

MECANISMO DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO ENVOLVE UMA INTEGRAÇÃO
DOS SISTEMAS PRIMÁRIOS DE TRANSPORTE DE H⁺ E Ca²⁺ ASSOCIADOS
COM REMODELAMENTO DA DINÂMICA VACUOLAR

FREDERICO FIRME FIGUEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO – 2020

MECANISMO DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO ENVOLVE UMA INTEGRAÇÃO
DOS SISTEMAS PRIMÁRIOS DE TRANSPORTE DE H⁺ E Ca²⁺ ASSOCIADOS
COM REMODELAMENTO DA DINÂMICA VACUOLAR

FREDERICO FIRME FIGUEIRA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Produção
Vegetal”

Orientador: Prof. Dr. ARNOLDO ROCHA FAÇANHA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

F475

Figueira, Frederico Firme.

MECANISMO DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO ENVOLVE UMA INTEGRAÇÃO DOS SISTEMAS PRIMÁRIOS DE TRANSPORTE DE H⁺ E Ca²⁺ ASSOCIADOS COM REMODELAMENTO DA DINÂMICA VACUOLAR / Frederico Firme Figueira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

75 f. : il.

Bibliografia: 40 - 56.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientador: Arnaldo Rocha Facanha.

1. *Schizosaccharomyces pombe*. 2. retículo endoplasmático. 3. V-ATPase. 4. Vma5p. 5. estresse oxidativo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

MECANISMO DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO ENVOLVE UMA INTEGRAÇÃO
DOS SISTEMAS PRIMÁRIOS DE TRANSPORTE DE H⁺ E Ca²⁺ ASSOCIADOS
COM REMODELAMENTO DA DINÂMICA VACUOLAR

FREDERICO FIRME FIGUEIRA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Produção
Vegetal”

Aprovado em 17 de agosto de 2020

Comissão Examinadora

Prof. Carlos Eduardo Tadokoro (DSc. Imunologia) - UVV

Prof. Carlos Eduardo Veiga de Carvalho (DSc. Geoquímica Ambiental) - UENF

Prof. Daniel Basílio Zandonadi (DSc. Biociências e Biotecnologia) – UFRJ

Profa. Anna Lvovna Okorokova Façanha (DSc. Química Biológica) - UENF
(Coorientadora)

Prof. Arnaldo Rocha Façanha (DSc. Química Biológica) – UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias e programa de pós-graduação em Produção Vegetal pelo acolhimento e oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, pela concessão da bolsa e agências de fomentos CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro à pesquisa.

Ao meu querido orientador professor Arnaldo Rocha Façanha, pela confiança e orientação ao longo desses anos, no qual sempre demonstrou prontidão e disposição em sanar qualquer dúvida durante todo o doutorado, e pela oportunidade de participar em seu seletivo grupo de pesquisa.

À minha coorientadora professora Anna Lvanovna Okorovkova-Façanha, pela confiança, paciência e direcionamento durante todo o desenvolvimento do projeto. Sempre dando ideias novas e tendo certeza de que eu estava indo pelos trilhos corretos. Por todo conselho, aprendizado passado, e discussões no laboratório.

Aos meus maravilhosos pais, Margareth e Holdar, dos quais sem eles jamais conseguiria atingir essa etapa da minha vida. Por toda força e confiança depositava em mim. Pelo carinho, zelo, cobranças e conselhos que sempre me deram durante toda a minha vida.

À minha querida irmã Natália, que mesmo distante, sempre esteve presente durante toda minha jornada de vida.

À minha querida parceira de vida, Juliana do Couto Vieira Carvalho dos Santos. Por todos os momentos maravilhosos que tivemos ao longo dessa jornada, pelos conselhos, carinho, confiança, e sobretudo, por sempre acreditar na minha capacidade, me motivando a ser sempre minha melhor versão.

Aos meus colegas de laboratório, Bruna, Letícia, Sávio, Matheus, Arícia, Enrico, Gil, Janiélio, Raul e Glenerson, pelo carinho, discussões, risadas, cafés das tardes e pelas ajudas que me deram sempre que necessitado.

Ao meu querido amigo Antônio Cogo, que sempre esteve ao meu lado, por todo auxílio durante a montagem e desenvolvimento de protocolos e dos experimentos, por todo conhecimento compartilhado durante toda minha jornada acadêmica, desde meus tempos de IC até o final do doutorado, sempre me guiou de alguma forma.

Ao professor Jorge Petreski, pelas maravilhosas pausas do café, com suas histórias fantásticas e conselhos que levarei para a vida toda, sempre com bom humor e sabedoria estrondosa.

A todos os professores do programa de pós-graduação em produção vegetal pelos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas cursadas.

E por fim, porém não menos importante, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a minha formação para a realização deste trabalho. Muito obrigado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Dinâmica do alumínio no sistema solo-planta	6
2.2. Leveduras como modelo de estudo de sistemas vegetais.....	9
2.3. Exposição do alumínio em microrganismos.....	10
2.4. Efeito do Al na homeostase de cálcio	11
2.5. Efeito do Al na homeostase de H ⁺	15
2.6. Estresse oxidativo induzido por Al.....	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Cepas de leveduras, manutenção e cultivo	22
4.2. Efeito do Al na morfologia celular	22
4.3. Marcação de vacúolos.....	23
4.4. Isolamento das membranas totais de <i>S. pombe</i>	23
4.5. Atividade das H ⁺ -ATPases de membrana plasmática e vacuolar	24
4.6. Determinação do conteúdo de proteínas	25

4.7. PCR em Tempo Real.....	25
4.8. Análise STRING de interação proteína-proteína	27
4.9. Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Efeito do estresse induzido por Al e ausência de Cta4 ATPase na fragmentação vacuolar e celular.	28
5.2. Efeito do Al na atividade de H ⁺ -ATPases em S. pombe	30
5.3. Al regula negativamente os níveis de mRNA relacionados à homeostase do H ⁺ e Ca ²⁺	33
5.4. Construção de redes de proteínas através da análise STRING	38
6. DISCUSSÃO	41
6.1. Alterações de morfologia e polaridade celular da levedura de fissão por estresse de Al	41
6.2. Al interfere na fragmentação vacuolar	42
6.3. Efeito de Al nas bombas de H ⁺	43
6.4. Alteração nos níveis de mRNA dos genes envolvidos na homeostase de H ⁺ e Ca ²⁺	46
6.5. Rede de proteínas participantes da homeostase de pH e Ca ²⁺	48
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

ABREVIações

μM – Micromolar

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

ACMA - 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridine

Al – Alumínio

$\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})^{3+}$ - Hidróxido de alumínio

$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ – Sulfato duplo de alumínio e potássio

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - Albumina sérica bovina

Ca^{2+} - Cálcio

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO – Espécies reativas de oxigênio

H^+ - Hidrogênio

K – Potássio

M – Molar

Mg – Magnésio

Min- Minuto

mM – Milimolar

Mn^{2+} - Manganês

NaH_2PO_4 – Fosfato monossódico

$\text{OD}_{600\text{nm}}$ – Densidade óptica

P - Fósforo

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

RNA - Ácido ribonucleico

RESUMO

FIGUEIRA, Frederico Firme; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Agosto de 2020; Mecanismo de tolerância ao alumínio envolve uma integração dos sistemas primários de transporte de H^+ e Ca^{2+} associados com remodelamento da dinâmica vacuolar. Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha.

O alumínio (Al) é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, onipresente naturalmente em águas e solos e que sob condições ácidas se torna tóxico, representando, portanto, um risco para a maioria das plantas e fungos. A descrição da sensibilidade ao Al em leveduras provou ser uma ferramenta poderosa para a análise celular e molecular da toxicidade e tolerância ao mesmo. A levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* é usada no presente estudo como um modelo para explorar e aprofundar o conhecimento sobre a resposta celular ao estresse induzido pelo Al. Verificou-se que a exposição a $AlK(SO_4)_2$ a 0,5 mM resultou em alterações no crescimento e morfologia das células de levedura de fissão, regulação negativa das Ca^{2+} -ATPases e genes responsivos ao cálcio, e modulação da atividade e expressão da H^+ -ATPase vacuolar. Além disso, estresse de Al induziu a fragmentação vacuolar. Uma análise de bioinformática utilizando a ferramenta STRING foi realizada para elucidar diferentes interações entre proteínas envolvidas na homeostase do H^+ e Ca^{2+} . Os dados indicam a remodelação da homeostase de cálcio e prótons, particularmente no retículo endoplasmático e vacúolo, como parte do complexo mecanismo de sobrevivência contra a toxicidade do Al. O estudo aponta para *S. pombe* como um modelo promissor para estudos de mecanismos de tolerância ao Al e outros metais em sistemas eucarióticos.

Palavra-chave: *Schizosaccharomyces pombe*, retículo endoplasmático, V-ATPase, Vma5p, estresse oxidativo, STRING

ABSTRACT

Aluminum (Al) is the third most abundant element in the earth's crust, naturally ubiquitous in waters and soils which under acidic conditions becomes toxic, thus representing a risk to most plants and fungi. The description of Al sensitivity in yeasts proved to be a powerful tool for cellular and molecular analysis of Al toxicity and tolerance. The fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, is used in the present study as a model to explore and increase the knowledge about cellular response to stress induced by Al. It was found that exposure to AlK (SO₄)₂ at 0.5 mM resulted changes in growth and morphology of fission yeast cells, negative regulation of Ca²⁺-ATPases and genes responsive to calcium, and modulation of activity and expression of vacuolar H⁺-ATPase. In addition, Al's stress induced vacuolar fragmentation. A bioinformatics analysis using STRING tool was performed to elucidate different interactions between proteins involved in H⁺ and Ca²⁺ homeostasis. The data indicate the remodeling of calcium and proton homeostasis, particularly in the endoplasmic reticulum and vacuole, as part of the complex survival mechanism against Al toxicity. The study points to *S. pombe* as a promising model for studies of mechanisms of tolerance to Al and other metals in eukaryotic systems.

Key word *Schizosaccharomyces pombe*, endoplasmic reticulum, V-ATPase, Vma5p, oxidative stress, STRING

1. INTRODUÇÃO

Um terço da área total do planeta Terra é constituído por solos ácidos, os quais possuem $\text{pH} \leq 5,5$. Esse tipo de solo é comumente distribuído por toda a área tropical e subtropical, e quase metade das terras potencialmente aráveis são ácidas (Kochian et al., 2004; Sade et al., 2016). Diferentes fatores podem aumentar a acidificação do solo, como manejo inadequado do solo, agricultura intensa, lixiviação de cátions básicos (K, Ca, Mg), chuva ácida e uso indiscriminado de fertilizantes de amônio, que em conjunto, intensificam a acidificação dos solos cultivados (Krug e Frink, 1983; Guo et al., 2010).

O alumínio (Al), assim como outros metais (ferro e manganês), é altamente suscetível às alterações do pH, e sua solubilidade é intensificada em condições ácidas (Brautigam et al., 2012). Em pHs ácidos (abaixo de 5,0), o alumínio trivalente (Al^{3+}) se torna a forma mais abundante deste metal, o qual possui o maior impacto no crescimento das plantas, ocasionando uma toxicidade mais severa nos vegetais. Induzindo não só a deficiência de diversos minerais essenciais, como cálcio, magnésio e fósforo, como também danificando os tecidos das raízes e limitando tanto o crescimento radicular quanto o vegetal (Collignon et al., 2012).

Uma notória quantidade de estudos foram realizadas para descobrir os diferentes mecanismos (fisiológicos, bioquímicos, moleculares) dos quais as plantas empregam para tolerar quantidades tóxicas de Al em solo ácido (Kochian et al., 2004), mas a integração precisa da dinâmica celular eucariótica sob todo o estresse está longe de ser concluída. A ação pleiotrópica do Al impõe certas limitações aos estudos em plantas e animais, como a variação na resposta celular à exposição ao Al, que depende da localização celular dentro de um tecido ou nos

diferentes órgãos. Nesse cenário, a levedura unicelular surge como um excelente modelo para elucidar os principais alvos celulares do Al (MacDiarmid e Gardner, 1996; Anoop et al., 2003; Zheng et al., 2007). Em geral, verificou-se que a tolerância ao Al na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e de outras células de fungos é maior do que a observada em plantas e animais. Em trabalhos anteriores, nosso grupo identificou o Al como um fator que impede a transição para a hifa em *Yarrowia lipolytica* na concentração de 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ sem prejudicar seu crescimento (Lobão et al., 2007). O efeito do Al neste fungo foi demonstrado estar relacionado a um aumento do pH ambiente devido à extrusão aumentada de H^+ .

Embora inicialmente descrita e estudada em plantas (Gupta et al., 2013), a desregulação da homeostase do H^+ não é bem caracterizada em resposta ao Al nas células fúngicas (Hamilton et al., 2001a). As bombas H^+ são essenciais para diversos processos celulares básicos, incluindo a geração do gradiente transmembranar de H^+ que fornece energia para os transportadores secundários (Morsomme e Boutry, 2000). Devido à toxicidade do Al, há uma mudança no potencial de membrana e essa mudança está diretamente correlacionada com as mudanças do potencial da superfície da mesma, também conhecida como potencial zeta. Essas proteínas podem também atuar como sensores de estresse, portanto, estudar a modulação das H^+ -ATPases em resposta à toxicidade do Al pode contribuir para uma melhor compreensão do mecanismo de toxicidade e tolerância desse metal em células eucarióticas.

A carga superficial da membrana e o potencial transmembranar são características muito complexas que são influenciadas por uma infinidade de transporte de íons e outros processos (Miyasaka et al., 1989; Rengel, 1996). Entre esses processos, a atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática pode muito bem ser a mais influente. Uma vez que a carga superficial da membrana plasmática, bem como o potencial transmembranar pode influenciar a atividade dos canais de Ca^{2+} , incluindo ativação por hiperpolarização (Kiegle et al., 2000; Véry e Davies, 2000) e depolarização dos canais de Ca^{2+} (Piñeros e Tester, 1995; Piñeros e Tester, 1997; Thion et al., 1998) e portanto podem alterar a dinâmica da homeostase de Ca^{2+} citoplasmático.

Dessa maneira a sinalização de H^+ , como também a homeostase de Ca^{2+} , é proposta como um alvo do Al nas células vegetais e de leveduras (Li et al., 2011), o que sugere um “cross-talk” necessário entre a sinalização de próton e cálcio para lidar com o estresse de Al. A interrupção da homeostase de cálcio citoplasmático pode estar diretamente ou indiretamente envolvida com a inibição e a divisão celular e crescimento radicular, uma vez que o Al pode interromper o metabolismo dependente de Ca^{2+} , através da manutenção dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático ou impedindo a ocorrência de Ca^{2+} transiente.

A levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* é usada como um excelente modelo eucariótico para estudar vários processos biológicos, incluindo polaridade e morfologia celular (Perez e Rincón, 2010) e homeostase de metais (Mercier e Labbé, 2010). Assim, a possibilidade de identificar biomarcadores moleculares do estresse de Al e/ou possíveis alvos genéticos que possam contribuir para nosso entendimento de eventos moleculares e vias de sinalização desencadeadas por Al e, eventualmente, melhorar a tolerância das plantas ao Al é ampliada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dinâmica do alumínio no sistema solo-planta

Alumínio (Al) é o metal mais abundante da crosta terrestre. A maior parte deste elemento é incorporada ao solo mineral na forma de silicato de Al, com apenas algumas frações em forma solúvel as quais podem influenciar os organismos vivos do solo (Schmitt et al., 2016; Singh et al., 2017). É um elemento não essencial, porém tóxico quando em excesso para a maioria das plantas. Em condições ácidas ($\text{pH} < 5$) o Al encontrado no solo mineral surge nas formas $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})^{3+}$ e $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})^{3+}$, o qual a forma Al^{3+} é a mais abundante e possui o maior impacto no crescimento das plantas (Silva, 2012; Schmitt et al., 2016). Em contraste, o Al precipitado ou quelado em compostos orgânicos não são tóxicos para as plantas (Nogueirol et al., 2015).

Supreendentemente, a estimulação do crescimento radicular é um efeito benéfico do Al. O impacto do Al, tanto tóxico quanto benéfico, no crescimento vegetal, depende da concentração do metal e varia de acordo com a espécie de planta, o qual inclui o genótipo dentro da mesma espécie, sua idade fisiológica, condições de crescimento e a duração da exposição a este metal (Bojórquez-Quintal et al., 2017). Três respostas são observadas a respeito do crescimento radicular dependendo da concentração de Al. i) Crescimento radicular não é prejudicado em baixas concentrações de Al, no entanto em concentrações altas, diminui; ii) crescimento radicular é estimulado em baixas concentrações de Al, porém é inibido em concentrações altas; iii) inibição do crescimento radicular em

baixas concentrações ou curtos períodos de tempo, mas pouco ou nenhum efeito em altas concentrações ou longos períodos de tempo (Barceló e Poschenrieder, 2002; Zhou et al., 2011). Entretanto uma quarta resposta é apresentada em genótipos onde o crescimento radicular não é prejudicado, mesmo em concentrações muito altas de Al, indicando que diferentes espécies de plantas diferem em seus mecanismos de resposta ao estresse por Al nos níveis celular e tecidual, bem como no nível de toda a planta (Bojórquez-Quintal et al., 2017).

Sabendo que, aproximadamente 70% dos solos possuem algum tipo de estresse abiótico, entre eles, a grande ocorrência de pHs mais ácidos (Figura 1), há uma grande chance de ocorrer alguma limitação na produção dos alimentos básicos (Panda et al., 2009; Gupta et al., 2013; Nunes-Nesi et al., 2014).

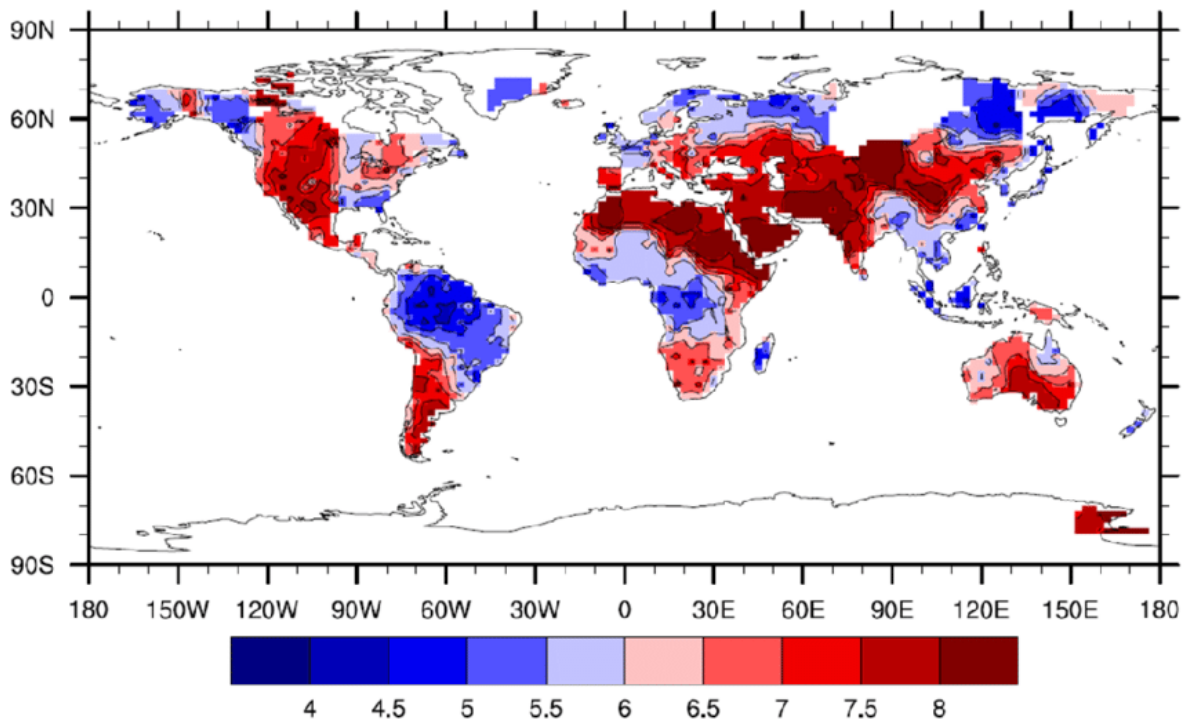


Figura 1. Caracterização do pH dos solos no globo. Fonte; IGBP-DIS.

