

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

Diogo Dias Castanheira

**A proteína Lpx1 como elo entre a sinalização de cálcio intracelular e a
ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, induzidas por
glicose, em *Saccharomyces cerevisiae***

Ouro Preto (MG)

2018

Diogo Dias Castanheira

A proteína Lpx1 como elo entre a sinalização de cálcio intracelular e a ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, induzidas por glicose, em *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada à Banca Examinadora do Núcleo de Pesquisas Em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a Obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

Co-orientadora: Dra. Fernanda Godoy-Santos

Co-orientador: Dr. Raphael Hermano Santos Diniz

Ouro Preto (MG), 2018

C274 p

Castanheira, Diogo Dias.

A proteína Lpx1 como elo entre a sinalização de cálcio intracelular e a ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, induzidas por glicose, em células de *Saccharomyces cerevisiae* [manuscrito] / Diogo Dias Castanheira. - 2018.

xiv, 105f.: il.: color; grafs; tabs..

Orientador: Prof. Dr. Rogélio Lopes Brandão.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Fernanda Godoy Santos.
Coorientador: Prof. Dr. Raphael Hermano Santos Diniz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Cálcio. I. Brandão, Rogélio Lopes.
II. Santos, Fernanda Godoy. III. Diniz, Raphael Hermano Santos.

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**



ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 22 dias do mês de março do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese do doutorando Diogo Dias Castanheira, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Rogelio Lopes Brandao (Presidente - UFOP), pelo Prof. Cirano José Ulhoa (Membro - Externo), pelo Prof. Luciano Gomes Fietto (Membro - Externo), pelo Prof. Mauro Cesar Isoldi (Membro - UFOP), pelo Prof. Milton Hercules Guerra de Andrade (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu ao doutorando Diogo Dias Castanheira 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "A Proteína Lpx1 como Elo Entre a Sinalização de Cálcio Intracelular e a Ativação de H⁺-Atpase de Membrana Citoplasmática, Induzidos Por Glicose, em *Saccharomyces Cerevisiae*", na área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas ao candidato sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que o doutorando foi aprovado por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pelo doutorando. Ouro Preto, 22 de março de 2018.

Presidente: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: _____

Doutorando: _____

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob a orientação do Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão e co-orientação da Dra. Fernanda Godoy-Santos e do Dr. Raphael Hermano Santos Diniz.

Auxílio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Programa Doutorado Sanduíche no Exterior – CAPES (Processo BEX 11122/13-7).

DEDICATÓRIA

À minha avó Laurinha, que sempre mostrou que a bondade, a alegria e o amor são sentimentos que podemos cultivar por toda a vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão, agradeço pela orientação deste trabalho e por contribuir para o meu aprendizado e crescimento durante o tempo em que fiz parte do grupo de pesquisa do LBCM.

Ao Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro, obrigado por sempre estar disponível para auxiliar e contribuir de maneira fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Fernanda Godoy-Santos e ao Dr. Raphael Hermano Santos Diniz, pela co-orientação do trabalho e por sempre me incentivarem.

Aos técnicos Maria José Trópia (Zezé) e Geraldo Sampaio, muito obrigado por sempre estarem dispostos a ajudar e pelo convívio.

Ao Dr. Fábio Faria, pelo convívio e contribuição durante o tempo em que estive no LBCM.

À Thalita Macedo, Anna Clara Campos, Patrícia Gonçalves e Bruna Figueiredo, muito obrigado pela amizade, pelos momentos necessários de descontração e por sempre me ajudarem quando precisei.

Aos colegas que estão/estiveram no LBCM durante o meu doutorado, Aureliano Cunha, Eduardo Perovano, Hygor Mezdri e Maria Ana Bessa, muito obrigado por tudo.

À Renata Rebeca, muito obrigado pelas palavras de incentivo sempre oportunas e por toda a ajuda, quando eu mais precisava.

Aos meus “filhos” de laboratório e agora meus amigos, Débora Albuquerque, Heloá Teixeira e Marcos Vinícius (Palitinho), obrigado pela amizade e companheirismo.

Ao Sr. José Raimundo e D. Amélia, que junto com seus filhos Ester, Daniel e André Kassis, fizeram com que eu me sentisse em família durante vários momentos especiais em Ouro Preto. Muito obrigado!

Aos amigos que a vida me fez encontrar em Ouro Preto, Audalice (Dadá), Amanda, Caio, Sabeline e Rodrigo (Diguinho). Obrigado pela convivência e por todo o tempo que gastamos aproveitando o que Ouro Preto tem de melhor!

Aos colegas de mestrado que viraram meus amigos do doutorado, Victor, Cyntia, José Augusto e Maurício. Obrigado!

Aos meus pais e irmãos, que mesmo de longe, se fizeram sempre presentes e foram meu porto seguro quando necessário.

Aos amigos, aos familiares e à todos que, mesmo não citados nominalmente, sei que sempre torceram por mim e acreditaram que esse dia chegaria.

Ao NUPEB e aos seus professores, pela estrutura física e pela disponibilização dos laboratórios/equipamentos.

À UFOP, pelo ensino público, gratuito e de qualidade.

À Capes, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

Castanheira, D.D. A proteína Lpx1 como elo entre a sinalização de cálcio intracelular e a ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, induzidas por glicose, em *Saccharomyces cerevisiae*. 2017. Tese (Doutorado) – NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

Em leveduras, como em outros eucariotos, o cálcio desempenha um papel essencial nas vias de sinalização celular. No entanto, até agora, a influência do cálcio na ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática induzida por glicose, uma via essencial para a fisiologia de leveduras, não foi demonstrada apesar de muitas evidências sugerirem que o cálcio é um fator primordial envolvido na ativação de H⁺-ATPase. H⁺-ATPase é uma proteína de membrana citoplasmática essencial para criar um gradiente de H⁺, utilizado para o transporte de nutrientes e homeostase do pH. A ativação de H⁺-ATPase é regulada pela atividade de diferentes proteínas como proteases, quinases e canais iônicos. Neste trabalho, foi demonstrada a relação entre a atividade de Lpx1p, uma serino-protease essencial para a ativação induzida por glicose de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, e o cálcio. Mutantes *lpx1Δ* exibiram um sinal de cálcio intracelular que não foi afetado enquanto a atividade de bombeamento de prótons foi reduzida, indicando sua essencialidade na ativação de H⁺-ATPase. Além disso, o aumento da atividade de bombeamento de prótons foi observado quando Lpx1p foi expresso em células *lpx1Δ* por meio de um vetor de expressão induzível. Em testes *in vitro*, a atividade proteolítica de Lpx1p aumentou na presença de cálcio. Dos ensaios *in vitro*, estabelecidos neste trabalho, foi demonstrado que Lpx1p, Ptk2p e cálcio são elementos-chave para a ativação de H⁺-ATPase. Esses resultados fortalecem um modelo em que a ativação pós-traducional de H⁺-ATPase induzida pela glicose e a sinalização de cálcio intracelular, estão realmente conectadas. Lpx1p seria este elo, aparentemente, dependendo da presença de cálcio para ser ativada e hidrolisar tubulinas acetiladas ligadas à H⁺-ATPase, permitindo a liberação da cauda C-terminal para fosforilação e ativação.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, H⁺-ATPase, Lpx1p, cálcio

ABSTRACT

Castanheira, D.D. Lpx1p protein as a link between glucose-induced intracellular calcium signaling and plasma membrane H⁺-ATPase activation in *Saccharomyces cerevisiae*. 2017. Tese (Doutorado) – NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

In yeast, as in other eukaryotes, calcium plays an essential role in cellular signaling transduction pathways. However, until now, calcium influence in plasma membrane H⁺-ATPase glucose-induced activation, an essential pathway for yeast physiology, has not been demonstrated although many pieces of evidences suggesting that calcium is a key factor for H⁺-ATPase activation. H⁺-ATPase is a plasma membrane protein essential to create the gradient of H⁺ used to nutrient transport and pH homeostasis. Its activation is regulated by activity of different proteins like proteases, kinases and ion channels. In this work, the relationship between Lpx1p activity, a serine-protease essential to the plasma membrane H⁺-ATPase glucose-induced activation, and calcium was demonstrated. Mutants *lpx1Δ* showed unaffected intracellular calcium signaling while its proton pumping activity was reduced, indicating its essentiality in the H⁺-ATPase activation. Additionally, increase in proton-pumping activity was observed when Lpx1p was expressed in *lpx1Δ* cells through an inducible expression vector. In *in vitro* tests, Lpx1p proteolytic activity increased in presence of calcium. From *in vitro* assays, established in this work, was demonstrated that Lpx1p, Ptk2p and calcium are key elements to H⁺-ATPase activation. These results strengthen a model which H⁺-ATPase post-translational activation, induced by glucose, and intracellular calcium signaling are indeed connected. Lpx1p would be this link by, apparently, depending on calcium presence to be activated and to hydrolyze acetylated tubulins bound to the plasma membrane H⁺-ATPase, allowing its C-terminus tail release to phosphorylation and activation.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, H⁺-ATPase, Lpx1p, calcium

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIACÕES	xi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Sinalização celular	2
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.3 Sinalização celular em leveduras	6
1.3.1 Sinalização de glicose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.3.2 Sinalização de cálcio em leveduras	11
1.4 Sinalização celular e fosforilação de proteínas	13
1.5 H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.5.1 Ativação de H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática induzida por glicose em leveduras	20
1.5.2 Lpx1p e ativação de H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Cepas de levedura utilizadas	29
3.2 Meios de crescimento	31
3.2.1 Meio YP	31
3.2.2 Meio mínimo sintético (SD)	31
3.2.3 Meio LB	31
3.3 Condições de crescimento	32
3.4 Vetores e plasmídeos	32
3.5 Iniciadores utilizados nos experimentos	32

3.6 Clonagem gênica e obtenção dos vetores para transformação.....	33
3.6.1 Condições da reação em cadeia de polimerase (PCR).....	33
3.6.2 Ligação e transformação de bactérias.....	33
3.6.3 Extração de DNA plasmidial em pequena escala.....	35
3.7 Transformação de leveduras.....	35
3.7.1 Preparo de células competentes.....	35
3.7.2 Transformação de células competentes.....	36
3.8 Monitoramento <i>in vivo</i> da concentração de cálcio citosólico livre.....	36
3.9 Busca em banco de dados para sítios potenciais de ligação com cálcio em Lpx1p.	37
3.10 Obtenção de Lpx1p para ensaios de atividade proteolítica e de ativação <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase.....	37
3.10.1 Crescimento celular e indução.....	37
3.10.2 Extração de proteínas e enriquecimento utilizando coluna de afinidade.....	38
3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida e <i>Western Blottin</i>	39
3.11.1 Condições da eletroforese.....	39
3.11.2 Coloração e revelação por prata.....	39
3.11.3 <i>Western Blotting</i>	40
3.12 Atividade proteolítica.....	40
3.13 Medida de atividade de H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática.....	41
3.13.1 Acidificação extracelular induzida por glicose.....	42
3.13.2 Medida de hidrólise de ATP em extratos contendo membranas citoplasmáticas purificadas.....	43
3.13.2.1 Obtenção de extratos contendo membranas citoplasmáticas.....	43
3.13.2.2 Determinação de atividade de hidrólise de ATP por H ⁺ -ATPase.....	44
3.14 Ativação <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática.....	45
3.14.1 Purificação de membranas citoplasmáticas.....	46
3.14.2 Obtenção de extratos livres de membranas.....	46
3.14.3 Ativação <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase e ensaio de atividade ATPásica.....	47
3.15 Análises estatísticas.....	48

4. RESULTADOS	50
4.1 Influência de Lpx1p sobre a atividade de H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática e no sinal de cálcio intracelular	50
4.2 Busca <i>in silico</i> por sítios de ligação com cálcio na estrutura da proteína Lpx1.....	53
4.3 Clonagem do gene <i>LPXI</i> e <i>LPXI</i> modificado no vetor pYES2/CT e transformação de leveduras	53
4.3.1 Amplificação e clonagem de <i>LPXI</i>	53
4.3.2 Obtenção de <i>LPXI</i> modificado e clonagem no vetor pYES2/CT.....	56
4.3.3 Extração e purificação de pYES2/CT-VV, pYES2/CT- <i>LPXI</i> e pYES2/CT- <i>LPXI</i> -MOD	56
4.3.4 Transformação de leveduras	56
4.3.5 Verificação de indução de Lpx1p no vetor pYES2/CT- <i>LPXI</i>	58
4.4 Atividade de ATPase em membranas citoplasmáticas de células transformadas com pYES2/CT-VV e pYES2/CT- <i>LPXI</i>	60
4.5 Enriquecimento de extratos contendo Lpx1p e Lpx1p modificada utilizando coluna de afinidade a níquel	60
4.5.1 Confirmação da presença de Lpx1p e Lpx1p modificada com cauda de histidina por <i>Western Blotting</i>	62
4.6 Atividade de Lpx1p e regulação por cálcio.....	65
4.6.1 Atividade proteolítica em membranas totais.....	65
4.6.2 Atividade proteolítica de Lpx1p isolada de gel de poliacrilamida	65
4.7 Ativação <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática.....	67
4.7.1 Definição preliminar das condições do ensaio <i>in vitro</i>	67
4.7.2 Ensaio de ativação e inibição <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase.....	69
4.7.3 Avaliação de Lpx1p e Ptk2p na ativação <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase.....	71
4.7.4 Avaliação de eluatos contendo Lpx1p e Lpx1p modificada na ativação <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase	71
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÕES	86
7. PERSPECTIVAS	88

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXO A	102
ANEXO B	103
ANEXO C	104
ANEXO D	105

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Princípios gerais da sinalização celular	3
Figura 2 – Principais vias de sinalização em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figura 3 – Representação esquemática das vias de sinalização de glicose em leveduras	10
Figura 4 – Principais vias de influxo de cálcio extracelular e de regulação interna dos níveis de Ca^{2+}	14
Figura 5 – Modelo topológico de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática em fungos	18
Figura 6 – Estrutura cristalográfica de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática de <i>Arabidopsis thaliana</i> (H^+ -ATPase 2 – <i>AHA2</i>)	19
Figura 7 – Modelo de ativação da H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, induzida por glicose	21
Figura 8 – Mecanismo hipotético de ativação da H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, induzido por glicose	24
Figura 9 – Efeitos de diferentes deleções na atividade de bombeamento de prótons de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa PJ69)	51
Figura 10 – Efeitos de diferentes deleções na sinalização de cálcio intracelular em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa PJ69)	52
Figura 11 – Busca <i>in silico</i> por sítios de ligação com cálcio em Lpx1p	54
Figura 12 – Confirmação da amplificação de <i>LPXI</i> da cepa BY4741	55
Figura 13 – Amplificação de <i>LPXI</i> em bactérias transformadas com o vetor pYES2/CT- <i>LPXI</i>	55

Figura 14 – Confirmação da clonagem de <i>LPXI</i> modificado em pYES2/CT em bactérias transformadas com o vetor pYES2/CT- <i>LPXI</i> -MOD	57
Figura 15 – Transformação de células de BY4741 <i>lpx1Δ</i> com os plasmídeos pYES2/CT-VV, pYES2/CT- <i>LPXI</i> e pYES2/CT- <i>LPXI</i> -MOD	57
Figura 16 – Atividade de bombeamento de prótons em células de leveduras transformadas com os plasmídeos pYES2/CT-VV e pYES2/CT- <i>LPXI</i>	59
Figura 17 – Atividade ATPásica em membranas plasmáticas de BY4741 <i>lpx1Δ</i> transformadas com os plasmídeos pYES2/CT-VV e pYES2/CT- <i>LPXI</i> após indução com galactose	61
Figura 18 – Perfil de bandas de proteínas após extração e enriquecimento de Lpx1p com cauda de histidina de células de BY4741 <i>lpx1Δ</i> transformadas com diferentes plasmídeos	63
Figura 19 – <i>Western Blotting</i> de eluatos obtidos após enriquecimento de Lpx1p de células de BY4741 <i>lpx1Δ</i> transformadas com diferentes plasmídeos	64
Figura 20 – Atividade proteolítica em membranas totais de BY4741 e BY4741 <i>lpx1Δ</i>	66
Figura 21 – Atividade proteolítica de Lpx1p isolada de gel de poliacrilamida	66
Figura 22 – Atividade ATPásica em membranas plasmáticas de BY4741 medida em diferentes tempos	68
Figura 23 – Atividade ATPásica em membranas plasmáticas de BY4741 pré-incubadas com diferentes concentrações de extrato livre de membranas (ELM)	68
Figura 24 – Atividade ATPásica em membranas plasmáticas de BY4741 pré-incubadas com diferentes concentrações cálcio	70
Figura 25 – Ativação <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase: efeito da adição de cálcio, extrato livre de membranas e ortovanadato de sódio	70
Figura 26 – Ativação <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase: avaliação do efeito de Lpx1p e Ptk2p	72
Figura 27 – Ativação <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase: avaliação da adição Lpx1p em associação com extrato livre de membranas de BY4741 <i>ptk2Δ</i>	72

Figura 28 – Ativação <i>in vitro</i> de H ⁺ -ATPase: avaliação da adição Lpx1p e Lpx1p modificada em associação com extrato livre de membranas de BY4741 <i>lpx1</i> Δ	74
Figura 29 – Mecanismo de ativação de Lpx1p por cálcio e ativação de H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática	82
Figura 30 – Modelo proposto da via de sinalização celular para ativação, induzida por glicose, de H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática	84

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Cepas de leveduras utilizadas neste trabalho (cepa PJ69)	29
Tabela 2 – Cepas de leveduras utilizadas neste trabalho (cepa BY4741)	30
Tabela 3 – Iniciadores utilizados	32

LISTA DE ABREVIACÕES

Abs.710nm: absorbância medida a 710 nanômetros

AEQ1: gene que codifica para a proteína apoeaquorina

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

ANSA: ácido 1-amino-2-hidróxi-naftaleno-sulfônico

ARG82: gene que codifica para inositol polifosfato multiquinase Arg82p (envolvida no processo de fosforilação de IP₃ em IP₄/IP₅)

ATP: adenosina trifosfato

AU/mL: unidade arbitrária por mililitro

BCY1: gene que codifica para subunidade regulatória da proteína quinase A (PKA) – Bcy1p

CCH1: gene que codifica para o canal Cch1p (envolvida na regulação de influxo de cálcio em sistema de alta afinidade)

CYR1: gene que codifica para adenilato ciclase (Cyr1p)

DAG: diacilglicerol

dNTPs: desoxirribonucleotídeos trifosfatados

ECM7: gene que codifica para proteína integral de membrana putativa envolvida no influxo de cálcio (Ecm7p)

ELM: extrato livre de membranas

ETCC: elevação transitória de cálcio citosólico

EUROSCARF: European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis

FIG1: gene que codifica para o canal Fig1p (envolvida no processo de acasalamento e regulação de influxo de cálcio em sistema de baixa afinidade)

FLC: conjunto de genes que codificam para canais de cálcio tipo-TRP

g/mL: gramas por mililitro

GDT1: gene que codifica para antiporter Ca²⁺/H⁺ do retículo endoplasmático (Gdt1p)

GIC: canal de cálcio induzido por glicose

GPA2: gene que codifica para a subunidade alfa da proteína G (Gpa2p)

GPRI: gene que codifica para o receptor acoplado à proteína G na membrana citoplasmática (Gpr1p)

GRR1: gene que codifica para proteína componente do complexo de degradação proteica SCF (Grr1p)

HACS: sistema de influxo de cálcio de alta afinidade/baixa capacidade

HEPES: ácido etano-sulfônico-4,2-hidroxi-etil-piperazina

HXK1 e *HXK2*: genes que codificam para proteínas que catalisam a fosforilação de glicose no citoplasma

HXTs: família de genes que codificam para transportadores de hexoses em levedura

IP₃: inositol-1,4,5-trifosfato

kDa: quilodáton(s)

K_m: constante de Michaelis-Menten

LACS: sistema de influxo de cálcio de baixa afinidade/alta capacidade

LB: Luria-Bertaini

LPX1: gene que codifica para a proteína Lpx1p

M: molar

MIDI: gene que codifica para o canal Mid1p (canal de cálcio requerido para influxo do íon em resposta à estímulo por feromônios e interage com o canal Cch1p)

MIG1: gene que codifica para o fator de transcrição envolvido na repressão por glicose (Mig1p)

MIG2: gene que codifica para o fator de transcrição envolvido na repressão por glicose (Mig2p)

mL: mililitro

mM: milimolar

mmol: milimol

MTH1: gene que codifica para o regulador negativo da via de sinalização relacionada ao sensoriamento de glicose (Mth1p)

ng: nanograma

nm: nanômetros

p/p: peso por peso

p/v: peso por volume

pb: pares de base

PCR: reação em cadeia de polimerase

PDB: Protein Data Bank

pg: picograma

PGM1 e *PGM2*: genes que codificam para a proteína fosfoglicomutase (catalisa a conversão de glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato)

pH: potencial hidrogeniônico

PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato

PKA: proteína quinase A

PLC1: gene que codifica para a Fosfolipase C – Plc1p (catalisa a hidrólise de PIP₂ em diacilglicerol e IP₃)

PMCI: gene que codifica para Ca²⁺-ATPase vacuolar (Pmc1p)

pmol: picomol

PMR1: gene que codifica para Pmr1p, ATPase presente no complexo de Golgi (necessária para o transporte de Ca²⁺ e Mn²⁺ para a organela)

PTK2: gene que codifica para serina-treonina quinase Ptk2p (envolvida no processo de ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática)

pVTU-AEQ: plasmídeo obtido pela inserção do fragmento do gene AEQ1 (permite expressão de apoeaquorina)

pYES2/CT: plasmídeo que permite a expressão induzível por galactose de proteínas recombinantes fundidas a uma cauda contendo seis histidinas

RAS1 e *RAS2*: genes que codificam para GTPases envolvidas na sinalização por proteína G (Ras1p e Ras2p)

RGT1: gene que codifica para fator de transcrição responsivo à glicose (Rgt1p)

RGT2: gene que codifica para a proteína Rgt2p (sensor de glicose da membrana citoplasmática de alta afinidade)

RLU/s: unidades relativas de luminescência por segundo

rpm: rotações por minuto

SAK1: gene que codifica para a proteína Sak1p (serina/treonina quinase para o complexo SNF1)

SCF: complexo envolvido na degradação de proteínas por ubiquitinação

SD –URA: meio sintético sem adição da base nitrogenada uracila

SNF1: gene que codifica para proteína quinase ativada por AMP cíclico (Snf1p)

SNF3: gene que codifica para a proteína Snf3p (sensor de glicose da membrana citoplasmática de baixa afinidade)

SPF1/COD1: codificam para a Ca^{2+} -ATPase presente no retículo endoplasmático

SRCH: sistema responsivo à choque hipotônico (influxo de cálcio extracelular)

SSN6: gene que codifica para o co-repressor transcricional Ssn6p (atua em conjunto com a proteína Tup1)

STD1: gene que codifica para proteína envolvida na expressão gênica regulada por glicose (Std1p)

TUP1: gene que codifica para o repressor transcricional Tup1p

V: volts

v/v: volume por volume

VCX1: gene que codifica para antiporter $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ e trocador $\text{K}^{+}/\text{H}^{+}$ de membrana vacuolar (Vcx1p)

$V_{\text{máx}}$: velocidade máxima

VNX1: gene que codifica para antiporter $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ do retículo endoplasmático (Vnx1p)

WT: cepa selvagem

YCK1 e *YCK2*: genes que codificam para as isoformas de caseína-quinase (Ykc1p e Yck2p)

YOR365C: gene que codifica para proteína putativa YOR365Cp (canal de cálcio tipo-TRP)

YVC1: gene que codifica para o canal de cálcio vacuolar (Yvc1p)

μg : micrograma

$\mu\text{g}/\text{mL}$: micrograma por mililitro

μL : microlitro

μM : micromolar

μmol : micromol

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sinalização celular

Todas as células, independentemente se vivem como indivíduos isolados ou em um organismo multicelular, são estimuladas por sinais externos de forma constante e por diferentes maneiras. É a habilidade dos organismos, ou células individuais, de perceber e de responder ao seu ambiente que se torna crucial para sua sobrevivência (HANCOCK, 2017). A sinalização celular engloba um sistema que regula atividades e funções celulares que são fundamentais para a manutenção da vida. Por meio de proteínas receptoras presentes em sua membrana citoplasmática, uma célula pode perceber alterações no pH, na pressão osmótica, a presença de nutrientes e outros diferentes sinais/variações no meio extracelular (CLAPHAM, 2007). Células respondem à fatores externos utilizando diferentes vias de sinalização que são ativadas por receptores presentes na membrana citoplasmática, como por exemplo receptores associados à proteína G e também receptores tirosina-quinase. Estas rotas não só simplesmente transmitem, mas também processam, codificam e integram os sinais internos e externos (KHOLODENKO, 2006).

Os princípios gerais e os componentes dos mecanismos de sinalização são essencialmente os mesmos nos diferentes organismos vivos, como bactérias, fungos, plantas e animais (**Figura 1**). Em uma visão mais generalista e didática, a sinalização celular envolve inicialmente mecanismos que percebem a chegada de estímulos que requerem uma resposta da célula. Este mecanismo de percepção e resposta segue na maioria das vezes os seguintes passos funcionais: 1) percepção do sinal, usualmente por proteínas denominadas receptores; 2) transmissão do sinal pelo receptor para o interior da célula (ou para o próximo componente da via de sinalização se o receptor for intracelular); 3) passagem da mensagem para uma série de componentes de sinalização celular (denominado geralmente de cascata de sinalização celular); 4) chegada da mensagem ao seu destino no interior da célula; 5) resposta celular, para que haja uma efetiva alteração/modificação na fisiologia da célula devido ao estímulo inicial (HANCOCK, 2017).

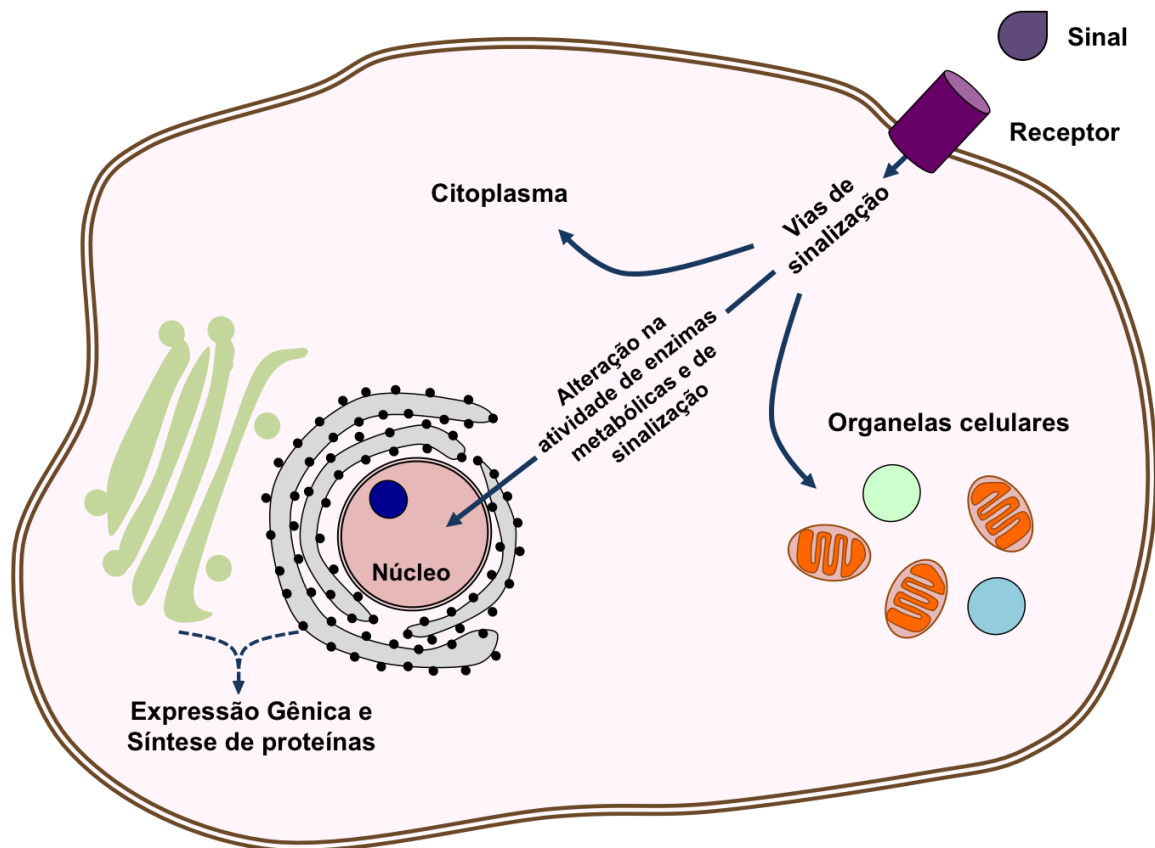


Figura 1 – Princípios gerais da sinalização celular. O sinal é percebido pelo receptor presente na membrana citoplasmática que, em seguida, transmite o sinal para o interior da célula, através de diversas vias/cascatas de sinalização. Essas vias/cascatas podem ter como destino final o próprio citoplasma, sinalizar para diferentes organelas celulares, modificando a atividade de enzimas metabólicas e de sinalização e também ter como finalidade o estímulo da expressão gênica no núcleo, seguida pela síntese de novas proteínas (HANCOCK, 2017).

Assim, a resposta ao sinal pode se dar em diferentes organelas e locais na célula. Algumas cascatas têm seu destino final no citoplasma, como por exemplo no controle de metabolismo do glicogênio, enquanto outras podem finalizar no núcleo, estimulando o controle da expressão gênica. Dentre os principais eventos de sinalização celular estão aqueles que fazem com que haja alteração no padrão de comportamento da célula, através da geração de cascatas de fosforilação de proteínas, que por sua vez ativam/inativam enzimas, assim como modulam fatores de transcrição que modificam a expressão gênica. Dessa forma, o conhecimento e o entendimento do sistema de sinalização em um tecido ou em diferentes organismos é muitas vezes utilizado para acelerar o descobrimento de um sistema análogo em um outro tecido ou em uma espécie diferente (ALBERTS *et al.*, 2002; HANCOCK, 2017).

1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

O nome “levedura” é um termo coletivo, sendo mais frequentemente utilizado para descrever a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que o termo levedura refere-se a uma substância necessária para o processo de produção de pão e álcool. O estudo da fermentação por células de levedura iniciou-se em 1787 com Adamo Fabbroni (1748-1816) em seu livro, *Ragionamento sull'arte di far vino*. Em 1857, Louis Pasteur descobriu que a substância responsável pela fermentação era um organismo vivo. Seu nome científico, *Saccharomyces cerevisiae*, foi dado em função da alta afinidade por açúcar (*Saccharo-*) por este fungo (*-myces*) e do seu uso na fabricação de cerveja ou *cervoise (cerevisiae)* (FEYDER *et al.*, 2015).

