

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Novos aspectos da desintoxicação de cádmio em *Saccharomyces cerevisiae*: regulação do transportador Ycf1p durante o metabolismo respiratório e contribuição de transportadores de cálcio.

TESE DE DOUTORADO
ALBANIN APARECIDA MIELNICZKI PEREIRA

Porto Alegre, 2009.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Novos aspectos da desintoxicação de cádmio em *Saccharomyces cerevisiae*: regulação do transportador Ycf1p durante o metabolismo respiratório e contribuição de transportadores de cálcio.

Albanin Aparecida Mielniczki Pereira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre, junho de 2009.

SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Departamento de Biofísica e no Laboratório Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O Projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Auxílio à Pesquisa Científica (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Genotox – Instituto Royal).

As cabeças pensantes, os homens que avaliam corretamente as coisas, são apenas exceções, assim como as pessoas que levam os assuntos a sério.

(Arthur Schopenhauer)

*Se a chuva cai e o sol não sai
Penso em você, vontade de viver mais
Em paz com o mundo e comigo,
Se a chuva cai e o sol não sai
Penso em você, vontade de viver mais
Em paz com o mundo e consigo.
(Chico César)*

**Dedico este trabalho ao Giovani,
que me ensinou a ser uma pessoa melhor, mais simples e em paz.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques, pela orientação, pela grande confiança e por ter me dado a autonomia necessária para que eu desenvolvesse este trabalho de doutorado com liberdade e criatividade, o que foi fundamental para o meu amadurecimento como pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Diego Bonatto, eu agradeço pelas discussões científicas, críticas e sugestões ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Ao Diego, meu amigo, eu agradeço pelas filosofias de bar, os conselhos, as boas risadas...

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS (PPGBCM), pela excelente oportunidade de formação profissional.

A Profa. Dra. Janette Palm Fett, pelas sugestões e colaborações como membro da minha Comissão de Acompanhamento e pela revisão minuciosa da minha tese de doutorado.

Ao Prof. Dr. José Claudio Fonseca Moreira, pelas sugestões e colaborações como membro da minha Comissão de Acompanhamento.

A Profa. Dra. Elis Cristiana Araújo Eleutherio, pela cooperação científica que permitiu a realização dos experimentos de absorção atômica na UFRJ.

À Sílvia e ao Luciano, da secretaria do PPGBCM, pelo bom humor e competência. Silvinha, hoje eu sei que “mimosa” é o teu jeito carinhoso de chamar as pessoas.

À Ana Zilles, pela contribuição imprescindível para a obtenção dos resultados incluídos no primeiro capítulo deste trabalho. Quem mais teria tido disposição de me acompanhar nas madrugadas frias do Campus do Vale?

À Ana Bárbara, pelo seu compromisso com o trabalho, por sua alegria contagiante, por seu otimismo e por sua humildade.

A Cassiana e à Jaqueline Cardone, pela boa convivência durante os últimos quatro anos e pelo auxílio com os experimentos de RT-PCR.

Ao Cláudio, meu colega bom astral e engraçado, que me deixou de herança as alegrias e tristezas de trabalhar com a proteína Pmr1...

À Valéria, pela amizade, pela compreensão, por ter ouvido meus anseios e entendido algumas das minhas fraquezas. Espero ter retribuído, de algum modo, tua compreensão e amizade.

A Dinara, por ter me ensinado que a misteriosa historinha do “Vai ser só uma cerveja” é só mais uma lenda urbana e que, na vida real, uma cerveja nunca chega sozinha. Como agradecimento especial, eu ofereço para a Dinara (e também para o Fabrício e para Fernanda) um verso de qualidade duvidosa: “é a dança do maxixe, é a dança do maxixe, é um gel no meio com duas esponjas fazendo sanduíche!”.

À Jaqueline Rocha, pelas boas conversas durante o “cafezinho matinal”.

À Renata, ao Fabrício, à Fernanda e à Gabrielle, colegas que eu só aprendi a valorizar no final do meu doutorado. Vocês são pessoas ótimas e eu, sinceramente, os agradeço por terem me acolhido no laboratório 219 e por terem tornado mais divertidos os meus últimos meses de doutorado.