Várias atividades antropológicas aceleraram a acidificação dos solos nas últimas décadas, sendo o uso desenfreado de fertilizantes a base de P e N um deles (Mahler e McDole, 1985; Guo et al., 2010; Liang et al., 2013). Consequentemente aumenta a solubilização do Al (Che et al., 2015), e assim ocorre um desbalanço no ciclo do enxofre, nitrogênio, carbono (Bolan e Hedley, 2003; Tang e Rengel 2003), além dos impactos nas bactérias fixadoras de N de raízes de leguminosas (Coventry e Slattery, 1991). O primeiro sintoma de fitotoxicidade de Al

em plantas é a inibição do crescimento radicular, o qual ocorre após a exposição ao Al^{3+} em concentrações micromolares dentro de uma hora (Matsumoto 2000; Kochian et al., 2005; Ma, 2007). O crescimento radicular depende de um processo contínuo de divisão celular, que devido à fitotoxicidade por Al, ocorre de forma limitada. Como resultado, as raízes se tornam atrofiadas e quebradiças, o desenvolvimento dos pelos radiculares é prejudicado e o ápice da raiz se torna inchado e danificado (Panda et al., 2009).

A inibição do crescimento radicular promovida pelo Al requer que o ápice da raiz, em particular a parte distal da zona de alongamento, esteja diretamente exposta ao Al, indicando que o ápice radicular é um sítio crítico de percepção e expressão de resistência e toxidez ao mesmo (Kinraide et al., 1993; Kollmeier et al., 2001; Gupta et al., 2013; Kopittke et al., 2015). Sabe-se também que a exposição a este elemento induz uma desregulação do ciclo celular, redução da atividade mitótica e interfásica, indicando o motivo da rápida inibição do crescimento radicular devido à exposição ao Al (Panda et al., 2009; Silva, 2012).

A morfologia celular depende do citoesqueleto de microtúbulos, que por sua vez depende do gradiente de cálcio citoplasmático. Além disso, Macdonald, e colaboradores (1987) mostraram que o Al influenciou/promoveu a polimerização/montagem da tubulina *in vitro*. Desde então, vários grupos relataram efeitos do Al no citoesqueleto nas células vegetais. Por outro lado, há um número crescente de evidências de que o Al interfere com a homeostase do cálcio. Por exemplo, para a planta sintetizar calose é necessário um aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático, e vários cátions metálicos polivalentes, incluindo Al, induzem a síntese de calose nas raízes após 30 min de exposição (Rengel, 1992). Dessa forma, o fenômeno para síntese de calose demonstra um link entre estresse por Al e mudanças na concentração de Ca^{2+} que modulam vias de sinalização celular.

De acordo com Sivaguru e Horst 1998, Al induz acumulação de calose no plasmodesma de células de raízes trigo, e assim bloqueia o tráfico de célula para célula. A célula vegetal requer uma rede dinâmica baseada no citoesqueleto para o funcionamento adequado da diferenciação e divisão celular, dessa maneira a toxicidade de Al interrompe a estrutura do citoesqueleto.

A correlação positiva entre o aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático desencadeado pela exposição ao Al e a inibição do crescimento radicular (Zhang e Rengel, 1999) é consistente com as observações de que: a formação de calose induzida por Al nas pontas das raízes está diretamente relacionada à inibição do crescimento radicular em *Triticum aestivum* (Zhang et al., 1994) e *Triticum turgidum* (Frantzios et al., 2001); e a síntese de calose induzida por Al é inversamente correlacionada com a resistência ao Al em *Zea mays* (Horst et al., 1997). Portanto, um aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático em resposta ao Al serve como um gatilho para promover a síntese de calose, ativando a enzima de 1,3- β -glucana sintase.

Diversos processos bioquímicos e fisiológicos foram demonstrados sendo influenciados tanto em minutos quanto a horas após a exposição ao Al, dentre eles estão: mudanças na dinâmica do citoesqueleto (Schwarzerová et al., 2002; Gupta et al., 2013), inibição da captação de cátions (Van Oene, 1998), acumulação de calose (Ahn, 2002), estresse oxidativo exacerbado (Yamamoto et al., 2002; Singh et al., 2017), distúrbio na homeostase de Ca^{2+} e de pH (Ma et al., 2002), inibição da atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática de células da ponta da raiz (Ahn et al., 2001; Ahn, 2002; Bose et al., 2010a).

2.2. Leveduras como modelo de estudo de sistemas vegetais

As leveduras são continuamente usadas como um modelo válido para estudos de sistemas vegetais devido à rápida e simples transformação, ao curto ciclo de vida e à facilidade de manipulação. O uso de leveduras como modelo de célula eucariótica de uma planta é bastante comum, devido às semelhanças na bioenergética celular e respostas aos estresses incluindo a toxidez do Al. Por exemplo, Ezaki e colaboradores (2005) demonstraram que genes de tolerância ao Al de plantas vasculares conferem uma resistência ao Al em levedura.

A levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* tornou-se importante em estudos na área de biologia celular devido à divisão celular deste organismo, que se assemelha com a maioria dos eucariotos e distingue-se das leveduras de brotação pela sua divisão celular simétrica (fissão binária). Com a realização do sequenciamento completo do genoma da *S. pombe* em 2002 (Wood et al., 2002), em conjunto com anos de desenvolvimento de métodos de genética e biologia

molecular, *S. pombe* se tornou um excelente organismo modelo, sendo utilizada em diferentes estudos, como morfologia celular e tolerância a metais (Nurse, 1994; Clemens et al., 2002).

A *S. pombe* é um fungo ascomiceto unicelular em forma de bastão, caracterizada pelo modo unicelular de crescimento. Essa levedura de fissão pertence a um pequeno grupo de espécies caracterizadas (*S. pombe*, *S. japonicus*, *S. octosporus*) e o grupo como um todo possui uma distância evolucionária de 300-1.000 milhões de anos das numerosas espécies de levedura de brotação, incluindo *Saccharomyces cerevisiae* (Sipiczki, 2000; Heckman et al., 2001). Além disso, essas leveduras possuem sua ascendência de uma cepa monolítica, em que todas as cepas desta levedura utilizada em experimentos científicos foram originadas de um único isolado (Sunnerhagen, 2002).

2.3. Exposição do alumínio em microrganismos

Algumas cepas microbianas tolerantes ao Al foram isoladas de solos ácidos (Kimoto et al., 2010; Kunito et al., 2012; Wang et al., 2013a). A maioria dessas cepas pode tolerar várias centenas de mM de Al. A tolerância microbiana ao Al da levedura *Rhodotorula glutinis* e da bactéria *Acidiphilium cryptum* pode ser induzida pelo pré-tratamento com Al (Fischer et al., 2002; Tani et al., 2004, 2010). Sugere-se que vários mecanismos, como sistema de transporte de magnésio, aumento do número de mitocôndrias, aumento da espessura da parede celular, estejam associados à tolerância a este metal (MacDiarmid e Gardner, 1998; Tani et al., 2008; Wang et al., 2013b). No entanto, os exatos mecanismos utilizados pelos microrganismos nativos de solo ácidos com alta tolerância ao Al são amplamente desconhecidos, embora sejam potencialmente interessantes e significativos.

A toxicidade e tolerância ao Al envolvem diferentes vias e processos coordenados. Uma análise de proteômica utilizando *Rhodotorula sp.* RS1, uma levedura isolada de solo ácido tolerante ao Al, identificou 33 proteínas que são diferencialmente expressas em resposta ao estresse por Al, proteínas essas associadas a diferentes vias, como transcrição e tradução de proteínas, metabolismo, reparo de DNA, proteínas de parede celular e relacionadas às funções do Golgi, além de proteínas que podem induzir o acúmulo de citrato interno o qual poderia quelar o íon Al. É importante destacar que 18% das proteínas

diferencialmente expressas na exposição ao Al têm função desconhecida em RS1, abrindo ainda mais a gama de possíveis mecanismos chave envolvidos na resposta a esse metal (Wang et al., 2013a).

Entre os efeitos mais estudados da resposta ao Al está a inibição do crescimento celular. Apesar de não inibir o crescimento do fungo dimórfico *Yarrowia lipolytica*, Al impede a transição morfogênica de levedura para hifa (Lobão et al., 2007). Mesmo em modelos considerados tolerantes ao Al, como *Rhodotorula sp.* RS1 (Wang et al., 2013b) e *Cryptococcus humicola* (Zhang et al., 2017) a exposição a altas concentrações de Al é capaz de inibir o crescimento. Em resposta ao Al também é frequentemente descrito o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Wang e Yang, 2005; Palma, 2011; Sade et al., 2016), indução de estresse de retículo endoplasmático e consequente desregulação da homeostase de cálcio (Palma, 2011; Zhang et al., 2015; 2017), além da desregulação na homeostase de H⁺ (Hamilton et al., 2001b; Gupta et al., 2013).

2.4. Efeito do Al na homeostase de cálcio

O alumínio interfere com a homeostase de Ca²⁺ intracelular, o qual é outro processo responsável pelas injúrias ocasionadas por este metal (Zheng et al., 2007; Panda et al., 2009). Os íons de cálcio são importantes mensageiros secundários na resposta aos sinais biológicos, pois vários desses mecanismos utilizam vias de sinalização mediadas por cálcio como, exocitose, rearranjo do citoesqueleto e outras (Iida et al., 1990). Acredita-se que a homeostase de Ca²⁺ em eucariotos unicelulares e plantas depende de uma atividade coordenada entre i) Ca²⁺-ATPases de alta afinidade e baixa capacidade, II) transportadores trocadores Ca²⁺/H⁺ de baixa afinidade e alta capacidade de membranas vacuolares e iii) canais de liberação de cálcio (Cunningham e Fink, 1994; Sanders et al., 1999).

O Al possui uma grande afinidade pela superfície da membrana plasmática, podendo chegar a ser até 56 vezes maior que o Ca²⁺ (Akeson et al., 1989). Dessa maneira, a interrupção das cascatas de sinalização ligadas a Ca²⁺ parece ser um evento chave na percepção de toxicidade do Al em plantas (Rengel e Zhang 2003), pois o Al é capaz de inibir canais de Ca²⁺ na membrana plasmática (Piñeros e Tester, 1995; Véry e Davies, 2000) e em contrapartida, induzir o aumento na

concentração citoplasmática de Ca^{2+} em diferentes sistemas vegetais (Jones et al., 1998; Zhang e Rengel, 1999).

É possível que a fonte de Ca^{2+} para um aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico durante a exposição ao Al seja tanto extracelular quanto intracelular. Os canais Ca^{2+} ativados pela hiperpolarização são inibidos pelo Al (nº 1, Figura 2), enquanto a despolarização da membrana plasmática por Al pode aumentar os fluxos de Ca^{2+} por meio de canais de Ca^{2+} ativados por despolarização (nº 2, Figura 2), efeito putativo do Al nos canais catiônicos não seletivos permeáveis a Ca^{2+} (nº 3, Figura 2). Um aumento do fluxo de Ca^{2+} a partir do apoplasto resultaria em um aumento inicial na concentração citoplasmática de cálcio que ativaria os canais de liberação de Ca^{2+} no tonoplasto (nº 4, Figura 2) e a membrana do retículo endoplasmático (RE) (nº 5, Figura 2), aumentando ainda mais a concentração citoplasmática de Ca^{2+} . O alumínio (extracelular ou intracelular) pode bloquear a formação de IP3 e, assim, diminuir o sinal gerado por IP3 para a ativação de canais de liberação de Ca^{2+} específicos no tonoplasto (nº 6, Figura 2). O efeito do Al nas Ca^{2+} -ATPases localizadas no retículo endoplasmático (nº 7, Figura 2) e na membrana plasmática (nº 8, Figura 2) indicam que o Al pode inibir essas bombas, o que resultaria no aumento da concentração citoplasmática de cálcio. Pouco se sabe a respeito do efeito do Al nos trocadores de Ca^{2+} (CaX) no tonoplasto (nº 9, Figura 2) (Rengel e Zhang, 2003).

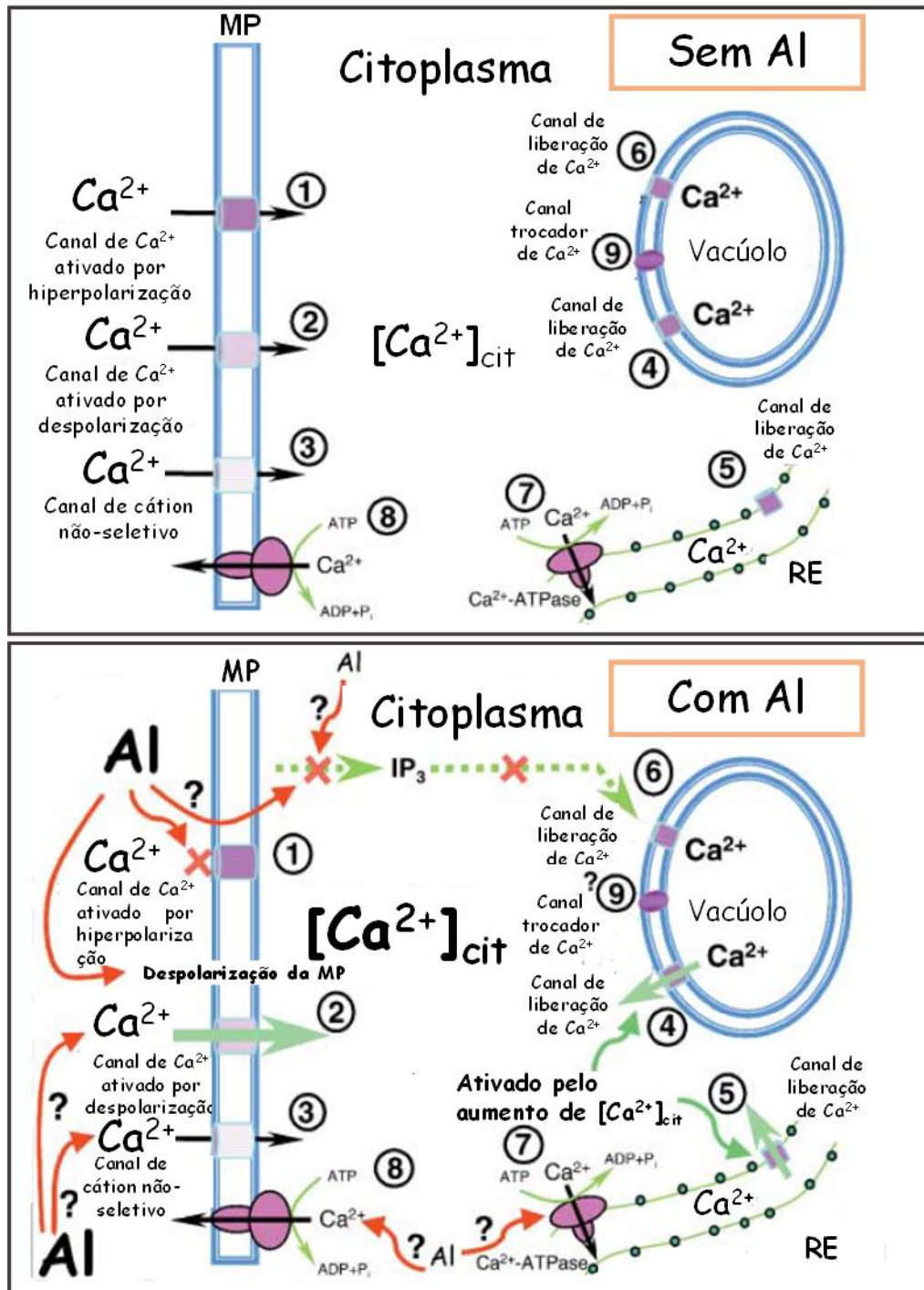


Figura 2. Diagrama esquemático mostrando os processos influenciados por Al e fontes de Ca^{2+} pelo aumento da atividade de Ca^{2+} citoplasmático nos estágios iniciais de estresse por Al (adaptado de Rengel e Zhang 2003).

Li e colaboradores (2011), mostraram que em leveduras, a toxidez por Al é mediada por sinais de Ca^{2+} e que a Ca^{2+} -ATPase vacuolar, Pmc1p, possui um papel importante na tolerância ao Al. Em *S. pombe*, a toxicidade do Al induz uma desregulação no transporte de Ca^{2+} , sendo observado um acúmulo de Ca^{2+} citosólico, uma redução no transporte de Ca^{2+} ATP-dependente no retículo e no

envelope nuclear, porém, em vesículas de outras organelas da via secretória é observado um aumento de tal transporte. Além disso, a exposição ao Al induz ao aumento dos níveis de Cta4p (Palma, 2011).

Cta4p é uma ATPase tipo P (sub-família P5A) localizada nas membranas nucleares e no retículo endoplasmático da *S. pombe* (Okorokova-Façanha et al., 2002). Os genes que codificam para P5A-ATPases estão bem conservados entre os organismos eucariontes, apresentando homólogos conhecidos em *D. melanogaster* (CG6230), *S. cerevisiae* (SPF1), *A. thaliana* (MIA), além de mamíferos (ATP13A1) (HomoloGene-NCBI), dentre outros (Okorokova-Façanha et al., 2016). Até a década passada, o substrato específico transportado por esta ATPase era de caráter desconhecido. Entretanto, evidências bioquímicas demonstram o envolvimento direto da Cta4p no transporte de Ca^{2+} para o retículo endoplasmático (Lustoza et al., 2011), enquanto as evidências genéticas indiretas apontam no envolvimento em transporte de Mn^{2+} . É interessante notar que a deleção de Cta4p no retículo de *S. pombe* induz efeitos similares no transporte de Ca^{2+} e na morfologia celular vistos em células expostas ao Al (Palma, 2011), sugerindo vias comuns de resposta ao estresse de retículo induzido por ambas as condições.

Além dos efeitos no transporte do Ca^{2+} , a resposta ao Al também parece envolver calmodulina e calcineurina, que participam na sinalização de Ca^{2+} . A calmodulina age como um sensor de Ca^{2+} para mediar diversos sinais e ativar proteínas quinases calmodulina-dependentes bem como ativar a atividade da calcineurina, uma fosfatase Ca^{2+} -calmodulina dependente (Zhang et al., 2016). Tanto a calmodulina quanto a calcineurina possuem um papel importante na tolerância a diferentes estresses (Kraus e Heitman, 2003; Juvvadi et al., et al., 2014).

Em *Rhodotorula glutinis* e *C. humicola*, leveduras resistentes ao Al, inibição severa do crescimento celular foi observada em condição de estresse ao Al somado ao tratamento com inibidor de calmodulina ou ao inibidor de calcineurina (Tani et al., 2010; Zhang et al., 2015, 2017). Além disso, sob estresse ao Al, ocorreu um aumento da expressão de calmodulina (Zhang et al., 2016), e a subunidade catalítica da calcineurina (subunidade A) e sua interação com a calmodulina foi regulada positivamente (Zhang et al., 2017). Esses dados demonstram uma

modulação na cascata de sinalização do Ca^{2+} por exposição ao Al. Ainda, foi observado que as células transgênicas de levedura expressando a subunidade catalítica da calcineurina têm maior potencial em desenvolver a resistência ao Al, provavelmente através do mecanismo de absorção de Al pelas células (Zhang et al., 2017).

2.5. Efeito do Al na homeostase de H^+

Os prótons participam de uma gama de processos fundamentais, como a regulação do pH citoplasmático, acidificação de organelas, além da formação e a manutenção do gradiente eletroquímico através da membrana, que serve como uma força motora para sistemas secundários de transporte de íons, aminoácidos e açúcares. A homeostase de H^+ é mantida pela atividade coordenada de diferentes transportadores, sendo as principais ATPases proteônicas do tipo P, V e F, que são capazes de transportar prótons através das membranas contra o seu gradiente eletroquímico, usando a energia da hidrólise do complexo ATP-Mg (Nelson, 1992).