Saccharomyces cerevisiae é um dos modelos de organismos eucariotos mais bem estudados e caracterizados, principalmente devido à sua organização intracelular, uma maior facilidade de manipulação comparada a eucariotos superiores e também por apresentar um tempo de geração curto. Uma outra vantagem é a sua conveniência de uso em estudos genéticos, já que *Saccharomyces cerevisiae* possui um genoma relativamente pequeno, em relação a outros eucariotos, com aproximadamente 6000 genes. Suas células podem crescer de forma estável como haploides ou diploides, sendo assim possível o uso tanto de técnicas de genética clássica (com o cruzamento de células de tipo sexual opostos, *MATa* e *MATα*) como também modificações que envolvem

o uso de técnicas de biologia molecular (GOFFEAU *et al.*, 1996; ARORA, 2003; AMBERG *et al.*, 2005; FEYDER *et al.*, 2015).

Ademais, devido à sua maquinaria celular ser similar a de organismos multicelulares, *Saccharomyces cerevisiae* tem sido continuamente utilizada como organismo modelo e assim contribuído para o entendimento de uma variedade de processos celulares, como replicação e reparo de DNA, ciclo celular, transcrição e remodelamento de cromatina, síntese e degradação proteica, transporte, meiose, recombinação, assim como em estudos de sinalização celular (MICHELS, 2002; ENGELBERG *et al.*, 2014).

Em estudos de sinalização celular, a utilização de leveduras como modelo deve-se ao fato da similaridade existente entre os conceitos de sinalização celular de leveduras e mamíferos, demonstrado pela primeira vez com a descoberta da via de acasalamento em leveduras e posteriormente com a cascata Ras/cAMP. Além disso, foi demonstrado também a semelhança e a intercambialidade dos componentes envolvidos. Posteriormente, estudos demonstraram que *Saccharomyces cerevisiae* está sujeita a modificações em seu desenvolvimento que envolvem interações célula-célula e também comunicação célula-célula, sugerindo que esta pode ser utilizada como organismo modelo para processos multicelulares (ENGELBERG *et al.*, 2014).

Além de ser um organismo modelo, leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são usadas em diversas aplicações industriais na produção de importantes produtos utilizados e consumidos pelo homem, como o pão, vinho, cerveja e bebidas destiladas. A produção de etanol combustível, a partir da utilização de leveduras no processo de fermentação, possui também uma grande relevância. Muitas características desse organismo o torna ideal para utilização em diferentes processos biotecnológicos. Sua parede celular espessa auxilia na sobrevivência na ocorrência de choque osmótico e, em contraste com bactérias, as leveduras são resistentes à vírus. A sua forma unicelular facilita o seu cultivo, escalonamento de processos e também a coleta de células (DOMINGUES *et al.*, 2000; RILEY *et al.*, 2016).

O uso de leveduras na produção de bebidas fermentadas e pães constituem as mais antigas formas de utilização deste organismo. Durante a fermentação, além de produzir gás carbônico e etanol, há também a formação de diferentes compostos secundários, que tem impacto sobre a qualidade do produto final (HEITMANN *et al.*,

2017). Com o uso de técnicas de engenharia genética, e também por meio de genética clássica através de cruzamentos, pode-se obter, por exemplo, cepas que sejam mais eficientes na produção de elementos que melhoram as características sensoriais de bebidas fermentadas, como vinhos e cervejas (BAUER e DICKS, 2017; CARVALHO *et al.*, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2017; PRETORIUS, 2017; VOLSCHENK *et al.*, 2017; DENBY *et al.*, 2018).

A produção industrial de etanol por leveduras é, sem dúvida, uma de suas aplicações mais importantes. O uso de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol de primeira geração é bastante difundido em países como o Brasil e Estados Unidos (BEATO *et al.*, 2016) e, mais recentemente, o uso destas leveduras para produção de etanol de segunda geração, utilizando-se fontes de carbono alternativas ao açúcar e/ou amido usados na produção de etanol de primeira geração, tem sido investigado. A produção de etanol de segunda geração em larga escala é atualmente baseada principalmente na fermentação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas capazes de metabolizar os açúcares produzidos por esse processo de hidrólise (JANSEN *et al.*, 2017).

Saccharomyces cerevisiae também é utilizada em diferentes processos biotecnológicos para produção de enzimas, proteínas recombinantes e de compostos de interesse comercial, como os ácidos succínico, láctico, málico e fumárico e também isobutanol, sendo utilizadas diferentes técnicas de engenharia genética para geração de cepas capazes de produzi-los de forma eficiente (BORODINA e NIELSEN, 2014; TURANLI-YILDIZ *et al.*, 2017; MANS *et al.*, 2018).

1.3 Sinalização celular em leveduras

As principais vias de sinalização identificadas em *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 2**) são vias ortólogas em eucariotos superiores e muitos dos componentes envolvidos são funcionalmente intercambiáveis, porém, para algumas proteínas essenciais em leveduras, as equivalentes em metazoários ainda não foram identificadas. Por outro lado, a contraparte de alguns componentes importantes das vias de sinalização em eucariotos superiores também não estão presentes em leveduras (ENGELBERG *et al.*, 2014).

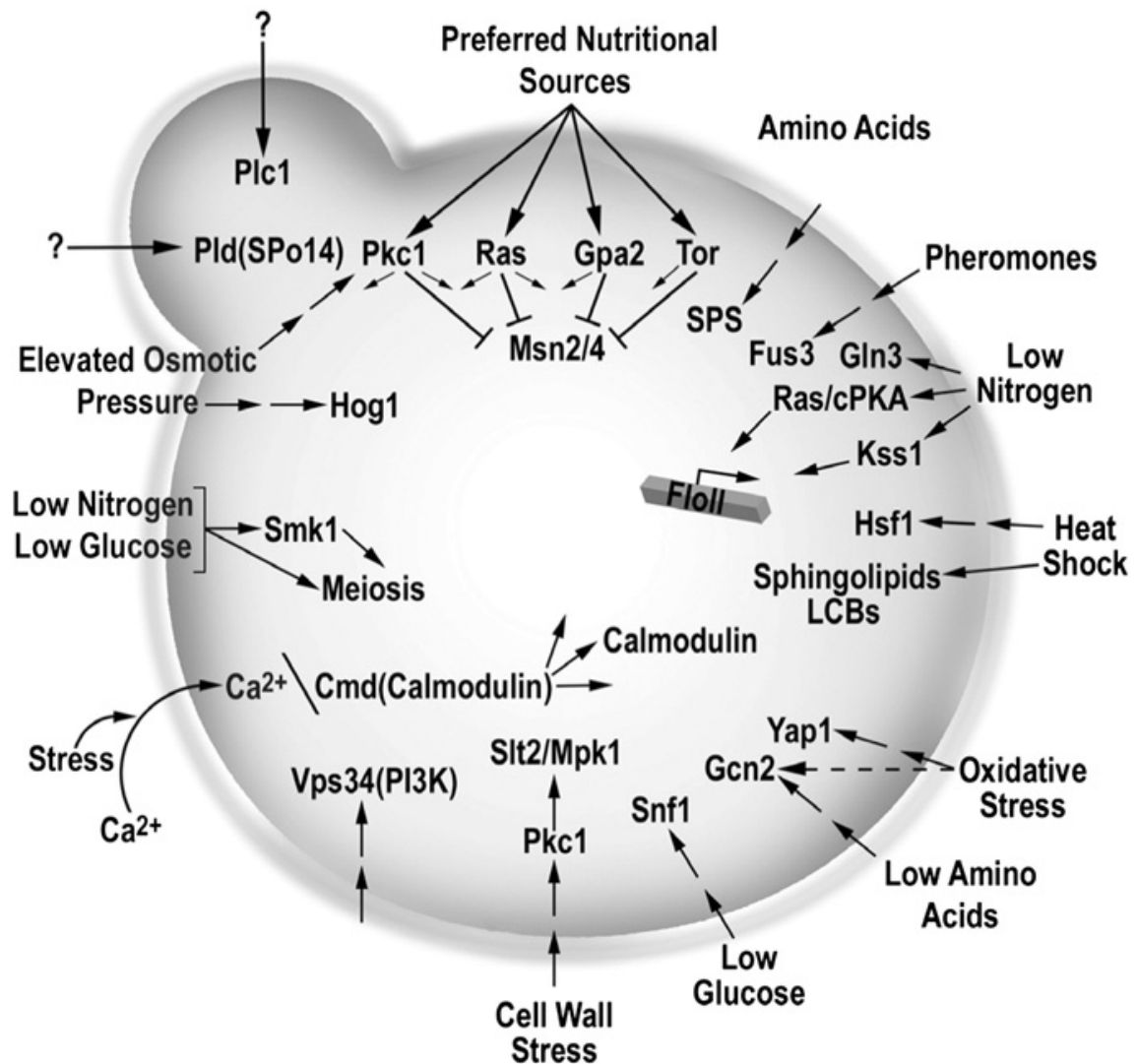


Figura 2 – Principais vias de sinalização em *Saccharomyces cerevisiae*. As vias de sinalização para resposta ao choque térmico, feromônios, estresse oxidativo, pressão osmótica e à presença de nutrientes, cálcio, aminoácidos e fontes de carbono, presentes em *Saccharomyces cerevisiae*, estão demonstradas. Retirado de ENGELBERG, D.; PERLMAN, R.; LEVITZKI, A. Transmembrane signaling in *Saccharomyces cerevisiae* as a model for signaling in metazoans: State of the art after 25 years. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 12, p. 2866, 2014.

Em organismos multicelulares, mensageiros extracelulares ativam rotas de sinalização que tem efeito sobre a proliferação, no desenvolvimento ou modificação do metabolismo de células alvo; em leveduras, os nutrientes são os principais agentes que sinalizam para a ocorrência de eventos de alteração ou resposta metabólica (THEVELEIN, 1994). A capacidade de ser responsiva à variação da oferta de nutrientes e também à outras variações ambientais (temperatura, osmolaridade, ação de hormônios, etc.), faz com que *Saccharomyces cerevisiae* possa se adaptar rapidamente à diferentes mudanças (HOHMANN *et al.*, 1999; NEWCOMB *et al.*, 2003; HOLSBEEKS *et al.*, 2004). Nutrientes, como a glicose, que agem como moléculas sinalizadoras em leveduras, têm sido sugeridos como os recursos que constituem as vias primárias de sinalização celular, que posteriormente foram modificadas e/ou duplicadas para servirem como vias de sinalização para fins mais complexos, como a resposta a feromônios, temperatura, estresse, dentre outros (THEVELEIN, 1994).

1.3.1 Sinalização de glicose em *Saccharomyces cerevisiae*

A glicose é a principal fonte de energia para a maioria dos organismos vivos e, em *Saccharomyces cerevisiae*, esse açúcar é preferencialmente metabolizado via fermentação. Embora o rendimento de ATP via fermentação é menor do que via respiração, a taxa de crescimento de *S. cerevisiae* é maior nestas condições. Outras fontes de carbono e de energia, como o glicerol, o etanol e o acetato, são utilizadas para respiração e mantém taxas de crescimento menores. Alguns açúcares, como a galactose, são lentamente fermentados e parcialmente respirados (PEETERS e THEVELEIN, 2014).

A preferência de *Saccharomyces cerevisiae* por glicose e açúcares rapidamente fermentados, como frutose e manose, é demonstrada pela existência das múltiplas vias regulatórias que são desencadeadas pela presença desses açúcares, que tem como principal objetivo o estímulo da fermentação e da proliferação celular. Em leveduras, a regulação por esses açúcares pode ocorrer em diferentes níveis: alostérico, pós-traducional e transcricional (PEETERS e THEVELEIN, 2014).

A presença de glicose desencadeia amplas mudanças na levedura que se adapta para utilizá-la eficientemente e em detrimento de outras fontes de carbono

disponíveis. Estas mudanças incluem regulação da expressão gênica aos níveis transcricional e pós-transcricional, como também em nível traducional e pós-traducional. Para que estas adaptações ocorram, a levedura deve perceber a presença de glicose e transmitir o sinal para os efetores apropriados. Três sistemas de sensoriamento de glicose já foram descritos em *S. cerevisiae*. Um deles opera através da proteína quinase Snf1p que causa a repressão de expressão gênica quando os níveis de glicose são altos enquanto um outro mecanismo trabalha através dos sensores de glicose Snf3p e Rgt2p, para induzir a expressão de genes codificadores para transportadores de glicose. Um terceiro mecanismo emprega o receptor acoplado à proteína G, Gpr1p, e utiliza o AMP cíclico como segundo mensageiro (KANIAK *et al.*, 2004).

As três vias de sensoriamento e sinalização de glicose desempenham papéis distintos mas que interagem na indução de expressão de genes que codificam transportadores desse açúcar (*HXTs*). A inativação induzida por glicose de Mth1p é um evento crucial na modulação na função de Rgt1p. De fato, os níveis de Mth1p são estritamente controlados pela coordenação das vias que são induzidas e reprimidas por glicose e além disso, o sinal de repressão por glicose que inativa a quinase Snf1p é gerado em função do próprio metabolismo desse carboidrato (KIM *et al.*, 2013).

Em leveduras, as vias de sinalização por glicose se interpõem e podem ser resumidas da seguinte maneira, conforme esquematizado na **Figura 3**: YckI (Yck1p e Yck2p) fosforila Mth1p e Std1p após ativação, iniciada pela ligação com glicose aos sensores Rgt2p e Snf3p. Após fosforilação, Mth1p e Std1p são ubiquitinizados pelo complexo SCFGrr1 e degradados pelo proteassoma. Os sítios de fosforilação por PKA presentes na região amino-terminal de Rgt1p tornam-se expostos e disponíveis para fosforilação quando Mth1p é degradado. Rgt1p, quando fosforilado, dissocia-se de Ssn6p-Tup1p e subsequentemente do DNA, levando a uma desrepressão dos genes-alvo de Rgt1p, como por exemplo os genes *HXTs* e *HXX2*. A via Rgt2p/Snf3p se autorregula através da indução por glicose da expressão do gene *STD1*. Conseqüentemente, o gene *STD1* é expresso ao mesmo tempo em que a proteína Std1p é degradada em resposta à presença de glicose. De forma oposta, a presença de glicose estimula a degradação de Mth1p, além de reprimir a expressão de *MTH1* através da ação de Mig1p e Mig2p. A entrada de glicose na célula é um passo necessário para que seja gerado o sinal de

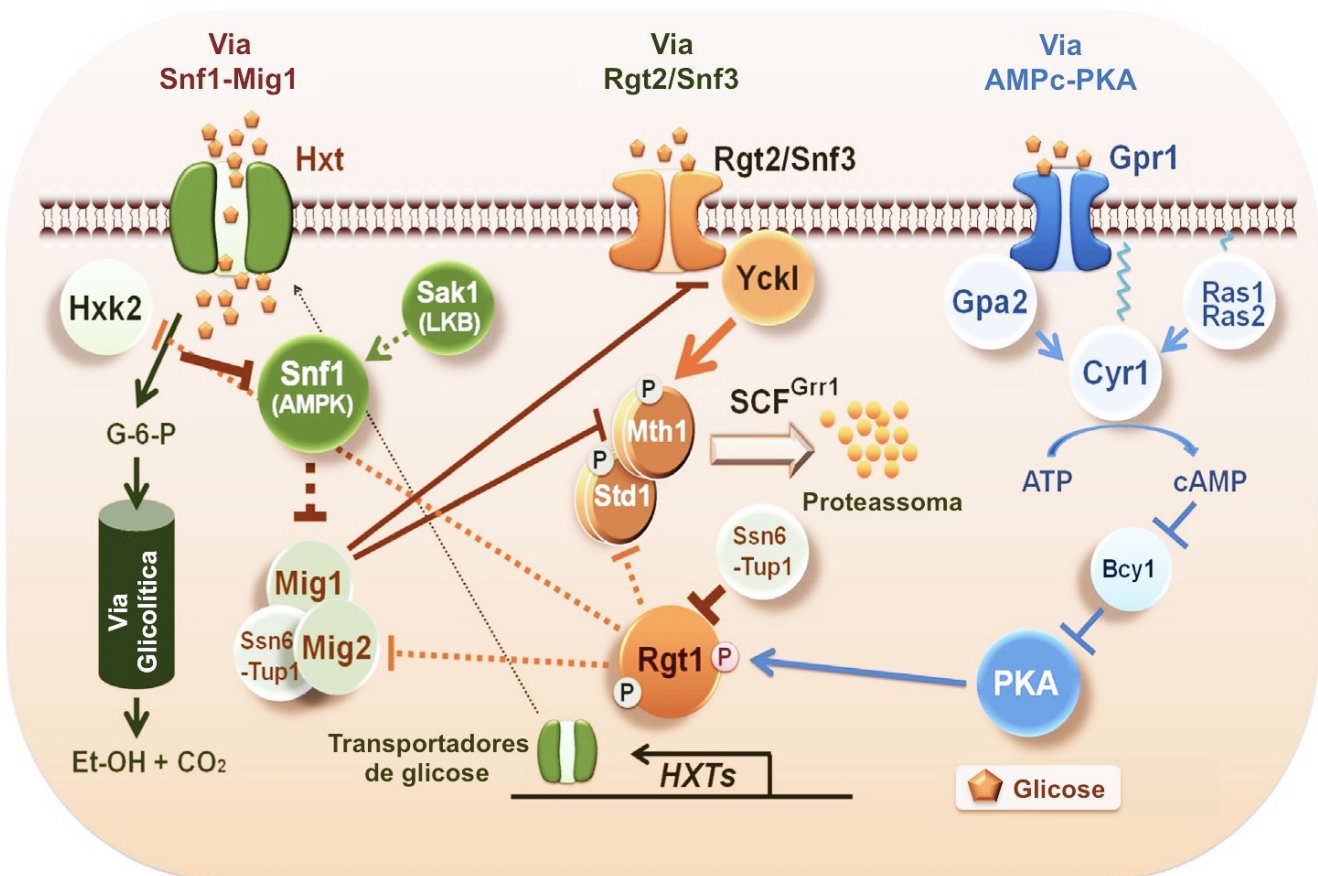


Figura 3 – Representação esquemática das vias de sinalização de glicose em leveduras. A presença de glicose induz a expressão dos genes *HXT* através da inibição de Mth1p e Rgt1p. Os níveis de Mth1p são reduzidos pela atividade das outras vias de sinalização de glicose e Rgt1p é fosforilado por PKA quando Mth1p está ausente. Dessa forma, as três vias de sinalização por glicose convergem para a expressão de genes *HXT*. Adaptado de KIM *et al.* (2013)

repressão que leva à inativação da quinase Snf1p. A expressão do gene *MIG2* é induzida em leveduras através da via Rgt2p/Snf3p e a repressão da expressão de *SNF3* por Mig1p reflete a provável função de Snf3p como um sensor de glicose de alta afinidade, representando outra característica importante na interação entre as vias que são reprimidas e induzidas por glicose (KIM *et al.*, 2013).

1.3.2 Sinalização de cálcio em leveduras

Diferentes espécies de fungos compartilham mecanismos básicos de regulação por cálcio, onde este pode modular a ação de diferentes proteínas ligando-se diretamente a elas, como também atuando na atividade de bombas, trocadores e canais que regulam a concentração de Ca^{2+} nos diferentes compartimentos celulares. A regulação de diferentes alvos pela ação do complexo Ca^{2+} /calmodulina é umas das mais conservadas nesse reino (CUNNINGHAM, 2011). *Saccharomyces cerevisiae* utiliza vias de sinalização de cálcio para controlar diferentes processos celulares como ciclo celular, crescimento, acasalamento, resposta à nutrientes, dentre outros (ANRAKU *et al.*, 1991; PAIDHUNGAT e GARRETT, 1997; DENIS e CYERT, 2002; SERRANO *et al.*, 2002).

No citosol de células de leveduras, a concentração de Ca^{2+} livre é estritamente regulada pela ação de diferentes transportadores, canais, bombas e co-transportadores e mantida a baixos níveis (variando de 50 a 200 nM) (MISETA, KELLERMAYER, *et al.*, 1999). Assim, quando há a ocorrência de variações transitórias nas concentrações de cálcio no citoplasma estas podem ser sinalizadas e transmitidas para diferentes alvos celulares (CUNNINGHAM, 2011; CYERT e PHILPOTT, 2013). Na ocorrência de estímulos, a abertura de canais de cálcio presentes na membrana citoplasmática e em compartimentos celulares internos leva a um aumento na concentração de cálcio no citosol, o que representa um sinal com dinâmicas espacial e temporal específicas. A sinalização de cálcio é essencial para sobrevivência de leveduras durante a conjugação, resistência à íons, progressão do ciclo celular, choque osmótico e fusão de vacúolos (GROPPI *et al.*, 2011).

O influxo de cálcio em células de *Saccharomyces cerevisiae* é intermediado principalmente por um complexo proteico de alta afinidade/baixa capacidade localizado na membrana citoplasmática, formado pela proteína Cch1p, pelo

canal de cálcio Mid1p e por Ecm7p (denominado sistema HACS). Em meio mínimo, estes canais são ativados sob determinadas condições específicas (despolarização de membrana, depleção de cálcio nos estoques internos, estímulos por feromônios e choque osmótico), porém em meio rico a inibição desses dois canais é desencadeada por calcineurina, provavelmente através de desfosforilação. Em leveduras, também foi descrito o envolvimento da proteína Pdr5p no influxo de cálcio extracelular. Um sistema de influxo de cálcio de baixa afinidade/alta capacidade (denominado LACS) também é encontrado em leveduras, em resposta à feromônios (Fig1p). Curiosamente, a presença de glicose desencadeia uma sinalização celular de cálcio em leveduras, mesmo na ausência de genes que codificam para canais de cálcio já descritos previamente (IIDA *et al.*, 1994; FISCHER *et al.*, 1997; MULLER *et al.*, 2001; BONILLA e CUNNINGHAM, 2003; TUTULAN-CUNITA *et al.*, 2005; GROPPI *et al.*, 2011; BOUILLET *et al.*, 2012; CYERT e PHILPOTT, 2013).

O principal estoque de Ca^{2+} intracelular é mantido no vacúolo, acumulando aproximadamente 90% do cálcio intracelular (DUNN *et al.*, 1994; MISETA, FU, *et al.*, 1999). Esse estoque é regulado principalmente pela ação da bomba Pmc1p (uma cálcio ATPase) e por Vcx1p (um trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$). Além de regular o estoque de cálcio do vacúolo, as ações de Vcx1p e Pmc1p auxiliam no controle da retirada do excesso de cálcio do citosol. A retirada de cálcio do citoplasma também é facilitada pela ação de proteínas presentes no complexo de Golgi, como a Ca^{2+} -ATPase Pmr1p e a proteína Gdt1p (trocador trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$). As atividades de proteínas Pmc1p/Pmr1p e Vcx1p são reguladas através da via de sinalização cálcio-calmodulina/calcineurina, pelo estímulo de sua atividade ou através de sua repressão, respectivamente (CUNNINGHAM e FINK, 1996; CUNNINGHAM, 2011; DEMAEGD *et al.*, 2013). A liberação de cálcio retido no vacúolo se dá através do canal de cálcio Yvc1p, que tem sua atividade regulada por diferentes estímulos celulares (CUNNINGHAM, 2011; BOUILLET *et al.*, 2012). No retículo endoplasmático de *Saccharomyces cerevisiae*, a proteínas Vnx1p atua como um trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (CAGNAC *et al.*, 2007). Além disso, essa organela contém uma ATPase do tipo P, Cod1p, que também contribui para a regulação dos níveis de cálcio no citoplasma (CRONIN *et al.*, 2002). As proteínas de retículo endoplasmático Flc1p, Flc2p e Flc3p atuam como canais tipo-TRP, liberando cálcio principalmente em resposta à

choque hipotônico. YOR365Cp, uma proteína putativa paróloga à Flc2p, está presente em na membrana de mitocôndrias (HSIANG e BAILLIE, 2005; TISI *et al.*, 2016).

Saccharomyces cerevisiae exibe uma sinalização de cálcio também em resposta à adição de hexoses e também em resposta à choque hipotônico (GROPPI *et al.*, 2011; RIGAMONTI *et al.*, 2015). O aumento dos níveis de cálcio induzido por glicose requer a fosforilação desse açúcar, atividade de fosfolipase C e de Gpr1p (receptor de glicose associado à Gpa2p), levando à ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática. Essa sinalização de cálcio induzida por glicose se dá principalmente pelo influxo desse íon do meio extracelular, que requer a atividade do canal Mid1p. Essa participação de Mid1p é observada em meio sintético, mas não em meio rico (EILAM *et al.*, 1990; TISI *et al.*, 2002; TÖKÉS-FÜZESI *et al.*, 2002; TRÓPIA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008; GROPPI *et al.*, 2011). Além de Mid1p, um outro canal de cálcio que responde à presença glicose (denominado GIC), em meio rico, também foi observado em leveduras (GROPPI *et al.*, 2011).

Os principais sistemas de influxo de cálcio extracelular e de regulação dos níveis desse íon no citosol e nos compartimentos intracelulares está representado esquematicamente na **Figura 4**.

1.4 Sinalização celular e fosforilação de proteínas

Dentre as diversas modificações pós-traducionais presentes nos organismos vivos, a fosforilação é a mais abundante sendo assim a mais estudada. Quando resíduos de aminoácidos são fosforilados, a carga líquida dessas moléculas se torna mais negativa gerando assim alterações nas proteínas. Embora os resíduos de aminoácidos frequentemente alvos da fosforilação sejam a serina, treonina e a tirosina, outros seis resíduos de aminoácidos já mostraram ser também passíveis de fosforilação (histidina, cisteína, arginina, lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico) (STASYK e HUBER, 2012).

Grupos fosfatos são grupamentos funcionais comuns em diferentes compostos biológicos. Eles formam o esqueleto hidrofílico do DNA e RNA e representam o grupo hidrofílico em muitos lipídios anfifílicos de membrana. A fosforilação proteica

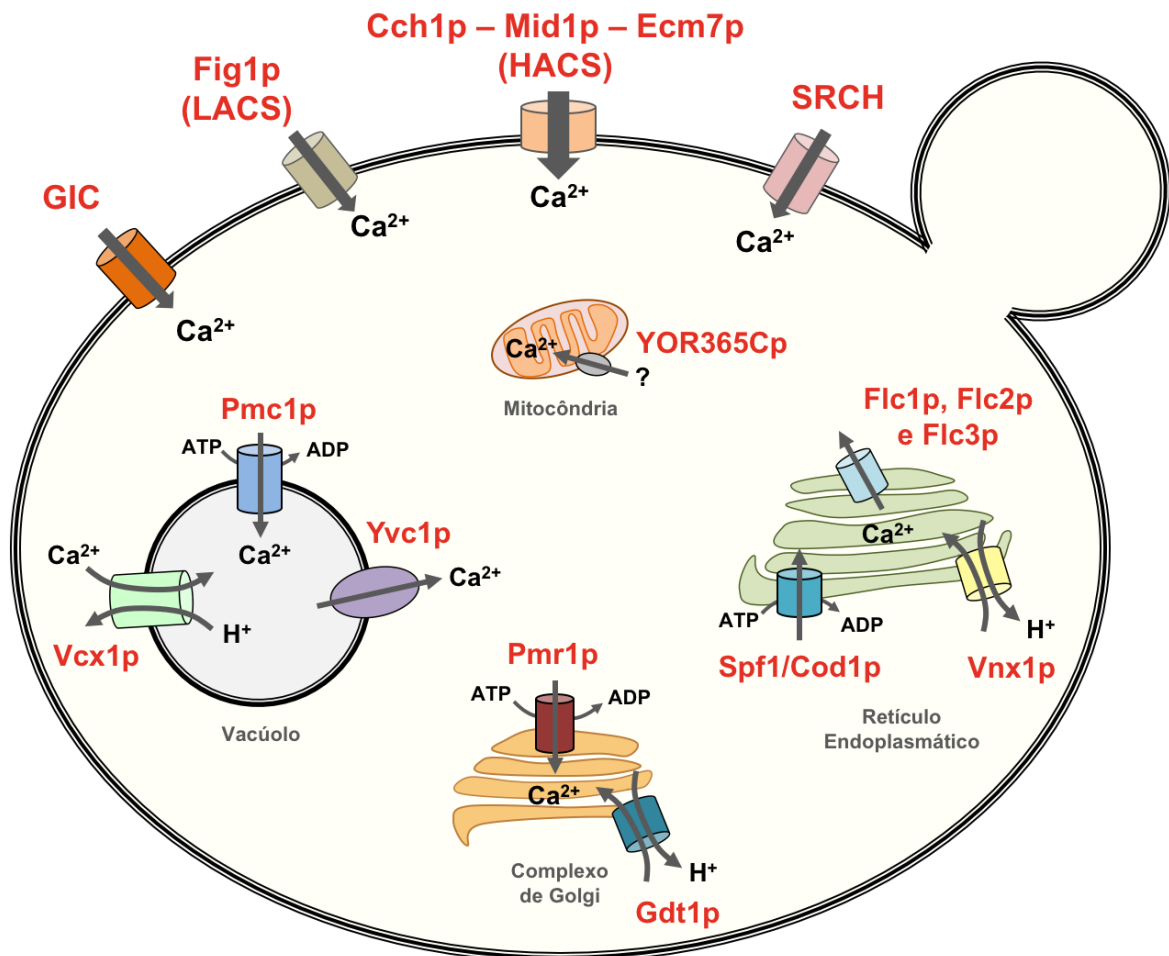


Figura 4 – Principais vias de influxo de cálcio extracelular e de regulação interna dos níveis de Ca^{2+} . Cch1p-Mid1p-Ecm7p (sistema de influxo de alta afinidade/baixa capacidade – HACS); Fig1p (sistema de influxo de baixa afinidade/alta capacidade – LACS); GIC (canal de cálcio induzido por glicose); SRCH (sistema responsivo à choque hipotônico); Pmc1p, Pmr1p e Spf1p/Cod1p (Ca^{2+} -ATPase); Vcx1p, Vnx1p e Gdt1p (troca H^+ - Ca^{2+}); Yvc1p (canal de cálcio vacuolar); Flc1/Flc2/Flc3p e YOR365Cp (canais tipo-TRP). Adaptado de TISI *et al.* (2016).

reversível funciona como um interruptor molecular que permite a regulação do metabolismo e sinalização nas células (LEITNER *et al.*, 2011). Literalmente, milhares de eventos de fosforilação têm sido descritos em células eucarióticas e relacionados com vários fenômenos de sinalização e regulação, como por exemplo, no controle do ciclo celular, no ritmo circadiano em mamíferos e apoptose. A fosforilação de proteínas é encontrada em organismos pertencentes aos domínios *Eukarya*, *Bacteria* e *Archaea*, que compartilham a principal superfamília de proteínas quinases (DEROUICHE *et al.*, 2012).

Estudos de sequenciamento genômico revelaram que 2-3% de todos os genes eucarióticos provavelmente codificam para proteínas quinases, que transferem grupos fosfato para o substrato, e mais de 1000 fosfatases, proteínas que catalisam a reação reversa, foram preditas em humanos, enfatizando o amplo papel empregado pela fosforilação proteica (TICHY *et al.*, 2011).