À Diana que me mostrou, de uma forma bastante divertida, que podem existir pessoas ainda mais atucanadas do que eu. Relaxa Diana, a gente é normal (eu acho?!)..

Ao Renato, por ter me apelidado de “AlbanVader” no meu primeiro mês de doutorado. Este apelido, que só poderia ser criação do Renato, me ensinou de forma bastante didática como era a dinâmica de trabalho e a forma de relacionamento entre os alunos mais antigos do grupo do Prof. Henriques. Agradeço também pelas festas, cervejas e filosofias baratas que compartilhamos.

Ao Cristiano Riger, que foi um grande colega de trabalho durante o período que passou aqui na UFRGS e que sempre foi muito prestativo quando precisei de sua colaboração para as análises de absorção atômica.

Ao Iuri (tu vê!), pelos momentos divertidos no laboratório e por ter sido meu “auxiliar de cronômetro” quando o espectrofotômetro estava contra mim...

Aos alunos de iniciação científica e de apoio técnico que passaram pelo laboratório durante o período em que realizei meu doutorado: Ana Catarina, Angelo, Bruna Castilhos, Bruna Immich, Michelli, Nicolas, Rafael Santos, Robado, Rafael Halm, Bibiana, André, Gabriela. Agradeço pela alegria de vocês e também pelos pequenos favores prestados... O café dos alunos de IC é sempre mais gostoso!

A Nucha, pela sensibilidade em perceber toda minha tensão e estresse durante os últimos meses; e por todo apoio que veio junto com esta percepção.

Ao Professor Arthur Germano Fett Netto, que me entrevistou durante o processo seletivo do PPGBCM em 2005. Foi uma entrevista tão simpática que, ao final, quase tive vontade de chamá-lo para tomar um “cafezinho” e continuar conversando sobre as coisas da ciência.

Às colegas do Genotox, Miriana, Márcia, Izabel, Miriam, Jaqueline de Deos, agradeço o futebol, as cervejas, os churrascos, as fofocas, os cafezinhos, os “serviços” de portaria e impressão, as ligações para celular... Mas, em especial, agradeço pelo forte apoio que vocês deram a mim, à Valéria e a Dinara no momento de maior crise do laboratório 210. Ninguém merece receber três pós-graduandas, aos prantos, às três da tarde de uma sexta-feira!

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biofísica da UFRGS, agradeço pelo convívio agradável e divertido durante os últimos quatro anos.

A todos os colegas de laboratório (210, 212, 219) com quem convivi durante o tempo de doutorado. Aqui não vou citar nomes para não correr o risco de esquecer alguém... Afinal, foram muitos colegas nestes quatro anos! Com cada um eu aprendi um pouco mais sobre vida, ciência ou, simplesmente, sobre convivência.

A minha família... Minha grande quadrilha, digo, família! Bagunçada, confusa, divertida. Agradeço por terem aceitado minhas escolhas, por terem compreendido minhas ausências e por terem me recebido, a cada retorno, com os braços abertos e a casa em festa.

Ao Giovani, que durante minha longa jornada de pós-graduação me ensinou o verdadeiro significado da palavra “cumplicidade”, enquanto eu, sempre enlouquecida e confusa, tentava ensinar a ele o mecanismo de replicação do DNA durante nossos jantares de sábado à noite... Agradeço porque, ainda assim, você sempre esteve a meu lado, me incentivando, me apoiando ou simplesmente me dando colo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. CÁDMIO: CARACTERÍSTICAS, APLICAÇÕES INDUSTRIAIS E ASPECTOS AMBIENTAIS	20
3. TOXICIDADE DO CÁDMIO PARA OS SERES HUMANOS	23
4. MECANISMOS DE TOXICIDADE DO CÁDMIO	24
4.1. <i>Geração de estresse oxidativo</i>	25
4.2. <i>Interferência com as vias de sinalização intracelular e expressão gênica</i>	26
4.3. <i>Interferência com os sistemas de reparação de DNA</i>	28
5. MECANISMOS DE DESINTOXICAÇÃO DE CÁDMIO	30
5.1. <i>Desintoxicação de cádmio em <i>S. cerevisiae</i></i>	33
6. CÁLCIO NO CONTEXTO BIOLÓGICO	37
6.1. <i>Aspectos gerais da homeostase de cálcio em células eucarióticas</i>	38
6.2. <i>Proteínas associadas à homeostase de cálcio em <i>S. cerevisiae</i></i>	42
7. INFLUÊNCIA DO CÁDMIO SOBRE AS FUNÇÕES BIOLÓGICAS DO CÁLCIO	47
8. METABOLISMO ENERGÉTICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM <i>S. cerevisiae</i>	49
OBJETIVOS	53
1. OBJETIVO GERAL	54
1.1. <i>Objetivos Específicos</i>	54
CAPÍTULO I	56
THE ROLE OF THE YEAST ATP-BINDING CASSETTE Ycf1p IN GLUTATHIONE AND CADMIUM ION HOMEOSTASIS DURING RESPIRATORY METABOLISM	57
CAPÍTULO II	65
NEW INSIGHTS ABOUT THE Ca²⁺-ATPASES CONTRIBUTION FOR CADMIUM TOLERANCE IN YEAST	66