Os mecanismos clássicos de tolerância aos metais em plantas envolvem a translocação do metal para compartimentos celulares, como vacúolo, ou seu bombeamento para o meio extracelular (Singh et al., 2016) As H^+ -ATPases funcionam como sistemas primários gerando um gradiente eletroquímico ao transportar o H^+ íon contra seu gradiente de concentração (Serrano et al., 1986; Sze et al., 1999). A força próton-motriz gerada é utilizada pelos transportadores secundários para energizar e regular o transporte de nutrientes para o interior das células assim como exsudar os íons tóxicos ou compartimentalizá-los em vesículas específicas dentro das células de fungos e plantas (Morsomme e Boutry, 2000).

Em plantas e fungos as H^+ -ATPases de membrana plasmática (P- H^+ -ATPase) são os principais sistemas de transporte primário que translocam H^+ do citosol para fora da célula gerando o gradiente eletroquímico de H^+ na membrana celular. Nas plantas, essa enzima também fornece um ambiente ácido na parede celular que é favorável à ação de enzimas que promovem a expansão e o crescimento celular (Rayle e Cleland, 1992; Haruta et al., 2015). Além disso, as P- H^+ -ATPases possuem também diversas outras funções, incluindo regulação do pH citoplasmático e participação nas respostas de tolerância à salinidade (Serrano, 1989; Nelson e Harvey, 1999; Portillo, 2000).

Todas as P-H⁺-ATPases apresentam estrutura simples, sendo um peptídeo em torno de 100 kDa, que contém regiões altamente conservadas, especialmente o sítio de ligação do ATP e de fosforilação catalítica (Pedersen e Carafoli, 1987; Fagan e Saier, 1994). Dois genes codificando P-H⁺-ATPases, *PMA1* e *PMA2*, foram inicialmente identificados em *S. cerevisiae* (Serrano, 1984; Schlessler et al., 1988) e *S. pombe* (Ghislain e Goffeau, 1991), seguindo a clonagem de H⁺-ATPase de planta (Harper et al., 1989). A P-H⁺-ATPase parece ser regulada mais efetivamente ao nível pós-traducional, principalmente pelo aumento do acoplamento entre o transporte de H⁺ e a hidrólise de ATP, sugerindo que esta enzima pode responder mais rápido aos desafios impostos pelo ambiente (Gaxiola et al., 2007).

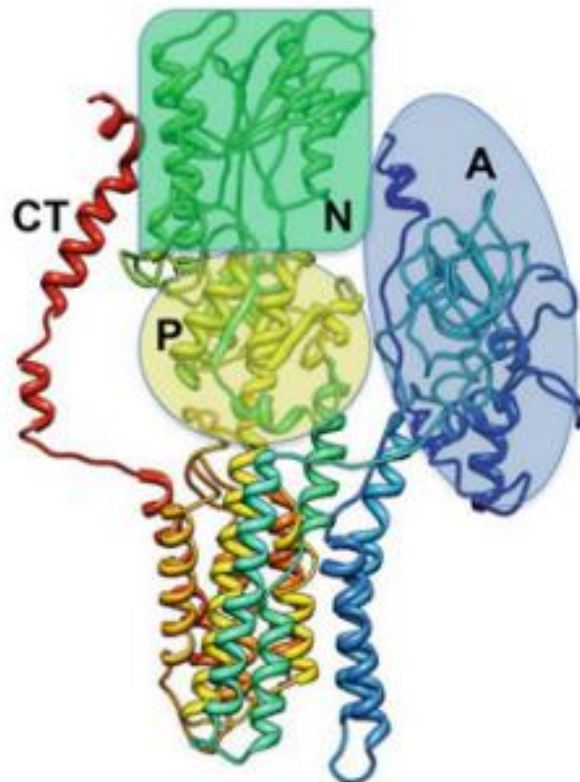


Figura 3. Imagem estrutural da H⁺-ATPase Pma1 de levedura demonstrando a localização do domínio ativador citosólico (A), domínio de ligação de nucleotídeo (N) e domínio de fosforilação (P). A porção regulatória C-terminal (CT) está em vermelho (Adaptado de Kane, 2016).

As H⁺-ATPases vacuolares (V-ATPases) são as mais complexas dentre as três bombas de H⁺ (P-H⁺-ATPase, V-H⁺-ATPase e F-ATPase), compartilhando características semelhantes à sua ancestral F-ATPase (Nishi e Forgac, 2002;

Gaxiola et al., 2007). As V-ATPases apresentam múltiplas subunidades distribuídas em dois domínios: o complexo citoplasmático V_1 , que por sua vez é composto por oito subunidades (A; B; C; D; E; F; G; H) e é responsável pela hidrólise do ATP; o complexo transmembranar V_o , composto por seis subunidades (a; c; c'; c"; d; e) e é responsável pela translocação do H^+ (Gaxiola et al., 2007). Essas bombas são localizadas no tonoplasto e outras endomembranas, como endossomos, lisossomos, complexo de Golgi, retículo endoplasmático (RE) e vesículas secretórias (Beyenbach e Wieczorek, 2006; Forgac, 2007; Samarão et al., 2009).

A demanda de armazenamento de metabólitos no vacúolo requer maior atividade das V-ATPases localizadas no tonoplasto, logo estas enzimas são essenciais para a sobrevivência da célula, assim como para o processo de expansão celular, tolerância a estresses, armazenamento de nutrientes, entre outros (Gaxiola et al., 2007; Ekkehard et al., 2014). As V- H^+ -ATPases são de grande importância na regulação do balanço osmótico além de apresentarem um papel essencial para o acúmulo e estocagem de cátions, como o Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} (Harvey, 1992). Por exemplo, estudos *in vitro* mostraram que o Ca^{2+} é transportado para o vacúolo pelo antiporter Ca^{2+}/H^+ usando a força motriz criada pela H^+ -ATPase vacuolar (Ohsumi e Anraku, 1983).

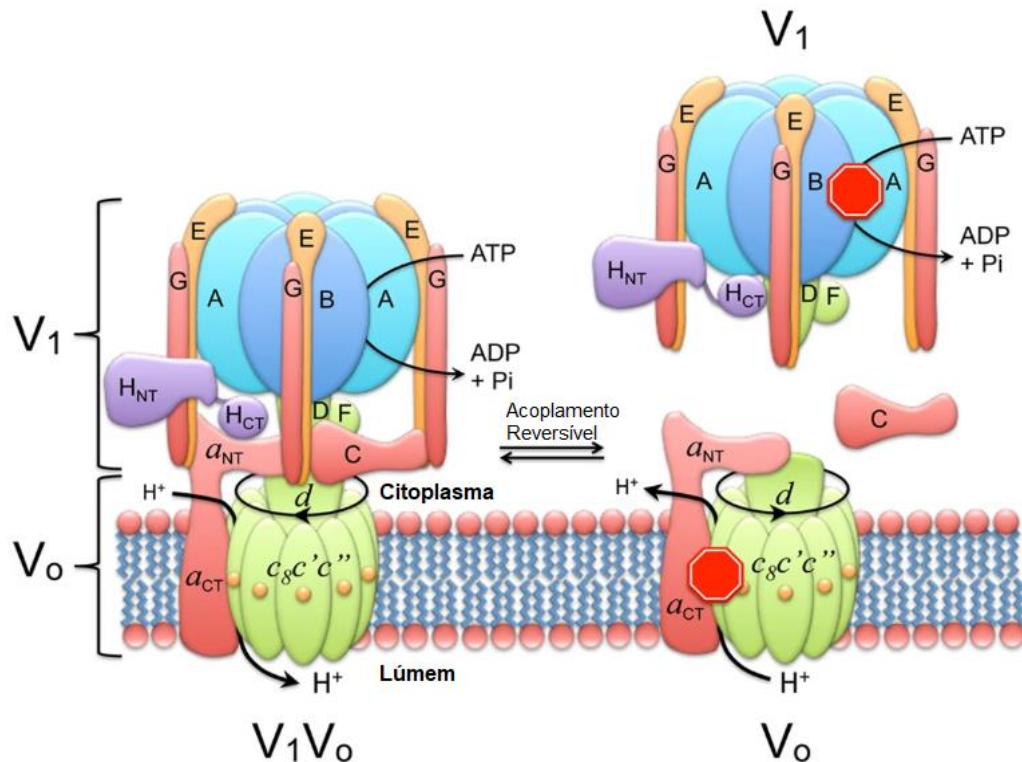


Figura 4. Regulação da atividade da V-ATPase através do acoplamento reversível dos domínios V_1 e V_0 . Em verde subunidades rotatórias ($DFc_8c'e''$), em laranja o complexo estator ($(EG)_3CH\alpha$) e em azul o hexâmetro catalítico (A_3B_3). O octógono em vermelho representa a inibição da hidrólise de ATP e do transporte de H^+ devido ao desacoplamento reversível dos domínios V_1 e V_0 (Adaptado de Couch-Cardel et al., 2016).

Em células de raízes expostas ao Al, foi observada uma diminuição da corrente negativa na superfície da célula, correlacionada com o declínio da atividade das H^+ -ATPases de membrana plasmática (Ahn et al., 2001; Ahn, 2002). A exposição ao Al em *Arabidopsis* tolerantes a esse metal (*alr-104*) induziu aumento de duas vezes no influxo de H^+ nas pontas das raízes resultando em um aumento do pH superficial (Degenhardt et al., 1998), o qual, possivelmente, precipita o Al na solução do solo, inibindo a sua entrada na raiz. É importante notar que, a ruptura do gradiente H^+ induzida pelo Al, conseqüentemente, pode influenciar de forma inevitável o estado e a homeostase iônica das células radiculares, uma vez que, como já citado, tal gradiente atua como a principal força motriz no transporte de íons secundários (Gupta et al., 2013).

Em leveduras, a modulação das H^+ -ATPases por exposição ao Al ainda é pouco documentada. Em *Yarrowia lipolytica*, a exposição ao Al foi capaz de estimular a P- H^+ -ATPase (Lobão et al., 2007), em contrapartida, em *S. cerevisiae*

essa enzima foi inibida (Hamilton et al., 2001a). É possível que a modulação da atividade dessa enzima dependa da concentração de Al. Mutantes da V-H⁺-ATPase são hipersensíveis à toxidez do Al, sugerindo que esta enzima seja requerida para a resistência a este metal (Hamilton et al., 2001a). No entanto, até onde se tem conhecimento, não há evidências bioquímicas sobre regulação da atividade de V-H⁺-ATPase por Al em leveduras.

2.6. Estresse oxidativo induzido por Al

Diversos fatores, entre eles o estresse a metais, podem causar alterações em funcionalidade normal da mitocôndria, que leva ao subsequente desequilíbrio na produção de ERO (Lin e Beal, 2006). Em níveis ideais, ERO atuam principalmente como moléculas de sinalização, regulando assim o processo de crescimento, desenvolvimento e defesa nas plantas, mas sua maior produção pode interferir com o metabolismo celular (Gupta et al., 2013).

Uma das primeiras respostas à toxidez ao Al é o acúmulo exacerbado de ERO e peroxidação de lipídios (Meriga et al., 2004; Wang e Yang, 2005). O desequilíbrio sistêmico de ERO induzido pelo Al e alteração nas propriedades da parede celular foram propostos como os dois fatores intrínsecos responsáveis pela toxicidade do Al nas plantas.

O Al em si não é um elemento de transição, mas atua como catalisador na geração de EROs que levam ainda mais ao estresse oxidativo nas plantas (Tamás et al., 2003; Gupta et al., 2013). Sabe-se que os íons Al formam uma ligação eletrostática, presumivelmente com ligantes doadores de oxigênio, como carboxilato e pectina da parede celular, e a superfície externa da membrana plasmática parece ser o principal alvo da toxicidade do Al (Yamamoto et al., 2001)

A alta capacidade de sequestrar ERO pela ativação de um sistema antioxidativo pode resultar em um aumento à tolerância ao Al por enzimas antioxidantes, uma vez que estas enzimas e outros metabólitos antioxidantes auxiliam na remoção do excesso de ERO, e assim, a inibição da peroxidação de lipídios (Wang e Yang, 2005). A elevação dos níveis de ROS causada por estresse ao Al ativa a expressão de genes relacionados às enzimas antioxidantes como superoxi-desmutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e glutathione-S-

transferase (GST) (Ahn et al., 2004; Ezaki et al., 2004), conferindo uma tolerância ao Al. Em *S. pombe* cultivadas com Al há um acúmulo de ROS, enquanto as células cultivadas na ausência de Al apresentam níveis de ROS praticamente indetectáveis (Palma, 2011)

As interações entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e sinalização de Ca^{2+} podem ser consideradas bidirecionais, em que a ERO pode regular a sinalização celular de cálcio, enquanto a sinalização de Ca^{2+} é essencial para a produção de ERO (Gordeeva et al., 2003). A interação mútua e a comunicação de ERO e Ca^{2+} são altamente dependentes dos tipos de células e tecidos (Görlach et al., 2015). A toxicidade de Al altera significativamente as funções respiratórias mitocondriais e altera o status redox nas células do tabaco (Yamamoto et al., 2002). O efeito causado pelo ERO e Al, induz a expressão de vários genes que codificam enzimas antioxidantes, como a glutathiona S-transferase, peroxidase e superóxido dismutase (SOD) (Panda et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estabelecer as inter-relações funcionais entre transportadores de membrana de Ca^{2+} e H^+ durante o estresse de Al e explorar a possibilidade de que Al induza a disfunção do vacúolo por indução do estresse do retículo endoplasmático, usando *S. pombe* como modelo.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da exposição ao Al ou ausência de Cta4 ATPase no(a):

- Características ultraestruturais das células;
- Morfologia dos vacúolos
- Atividade das bombas de prótons do tipo P e V;
- Expressão relativa de genes relacionados à homeostase de Ca^{2+} e H^+ ;

Investigar a Interação física e funcional das proteínas envolvidas na homeostase de Ca^{2+} e H^+ .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cepas de leveduras, manutenção e cultivo

As cepas de *Schizosaccharomyces pombe* utilizadas neste estudo foram do tipo selvagem Fy1180 (h^+ otr1R (SphI) :: *ade6⁺ ura4-D18 leu1-32 ade6-M210*) e a linhagem mutante Hu285 com deleção do gene que codifica para Cta4p (h^+ *cta4* :: *ura4⁺ ura4-D18 leu1-32 ade6-M216*) (Okorokova-Façanha et al., 2002). As cepas foram mantidas rotineiramente em placas de Petri contendo meio sólido YES (3% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 2% de ágar) suplementado com histidina, uracila, leucina, adenina, arginina (75 mg/L cada), com repiques a cada 3 meses. Para culturas líquidas, as células foram cultivadas em meio YES ajustado para pH 4,5 com HCl. O pH do meio líquido YES sem ajuste é 5,8. As culturas no meio líquido foram inoculadas a um $A_{600} = 0,001$ e cultivadas a 30°C em agitador rotativo a 250 rpm. Para estudo de estresse de Al em células Fy1180, a solução estoque de $AlK(SO_4)_2 \times 12 H_2O$ (Sigma) foi esterilizada por filtração (filtro estéril de 0,22 μm) e adicionada ao meio de crescimento até uma concentração de 0,5 mM.

4.2. Efeito do Al na morfologia celular

O efeito de Al na morfologia celular foi analisado usando a microscopia eletrônica de varredura conforme descrito por (Cogo *et al.* 2018). As células foram centrifugadas e fixadas em 2,5% de glutaldeído, 4% de formaldeído em 0.1 M tampão de fosfato (pH 7.2) por 24 h em baixa temperatura (5-6 °C). A pós-fixação ocorreu por 2 h em temperatura ambiente com 1% de tetróxido de ósmio. A desidratação inicial foi contemplada colocando as células de levedura em um

gradiente de etanol: 50% e 70% (duas vezes por 10 min), 95% (duas vezes por 5 min) e 100% (duas vezes por 1 min), respectivamente. Após, as amostras foram desidratadas com acetona (duas vezes por 30 s). As amostras foram secas pelo método do ponto crítico com CO₂ em um CPD-030 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein). Em sequência as amostras foram cobertas com ouro (20 nm) utilizando um pulverizador (SCD 050, BAL-TEC) e examinadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura (DSM 962 EVO 40, Zeiss).

4.3. Marcação de vacúolos

As células de levedura foram cultivadas em meio YES, pH 4,5, coletadas através de centrifugação e incubadas com marcador fluorescente verde MDY-64 (Molecular Probes) por 15 min em temperatura ambiente. As células e vacúolos foram visualizados no microscópio confocal LSM-710-ZEISS (Zeiss, Hamburgo, Alemanha), acoplado a uma câmera de vídeo e ao software Zenblue v.3.1. Foram observadas pelo menos 50 células por amostra para a determinação do número de vacúolos.

4.4. Isolamento das membranas totais de *S. pombe*

O volume do pré-inóculo adicionado em 800 mL do meio YES foi calculado considerando o tempo de dobra das cepas de *S. pombe*, de acordo com a curva de crescimento. As leveduras foram inoculadas em meio YES e cultivadas a 30°C e 250 rpm em agitador orbital horizontal (Innova, New Brunswick). Após atingir a metade da fase logarítmica (OD₆₀₀ ≈ 2), seguiu-se com o isolamento das membranas totais de *S. pombe*.

O isolamento de membranas celulares foi realizado seguindo o protocolo descrito por Lustoza *et al.* (2011), com algumas modificações. As células foram transferidas para tubos de centrífuga, centrifugadas a 5000 rpm por 5 min, lavadas em solução de sorbitol 1,2 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,4, EDTA 10 mM, β-mercaptoetanol 30 mM em temperatura ambiente por 10 min e centrifugadas novamente a 3000 x g por 5 min a 4 °C. As células foram para mais uma lavagem em solução de sorbitol 1,2 M, NaH₂PO₄ 0,05 M, ácido cítrico pH 5,8 (solução padrão) e coletadas a 3000 x g por 5 min a 4 °C.

As células foram ressuspensas em solução padrão contendo enzima lítica de *Trichoderma* e incubadas a 37 °C em banho-maria, com agitação, a fim de obter

os esferoplastos. Os esferoplastos foram transferidos para tubos de centrífugas contendo solução sorbitol 1,4 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,2 e coletados a 3000 x g por 5 min a 4 °C. Os esferoplastos foram ressuspensas em tampão de lise (12,5% sacarose, Tris-HCl 20 mM pH 7,4), homogeneizados no *potter* e centrifugados a 3000 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi submetido a uma última centrifugação, dessa vez a 45000 x g por 45 min a 0 °C, para a obtenção das membranas totais. As membranas foram homogeneizadas em tampão de lise, aliquotadas e armazenadas a -70 °C para posterior análises.

4.5. Atividade das H⁺-ATPases de membrana plasmática e vacuolar

Para a obtenção da formação do ΔpH proveniente do funcionamento de V-H⁺-ATPase e P-H⁺-ATPase, utilizamos uma sonda fluorescente ACMA (Okorokov and Lichko 1983). Dessa forma, foi utilizada um tampão de incubação contendo MgSO₄ 2,5 mM, KCl 20 mM e solução de MOPS-KOH (12,4% de sacarose, 20 mM Tris-HCL, pH 7,4) em volume necessário para completar 2,0 mL de volume final, 3 μL de ACMA 1 mM (dissolvido em etanol) e proteína com volume variando entre 20 e 90 μL, dependendo da atividade apresentada, de modo que a amplitude máxima (F_{máx}) não ultrapasse o valor de 50%.

Após a estabilização da fluorescência, 1 mM de ATP pH 7,2 foi adicionado, observando a diminuição da fluorescência do ACMA em fluorímetro, nos comprimentos de onda de excitação 415 nm e emissão em 485 nm aberta de 5 nm/10 nm. O decaimento da fluorescência do ACMA reflete a formação de um gradiente de prótons resultante do transporte ATP-dependente para lúmen das vesículas membranares. Após atingir o equilíbrio entre efluxo e influxo de prótons, foi adicionado 0,02 M de NH₄Cl para dissipação do gradiente eletroquímico de H⁺protônico que foi estabelecido. Para definir a atividade de P e V-H⁺-ATPase foi efetuado o mesmo procedimento, entretanto, com adição dos inibidores específicos, 100 μM de vanadato e 5,75 μM de concanamicina A, respectivamente, ao tampão de incubação.

