *Biologia Molecular da Célula*. 5<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed, 1396p.
- ALVES, O. T. (2006). *Estudo dos transportadores de H<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> em vesículas secretórias do mutante *sec6-4* da levedura *Saccharomyces cerevisiae**. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 81p.
- ANDRÉ, B. (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11: 1575-1611.
- APERIA, A.; IBARRA, F.; SVENSON, L. B.; KLEECAND, C.; GREENGARD, P. (1992). Calcineurin mediates  $\alpha$ -adrenergic stimulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in renal tubule cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 7394-7397.
- APERIA, A.; AKKURATOV, E. E.; FONTANA, J. M.; BRISMAR, H. (2016). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology* 310: 491-495.
- ARAI, H.; BERNE, M.; TERRES, G.; TERRES, H.; PUOPOLO, K.; FORGAC, M. (1987). Subunit composition and ATP site labeling of the coated vesicle proton-translocating adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 26(21): 6632-6638.
- AXELSEN, K. B.; PALMGREN, M. G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamilies. *The Journal of Molecular Evolution* 46: 84-101.
- BANCI, L.; BERTINI, I.; CANTINI, F.; MIGLIARDI, M.; NATILE, G.; NUSHI, F.; ROSATO, A. (2009). Solution structures of the actuator domain of ATP7A and ATP7B, the Menkes and Wilson disease proteins. *Biochemistry* 48: 7849-7855.
- BARKLA, B. J.; PANTOJA, O. (1996) Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 159-184.
- BAUERLE, C.; HO, M. N.; LINDORFER, M. A.; STEVENS, T. H. (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-KDa subunit of the

vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase membrane sector. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 12749-12757.

- BEYENBACH, K. W.; WIECZOREK, H. (2006). The V-type H<sup>+</sup>-ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of Experimental Biology* 209: 577-589 (Review).
- BOND, S.; FORGAC, M. (2008). The Ras/cAMP/protein kinase A pathway regulates glucose-dependent assembly of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 36513-36521.
- BOWMAN, E. J.; MANDALA, S.; TAIZ, L.; BOWMAN, B. J. (1986). Structural studies of the vacuolar membrane ATPase from *Neurospora crassa* and comparison with the tonoplast membrane ATPase from *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 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<sup>+</sup>-ATPases. *Methods in Enzymology* 157: 562-573.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing principal of dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- BUBLITZ, M.; MORTH, J. P.; NISSEN, P. (2011). P-type ATPases at a glance. *Journal of Cell Science* 124: 2515-2519.
- BUSH, D. S. (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 95-122.
- CAMPBELL, K. P.; MACLENNAN, D. H. (1983). Labeling of high affinity ATP binding sites on the 53,000- and 160,000-dalton glycoproteins of the sarcoplasmic reticulum with the photoaffinity probe N,-[<sup>32</sup>P]AT. *The Journal of Biological Chemistry* 10: 1391-1394.
- CARDI, D.; POZZA, A.; ARNOU, B.; MARCHAL, E.; CLAUSEN, J. D.; ANDERSEN, J. P.; KRISHNA, S.; MOLLER, J. V.; LE, M. M.; JAXEL, C. (2010). Purified E255L mutant SERCA1a and purified PfATP6 are sensitive to SERCA-type inhibitors but insensitive to artemisinin. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 26406-26416.
- CARVALHO, F. M. (2007). *Participação de componentes do metabolismo do fosfatidilinositol no controle de vias de sinalização induzidas por glicose em*

*Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Ouro Preto – MG, Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, 104p.