DISCUSSÃO GERAL	92
CONCLUSÕES	109
1. CONCLUSÃO GERAL	110
<i>1.1. Conclusões Específicas</i>	110
PERSPECTIVAS	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXOS	132
CURRICULUM VITAE	147

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ABC: *ATP-binding cassette*

ABCC/MRP: Família de proteínas ABC (*ATP-binding cassette*), subfamília C, proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas.

Alr1: *Aluminum resistance 1*

AP1: *Activator protein 1*

BER: *Base excision repair* (reparação por excisão de bases)

CCE: *Capacitative calcium entry*

Cch1: *Calcium channel 1*

Cd.[GS]₂: cádmio-bis(glutationato)

CDF: *Cation diffusion facilitator*

Cka: *Casein kinase alpha subunit 1*

Cmd1: *Calmodulina*

Cod1/Spf1: *Sensitivity to pichia farinosa killer toxin 1*

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CREB: *cAMP-response binding protein*

Crs5: *Copper-resistant suppressor 5*

Crz1p/Tnz1p: *Calcineurin-responsive zinc finger 1*

Cup1: metalotioneína de *S. cerevisiae*

DAG: 1,2-diacylglicerol

Dna2: *DNA synthesis defective 2*

Ecm38: *Extracellular mutant 38* (γ -Glutamyl transferase de *S. cerevisiae*)

ERO: Espécies reativas de oxigênio

Fet4: *Ferrous transport*

Fig1: *Factor-induced gene 1*

FQS: Fitoquelatina sintase

FQs: Fitoquelatinas

GSH: Glutationa (γ -Glu-Cys-Gly)

GSSG: Glutationa dissulfeto

Gtt2: *Glutathione transferase 2*

hCFTR: *Human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

IARC: *International Agency for Research on Cancer*
 Lap4: *Leucine aminopeptidases 4*
 Mid1: *Mating pheromone-induced death 1*
 MMR: *Mismatch repair* (reparação de erros no emparelhamento de bases)
 MRP1: *Multidrug resistance associated protein 1*
 MTs: metalotioneínas
 NER: *Nucleotide excision repair* (reparação por excisão de nucleotídeos)
 Pca1: *P-type cation-transporting ATPase*
 Pka: *Takashi's Protein Kinase* (GTPase heterotrimérica de *S. cerevisiae*)
 Pmc1: *Plasma membrane calcium 1*
 PMCA: *Plasma membrane Ca²⁺-ATPases*
 Pmr1: *Plasma membrane ATPase related 1*
 Rad27: *Radiation sensitive 27*
 Ras: *Homologous to RAS proto-oncogene* (GTPase monomérica de *S. cerevisiae*)
 RE: *Retículo endoplasmático*
 Rgt2: *Restores glucose transport 2*
 RYR: Receptores responsivos a rianodina (*Ryanodin receptors*)
 SERCA: [*sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase pumps*]
 Skn7: *Suppressor of kre null 7*
 Smf1: *Suppressor of mitochondria import function 1*
 Snf3: *Sucrose Nonfermenting 3*
 Sod1: Cobre-zinco superóxido dismutase (citossólica)
 Sod2: Manganês superóxido dismutase (mitocondrial)
 SPCA: *Secretory-pathway Ca²⁺ ATPases*
 TRPCs: *Transient receptor potential channels*
 Trr1: *Tiorredoxin reductase 1*
 Trx1, Trx2, Trx3: *Tiorredoxins* (1, 2, 3)
 Vcx1: *Vacuolar H⁺/Ca²⁺ exchanger 1*
 VGCCs: *Voltage-gated Ca²⁺ channels*
 WHO: *World Health Organization*
 Yap1: *Yeast AP-1*
 Ycf1: *Yeast cadmium factor 1*