A partir dos dados e gráficos obtidos das análises, monta-se uma curva de ΔpH a fim de determinar fluorescência máxima (F_{max}) e velocidade inicial (V₀) em cada fração de membrana.

Utiliza-se a seguinte fórmula:

$$V_0 = [F_0 / (F_{\text{máx}} * t)] * 100$$

onde:

V_0 : velocidade inicial de formação do pH;

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

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

t : tempo em minutos;

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

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

4.6. Determinação do conteúdo de proteínas

A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando 10 a 15 μL de amostra de vesículas de membrana isoladas de células de levedura (conforme descrito em 4.4), com várias diluições, e usando BSA nas concentrações de 0 a 10 μg como curva padrão.

4.7. PCR em Tempo Real

O RNA total foi extraído das células de *S. pombe* cultivadas por 21 h com o RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. O RNA total da levedura foi tratado com DNase (AMPD1 Sigma-Aldrich), a fim de eliminar a contaminação do DNA genômico. A pureza e a concentração do RNA extraído foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop One / OneC), e 2 μg de RNA total foram usados para transcrição reversa em um volume final de 20 μL usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de expressão foram analisados pelo sistema de PCR em tempo real StepOne PlusTM (Thermo Fisher Scientific) em um volume final de 12 μL contendo 6 μL de PCR Master Mix Power SYBR (Thermo Fisher Scientific), 450 nM de cada par de oligonucleotídeos e 1:10 de diluição de cDNA (Tabela 1). As condições de PCR foram as seguintes: um ciclo inicial a 95 °C por 10 min; seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por um min; no final, foi incluído uma análise da curva de *melt* e a fluorescência foi medida de 60 a 99 °C (cada amostra foi analisada em duplicata). Os níveis relativos de mRNA foram quantificados usando o método de limiar de ciclo comparativo ($\Delta\Delta\text{Ct}$) e

normalizados pela expressão do gene de actina (*act1+*) e usando Fy1180 como referência (fórmula de $2^{\Delta\Delta Ct}$).

Tabela 1. Sequências de primers utilizados no PCR em tempo real e seus respectivos tamanhos

Gene	Gene ID	Proteína codificada	Sequência (5'-3')	Tamanho amplicon (bp)
<i>pma1+</i>	2542664	P-type proton ATPase	F: CTCCTCAACAACCCGCTCAT	131
			R: GGGGGCATCATCATTGTCCT	
<i>pma2+</i>	2539012	P-type proton ATPase	F: TATGCCGTGCTCAGATCCAC	100
			R: AACCGCATCACCAGTAAGCA	
<i>vph1+</i>	2542310	V-type ATPase V0 subunidade a	F: ATTCATCAAGTGCGGGCTGA	91
			R: GAGTACCGTGGGCGATAACC	
<i>vma2+</i>	2543408	V-type ATPase V1 subunidade B	F: AATGCCTCTTTTTAGACCTCCTT	101
			R: TCAAAGAGCGACGCCATGTT	
<i>vma5+</i>	2543469	V-type ATPase V1 subunidade C	F: TGCTCACCTTTTCCCTCCAC	112
			R: AGAGGGGTCTGACAACGAGT	
<i>vma13+</i>	2541906	V-type ATPase V1 subunidade H	F: TGCCTTTGGTCCTGCTTTCT	130
			R: AACGGAGCACGGTGAAGAAG	
<i>cam1+</i>	2543039	calmodulina	F: TCATCCGCCGTTTAGTGTT	147
			R: GACTACCGTTGTCGCTTCCT	
SPCC830.06	2538786	subunidade regulatória de calcineurina	F: TGGCTCTATTGACCGAAACGA	99
			R: CCTCCACCGTCTTCGTCTAC	
<i>ppb1+</i>	2540024	subunidade catalítica de calcineurina	F: CGGGAAGGCCGTTTATCTGA	114
			R: ACCGCATACAGTGACAGGTG	
<i>act1+</i>	2540051	actina	F: ACTACCGCCGAACGTGAAAT	103
			R: GGGAGGAAGATTGAGCAGCA	
<i>pmc1+</i>	2543477	Ca ²⁺ -ATPase vacuolar SPAPB2B4.04c	F: GGCGCAAATCCACCATTACAA	150
			R: CGGCACTCAAAGAATCAACAAA	
<i>cta4+</i>	2542381	P5A-type ATPase	F: GCGATGCTTCTAACGATGCG	101
			R: CATGGGGTCACCAACGACTT	
<i>pgr1+</i>	2540156	glutathione reductase	F: CGCATATTCCAGGAGCGGAA	92
			R: ACCAGCACCAACGATAGCAA	
<i>gst1+</i>	2538694	glutathione S-transferase Gst1	F: TCTTTGCCTCGTGACCATCC	94
			R: ATCCAGCCTGTCCCAAATG	
<i>gst2+</i>	2539601	glutathione S-transferase Gst2	F: TGATGGTTGCGGCTTCAGTT	147
			R: GCAACAGGGAAGAACGAACG	

<i>gst3⁺</i>	2543479	glutathiona S-transferase Gst3	F: TGCATGTCGAATTGCTGCTG	92
			R: GAGGAGGGGTAGGGGGATG	
<i>ctt1⁺</i>	2539418	catalase	F: ATGAAGAAGCCGCTGCATTG	96
			R: GCGTCCAACCTGGGGTAATCA	

4.8. Análise STRING de interação proteína-proteína

Uma rede PPI pode ser descrita como um sistema complexo de proteínas conectadas por interações. A plataforma STRING (<https://string-db.org>; Szklarczyk et al., 2019) foi utilizada a fim de obter uma visualização mais profunda das interações entre as proteínas envolvidas na homeostase do H⁺ e Ca²⁺ em *S. pombe* com base nos dados de PPI. STRING usa interações físicas e associações genéticas e funcionais para analisar um conjunto definido de proteínas e expandi-lo, incluindo as proteínas associadas. Para uma ampla observação dos níveis de interação entre proteínas, foram realizados testes nos níveis de confiança 0,9 (mais alto), 0,7 (alto) e 0,4 (médio). Dentre as proteínas analisadas, incluímos Pma1p e Pma2p, as H⁺-ATPases de membrana plasmática do tipo P, subunidades da V-H⁺-ATPase Vph1p, Vma2p, Vma13p e Vma5p; Ca²⁺-ATPase vacuolar Pmc1p, Ca²⁺-ATPase de RE/Golgi Pmr1p, Cta4 ATPase, além de outras proteínas responsáveis pela homeostase/sinalização de cálcio, como calmodulina, calcineurina e trocadores Ca²⁺/H⁺.

4.9. Análise estatística

Os dados foram analisados no GraphPad Prism versão 7.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como valor médio de pelo menos três experimentos independentes. Para detectar diferenças estatisticamente significativas, ANOVA seguida pelos testes de Bonferroni; precedido por análise de teste *t* único entre tratamentos.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do estresse induzido por Al e ausência de Cta4 ATPase na fragmentação vacuolar e celular.

Para averiguar se Al interfere no funcionamento do vacúolo, foi analisada fragmentação vacuolar. Para isso, as membranas vacuolares foram marcadas com a sonda MDY-64. Em células de *S. pombe* do tipo selvagem, o número médio de vacúolos foi dois, com algumas exceções apresentando três vacúolos. Curiosamente, as células de levedura de fissão sob estresse por Al, bem como as células com deleção do gene *cta4⁺*, exibiram múltiplos vacúolos pequenos.

Sob estresse de Al, o vacúolo se fragmentou, com uma média de seis vacúolos contáveis. A deleção de *cta4⁺* resultou em vacúolos altamente fragmentados, com uma média de oito vacúolos (Figura 5).

Além disso, tanto o tratamento com Al quanto a deleção da *cta4* ATPase demonstraram deformidades morfológicas nas células, possivelmente provenientes das alterações na polaridade e formação do citoesqueleto, ocasionando em células multiseptadas e/ou alongadas (Figura 6).

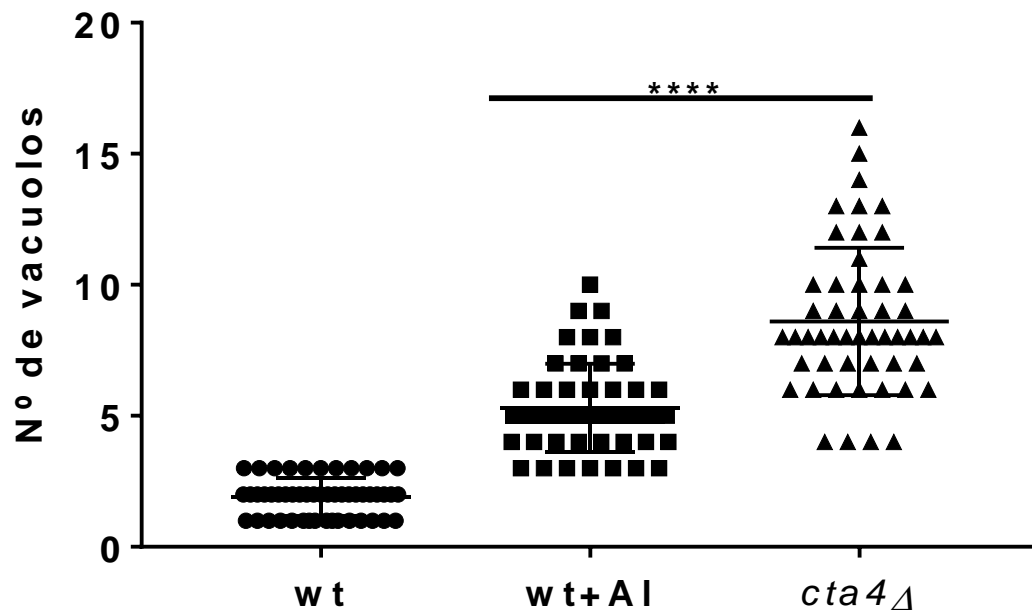


Figura 5. Quantificação de vacúolos nas células de *S. pombe* do tipo selvagem (Fy1180) cultivadas com ou sem 0,5 mM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ e células mutante *cta4Δ*, após o cultivo em meio YES, pH 4,5, durante 21 h. As células foram incubadas com o marcador vacuolar MDY-64, visualizadas sob microscopia de fluorescência e o número de vacúolos foi contado. Os dados mostrados são representativos do número de vacúolos contados nas células de levedura (n = 50).

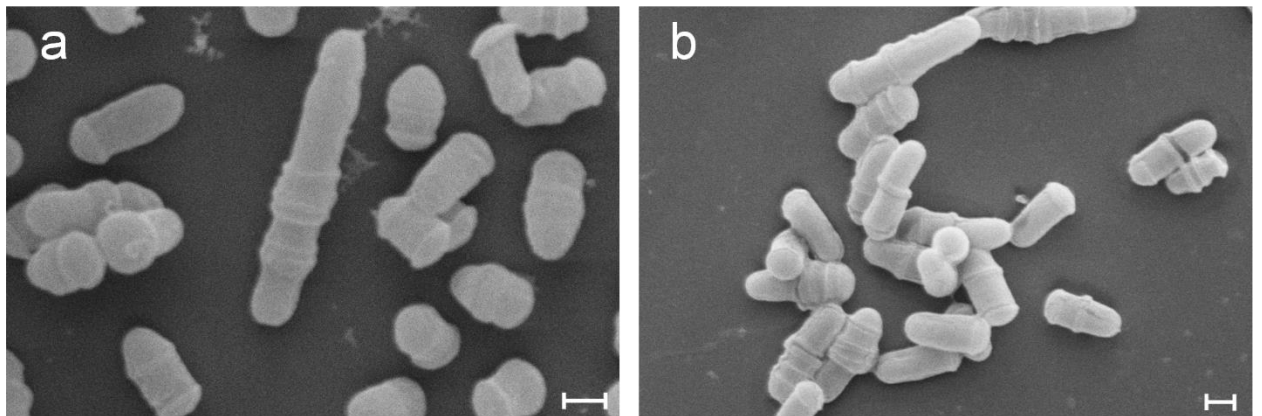


Figura 6. Micrografia eletrônica de varredura de células Fy1180 na presença de 0,5 mM de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ (a) e células mutantes *cta4Δ* (b) crescidas em meio YES, pH 4,5 durante 21 h. Barra de escala: 2 μm .

5.2. Efeito do Al na atividade de H⁺-ATPases em *S. pombe*

A atividade da H⁺-ATPase do tipo P e V foi investigadas como um potencial alvo do efeito pleotrópico da toxicidade do Al. Foi observado que 0,5 mM de AlK(SO₄)₂ pode prejudicar a energização das membranas de levedura por inibição do transporte de H⁺ ATP-dependente (Figura 7).

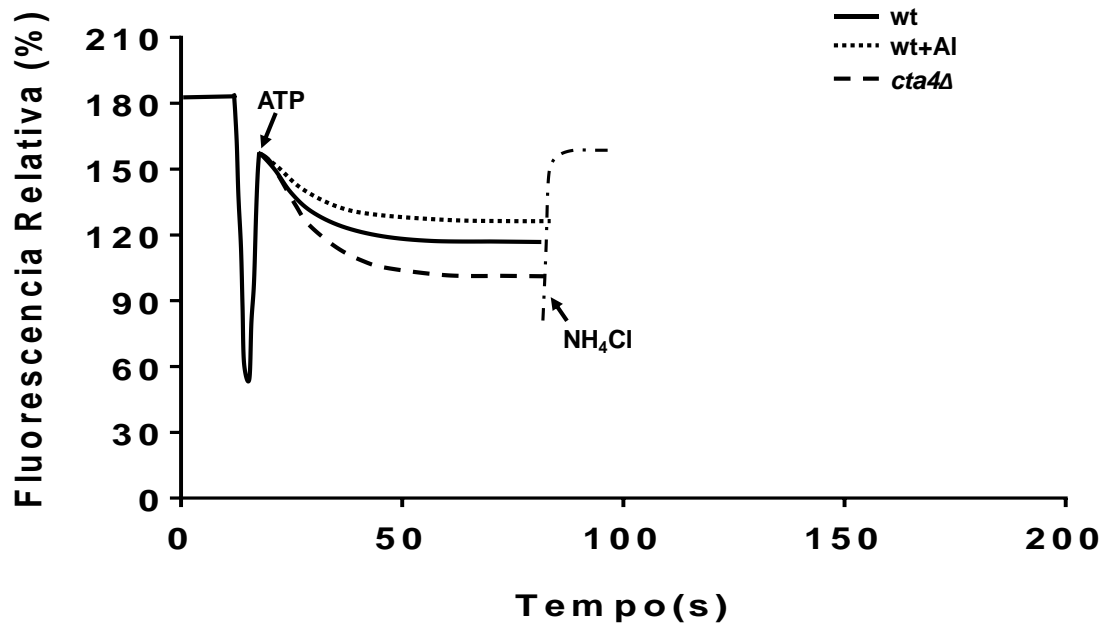


Figura 7. Energização ATP-dependente das membranas de *S. pombe*. O decaimento da fluorescência de ACMA após a adição de 1 mM de ATP (indicado por uma seta) às vesículas membranares isoladas de células Fy1180 do tipo selvagem cultivadas na ausência (Ctr, wt) ou na presença de 0,5 mM de AlK(SO₄)₂ (Al 0,5, wt+Al), e as células mutantes *cta4Δ*. Em todos os casos, 20 mM de NH₄Cl foi adicionado para dissipar o gradiente de H⁺. Os traços de fluorescência mostrados são representativos de pelo menos três isolamentos independentes de vesículas de membrana.

O uso de inibidores farmacológicos específicos das P e V-ATPases, vanadato e concanamicina A, respectivamente, revelou atividade quase não detetável das H⁺-ATPases da membrana plasmática (apenas 2-3% de inibição para as membranas do tipo selvagem e *cta4Δ*, Figura 8ac). Em contraste, a concanamicina A mostrou forte inibição do transporte H⁺ ATP-dependente (54%, 59% e 68% de inibição para membranas isoladas de células do tipo selvagem, células crescidas com Al e células de *cta4Δ*, respectivamente (Figura 8a-c).

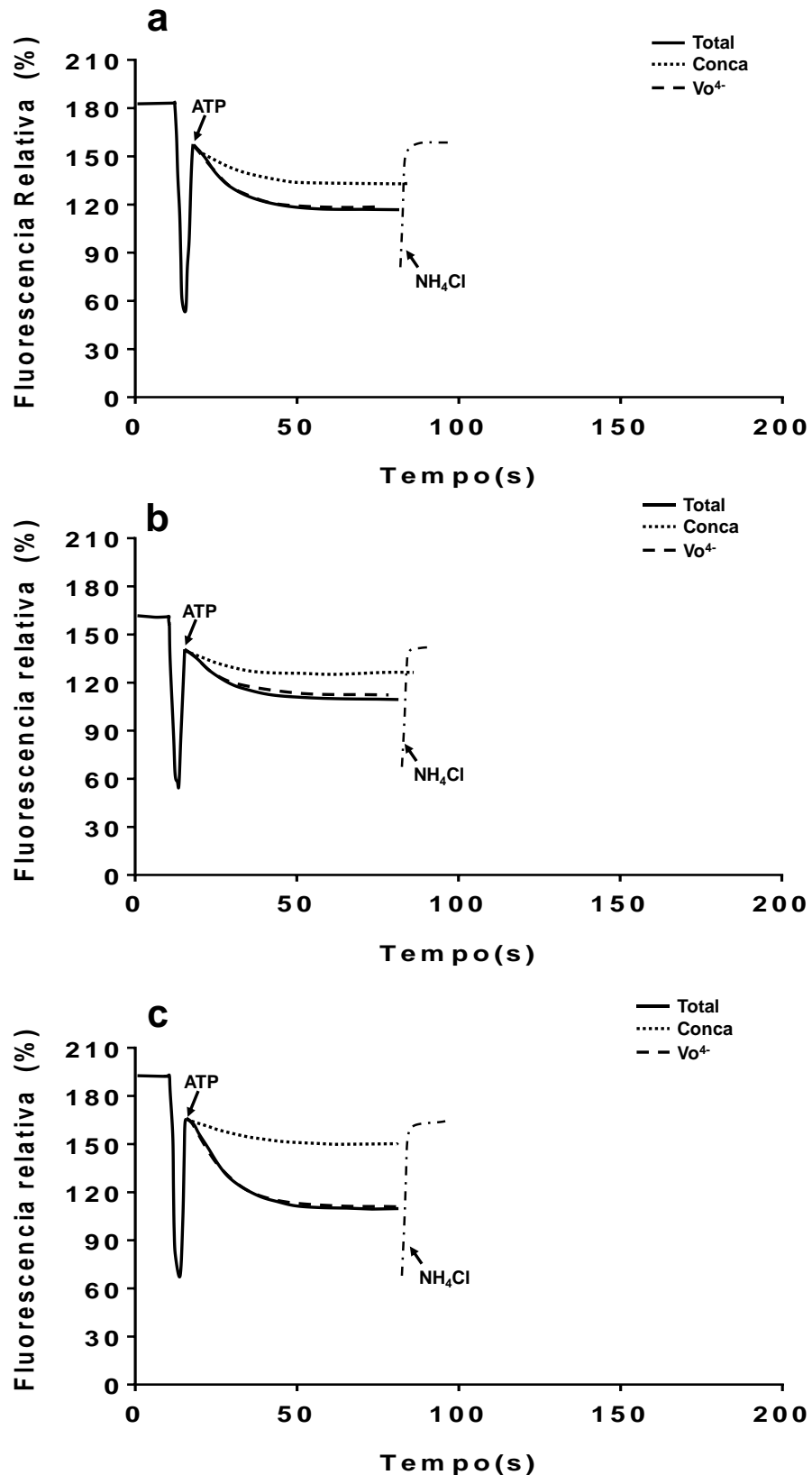


Figura 8. Formação de gradiente H⁺ ATP-dependente em vesículas de membrana isoladas das células de Fy1180 (a), Fy1180+0,5 mM Aik(SO₄)₂ (b) e *cta4Δ* (c), pré-incubadas com vanadato a 0,2 mM (VO₄³⁻) e 110 μM de concanamicina A (Conca). O transporte de H⁺ foi iniciado pela adição de 1 mM de ATP; o gradiente de H⁺ foi dissipado pela adição de 20 mM de NH₄Cl. Os dados mostrados são traços representativos de fluorescência de ACMA de pelo menos três isolamentos de membrana independentes.