- CASEY, J. R.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSK, J. (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 50-61.
- CHAMBREY, R.; PAILLARD, M.; PODEVIN, R. A. (1994) Enzymatic and functional evidence for adaptation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in proximal tubule apical membranes from rats with chronic metabolic acidosis. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 3243-3250.
- CHANG, A.; SLAYMAN, C. W. (1991). Maturation of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *The Journal of Cell Biology* 115(2): 289-295.
- CHATFIELD-REED, K.; VACHON, L.; KWON E. J.; CHUA, G. (2016). Conserved and diverged functions of the calcineurin-activated Prz1 transcription factor in fission yeast. *Genetics*. 202:1365-75.
- CHÈNE, P. (2002). ATPases as drug targets: learning from their structure. *Nature Reviews Drug Discovery* 1: 665-673.
- CHOU, A. C.; JU, Y. T.; PAN, C. Y. (2015). Calmodulin interacts with the sodium/calcium exchanger NCX1 to regulate activity, *PLoS ONE* 10(9): e0138856.
- CIPRIANO, D. J.; WANG, Y.; BOND, S.; HINTON, A.; JEFFERIES, K. C.; QI, J.; FORGAC, M. (2008). Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777: 599-604.
- CODLIN, S.; HAINES, R.; BURDEN, J.; MOLE, S. (2008). *BTN1* affects cytokinesis and cell-wall deposition by independent mechanisms, one of which is linked to dysregulation of vacuole pH. *Journal of Cell Science* 121: 2860-2870.
- COHEN, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry* 58: 453-508.
- COMPTON, M. A.; GRAHAM, L. A.; STEVENS, T. H. (2006). Vma9p (Subunit e) is an Integral membrane V<sub>0</sub> subunit of the yeast V-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 15312-15319.
- CUNNINGHAM, K. W.; FINK, G. R. (1994). Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *The Journal of Cell Biology* 124: 351-363.

- CUNNINGHAM, K. W.; FINK, G. R. (1996). Calcineurin inhibits VCX1-dependent  $H^+/Ca^{2+}$  exchange and induces  $Ca^{2+}$ -ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 16: 2226-2237.
- CYERT, M. S.; PHILPOTT, C. C. (2013). Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193: 677-713.
- DE LA FUENTE, N.; PORTILLO, F. (2000). The cell wall integrity/remodeling MAPK cascade is involved in glucose activation of the yeast plasma membrane  $H^+$ -ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1509: 189-194.
- DE LORES ARNAIZ, G. R.; LÓPEZ ORDIERES, M. G. (2014) Brain  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase activity in aging and disease. *International Journal of Biomedical Science* 10: 85-102.
- DIAKOV, T. T.; KANE, P. M. (2010). Regulation of vacuolar proton-translocating ATPase activity and assembly by extracellular pH. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 23771-23778.
- DRÖSE, S.; BINDSEIL, K. U.; BOWMAN, E. J.; SIEBERS, A.; ZEECK, A.; ALTENDORF, K. (1993). Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P-type and V-type adenosine triphosphatases. *Biochemistry* 32: 3902-3906.
- ENYEDI, A.; VORHERR, T.; JAMES, P.; MCCORMICK, D. J.; FILOTEO, A. G.; CARAFOLI, E.; PENNISTON, J. T. (1989). The calmodulin binding domain of the plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 12313-12321.
- ERASO, P.; GANCEDO, C. (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Letters* 224: 187-192.
- ERASO, P.; PORTILLO, F. (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane  $H^+$ -ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *The Journal of Biological Chemistry* 156: 11-14.
- ERASO, P.; MAZÓN, M. J.; PORTILLO, F. (2006). Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates *in vitro* the C-terminal peptide of the  $H^+$ -ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1758: 164-170.
- FAÇANHA, A. R.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L. (2008). ATP synthesis catalyzed by a V-ATPase: an alternative pathway for energy conservation

operating in plant vacuoles? *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14: 195-203.