Uma das maiores superfamílias de proteínas conhecidas é formada por proteínas quinases, amplamente identificadas em organismos eucarióticos. Estas enzimas utilizam o γ -fosfato do ATP (ou GTP) para gerar monoésteres utilizando os grupamentos álcool presentes nas proteínas como aceptores de fosfato. As proteínas quinases são agrupadas em função do seu domínio catalítico, que consiste em aproximadamente 250-300 resíduos de aminoácidos. Além de mamíferos e outros vertebrados, membros da superfamília de proteínas quinases foram identificados e caracterizados em um amplo espectro de outros organismos como plantas, fungos e protozoários (HANKS e HUNTER, 1995).

Uma comparação entre as proteínas quinases presentes em *S. cerevisiae* e aquelas em *D. melonagaster*, *C. elegans* e *H. sapiens* revelou a presença de sete subfamílias específicas de leveduras, contendo 23 quinases. Todas as sete famílias são conservadas na levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* e realizam principalmente funções unicelulares específicas, incluindo resposta ao estresse osmótico e outros estresses, ciclo celular e transporte de pequenas moléculas. Além destas sete subfamílias, nove proteínas quinases foram identificadas como estando presentes somente em leveduras. Outras proteínas quinases de leveduras pertencem a 55 subfamílias que são compartilhadas com organismos superiores (MANNING *et al.*, 2002). O genoma de

levedura codifica 117 proteínas quinases na superfamília de proteínas quinases eucarióticas (ePKs) além de outras 10 quinases adicionais atípicas (RUBENSTEIN e SCHMIDT, 2007).

Entretanto, um aspecto em relação à biologia das proteínas quinases que permanece ainda pouco estudado é como as proteínas quinases alcançam a especificidade para seus substratos. Para garantir a fidelidade na sinalização, as proteínas quinases devem de alguma forma discriminar entre o vasto número de potenciais sítios de fosforilação. Um importante aspecto para reconhecimento do substrato é que o sítio de fosforilação esteja numa sequência consenso de aminoácidos que seja complementar ao sítio ativo da quinase (MOK *et al.*, 2010). Em *S. cerevisiae*, um exemplo de proteína que tem sua ativação, desencadeada pela presença de glicose, regulada através do processo de fosforilação, é a H^+ -ATPase de membrana citoplasmática.

1.5 H^+ -ATPase de membrana citoplasmática em *Saccharomyces cerevisiae*

A H^+ -ATPase, uma ATPase do tipo P, é uma das proteínas mais abundantes na membrana citoplasmática de plantas e fungos e desempenha um papel essencial para a fisiologia desses organismos (SERRANO, 1988). As ATPases do tipo P constituem uma ampla família de proteínas envolvidas em diversos processos de transporte que bombeiam íons e lipídios através de membranas e estão presentes em praticamente todos os organismos vivos. Membros dessa família de proteínas geram e mantêm um gradiente eletroquímico essencial para manutenção de diferentes processos celulares. ATPases do tipo P contêm basicamente cinco domínios distintos: três domínios citoplasmáticos (A, atuador; N, ligação com nucleotídeo; P, fosforilação) e dois domínios inseridos na membrana (T, transporte; S, domínio de suporte classe-específico). Um domínio de regulação (R) também pode estar presente, situado na região C ou N-terminal. As características bioquímicas comuns à essas bombas são: a) um resíduo de aspartato fosforilável no domínio P que se forma durante o ciclo catalítico; e b) a inibição por ortovanadato (KÜHLBRANDT, 2004; BUBLITZ *et al.*, 2011; PALMGREN e NISSEN, 2011).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a H^+ -ATPase de membrana citoplasmática é codificada pelo gene *PMA1* tendo sido caracterizada pela primeira vez por

MALPARTIDA e SERRANO (1980). Essa caracterização demonstrou que esta proteína é composta por uma única cadeia polipeptídica, com massa molecular de aproximadamente 100 kDa, inserida na bicamada lipídica da membrana plasmática. Em sua estrutura terciária, apresenta uma estrutura consenso com dois grandes domínios hidrofílicos e 10 segmentos transmembranares, conforme esquematizado no modelo topológico na **Figura 5** (MALPARTIDA e SERRANO, 1980; AMBESI *et al.*, 2000).

Em sua conformação tridimensional, a H⁺-ATPase de membrana citoplasmática apresenta os domínios característicos das ATPases do tipo P claramente definidos. A H⁺-ATPase de membrana citoplasmática presente em *Arabidopsis thaliana*, que apresenta similaridades com a encontrada em leveduras e tem sua estrutura cristalográfica resolvida (**Figura 6**), a qual possui 4 domínios distintos: um domínio transmembrana com 10 hélices e 3 domínios citosólicos denominados N (domínio de ligação com nucleotídeo), P (domínio de fosforilação) e A (domínio atuador) (PEDERSEN *et al.*, 2007).

A função básica da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática de fungos e plantas é criar um gradiente eletroquímico de prótons, através de um sistema de transporte ativo, importante para a captação de nutrientes e para a regulação do pH intracelular. Para sua atividade, esta enzima requer Mg²⁺, Mn²⁺ ou Co³⁺, pH ótimo em torno de 6,0, e apresenta especificidade para ATP (PORTILLO, 2000). Devido à alta expressão do gene *PMAI* e à meia-vida longa da proteína, em comparação à média da meia-vida de outras proteínas de membrana, é possível sugerir que seus mecanismos de regulação mais importantes ocorram em nível pós-traducional (MORENO e LAGUNAS, 1991; RAO *et al.*, 1993).

Esta enzima é regulada por um grande número de fatores ambientais, dentre os quais o metabolismo de glicose parece ser o mais importante. A regulação por glicose pode ser dar em dois níveis: em nível transcricional, a glicose aumenta a síntese de mRNA do gene *PMAI* e em nível pós-traducional, a glicose induz a ativação da enzima. Situações de estresse desencadeadas pela presença de etanol, presença de ácidos orgânicos e choque térmico também são capazes de promover um aumento da atividade da enzima (PORTILLO, 2000).

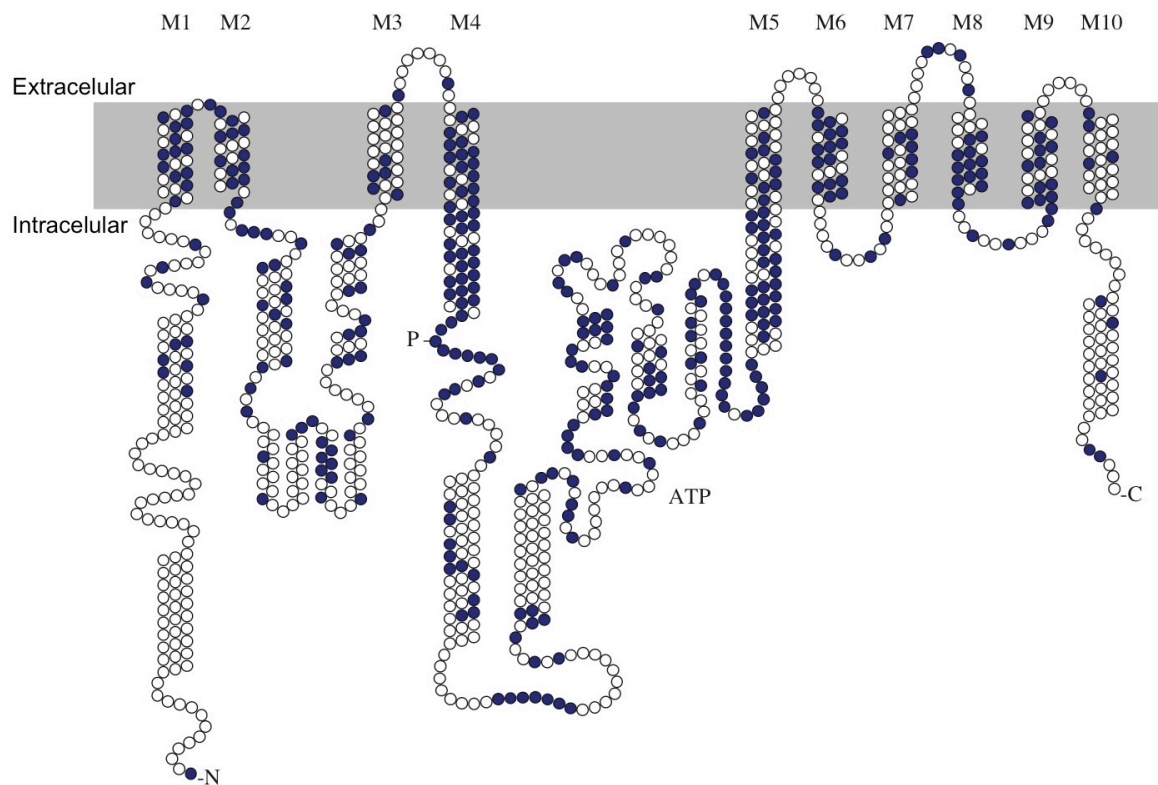


Figura 5 – Modelo topológico de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática em fungos. Resíduos de aminoácidos comuns às H⁺-ATPases em diferentes fungos estão indicados em azul. M1–M10, segmentos transmembranares; P, sítio de fosforilação; ATP, sítio de ligação do ATP. Adaptado de AMBESI *et al.* (2000).

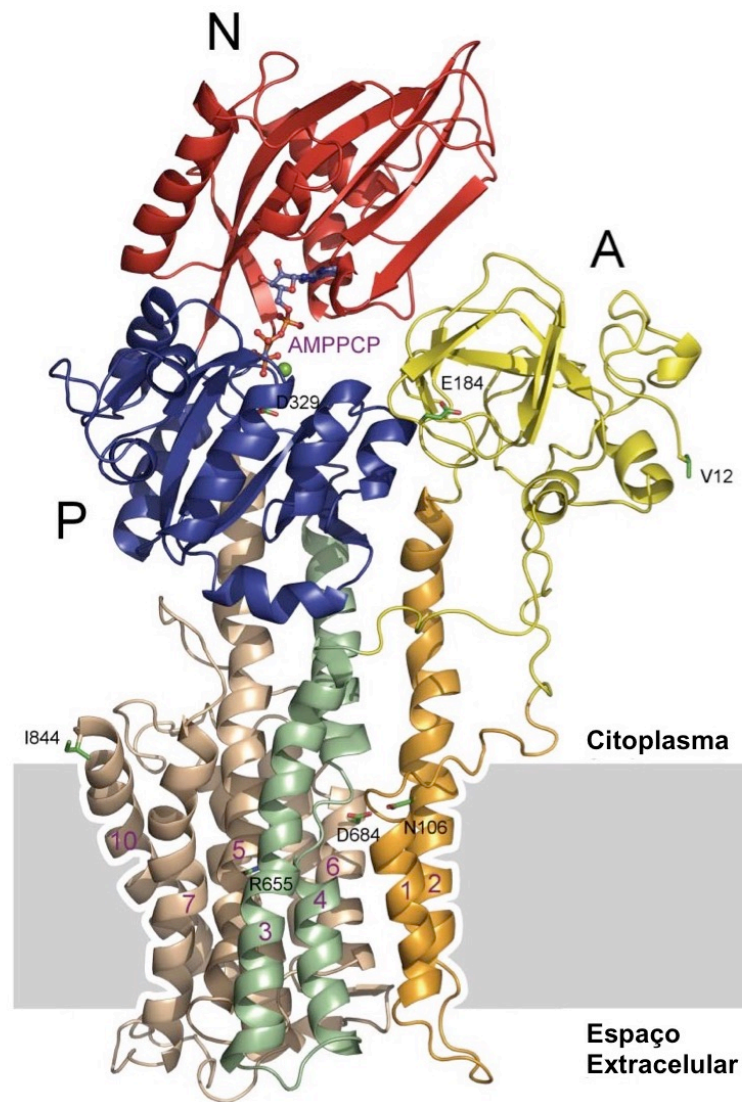


Figura 6 – Estrutura cristalográfica de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática de *Arabidopsis thaliana* (H^+ -ATPase 2 – *AHA2*). A estrutura representa a forma ativa da bomba de prótons, sem o domínio inibitório C-terminal e complexada com AMPPCP (um análogo de ATP não-hidrolisável). Estão presentes 10 hélices transmembrana (nas cores laranja, verde e marrom); domínio de ligação com nucleotídeo (N, em vermelho); o domínio de fosforilação (P, em azul); o domínio atuador (A, em amarelo). Mg-AMPPCP é encontrado na interface entre os domínios N e P. Adaptado de PEDERSEN *et al.* (2007).

1.5.1 Ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática induzida por glicose em leveduras

A ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática resulta na promoção de uma modificação conformacional da região C-terminal, desfazendo a interação inibitória deste domínio com o domínio de ligação do ATP e fosforilação direta da enzima por intermédio de proteína(s) quinase(s) (**Figura 7**). Essas modificações ocorridas na conformação da enzima implicam em: decréscimo do K_m por ATP, relacionado ao sítio envolvendo os resíduos Ser-899 e Glu-901; aumento da $V_{máx}$, relacionado ao sítio envolvendo os resíduos Arg-909 e Thr-912 e deslocamento do pH ótimo enzimático de 6,0 para valores neutros (DE LA FUENTE *et al.*, 1997; PORTILLO, 2000).

Utilizando técnicas de dissociação por transferência de elétrons (ETD-MS/MS), LECCHI *et al.* (2007) evidenciaram que a fosforilação do resíduo Thr-912 parece ser constitutiva e que o resíduo imediatamente adjacente, Ser-911, seria o sítio fosforilado após adição de glicose. Posteriormente, confirmou-se que a fosforilação de ambos os resíduos (Ser-911 e Thr-912) parecem estar conectados ao processo de ativação (MAZÓN *et al.*, 2015).

Embora tenha sido demonstrado que a ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática envolva a sua fosforilação, a busca por proteínas quinase envolvidas nesse processo levaram, até o momento, à identificação de uma única proteína, Ptk2p, responsável pela fosforilação do resíduo Ser-899 da cauda C-terminal (GOOSSENS *et al.*, 2000; ERASO *et al.*, 2006). Recentemente, uma ampla triagem dentre as proteínas quinase de leveduras, reconfirmou o envolvimento essencial de Ptk2p na ativação induzida por glicose de H⁺-ATPase (PORTILLO, 2000; PEREIRA *et al.*, 2015). Dessa forma, o modelo indicando a existência de dois sítios de fosforilação (e uma outra proteína quinase envolvida, além de Ptk2p) parece estar incorreto, ou ao menos, incompleto

Tendo em vista de que foi sugerido primeiramente o envolvimento da proteína quinase A como sendo a responsável pela fosforilação da enzima, DOS PASSOS *et al.* (1992) demonstraram que a ativação da enzima não era mediada por esta quinase.

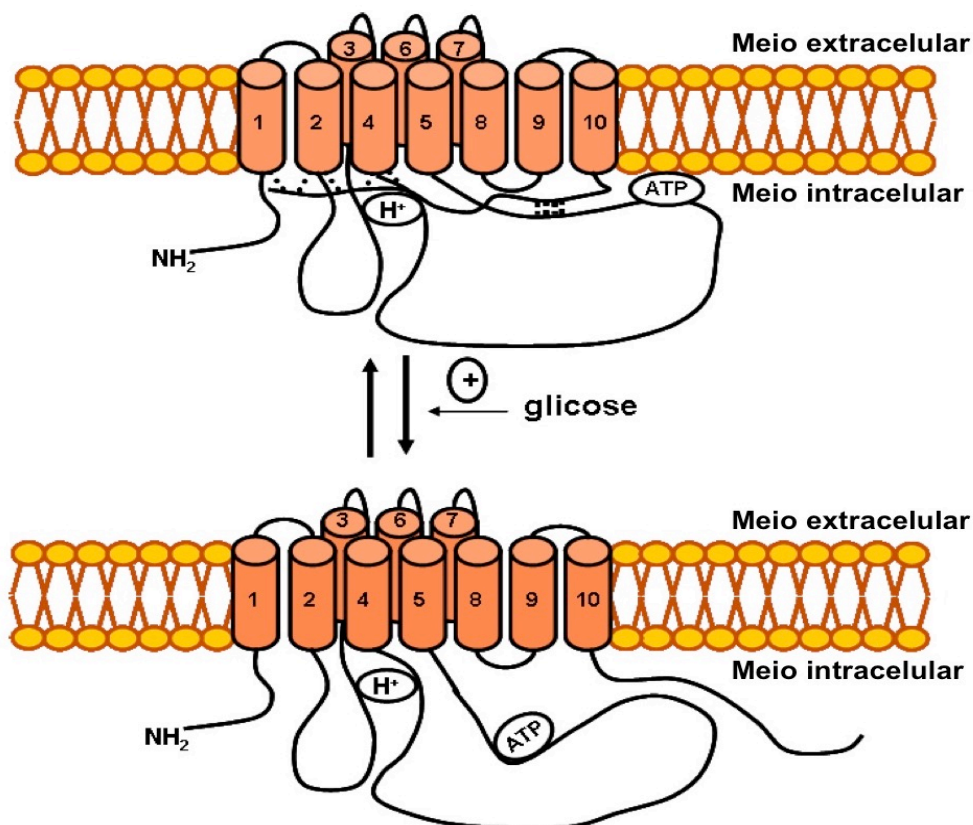


Figura 7 – Modelo de ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, induzida por glicose. Após a adição de glicose, os resíduos Ser-899 e Thr-912 são fosforilados desfazendo a interação inibitória, aumentando o bombeamento de prótons. Adaptado de PORTILLO (2000).

Considerando que outro importante efeito da adição de glicose a células de levedura é a estimulação do *turnover* do fosfatidilinositol e a partir de dados obtidos e publicados por BRANDÃO *et al.* (1994) sugeriu-se um possível envolvimento deste processo na regulação da H⁺-ATPase. Assim, trabalhando com ativadores e inibidores da proteína quinase C, bem como inibidores da proteína quinase dependente de Ca²⁺/calmodulina e da fosfolipase C, propôs-se um mecanismo semelhante àquele da via de fosfatidilinositol de mamíferos, com a provável participação da proteína quinase C na ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de levedura. Posteriormente, foi demonstrado por COCCETTI *et al.* (1998) que, de fato, a fosfolipase C está envolvida no *turnover* do fosfatidilinositol e na ativação da H⁺-ATPase, induzidos por glicose. Neste trabalho, mutantes *plc1Δ* mostraram inibição do *turnover* do fosfatidilinositol e a uma significativa redução (ou ausência) da ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática.

Em outro trabalho, SOUZA *et al.* (2001) demonstraram a participação da subunidade alfa da proteína G (Gpa2p), do sensor de glicose Snf3p e também a necessidade da entrada e fosforilação da glicose para que a ativação eficiente da H⁺-ATPase possa acontecer. Além disso, a participação do receptor de glicose Gpr1p no mecanismo de ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose foi descartada, uma vez que a deleção do gene que codifica para esta proteína não afeta a ativação da enzima.

Evidências sobre a existência de um modelo de sinalização relacionado à homeostase de cálcio, que apresenta muitas semelhanças com o mecanismo que regula a atividade de H⁺-ATPase, começaram a ser encontradas por diferentes grupos de trabalho. Embora todos os componentes desta via ainda não tenham sido identificados, a elevação transitória de cálcio citosólico (ETCC) também é ativada pela presença de glicose. Neste contexto, foi ainda verificado que para que haja a geração do sinal de cálcio, o transporte do açúcar seguido de sua fosforilação é absolutamente necessário, sendo igualmente requeridas as participações da fosfolipase C e da proteína Gpa2p (MISETA, FU, *et al.*, 1999; FU *et al.*, 2000; AIELLO *et al.*, 2002; TÖKÉS-FÜZESI *et al.*, 2002; KELLERMAYER *et al.*, 2003; AIELLO *et al.*, 2004; TISI *et al.*, 2004).

TISI *et al.* (2004) evidenciaram, pela primeira vez em leveduras, uma participação do inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) como um mensageiro secundário, responsável pela geração do sinal de cálcio induzido por glicose. Em condições fisiológicas, o IP₃ é rapidamente fosforilado a IP₄ e IP₅ por uma quinase (Arg82p),

produto do gene *ARG82*, tornando a elevação dos níveis de IP_3 na célula um evento transiente. A deleção deste gene (*ARG82*) foi capaz de gerar uma elevação dos níveis de inositol-1,4,5-trifosfato e, ainda, um aumento significativo do sinal intracelular de cálcio. Em outro trabalho, observou-se que na ausência de Arg82p, a ativação da H^+ -ATPase de membrana citoplasmática era intensificada a níveis até duas vezes maiores que o observado na cepa selvagem. Assim, considerando todos estes relatos, a hipótese de uma conexão entre a sinalização do fosfatidilinositol, liberação de cálcio intracelular e a via de ativação da H^+ -ATPase foi reforçada (TRÓPIA *et al.*, 2006).

Com base nos resultados obtidos por TRÓPIA *et al.* (2006) e PEREIRA *et al.* (2008) sugere-se que um sinal de cálcio intracelular induzido por açúcares é necessário para a ativação da H^+ -ATPase. Com relação ao envolvimento do sensor de glicose Snf3p, foram encontradas evidências de que este sensor atuaria de forma paralela à proteína Gpa2p, e que a sua extremidade C-terminal é aparentemente responsável por sua ação. Além disso, também foi observado que uma cepa mutante *snf3Δ* apresenta um fenótipo de acumulação de cálcio na célula, sobretudo para células crescidas em galactose. Os resultados sugerem o envolvimento de Snf3p no controle da acumulação de cálcio, provavelmente modulando a atividade da enzima Pmc1p, uma Ca^{2+} -ATPase vacuolar (TRÓPIA *et al.*, 2006).

Um mecanismo hipotético de ativação da H^+ -ATPase induzida por glicose pode ser observado na **Figura 8**. A internalização seguida pela fosforilação de glicose ou galactose gera um sinal (quantidades relativas de glicose-6-P e/ou glicose-1-P?) que estimula uma proteína G, Gpa2p, e a fosfolipase C promovendo sua ativação. Então, a fosfolipase C hidrolisaria fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) gerando diacilglicerol (DAG) e IP_3 que pode agir direta ou indiretamente no canal de cálcio vacuolar Yvc1p, levando a um aumento no sinal de cálcio intracelular. Além disso, a cauda C-terminal do sensor de glicose Snf3p, que controla a Ca^{2+} -ATPase vacuolar, detectaria o sinal. A intensidade final do sinal de cálcio seria o resultado da contribuição parcial de cada ramo deste sistema (BOUILLET *et al.*, 2012).

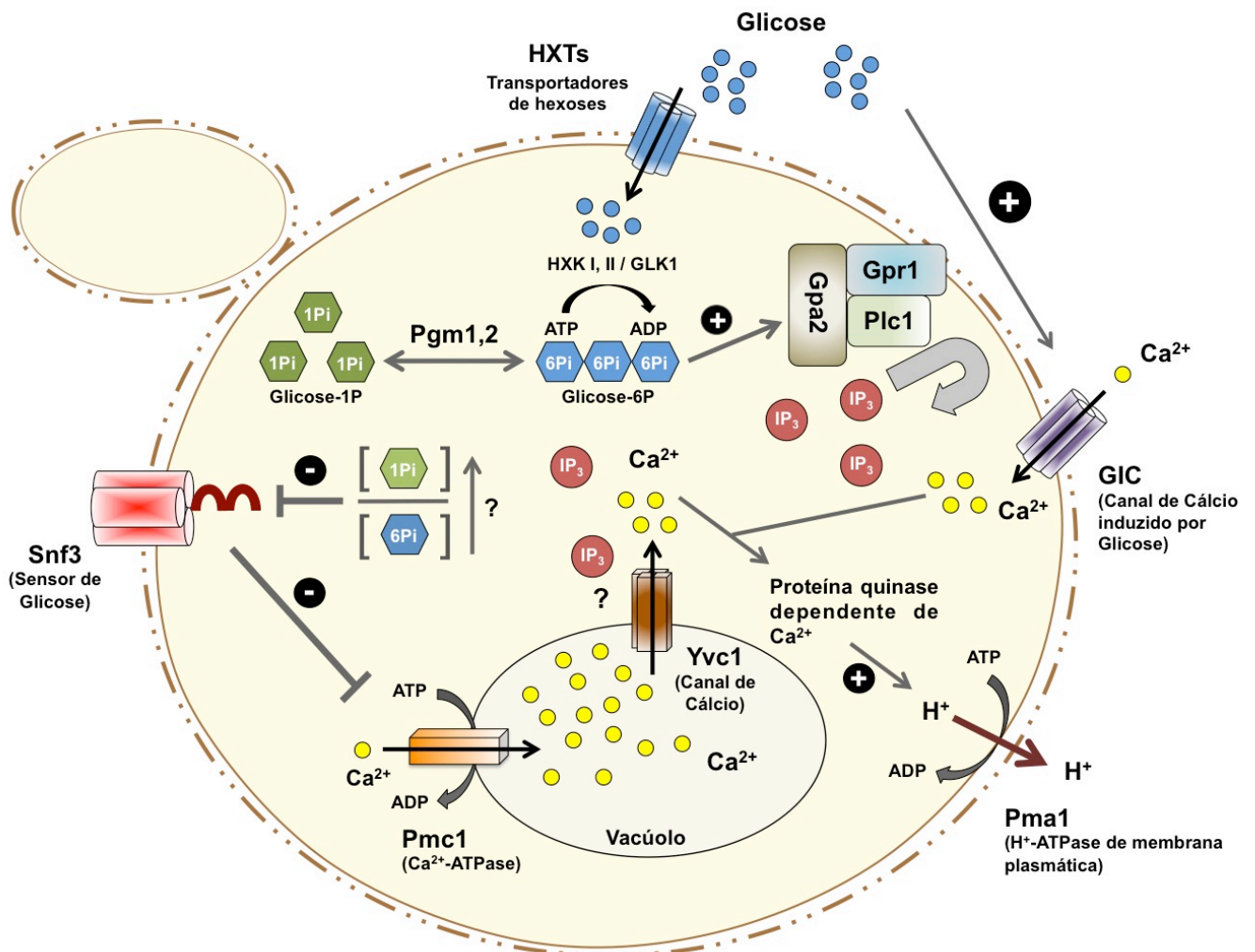


Figura 8 – Mecanismo hipotético de ativação da H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, induzido por glicose. O mecanismo de ativação de H^+ -ATPase seria subdividido em duas partes. Na primeira, a entrada de glicose gera um sinal que estimularia a ativação das proteínas Gpa2p e fosfolipase C. A ação de fosfolipase C sobre PIP_2 geraria IP_3 , que estimularia a liberação de cálcio do vacúolo para o citoplasma através de Yvc1p. Na outra parte da via de ativação, a cauda C-terminal do sensor de glicose Snf3p detectaria também o sinal da entrada de glicose, e controlaria a atividade de Pmc1p (Ca^{2+} -ATPase vacuolar). A intensidade final do sinal de cálcio seria o resultado da contribuição parcial de cada subdivisão deste sistema. Adaptado de BOUILLET *et al.* (2012).

1.5.2 Lpx1p e ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática

Recentemente, evidências experimentais sugeririam que a ativação da H⁺-ATPase, induzida por glicose, envolveria a participação de novos elementos na sua via de sinalização. A atividade de uma serino-protease codificada pelo gene *LPXI*, na degradação de tubulinas acetiladas associadas à H⁺-ATPase seria um passo essencial. De acordo com o modelo proposto, a forma não ativada da H⁺-ATPase estaria associada a tubulinas que seriam hidrolisadas após a adição de glicose, devido à ação de Lpx1p, liberando assim o domínio C-terminal da H⁺-ATPase, tornando-o suscetível à fosforilação e consequente ativação (CAMPETELLI *et al.*, 2005; CAMPETELLI *et al.*, 2013).

Lpx1p possui a massa molecular prevista de aproximadamente 44 kDa e carrega um sinal de direcionamento para peroxissomos tipo 1 (glutamina-lisina-leucina). Esta proteína pertence à superfamília das α/β hidrolases que catalisam, dentre outros substratos, a hidrólise de ésteres de ácido carboxílico, lipídios, tio-ésteres e epóxidos e também a quebra de ligação C–C. Lpx1p pode estar envolvida em diferentes processos como detoxificação e respostas à estresses, mobilização de lipídios e na modificação de fosfolipídios de membrana (THOMS *et al.*, 2008; THOMS *et al.*, 2011).

Considerando estes dois conjuntos de evidências relacionados à ativação de H⁺-ATPase, o envolvimento da sinalização de cálcio e a dependência da atividade de Lpx1p, além da aparente dificuldade de se identificar outra(s) proteína(s) quinase(s) (principalmente as que são dependentes de cálcio) envolvidas na fosforilação/ativação da enzima, a possível relação entre a sinalização de cálcio e a ativação de Lpx1p em conexão com a regulação induzida por glicose de H⁺-ATPase foi avaliada neste trabalho.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o mecanismo de regulação e o envolvimento da proteína Lpx1 na sinalização de cálcio e na ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, induzidas por glicose, em *Saccharomyces cerevisiae*

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar o papel de Lpx1p na ativação de H⁺-ATPase e na sinalização de cálcio intracelular em células de *Saccharomyces cerevisiae*;
- 2.2.2 Determinar a influência do cálcio na atividade proteolítica de Lpx1p;
- 2.2.3 Avaliar a participação de Lpx1p, Ptk2p e do sinal de cálcio na ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Materials e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas de levedura utilizadas

Todas as cepas foram mantidas em freezer -80 °C em meio de cultura YP ou SD acrescidos de 30% v/v de glicerol. As cepas utilizadas neste trabalho estão listadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Cepas de leveduras utilizadas neste trabalho (cepa PJ69)

Identificador Padrão	Identificador	Genótipo	Origem
		<i>MATa; trp-901; leu2-3; 112</i>	
		<i>ura3-52; his3-200; gal4Δ</i>	
PJ69-2A	Selvagem	<i>gal80Δ; LYS:: GAL1- HIS3; GAL2-ADE2; met2::GAL7-lacZ</i>	James Caffrey (SAIARDI <i>et al.</i> , 2000)
PJ69-4A1	<i>ARG82</i>	PJ69; <i>arg82::KanMX4</i>	
LBCM 1630	<i>YVC1</i>	PJ69-2A; <i>yvc1::URA3</i>	(BOUILLET <i>et al.</i> , 2012)
LBCM 1713	<i>YVC1 LPX1</i>	LBCM 1630; <i>lpx1::LEU2</i>	UFOP – LBCM
LBCM 1714	<i>ARG82 LPX1</i>	PJ69-4A1; <i>lpx1::LEU2</i>	

Tabela 2 – Cepas de leveduras utilizadas neste trabalho (cepa BY4741)

Identificador Padrão	Identificador	Genótipo	Origem
BY4741	Selvagem	MATa ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	EUROSCARF
YOR084W	<i>LPX1</i>	BY4741; <i>lpx1::KanMX4</i>	
YJR059W	<i>PTK2</i>	BY4741; <i>ptk2::KanMX4</i>	
LBCM 1738	<i>lpx1Δ + VV</i>	YOR084W + pYES2/CT-VV	Este trabalho
LBCM 1739	<i>lpx1Δ + LPX1</i>	YOR084W + pYES2/CT- <i>LPX1</i>	
LBCM 1764	<i>lpx1Δ + LPX1-MOD</i>	YOR084W + pYES2/CT- <i>LPX1-MOD</i>	

Nota:

pYES2/CT-VV: vetor pYES2/CT vazio

pYES2/CT-*LPX1*: vetor pYES2/CT contendo o gene *LPX1*

pYES2/CT-*LPX1-MOD*: vetor pYES2/CT contendo o gene *LPX1* modificado

3.2 Meios de crescimento

3.2.1 Meio YP

Para o preparo do meio YP foram utilizados extrato de levedura 1% p/v e peptona bacteriológica 2% p/v. Para o meio YP sólido foram adicionados ágar 1,5% p/v, antes da esterilização. A fonte de carbono, com concentração e tipo variável conforme o experimento, foi autoclavada separadamente e acrescentada posteriormente à esterilização.