A deleção da Cta4-ATPase de retículo endoplasmático (*cta4Δ*) resultou em aumento do estado estacionário e da velocidade inicial (Figura 8c) do transporte de H⁺ mediado pela V-ATPase, quando comparado à atividade de V-ATPase em membranas do tipo selvagem. Por outro lado, cultivo com 0,5 mM de AlK(SO₄)₂, levou a diminuição da velocidade inicial da V-H⁺-ATPase (Figura 8b). Todos os tratamentos mostraram-se mais sensíveis à concanamicina A do que ao vanadato (Figura 8a-c). Além de regular negativamente o desempenho da V-ATPase, 0,5 mM de AlK(SO₄)₂ aumentou sua sensibilidade ao vanadato no estado estacionário, quando comparado com o controle (Figura 9).

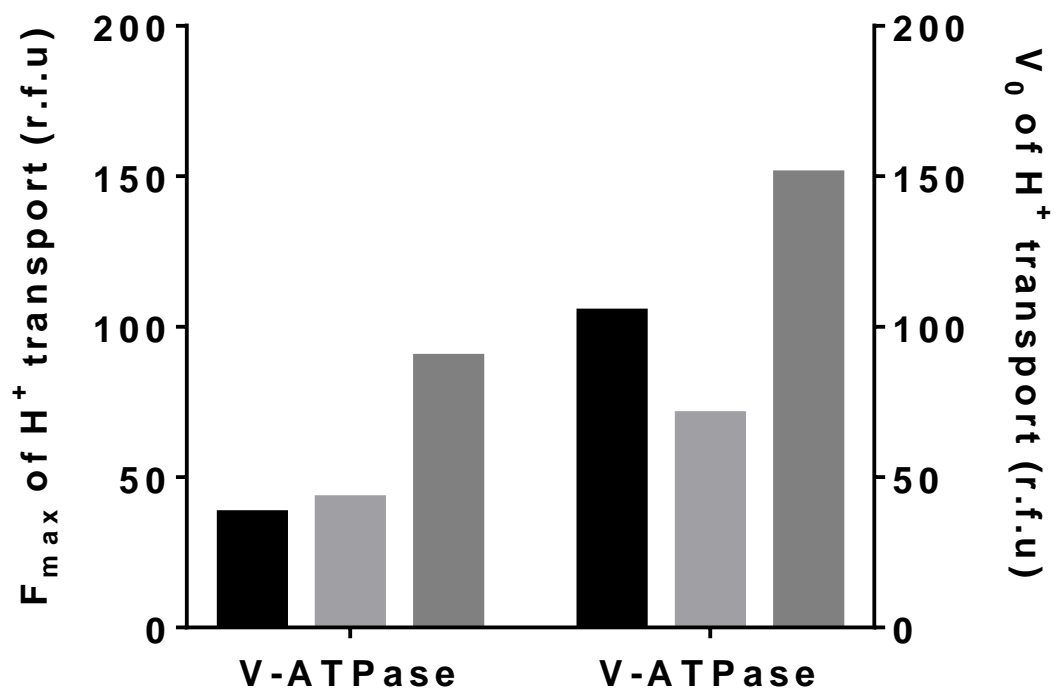


Figura 9. Amplitude máxima (F_{max}) e a velocidade inicial (V_0) de H⁺ transporte mediado por V-H⁺ ATPase em vesículas membranares isoladas de células de Fy1180 cultivadas por 21 h em meio YES, pH 4,5, com ou sem 0,5 mM AlK(SO₄)₂, e *cta4Δ*. Os dados mostrados são representativos do valor médio de experimentos independentes (n = 3).

5.3. Al regula negativamente os níveis de mRNA relacionados à homeostase do H⁺ e Ca²⁺

Em seguida, foi analisado o efeito do Al na expressão gênica em células de tipo selvagem na ausência ou presença de Al e em células mutantes *cta4Δ* (Figura 4). Para ambas as isoformas da P-H⁺-ATPase, foi observado uma diminuição na expressão relativa de mRNA em células de tipo selvagem cultivadas com 0,5 mM de AlK(SO₄)₂ e em células sem *cta4*⁺, sendo mais alterada negativamente pelo estresse por Al, -1,4 e alteração de -1,7 vezes para *pma1*⁺ e *pma2*⁺, respectivamente (Figura 10).

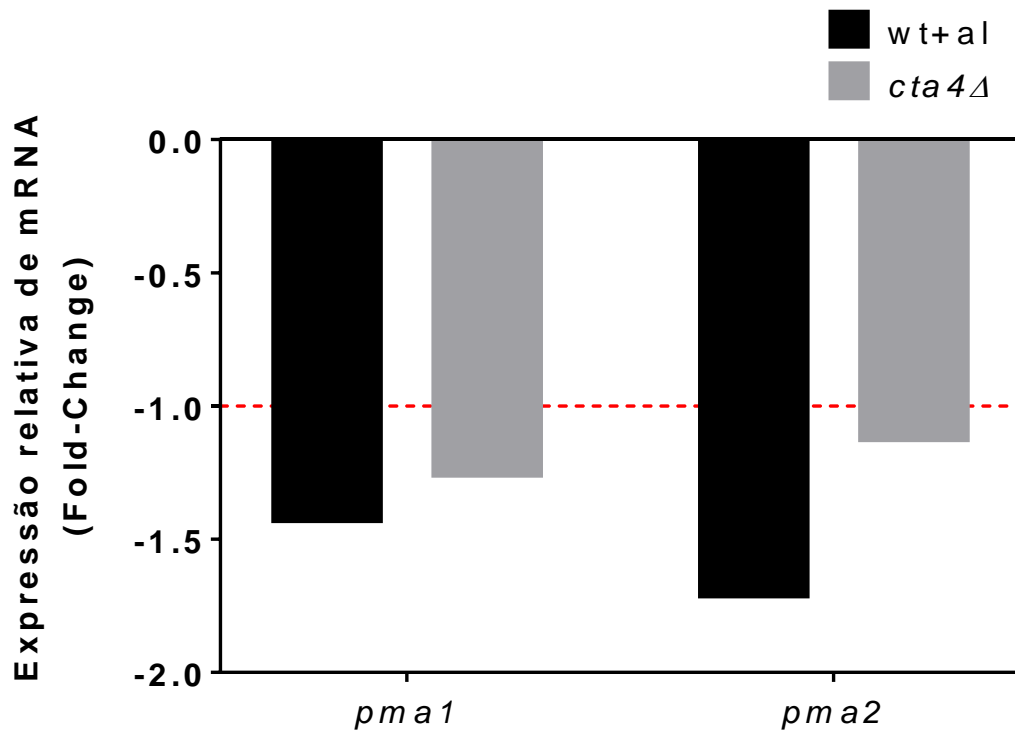


Figura 10. Expressão do mRNA das isoformas de H⁺-ATPase do tipo P. Análise de RT-qPCR em células Fy1180 com 0,5 mM AlK(SO₄)₂ e *cta4Δ* cultivadas por 21 h, em meio YES, pH 4,5. Os valores foram normalizados pelo gene de referência (*act1*⁺) e são expressos relativos à cepa do tipo selvagem Fy1180 (= 1 ou -1), representada pela linha tracejada vermelha.

Também foi observada uma regulação negativa da exposição ao AI para as subunidades da V-ATPase codificadas pelos genes *vma2⁺*, *vph1⁺*, *vma5⁺* e *vma13⁺*, onde a expressão *vma2⁺* (codificação para subunidade *B*) foi a mais alterada seguida pela *vph1* (subunidade *a*), exibindo uma diminuição de -1,5 vezes e -1,3 vezes na expressão relativa, respectivamente (Figura 11). Já a expressão do gene *vma5⁺* que codifica a subunidade *C* foi aumentada em 1,5 vezes nas células com deleção na Cta4 ATPase.

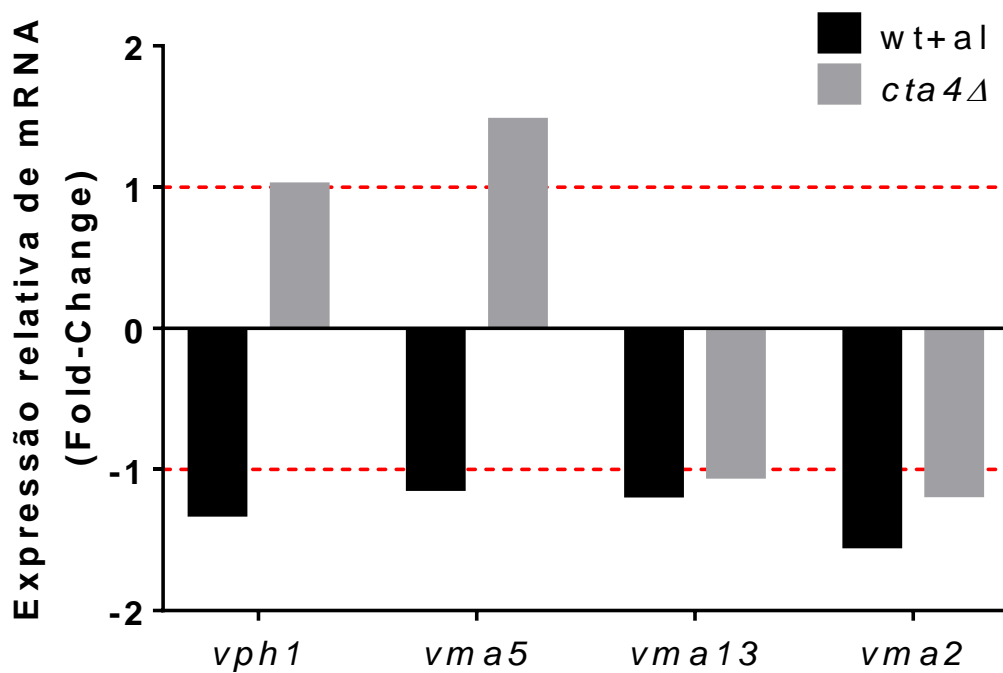


Figura 11. Expressão do mRNA das isoformas de H⁺-ATPase do tipo V. Análise de RT-qPCR em células Fy1180 com 0,5 mM AIK(SO₄)₂ e *cta4Δ* cultivadas por 21 h, em meio YES, pH 4,5. Os valores foram normalizados pelo gene de referência (*act1⁺*) e são expressos relativos à cepa do tipo selvagem Fy1180 (= 1 ou -1), representada pela linha tracejada vermelha.

Células cultivadas com 0,5 mM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ mostraram níveis transcricionais diminuídos dos genes envolvidos na homeostase do Ca^{2+} : ambas Ca^{2+} -ATPases do retículo endoplasmático e vacuolares (cta4^+ e pmc1^+ , respectivamente) com regulação negativa de -1,5 vezes (Figura 12).

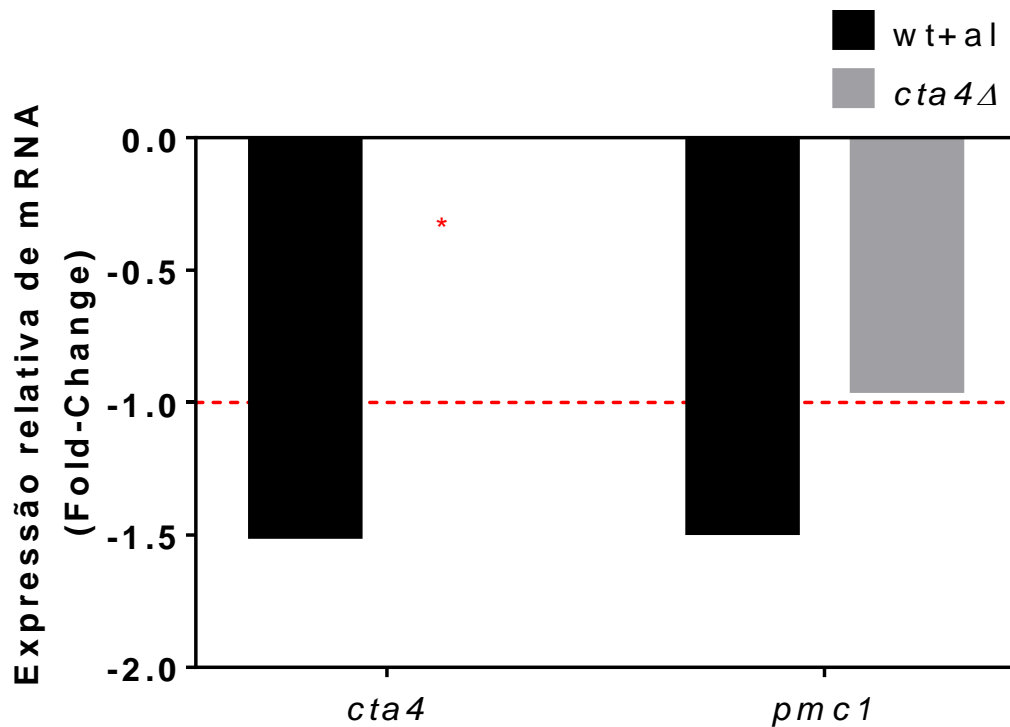


Figura 12. Expressão do mRNA das Ca^{2+} -ATPases de retículo endoplasmático e vacúolo, respectivamente. Análise de RT-qPCR em células Fy1180 com 0,5 mM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ e $\text{cta4}\Delta$ cultivadas por 21 h, em meio YES, pH 4,5. Os valores foram normalizados pelo gene de referência (act1^+) e são expressos relativos à cepa do tipo selvagem Fy1180 (= 1 ou -1), representada pela linha tracejada vermelha. O asterisco (*) representa ausência de transcrição de cta4^+ na cepa Hu285 ($\text{cta4}\Delta$).

A mesma diminuição foi observada em outras proteínas relacionadas à homeostase de Ca^{2+} , calcineurina (subunidade catalítica *ppb1*⁺ -1,3 e subunidade reguladora SPPC830.06 -1,18x); e -1,7 vezes para calmodulina (*cam1*⁺). Em contrapartida foi observado um perfil de expressão diferente para as células *cta4Δ*, que exibiram uma regulação positiva da calmodulina e da subunidade reguladora da calcineurina com um aumento de 1,5 e 1,3 vezes em comparação com a expressão de células do tipo selvagem (Figura 13).

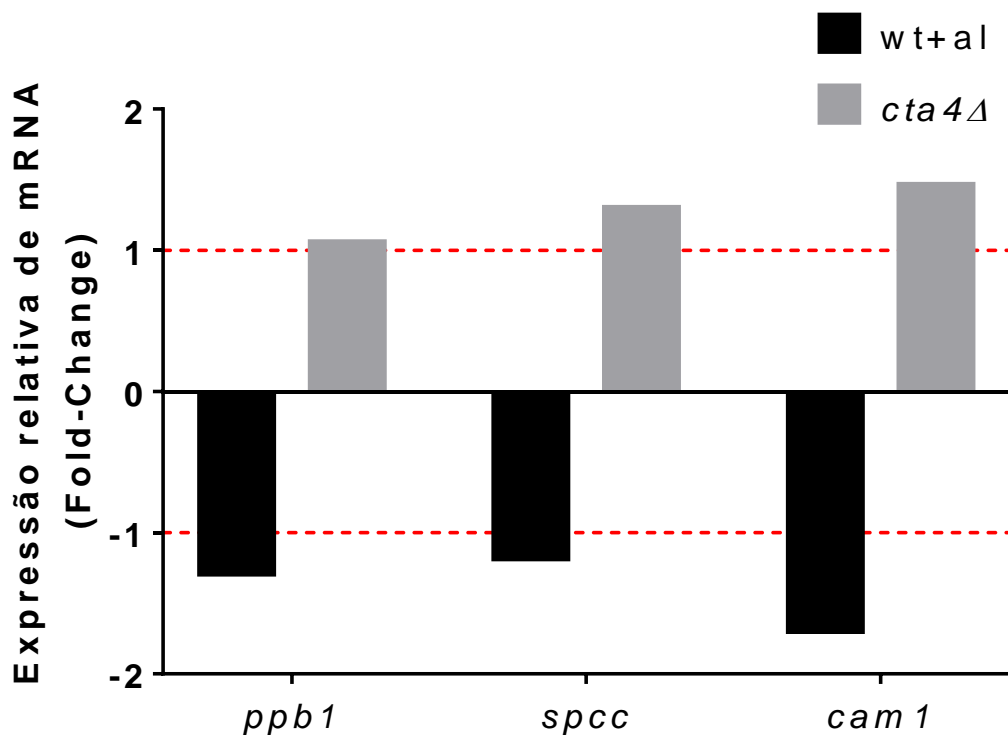


Figura 13. Expressão do mRNA das subunidades de calcineurina e de calmodulina. Análise de RT-qPCR em células Fy1180 com 0,5 mM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ e *cta4Δ* cultivadas por 21 h, em meio YES, pH 4,5. Os valores foram normalizados pelo gene de referência (*act1*⁺) e são expressos relativos à cepa do tipo selvagem Fy1180 (= 1 ou -1), representada pela linha tracejada vermelha.

Diferentes genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo também foram analisados (Figura 14). Nas células *cta4Δ*, a glutathione S-transferase *gst1⁺* e a glutathione redutase *pgr1⁺* apresentaram um aumento de 1,2 vezes, enquanto a glutathione redutase *gst3⁺* exibiu um aumento de 2,8 vezes. A catalase (*ctt1⁺*) e *gst2⁺* mostraram uma diminuição de -1,16 e -2,2 vezes, respectivamente. Nas células do tipo selvagem cultivadas com AI, a *gst2⁺* diminuiu a expressão do nível de RNA em -1,4 vezes, também foi observada uma regulação negativa para *ctt1⁺* e *pgr1⁺* (-1,2 vezes a alteração).

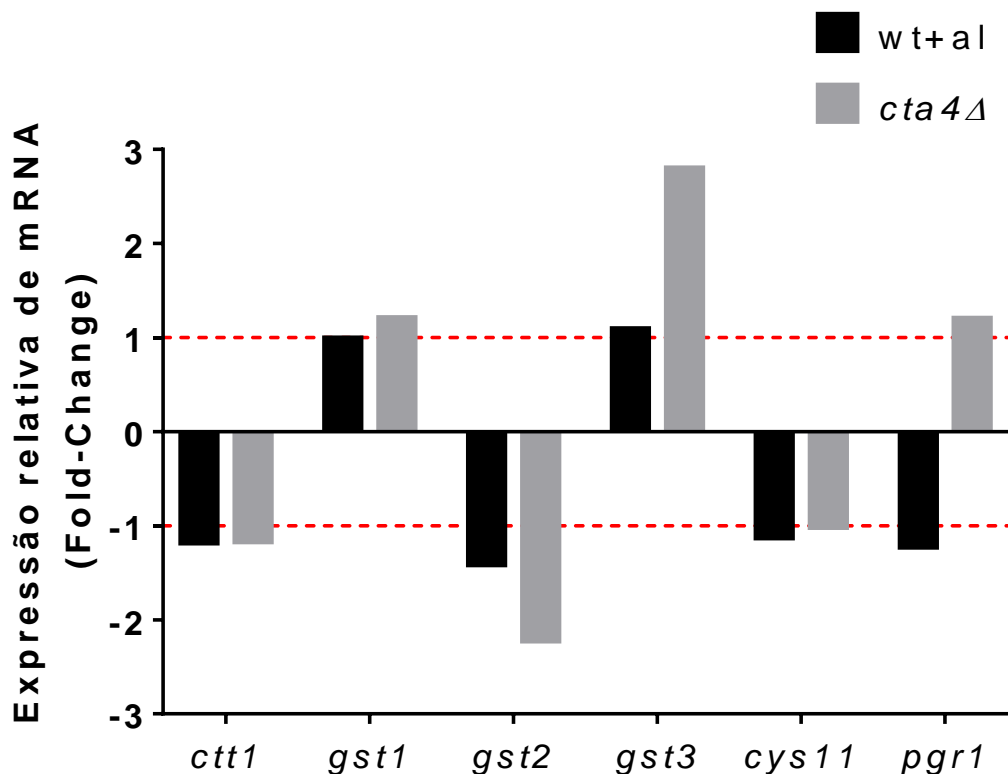


Figura 14. Expressão do mRNA de enzimas em resposta ao ROS. Análise de RT-qPCR em células Fy1180 com 0,5 mM AIK(SO₄)₂ e *cta4Δ* cultivadas por 21 h, em meio YES, pH 4,5. Os valores foram normalizados pelo gene de referência (*act1⁺*) e são expressos relativos à cepa do tipo selvagem Fy1180 (= 1 ou -1), representada pela linha tracejada vermelha.