- FAGAN, M. J.; SAIER, M. H. (1994). P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *The Journal of Molecular Evolution* 38: 57-99.
- FAIS, S.; De MILITO, A.; YOU, H.; QIN, W. (2007). Targeting vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Research* 67: 10627-10630.
- FINBOW, M. E.; HARRISON, M. A. (1997). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochemical Journal* 324: 697-712.
- FORGAC, M. (1999). Structure and properties of the vacuolar (H<sup>+</sup>-ATPase). *The Journal of Biological Chemistry* 274(19): 12951-12954.
- FORGAC, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 917-929.
- FORDYCE, C. A.; GRIMES, M. M.; LICON-MUNOZ, Y.; CHAN, C. Y.; PARRA, K. J. (2016). Vacuolar ATPase in physiology and pathology: roles in neurobiology, infectious disease and cancer. In: "*Regulation of Ca<sup>2+</sup>-ATPases, V-ATPases and F-ATPases*": *Advances in Biochemistry in Health and Disease*. Londres - Gran Bretanha: Springer, p. 337-370.
- GACHET, Y.; CODLIN, S.; HYAMS, J. S.; MOLE, S. E. (2005). *BTN1*, the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the human Batten disease gene *CLN3*, regulates vacuole homeostasis. *Journal of Cell Science* 118: 5525-5536.
- GADD, G. M. (1994). Signal Transduction In Fungi. In The Growing Fungus London pp 183-210.
- GARCÍA, R.; BERMEJO, C.; GRAU, C.; PEREZ, R.; RODRÍGUEZ-PEÑA, J. M.; FRANCOIS, J.; NOMBELA, C.; ARROYO, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 15183-15195.
- GARRETT-ENGELE, P.; MOILANEN, B.; CYERT, M. S. (1995). Calcineurin, the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Molecular and Cellular Biology* 15: 4103-4114.
- GOFFEAU, A.; SLAYMAN, C. W. (1981). The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 639: 197-223.

- GOLDMAN, A.; ROY, J.; BODENMILLER, B.; WANKA, S.; LANDRY, C. R.; AEBERSOLD, R.; CYERT, M. S. (2014). The calcineurin signaling network evolves via conserved kinase-phosphatase modules that transcend substrate identity. *Molecular Cell* 55: 422-435.
- GOOSSENS, A.; DE LA FUENTE, N.; FORMENT, J.; SERRANO, R.; PORTILLO, F. (2000). Regulation of yeast H<sup>+</sup>-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Molecular and Cellular Biology* 20: 7654-7661.
- GRANATO, T. M. (2006). *Localização intracelular e regulação pela glicose in vivo de P e V H<sup>+</sup>-ATPases em leveduras*. Dissertação (Mestre em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 94p.
- HARVEY, W. R. (1992). The physiology of V-ATPases. *The Journal of Experimental Biology* 172: 1-17.
- HE, F.; ZHANG, X.; MAFURAH, J. J.; ZHANG, M.; QIAN, G.; WANG, R.; SAFDAR, A.; YANG, X.; LIU, F.; DOU, D. (2016). The transcription factor VpCRZ1 is required for fruiting body formation and pathogenicity in *Valsa pyri*, *Microbial Pathogenesis* 95: 101-110.
- HEMENWAY, C. S.; DOLINSKI, K.; CARDENAS, M. E.; HILLER, M. A.; JONES, E. W.; HEITMAN, J. (1995) *vph6* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* require calcineurin for growth and are defective in vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase assembly. *Genetics* 141: 833-844.
- HINTON, A.; BOND, S.; FORGAC, M. (2009). V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 457: 589-598.
- 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<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 272(8): 4795-4803.
- HOLLIDAY, L. H. (2014). Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: an essential multitasking enzyme in physiology and pathophysiology. *New Journal of Science* ID 675430, 21p.
- INOUE, T.; FORGAC, M. (2005). Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V<sub>1</sub>

domain and subunit a of the  $V_0$  domain. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 27896-27903.

- JAHN, T.; FUGLSANG, A. T.; OLSSON, A.; BRUNTRUP, I. M.; COLLINGE, D. B.; VOLKMANN, D.; SOMMARIN, M.; PALMGREN, M. G.; LARSSON, C. (1997). The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane  $H^+$ -ATPase. *Plant Cell* 9: 1805-1814.
- JOHANNES, E.; BROSANAN, J. M.; SANDERS, D. (1991). Calcium channels and signal transduction in plant cells. *BioEssays* 13: 331-336.
- KAKINUMA, Y.; OHSUMI, Y.; ANRAKU, Y. (1981). Properties of  $H^+$ -translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 10859-10863.
- KANE, P. M. (1995). Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar  $H^+$ -ATPase *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 17025-17032.
- KANE, P. M. (2006). The where, when and how of organelle acidification by the yeast vacuolar  $H^+$ -ATPase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 177-191.
- KARTNER, N.; MANOLSON, M. F. (2016). The vacuolar proton ATPase (V-ATPase): regulation and therapeutic targeting. In: "Regulation of  $Ca^{2+}$ -ATPases, V-ATPases and F-ATPases". *Advances in Biochemistry in Health and Disease*. Londres - Gran Bretanha: Springer, p. 407-437.
- KAWASAKI-NISHI, S.; NISHI, T.; FORGAC, M. (2001). Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100 kDa a-subunit differ in coupling efficiency and *in vivo* dissociation. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 17941-17948.
- KETTNER, C.; BERTL, A.; OBERMEYER, G.; SLAYMAN, C.; BIHLER, H. (2003). Electrophysiological analysis of the yeast V-type proton pump: Variable coupling ratio and proton shunt. *Biophysical Journal* 85: 3730-3738.
- KLIONSKY, D. J.; HERMAN, P. K.; EMR, S. D. (1990). The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 54: 266-292.
- KUHLEBRANDT, W.; ZEELEN, J.; DIETRICH, J. (2002). Structure, mechanism, and regulation of the *Neurospora* plasma membrane  $H^+$ -ATPase. *Science* 297: 1692-1696.