3.2.2 Meio mínimo sintético (SD)

O meio SD foi preparado com a seguinte composição: base nitrogenada de leveduras sem aminoácidos 0,67% p/v (Difco, USA), suplementado com os aminoácidos (mg/L): arginina (20), metionina (20), tirosina (30), isoleucina (30), lisina (30), fenilalanina (50), triptofano (100), histidina (100), ácido glutâmico (100), ácido aspártico (100), valina (100), treonina (200), leucina (250) e serina (375); e as bases nitrogenadas (mg/L): adenina (50) e uracila (50). Para o meio SD sólido foi adicionado ágar 1,5% p/v e o pH ajustado com KOH 3M para 6,5, antes da esterilização. Para o preparo do meio SD líquido, o pH foi ajustado para 5,5. A fonte de carbono, com concentração e tipo variável conforme o experimento, foi autoclavada separadamente e acrescentada posteriormente ao meio SD estéril.

3.2.3 Meio LB

Para o preparo do meio LB foram utilizados extrato de levedura 0,5% p/v, triptona bacteriológica 1% p/v, NaCl 1% p/v e o pH foi ajustado para 7,5. Para o meio LB sólido foi adicionado ágar 1,5% p/v, antes da esterilização.

3.3 Condições de crescimento

As células de *Saccharomyces cerevisiae* foram crescidas a 30 °C em estufa ou sob agitação de 200 rpm (incubador rotatório New Brunswick model G25) em meio YP ou SD, preferencialmente com glicose 2% p/v. O crescimento foi acompanhado através de densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro BioMate 3S (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), sendo as células crescidas até o final da fase logarítmica (densidade ótica aproximadamente 2,0).

3.4 Vetores e plasmídeos

pVTU-apoaequorina (pVTU-AEQ): obtido pela inserção do fragmento do gene *AEQ1*, que codifica para apoaequorina, obtido com PCR do vetor pYX212-AEQ e possui como marcador auxotrófico o gene *URA3* (TISI *et al.*, 2002).

pYES2/CT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA): permite a expressão induzível por galactose de proteínas recombinantes fundidas a uma cauda 6x-Histidinas na porção C-terminal.

3.5 Iniciadores utilizados nos experimentos

Os iniciadores utilizados neste trabalho estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Iniciadores utilizados

Iniciador	Sequência
<i>F-LPX1-HIS</i>	AAAGGTACCATGGAACAGAACAGGTCC
<i>R-LPX1-HIS</i>	TTTCTAGATTACAGTTTTTGTTTAGTCG
<i>R-CYC</i>	GCGTGAATGTAAGCGTGAC

Os iniciadores *F-LPX1-HIS* e *R-LPX1-HIS* foram utilizados para introduzir sítios de restrição (destacados na **Tabela 3**) para as enzimas *Kpn1* e *Xba1*, respectivamente, no gene clonado (*LPX1*) (CAMPETELLI *et al.*, 2013).

3.6 Clonagem gênica e obtenção dos vetores para transformação

3.6.1 Condições da reação em cadeia de polimerase (PCR)

Para a obtenção do gene *LPXI* a ser clonado no vetor pYES2/CT, o DNA da cepa selvagem BY4741 foi extraído através do método descrito por HOFFMAN (2001) e utilizado como molde na reação de PCR, juntamente com os iniciadores *F-LPXI-HIS* e *R-LPXI-HIS* (Tabela 3), necessários para a obtenção do gene *LPXI* a ser clonado no vetor pYES2/CT. A reação de PCR foi composta por: 2,5 µL de tampão Tris-HCl (Sinapse Biotecnologia, Brasil), 1 µL MgCl₂ 50 mM (Sinapse Biotecnologia, Brasil), 0,5 µL solução de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 pmol de cada iniciador (Integrated DNA Technologies, CA, USA), 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Sinapse Biotecnologia, Brasil), 1 pg de DNA molde e 17,8 µL de água deionizada, perfazendo um total de 25 µL. O termociclador foi programado com os seguintes parâmetros: 95 °C por 4 min (para aquecimento inicial); seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 52,5 °C por 45 s e 72 °C por 1 min e 50 s; após os ciclos, 72 °C por 5 min e 12 °C até retirada dos tubos do termociclador. O produto de PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2% p/v, revelado com GelRed (Biotium Inc., CA, USA) e fotografado através do *software* Alpha Imager (Alpha Innotech).

Para realização de PCR de colônia, uma colônia de bactéria e/ou levedura crescidas em meio de seleção foi retirada e transferida para um tubo com capacidade de 250 µL. Foram adicionados a este tubo 15 µL de água estéril e levado ao micro-ondas por 5 min em potência máxima. Em seguida, 5 µL da suspensão obtida foram utilizados como DNA molde utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente.

3.6.2 Ligação e transformação de bactérias

O produto de PCR e o vetor pYES2/CT foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *KpnI* e *XbaI* (Fermentas, Waltham, MA, USA). As reações de digestão para o produto de PCR e do vetor foram realizadas com adição de 1 unidade da enzima *KpnI* e 1 unidade da enzima *XbaI*, durante 4 h a 37 °C. Após a digestão, o vetor

foi submetido à reação de fosfatase alcalina (Fermentas, Waltham, MA, USA), com adição de 1 unidade dessa enzima. A reação foi realizada por 1 h a 37 °C, seguida de inativação da fosfatase alcalina (15 min a 65 °C). Para a obtenção do gene *LPXI* modificado (*LPXI*-MOD), o gene *LPXI* foi tratado com a enzima de restrição *PvuII* (Fermentas, Waltham, MA, USA), a qual possui sítio de corte após 909 pares de base a partir do códon de iniciação, removendo assim, parte da região C-terminal de *LPXI*. Os insertos foram ligados aos vetores utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cada reação foi composta por 50 ng de inserto (*LPXI* ou *LPXI*-MOD) e 200 ng do vetor pYES2/CT e incubadas a 23 °C por 1 h. Todas as reações foram preparadas de acordo com as instruções determinadas pelos fabricantes das enzimas. Desta forma, o vetor pYES2/CT contendo o gene *LPXI* foi denominado pYES2/CT-*LPXI* (**Anexo A**) e aquele contendo o gene *LPXI* modificado foi denominado pYES2/CT-*LPXI*-MOD (**Anexo B**). O vetor vazio pYES2-CT (denominado pYES2/CT-VV), também foi utilizado na etapa de transformação de bactérias (**Anexo C**).

Os vetores contendo os genes *LPXI* e *LPXI* modificado, bem como o vetor vazio, foram utilizados para transformação de *Escherichia coli* TOP10. Para controle de transformação, 50 µL de células de *E. coli* TOP10 competentes foram inoculadas em meio LB sólido e em meio LB sólido acrescido de ampicilina. Para a transformação, 20 µL de DNA foram adicionados a 100 µL de células competentes e deixados em gelo por 30 min. Esta suspensão foi então incubada a 42 °C por 45 s e imediatamente acrescida de 1 mL de meio LB. Os microtubos foram então colocados em agitador rotativo a 37 °C por 1 h. Após esta pré-incubação, 200 µL foram inoculados em placas contendo meio LB sólido acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C em estufa. Após crescimento, a presença de *LPXI* foi verificada através de PCR de colônia utilizando-se os iniciadores *F-LPXI-HIS* e *R-LPXI-HIS*. A confirmação da inserção do gene *LPXI* modificado no vetor foi feita através de PCR com os iniciadores *F-LPXI-HIS* e *R-CYC*, onde foram comparados os diferentes tamanhos de amplicons obtidos entre os plasmídeos pYES2/CT-*LPXI* e pYES2/CT-*LPXI*-MOD, ≈1300 pb e ≈1100 pb respectivamente.

3.6.3 Extração de DNA plasmidial em pequena escala

As células de *E. coli* TOP10 contendo os plasmídeos pYES2/CT-VV, pYES2/CT-LPX1 e pYES2/CT-LPX1-MOD foram inoculadas em meio LB líquido acrescido de ampicilina (concentração final de 100 µg/mL) e incubadas por 18 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm (incubador rotatório New Brunswick model G24). Aliquotas de 1,5 mL foram centrifugadas em microtubos a 3000 g por 6 min (Eppendorf 5415D) e o precipitado foi ressuscitado em 200 µL de STET (Sacarose 8% p/v, Triton X-100 0,1% p/v, EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Foram adicionados 5 µL de lisozima 50 mg/mL à suspensão e os tubos foram incubados por 8 min à temperatura ambiente. Os microtubos foram transferidos para termobloco a 95 °C por 45 s e posteriormente centrifugados a 16000 g por 10 min (Eppendorf 5415D). O precipitado foi retirado e ao sobrenadante foram adicionados 24 µL de CTAB 5% p/v (cetiltrimetilbrometo de amônio). Após centrifugação a 16000 g por 5 min (Eppendorf 5415D), o precipitado foi ressuscitado em 500 µL de NaCl 1,2 M e 750 µL de etanol 92,5% v/v. A solução foi lavada duas vezes em etanol 70% v/v com centrifugação a 16000 g por 5 min e deixado para secar a 30 °C por 2 h. O material foi então ressuscitado em 20 µL de água e congelado a -20 °C até o momento do uso.

3.7 Transformação de leveduras

3.7.1 Preparo de células competentes

As linhagens a serem transformadas com os plasmídeos pYES2/CT-VV, pYES2/CT-LPX1 ou pYES2/CT-LPX1-MOD foram inoculadas em 5 mL de meio YP Glicose 2% p/v e incubadas por 12 h sob agitação de 200 rpm (incubador rotatório New Brunswick model G25). Em seguida, foram utilizadas para inocular 45 mL do mesmo meio e crescidas por 4 h sob agitação. As células foram então coletadas por centrifugação a 2885 g (Beckman Coulter Allegra X-12R) por 5 min e ressuscitadas em 25 mL de tampão Tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) e novamente centrifugadas. O precipitado foi então ressuscitado em 1 mL de acetato de lítio 100 mM e as células

foram transferidas para microtubos. O acetato de lítio foi removido após centrifugação a 8000 g por 15 s (Eppendorf 5415D) e as células foram ressuspensas em 400 μ L de acetato de lítio 100 mM.

3.7.2 Transformação de células competentes

Para cada 50 μ L de células competentes foram adicionados na seguinte ordem: 240 μ L de polietilenoglicol 4000 50% p/v, 36 μ L de acetato de lítio 1 M, 10 μ L de DNA de esperma de salmão (2 μ g/ μ L) e 65 μ L de água estéril contendo o plasmídeo desejado. A mistura foi agitada cuidadosamente e incubada a 30 °C por 30 min e seguida por incubação a 42 °C por 20 min. Após incubação, as células foram centrifugadas por 15 s a 8000 g (Eppendorf 5415D) e lavadas com 1 mL de água estéril. As células foram ressuspensas em 200 μ L de água estéril e plaqueadas em meio seletivo SD –URA. As placas foram incubadas por 3 a 5 dias em estufa a 30 °C. Após, crescimento a presença de *LPXI* foi verificada através de PCR de colônia.

3.8 Monitoramento *in vivo* da concentração de cálcio citosólico livre

Para a medida da concentração de cálcio citosólico livre foi utilizado o método da aequorina-coelenterazina, onde foram utilizadas células previamente transformadas com o plasmídeo pVTU-AEQ (TISI *et al.*, 2002). As células foram pré-incubadas em 4 mL de meio YP Glicose 2% p/v e crescidas a 30 °C por 24 h sob agitação de 200 rpm (incubador rotatório New Brunswick model G25) até a fase exponencial. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 2885 g por 5 min (Beckman Coulter Allegra X-12R) e lavadas três vezes com água estéril. As células então foram ressuspensas em tampão MES-Tris 0,1 M pH 6,5, a uma densidade de 1×10^8 células/mL e foi realizada uma incubação para esgotamento dos nutrientes (90 min, à temperatura ambiente). Em seguida, as células foram centrifugadas a 2885 g por 2 min (Beckman Coulter Allegra X-12R) e ressuspensas no mesmo tampão a uma densidade de $2,5 \times 10^9$ células/mL.

Na etapa seguinte, 50 μM de coelenterazina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionados a um volume final de 30 μL da suspensão celular e a mesma foi incubada por 20 min à temperatura ambiente, no escuro. Para remover o excesso de coelenterazina, as células foram lavadas duas vezes com 200 μL de tampão MES-Tris 0,1 M pH 6,5 com centrifugação a 3000 g por 2 min (Eppendorf 5415D). No procedimento de preparo das amostras para leitura no luminômetro Lumat 9507 (Berthold Technologies), as células foram ressuspensas em 500 μL do mesmo tampão citado anteriormente (5×10^7 células/mL) e, em seguida, a suspensão de células foi transferida para um tubo de luminômetro. Para medir a elevação do cálcio citosólico (sinal de cálcio) induzida por 100 mM de glicose (concentração final), a luminescência emitida foi monitorada em intervalos de 10 s durante 1 min antes do estímulo e, após a adição da glicose, a luminescência emitida foi monitorada por mais 10 min. Os dados obtidos foram transferidos e analisados em computador acoplado ao equipamento e descritos em unidades relativas de luminescência por segundo (RLU/s).

3.9 Busca em banco de dados para sítios potenciais de ligação com cálcio em Lpx1p

Para verificar a potencial existência de regiões na estrutura da proteína Lpx1p que poderiam interagir com Ca^{2+} , foi utilizado o servidor WebFEATURE 4.0 (endereço eletrônico: < <http://feature.stanford.edu/webfeature/> >) (LIANG *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2008) e a estrutura cristalográfica depositada de Lpx1p de *Saccharomyces cerevisiae* (acesso PDB: 2y6u) (THOMS *et al.*, 2011).

3.10 Obtenção de Lpx1p para ensaios de atividade proteolítica e de ativação *in vitro* de H^+ -ATPase

3.10.1 Crescimento celular e indução

Cepas de BY4741 *lpx1* Δ transformadas com os plasmídeos pYES2/CT-VV, pYES2/CT-LPX1 ou pYES2/CT-LPX1-MOD foram crescidas em 50 mL de meio SD –URA contendo glicose 2% p/v durante 24 h, sob agitação de 200 rpm (incubador rotatório New Brunswick model G25). Em seguida, todo o volume de cultura foi

transferido para 250 mL de meio SD –URA contendo glicose 2% p/v e crescido por mais 24 h sob agitação. Após o crescimento, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água estéril e ressuspensas em meio de indução (meio SD –URA contendo galactose 8% p/v).

As células foram mantidas em meio de indução *overnight* sob agitação de 200 rpm (incubador rotatório New Brunswick model G25) a 30 °C. Após esse período, as células foram coletadas por filtração em membranas com 0,45 µm de porosidade e utilizadas imediatamente na etapa de extração de Lpx1p ou mantidas congeladas a -20 °C até o momento do uso.

3.10.2 Extração de proteínas e enriquecimento utilizando coluna de afinidade

A massa celular obtida foi dividida em frações de 0,5 g e cada uma dessas frações foi transferida para tubo de ensaio contendo 1,5 g de pérolas de vidro (1,5 mm de diâmetro). Em cada tubo foram adicionados 500 µL de tampão de extração (Na₃PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM e β-mercaptoetanol 5 mM) e as células foram rompidas utilizando o vórtex para agitação (3 ciclos de 90 s), com intervalos de resfriamento em gelo. Após três ciclos de agitação, foram adicionados mais 500 µL de tampão de extração e foi feito o rompimento por mais 3 ciclos de 90 s, resultando ao final em um homogenato, conforme descrito anteriormente (DOS PASSOS *et al.*, 1992).

Este homogenato foi então centrifugado a 2885 g por 5 min (Beckman Coulter Allegra X-12R). O sobrenadante obtido após a centrifugação foi separado e novamente centrifugado a 11200 g (Eppendorf 5415D) por 10 min. Após esse tempo, o sobrenadante foi transferido para microtubos com volume útil de 1,5 mL contendo coluna de afinidade de níquel HIS-Select (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A coluna de afinidade utilizada foi lavada e equilibrada conforme instruções do fabricante, previamente à sua utilização no ensaio de enriquecimento de eluato contendo Lpx1p e Lpx1p modificada.

Os tubos foram mantidos sob agitação branda por 1 h a 4 °C. Após o período de incubação com a coluna de afinidade, os tubos foram centrifugados a 2000 g por três min, e o sobrenadante foi removido. A coluna de afinidade foi lavada por

centrifugação três vezes com tampão de lavagem (Na_3PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e β -mercaptoetanol 5 mM) e em seguida as proteínas ligadas à resina foram eluídas com tampão de eluição (Na_3PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e β -mercaptoetanol 5 mM).

Das diferentes etapas realizadas para obtenção das proteínas contendo a cauda de histidina (Lpx1p e Lxp1p modificada) foram coletadas amostras para resolução através de gel de poliacrilamida e quantificação de proteínas (LOWRY *et al.*, 1951). Todas as etapas também foram realizadas com a cepa BY4741 *lpx1* Δ transformada com o vetor vazio (pYES2/CT-VV) e utilizada como controle nos experimentos posteriores.

3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western Blotting*

3.11.1 Condições da eletroforese

Foi utilizado o aparato de corrida em gel de poliacrilamida BioRad Laboratories, montado e preparado conforme instruções do fabricante. As proteínas foram separadas em gel desnaturante (ou não-desnaturante) com concentração de poliacrilamida de 8 ou 12 %. A eletroforese foi realizada durante 4 h utilizando uma diferença de potencial de 80 V.

3.11.2 Coloração e revelação por prata

Após eletroforese, o gel foi lavado para remoção do excesso de tampão de corrida e mantido em solução fixadora (etanol 40% v/v, ácido acético glacial 10% v/v e água destilada 50% v/v) *overnight*. Em seguida, foram feitas três lavagens em água destilada com duração de 10 min cada. O gel de poliacrilamida foi sensibilizado em solução de tiosulfato de sódio 0,02% p/v durante 1 min, e em seguida lavado com água destilada durante dois min. O gel foi mantido em solução de impregnação (nitrito de prata 0,2% p/v e formol 0,075 v/v) por 45 min sendo em seguida lavado com água destilada por 10 s. Foi adicionado ao gel a solução reveladora (carbonato de sódio 3% p/v, formol 0,025% v/v e tiosulfato de sódio 0,0012% p/v) até que fosse possível a observação das bandas. A revelação foi interrompida com solução de parada (Tris 3% p/v e ácido acético glacial 10% v/v), e o gel foi mantido nessa solução por 30 min. Imagens

do gel foram obtidas através do *software* Image Scanner (Amersham Biosciences, United Kingdom).

3.11.3 *Western Blotting*

A presença das proteínas Lpx1 e Lpx1 modificada, ambas contendo cauda de histidina, foi avaliada nos extratos enriquecidos em coluna de afinidade através de *Western Blotting*. Como controle negativo foi utilizado o extrato obtido das células transformadas com o vetor vazio (pYES2/CT-VV).

50 µg das amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida 12% através de SDS-PAGE. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), segundo recomendações do fabricante do sistema de transferência (BioRad Laboratories). As membranas foram bloqueadas por 1 h com tampão PBS contendo Tween 20 0,1% v/v e leite desnatado em pó 5% p/v. As membranas foram então incubadas *overnight* com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-His (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) na proporção 1:1500, sendo subsequentemente lavadas por três vezes com tampão PBS contendo Tween 20 0,1% v/v. A incubação com anticorpo secundário anti IgG de camundongo-HRP (H+L) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), na proporção 1:3000, foi realizada durante 1 h, com posterior lavagem das membranas em tampão PBS contendo Tween 20 0,1% v/v. A visualização das bandas marcadas foi realizada com o substrato quimioluminescente WESTAR Nova 2.0 (Cyanagen, Itália), conforme orientações do fabricante. As imagens foram obtidas através do *software* Image Scanner (Amersham Biosciences, United Kingdom).

3.12 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi avaliada em extratos de membrana de células BY4741 e BY4741 *lpx1Δ*, com o uso de azocaseína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como substrato (CHARNEY e TOMARELLI, 1947). Amostras de membranas totais contendo de 50-100 µg de proteínas foram adicionados à mistura de reação (Tris-HCl 100 mM, azocaseína 0,5% p/v, pH 8,0), com ou sem adição de cálcio 1 mM

(concentração final), para um volume de 500 μL . A mistura foi mantida por 1 h a 40 °C e, após este tempo, a reação foi interrompida com adição de 250 μL de ácido tricloroacético 10% p/v. A mistura resultante foi centrifugada a 2000 g por 5 min, para remoção de proteínas coaguladas, e 500 μL do sobrenadante foram retirados e transferidos para um microtubo. Foram adicionados 500 μL de KOH 5 M para neutralização desse sobrenadante e então a absorbância a 428 nm foi medida através do espectrofotômetro BioMate 3S (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Alterações a cada 0,01 na absorbância, resultantes da hidrólise de azocaseína, foram definidas como uma unidade arbitrária (AU/mL). O controle foi obtido através da adição da solução de ácido tricloroacético à azocaseína antes da adição do eluato contendo proteínas.

A atividade proteolítica dos eluatos obtidos das cepas de BY4741 *lpx1* Δ transformada com os vetores pYES2/CT-VV e pYES2/CT-LPX1 e a influência da adição de cálcio também foram avaliadas com o uso de azocaseína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como substrato (CHARNEY e TOMARELLI, 1947). Amostras contendo 100 μg foram dissolvidas em tampão Laemmli não-redutor (Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 10% p/v, azul de bromofenol 0,001% p/v, pH 6,8) sendo realizada eletroforese a 4 °C em gel de poliacrilamida 8%. Após eletroforese, porções do gel contendo as bandas correspondentes à Lpx1p foram retiradas e lavadas três vezes com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, sob agitação branda. As porções de gel foram adicionadas à mistura de reação (Tris-HCl 100 mM, azocaseína 0,5% p/v, pH 8,0), com ou sem adição de cálcio 100 μM (concentração final), para um volume de 500 μL . O ensaio foi realizado conforme descrito anteriormente para análise de atividade proteolítica em extratos de membranas. Porções do gel equivalentes das canaletas onde se adicionaram amostras de proteínas provenientes do eluato de células BY4741 *lpx1* Δ transformadas com o vetor vazio foram utilizadas como controle.

3.13 Medida de atividade de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática

A atividade de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática foi avaliada por duas abordagens diferentes: medida indireta da taxa de bombeamento de prótons através da acidificação extracelular e diretamente através da medida de hidrólise de ATP em extratos contendo membranas citoplasmáticas purificadas.

3.13.1 Acidificação extracelular induzida por glicose

As cepas a serem avaliadas foram inoculadas em 50 mL de meio YP Glicose 2% p/v e crescidas a 30 °C por 24 h sob agitação de 200 rpm (incubador rotatório New Brunswick model G25). Todo o volume foi vertido em 300 mL de YP Glicose 2% p/v e incubado por 18 h, sob agitação. Após crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 2885 g por 5 min (Beckman Coulter Allegra X-12R), a 4 °C, e lavadas três vezes com água destilada gelada. As células, transferidas para tubos Falcon (50 mL), foram ressuspensas em solução de acidificação (Tris-HCl 100 mM, KCl 100 mM, pH 4,5) a uma concentração de 0,1 g/mL. Cinco amostras de 4,5 mL dessa suspensão celular foram transferidas para béqueres com volume útil de 5 mL. Em duas amostras a estabilização do pH foi acompanhada por 2 min, e em seguida, foram submetidas a um pulso de 1 μmol de H⁺ pela adição de 500 μL de HCl 10 mM (padrão) e a variação de pH foi monitorada por 2 min e os valores foram anotados de 30 em 30 s (potenciômetro Orion Model 900A). Em três amostras, a estabilização do pH foi também monitorada por 2 min, e em seguida 500 μL de glicose 1 M foram adicionados (para atingir uma concentração final de 100 mM) e a variação do pH foi acompanhada, como descrito anteriormente para o pulso de H⁺, durante mais 6 min. Ao final de cada procedimento de acidificação, 100 μL de cada amostra foram coletados em membranas com 0,45 μm de porosidade previamente pesadas. Após a filtração, as membranas contendo as células foram levadas a estufa 80 °C por 24 h e o peso seco foi determinado.

As taxas de bombeamento de prótons foram calculadas de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{mmol H}^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g de células}^{-1} = \frac{\Delta\text{pH} \div \Delta\text{pH (HCl)} \times 60}{\Delta t \times \text{PS} \times \text{volume da solução (50)} \times 1000}$$

Onde:

- ΔpH = variação de pH na presença de glicose;
- ΔpH (HCl) = refere-se à variação de pH após a adição de 1 μmol H⁺ (controle);
- Δt = tempo de monitoramento, convertido em escala;

- d) PS = valor do peso seco médio em gramas;
- e) Multiplicou-se por 60 para converter o valor para h;
- f) Foi dividido pelo peso seco obtendo o resultado em gramas;
- g) Multiplicação por 1.000 na equação, para que a extrusão de prótons seja apresentada em mmoles de $H^+ \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ de célula.

A taxa máxima de bombeamento de prótons foi calculada pela inclinação da reta indicando a variação de pH no meio, como descrito anteriormente e indicada em $mmol H^+ \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ célula (SOUZA *et al.*, 2001).

Para medir a taxa de bombeamento de prótons em cepas transformadas com os vetores pYES2/CT-VV e/ou pYES2/CT-LPX1, células crescidas em meio SD –URA foram lavadas duas vezes por centrifugação a 2885 g por 5 min com tampão (Tris-HCl 100 mM, KCl 100 mM, pH 4,5). Após lavagem, as células foram incubadas no mesmo tampão suplementado com galactose 100 mM (concentração final) antes do início do ensaio de acidificação extracelular, com o objetivo de promover a expressão do gene *LPX1* (quando presente). A indução com galactose 100 mM foi realizada por diferentes tempos (10, 30 e 50 min) e em seguida as células foram novamente lavadas por centrifugação (2885 g, 5 min) com tampão (Tris-HCl 100mM, KCl 100 mM, pH 4,5). Em seguida, o ensaio de acidificação extracelular foi realizado conforme descrito previamente neste trabalho. Células sem incubação com galactose 100 mM foram utilizadas como controle.

3.13.2 Medida de hidrólise de ATP em extratos contendo membranas citoplasmáticas purificadas

3.13.2.1 Obtenção de extratos contendo membranas citoplasmáticas

Para avaliação direta da atividade de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, células de BY4741 *lpx1Δ* transformadas com os vetores pYES2/CT-VV e pYES2/CT-LPX1 foram coletadas após incubação *overnight* em meio de indução (SD –URA suplementado com galactose 8% p/v), através de centrifugação a 2885 g (Beckman Coulter Allegra X-12R) por 5 min e lavadas duas vezes em tampão de

incubação (MES 10 mM, pH 6,5 ajustado com Tris). As células foram coletadas por filtração em membranas com 0,45 µm de porosidade e foram utilizadas imediatamente na etapa de extração de membranas citoplasmáticas ou mantidas congeladas a -20 °C até o momento do uso. A obtenção dos extratos foi realizada conforme previamente descrito por DOS PASSOS *et al.* (1992).

A massa celular obtida foi dividida em frações de 0,5 g e cada uma dessas frações foi transferida para tubo de ensaio contendo 1,5 g de pérolas de vidro (1,5 mm de diâmetro) e 500 µL de tampão de extração (Tris 100 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, sorbitol 330 mM) e, em seguida, rompidas sob agitação em vórtex (3 ciclos de 90 s) com intervalos de resfriamento em gelo. Após estes ciclos de agitação, foram adicionados mais 500 µL do tampão de extração com repetição dos ciclos em vórtex, sendo obtido um homogenato.

A fração de membranas citoplasmáticas foi obtida por centrifugação fracionada do homogenato. Inicialmente, foi realizada uma centrifugação a 2885 g por 5 min (Beckman Coulter Allegra X-12R). O sobrenadante resultante foi dividido em tubos e centrifugado a 15000 g por 30 min (Beckman L7-65). O sedimento obtido em cada um dos tubos foi ressuspensionado em 1 mL de tampão glicerol (Glicerol 20% v/v; Tris 10 mM, β-mercaptoetanol 1 mM, pH 7,5) e, em seguida, foi centrifugado em gradiente de sacarose (3 mL de sacarose 53,5% p/p + 6 mL de sacarose 43,5% p/p) a 100000 g por 2 h (Beckman L7-65). Na interface do gradiente foi coletada a fração contendo a membrana citoplasmática e esta foi diluída e homogeneizada em 10 mL de água. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 100000 g por 30 min (Beckman L7-65). O sedimento final foi ressuspensionado em 300 µL de tampão glicerol sendo utilizado para determinação da atividade específica da H⁺-ATPase. A determinação do conteúdo de proteínas foi realizado pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

3.13.2.2 Determinação de atividade de hidrólise de ATP por H⁺-ATPase

A medida de hidrólise de ATP foi avaliada nos extratos contendo frações de membranas citoplasmáticas, conforme descrito previamente por DOS PASSOS *et al.* (1992). 40 µg de proteínas do extrato contendo membranas foram utilizadas para um volume final de 250 µL de reação. Em cada tubo foi adicionada a fração de membranas

em tampão de incubação (HEPES 50 mM, NaN_3 10 mM e molibdato de amônio 5 mM, pH 6,5) suplementado com MgCl_2 1 mM (concentração final). Esta mistura foi pré-incubada por 10 min a 30 °C. Em seguida, foi adicionado à mistura ATP 2 mM (concentração final). A reação foi interrompida após 10 min com a adição de 250 μL de ácido tricloroacético 10% p/v. Imediatamente, foram adicionados 450 μL de molibdato de amônio 5 mM em HCl 0,8 N (para complexar o fosfato liberado durante a reação de hidrólise de ATP) e 50 μL do reativo de cor (ANSA 1 mg, Na_2SO_3 20 mg, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 600 mg, água q.s.p. 4 mL). Após 30 min à temperatura ambiente foi feita a leitura. As absorbâncias a 710 nm foram obtidas em um espectrofotômetro BioMate 3S (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Como padrão foi utilizada uma solução de Na_3HPO_4 .