Yck1: *Yeast casein kinase 1*

Yor1: *Yeast oligomycin resistance 1*

Yvc1: *Yeast vacuolar conductance 1*

Zrc1: *Zinc resistance conferring 1*

Zrt1: *Zinc-regulated transporter 1*

RESUMO

Cádmio (Cd^{2+}) é um metal pesado tóxico para os sistemas biológicos e que pode competir com íons essenciais como Zn^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} por seus respectivos sistemas de transporte. Em *S. cerevisiae*, íons Cd^{2+} podem ser conjugados com GSH formando complexos $\text{Cd}[\text{GS}]_2$ – os quais são internalizados no vacúolo pelo transportador Ycf1p. Neste trabalho, foi feita uma análise comparativa da atuação de Ycf1p na desintoxicação de Cd^{2+} durante o metabolismo fermentativo e respiratório de *S. cerevisiae*. Adicionalmente, foi realizada uma investigação sobre a contribuição de transportadores de cálcio (Ca^{2+}) para a tolerância ao Cd^{2+} . Os resultados mostram que, durante o metabolismo respiratório, o mutante *ycf1Δ* é mais tolerante à Cd^{2+} e aos oxidantes t-BOOH e H_2O_2 do que a linhagem selvagem. Esta tolerância possivelmente está relacionada com o maior conteúdo de GSH presente nas células *ycf1Δ*. Na linhagem selvagem BY4741, a atividade do promotor *YCF1* sofre uma queda gradual durante a transição do metabolismo fermentativo para o respiratório e a sua indução em resposta à Cd^{2+} depende da disponibilidade de GSH. Estes dados indicam que a atividade de Ycf1p pode, direta ou indiretamente, influenciar a homeostase de GSH e que as células de *S. cerevisiae* devem possuir mecanismos independentes de Ycf1p para conter a toxicidade do Cd^{2+} em situações nas quais a disponibilidade de GSH esteja comprometida. Neste contexto, os resultados do trabalho mostram também que as ATPases de Ca^{2+} Pmr1p e Pmc1p podem contribuir para a tolerância ao Cd^{2+} . Na linhagem selvagem BY4741 o tratamento com Cd^{2+} promove aumento da expressão de *PMCI* e este aumento é ainda maior nos mutantes *ycf1Δ*. O gene *PMRI* só é induzido por Cd^{2+} na ausência do gene *YCF1* funcional. Entretanto, no mutante *pmr1Δ* a expressão basal de *YCF1* e *PMCI* é maior do que na linhagem selvagem (70% e 200%, respectivamente). Adicionalmente, a ausência de Pmr1p funcional está associada a um acúmulo crescente, tempo dependente, de Cd^{2+} intracelular. Por outro lado, a linhagem selvagem BY4741 alterna fases de captação e exportação do metal. Os resultados apontam para Pmr1p e Pmc1p como proteínas auxiliares na desintoxicação de Cd^{2+} em *S. cerevisiae*, as quais possivelmente são ativadas em situações onde a formação e posterior importação de complexos $\text{Cd}[\text{GS}]_2$ por Ycf1p não é adequada ao metabolismo celular.