- KULAKOVSKAYA, T. V.; MATIS, S. V.; OKOROKOV L. A. (1991). Transport of organic acid anions and guanosine into vacuoles of *Saccharomyces pastorianus*. *YEAST* 7: 495-501.
- KULAKOVSKAYA, T. V.; MATYASHOVA, R. N.; SHISHKANOVA, N. V.; FINOGENOVA, T. V.; OKOROKOV, L. A. (1993) Change in transport activities of vacuoles of the yeast *Yarrowia lipolytica* during its growth on glucose. *YEAST* 9: 121-6.
- LaFERLA, F. M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 3: 862-872.
- LECCHI, S.; ALLEN, K. E.; PARDO, J. P.; MASON, A. B.; SLAYMAN, C. W. (2005). Conformational Changes of Yeast Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase during Activation by Glucose: Role of Threonine-912 in the Carboxy-terminal tail. *Biochemistry* 44: 16624-16632.
- 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<sup>+</sup>-ATPase leads to glucose-dependent activation. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 35471-35481.
- LEHANE, A. M.; RIDGWAY, M. C.; BAKER, E.; KIRK, K. (2014). Diverse chemotypes disrupt ion homeostasis in the malaria parasite. *Molecular Microbiology* 94(2): 327-339.
- LICHKO, L. P.; OKOROKOV, L. A. (1984). Some properties of membrane-bound, solubilized and reconstituted in liposomes H<sup>+</sup>-ATPase of vacuoles of *Saccharomyces carlsbergensis*. *FEBS Letters* 174: 233-237.
- LIU, S.; HOU, Y.; LIU, W.; LU, C.; WANG, W.; SUN, S. (2015). Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eucaryotic Cell* 14: 324-334.
- LLOPIS, J.; McCAFFERY, J. M.; MIYAWAKI, A.; FARQUHAR, M. G.; TSIEN, R. Y. T. (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 6803-6808.
- LU, M.; SAUTIN, Y. Y.; HOLLYDAY, S.; GLUCK, S. L. (2004). The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression and activity of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 8732-8739.

- LUDWIG, J.; KERSCHER, S.; BRANDT, U.; PFEIFFER, K.; GETLAWI, F.; APPS, D. K.; SCHAGGER, H. (1998). Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 10939-10947.
- LUSTOZA, A. C. D. M.; PALMA, L. M.; FAÇANHA, A. R.; OKOROKOV, L. A.; FAÇANHA, A. L. O. (2011). P5A-Type ATPase Cta4p Is essential for Ca<sup>2+</sup> transport in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe*. *Plos One*, 6: e27843.
- MA, B.; XIANG, Y.; AN, L. (2011). Structural bases of physiological functions and roles of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Cellular Signalling* 23: 1244-1256.
- MADRID, R.; GÓMEZ, M. J.; RAMOS, J.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 14838-14844.
- MANZOOR, N. (2016). Plasma Membrane ATPase: Potential target for antifungal drug therapy. In: “*Regulation of Ca<sup>2+</sup>-ATPases, V-ATPases and F-ATPases*”. *Advances in Biochemistry in Health and Disease*. Londres - Gran Bretanha: Springer, p. 519-530.
- MARSHANSKY, V.; FUTAI, M.; GRÜBER, G. (2016). Eukaryotic V-ATPase and its supercomplexes: from structure and function to disease and drug targeting. In: “*Regulation of Ca<sup>2+</sup>-ATPases, V-ATPases and F-ATPases*”. *Advances in Biochemistry in Health and Disease*. Londres - Gran Bretanha: Springer, p. 301-336.
- MARTÍNEZ-MUÑOZ, G. A.; KANE, P. M. (2008). Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 20309-20319.
- MATSUMOTO, T. K.; ELLSMORE, A. J.; CESSNA, S. G.; LOW, P. S.; PARDO, J. M.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. (2002). An osmotically induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 33075-33080.
- MCDONOUGH, J. P.; MAHLER, H. P. (1982). Covalent phosphorylation of the Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase of yeast plasma membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 257: 14579-14581.