5.4. Construção de redes de proteínas através da análise STRING

A análise do maior valor de confiança (0,9) mostrou três grupos distintos de associação de proteínas, o primeiro grupo composto apenas das duas isoformas da H⁺-ATPase membrana plasmática. O segundo grupo mostra a interação entre as diferentes subunidades da V-H⁺-ATPase, enquanto o último grupo de interação consiste na Ca²⁺-ATPase Pmc1p vacuolar com genes relacionados à calmodulina/calcineurina. Nesse nível de confiança, tanto a Ca²⁺-ATPase Pmr1p como a ATPase Cta4p do tipo P5A (codificada pelos genes *pmr1+* e *cta4+*, respectivamente), não obtiveram interação entre si ou com qualquer outro grupo (Figura 15a). Nesse nível de confiança, as estatísticas da rede foram as seguintes: Número de nós: 12; Número de arestas: 10; Número esperado de arestas: 0; Grau médio do nó: 1,67; Média de coeficiente de agrupamento local: 0,667 e valor de $p < 1,0e^{-16}$.

Ao realizar a representação da interação com um alto valor de confiança (0,7), o padrão de associação de proteínas mudou com a fusão dos três agrupamentos em um e apenas o Cta4-ATPase não teve interação alguma. Os resultados obtidos mostraram uma conexão direta entre P e V-ATPase, seguida de uma conexão exclusiva entre V-ATPase e homeostase do Ca²⁺, através da subunidade a (*vph1+*) e da subunidade C (*vma5+*) através de uma interação com Ca²⁺-ATPases e posteriormente o sistema de sinalização calcineurina/calmodulina. (Figura 15b). As estatísticas da rede referentes a 0,7 como pontuação de confiança foram: Número de nós: 12; Número de arestas: 16; Número esperado de arestas: 0; Grau médio do nó: 2,67; Média coeficiente de agrupamento local: 0,625 e valor de $p < 1,0e^{-16}$.

Aplicação do valor médio de confiança (0,4) resultou em uma rede de todos os genes-alvo conectados e um único caminho de interação pode ser observado, começando entre P e V-ATPase, seguido de uma interação entre Ca²⁺-ATPases via V-ATPase e, finalmente, um vínculo entre outros genes associados à homeostase de Ca²⁺ (Figura 15c). As estatísticas de interação apresentadas pela análise STRING nesta condição foram: Número de nós: 12; Número de arestas: 28; Número esperado de arestas: 1; Grau médio do nó: 4,67; Média coeficiente de agrupamento local: 0,746 e valor de $p < 1,0e^{-16}$. É importante destacar que, independentemente da pontuação de confiança selecionado; a associação de interação apresentou valor de $p < 1,0e^{-16}$.

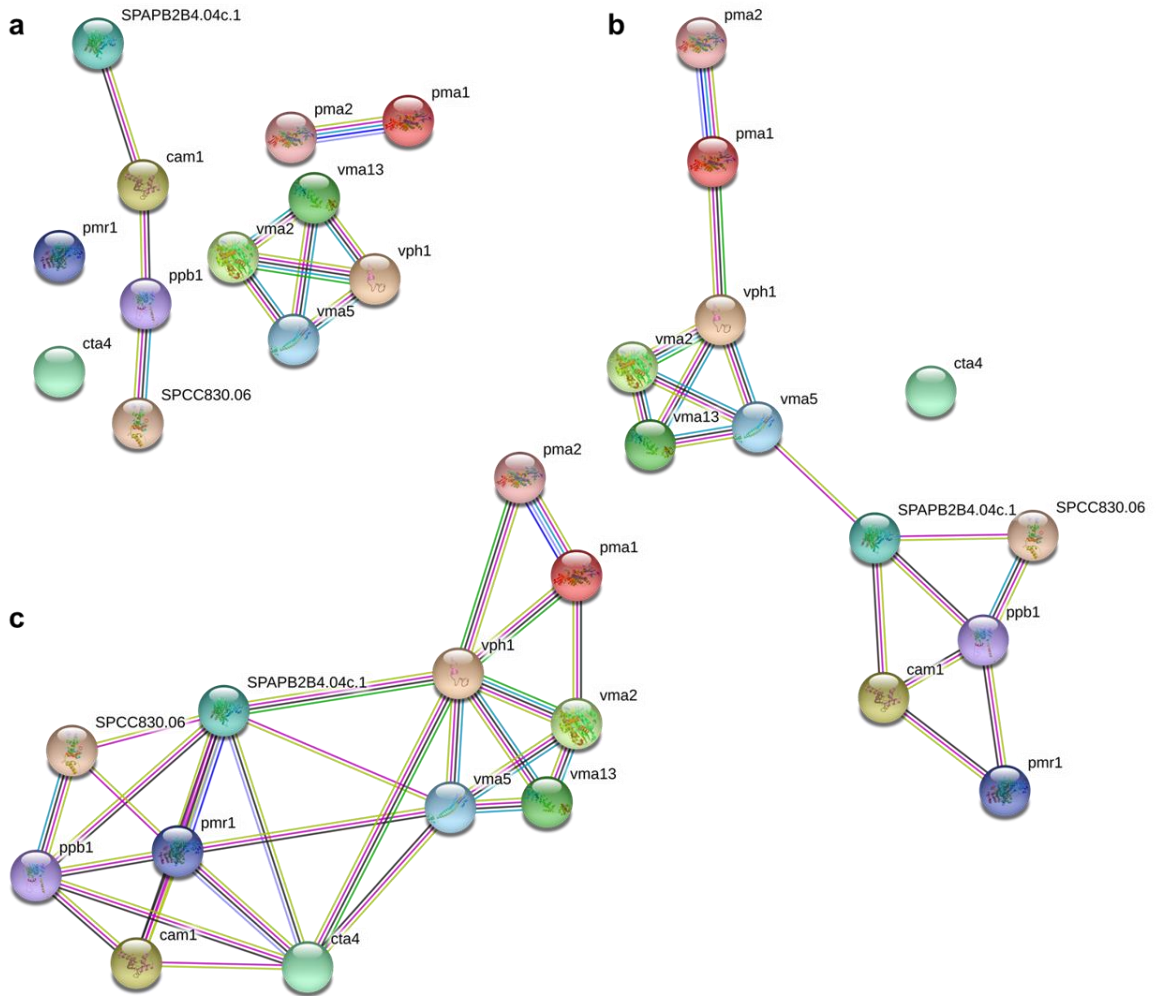


Figura 15. Rede de PPI de 12 proteínas relacionadas à homeostase do H^+ e Ca^{2+} em *S. pombe*. A análise foi realizada usando o banco de dados STRING. As propriedades de rede foram nos valores (a) muito alto 0.9, (b) alto 0.7 e (c) médio, 0.4. Nós e bordas representam proteínas e PPI, respectivamente.

Foi realizada também a análise STRING com inclusão de gene *vcx1* de trocador vacuolar Ca^{2+}/H^+ relacionado com homeostase de cálcio, genes *abt2⁺* e *nda2⁺* (α -tubulina), e *tip1* (tip elongation protein 1) relacionados com manutenção de citoesqueleto e polaridade celular, porém sem genes *pma1* e *pma2* de H^+ -ATPase de membrana plasmática. Neste caso, observou a formação de quatro clusters de associações dentro de uma rede maior de PPI (Figura 16). O cluster com Cta4 ATPase em um hub central com Ca^{2+} -ATPases Pmc1 e Pmr1 e o trocador Ca^{2+}/H^+ Vcx1 serve como um vinculador para o cluster composto pelas subunidades da bomba vacuolar de H^+ com a homeostase do Ca^{2+} , por meio de interações com as subunidades da V-ATPase a (*vph1⁺*) e C (*vma5⁺*) e, por outro

lado, também com o conjunto de sistemas de sinalização de calcineurina / calmodulina (Figura 16).

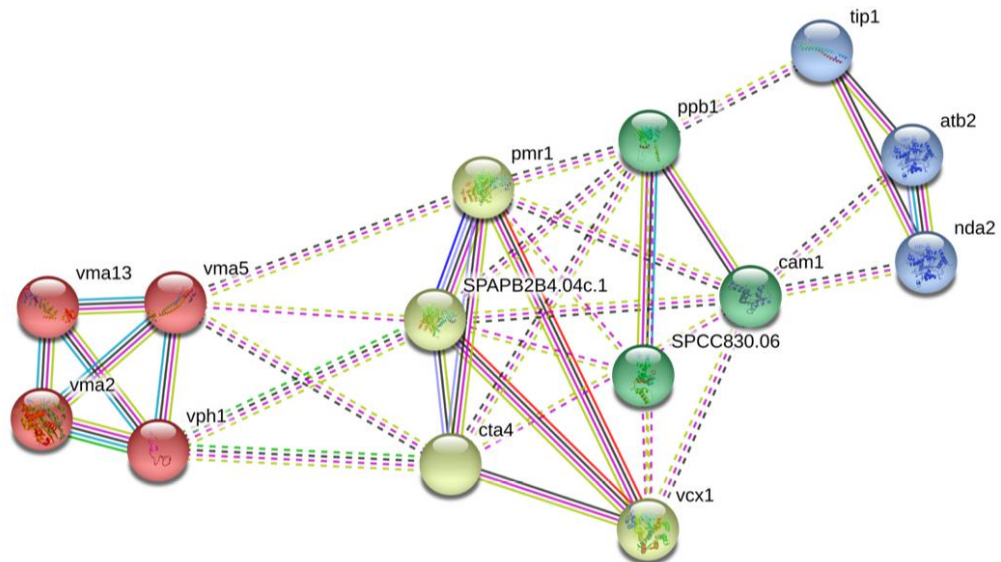


Figura 16. Rede de PPI de genes que codificam proteínas relacionadas à homeostase do H^+/Ca^{2+} e polaridade celular em *S. pombe*. A análise foi realizada usando o banco de dados STRING. A propriedade de rede foi de valor médio, 0.4. Nós e bordas representam proteínas e PPI, respectivamente. Quatro clusters formados na rede são identificados pelas cores vermelho, verde claro, verde e azul. As linhas sólidas e pontilhadas indicam a conexão dentro do mesmo cluster e entre clusters diferentes, respectivamente, e diferentes cores das linhas indicam distintas associações proteína-proteína (ciano, de bancos de dados; magenta, determinadas experimentalmente; verde, *neighborhood* genica; azul, coocorrência genica; verde claro, text-mining; preto, coexpressão).

6. DISCUSSÃO

6.1. Alterações de morfologia e polaridade celular da levedura de fissão por estresse de Al

Ao analisar as células de levedura de fissão expostas ao Al, observamos que sua morfologia apresentava características semelhantes às células de *S. pombe* com deleção na Ca²⁺-ATPase de retículo endoplasmático, Cta4p (Okorokova-Façanha et al., 2002). Curiosamente estas células mutantes *cta4Δ* exibem estresse severo no RE devido à redução do sequestro de Ca²⁺, aumentando os níveis intracelulares de Ca²⁺, estimulando a atividade proteína fosfatase, calcineurina, e alterações na atividade de transporte de Ca²⁺-ATPase nas membranas de RE e vacúolos (Lustoza et al., 2011). Essa disrupção na homeostase de cálcio no RE e acúmulo de cálcio citosólico é semelhante ao que ocorre nas células quando expostas ao Al. Dessa maneira, é possível que a Cta4 ATPase tenha um papel fundamental para a manutenção da função do RE e sinalização celular, durante o estresse por Al.

Células de *S. pombe* cultivadas na presença de Al exibiram forma aberrante e diversas alterações da sua morfologia típica de “bastão”, incluindo células alongadas e em formas de pera com números de septos aumentados, indicando que Al induz mudanças na polaridade e citocinese. Uma das possibilidades é que o Al interfere com a função e/ou entrega de proteínas associadas aos microtúbulos, modificando a dinâmica dos microtúbulos, uma vez que a polarização e morfologia da levedura de fissão dependem dos microtúbulos (Sawin e Nurse, 1998; Chang e

Martin, 2009). De fato, a visualização de microtúbulos em células cultivadas com Al usando anticorpos antitubulina monoclonais mostraram que o estresse por Al resultou em alterações na montagem dos microtúbulos que pareciam mais curtas e em maior número quando comparadas às células do tipo selvagem (dados não publicados), indicando a desestabilização dos microtúbulos por Al em *S. pombe*. Esses dados são consistentes com as alterações do citoesqueleto em raízes de milho tratados com Al (Sivaguru et al., 1999), reforçando a ideia de que o maquinário da polaridade celular é um dos alvos da toxicidade de Al.

6.2. Al interfere na fragmentação vacuolar

O vacúolo é mantido a um pH ácido por uma V-H⁺-ATPase. Este complexo enzimático é composto por componentes integrais da membrana e subunidades periféricas ligadas à face citoplasmática da membrana vacuolar. A função da V-H⁺-ATPase não é necessária para a viabilidade celular, mas o baixo crescimento de células deficientes em ATPases indica que o complexo desempenha importantes papéis fisiológicos que ainda precisam ser elucidados com precisão. Desafios de pesquisas adicionais envolvendo a V-H⁺-ATPase incluem definir a composição da bomba de prótons ativa, entender as funções de várias subunidades e determinar o local da biossíntese e a sequência de montagem desse complexo a partir de componentes recém-sintetizados (Raymond et al., 1992). Como V-ATPase fornece a maior parte da energia ao sistema vacuolar e promove a acidificação do seu lúmen, alterações na atividade da enzima devido ao estresse pelo Al e à fragmentação do vacúolo devem resultar em consequências pleiotrópicas que alteram todo o funcionamento do sistema de endomembrana e comunicação com outras organelas.

A depleção de cálcio do lúmen do retículo endoplasmático causa graves perturbações na função do RE, conhecida como estresse do RE (Locke et al., 2000). Recentemente, foi relatado que os vacúolos de *S. cerevisiae* se fragmentam em resposta ao estresse no retículo endoplasmático (Stauffer e Powers, 2015). O exame dos níveis de proteína da chaperona BiP, conhecido marcador de estresse do RE, mostrou níveis mais altos de BiP em células de *S. pombe* cultivadas com Al (dados não publicados). Para examinar se Al interfere no funcionamento do vacúolo, analisou a fragmentação vacuolar usando marcador fluorescente

específico da membrana vacuolar, MDY-64. Foi observado que o número médio de vacúolos nas células de *S. pombe* foi dois, com algumas exceções apresentando três vacúolos (Figura 5). O crescimento na presença de Al resultou em múltiplos pequenos vacúolos (6 em média), semelhantes à morfologia fragmentada de vacúolos de mutantes de classe B identificados durante uma triagem de mutantes de *S. cerevisiae* com alterações no processo de biogênese vacuolar e na estrutura e dinâmica vacuolares (Banta et al., 1988; Raymond et al., 1992). Vale ressaltar que a deleção do gene *cta4⁺* resultou em vacúolos ainda mais fragmentados, indicando que Cta4p influencia a dinâmica do vacúolo. Como a deleção do *cta4⁺* também leva ao estresse do retículo endoplasmático e ao aumento do Ca^{2+} citoplasmático (Lustoza et al., 2011), a fragmentação do vacúolo pode representar resposta fisiológica e possivelmente garantir o sequestro eficiente dos íons cálcio, como sugerido para as células de *S. cerevisiae* sem Ca^{2+} -ATPase Pmr1p (Kellermayer et al., 2003). Há ainda a possibilidade de Al também causar as alterações na curvatura da membrana, promovendo a fragmentação do vacúolo, o que requer futuros estudos.

6.3. Efeito de Al nas bombas de H^+

Nas plantas, as alterações no potencial da membrana e na atividade da H^+ -ATPase na membrana plasmática estão relacionadas às raízes, ao grau de estresse, sensibilidade ao Al das espécies assim como o genótipo da planta. Por exemplo, à estresse por Al induziu a despolarização da membrana plasmática em cevada (Matsumoto 1988), abóbora (Ahn et al., 2001) e células cultivadas de tabaco (Sivaguru et al., 2005), sugerindo uma diminuição da atividade da H^+ -ATPase. Ainda, a despolarização ou hiperpolarização da membrana plasmática foi registrada em *Arabidopsis* (Bose et al., 2010b, 2010a) e soja (Wang et al., 2016). Nas pontas das raízes do trigo, a exposição ao Al ocasionou hiperpolarização nos genótipos resistentes ao Al e despolarização nos genótipos sensíveis ao Al (Ahn et al., 2004). A liberação de prótons induzida por Al está associada à ativação da H^+ -ATPase de membrana plasmática em plantas de chá (Wan et al., 2018). Em plantas de soja e fava, os níveis e atividades mais elevados das H^+ -ATPase de membrana plasmática coincidiram com o aumento da expressão do gene, e maior abundância da proteína H^+ -ATPase de membrana plasmática nas cultivares resistentes ao Al

(Shen et al., 2005; Guo *et al.* 2013). Assim, Al modula a H⁺-ATPase de membrana plasmática em diferentes níveis, transcricional, traducional e pós-traducional.

Neste trabalho, observou uma diminuição no transporte de H⁺ em células tratadas com Al (Figura 7) e dos transcritos das H⁺-ATPase de MP, que estão diretamente ligados ao potencial zeta da membrana plasmática. Zhao e colaboradores, 2017 observaram um aumento da carga negativa da superfície celular em células tratadas com Al em pH 4.2, e sugerem que a adsorção do Al na membrana celular reflete mais uma reação físico-química do que um transporte ativo direto pela membrana, sendo assim a carga negativa da superfície celular possui um papel muito importante em aumentar a adsorção do Al na superfície celular. Esses dados em conjunto com (Hu et al., 2016) corroboram com a ideia de que microrganismos, principalmente os com grande tolerância ao Al, possuem uma membrana celular com carga mais positiva, levando a menor adsorção de Al.

O sequestro vacuolar está envolvido na resistência de uma gama de metais tóxicos em células fúngicas, onde os íons metálicos podem ser efetivamente complexados com ácidos orgânicos ou polifosfatos (Martin et al., 1994; Simm et al., 2007; Kulakovskaya, 2018). Foi relatado que as células vegetais impedem a toxicidade do Al pela translocação do Al para o vacúolo (Illéš et al., 2006). Os mutantes de leveduras defeituosos no vacúolo (ausência de vacúolo ou V-H⁺-ATPase funcional) apresentaram sensibilidade aumentada e uma capacidade diminuída de acumular Zn, Mn, Co e Ni (Ramsay e Gadd, 1997). Além disso, o estudo do ionoma de *S. cerevisiae* demonstrou que várias cepas deletérias em genes que codificam subunidades da V-H⁺-ATPase exibiram alterações nos níveis de íons (Eide et al., 2005).

Portanto, examinou se a fragmentação do vacúolo altera o funcionamento vacuolar em *S. pombe*. A determinação do transporte de H⁺ dependente de ATP nas vesículas da membrana mostrou que o estresse de Al resultou em uma energização reduzida das membranas de levedura de fissão (Figura 8b). Curiosamente, foi observado um bombeamento mais eficiente de H⁺ em membranas isoladas de células *cta4Δ* em comparação com células de tipo selvagem.