ABSTRACT

Cadmium (Cd^{2+}) is a heavy metal highly toxic to biological systems, which can compete with essential ions like Zn^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} for their respective transport systems. In the yeast *S. cerevisiae*, Cd^{2+} can be conjugated with GSH generating complexes of Cd - $[\text{GS}]_2$ which, in turn, are removed from the cytosol to the vacuole by specific transmembrane proteins such as the glutathione-conjugated transporter Ycf1p. In this work the role of Ycf1p in Cd^{2+} detoxification during respiratory metabolism of *S. cerevisiae* was investigated. In addition, the contribution of Ca^{2+} transporters for Cd^{2+} detoxification was analyzed. The results showed that in respiratory condition the mutant *ycf1* Δ is more tolerant to Cd^{2+} and to the oxidants t-BOOH and H_2O_2 than the wild-type strain. This tolerance is probably related to the high content of GSH present in the *ycf1* Δ mutant. Expression of the *YCF1* promoter in the wild type strain is naturally down-regulated after the transition from fermentative to respiratory metabolism (diauxic shift), and its induction in response to Cd^{2+} is dependent on GSH availability. These data indicate that Ycf1p activity can, in some way, influence GSH intracellular homeostasis. Therefore, yeast cells may have an Ycf1p-independent mechanism to cope with Cd^{2+} toxicity when GSH availability is compromised. Accordingly, the results of this work point also to the contribution of the Ca^{2+} -ATPases Pmc1p and Pmr1p to Cd^{2+} detoxification. In the BY4741 wild-type strain, Cd^{2+} treatment triggers an increase in *PMCI* expression, and this increase is even greater in the *ycf1* Δ mutant strain. The *PMRI* gene is induced by Cd^{2+} only in the absence of the functional *YCF1* gene. However, the basal expression of *YCF1* and *PMCI* is higher in the *pmr1* Δ mutant than in wild-type cells (70% and 200%, respectively). In addition, the absence of the functional Pmr1p is associated with a crescent, time-dependent, Cd^{2+} uptake by the cells. Unlikely, alternating phases of uptake and export of metal are observed in BY4741 wild-type cells. The results indicate that Pmr1p and Pmc1p can act as accessory proteins for Cd^{2+} detoxification, which possibly are activated when the formation and subsequent import of Cd - $[\text{GS}]_2$ by Ycf1p is not adequate to cellular metabolism.



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO GERAL

A vida em sua essência é caracterizada por ter uma natureza química. A alimentação, o crescimento e a proliferação de todos os organismos vivos só são possíveis graças à ocorrência de reações químicas em condições relativamente controladas. Sob esta perspectiva, as propriedades químicas dos elementos que entram em contato com as células são fatores importantes não somente para a manutenção, como também para a evolução da vida. Além disso, é fundamental que os organismos consigam reproduzir (e transmitir) o funcionamento controlado de grupos de reações bioquímicas, o que é feito por meio da informação contida no código genético de DNA (Williams, 1997).

O surgimento da vida ocorreu num ambiente inorgânico inóspito e a seleção dos elementos que foram sendo incorporados às células ao longo de sua evolução dependeu de dois fatores principais: i) biodisponibilidade e ii) propriedades químicas adequadas para a execução de funções biológicas nas condições de temperatura e pressão da Terra pré-biótica (Williams, 1997).

A formação de estruturas orgânicas complexas (biomembranas, proteínas, etc.) ficou centrada em elementos abundantes como hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo. Para a manutenção da pressão osmótica e força iônica do ambiente intracelular foram selecionados íons que se mantêm bem em solução aquosa como sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloro (Cl^-). Os íons de magnésio (Mg^{2+}) se ligam a ânions formando sais relativamente solúveis, propriedade útil no controle de reações químicas dependentes de fósforo e no controle de alterações na estrutura de ânions de grande porte, como são o DNA e o RNA. Elementos com atividade redox como o ferro, molibdênio e cobalto foram incorporados especialmente a sítios catalíticos de proteínas ou coenzimas. Os íons de cálcio (Ca^{2+}) inicialmente foram selecionados por sua capacidade de fazer ligação iônica

entre subunidades de uma mesma proteína ou entre proteínas diferentes. Com a evolução do sistema de endomembranas, as células eucarióticas adquiriram a capacidade de controlar refinadamente os níveis intracelulares deste metal e, assim, o Ca^{2+} adquiriu papel na sinalização intracelular e controle de polaridade de membranas (Williams, 1997).