- MERZENDORFER, H.; GRÄF, R.; HUSS, M.; HARVEY, W. R.; WIECZOREK, H. (1997). Regulation of proton-translocating V-ATPases. *The Journal of Experimental Biology* 200: 225-235.
- MERZENDORFER, H.; HUSS, M.; SCHMID, R.; HARVEY, W. R.; WIECZOREK, H. (1999). A novel insect V-ATPase subunit M9.7 is glycosylated extensively. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 17372-17378.
- MOLLER, J. V.; JUUL, B.; LE MAIRE, M. (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1286(1): 1-51.
- MORIYAMA, Y.; NELSON, N. (1987). The purified ATPase from chromaffin granule membranes is an anion-dependent proton pump. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 9175-9180.
- MORIYAMA, Y.; NELSON, N. (1988). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, a proton pump controlled by a slip. *Progress in Clinical and Biological Research* 273: 387-394.
- MORIYAMA, Y.; FUTAI, M. (1990). H<sup>+</sup>-ATPase, a primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173: 443-448.
- MORSOMME, P.; SLAYMAN, C. W.; GOFFEAU, A. (2000). Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1469(3): 133-157.
- MOULARD, B.; PICARDA, F.; HELLARDB, S.; AGULHONB, C.; WEILANDA, S.; FAVREA, I.; BERTRANDA, S.; MALAFOSSEB, A.; BERTRANDA, D. (2001). Ion channel variation causes epilepsies. *Brain Research Reviews* 36: 275-284.
- MULLER, M. L.; JENSEN, M.; TAIZ, L. (1999). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase of lemon fruits is regulated by variable H<sup>+</sup>/ATP coupling and slip. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 10706-10716.
- NELSON, H.; MANDIYAN, S.; NOUMI, T.; MORIYAMA, Y.; MIEDEL, M. C.; NELSON, M. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the C subunit of H<sup>+</sup>-ATPase from bovine chromaffin granules. *The Journal of Biological Chemistry* 265(33): 20390-20393.
- NELSON, N. (1992). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase – one of the most fundamental ion pumps in nature. *The Journal of Experimental Biology* 172: 19-27.
- NELSON N.; HARVEY, W. R. (1999). Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiological Reviews* 79(2): 361-385.