A atividade específica expressa em $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ foi calculada por meio da seguinte equação:

$$\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} = \frac{\left(\frac{\text{Abs. 710 nm} - a}{b} \right)}{40(\mu\text{g}) \times 10 (\text{min})} \times 1000$$

Onde:

- Abs.710 nm = valor da absorbância relativa à hidrólise de ATP;
- a = intercepto da curva padrão de fosfato;
- b = inclinação da curva padrão de fosfato;
- 40 μg =quantidade de proteína utilizada no ensaio;
- 10 min = tempo total da reação de hidrólise de ATP;
- 1000 = multiplica-se por 1000 para obter o resultado em $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

3.14 Ativação *in vitro* de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática

Para examinar uma conexão direta entre a disponibilidade de cálcio, as atividades de Lpx1p e Ptk2p e a regulação de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, foi reconstituído *in vitro* o mecanismo de ativação de H^+ -ATPase. Este ensaio foi dividido em três etapas principais: (a) purificação de membranas citoplasmáticas, (b) obtenção de

extratos livres de membranas e (c) ativação *in vitro* de H⁺-ATPase seguido de ensaio de atividade ATPásica.

3.14.1 Purificação de membranas citoplasmáticas

Células de BY4741 (cepa selvagem) foram crescidas sob agitação em meio YP contendo glicose 4% p/v e coletadas por centrifugação a 2885 g (Beckman Coulter Allegra X-12R) por 5 min e lavadas duas vezes em tampão (MES 10 mM, pH 6,5 ajustado com Tris). Após a centrifugação, essas células foram transferidas para erlenmeyers contendo tampão de incubação (MES 100 mM, pH 6,5 ajustado com Tris), a uma concentração de 150 mg de células/mL, e mantidas em banho-maria a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 4 h, para esgotar qualquer fonte de carbono ainda presente na suspensão celular e manter a H⁺-ATPase de membrana citoplasmática em um estado não-ativado. Após este período, a suspensão de células foi fracionada e imediatamente filtrada a vácuo em membranas 0,45 µm de porosidade. A obtenção de membranas citoplasmáticas foi realizada conforme descrito anteriormente neste trabalho, de acordo com DOS PASSOS *et al.* (1992), sem adição de EDTA no tampão de lise e no tampão glicerol. A determinação do conteúdo de proteínas foi realizado pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

3.14.2 Obtenção de extratos livres de membranas

Para reconstituição *in vitro* do mecanismo de ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, foram obtidos extratos livres de membranas (ELM) da cepa selvagem BY4741 e de cepas com deleção nos genes *LPX1* e *PTK2* (BY4741 *lpx1*Δ e BY4741 *ptk2*Δ, respectivamente). As células foram crescidas e submetidas a depleção de nutrientes por 4 h, da mesma maneira conforme descrito para purificação de membranas citoplasmáticas, sendo em seguida coletadas por filtração em membranas com 0,45 µm de porosidade. 0,5 g de células foram ressuspendidas em 500 µL de tampão de extração sem inibidores de protease (Tris 100 mM, sorbitol 330 mM e β-mercaptoetanol 5 mM) e rompidas sob agitação em vórtex em tubos de ensaio contendo 1,5 g de pérolas de vidro (1,5 mm de diâmetro), por 3 ciclos de agitação de 90 s. Em seguida, foram adicionados

mais 500 μL de tampão de extração, com mais 3 ciclos de 90 s de agitação em vórtex, onde foi obtido um homogenato. Este homogenato foi centrifugado a 2885 g durante 5 min e em seguida o sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 100000 g por 30 min (Beckman L7-65). O sobrenadante resultante desta centrifugação resultou no que foi denominado extrato livre de membranas (ELM).

3.14.3 Ativação *in vitro* de H^+ -ATPase e ensaio de atividade ATPásica

Para os ensaios de ativação *in vitro* de H^+ -ATPase, os extratos livres de membranas utilizados bem como os eluatos contendo Lpx1p e Lpx1p modificada foram submetidos à diálise *overnight* a 4 °C com tampão de incubação (HEPES 50 mM, NaN_3 10 mM e molibdato de amônio 5 mM).

A ativação *in vitro* e a medida de hidrólise de ATP foram avaliadas nos extratos contendo frações de membranas citoplasmáticas de células da cepa selvagem (BY4741) submetidas à depleção de nutrientes, conforme descrito anteriormente. 40 μg de proteínas desse extrato contendo membranas foram utilizadas para um volume final de 250 μL de reação. Em cada tubo foi adicionada a fração de membranas em tampão de incubação (HEPES 50 mM, NaN_3 10 mM e molibdato de amônio 5 mM, pH 6,5) suplementado com MgCl_2 1 mM (concentração final).

Inicialmente, para definição das melhores condições dos ensaios de ativação *in vitro*, a pré-incubação da mistura de reação foi testada por diferentes tempos (10, 30 e 60 min), diferentes concentrações de cálcio (100 μM , 1 e 5 mM) e também com relação à concentração de proteínas provenientes dos extratos livres de membranas (50, 100, 200 e 400 μg). Todos os testes foram realizados à temperatura de 30 °C em banho-maria. Em cada tubo de reação a ser testado, foi adicionado ATP 2 mM (concentração final). A reação foi interrompida após 10 min com a adição de 250 μL de ácido tricloroacético 10% p/v. Imediatamente, foram adicionados 450 μL de molibdato de amônio 5 mM em HCl 0,8 N (para complexar o fosfato liberado durante a reação de hidrólise de ATP) e 50 μL do reativo de cor (ANSA 1 mg, Na_2SO_3 20 mg, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 600 mg, água q.s.p. 4 mL). Após 30 min à temperatura ambiente foi feita a leitura das absorbâncias a 710 nm em espectrofotômetro BioMate 3S (Thermo Scientific,

Waltham, MA, USA). Como padrão foi utilizada uma solução de Na_3HPO_4 e a atividade específica, expressa em $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, foi calculada conforme descrito previamente neste trabalho e indicada nos resultados como um percentual relativo ao controle do teste.

Para avaliação de inibição de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, foi realizado um ensaio de ativação *in vitro* e atividade ATPásica onde foram adicionados 50 μM de ortovanadato de sódio (concentração final) ao sistema de ativação. Todos os extratos livres de membranas, bem como os eluatos utilizados, foram avaliados para verificação de atividade ATPásica remanescente, como controle. Os ensaios de atividade de hidrólise de ATP foram realizados conforme descrito por DOS PASSOS *et al.* (1992), com modificações, e controles foram realizados para cada ensaio.

3.15 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e com controles adequados e o desvio-padrão foi indicado em cada figura ou tabela. As análises estatísticas foram realizadas com o uso de Teste *T* de Student ou Análise de Variância (ANOVA) através do programa GraphPad Prism versão 6.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de *P* foi menor que 0,05.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Influência de Lpx1p sobre a atividade de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática e no sinal de cálcio intracelular

Para verificar o efeito de Lpx1p sobre a atividade de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática (medida indiretamente através da taxa de bombeamento de prótons) e também na sinalização de cálcio intracelular, foram utilizadas diferentes cepas: além da cepa selvagem (PJ69), as cepas *arg82Δ*, *yvc1Δ* e *lpx1Δ* e os duplos mutantes *arg82Δ lpx1Δ* e *yvc1Δ lpx1Δ* foram utilizadas.

Como demonstrado na **Figura 9**, a taxa de bombeamento de prótons foi reduzida em cepas que apresentam deleção do gene *LPXI*, em comparação com a cepa selvagem, e resultado similar também foi observado na cepa com deleção do gene *YVC1*. Por outro lado, a deleção de *ARG82* provocou um claro aumento da atividade de H⁺-ATPase, comparado à cepa selvagem. Quando a deleção de *ARG82* foi realizada de forma simultânea com a de *LPXI*, a atividade de H⁺-ATPase foi reduzida como na cepa com deleção única *lpx1Δ*. O mesmo padrão de redução na atividade de bombeamento de prótons também foi observado no duplo-mutante *yvc1Δ lpx1Δ*.

A influência de Lpx1p na sinalização de cálcio intracelular induzido por glicose também foi avaliada, no mesmo conjunto de cepas (**Figura 10**). Foi observado que na cepa com deleção única do gene *LPXI* o sinal de cálcio intracelular gerado após o pulso de glicose foi comparável com o sinal de cálcio obtido na cepa selvagem. Na cepa com a deleção única do gene *ARG82* e quando essa deleção foi combinada com a deleção de *LPXI*, foi verificado um sinal de cálcio de maior intensidade, em comparação ao visto na cepa selvagem. Em células *yvc1Δ* e *yvc1Δ lpx1Δ* a sinalização de cálcio foi reduzida, ou, até mesmo, ausente.

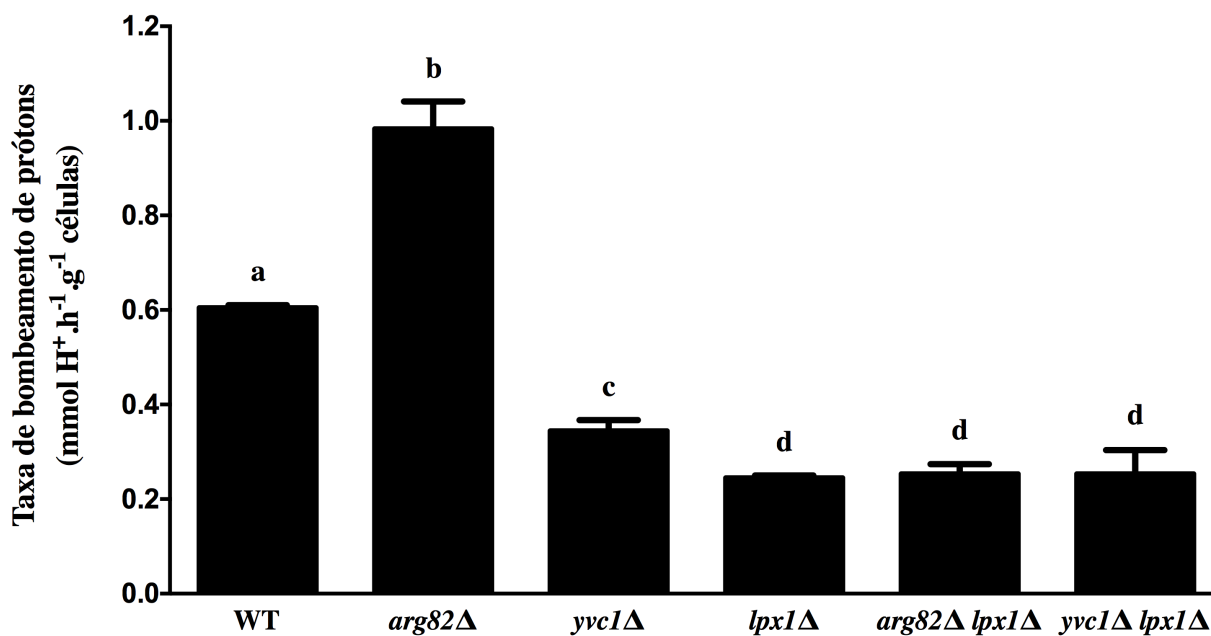


Figura 9 – Efeitos de diferentes deleções na atividade de bombeamento de prótons de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática em células de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa PJ69). A taxa de bombeamento de prótons foi medida utilizando-se aproximadamente 500 mg de células, após a adição de glicose 100 mM (concentração final). Letras diferentes indicam que as médias diferem-se entre si estatisticamente ($P < 0,05$).

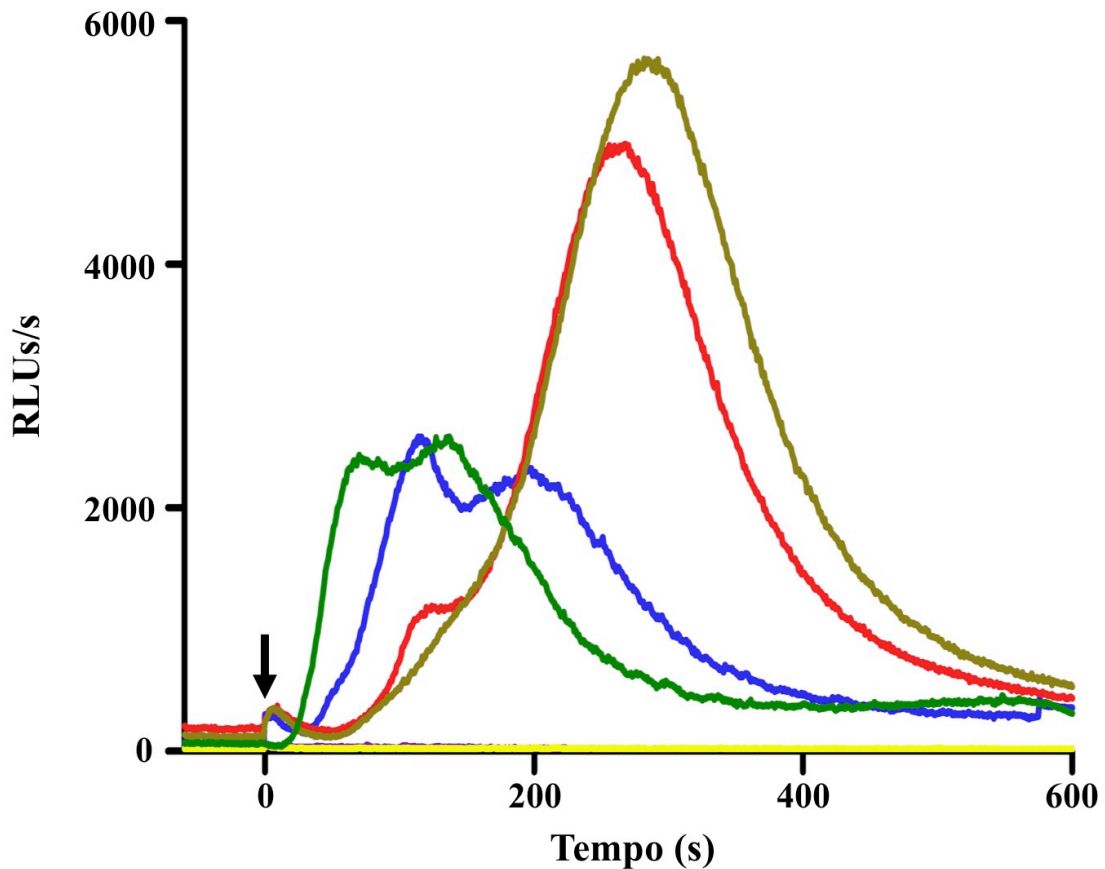


Figura 10 – Efeitos de diferentes deleções na sinalização de cálcio intracelular em células de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa PJ69). A medida de cálcio citosólico livre foi realizada através do método da aequorina-coelenterazina em células previamente incubadas com 50 μ M de coelenterazina, após a adição de glicose 100 mM (concentração final) no tempo 0 s (indicado pela seta preta). Cepa selvagem (■), *lpx1Δ* (■), *arg82Δ* (■), *arg82Δ lpx1Δ* (■), *yvc1Δ* (■) e *yvc1Δ lpx1Δ* (■). RLU/s: unidades relativas de luminescência por segundo.

4.2 Busca *in silico* por sítios de ligação com cálcio na estrutura da proteína Lpx1

De forma a verificar uma possível interação de cálcio com Lpx1p, foi realizada uma análise *in silico* para avaliar a existência de sítios potenciais de ligação com Ca^{2+} na estrutura desta proteína. A análise foi realizada através do programa WebFEATURE 4.0 que indicou a presença de uma possível região de interação com cálcio com predição de alta confiança (95% de performance de precisão). Este possível sítio de interação foi localizado na região C-terminal da proteína na posição Asp368, sendo identificado como um motivo ligador de cálcio do tipo mão EF (**Figura 11**).

4.3 Clonagem do gene *LPXI* e *LPXI* modificado no vetor pYES2/CT e transformação de leveduras

4.3.1 Amplificação e clonagem de *LPXI*

O gene *LPXI* foi amplificado através de PCR utilizando como molde o DNA da cepa selvagem BY4741 e foram usados os iniciadores *F-LPXI-HIS* e *R-LPXI-HIS*. A amplificação do gene foi confirmada após eletroforese em gel de agarose 1,2% p/v. O produto de PCR de aproximadamente 1200 pb (**Figura 12**) foi em seguida utilizado para ligação com o vetor de expressão pYES2/CT. Após reação para ligação do gene com o vetor, o produto de ligação (denominado pYES2/CT-*LPXI*) foi utilizado para transformação de bactérias competentes. Das colônias crescidas em meio LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi feita a confirmação da presença do gene *LPXI* através de PCR de colônia com os iniciadores *F-LPXI-HIS* e *R-LPXI-HIS* e os produtos de PCR resolvidos em gel de agarose 1,2% p/v (**Figura 13**). Foram avaliados 5 transformantes obtidos na placa de transformação e a colônia 1 foi selecionada para etapa de purificação do plasmídeo pYES2/CT-*LPXI*.

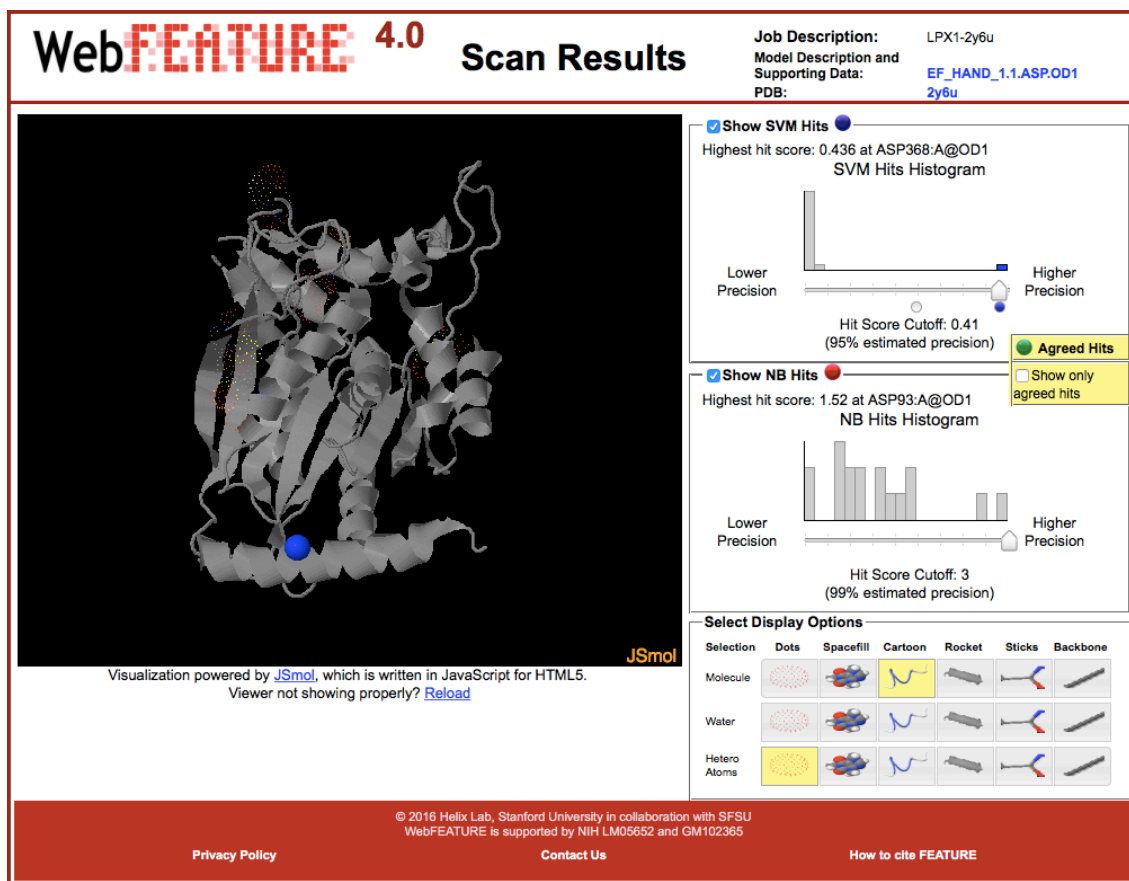


Figura 11 – Busca *in silico* por sítios de ligação com cálcio em Lpx1p. A análise *in silico* foi realizada através do programa WebFEATURE 4.0 e o resultado obtido indicou um possível sítio de ligação com cálcio na porção C-terminal da proteína, indicado na figura por uma esfera em azul. Este sítio de ligação foi identificado como um motivo ligador de cálcio do tipo mão EF.

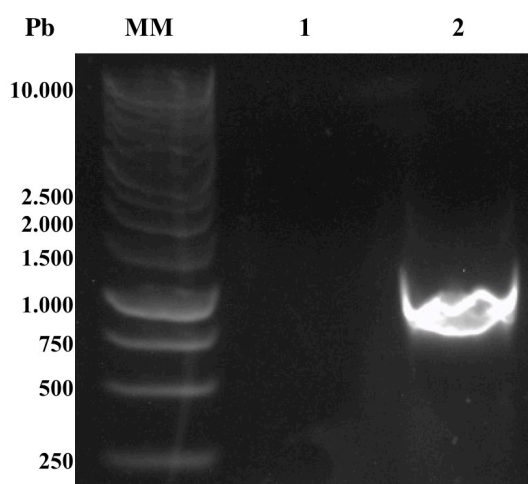


Figura 12 – Confirmação da amplificação de *LPX1* da cepa BY4741. O gene *LPX1* foi amplificado através de PCR e o produto obtido foi resolvido em gel de agarose 1,2% p/v. MM: marcador de peso molecular (Kasvi, Brasil), Coluna 1: controle negativo (reação sem adição de DNA molde) e Coluna 2: produto obtido após amplificação utilizando DNA da cepa selvagem BY4741.

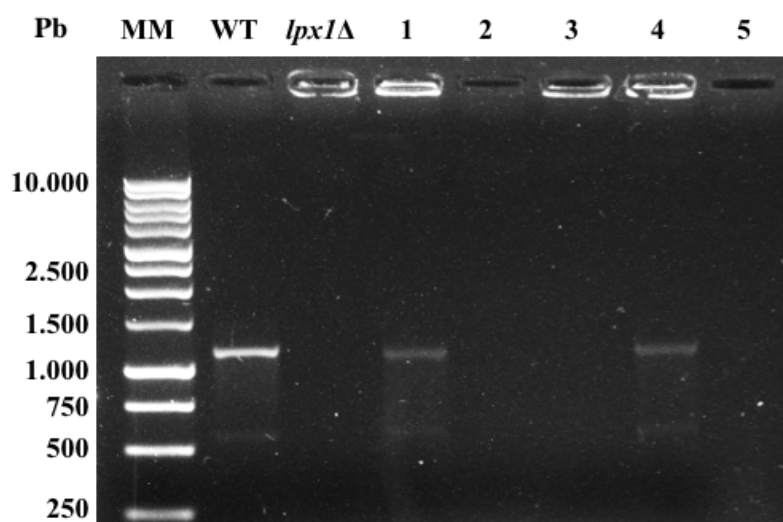


Figura 13 – Amplificação de *LPX1* em bactérias transformadas com o vetor pYES2/CT-*LPX1*. Colônias crescidas em meio seletivo foram retiradas e submetidas à PCR de colônia. A presença do produto de ligação pYES2/CT-*LPX1* foi confirmada através da amplificação do gene *LPX1* e resolvida em gel de agarose 1,2% p/v. MM: marcador de peso molecular (Kasvi, Brasil), WT: controle positivo (DNA da cepa selvagem BY4741), *lpx1Δ*: controle negativo (DNA da cepa BY4741 *lpx1Δ*) e Colunas 1-5: amplificação de *LPX1* após PCR de colônia dos transformantes avaliados (colônias 1 a 5).

4.3.2 Obtenção de *LPXI* modificado e clonagem no vetor pYES2/CT

Após obtenção do gene *LPXI* através de PCR, foi realizado o corte do produto obtido com a enzima de restrição *PvuII*. O gene modificado, com tamanho de 909 pb, foi em seguida utilizado para ligação com o vetor de expressão pYES2/CT. Após reação para ligação do gene com o vetor, o produto de ligação (denominado pYES2/CT-*LPXI*-MOD) foi utilizado para transformação de bactérias competentes. As colônias crescidas em meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) foram retiradas da placa e a confirmação da presença do gene *LPXI* modificado foi feita através de PCR de colônia com os iniciadores *F-LPXI-HIS* e *R-CYC* e os amplicons resolvidos em gel de agarose 1,2% p/v. A diferença de tamanho entre os amplicons que foram obtidos após amplificação mostrou que o gene *LPXI* modificado estava inserido no vetor de expressão (Figura 14).

4.3.3 Extração e purificação de pYES2/CT-VV, pYES2/CT-*LPXI* e pYES2/CT-*LPXI*-MOD

Após confirmação da presença do gene *LPXI* e *LPXI* modificado no vetor de expressão, foi realizada a extração de DNA plasmidial para transformação de leveduras. As colônias de bactérias escolhidas foram crescidas em 5 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e a suspensão obtida foi utilizada para extração de pYES2/CT-*LPXI* e pYES2/CT-*LPXI*-MOD. Foi realizada também extração do plasmídeo vazio (denominado pYES2/CT-VV), nas mesmas condições descritas.

4.3.4 Transformação de leveduras

Células de BY4741 *lpx1*Δ foram utilizadas para transformação com os vetores pYES2/CT-*LPXI*, pYES2/CT-*LPXI*-MOD e pYES2/CT-VV. Após crescimento em meio SD –URA contendo glicose 2% (Figura 15), as colônias de cada uma das placas de seleção onde foram utilizados os vetores para transformação foram retiradas para crescimento e congelamento a -80 °C.

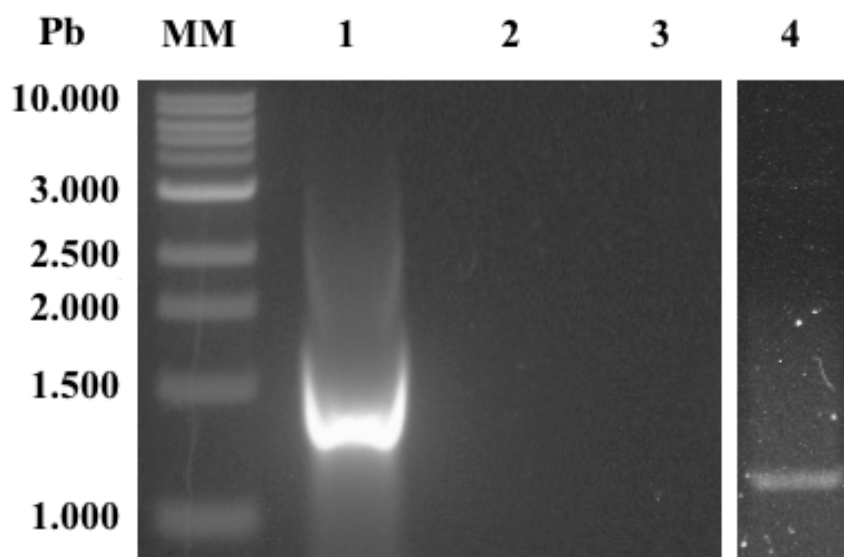


Figura 14 – Confirmação da clonagem de *LPXI* modificado em pYES2/CT em bactérias transformadas com o vetor pYES2/CT-*LPXI*-MOD. Colônias crescidas em meio seletivo foram retiradas e submetidas à PCR de colônia. A presença do produto de ligação pYES2/CT-*LPXI*-MOD foi confirmada através da amplificação do gene *LPXI* e resolvida em gel de agarose 1,2% p/v. MM: marcador de peso molecular (Kasvi, Brasil), Coluna 1: controle positivo (plasmídeo pYES2/CT-*LPXI*) e Colunas 2-4: amplificação obtida das após PCR das colônias transformadas. A amplificação utilizando a colônia referente à linha 4 mostrou amplificação do gene modificado.

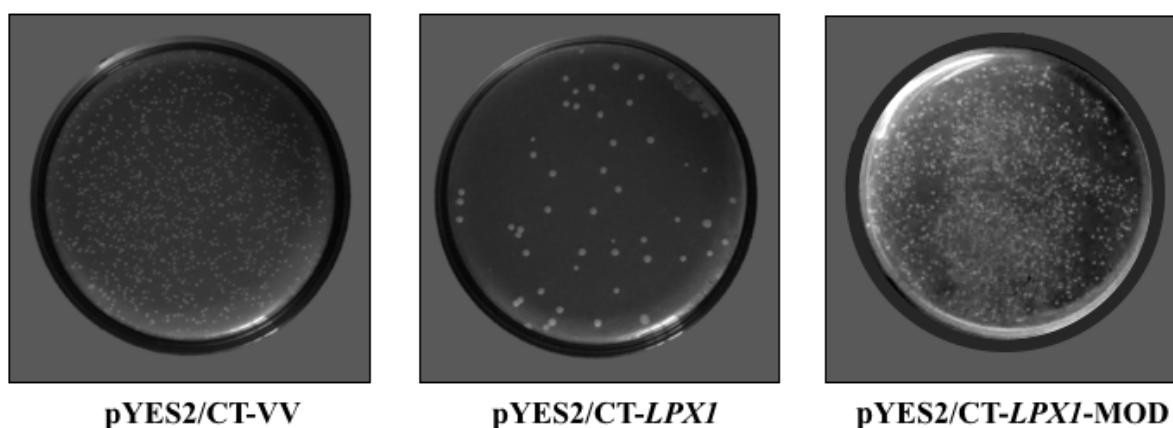


Figura 15 – Transformação de células de BY4741 *lpx1Δ* com os plasmídeos pYES2/CT-VV, pYES2/CT-*LPXI* e pYES2/CT-*LPXI*-MOD. As células foram transformadas com os plasmídeos e crescidas em placas de SD –URA com glicose 2% p/v, durante 3 dias.

4.3.5 Verificação de indução de Lpx1p no vetor pYES2/CT-LPX1

A verificação da funcionalidade do sistema de indução foi avaliada nas células de BY4741 *lpx1Δ* transformadas com pYES2/CT-LPX1. Após indução com galactose 100 mM por diferentes tempos (10, 30 e 50 min) foi realizada a medida de atividade através da taxa de bombeamento de prótons.

Células de BY4741 *lpx1Δ* transformadas com o vetor vazio (pYES2/CT-VV), bem como a cepa selvagem BY4741 e a cepa BY4741 *lpx1Δ* foram utilizadas como controles. Além disso, células sem indução com galactose também foram utilizadas para medida da taxa de bombeamento de prótons.

Conforme demonstrado na **Figura 16**, um aumento na taxa de bombeamento de prótons foi observado nas células de BY4741 *lpx1Δ* expressando LPX1 através do vetor pYES2/CT, em comparação com células não induzidas. Após 10, 30 e 50 min a taxa de bombeamento foi aumentada em 58,0%, 87,3% e 112,4%, respectivamente, em comparação com as células em que não foi realizada indução com galactose. Células de BY4741 *lpx1Δ* transformadas com o vetor vazio (pYES2/CT-VV) mostraram taxas de bombeamento de prótons similares ao que foi observado nas células de BY4741 *lpx1Δ*, com ou sem indução com galactose.

Considerando os resultados observados após 50 min de indução, as células de BY4741 *lpx1Δ* contendo pYES2/CT-LPX1 apresentaram taxas de bombeamento similares às verificadas na cepa selvagem. Dessa forma, após este tempo, a expressão de Lpx1p estaria funcional no vetor construído, permitindo então a ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática.