Em células fúngicas e vegetais, a V-ATPase é responsável pela acidificação dos compartimentos vacuolares e intracelulares (Okorokov et al., 2001; Schumacher, 2006; Samarão et al., 2009). A função da V-H⁺-ATPase não é necessária para a viabilidade celular, mas o baixo crescimento de células deficientes em ATPase indica que esta bomba desempenha papéis fisiológicos importantes que ainda não foram totalmente elucidados (Nelson et al., 2000). A inibição farmacológica com Concanamicina A (ConcA), um inibidor específico que se liga à subunidade c (Vma3p) do complexo V₀, impede o transporte de H⁺ e a hidrólise de ATP (Huss et al., 2002; Bowman et al., 2004). A adição de ConcA às vesículas da membrana resultou em forte inibição do transporte H⁺ dependente de ATP em membranas isoladas de células do tipo selvagem, células cultivadas na presença de Al e células *cta4Δ*, respectivamente (Figura 8a-c), revelando que este foi mediado por V-ATPase. A velocidade inicial da V-H⁺-ATPase foi diminuída por Al (Figura 9), indicando modulação da bomba vacuolar e, conseqüentemente, dos transportadores secundários que dependem do gradiente de H⁺. Por outro lado, as membranas isoladas das células *cta4Δ* apresentaram um aumento no estado estacionário e na velocidade inicial do transporte de H⁺ mediado pela V-ATPase, quando comparadas às membranas do tipo selvagem, evidenciando ainda mais a importância da Cta4 ATPase na manutenção do funcionamento correto do sistema de transporte H⁺ e, conseqüentemente, sinalização celular mediada por H⁺.

As alterações observadas na atividade da V-H⁺-ATPase podem ser parcialmente explicadas pela fragmentação vacuolar e / ou vice-versa. As proteínas envolvidas na montagem da V-ATPase e da subunidade Vma2p da V-ATPase foram identificadas entre os fatores que regulam a fragmentação do vacúolo em *S. cerevisiae* (Michaillat e Mayer, 2013; Stauffer e Powers, 2015). Alterações na atividade da V-ATPase em resposta ao estresse por Al, fragmentação de vacúolos e aumento de Ca²⁺ devem claramente levar a diversas conseqüências que alteram todo o funcionamento do sistema endomembranar e a comunicação com outras organelas, com profundo efeito na fisiologia das células de leveduras.

6.4. Alteração nos níveis de mRNA dos genes envolvidos na homeostase de H⁺ e Ca²⁺

Para compreender os mecanismos moleculares subjacentes à modulação da atividade do sistema primário de transporte após o tratamento com Al, analisaram os níveis de expressão dos genes que codificam para proteínas envolvidas na homeostase de prótons e a sinalização de cálcio (Figuras 10-13), incluindo *cta4⁺*, *pmc1⁺* que codifica Ca²⁺-ATPase vacuolar, *ppb1⁺* e *SPCC830.06* que codificam subunidades catalíticas e reguladoras da calcineurina, respectivamente, *cam1⁺* que codifica calmodulina e algumas subunidades da V-ATPase. Encontraram níveis transcricionais ligeiramente reduzidos nas células cultivadas com Al (para ambas as ATPases de retículo endoplasmático e vacuolar, calmodulina e subunidades de calcineurina (Figuras 12,13). Esses resultados corroboram com dados bioquímicos sobre a atividade reduzida de Ca²⁺-ATPase nas membranas celulares (Palma, 2011).

Nossos dados estão de acordo com o achado anterior de expressão diferencial de calmodulina na planta *Vaccinium corymbosum* L. tratada com Al (Inostroza-Blancheteau et al., 2013), regulação negativa dos genes calmodulina e Ca²⁺-ATPase vacuolar em *S. cerevisiae*, aumenta a sensibilidade de células *pmc1* mutantes a Al (Li et al., 2011) e fornecem evidências adicionais sobre a perturbação da sinalização vacuolar e citoplasmática do cálcio.

Para comparação, foi observado um perfil de expressão diferente nas células *cta4Δ*, que exibiram uma regulação positiva da subunidade reguladora de calmodulina e calcineurina em comparação com as células do tipo selvagem (Figura 13). As evidências bioquímicas diretas demonstraram previamente que a atividade específica da fosfatase de calcineurina é altamente induzida após a deleção da *cta4⁺* (Lustoza et al., 2011). Assim, juntos, esses resultados sugerem que a elevação dos níveis de cálcio induz a calcineurina em ambos os níveis transcricional e pós-traducional. Seria interessante explorar se o Al modula a atividade da calcineurina.

A exposição ao Al também resultou em discreta regulação da expressão gênica de subunidades envolvidas principalmente na regulação da V-ATPase (*vma2⁺*, *vph1⁺*, *vma5⁺* e *vma13⁺*), com a subunidade *B* sendo a mais modulada com

30% de redução (Figura 11). Isso está de acordo com os dados obtidos anteriormente para a V-ATPase de *S. cerevisiae*, cuja expressão das subunidades $V_1 A$ e B diminuiu em 40% nas concentrações micromolares de Al (Hamilton et al., 2001a). Em contraste, os níveis de transcrição da subunidade B das V-ATPases de uma cultivar de trigo resistente ao Al aumentaram 2,2 vezes quando tratados com Al (Hamilton et al., 2001b), indicando a relevância dessa subunidade como um possível marcador de adaptação ao Al. A subunidade B , localizada no domínio catalítico V_1 , contém o local de ligação alostérica do ATP e também se liga a elementos do citoesqueleto (Holliday et al., 2000). A subunidade a (*vph1*), para qual foi observada diminuição de 25%, localizada no domínio V_0 , está diretamente envolvida na translocação de prótons através da membrana e é essencial para a montagem da V-ATPase (Manolson et al., 1992). Curiosamente, nossos dados também revelaram que a expressão do gene *vma5⁺* que codifica a subunidade C foi aumentada em 30% em células deficientes de *Cta4* ATPase. Essa subunidade desempenha um papel crucial na montagem estrutural e funcional da V-ATPase (Kane e Smardon, 2000) e exibe propriedades de ligação ao citoesqueleto de actina (Vitavska et al., 2003). No entanto, verificou-se que o mecanismo regulador de montagem e desmontagem da V-ATPase é principalmente dependente do citoesqueleto de microtúbulos (Xu e Forgac, 2001). A subunidade C atua como uma ponte molecular entre os domínios V_1 e V_0 e deixa a holoenzima durante a desmontagem (Kane, 1995; Drory et al., 2004). A subunidade H , por sua vez, permanece ligada ao domínio V_1 após desmontagem, todavia sofre uma alteração de conformação que impede a hidrólise de ATP, impedindo a depleção de energia (Parra et al., 2000; Sharma et al., 2018). Como a expressão funcional da V-ATPase também é necessária para a energização da membrana do ER (Samarão et al., 2009), é provável que a regulação positiva do gene *vma5⁺* seja uma característica das respostas de estresse do RE das células mutantes *cta4Δ*, na tentativa de preservar a funcionalidade adequada do RE. Níveis mais altos de expressão de *vma5⁺* também podem estar relacionados à atividade elevada da V-ATPase encontrada nas células mutantes *cta4Δ* (Figura 9).

O estresse oxidativo causa um aumento de Ca^{2+} citosólico de células animais (Klyubin et al., 1996), vegetal (Cessna e Low, 2001) e fúngicas (Lustoza et al., 2011), provavelmente aumentando a atividade dos canais de Ca^{2+} ativados por hiperpolarização na membrana plasmática (Klüsener et al., 2002; Lecourieux et al.,

2002) e/ou canais permeáveis de cátions não seletivos a Ca^{2+} (Demidchik et al., 2003), facilitando assim o fluxo de Ca^{2+} apoplasmático para a célula. O Al também ocasiona um aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico (Zhang e Rengel, 1999; Ma et al., 2002) e pode induzir estresse oxidativo devido à interrupção da função das mitocôndrias (Yamamoto et al., 2002). Enquanto o estresse oxidativo é ativado (Klüsener et al., 2002; Lecourieux et al., 2002), o estresse do Al bloqueia os canais de Ca^{2+} ativados pela hiperpolarização (Kiegle et al., 2000; Véry e Davies, 2000) na membrana plasmática, que por sua vez, influenciam na contribuição relativa das fontes de Ca^{2+} extracelulares e intracelulares para aumentar a concentração de Ca^{2+} citosólico devido ao estresse por Al. Portanto, as consequências da interação entre os dois estresses (estresse do Al e estresse oxidativo) na regulação dos níveis do Ca^{2+} citosólico não são claras e requerem maiores estudos.

De modo intrigante não encontramos um aumento da expressão dos genes relacionados ao estresse oxidativo em *S. pombe* cultivados com 0,5 mM de $\text{Al}(\text{SO}_4)_2$. Apesar de ser uma quantidade elevada para plantas, esta concentração talvez não tenha sido o suficiente para ocasionar o aumento da expressão de genes das proteínas responsáveis em eliminar os agentes oxidativos ocasionados pelas injúrias deste metal, e assim a atividade de enzimas já presentes nas células de *S. pombe* no combate de ERO seria o suficiente para lidar com o estresse provocado por Al.

6.5. Rede de proteínas participantes da homeostase de pH e Ca^{2+}

A análise STRING (Szklarczyk et al., 2019) permitiu construção de uma rede interconectando todos os genes alvo acessados neste trabalho envolvidas na regulação da homeostase do H^+ e Ca^{2+} , com genes reguladores da polaridade celular. A rede também revelou conexões específicas com proteínas do citoesqueleto, criando um cenário abrangente e fisiologicamente significativo, uma vez que as associações na análise STRING não se restringem a interações físicas, mas também incluem associações funcionais.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi aprofundado o conhecimento sobre a intercomunicação entre a homeostase de H^+ e Ca^{2+} e avaliados os padrões de expressão e atividade das principais bombas responsáveis pela homeostase de H^+ em células eucarióticas expostas a concentrações tóxicas de Al ou níveis intracelulares elevados de Ca^{2+} (deleção de Cta4-ATPase de RE).

Análises de interação de proteínas demonstraram uma relação direta entre proteínas envolvidas na homeostase de H^+ e Ca^{2+} , incluindo a *cta4^t*, o que corrobora com seu proposto papel como transportador ativo de Ca^{2+} . Genes relacionados à homeostase de H^+ e Ca^{2+} apresentaram menores níveis de expressão nos tratamentos com Al do que frente à deleção de *cta4^t*, refletindo diretamente na redução da atividade de transporte das bombas de H^+ . Ambas as condições apresentaram fragmentação do vacúolo, o que sugere vias de sinalização comum entre deleção da *cta4^t* e o estresse oriundo de altas concentrações de Al. Esses dados propõem uma remodelação da homeostase de H^+ e Ca^{2+} , particularmente no retículo endoplasmático e vacúolo, bem como o ajuste na fragmentação vacuolar e na comunicação do RE-vacúolo como parte do complexo mecanismo de tolerância ao Al.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, S.J. (2002) Aluminium-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *J Exp Bot.* 53:1959-1966.
- Ahn, S.J., Rengel Z., Matsumoto, H. (2004) Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H⁺-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytol.* 162:71-79.
- Ahn, S.J., Sivaguru M., Osawa H., Chung, G.C., Matsumoto, H. (2001) Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol.* 126:1381-1390.
- Akeson, M.A., Munns, D.N., Burau, R.G. (1989) Adsorption of Al³⁺ to phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 986:33-40.
- Anoop, V.M., Basu, U., McCammon, M.T., McAlister-Henn, L. (2003) Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol.* 132:2205-2217.
- Banta, L.M., Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Emr, S.D. (1988) Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *J Cell Biol.* 107:1369-1383.
- Barceló, J., Poschenrieder, C. (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: A review. *Environ Exp Bot.* 48:75-92.
- Beyenbach, K.W., Wiczorek, H. (2006) The V-type H⁺ ATPase: Molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol.* 209:577-589.

- Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echevarría-Machado, I., Martínez-Estévez, M. (2017) Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Front Plant Sci.* 8:1-18.
- Bolan, N.S., Hedley, M.J. (2003) *Role of carbon, nitrogen, and sulfur cycles in soil acidification.* In: Rengel, Z. (ed) *Handbook of soil acidity.* New York: CRC Press, p. 29-56.
- Bose, J., Babourina, O., Shabala, S., Rengel, Z. (2010a) Aluminum-dependent dynamics of ion transport in *Arabidopsis*: Specificity of low pH and aluminum responses. *Physiol Plant.* 139:401-412.
- Bose, J., Babourina, O., Shabala, S., Rengel, Z. (2010b) Aluminium-induced ion transport in *Arabidopsis*: the relationship between Al tolerance and root ion flux. *J Exp Bot.* 61:3163-3175.
- Bowman, E.J., Graham, L.A., Stevens, T.H., Bowman, B.J. (2004) The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279:33131-33138.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Brautigan, D.J., Rengasamy, P., Chittleborough, D.J. (2012) Aluminium speciation and phytotoxicity in alkaline soils. *Plant Soil.* 360:187-196.
- Cessna, S.G., Low, P.S. (2001) Activation of the oxidative burst in aequorin-transformed *Nicotiana tabacum* cells is mediated by protein kinase- and anion channel-dependent release of Ca²⁺ from internal stores. *Planta.* 214:126-134.
- Chang, F., Martin, S.G. (2009) Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a001347.
- Che, J., Zhao, X.Q., Zhou, X., Jia, Z.J., Shen, R.F. (2015) High pH-enhanced soil nitrification was associated with ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in acidic soils. *Appl Soil Ecol.* 85:21-29.
- Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U. (2007) A long way ahead : understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science,* 7:309-315.
- Cogo, A.J.D., Ferreira, K, dos R.D., Okorokov, L.A., Ramos, A.C., Façanha, A.R.,

- Okorokova-Façanha, A.L. (2018) Spermine modulates fungal morphogenesis and activates plasma membrane H⁺-ATPase during yeast to hyphae transition. *Biol Open*. 7:bio029660.
- Collignon, C., Boudot, J.P., Turpault, M.P. (2012) Time change of aluminium toxicity in the acid bulk soil and the rhizosphere in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and beech (*Fagus sylvatica* L.) stands. *Plant and Soil*, 357:259-274.
- Couoh-Cardel, S., Hsueh, Y.C., Wilkens, S., Movileanu, L. (2016) Yeast V-ATPase proteolipid ring acts as a large-conductance transmembrane protein pore. *Sci Rep*. 6:24774.
- Coventry, D.R., Slattery, W.J. (1991) Acidification of soil associated with lupins grown in a crop rotation in north-eastern Victoria. *Aust J Agric Res*. 42:391-397.
- Cunningham, K.W., Fink, G.R. (1994) Ca²⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Exp Biol*. 196:157-166.
- Degenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H., Kochian, L.V. (1998) Aluminum resistance in the arabidopsis mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol*. 117:19-27.
- Demidchik, V., Shabala, S.N., Coutts, K.B. Tester, M.A., Davies, J.M. (2003) Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable channels in plant root cells. *J Cell Sci*. 116:81-88.
- Drory, O., Frolov, F., Nelson, N. (2004) Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function. *EMBO Rep*. 5:1148-1152.
- Eide, D.J., Clark, S., Nair, T.M., Gehl, M., Gribskov, M., Guerinot, M.L., Harper, J.F. (2005) Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol*. 6:R77.
- Ezaki, B., Sasaki, K., Matsumoto, H., Nakashima, S. (2005) Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: Repression of oxidative damage by the AtBCB gene and promotion of efflux of Al ions by the NtGDI1 gene. *J Exp Bot*. 56:2661-2671.
- Ezaki, B., Suzuki, M., Motoda, H., Kawamura, M., Nakashima, S., Matsumoto, H. (2004) Mechanism of gene expression of *arabidopsis* glutathione S-transferase, AtGST1, and AtGST11 in response to aluminum stress. *Plant*

- Physiol.* 134:1672-1682.
- Fagan, M.J., Saier, M.H. (1994) P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: Sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J Mol Evol.* 38:57-99.
- Fischer, J., Quentmeier, A., Gansel, S., Sabados, V., Friedrich C.G. (2002) Inducible aluminum resistance of *Acidiphilium cryptum* and aluminum tolerance of other acidophilic bacteria. *Arch Microbiol.* 178:554-558.
- Forgac, M. (2007) Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:917-929.
- Frantzios, G., Galatis, B., Apostolakos, P. (2001) Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic cells. *J Plant Res.* 114:157-170.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Lett.* 28:2204-2214.
- Ghislain, M., Goffeau, A. (1991) The pma1 and pma2 H⁺-ATPases from *Schizosaccharomyces pombe* are functionally interchangeable. *J Biol Chem.* 226:18276-18279.
- Gordeeva, A.V., Zvyagilskaya, R.A., Labas, Y.A. (2003) Review: Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biokhimiya*, 68:1077-1080.
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanova, O. (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 6:260–271.
- Guo, C.L., Chen, Q., Zhao, X.L., Chen, Xuan-qian, Zhao, Y., Wang, L., Li, Kui-Zhi., Yu, Yong-Xiong., Chen, Li-Mei. (2013) Al-enhanced expression and interaction of 14-3-3 protein and plasma membrane H⁺-ATPase is related to Al-induced citrate secretion in an Al-resistant black soybean. *Plant Mol Biol Report.* 31:1012-1024.
- Guo, J.H., Liu, X.J., Zhang, Y., Shen, J.L, Han, W.X., Zhang, W.F., Christie, P., Goulding, K.W.T., Vitousek, P.M., Zhang, F.S. (2010) Significant acidification in major chinese croplands. *Science.* 327:1108-1010.
- Gupta, N., Gaurav, S.S., Kumar, A. (2013) Molecular basis of aluminium toxicity in plants: A Review. *Am J Plant Sci.* 4:21-37.

- Hamilton, C.A., Good, A.G., Taylor, G.J. (2001a) Vacuolar H⁺-ATPase, but not mitochondrial F1F0-ATPase, is required for aluminum resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 205:231-236.
- Hamilton, C.A., Good, A.G., Taylor, G.J. (2001b) Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiol.* 125:2068-2077.
- Harper, J.F., Surowy, T.K., Sussman, M.R. (1989) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:1234-1238.
- Haruta, M., Gray, W.M., Sussman, M.R. (2015) Regulation of the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) by phosphorylation. *Curr Opin Plant Biol.* 28:68-75.
- Harvey, W.R. (1992) Physiology of V-ATPases. *J Exp Biol.* 172:1-17.
- Heckman, D.S, Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., Hedges, S.B. (2001) Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*, 293:1129-1133.
- Holliday, L.S., Lu, M., Lee, B.S., Nelson, R.D., Solivan, S., Zhang, L., Gluck, S.L. (2000) The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H⁺-ATPase contains a filamentous actin binding site. *J Biol Chem.* 275:32331-32337.
- Horst, W.J., Püschel, A.K., Schmohl, N. (1997) Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. *Plant Soil.* 192:23-30.
- Hu, Z.M., Zhao, X.Q., Bao, X.M., Wang, C., Wang, W., Zheng, L., Lan, P., Shen, R.F. (2016) A potential contribution of the less negatively charged cell wall to the high aluminum tolerance of *Rhodotorula taiwanensis* RS1. *Yeast*, 33:575-586.
- Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gassel, M., Dröse, S., Zeeck, A., Altendorf, K., Wieczorek, H. (2002) Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V0 subunit c. *J Biol Chem.* 277:40544-40548.
- Iida, H., Yagawa, Y., Anraku, Y. (1990) Essential role for induced Ca²⁺ influx followed by [Ca²⁺]_i rise in maintaining viability of yeast cells late in the mating pheromone response pathway. A study of [Ca²⁺]_i in single *Saccharomyces cerevisiae* cells with imaging of fura-2. *J Biol Chem.* 265:13391-13399.