- NELSON, N. (2003). A journey from mammals to yeast with vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 35: 281-289.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. (2014). *Princípios de Bioquímica de Lehninger* - 6<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed, 1328p.
- NERI, D.; SUPURAN, C. T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature Reviews Drug Discovery* 10: 767-777.
- NICOLAY, K.; SCHEFERS, W. A.; BRUINENBERG, P. M.; KAPTEIN, R. (1982). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of intracellular pH, phosphate compartmentation and phosphate transport in yeasts. *Archives Microbiology* 133: 383-89.
- NISHI, T; FORGAC, M. (2002). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases: nature most versatile proton pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 94-103.
- NISHIMURA, K.; IGARASHI, K.; KAKINUMA, Y. (1998). Proton gradient-driven nickel uptake by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 180: 1962-1964.
- NIU, X.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology* 109: 735-742.
- NOVOA-APONTE, L.; OSPINA, C. Y. S. (2014). Mycobacterium tuberculosis P-Type ATPases: Possible Targets for Drug or Vaccine Development. *BioMed Research International*.
- OBERBECK, K.; DRUCKER, M.; ROBINSON, D. G. (1994). V-ATPase and pyrophosphatase in endomembranes of maize roots. *Journal of Experimental Botany* 45: 235-244.
- OKOROKOV, L. A.; LICHKO, L. P. (1983). The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carsbergensis*: ATPase is electrogenic H<sup>+</sup>-translocase. *FEBS Letters* 155: 102-106.
- OKOROKOV, L. A. (1985). Main mechanisms of ion transport and regulation of ion concentration in the yeast cytoplasm. In: KULAEV, I. S.; DAWES, E. A.; TEMPEST, D. W. *Environmental Regulation of microbiology*. 1. ed. Londres - Gran Bretanha: Academic Press, p. 339-349.
- OKOROKOV, L. A.; LICHKO, L. P.; KULAKOVSKAYA, T. V. (1985a). H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>/ion antiporters of vacuolar membrane of *Sacharomyces cerevisiae* yeast. In: *Biochemistry and function of vacuolar adenosine triphosphatase in fungi and plants*. Berlin - Germany: Springer Verlag, p. 203-212.

- OKOROKOV, L. A.; KULAKOVSKAYAYA, T. V.; LICHKO, L. P.; POLOROTOVA E. V. (1985b) H<sup>+</sup>/ion antiport as the principal mechanism of transport systems in the vacuolar membrane of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *FEBS Letters* 192: 303-306.
- OKOROKOV, L. A. (1997). Diversity of Ca<sup>2+</sup>-transporters and Ca<sup>2+</sup> store compartments in yeast: Possible role in protein targeting and in signal transduction. *Folia Microbiologica* 42: 244-245.
- OKOROKOV, L. A.; LEHLE, L. (1998). Ca<sup>2+</sup>-ATPases of *S. cerevisiae*: diversity and possible role in protein sorting. *FEMS Microbiology Letters* 162: 83-91.
- OKOROKOV, L. A.; SILVA, F. E.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L. (2001). Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> homeostasis in fission yeast: a role of Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and distinct V H<sup>+</sup>-ATPases of the secretory pathway organelles. *FEBS Letters* 505: 321-324.
- OKOROKOV, L. A. (2016). The yeast Ca<sup>2+</sup>-ATPases and Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers of the secretory pathway and their regulation. In: "Regulation of Ca<sup>2+</sup>-ATPases, V-ATPases and F-ATPases": *Advances in Biochemistry in Health and Disease*. Londres - Gran Bretanha: Springer, p. 531-550.
- OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; APPELGREN, H.; TABISH, M.; OKOROKOV, L. A.; EKWALL, K. (2002). The endoplasmic reticulum cation P-type ATPase Cta4p is required for control of cell shape and microtubule dynamics. *The Journal of Cell Biology* 157: 1029-1039.
- OKOROKOVA-FACANHA, A. L.; COGO, A. J. D.; PALMA, L. M. (2016). Role of P5A-type ATPase in ion homeostasis and signaling: shedding light on obscure pump. In: "Regulation of Ca<sup>2+</sup>-ATPases, V-ATPases and F-ATPases". *Advances in Biochemistry in Health and Disease*. Londres - Gran Bretanha: Springer, p.551-566.
- ORIJ, R.; BRUL, S.; SMITS, G. J. (2011). Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1810: 933-944.
- 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-LÓPEZ, S.; PEARCE, D. A. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* lacking Btn1p modulate vacuolar ATPase activity to regulate pH imbalance in the vacuole. *Journal of Biological Chemistry* 281: 10273-10280.