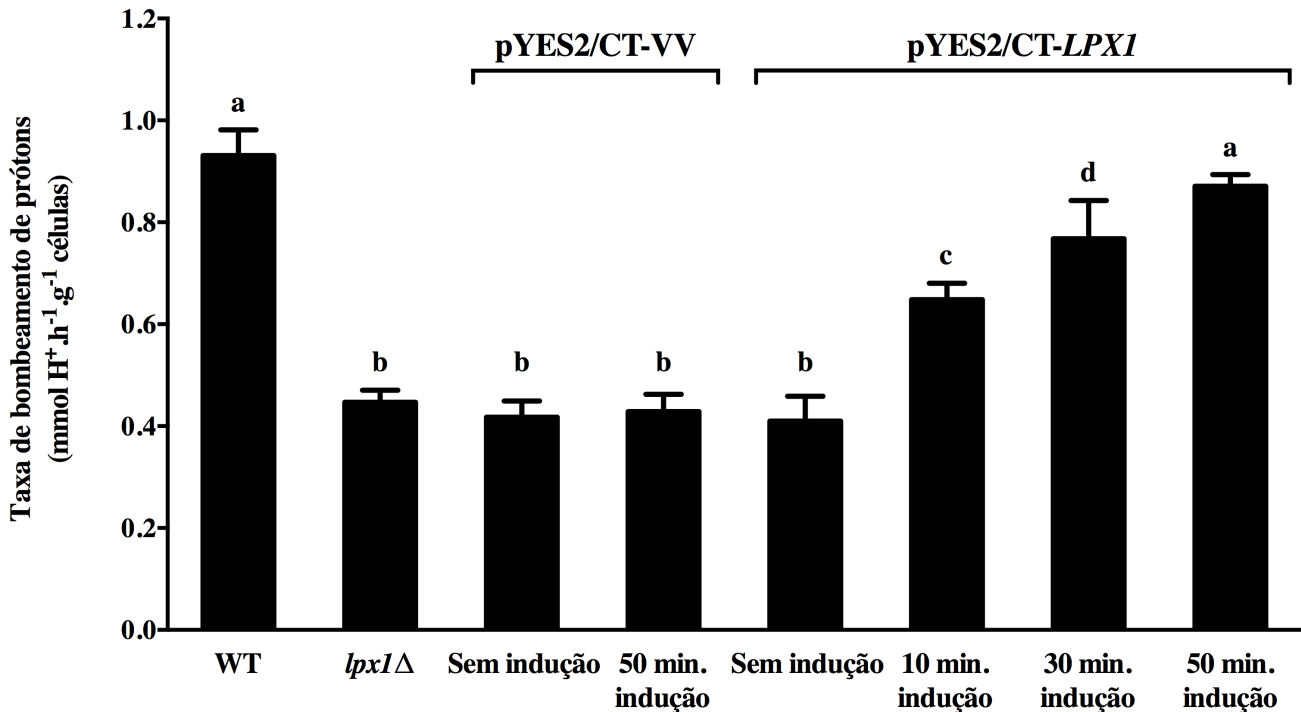


Figura 16 – Atividade de bombeamento de prótons em células de leveduras transformadas com os plasmídeos pYES2/CT-VV e pYES2/CT-LPX1. As células foram induzidas com galactose 100mM (concentração final) por diferentes tempos (10, 30 e 50 min) e a taxa de bombeamento de prótons foi medida após a adição de glicose 100 mM (concentração final). Células transformadas com os vetores pYES2/CT-VV e pYES2/CT-LPX1 não induzidas com galactose e também células de BY4741 e BY4741 *lpx1Δ* foram utilizadas como controles. WT: Cepa selvagem BY4741 e *lpx1Δ*: cepa BY4741 *lpx1Δ*. Letras diferentes indicam que as médias diferem-se entre si estatisticamente ($P < 0,05$).

4.4 Atividade de ATPase em membranas citoplasmáticas de células transformadas com pYES2/CT-VV e pYES2/CT-LPX1

A influência de Lpx1p na atividade de H⁺-ATPase também foi avaliada através da atividade ATPásica em membranas citoplasmáticas extraídas de células de BY4741 *lpx1Δ* transformadas com os vetores pYES2/CT-VV e pYES2/CT-LPX1. As células foram crescidas, coletadas e posteriormente induzidas *overnight* com galactose 8% p/v. Após extração e purificação das membranas, a atividade ATPásica de H⁺-ATPase foi avaliada.

Membranas de células transformadas com o vetor pYES2/CT-LPX1 mostraram uma atividade ATPásica maior (39% de aumento) do que aquela observada nas membranas das células transformadas com o vetor vazio (**Figura 17**), corroborando os resultados observados na medida de atividade de H⁺-ATPase verificados através da taxa de bombeamento de prótons.

4.5 Enriquecimento de extratos contendo Lpx1p e Lpx1p modificada utilizando coluna de afinidade a níquel

Após crescimento em meio SD –URA contendo glicose 2% p/v, as células de BY4741 *lpx1Δ* transformadas com os vetores pYES2/CT-VV, pYES2/CT-LPX1 e pYES2/CT-LPX1-MOD foram coletadas, lavadas e em seguida ressuspendidas em SD –URA contendo galactose 8% p/v para indução. Após indução *overnight*, as células foram coletadas novamente e realizada a extração/enriquecimento de Lpx1p e Lpx1p modificada em coluna de afinidade.

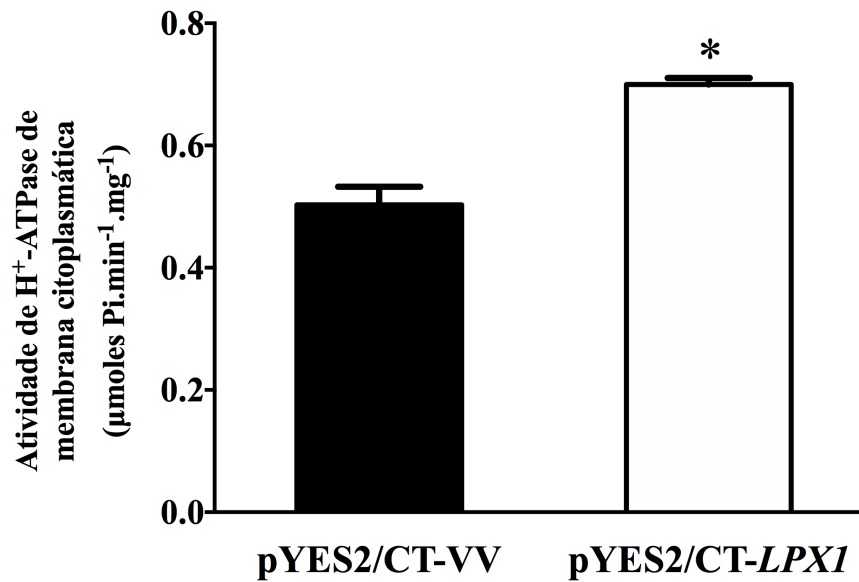


Figura 17 – Atividade ATPásica em membranas plasmáticas de BY4741 *lpx1*Δ transformadas com os plasmídeos pYES2/CT-VV e pYES2/CT-LPX1 após indução com galactose. As células foram induzidas *overnight* com galactose 8% p/v e a atividade ATPásica de H⁺-ATPase nas membranas citoplasmáticas purificadas foi medida. O asterisco indica que as médias foram consideradas significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

Amostras foram retiradas das diferentes etapas de enriquecimento e resolvidas em gel de poliacrilamida 8% e em seguida foram coradas com prata. Na extração e enriquecimento realizados com as amostras provenientes da cepa BY4741 *lpx1*Δ transformada com o vetor vazio (pYES2/CT-VV), nenhuma banda de peso molecular similar ao de Lpx1p foi observada após coloração com prata (**Figura 18 – Painel A**).

Uma banda de aproximadamente 49 kDa foi observada nas amostras provenientes das células de BY4741 *lpx1*Δ transformadas como vetor pYES2/CT-LPX1 (**Figura 18 – Painel B**). Essa banda é resultante da soma do peso molecular da proteína Lpx1p (de tamanho aproximado de 44 kDa) com a cauda de histidina (5 kDa) fundida a ela após expressão utilizando o vetor de expressão pYES2/CT. Uma banda de menor, com peso molecular de aproximadamente 41 kDa, foi observada no eluato proveniente da extração realizada com as células de BY4741 *lpx1*Δ contendo o vetor pYES2/CT-LPX1-MOD (**Figura 18 – Painel C**). O peso molecular das proteínas obtidas foi inferido também através do fator de retenção de sua migração relativa (**Anexo D**).

4.5.1 Confirmação da presença de Lpx1p e Lpx1p modificada com cauda de histidina por *Western Blotting*

Para confirmar a presença de Lpx1p e Lpx1p modificada, foi realizado um *Western Blotting* com os eluatos obtidos após a enriquecimento de proteínas. O eluato obtido da cepa transformada com o vetor vazio foi utilizado como controle para o experimento.

Foi verificada a presença de bandas nos eluatos das células de BY4741 *lpx1*Δ transformadas com o vetor pYES2/CT-LPX1 e também com o vetor pYES2/CT-LPX1-MOD. No eluato advindo da cepa transformada com o vetor vazio (pYES2/CT-VV) não foi observada nenhuma banda no *Western Blotting* (**Figura 19**).

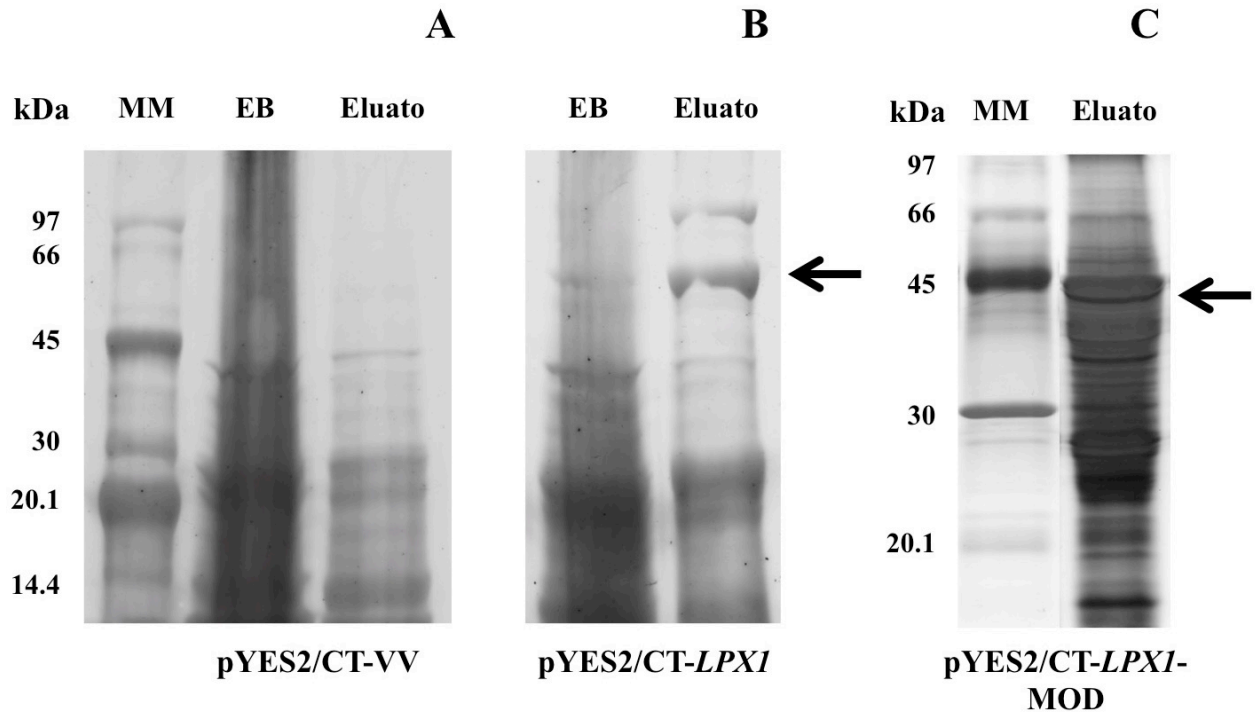


Figura 18 – Perfil de bandas de proteínas após extração e enriquecimento de Lpx1p com cauda de histidina de células de BY4741 *lpx1Δ* transformadas com diferentes plasmídeos. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida 8% e coradas por prata. **Painel A:** BY4741 *lpx1Δ* transformada com o vetor vazio (pYES2/CT-VV). **Painel B:** BY4741 *lpx1Δ* transformada com o vetor pYES2/CT-LPX1; uma banda de ≈ 49 kDa pode ser observada (indicada pela seta). **Painel C:** BY4741 *lpx1Δ* transformada com o vetor pYES2/CT-LPX1-MOD; uma banda de ≈ 41 kDa pode ser observada (indicada pela seta preta). MM: marcador de peso molecular (GE Healthcare, USA); EB: extrato bruto.

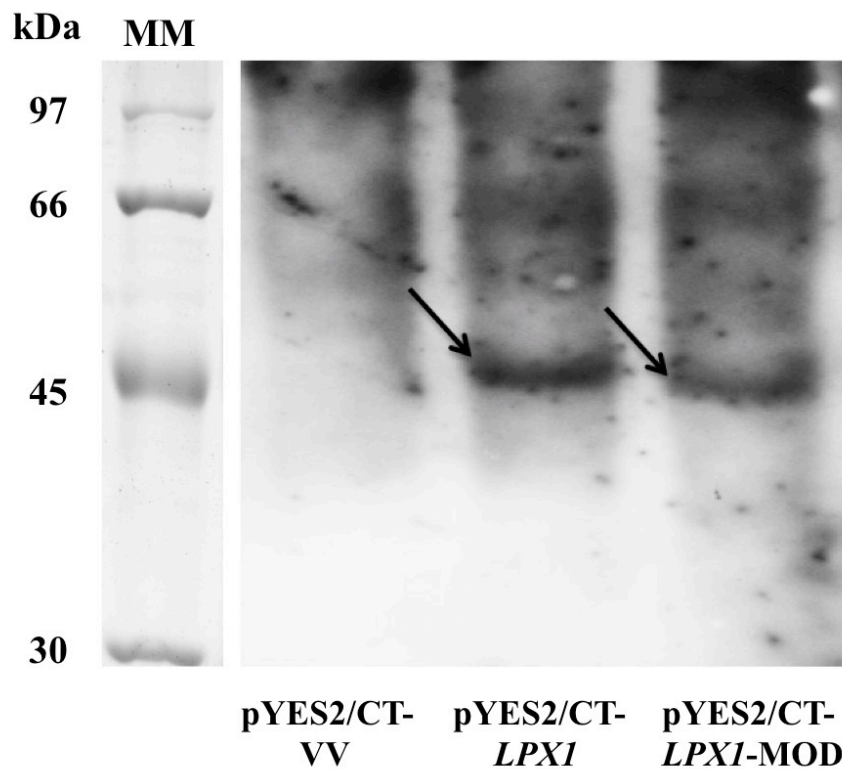


Figura 19 – Western Blotting de eluatos obtidos após enriquecimento de Lpx1p de células de BY4741 *lpx1* Δ transformadas com diferentes plasmídeos. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida 12%, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-His. Não foi observada a presença de bandas no eluato proveniente da cepa contendo o vetor pYES2/CT-VV não apresentou nenhuma marcação. Os eluatos das células transformadas com pYES2/CT-LPX1 e pYES2/CT-LPX1-MOD mostraram bandas específicas que se ligaram aos anticorpos anti-His (indicados pelas setas). MM: marcador de peso molecular (GE Healthcare, USA).

4.6 Atividade de Lpx1p e regulação por cálcio

A atividade proteolítica de Lpx1p e a sua dependência de Ca^{2+} foi avaliada e demonstrada por duas abordagens distintas: em isolados de membranas obtidas de células da cepa selvagem BY4741 e da cepa BY4741 *lpx1Δ* e de maneira mais direta utilizando amostras de Lpx1p isoladas após eletroforese não-desnaturante em de gel de poliacrilamida. Em ambos os casos, a azocaseína foi utilizada como substrato.

4.6.1 Atividade proteolítica em membranas totais

As membranas totais de BY4741 e da cepa BY4741 *lpx1Δ* foram extraídas e incubadas durante 1 h a 40 °C na mistura de reação contendo azocaseína, com e sem adição de cálcio. A presença de 1 mM de cálcio triplicou a atividade proteolítica específica ($\text{unidades/mg.proteína}^{-1}$) nas amostras de membranas purificadas da cepa selvagem BY4741 comparadas com aquelas onde não houve adição de Ca^{2+} . Nas amostras contendo membranas extraídas de BY4741 *lpx1Δ* não foi observado aumento na atividade proteolítica após adição de cálcio ao sistema (**Figura 20**).

4.6.2 Atividade proteolítica de Lpx1p isolada de gel de poliacrilamida

O efeito da adição de cálcio na atividade proteolítica de Lpx1p foi avaliado após eletroforese não-desnaturante dos eluatos obtidos de células BY4741 *lpx1Δ* transformadas com os vetores pYES2/CT-LPX1 e pYES2/CT-VV. Após eletroforese, as regiões de ambos os géis referentes à posição onde Lpx1p migrou (por volta de 50 kDa) foram excisadas.

As bandas excisadas foram incubadas durante 1 h a 30 °C na mistura de reação contendo azocaseína, com e sem adição de cálcio. Conforme demonstrado na **Figura 21**, nas amostras contendo a fração do gel retirado após eletroforese do eluato de BY4741 *lpx1Δ* + pYES2/CT-VV não foi observado aumento na atividade proteolítica após adição de cálcio. Ao se avaliar a atividade proteolítica dos excisados do gel de eluatos de BY4741 *lpx1Δ* + pYES2/CT-LPX1, foi verificado que, na presença de cálcio,

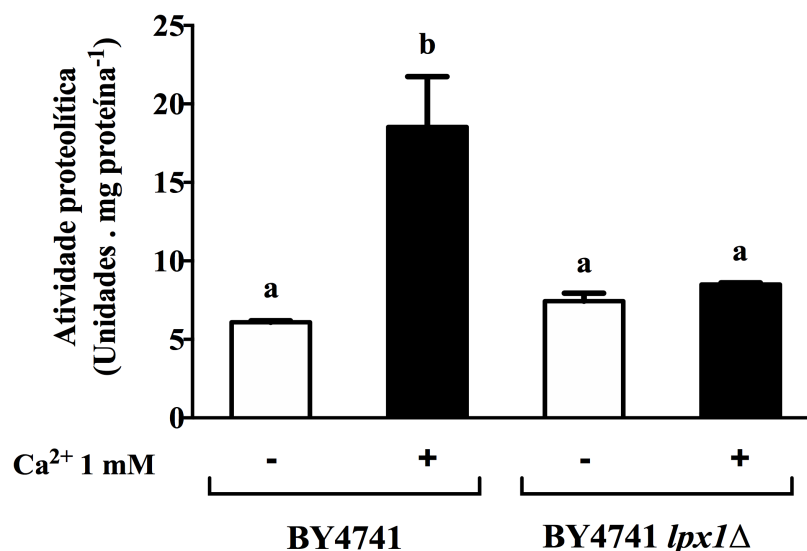


Figura 20 – Atividade proteolítica em membranas totais de BY4741 e BY4741 *lpx1*Δ. A atividade proteolítica foi avaliada utilizando azocaseína como substrato, com e sem adição de cálcio. Uma unidade de atividade enzimática (UA) foi definida como a variação de cada 0,01 na absorbância a 428nm, nas condições avaliadas. Letras diferentes indicam que as médias diferem-se entre si estatisticamente ($P < 0,05$).

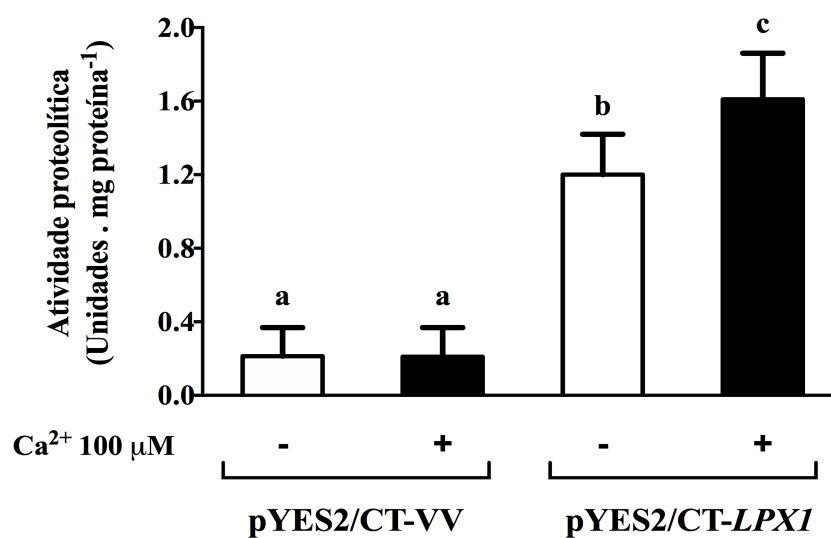


Figura 21 – Atividade proteolítica de Lpx1p isolada de gel de poliacrilamida. A atividade proteolítica de Lpx1p foi avaliada em bandas de gel obtidas após eletroforese não-desnaturante de eluatos de BY4741 *lpx1*Δ transformada com os vetores pYES2/CT-VV e pYES2/CT-LPX1, com e sem adição de cálcio. Uma unidade de atividade enzimática (UA) foi definida como a variação de cada 0,01 na absorbância a 428nm, nas condições avaliadas. Letras diferentes indicam que as médias diferem-se entre si estatisticamente ($P < 0,05$).

a atividade proteolítica (unidades/mg.proteína⁻¹) aumentou 34%, em comparação àquela onde não houve adição de Ca²⁺.

4.7 Ativação *in vitro* de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática

Um sistema de ativação *in vitro* de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática foi utilizado. Neste sistema de ativação, quando todos componentes necessários para ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática estão presentes, a ativação da enzima foi observada. Previamente aos ensaios, os extratos livres de membranas e os eluatos utilizados foram testados para verificar a presença de atividade ATPásica e não foi observada nenhuma atividade nos mesmos.

4.7.1 Definição preliminar das condições do ensaio *in vitro*

Previamente, para se definir as melhores condições do ensaio *in vitro* foram testados diferentes tempos de pré-incubação (10, 30 e 60 min), diferentes concentrações de extrato livre de membranas (50, 100, 200 e 400 µg) e diferentes concentrações de cálcio (100 µM, 1 e 5 mM).

O tempo de pré-incubação a 30 °C foi inicialmente testado para verificar se a atividade de H⁺-ATPase seria influenciado pelo tempo. O teste foi realizado utilizando membranas plasmáticas da cepa BY4741. Conforme mostrado na **Figura 22**, com 10 e 30 min de pré-incubação não houve influência na atividade. Entretanto, com 60 min já se observa uma diminuição da atividade medida. O tempo de 30 min foi escolhido para os próximos testes.

Em seguida, a variação das concentrações de extrato livre de membranas (ELM) adicionados ao sistema foi avaliada. O ELM utilizado para os testes foi obtido de células da cepa selvagem BY4741 e foi utilizado o tempo de pré-incubação de 30 min entre ELM e membranas plasmáticas. Após esse tempo, o ensaio foi realizado e foi verificado que as variações da concentração do ELM adicionado ao sistema não alteraram a atividade medida de H⁺-ATPase, em comparação ao teste realizado sem adição do ELM (**Figura 23**).

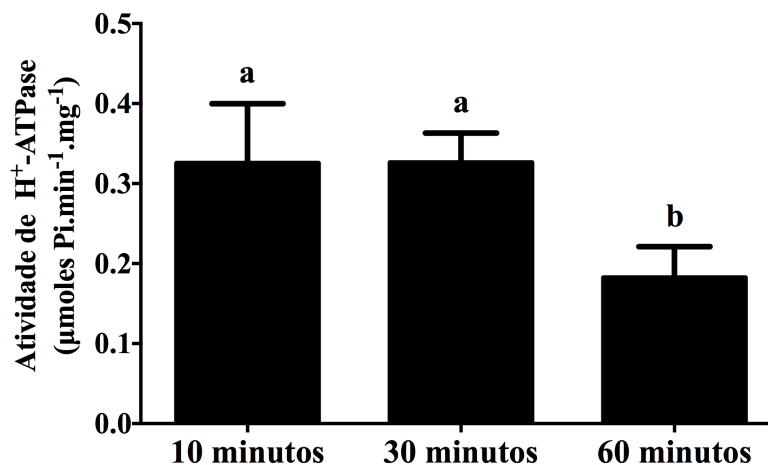


Figura 22 – Atividade ATPásica em membranas plasmáticas de BY4741 medida em diferentes tempos. A atividade de H⁺-ATPase foi avaliada em membranas de BY4741 extraídas após 4 h de depleção de nutrientes. Diferentes tempos de pré-incubação à 30 °C foram avaliados. Letras diferentes indicam que as médias diferem-se entre si estatisticamente ($P < 0,05$).

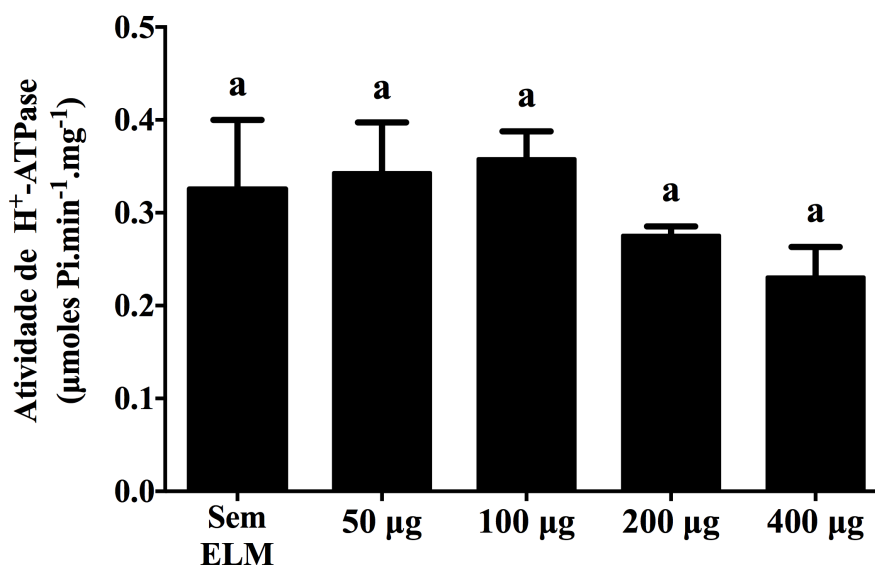


Figura 23 – Atividade ATPásica em membranas plasmáticas de BY4741 pré-incubadas com diferentes concentrações de extrato livre de membranas (ELM). A atividade de H⁺-ATPase foi avaliada em membranas de BY4741 pré-incubadas à 30 °C com diferentes concentrações de extrato livre de membranas (ELM). Letras diferentes indicam que as médias diferem-se entre si estatisticamente ($P < 0,05$).

A concentração de 50 µg de ELM foi escolhida para o teste de variação da concentração de cálcio, pois foi a menor concentração utilizada e não causou alteração na atividade de H⁺-ATPase.

Com a definição do tempo de pré-incubação e da concentração de extrato livre de membranas a serem utilizados, foi realizado o ensaio para determinação da concentração de cálcio a ser avaliada nos testes. Ao sistema contendo membranas plasmáticas e ELM provenientes da cepa selvagem BY4741, foram adicionadas diferentes concentrações de cálcio. A atividade de H⁺-ATPase nas concentrações de 100 µM e 1 mM não diferiram entre si. Já com a concentração de 5 mM, a atividade de H⁺-ATPase foi reduzida (**Figura 24**). Assim, a menor concentração de cálcio utilizada, 100 µM, foi escolhida para os ensaios posteriores.

Por fim, os parâmetros determinados para os ensaios *in vitro* foram os seguintes: 30 min de pré-incubação entre membranas plasmáticas não-ativadas com 50 µg de proteínas provenientes dos ELMs e adição de cálcio 100 µM, quando necessários para avaliação.

4.7.2 Ensaio de ativação e inibição *in vitro* de H⁺-ATPase

Com as condições de ensaio pré-determinadas, foi realizado o ensaio de ativação *in vitro* com as membranas plasmáticas de BY4741 contendo a H⁺-ATPase não-ativada e também o ELM extraído dessa mesma cepa. Os testes foram realizados com a adição de cada um dos componentes necessários à ativação da H⁺-ATPase. Os resultados obtidos estão demonstrados como uma porcentagem relativa em comparação ao teste onde somente foi adicionada membrana citoplasmática ao sistema.

Quando foram adicionados individual e separadamente, o extrato livre de membranas e cálcio não causaram alteração de atividade de H⁺-ATPase, em comparação ao teste realizado somente com uso de membranas. Ao se combinar as membranas plasmáticas com a adição de cálcio e de ELM, foi verificado um aumento de atividade de H⁺-ATPase em torno de 47,5%. A adição de 50 µM de ortovanadato de sódio (um inibidor de H⁺-ATPase) causou uma redução de atividade de 77,4% (**Figura 25**).

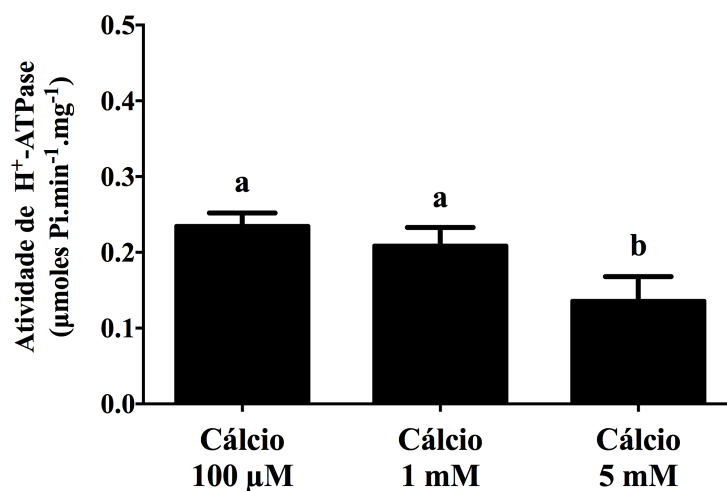


Figura 24 – Atividade ATPásica em membranas plasmáticas de BY4741 pré-incubadas com diferentes concentrações cálcio. A atividade de H⁺-ATPase foi avaliada em membranas de BY4741 pré-incubadas à 30 °C com 50 µg de ELM e com diferentes concentrações de cálcio. Letras diferentes indicam que as médias diferem-se entre si estatisticamente ($P < 0,05$).