- Illéš, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluska, F., Ovecka, M. (2006) Aluminium toxicity in plants: Internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *J Exp Bot.* 57:4201-4213.
- Inostroza-Blancheteau, C., Aquea, F., Loyola, R., Slovin, J., Rengel, Z., Díaz-Reyes, M., Alberdi, M., Arce-Johnson, P. (2013) Molecular characterisation of a calmodulin gene, VcCaM1, that is differentially expressed under aluminium stress in highbush blueberry. *Plant Biol.* 15:1013-1018.
- Jones, D.L., Kochian, L.V., Gilroy, S. (1998) Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. *Plant Physiol.* 116:81-89.
- Juvvadi, P.R., Lamoth, F., Steinbach, W.J. (2014) Calcineurin as a multifunctional regulator: Unraveling novel functions in fungal stress responses, hyphal growth, drug resistance, and pathogenesis. *Fungal Biol Rev.* 28:56-69.
- Kane, P.M. (1995) Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase in vivo. *J Biol Chem.* 270:17025-17032.
- Kane, P.M. (2016) Proton transport and pH control in fungi. *Adv Expl Med Biol.* 892:33-68.
- Kane, P.M., Smardon, A.M. (2000) Assembly and regulation of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* 35:313-21.
- Kellermayer, R., Aiello, D.P., Miseta, A., Bedwell, D.M. (2003) Extracellular Ca²⁺ sensing contributes to excess Ca²⁺ accumulation and vacuolar fragmentation in a *pmr1*Δ mutant of *S. cerevisiae*. *J Cell Sci.* 116:1637-1646.
- Kiegle, E., Gilliam, M., Haseloff, J. (2000) Hyperpolarisation-activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J.* 21:225-229.
- Kimoto, K.I., Aizawa, T., Urai, M., Ve, N.B., Suzuki, Ken-Ichiro., Nakajima, M., Sunairi, M. (2010) *Acidocella aluminidurans* sp. nov., an aluminium-tolerant bacterium isolated from *Panicum repens* grown in a highly acidic swamp in actual acid sulfate soil area of Vietnam. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:764-768.
- Kinraide, T., Ryan, P., Kochian, L. (1993) Al³⁺-Ca²⁺ interactions in aluminum

- rhizotoxicity. *Planta*, 192:98-103.
- Klüsener, B., Young, J.J., Murata, Y., Allen, G.J., Mori, I.C., Hugouvieux, V., Schroeder, J.I. (2002) Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiol.* 130:2152-2163.
- Klyubin, I.V., Kirpichnikova, K.M., Gamaley, I.A. (1996) Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. *Eur J Cell Biol.* 70:347-351.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A. (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Biol.* 55:549-493.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., Hoekenga, O.A. (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil.* 274:175-195.
- Kollmeier, M., Dietrich, P., Bauer, C.S., Horst, W.J., Hendrich, R. (2001) Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiol.* 126:397-410.
- Kopittke, P.M., Moore, K.L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B.J., Blamey, F.P.C., Menzies, N.W., Nicholson, T.M., McKenna, B.A., Wang, P., Gresshoff, P.M., Kourousias, G., Webb, R.I., Green, G., Tollenaere, A. (2015) Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. *Plant Physiol.* 167:1402-1411.
- Kraus, P.R., Heitman, J. (2003) Coping with stress: Calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. *Biochem Biophys Res Commu.* 28:1151-1157.
- Krug, E.C., Frink, C.R. (1983) Acid rain on acid soil: A new perspective. *Science*, 221:520-525.
- Kulakovskaya, T. (2018) Inorganic polyphosphates and heavy metal resistance in microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol.* 34:1-8.
- Kunito, T., Owaki, M., Ihyo, Y., Sumi, H., Toda, H., Fukuda, D., Park, Ho-Dong. (2012) *Genera Burkholderia* and *Lipomyces* are predominant aluminum-resistant microorganisms isolated from acidic forest soils using cycloheximide-amended growth media. *Ann Microbiol.* 62:1339-1344.

- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjev, R., Pugin, A. (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*, 14:2627-2641.
- Li, X., Qian, J., Wang, C., Zheng, k., Ye, L., Fu, Y., Han, N., Bian, H., Pan, J., Wang, J., Zhu, M. (2011) Regulating cytoplasmic calcium homeostasis can reduce aluminum toxicity in yeast. *PLoS One*, 6:1–13.
- Liang, L.Z., Zhao, X.Q., Yi, X.Y., Chen, C.Z., Dong, X.Y., Chen, R.F., Shen, R.F. (2013) Excessive application of nitrogen and phosphorus fertilizers induces soil acidification and phosphorus enrichment during vegetable production in Yangtze River Delta, China. *Soil Use Manag.* 29:161-168.
- Lin, M.T., Beal, M.F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443:787-795.
- Lobão, F.A., Façanha, A.R., Okorokov, L.A, Dutra, K.R., Façanha-Okorokova, A.L. (2007) Aluminum impairs morphogenic transition and stimulates H⁺ transport mediated by the plasma membrane ATPase of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett.* 274:17-23.
- Locke, E.G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y., Cunnigham, K.W. (2000) A Homolog of voltage-gated Ca²⁺ channels stimulated by depletion of secretory Ca²⁺ in Yeast. *Mol Cell Biol.* 20:6686-6694.
- Lustoza, A.C.D.M., Palma, L.M., Façanha, A.R., Okorokov, L.A., Okorokova-Façanha, A.L. (2011) P(5A)-type ATPase Cta4p is essential for Ca²⁺ transport in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One*, 6:e27843.
- Ma, J.F. (2007) Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *Int Rev Cytol.* 264:225-252.
- Ma, Q., Rengel, Z., Kuo, J. (2002) Aluminium toxicity in rye (*Secale cereale*): Root growth and dynamics of cytoplasmic Ca²⁺ in intact root tips. *Ann Bot.* 89:241–244.
- MacDiarmid, C.W., Gardner, R.C. (1996) Al toxicity in yeast. A role for Mg? *Plant Physiol.* 112:1101-1109.
- MacDiarmid, C.W., Gardner, R.C. (1998) Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J*

Biol Chem. 273:1727-1732.

- Macdonald, T.L., Humphreys, W.G., Martin, R.B. (1987) Promotion of tubulin assembly by aluminum ion in vitro. *Science*, 236:183-186.
- Mahler, R.L., McDole, R.E. (1985) The influence of lime and phosphorus on crop production in northern idaho. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 16:485-499.
- Manolson, M.F., Proteau, D., Preston, R.A., Stenbit, A., Roberts, B.T., Hoyt, M.A., Preuss, D., Muholland, J., Botstein, D., Jones, E.W. (1992). The VPH1 gene encodes a 95-kDa integral membrane polypeptide required for in vivo assembly and activity of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 267:14294-14303.
- Martin. F., Rubini, P., Côté, R., (1994) Aluminium polyphosphate complexes in the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. A ²⁷Al-nuclear magnetic resonance study. *Planta*, 194:241-246.
- Matsumoto, H. (1988) Inhibition of proton transport activity of microsomal membrane vesicles of barley roots by aluminium. *Soil Sci Plant Nutr.* 34:499-506.
- Matsumoto, H. (2000) Cell biology of aluminum toxicity tolerance in higher plants. *Int Rev Cytol.* 200:1-46.
- Mercier, A., Labbé, S. (2010) Iron-Dependent remodeling of fungal metabolic pathways associated with ferrichrome biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* 76:3806-3817.
- Meriga, B., Reddy, B.K., Rao, K.R., Reddy, L.A., Kishor, P.V.K. (2004) Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *J Plant Physiol.* 161:63-68.
- Michaillat, L., Mayer, A. (2013) Identification of genes affecting vacuole membrane fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 8:e54160.
- Miyasaka, S., Kochian, L., Shaff, J. (1989) Mechanisms of aluminum tolerance in wheat: An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K⁺, and H⁺ transport, and root-cell membrane potentials. *Plant Physiol.* 91:1188-1196.
- Morsomme, P., Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: Structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1465:1-16.
- Nelson N. (1992) The vacuolar H⁺-ATPase-one of the most fundamental ion pumps in nature. *J Exp Biol.* 172:19-27.

- Nelson, N., Harvey, W.R. (1999) Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev.* 79:361-385.
- Nelson, N., Perzov, N., Cohen, A., Hagai, K., Padler, V., Nelson, H. (2000) The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J Exp Biol.* 203:89-95.
- Neuhaus, H.E., Trentmann, O. (2014) Regulation of transport processes across the tonoplast. *Front Plant Sci.* 5:1-8.
- Nishi, T., Forgac, M. (2002) The vacuolar H⁺-ATPases - Nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:94-103.
- Nogueirol, R.C., Monteiro, F.A., Azevedo, R.A. (2015) Tropical soils cultivated with tomato: fractionation and speciation of Al. *Environ Monit Assess.* 187:1-8.
- Nunes-Nesi, A., Brito, D.S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A.R., Araújo, W.L. (2014) The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends Plant Sci.* 19:399-407.
- Nurse, P. (1994) Fission yeast morphogenesis - Posing the problems. *Mol Biol Cell.* 5:613-616.
- Van, H.V. (1998) A mechanistic model for the inhibiting effects of aluminium on the uptake of cations. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkd*, 161:661-670
- Ohsumi, Y., Anraku, Y. (1983) Calcium transport driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 258:5614-5617.
- Okorokov, L.A., Lichko, L.P. (1983) The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. ATPase is electrogenic H⁺-translocase. *FEBS Lett.* 155:102-106.
- Okorokov, L.A., Silva, F.E., Okorokova-Façanha, A.L. (2001) Ca²⁺ and H⁺ homeostasis in fission yeast: A role of Ca²⁺/H⁺ exchange and distinct V-H⁺-ATPases of the secretory pathway organelles. *FEBS Lett.* 505:321-324.
- Okorokova-Façanha, 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: Chakraborti, S., Dhalla, N.S. (eds) *Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPases*. Winnepeg: Springer, p. 551-565.

- Okorokova-Façanha, A.L., Appelgren, H., Tabish, M., Okorokov, L., Ekwall, K. (2002) The endoplasmic reticulum cation P-type ATPase Cta4p is required for control of cell shape and microtubule dynamics. *J Cell Biol.* 157:1029-1039.
- Panda, S.K., Baluska, F., Matsumoto, H. (2009) Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signal Behav.* 4:592-597.
- Pedersen, P.L., Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem Sci.* 12:146-150.
- Perez, P., Rincón, S.A. (2010) Rho GTPases: Regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J.* 426:243-253.
- Pineros, M., Tester, M. (1997) Calcium channels in higher plant cells: selectivity, regulation and pharmacology. *J Exp Bot.* 48:551-577.
- Piñeros, M., Tester, M. (1995) Characterization of a voltage-dependent Ca²⁺-selective channel from wheat roots. *Planta*, 195:478-488.
- Portillo, F. (2000) Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta.* 1469:31-42.
- Portillo, F., Serrano, R. (1989) Growth control strength and active site of yeast plasma membrane ATPase studied by site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem.* 186:501-507.
- Ramsay, L.M., Gadd, G.M. (1997) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol Lett.* 152:293-298.
- Rayle, D.L., Cleland, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99:1271-1274.
- Raymond, C.K., Roberts, C.J., Moore, K.E., Howald, I., Stevens, H. (1992). Biogenesis of the in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Rev Cytol.* 139:59-120.
- Rengel, Z. (1992) Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol.* 121:499-513.
- Rengel, Z. (1996) Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytol.* 134:389-406.
- Rengel, Z., Zhang, W.H. (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytol.* 159:295–314.
- Sade, H., Meriga, B., Surapu, V., Gadi, J., Sunita, M.SL., Suravajhala, P., Kishor, P.B.K. (2016) Toxicity and tolerance of aluminum in plants: Tailoring plants to

- suit to acid soils. *BioMetals*, 29:187-210.
- Samarão, S.S., Teodoro, C.E.S., Silva, F.E., Ribeiro, C.C., Granato, T.M., Bernardes, N.R., Retamal, C.A., Façanha, A.R., Okorokova-Façanha, A.L., Okorokov, L.A. (2009) V H⁺-ATPase along the yeast secretory pathway: Energization of the ER and Golgi membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1788:303-313.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F. (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell*. 11:691-706.
- Sawin, K.E., Nurse, P. (1998) Regulation of cell polarity by microtubules in fission yeast. *J Cell Biol*. 142:457-471.
- Schlessler, A., Ulaszewski, S., Ghislain, M., Goffeau, A. (1988) A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 263:19480-19487.
- Schmitt, M., Watanabe, T., Jansen, S. (2016) The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. *AoB Plants*, 8:plw065.
- Schumacher, K. (2006) Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport. *Curr Opin Plant Biol*. 9:595-600.
- Schwarzerová, K., Zelenková, S., Nick, P., Opatrný, Z. (2002) Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant Cell Physiol*. 43:207-219.
- Serrano, R. (1984) Plasma membrane atpase of fungi and olants as a novel type of proton Pump. *Curr Top Cell Regul*. 23:81-126.
- Serrano R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 40:61-94.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C., Fink, G.R. (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature*; 319:689-693.
- Shen, H., Long, F.H., Sasaki, T., Ymamamoto, Y., Zheng, S.J., Ligaba, A., Yan, X.L., Ahn, S.J., Yamagushi, M., Sasakawa, H., Matsumoto, H. (2005). Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol*. 138:287-296.

- Silva, S. (2012) Aluminium toxicity targets in plants. *J Bot.* 2012:219462.
- Simm, C., Lahner, B., Salt, D., LeFurgey, A., Ingram, P., Yandell, B., Eide, D.J. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. *Eukaryot Cell.* 6:1166-1177.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M. (2016) Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front Plant Sci.* 6:1143.
- Singh, S., Tripathi, D.K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N.K., Chauhan, D. K., Vaculík, M. (2017) Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. *Environ Exp Bot.* 137:177-193.
- Sipiczki, M. (2000) Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol.* 1:1011.1-1011.4.
- Sivaguru, M., Baluška, F., Volkmann, D., Felle, H.H., Hoirst, W.J. (1999) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol.* 119:1073-1082.
- Sivaguru, M., Horst, W.J. (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116:155-163.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Rengel, Z., Ahn, S.J., Matsumoto, H. (2005) Early events responsible for aluminum toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. *New Phytol.* 165:99-109.
- Stauffer, B., Powers, T. (2015) Target of rapamycin signaling mediates vacuolar fission caused by endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 26:4618-1630.
- Sunnerhagen, P. (2002) Prospects for functional genomics in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet.* 42:73-84.
- Sze, H., Li, X., Palmgren, M. (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. *Plant Cell.* 11:677-690.
- Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Milan, S., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., Brok, P., Jensen, L.J., Mering, C.V. (2017). The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 45:D362-D368.

- Tamás, L., Šimonovičová, M., Huttová, J., Mistrík, I. (2003) Changes in the composition of cell wall proteins in barley roots during germination and growth in aluminium presence. *Plant Soil Environ.* 19:327-331.
- Tang, C., Rengel, Z. (2003) Role of plant cation/anion uptake ratio in soil acidification. In: Rengel, Z. (ed) *Handbook of soil acidity*. New York: CRC Press, p. 57-81.
- Tani, A., Inoue, C., Tanaka, Y., Yamamoto, Y., Kondo, H., Hiradate, S., Kimbara, K., Kawai, F. (2008) The crucial role of mitochondrial regulation in adaptive aluminium resistance in *Rhodotorula glutinis*. *Microbiology*, 154:3437-3446.
- Tani, A., Kawahara, T., Yamamoto, Y., Kimbara, J., kawai, F. (2010) Genes involved in novel adaptive aluminum resistance in *Rhodotorula glutinis*. *J Biosci Bioeng.*109:453-458.
- Tani, A., Zhang, D., Duine, J.A., Kawai, F. (2004) Treatment of the yeast *Rhodotorula glutinis* with $AlCl_3$ leads to adaptive acquirement of heritable aluminum resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65:344-348.
- Thion, L., Mazars, C., Nacry, P., Bouchez, D., Moreau, M., Ranjeva, R., Thyleau, P. (1998) Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a longer half-life in ton 2 mutant cells affected in the organization of cortical microtubules. *Plant J.* 13:603-610.
- Véry, A.A., Davies, J.M. (2000) Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9801-9806.
- Vitavska, O., Wiczorek, H., Merzendorfer, H. (2003) A novel role for subunit C in mediating binding of the H^+ -V-ATPase to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 278:18499-184505.
- Wan, Q., Mi, Y., Yang, Y., Renkou, X., Li, X. (2018) Aluminum-enhanced proton release associated with plasma membrane H^+ -Adenosine triphosphatase activity and excess cation uptake in tea (*Camellia sinensis*) plant roots. *Pedosphere*, 28:804-813.
- Wang, C., Wang, C.Y., Zhao, X.Q., Chen, R.F.F., Lan, P., Shen, R.F. (2013a) Proteomic analysis of a high aluminum tolerant yeast *Rhodotorula taiwanensis*

- RS1 in response to aluminum stress. *Biochim Biophys Acta*. 1834:1969-1975.
- Wang, C., Zhao, X.Q., Aizawa, T., Sunairi, M., Shen, R.F (2013b) High aluminum tolerance of *Rhodotorula sp.* RS1 is associated with thickening of the cell wall rather than chelation of aluminum ions. *Pedosphere*, 23:29-38.
- Wang, P., Yu, W., Zhang, J., Rengel, Z., Xu, J., Han, Q., Chen, L., Li, k., Yu, Y., Chen, Q. (2016) Auxin enhances aluminium-induced citrate exudation through upregulation of GmMATE and activation of the plasma membrane H⁺-ATPase in soybean roots. *Ann Bot.* 118:933-940.
- Wang, Y.S., Yang, Z.M. (2005) Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* 46:1915-1923.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E.J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R.G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schäfer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Düsterhöft, A., Fritz, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T.M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dréano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S.J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S.M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V.A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R.R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sánchez, M., del Rey, F., Benito, J., Domínguez, A., Revuelta, J.L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S.L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W.R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G.V., Ussery, D., Barrell, B.G., Nurse, P. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415:817-880.

- Xu, T., Forgac, M. (2001) Microtubules are involved in glucose-dependent dissociation of the yeast vacuolar [H⁺]-ATPase in vivo. *J Biol Chem.* 276:24855-24861.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, R., Matsumoto, H. (2002). Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 128:63-72.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.* 125:199-208.
- Zhang, G., Hoddinott, J., Taylor, G.J. (1994) Characterization of 1,3- β -D-Glucan (Callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminum toxicity. *J Plant Physiol.* 144:229-234.
- Zhang, J., Liu, S., Zhang, L., Nian, H., Chen, L. (2015) Effect of aluminum stress on the expression of calmodulin and the role of calmodulin in aluminum tolerance. *J Biosci Bioeng.* 122:1558-562.
- Zhang, L., Zhang, J.J., Liu, S., Nian, H.J., Chen, L.M. (2017) Characterization of calcineurin from *Cryptococcus humicola* and the application of calcineurin in aluminum tolerance. *BMC Biotechnology*, 17:1-12.
- Zhang, W.H., Rengel, Z. (1999) Aluminium induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. *Aust J Plant Physiol.* 26:401-409.
- Zhao, X.Q., Bao, X.M., Wang, C., Xiao, Z.Y., Hu, Z.M., Zheng, C.L., Shen, R.F. (2017) Hydroxy-Al and cell-surface negativity are responsible for the enhanced sensitivity of *Rhodotorula taiwanensis* to aluminum by increased medium pH. *Arch Microbiol.* 199:1185-1194.
- Zheng, K., Pan, J.W., Ye, L., Fu, Y., Peng, H.Z., Wan, B.Y., Gu, Q., Bian, H.W., Han, N., Wang, J.H., Kang, B., Pan, J.H., Shao, H.H., Wang, W.Z., Zhu, M.Y. (2007) Programmed cell death-involved aluminum toxicity in yeast alleviated by antiapoptotic members with decreased calcium signals. *Plant Physiol.* 143:38-49.
- Zhou, G., Delhaize, E., Zhou, M., Ryan, P.R. (2011) Biotechnological solutions for enhancing the aluminium resistance of crop plants. In: Shanker, A., Venkateswarlu, B. (eds.) *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and*

Adaptations. Rijeka: Intech, p. 119-142.