- PALMGREN, M. G.; AXELSEN, K. B. (1998). Evolution of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1365: 37-45.
- PALMGREN, M. G.; NISSEN, P. (2011). P-Type ATPases. *Annual Review of Biophysics*, 40(1): 243-266.
- 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 V<sub>1</sub> complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 275(28): 21761-21767.
- PEDERSEN, P. L.; CARAFOLI, E. (1987). Ion motive ATPases. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends in Biochemical Sciences* 12: 146-150.
- PEDERSEN, B. P.; BUCH-PEDERSEN, M. J.; MORTH, J. P.; PALMGREN, M. G.; NISSEN, P. (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450: 1111-1114.
- PERLIN, D. S.; BROWN, C. L.; HABER, J. E. (1988). Membrane potential defect in hygromycin B-resistant pma1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 18118-18122.
- PERMYAKOV, S.; SUZINA, N.; VALIAKHMETOV, A. (2012). Activation of H<sup>+</sup>-ATPase of the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae* by Glucose: The Role of Sphingolipid and Lateral Enzyme Mobility. *PLoS ONE* 7(2): e30966.
- PETROV, V. V.; OKOROKOV, L. (1992) Energization of the yeast Plasmalemma is required for activation of its H<sup>+</sup>-ATPase by glucose. *Biochemistry* 57: 1705-1711.
- PORTILLO, F.; MAZON, M. J. (1985). Activation of yeast plasma membrane ATPase by phorbol ester. *FEBS Letters* 192: 95-8.
- PORTILLO, F. (2000). Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469: 31-42.
- RANDALL, S. K.; SZE, H. (1986). Properties of the partially purified tonoplast H<sup>+</sup> pumping ATPase from oat roots. *The Journal of Biological Chemistry* 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<sup>+</sup>-ATPase. *Yeast* 9: 1075-84.

- READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Analytical Biochemistry* 116: 53-64.
- RETAMAL, C. A.; THIEBAUT, P.; ALVES, E. W. (1999). Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Analytical Biochemistry* 1: 15-20.
- RIBEIRO, C. C.; MONTEIRO, R. M.; FREITAS, F. P.; RETAMAL, C. A.; TEIXEIRA, L. R. S.; PALMA, L. M.; SILVA, F. E.; FAÇANHA, A. R.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; OKOROKOV, L. A. (2012). Extracellular glucose increases the coupling capacity of the yeast V H<sup>+</sup>-ATPase and the resistance of its H<sup>+</sup> transport activity to nitrate inhibition. *PLoS ONE* 11: e49580.
- ROOS, A.; BORON, W. F. (1981). Intracellular pH. *Physiological Reviews* 61(2): 296-434.
- ROTTMANN, M.; MCNAMARA, C.; YEUNG, B. K.; LEE, M. C.; ZOU, B.; RUSSELL, B.; SEITZ, P.; PLOUFFE, D. M.; DHARIA, N. V.; TAN, J.; ET AL. (2010). Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. *Science* 329: 1175-1180.
- RUDOLPH, H. K.; ANTEBI, A.; FINK, G. R.; BUCKLEY, C. M.; DORMAN, T. E.; LeVITRE, J.; DAVIDOW, L. S.; MAO, J.; MOIR, D. T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca<sup>2+</sup>-ATPase family. *Cell* 58:133-145.
- RUSNAK, F.; MERTZ, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiological Reviews* 80: 1483-1521.
- SAMARÃO, S. S. (2003). *Caracterização das atividades das V H<sup>+</sup>-ATPases e P H<sup>+</sup>-ATPase nas organelas de via secretória de levedura e regulação destas enzimas pela glicose extracelular*. Tese (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 101p.
- SAMARÃO, S.; TEODORO, C. E. S.; SILVA, F. E.; RIBEIRO, C.; GRANATO, T. M.; BERNARDES, N.; RETAMAL, C. M.; FACANHA, A. R.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; OKOROKOV, L. A. (2009). V H<sup>+</sup>-ATPase along the yeast secretory pathway: Energization of the ER and Golgi membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788: 303-313.
- SAMBADE, M.; KANE, P. M. (2004). The yeast vacuolar proton-translocating ATPase contains a subunit homologous to the *Manduca sexta* and bovine e

subunits that is essential for function. *The Journal of Biological Chemistry* 279(17): 17361-17365.