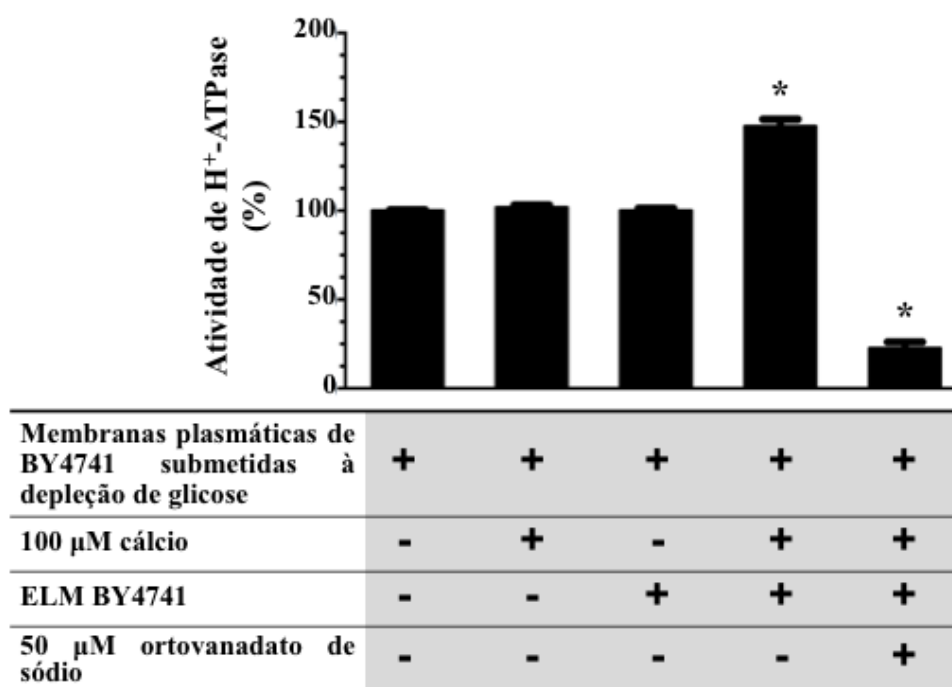


Figura 25 – Ativação *in vitro* de H⁺-ATPase: efeito da adição de cálcio, extrato livre de membranas e ortovanadato de sódio. A ativação *in vitro* de H⁺-ATPase foi avaliada em membranas de BY4741 com a adição de componentes necessários à ativação e/ou inibição. O asterisco indica que as médias foram consideradas significativamente diferentes em comparação com o tratamento controle ($P < 0,05$).

4.7.3 Avaliação de Lpx1p e Ptk2p na ativação *in vitro* de H⁺-ATPase

A ligação entre a sinalização de cálcio e as atividades de Lpx1p e Ptk2p, relacionadas à fosforilação e ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, foram avaliadas através do ensaio de ativação *in vitro*. O ELM proveniente da cepa BY4741 *lpx1Δ* apresentaria todos os componentes necessários à ativação de H⁺-ATPase, com exceção de Lpx1p. Já o ELM obtido de BY4741 *ptk2Δ* não tem a presença da proteína quinase Ptk2p, envolvida na ativação de H⁺-ATPase.

Inicialmente, membranas citoplasmáticas da cepa BY4741, contendo a H⁺-ATPase em sua forma não-ativada, foram utilizadas associadas a ELMs das cepas BY4741 *ptk2Δ* e BY4741 *lpx1Δ*, no sistema de ativação. Conforme mostrado na **Figura 26**, quando foi utilizado o ELM da cepa *lpx1Δ*, considerando o sistema onde foi adicionado cálcio 100 μM, não houve aumento de atividade da H⁺-ATPase. Já quando foi usado o ELM da cepa *ptk2Δ*, um pequeno aumento de 11,8% foi verificado após adição de cálcio.

4.7.4 Avaliação de eluatos contendo Lpx1p e Lpx1p modificada na ativação *in vitro* de H⁺-ATPase

Além desses ensaios, os ELMs das cepas BY4741 *ptk2Δ* e BY4741 *lpx1Δ* também foram avaliados em associação com eluatos dos ensaios de extração/enriquecimento de Lpx1p das células transformadas com os plasmídeos pYES2/CT-VV, pYES2/CT-LPX1 e pYES2/CT-LPX1-MOD. O eluato da cepa transformada com o plasmídeo vazio foi utilizado como controle, por não conter Lpx1p e/ou Lpx1p modificada.

Conforme demonstrado na **Figura 27**, o uso de extratos livres de membranas de células BY4741 *ptk2Δ* com o eluato da cepa BY4741 *lpx1Δ* transformada com o plasmídeo vazio não resultou em aumento na atividade de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, após adição de cálcio. De maneira similar ao observado anteriormente, a combinação do extrato livre de membranas de BY4741 *ptk2Δ* com o eluato contendo Lpx1p (obtido da extração feita com a cepa BY4741 *lpx1Δ* + pYES2/CT-LPX1) não resultou em aumento de atividade após adição de cálcio 100 μM.

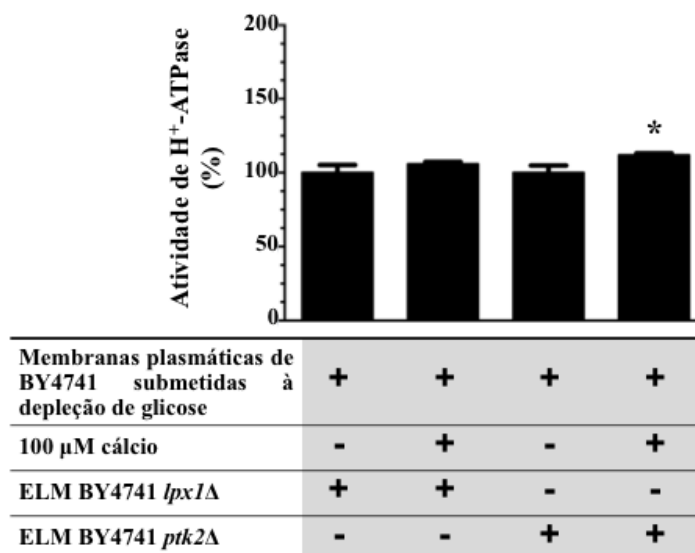


Figura 26 – Ativação *in vitro* de H⁺-ATPase: avaliação do efeito de Lpx1p e Ptk2p. A ativação *in vitro* de H⁺-ATPase foi avaliada em membranas de BY4741 com a adição de componentes necessários à ativação em associação com extratos livres de membranas de BY4741 *ptk2Δ* ou BY4741 *lpx1Δ*. O asterisco indica que as médias foram consideradas significativamente diferentes em comparação com o tratamento controle ($P < 0,05$).

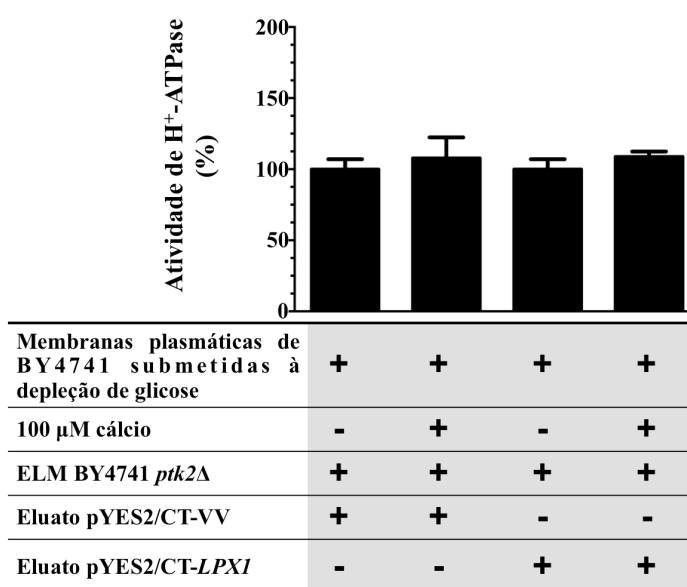


Figura 27 – Ativação *in vitro* de H⁺-ATPase: avaliação da adição Lpx1p em associação com extrato livre de membranas de BY4741 *ptk2Δ*. A ativação *in vitro* de H⁺-ATPase foi avaliada em membranas de BY4741 com a adição de eluato contendo Lpx1p em associação com extrato livre de membranas de BY4741 *ptk2Δ*. O asterisco indica que as médias foram consideradas significativamente diferentes em comparação com o tratamento controle ($P < 0,05$).

O extrato livre de membranas de BY4741 *lpx1Δ* quando usado para ativação *in vitro* de H⁺-ATPase conjuntamente com o eluato de BY4741 *lpx1Δ* + pYES2/CT-VV não resultou em nenhum aumento da atividade medida de H⁺-ATPase, após adição de cálcio. Por outro lado, quando o eluato de BY4741 *lpx1Δ* transformado com o vetor pYES2/CT-*LPXI*, que contém a proteína Lpx1p, foi adicionado ao sistema de ativação junto com o extrato livre de membranas da cepa BY4741 *lpx1Δ*, um claro aumento de 57,3% foi observado na atividade de H⁺-ATPase no sistema contendo cálcio 100 μM. O eluato de BY4741 *lpx1Δ* + pYES2/CT-*LPXI*-MOD contendo Lpx1p modificada (que não apresenta o provável sítio de ligação com cálcio na sua porção C-terminal), foi também associado ao extrato livre de membranas de BY4741 *lpx1Δ* e, de acordo com os resultados observados, não houve aumento na atividade de H⁺-ATPase, mesmo após a adição de cálcio (**Figura 28**).

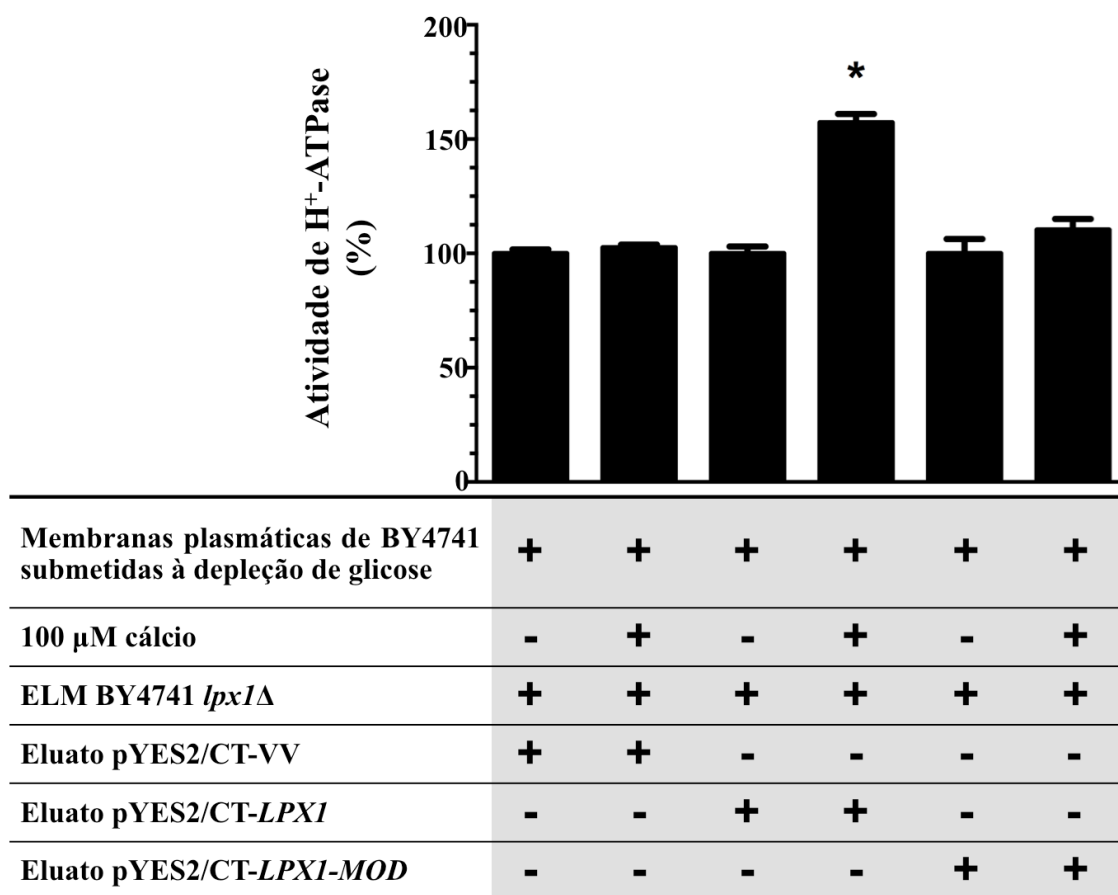


Figura 28 – Ativação *in vitro* de H⁺-ATPase: avaliação da adição Lpx1p e Lpx1p modificada em associação com extrato livre de membranas de BY4741 *lpx1Δ*. A ativação *in vitro* de H⁺-ATPase foi avaliada em membranas de BY4741 com a adição de eluato contendo Lpx1p ou Lpx1p modificada em associação com extrato livre de membranas de BY4741 *lpx1Δ*. O asterisco indica que as médias foram consideradas significativamente diferentes em comparação com o tratamento controle ($P < 0,05$).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Um grande número de evidências tem sugerido que a ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática em leveduras, induzida por glicose, seria relacionada ao metabolismo de cálcio (DOS PASSOS *et al.*, 1992; BRANDÃO *et al.*, 1994; COCCETTI *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2001; TRÓPIA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008; BOUILLET *et al.*, 2012). Além do envolvimento da sinalização de cálcio, a fosforilação direta de H⁺-ATPase, nos resíduos Ser-899 e Ser-911/Thr-912, também seriam fatores fundamentais para sua ativação/regulação pós-traducional (PORTILLO, 2000; LECCHI *et al.*, 2005; LECCHI *et al.*, 2007).

Dessa maneira, o envolvimento de uma proteína quinase cálcio-dependente poderia estar relacionado à essa via de ativação. Entretanto, a identificação de uma proteína quinase Ca²⁺-dependente que estaria envolvida na ativação de H⁺-ATPase, através da fosforilação dos seus sítios regulatórios, não foi evidenciada até o momento. De fato, foi demonstrado que a uma proteína quinase, denominada Ptk2p, estaria envolvida no processo de regulação/ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, mas essa proteína não pertence à nenhuma classe de proteínas quinase que seja regulada por cálcio.

Na presença de glicose, Ptk2p seria responsável pela fosforilação do resíduo Ser-899 localizado na porção C-terminal de H⁺-ATPase, levando assim à uma redução do K_m por ATP. O processo de desfosforilação da enzima no resíduo Ser-899, quando não há mais a presença de glicose, é catalisado pela fosfatase Glc7p (GOOSSENS *et al.*, 2000; MAZÓN *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015). Além disso, o envolvimento de outra(s) proteína(s) quinase(s) que estaria(m) envolvida(s) na fosforilação dos resíduos Ser-911 e Thr-912 também envolvidos no processo de ativação e a participação de uma proteína Ca²⁺-dependente não foi até o momento descrita por estar implicada no processo de ativação de H⁺-ATPase induzido por glicose.

A dependência da sinalização de cálcio intracelular induzida por glicose para ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática e a ausência, até o momento, da identificação do envolvimento de alguma proteína que seja dependente de Ca²⁺ nessa via de ativação é de certa forma contraditório. Assim, o desenvolvimento de diferentes estratégias para que se possa estabelecer uma relação que vincule a sinalização de cálcio

e o processo de ativação de H⁺-ATPase se torna necessário para um maior entendimento dos possíveis componentes envolvidos na via de sinalização que leva à ativação dessa enzima.

Recentemente, foi proposto o envolvimento de uma serino-protease no processo de ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática. De acordo com as evidências encontradas, para que haja a ativação de H⁺-ATPase seria necessária uma hidrólise, induzida por glicose, de tubulinas acetiladas ligadas à essa enzima. Após a hidrólise dessas tubulinas, a porção C-terminal de H⁺-ATPase seria liberada e permitiria assim que os resíduos de aminoácidos dos sítios regulatórios presentes nessa região possam ser fosforilados pela(s) proteína(s) quinase(s) envolvidas no processo de ativação. Essa hidrólise de tubulinas acetiladas seria mediada pela serino-protease Lpx1p, codificada pelo gene *LPX1* em *Saccharomyces cerevisiae* (CAMPETELLI *et al.*, 2005; CAMPETELLI *et al.*, 2013).

Uma vez que o processo de ativação de H⁺-ATPase envolve também a participação de Lpx1p, essa proteína poderia ser então avaliada como a uma possível proteína-candidata que responderia ao sinal de cálcio gerado pela presença de glicose nas células de *Saccharomyces cerevisiae* e assim poder ser correlacionado ao processo induzido por glicose de ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática.

Essa possibilidade foi então investigada inicialmente através de cepas que continham deleções únicas ou combinadas nos genes *ARG82*, *YVC1* e *LPX1*. Em células de levedura que não possuem o gene *ARG82*, que codifica para uma inositol quinase que fosforila os inosítois trifosfato IP₃/IP₄/IP₅, um aumento, quando comparado à cepa selvagem, tanto no sinal de cálcio intracelular quanto da ativação de H⁺-ATPase, ambos induzidos por glicose, foi claramente observado nos ensaios realizados neste trabalho e também já descritos anteriormente na literatura (TISI *et al.*, 2004; TRÓPIA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008). Este aumento concomitante do sinal de cálcio e ativação de H⁺-ATPase reforça a ideia que a ativação seja dependente da sinalização de cálcio.

Conforme visto nos resultados obtidos neste trabalho, a deleção única de *LPX1* ou em células com dupla deleção *arg82Δ lpx1Δ* leva a uma redução na ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática induzida por glicose. Entretanto, ao se analisar o sinal de cálcio gerado pela presença de glicose em células *lpx1Δ*, os resultados obtidos demonstram que este sinal foi similar ao observado nas células da cepa selvagem.

Em complemento, na cepa com deleção conjunta dos genes *ARG82* e *LPX1*, o sinal de cálcio induzido por glicose foi superior ao da cepa selvagem e comparável ao observado em células com deleção única *arg82Δ*. O sinal de cálcio e a ativação de H⁺-ATPase em células com deleção do gene *YVC1* somente ou em conjunto com *LPX1* estavam claramente reduzidos. Assim, a redução do sinal de cálcio nos mutantes *yvc1Δ* e *yvc1Δ lpx1Δ* poderia ser devida à ausência de Yvc1p, uma vez que a falta dessa proteína reduz os níveis do sinal de cálcio intracelular induzido por glicose por impedir a liberação de Ca²⁺ estocado no vacúolo (BOUILLET *et al.*, 2012). Além disso, os níveis de atividade de H⁺-ATPase já se encontravam reduzidos nos mutantes com deleções únicas *yvc1Δ* e *lpx1Δ*.

Os resultados inicialmente obtidos neste trabalho sugeriram que Lpx1p não é necessária para a geração do sinal de cálcio após a adição de glicose, entretanto, esta proteína parece ser fundamental para que haja a ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática mediada por cálcio. Dessa forma, Lpx1p estaria exercendo sua função após a liberação de cálcio por Yvc1p (induzida por IP₃), sendo dessa forma um possível elo entre a sinalização de cálcio e a ativação de H⁺-ATPase.

Na avaliação *in silico* para potenciais regiões na estrutura da proteína Lpx1p que poderiam interagir ou se ligar com cálcio, utilizando a ferramenta WebFEATURE, uma possível região de interação foi verificada. Esta região estaria localizada na região C-terminal da proteína e seria um motivo ligador de cálcio do tipo mão EF. A ferramenta WebFEATURE permite que seja investigada na estrutura tridimensional de uma proteína para os possíveis sítios funcionais presentes (LIANG *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2008).

O motivo ligador de cálcio do tipo mão EF é o motivo de ligação com cálcio mais comumente encontrado em proteínas. Em um grande número de proteínas esse motivo se liga ao cálcio e permite que essas proteínas exerçam diferentes funções como tamponamento de cálcio no citosol, participação em vias de sinalização celular entre os diferentes compartimentos da célula e em contração muscular (LEWIT-BENTLEY e RÉTY, 2000). Dessa forma, esse motivo ligador de cálcio encontrado na estrutura de Lpx1p poderia ser responsável pela interação com Ca²⁺ que possivelmente regula a sua atividade.

Em uma busca por sítios funcionais em Lpx1p, THOMS *et al.* (2011) verificaram que a porção da proteína que funciona como uma cobertura do sítio ativo mostra similaridade com calmodulina, um alvo intracelular de cálcio em eucariotos amplamente conhecido. Segundo estes autores, essa cobertura apresenta uma ampla flexibilidade na sua alça N-terminal o que sugeriria que esta alça possa atuar como um regulador do acesso ao sítio ativo.

Lpx1p também apresenta atividades de acil-hidrolase e fosfolipase A *in vitro*, esta última sugerindo que Lpx1p possa ter um papel mais especializado na modificação de fosfolipídios de membrana e, de forma interessante, algumas proteínas pertencentes à família das fosfolipases A apresentam dependência de cálcio (THOMS *et al.*, 2008; BURKE e DENNIS, 2009). Lpx1p é geralmente encontrada em peroxissomos, entretanto, uma análise global de localização de proteínas em leveduras utilizando marcação com GFP, mostrou que a distribuição de Lpx1p em *S. cerevisiae* é ambígua (HUH *et al.*, 2003; THOMS *et al.*, 2008).

Assim, a possível existência de um sítio de ligação com Ca^{2+} em Lpx1p e o fato desta proteína ser fundamental na ativação de H^+ -ATPase, mas não estar envolvida na geração do sinal de cálcio intracelular, sugere a existência de uma via de sinalização onde o sinal de cálcio gerado pela entrada de glicose seria responsável pela ativação de Lpx1p. De acordo com o modelo proposto por CAMPETELLI *et al.* (2013), Lpx1p hidrolisa tubulinas acetiladas ligadas ao domínio C-terminal de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, tornando então esta região acessível à fosforilação por proteínas quinase.

De fato, foi demonstrado nesse trabalho que uma cepa *lpx1* Δ expressando o gene *LPXI* através de um vetor induzível por galactose (pYES2/CT-*LPXI*) exibiu um progressivo aumento na atividade de H^+ -ATPase *in vivo*, medida através da taxa de bombeamento de prótons. Estes resultados confirmam que, de fato, Lpx1p possui papel fundamental na ativação de H^+ -ATPase. Em um experimento similar, realizado com a cepa BY4741 *yvc1* Δ , os resultados obtidos sugerem que a atividade do canal de cálcio Yvc1p não seria regulada por Lpx1p.

Além dos resultados observados nos ensaios de indução da expressão de *LPXI* através do vetor pYES2/CT-*LPXI*, os ensaios de atividade proteolítica realizados sugerem que a atividade proteolítica de Lpx1p poderia ser alvo de regulação por cálcio. A presença de cálcio então seria responsável pela ativação de Lpx1p que então exerceria

sua função de hidrólise de tubulinas, tornando a H⁺-ATPase acessível para fosforilação na região C-terminal por ao menos uma proteína quinase, Ptk2p.

De forma a confirmar a conexão entre a sinalização de cálcio, a atividade de Lpx1p e a ativação de H⁺-ATPase, um sistema para reconstituir o mecanismo de ativação de H⁺-ATPase *in vitro* foi desenvolvido neste trabalho. Este sistema *in vitro* permitiu a avaliação da importância/necessidade de cada um dos componentes avaliados neste trabalho para a ativação de H⁺-ATPase. Assim, a utilização de membranas citoplasmáticas da cepa BY4741 obtidas de células submetidas à depleção de glicose faz com que, nessa condição, a H⁺-ATPase se encontre em um estado não-ativado (provavelmente ligada à tubulinas acetiladas na sua região C-terminal, como descrito por CAMPETELLI *et al.* (2013)).

Quando utilizado nos ensaios de ativação/inibição *in vitro*, o extrato livre de membranas originado da cepa selvagem BY4741 forneceu ao sistema de ativação *in vitro* todos os elementos necessários para ativação, incluindo a proteína quinase Ptk2p (necessária para fosforilação do resíduo Ser-899 de H⁺-ATPase) e também Lpx1p (requerida para hidrólise de tubulinas acetiladas). A redução de atividade de H⁺-ATPase observada com a adição de 50 µM de ortovanadato de sódio ao sistema de ativação *in vitro* demonstrou que a atividade de hidrólise de ATP observada nos ensaios era realmente devida à ação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática.

Dessa forma, nos ensaios realizados para ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática com a utilização de extratos livres de membranas provenientes de cepas *lpx1Δ* ou *ptk2Δ*, na presença de cálcio 100 µM, não foi observado aumento na atividade ou foi visto apenas um pequeno aumento, respectivamente. A ausência dessas duas proteínas, Lpx1p e Ptk2p, nos seus respectivos extratos livres de membranas, e os resultados obtidos nestes ensaios mostram, mais uma vez, que estas proteínas são necessárias para desencadear o processo de ativação de H⁺-ATPase.

A adição de cálcio e também da proteína Lpx1p ao sistema de ativação *in vitro* (obtida através de extração/enriquecimento realizados com extratos celulares da cepa BY4741 *lpx1Δ* transformada com o vetor pYES2/CT-LPX1), em combinação com o extrato livre de membranas de BY4741 *lpx1Δ* (contendo os demais componentes necessários para ativação de H⁺-ATPase, mas não Lpx1p), resultou em um aumento da atividade de H⁺-ATPase. Nas mesmas condições, a utilização de extrato livre de

membranas de células *ptk2Δ*, não resultou em aumento na atividade de H⁺-ATPase, mesmo na presença de cálcio 100 μM, reforçando assim a importância de Ptk2p para o processo de ativação.

Com o intuito de verificar a necessidade da interação com cálcio, previamente à sua ação de hidrólise de tubulinas acetiladas, foi utilizada uma versão modificada de Lpx1p. Nesta proteína modificada, o sítio C-terminal que possivelmente interage com cálcio foi removido. Quando Lpx1p modificada foi utilizada em combinação com o extrato livre de membranas de células *lpx1Δ* e também na presença de cálcio 100 μM, não foi observado nenhum aumento na atividade de H⁺-ATPase.

De forma conjunta, os resultados obtidos neste trabalho, e em acordo com evidências encontradas na literatura, sugerem que muito provavelmente a sinalização de cálcio está ligada à ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática através da ativação, induzida por cálcio, da serino-protease Lpx1p. Com base nos resultados apresentados, um mecanismo de ativação pôde ser proposto: após a adição de glicose, o cálcio se ligaria à Lpx1p, levando à sua ativação. Assim, esta ativação faz com que seja possível a hidrólise de tubulinas ligadas à H⁺-ATPase de membrana citoplasmática. Essa hidrólise permite a liberação da região C-terminal de H⁺-ATPase, tornando-a acessível à fosforilação por, pelo menos, Ptk2p. A fosforilação leva então à ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática (**Figura 29**).

Assim, com as novas evidências encontradas neste trabalho e em conformidade com resultados obtidos anteriormente por nosso grupo de trabalho (DOS PASSOS *et al.*, 1992; BRANDÃO *et al.*, 1994; COCCETTI *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2001; TRÓPIA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008; GROPPPI *et al.*, 2011; BOUILLET *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2015), pode ser sugerida a existência de uma via de sinalização celular onde a entrada de glicose na célula controla a disponibilidade de cálcio no citoplasma. Esse sinal de cálcio intracelular gerado, teria então ligação direta com a atividade de Lpx1p e a ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática.

Essa via de sinalização celular para ativação de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática seria dividida basicamente em dois ramos (**Figura 30**). No primeiro ramo, a entrada e fosforilação de glicose no interior da célula gera um sinal (provavelmente devido ao balanço entre as concentrações de glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato) que estimularia uma proteína G (Gpa2p) a interagir e/ou ativar fosfolipase C (Plc1p). Plc1p por sua vez, através da hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato [PI(4,5)P₂], geraria diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP₃). O IP₃ gerado por essa hidrólise interagiria, de forma direta ou indiretamente, com o canal de cálcio Yvc1p, regulando o sinal de cálcio no citoplasma .

No segundo ramo, relacionado ao controle da atividade da Ca^{2+} -ATPase Pmc1p, o sensor de glicose Snf3p também seria capaz de perceber os açúcares fosforilados através da sua cauda C-terminal (ÖZCAN e JOHNSTON, 1999; DLUGAI *et al.*, 2001) e de alguma forma sinalizar para um aumento de atividade de Pmc1p. O equilíbrio entre os dois ramos seria responsável pelo estado transiente observado na sinalização de cálcio. A sinalização de cálcio parece ser então, responsável pela ativação da proteína Lpx1p. Lpx1p hidrolisa tubulinas acetiladas ligadas à H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, permitindo a liberação da sua cauda C-terminal para fosforilação e, por conseguinte, a sua ativação.

Dessa forma, a ativação de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática induzida por glicose demonstra envolver um processo de sinalização celular complexo, com a participação de diferentes proteínas e diferentes eventos que são fundamentais para a sua ativação. O envolvimento da proteína Lpx1p neste processo, demonstrada pela primeira vez como o elemento que conectaria o sinal de cálcio gerado com a entrada de glicose na célula e a ativação de H^+ -ATPase, é um passo importante na elucidação dos componentes envolvidos nessa via de sinalização.