- SANDERS, D.; PELLOUX, J.; BROWNLEE, C.; HARPER, J. F. (2002). Calcium at the crossroad of signaling. *The Plant Cell* 14: 3401-3417.
- SERRANO, R. (1983). *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Letters* 156: 11-14.
- SERRANO, R.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; FINK, G. R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* 319(6055): 689-93.
- SERRANO, R. (1989). Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology* 40: 61-94.
- SERRANO, R. (1993). Structure, function and regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *FEBS Letters* 325: 108-111.
- SETO-YOUNG, D.; PERLIN, D. S. (1991). Effect of membrane voltage on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 1383-1389.
- STEVENS, T. H.; FORGAC, M. (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 779-808.
- STOCK, C.; SCHWAB, A. (2014). Ion channels and transporters in metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 10: 2638-2646.
- SOUZA, M. A.; TROPIA, M. J.; BRANDÃO, R. L. (2001). New aspects of the glucose activation of the H<sup>+</sup>-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 147: 2849-2855.
- STATHOPOULOS, A. M.; CYERT, M. S. (1997). Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1- encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes & Development* 11: 3432-3444.
- STEINBACH, W. J.; REEDY, J. L.; CRAMER, R. A.; PERFECT, J. R.; HEITMAN J. (2007). Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nature Reviews Microbiology* 5: 418-430.
- SUMNER, J. P.; DOW, J. A. T.; EARLEY, F. G. P.; KLEIN, U.; JÄGER, D.; WIECZOREK, H. (1995). Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 5649-5653.



- TEODORO, C. E. S. (2004). *Bombas protônicas de organelas da via secretória: comparação entre leveduras e plantas*. Tese (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 154p.
- THEWES, S. (2014). Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes. *Eukaryotic Cell* 13: 694-705.
- TISI, R.; BALDASSA, S.; BELOTTI, F.; MARTEGANI, E. (2002). Phospholipase C is required for glucose-induced calcium influx in budding yeast. *FEBS Letters* 1: 133-138.
- TOYOSHIMA, C.; NAKASAKO, M.; NOMURA, H.; OGAWA, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647-655.
- TRÓPIA, M. J. M.; CARDOSO, A. S.; TISI, R.; FIETTO, L. G.; FIETTO, J. L. R.; MARTEGANI, E.; CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L. (2006). Calcium signaling and sugar-induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343(4): 1234-43.
- UCHIDA, E.; OHSUMI, Y.; ANRAKU, Y. (1985). Purification and properties of H<sup>+</sup>-translocating, Mg<sup>2+</sup>-adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 1090-1095.
- VENÂNCIO, J. B. (2013). *Modulação das Bombas de H<sup>+</sup> no Desenvolvimento Vegetal: Papel no Metabolismo de Açúcares e nas Respostas Adaptativas das Plantas ao Estresse Hídrico*. Tese (Doutor em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 124p.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. (2014). *Fundamentos de Bioquímica: a Vida em Nível Molecular*. 4<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed, 1200p.
- VOSS, M.; VITAVSKA, O.; WALZ, B.; WIECZOREK, H.; BAUMANN, O. (2007). Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase by protein kinase A. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 33735-33742.
- WAGNER, C. A.; FINBERG, K. E.; BRETON, S.; MARSHANSKY, V.; BROWN, D.; GEIBEL, J. P. (2004). Renal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Physiological Reviews* 84: 1263-1314.

- WEBB, B. A.; CHIMENTI, M.; JACOBSON, M. P.; BARBER, D. L. (2011). Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 11: 671-677.
- WIECZOREK, H.; BROWN, D.; GRINSTEIN, S.; EHREUFELD, J.; HARVEY, W. R. (1999). Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *Bioessays* 21: 637-648.
- WILKENS, S.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y. (2005). A structural model of the vacuolar ATPase from transmission electron microscopy. *Micron* 36: 109-126.
- WIPF, D.; LUDEWIG, U.; TEGEDER, M.; RENTSCH, D.; KOCH, W.; FROMMER, W. B. (2002). Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 139-147.
- XIE, X. S.; STONE, D. K. (1986). Isolation and reconstitution of the clathrin coated vesicle proton translocating complex. *The Journal of Biological Chemistry* 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. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 22075-22081.
- YOSHIMOTO, H.; SALTSMAN, K.; GASCH, A. P.; LI, H. X.; OGAWA, N.; BOTSTEIN, D.; PATRICK, O.; BROWN, P. O.; CYERT, M. S. (2002). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 31079-31088.