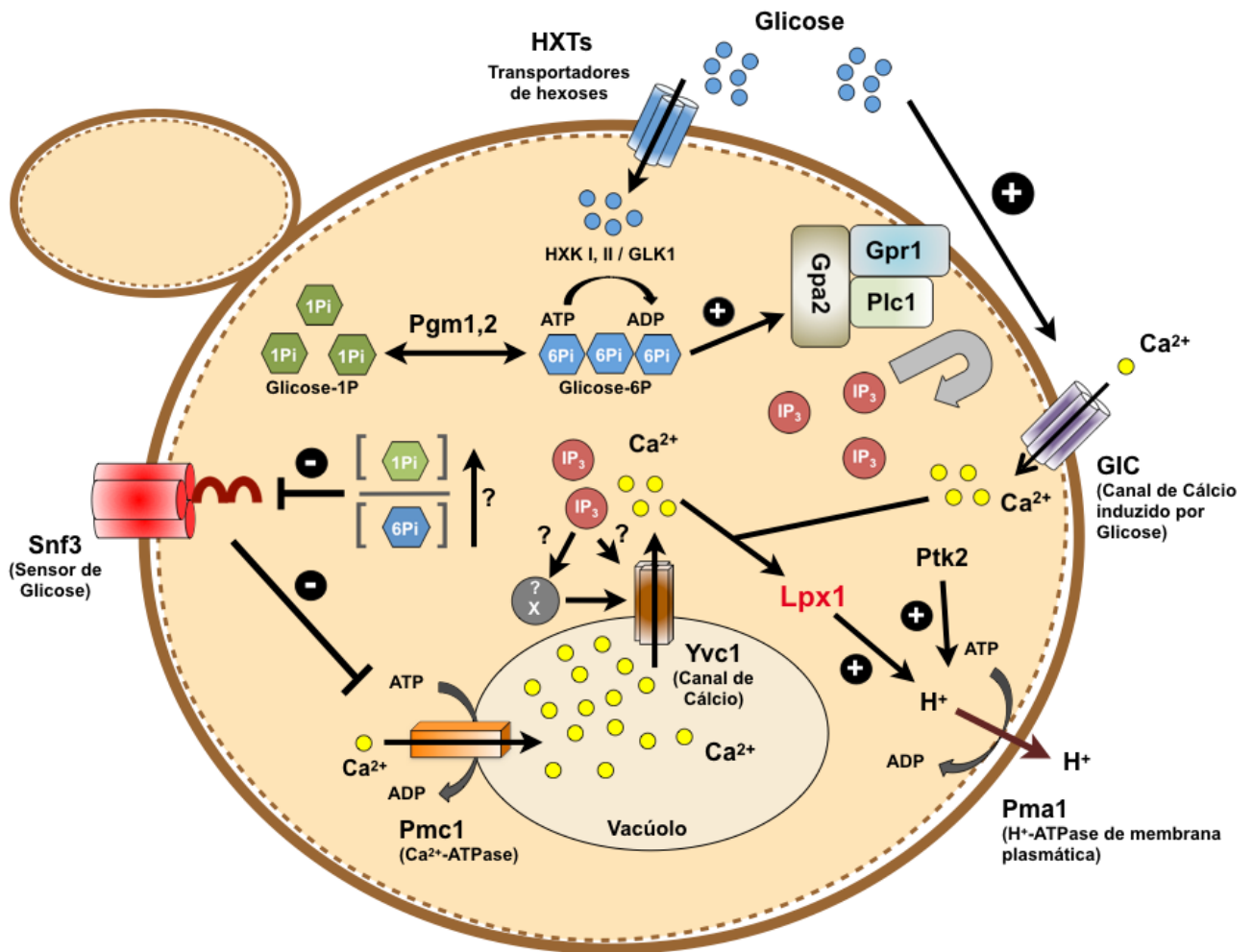


Figura 30 – Modelo proposto da via de sinalização celular para ativação, induzida por glicose, de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática. Um modelo de via de ativação de H⁺-ATPase pode ser proposto. Essa via seria basicamente dividida em dois ramos, que possuem como sinalização inicial a entrada e fosforilação de glicose. O primeiro ramo levaria à ativação de Plc1p que, por meio da hidrólise do diacilglicerol, gera inositol-trifosfato (IP₃). O IP₃ interagiria, de forma direta ou indireta, na atividade do canal Yvc1p, que libera cálcio do vacúolo para o citoplasma. O segundo ramo, está relacionado ao sensor de glicose Snf3p, que modularia a atividade da bomba Pmc1p (Ca²⁺-ATPase vacuolar). O equilíbrio gerado pela ação dos dois ramos é responsável pela natureza transitória do sinal de cálcio intracelular. O sinal de cálcio gerado ativaria a serino-protease Lpx1p que, através de hidrólise, degrada tubulinas acetiladas ligadas à porção C-terminal de H⁺-ATPase. A liberação da cauda C-terminal de H⁺-ATPase permitiria então a sua fosforilação por ao menos uma proteína quinase, Ptk2p.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- Lpx1p influencia a atividade de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática induzida por glicose, entretanto, não participa da geração do sinal de cálcio intracelular;
- A atividade proteolítica *in vitro* de Lpx1p é influenciada pela presença de cálcio;
- A expressão de Lpx1p através de um vetor induzível por galactose foi capaz de gerar um aumento na taxa de bombeamento de prótons por H^+ -ATPase de membrana citoplasmática e também na atividade ATPásica em membranas purificadas;
- O sistema de ativação *in vitro* de H^+ -ATPase demonstrou ser uma ferramenta eficiente para avaliação de diferentes componentes envolvidos na ativação *in vivo* de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática;
- As presenças de cálcio, Lpx1p e Ptk2p mostraram ser fundamentais para que a ativação de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática ocorra de forma eficiente.

Perspectivas

7. PERSPECTIVAS

Uma maior caracterização da proteína Lpx1p se faz importante, uma vez que essa proteína parece desempenhar atividades em diferentes compartimentos celulares como peroxissomos e também influenciar a atividade de proteínas presentes na membrana citoplasmática, como a H^+ -ATPase.

A utilização do ensaio de ativação *in vitro* de H^+ -ATPase de membrana citoplasmática pode permitir que novas abordagens sejam usadas para identificação de outros elementos que possam estar envolvidos na via de ativação. Dentre esses novos elementos que podem ser identificados estão diferente(s) proteína(s) quinase(s) que potencialmente estão envolvidas na regulação da atividade H^+ -ATPase de membrana citoplasmática.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIELLO, D. P. *et al.* Intracellular glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate levels modulate Ca^{2+} homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 45751-45758, 2002. ISSN 0021-9258.

AIELLO, D. P. *et al.* The Ca^{2+} homeostasis defects in a *pgm2* Δ strain of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by excessive vacuolar Ca^{2+} uptake mediated by the Ca^{2+} -ATPase Pmc1p. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38495-38502, 2004. ISSN 0021-9258.

ALBERTS, B. *et al.* Molecular Biology of the Cell. In: SCIENCE, G. (Ed.). **Molecular Biology of the Cell**, 2002. cap. 15, p.721-785.

AMBERG, D. C.; BURKE, D. J.; STRATHERN, J. N. Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005 Edition (Cold Spring). 2005.

AMBESI, A. *et al.* Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H^{+} -ATPase. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 1, p. 155-160, 2000. ISSN 0022-0949.

ANRAKU, Y.; OHYA, Y.; IIDA, H. Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1093, n. 2, p. 169-177, 1991. ISSN 0167-4889.

ARORA, D. K. **Handbook of Fungal Biotechnology**. CRC Press, 2003. ISBN 0203027353.

BAUER, R.; DICKS, L. M. Control of malolactic fermentation in wine. A review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 25, n. 2, p. 74-88, 2017. ISSN 2224-7904.

BEATO, F. B. *et al.* Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Brazilian biomes: new insights into biodiversity and industrial applications. **FEMS yeast research**, v. 16, n. 7, 2016. ISSN 1567-1356.

BONILLA, M.; CUNNINGHAM, K. W. Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca^{2+} signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 10, p. 4296-4305, 2003. ISSN 1059-1524.

BORODINA, I.; NIELSEN, J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. **Biotechnology journal**, v. 9, n. 5, p. 609-620, 2014. ISSN 1860-7314.

BOUILLET, L. E. *et al.* The involvement of calcium carriers and of the vacuole in the glucose-induced calcium signaling and activation of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Cell Calcium**, v. 51, n. 1, p. 72-81, Jan 2012. ISSN 1532-1991.

BRANDÃO, R. L. *et al.* Possible involvement of a phosphatidylinositol-type signaling pathway in glucose-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase and cellular proton extrusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1223, n. 1, p. 117-24, Aug 1994. ISSN 0006-3002.

BUBLITZ, M.; MORTH, J. P.; NISSEN, P. P-type ATPases at a glance. **J Cell Sci**, v. 124, n. 15, p. 2515-2519, 2011. ISSN 0021-9533.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S237-S242, 2009. ISSN 0022-2275.

CAGNAC, O. *et al.* Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H⁺ antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 24284-24293, 2007. ISSN 0021-9258.

CAMPETELLI, A. N. *et al.* Activation of H⁺-ATPase by glucose in *Saccharomyces cerevisiae* involves a membrane serine protease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3593-3603, 2013. ISSN 0304-4165.

CAMPETELLI, A. N. *et al.* Activation of the plasma membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose is mediated by dissociation of the H⁺-ATPase-acetylated tubulin complex. **Febs Journal**, v. 272, n. 22, p. 5742-5752, 2005. ISSN 1742-4658.

CARVALHO, B. T. D. *et al.* Identification of Novel Alleles Conferring Superior Production of Rose Flavor Phenylethyl Acetate Using Polygenic Analysis in Yeast. **mBio**, v. 8, n. 6, p. e01173-17, 2017. ISSN 2150-7511.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947. ISSN 0021-9258.

CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1047-1058, 2007. ISSN 0092-8674.

COCCHETTI, P. *et al.* The *PLC1* encoded phospholipase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is essential for glucose-induced phosphatidylinositol turnover and activation of plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1405, n. 1-3, p. 147-54, Oct 1998. ISSN 0006-3002.

CRONIN, S. R.; RAO, R.; HAMPTON, R. Y. Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. **The Journal of cell biology**, v. 157, n. 6, p. 1017-1028, 2002. ISSN 0021-9525.

CUNNINGHAM, K. W. Acidic calcium stores of *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Calcium**, v. 50, n. 2, p. 129-138, 2011. ISSN 0143-4160.

CUNNINGHAM, K. W.; FINK, G. R. Calcineurin inhibits *VCX1*-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 5, p. 2226-2237, 1996. ISSN 0270-7306.

CYERT, M. S.; PHILPOTT, C. C. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 193, n. 3, p. 677-713, 2013. ISSN 0016-6731.

DE LA FUENTE, N.; MALDONADO, A. M.; PORTILLO, F. Glucose activation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase requires the ubiquitin–proteasome proteolytic pathway. **FEBS Letters**, v. 411, n. 2-3, p. 308-312, 1997. ISSN 1873-3468.

DEMAEGD, D. *et al.* Newly characterized Golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 17, p. 6859-6864, 2013. ISSN 0027-8424.

DENBY, C. M. *et al.* Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 965, 2018. ISSN 2041-1723.

DENIS, V.; CYERT, M. S. Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. **Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 1, p. 29-34, 2002. ISSN 0021-9525.

DEROUICHE, A.; COUSIN, C.; MIJAKOVIC, I. Protein phosphorylation from the perspective of systems biology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 585-590, 2012. ISSN 0958-1669.

DLUGAI, S. *et al.* Glucose-dependent and-independent signalling functions of the yeast glucose sensor Snf3. **FEBS Letters**, v. 505, n. 3, p. 389-392, 2001. ISSN 1873-3468.

DOMINGUES, L. *et al.* Applications of yeast flocculation in biotechnological processes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, n. 4, p. 288-305, 2000. ISSN 1226-8372.

DOS PASSOS, J. B. *et al.* Glucose-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affected in cAMP metabolism, cAMP-dependent protein phosphorylation and the initiation of glycolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1136, n. 1, p. 57-67, Jul 22 1992. ISSN 0006-3002 (Print).

DUNN, T.; GABLE, K.; BEELER, T. Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7273-7278, 1994. ISSN 0021-9258.

EILAM, Y.; OTHMAN, M.; HALACHMI, D. Transient increase in Ca²⁺ influx in *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose: effects of intracellular acidification and cAMP levels. **Microbiology**, v. 136, n. 12, p. 2537-2543, 1990. ISSN 1465-2080.

ENGELBERG, D.; PERLMAN, R.; LEVITZKI, A. Transmembrane signaling in *Saccharomyces cerevisiae* as a model for signaling in metazoans: State of the art after 25 years. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 12, p. 2865-2878, 2014. ISSN 0898-6568.

ERASO, P.; MAZÓN, M. J.; PORTILLO, F. Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates *in vitro* the C-terminal peptide of the H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, n. 2, p. 164-70, Feb 2006. ISSN 0006-3002.

FEYDER, S. *et al.* Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1509-1525, 2015.

FIGUEIREDO, B. I. C. *et al.* New lager brewery strains obtained by crossing techniques using cachaça (Brazilian spirit) yeasts. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 20, p. e01582-17, 2017. ISSN 0099-2240.

FISCHER, M. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* *CCH1* gene is involved in calcium influx and mating. **Febs Letters**, v. 419, n. 2, p. 259-262, 1997. ISSN 0014-5793.

FU, L. *et al.* Loss of the major isoform of phosphoglucomutase results in altered calcium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5431-5440, 2000. ISSN 0021-9258.

GOFFEAU, A. *et al.* Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996. ISSN 0036-8075.

GOOSSENS, A. *et al.* Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 20, p. 7654-61, Oct 2000. ISSN 0270-7306.

GROPPI, S. *et al.* Glucose-induced calcium influx in budding yeast involves a novel calcium transport system and can activate calcineurin. **Cell Calcium**, v. 49, n. 6, p. 376-86, Jun 2011. ISSN 1532-1991.

HANCOCK, J. T. **Cell signalling**. Oxford University Press, 2017. ISBN 019965848X.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 8, p. 576-596, 1995. ISSN 0892-6638.

HEITMANN, M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, p. 1-13, 2017. ISSN 1040-8398.

HOFFMAN, C. S. Preparation of yeast DNA. **Current Protocols in Molecular Biology**, p. 13.11. 1-13.11. 4, 2001. ISSN 0471142727.

HOHMANN, S. *et al.* Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of *SUC2*. **Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 703-714, 1999. ISSN 1465-2080.

HOLSBECKS, I. *et al.* The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 10, p. 556-564, 2004. ISSN 0968-0004.

HSIANG, T.; BAILLIE, D. L. Comparison of the yeast proteome to other fungal genomes to find core fungal genes. **Journal of molecular evolution**, v. 60, n. 4, p. 475-483, 2005. ISSN 0022-2844.

HUH, W.-K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 686-691, 2003. ISSN 0028-0836.

IIDA, H. *et al.* *MIDI*, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for Ca²⁺ influx and mating. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 12, p. 8259-8271, 1994. ISSN 0270-7306.

JANSEN, M. L. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. **FEMS yeast research**, v. 17, n. 5, 2017. ISSN 1567-1356.

KANIAK, A. *et al.* Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 1, p. 221-231, 2004. ISSN 1535-9778.

KELLERMAYER, R. *et al.* Extracellular Ca²⁺ sensing contributes to excess Ca²⁺ accumulation and vacuolar fragmentation in a *pmr1*Δ mutant of *S. cerevisiae*. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 8, p. 1637-1646, 2003. ISSN 0021-9533.

KHOLODENKO, B. N. Cell-signalling dynamics in time and space. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 3, p. 165-176, 2006. ISSN 1471-0072.

KIM, J.-H. *et al.* The glucose signaling network in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 11, p. 5204-5210, 2013. ISSN 0304-4165.

KÜHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 282-295, 2004. ISSN 1471-0072.

LECCHI, S. *et al.* Conformational changes of yeast plasma membrane H⁺-ATPase during activation by glucose: role of threonine-912 in the carboxy-terminal tail. **Biochemistry**, v. 44, n. 50, p. 16624-32, Dec 2005. ISSN 0006-2960.

LECCHI, S. *et al.* Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase leads to glucose-dependent activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 35471-81, Dec 2007. ISSN 0021-9258.

LEITNER, A.; STURM, M.; LINDNER, W. Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 19-30, 2011. ISSN 0003-2670.

LEWIT-BENTLEY, A.; RÉTY, S. EF-hand calcium-binding proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, n. 6, p. 637-643, 2000. ISSN 0959-440X.

LIANG, M. P. *et al.* WebFEATURE: an interactive web tool for identifying and visualizing functional sites on macromolecular structures. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3324-3327, 2003. ISSN 0305-1048.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951. ISSN 0021-9258.

MALPARTIDA, F.; SERRANO, R. Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent. **FEBS Letters**, v. 111, n. 1, p. 69-72, 1980. ISSN 0014-5793.

MANNING, G. *et al.* Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 10, p. 514-520, 2002. ISSN 0968-0004.

MANS, R.; DARAN, J.-M. G.; PRONK, J. T. Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. **Current opinion in biotechnology**, v. 50, p. 47-56, 2018. ISSN 0958-1669.

MAZÓN, M. J.; ERASO, P.; PORTILLO, F. Specific phosphoantibodies reveal two phosphorylation sites in yeast Pma1 in response to glucose. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 5, p. f0v030, 2015. ISSN 1567-1364.

MICHELS, C. A. *Saccharomyces cerevisiae* as a Genetic Model Organism. **Genetic Techniques for Biological Research: A Case Study Approach**, p. 1-22, 2002. ISSN 0470846623.

MISETA, A. *et al.* The Golgi apparatus plays a significant role in the maintenance of Ca²⁺ homeostasis in the *vps33Δ* vacuolar biogenesis mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 9, p. 5939-5947, 1999. ISSN 0021-9258.

MISETA, A. *et al.* The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 451, n. 2, p. 132-136, 1999. ISSN 0014-5793.

MOK, J. *et al.* Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. **Science Signaling**, v. 3, n. 109, p. ra12, 2010.

MORENO, E.; LAGUNAS, R. Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1063, n. 2, p. 265-268, 1991. ISSN 0005-2736.

MULLER, E. M.; LOCKE, E. G.; CUNNINGHAM, K. W. Differential regulation of two Ca^{2+} influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 159, n. 4, p. 1527-1538, 2001. ISSN 0016-6731.

NEWCOMB, L. L. *et al.* Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 1, p. 143-149, 2003. ISSN 1535-9778.

ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 3, p. 554-569, 1999. ISSN 1092-2172.

PAIDHUNGAT, M.; GARRETT, S. A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca^{2+} uptake and exacerbates the *cdc1* (Ts) growth defect. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 11, p. 6339-6347, 1997. ISSN 0270-7306.

PALMGREN, M. G.; NISSEN, P. P-type ATPases. **Annual Review of Biophysics**, v. 40, p. 243-266, 2011. ISSN 1936-122X.

PEDERSEN, B. P. *et al.* Crystal structure of the plasma membrane proton pump. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 1111-1114, 2007. ISSN 0028-0836.

PEETERS, K.; THEVELEIN, J. M. Glucose sensing and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. In: (Ed.). **Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism**: Springer, 2014. p.21-56.

PEREIRA, M. B. *et al.* Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone induced calcium signaling and activation of plasma membrane H^{+} -ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 4, p. 622-30, Jun 2008. ISSN 1567-1356.

PEREIRA, R. R. *et al.* Detailed search for protein kinase(s) involved in plasma membrane H^{+} -ATPase activity regulation of yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 2, p. fov003, 2015. ISSN 1567-1364.

PORTILLO, F. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 1, p. 31-42, 2000. ISSN 0304-4157.

PRETORIUS, I. S. Synthetic genome engineering forging new frontiers for wine yeast. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 112-136, 2017. ISSN 0738-8551.

RAO, R.; DRUMMOND-BARBOSA, D.; SLAYMAN, C. W. Transcriptional regulation by glucose of the yeast *PMA1* gene encoding the plasma membrane H⁺-ATPase. **Yeast**, v. 9, n. 10, p. 1075-84, Oct 1993. ISSN 0749-503X.

RIGAMONTI, M. *et al.* Hypotonic stress-induced calcium signaling in *Saccharomyces cerevisiae* involves TRP-like transporters on the endoplasmic reticulum membrane. **Cell calcium**, v. 57, n. 2, p. 57-68, 2015. ISSN 0143-4160.

RILEY, R. *et al.* Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 35, p. 9882-9887, 2016. ISSN 0027-8424.

RUBENSTEIN, E. M.; SCHMIDT, M. C. Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 4, p. 571-583, 2007. ISSN 1535-9778.

SAIARDI, A. *et al.* Inositol polyphosphate multikinase (*ArgRIII*) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 468, n. 1, p. 28-32, 2000. ISSN 0014-5793.

SERRANO, R. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 947, n. 1, p. 1-28, 1988. ISSN 0304-4157.

SERRANO, R. *et al.* The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1319-1333, 2002. ISSN 1365-2958.

SOUZA, M.; TROPIA, M.; BRANDAO, R. New aspects of the glucose activation of the H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology-Sgm**, v. 147, p. 2849-2855, OCT 2001 2001. ISSN 1350-0872.

STASYK, T.; HUBER, L. A. Mapping in vivo signal transduction defects by phosphoproteomics. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 1, p. 43-51, 2012. ISSN 1471-4914.

THEVELEIN, J. M. Signal transduction in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1753-1790, 1994. ISSN 1097-0061.

THOMS, S. *et al.* Lpx1p is a peroxisomal lipase required for normal peroxisome morphology. **FEBS Journal**, v. 275, n. 3, p. 504-514, 2008. ISSN 1742-4658.

THOMS, S. *et al.* The unusual extended C-terminal helix of the peroxisomal α/β -hydrolase Lpx1 is involved in dimer contacts but dispensable for dimerization. **Journal of Structural Biology**, v. 175, n. 3, p. 362-371, 2011. ISSN 1047-8477.

TICHY, A. *et al.* Phosphoproteomics: Searching for a needle in a haystack. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 12, p. 2786-2797, 2011. ISSN 1874-3919.

TISI, R. *et al.* Phospholipase C is required for glucose-induced calcium influx in budding yeast. **FEBS Letters**, v. 520, n. 1-3, p. 133-8, Jun 2002. ISSN 0014-5793.

TISI, R. *et al.* Evidence for inositol triphosphate as a second messenger for glucose-induced calcium signalling in budding yeast. **Current Genetics**, v. 45, n. 2, p. 83-89, FEB 2004 2004. ISSN 0172-8083.

TISI, R. *et al.* Calcium homeostasis and signaling in fungi and their relevance for pathogenicity of yeasts and filamentous fungi. **AIMS Molecular Science**, v. 4, n. 3, p. 505-549, 2016.

TÖKÉS-FÜZESI, M. *et al.* Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1299-1308, 2002. ISSN 1365-2958.

TRÓPIA, M. *et al.* Calcium signaling and sugar-induced activation of plasma membrane H^+ -ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 4, p. 1234-43, May 2006. ISSN 0006-291X.

TURANLI-YILDIZ, B.; HACISALIHOĞLU, B.; ÇAKAR, Z. P. Advances in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of Industrially and Clinically Important Chemicals. In: (Ed.). **Old Yeasts-New Questions**: InTech, 2017.

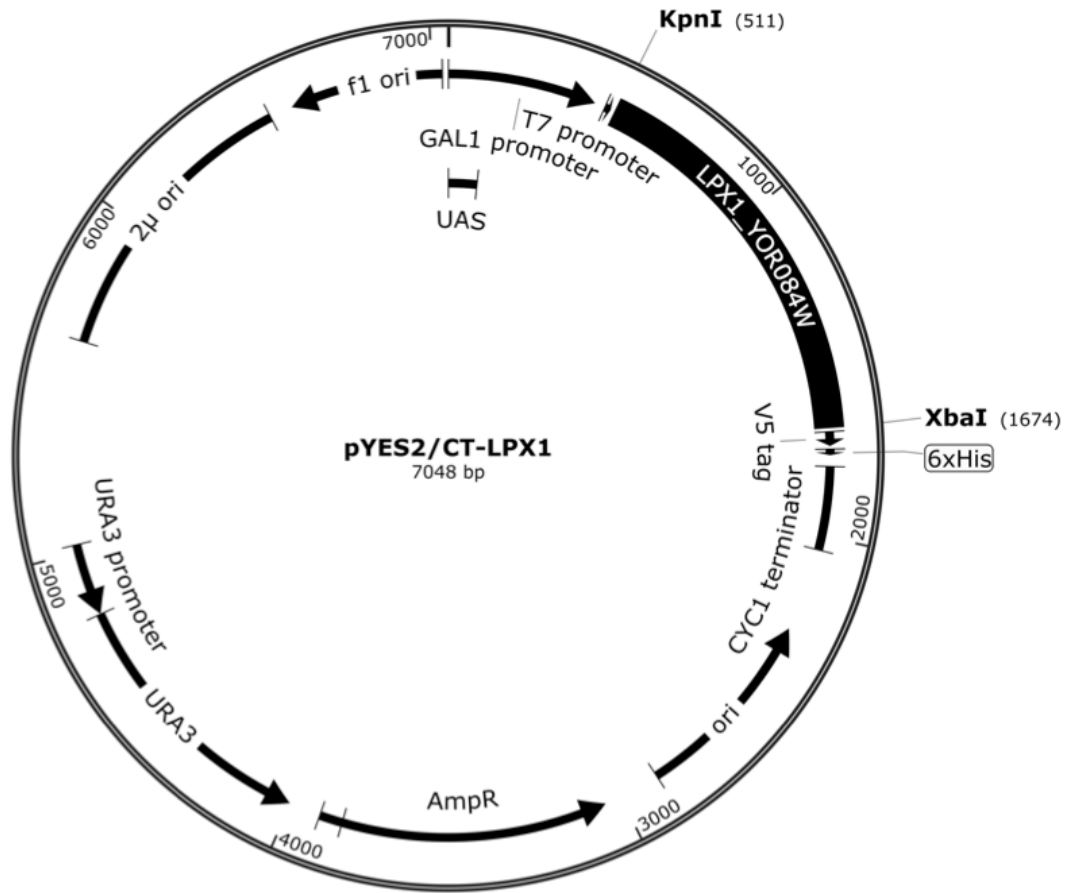
TUTULAN-CUNITA, A. C. *et al.* Involvement of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p ATP-binding cassette transporter in calcium homeostasis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, n. 4, p. 857-860, 2005. ISSN 1347-6947.

VOLSCHENK, H. *et al.* Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for L-malic acid degradation via an efficient malo-ethanolic pathway. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 25, n. 2, p. 63-73, 2017. ISSN 2224-7904.

WU, S.; LIANG, M. P.; ALTMAN, R. B. The SeqFEATURE library of 3D functional site models: comparison to existing methods and applications to protein function annotation. **Genome Biology**, v. 9, n. 1, p. R8, 2008. ISSN 1465-6906.

Anexos

ANEXO A

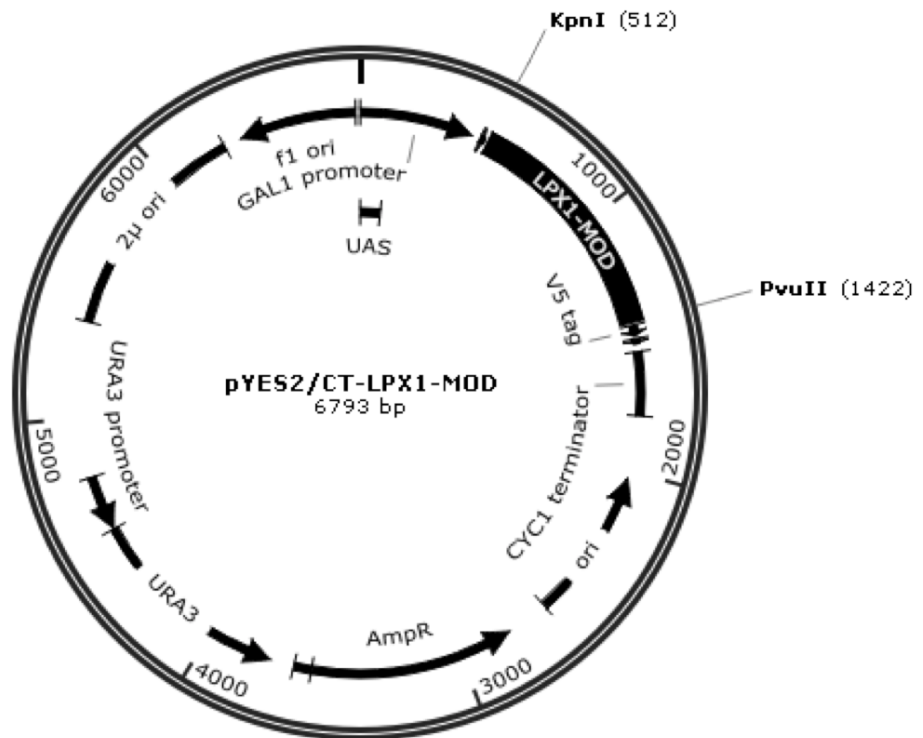


Plasmídeo pYES2/CT-LPX1

ANEXO B

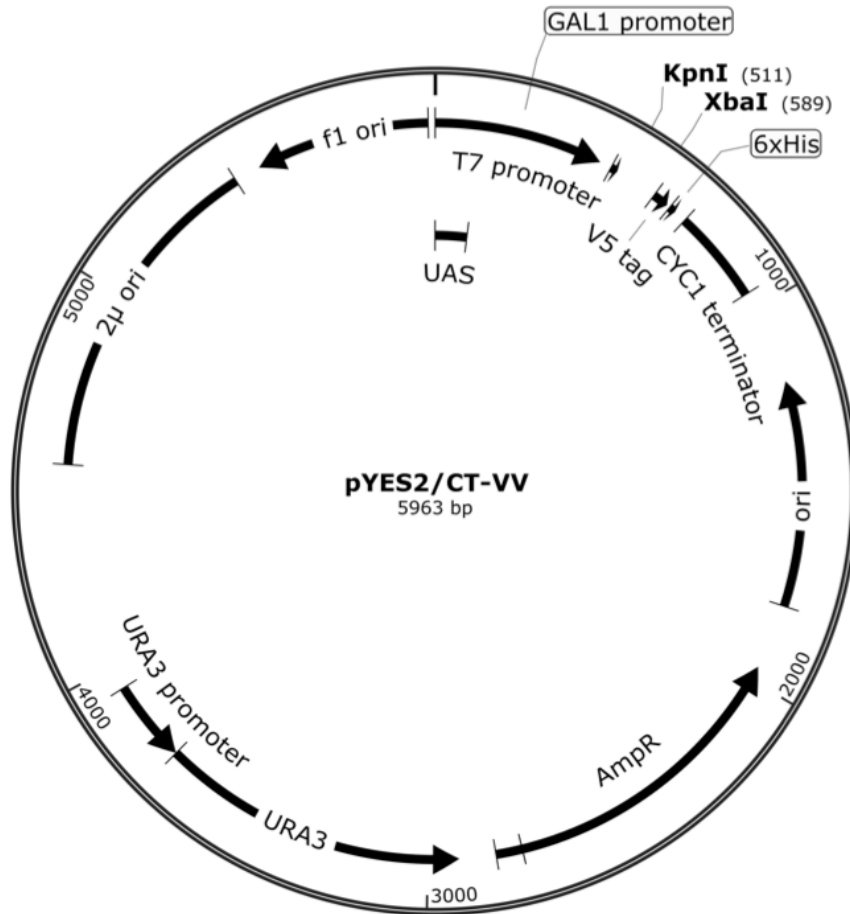


LPX1
1173 bp



Gene *LPX1* modificado e Plasmídeo pYES2/CT-*LPX1*-MOD

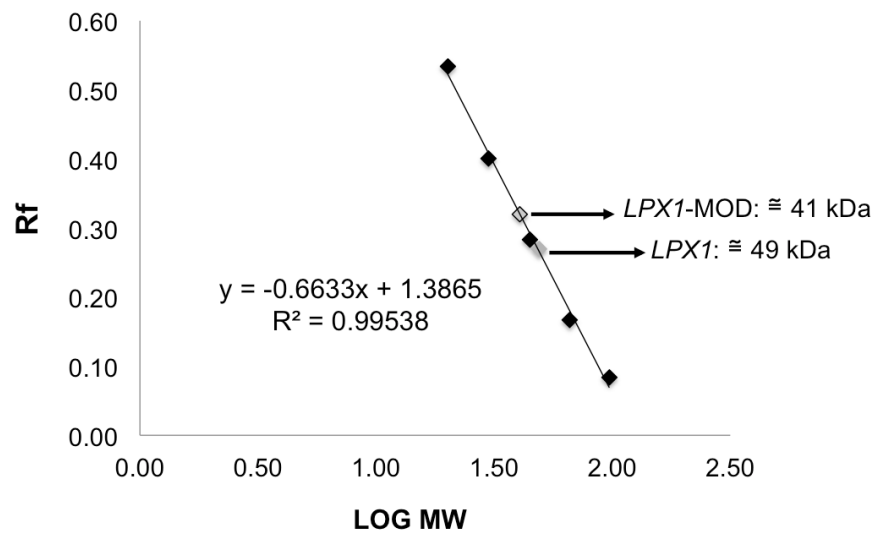
ANEXO C



Plasmídeo pYES2/CT-VV

ANEXO D

Peso Molecular (kDa)	Distância de migração (cm)	Rf
97.0	0.50	0.08
66.0	1.00	0.17
45.0	1.70	0.28
30.0	2.40	0.40
20.1	3.20	0.53



Os pesos moleculares de Lpx1p e Lpx1p modificada foram calculados pela interpolação das suas respectivas migrações relativas (Rf) em uma curva preparada com proteínas de peso molecular conhecido.