O zinco e o cobre só puderam ser aproveitados pelos organismos vivos após o enriquecimento da atmosfera com oxigênio diatômico, pois no ambiente anaeróbico primitivo estes metais se encontravam sob a forma de sulfetos insolúveis. O zinco passou a ser utilizado como cofator de uma série de enzimas, incluindo diversas proteinases. Além disso, surgiram proteínas com domínios “dedo de zinco” – capazes de se ligar ao DNA e sinalizar para alterações nos padrões de transcrição de genes em resposta a estímulos ambientais (Williams, 1997). A disponibilidade de cobre e oxigênio dimolecular aumentou substancialmente a capacidade oxidativa dos organismos e isso pode ser aproveitado em termos de geração de energia, como pode ser exemplificado pela participação do cobre na constituição estrutural de proteínas da cadeia respiratória das células atuais (Nelson & Cox, 2000).

O uso eficiente de elementos químicos para execução de funções biológicas, em especial dos metais, só foi possível porque as células desenvolveram estratégias para regular a concentração intracelular destes elementos. Destacam-se o surgimento de proteínas para importar e exportar metais na membrana plasmática, a compartimentalização de metais em vesículas ou organelas das células eucarióticas e o surgimento de proteínas especializadas em ligar (quelar) íons metálicos, tais como as metalotioneínas (Silver & Wauderhaug, 1992; Williams, 1997). As células precisaram também criar mecanismos de resistência contra metais que não adquiriram funções biológicas, cujo contato com os organismos vivos muitas vezes é imposto pelo ambiente

(Silver & Wauderhaug, 1992). Metais como o cádmio e mercúrio não têm atividade biológica e devido à sua natureza química intrínseca podem alterar o funcionamento da maquinaria celular, gerando toxicidade (Beyersmann & Hartwig, 2008).

O cádmio (Cd^{2+}) era um elemento pouco abundante na atmosfera primitiva quando comparado a outros metais (Williams, 1997). Este fato pode explicar porque os seres vivos em geral não desenvolveram sistemas para aproveitar este elemento. Apesar de ter sido demonstrado que o Cd^{2+} pode atuar como cofator da enzima anidrase carbônica de *Thalassiosira weissflogii* - uma diatomácea marinha (Lane *et al.*, 2005), é pouco provável que tenha havido uma pressão a favor de seu uso no decorrer da evolução. Mais do que uma atividade biológica intrínseca do Cd^{2+} , esse fato reflete a provável adaptação dos organismos marinhos à baixa disponibilidade de alguns elementos metálicos no ambiente oceânico (Lane *et al.*, 2005). Por definição, portanto, o Cd^{2+} é considerado um metal não essencial, em oposição aos metais essenciais que são os que possuem função biológica e que são indispensáveis aos organismos vivos como, por exemplo, o ferro, zinco e o cálcio (Nieves, 2005; Shenkin, 2006).

O Cd^{2+} continua sendo um elemento pouco abundante na natureza. Entretanto, a ocorrência de erosões e erupções vulcânicas e, durante o último século, as atividades industriais humanas, fizeram com que este elemento se tornasse biologicamente disponível (WHO, 2003). Neste cenário, os organismos vivos (incluindo os seres humanos) estão mais expostos à toxicidade do Cd^{2+} e por isso é importante compreender quais são os componentes da maquinaria celular afetados por este metal, bem como as estratégias mais relevantes que as células desenvolveram para conter a sua toxicidade.

2. CÁDMIO: CARACTERÍSTICAS, APLICAÇÕES INDUSTRIAIS E ASPECTOS AMBIENTAIS

O Cd^{2+} é um dos elementos químicos que compõe a crosta terrestre, estando disseminado nos solos, água e atmosfera do planeta por meio de fenômenos naturais ou pela atividade antropogênica. É um metal branco acinzentado pertencente à família II-B da tabela periódica, sendo encontrado naturalmente em rochas sedimentares e obtido comercialmente como subproduto do refino de zinco, cobre e chumbo (WHO, 2003). Mesmo em baixas concentrações, este metal pode ser tóxico para os organismos vivos e por isso é classificado como um contaminante ambiental (WHO, 1992).

A principal forma natural de disseminação de Cd^{2+} no ambiente é a erosão de rochas sedimentares. O Cd^{2+} proveniente de erosão pode ser transportado pela água de rios por longas distâncias, contaminando solos ou sendo liberado diretamente nos oceanos. A atividade vulcânica e os incêndios florestais também contribuem significativamente para a disseminação deste metal por meio de sua liberação na atmosfera (Williams & Harrison, 1984; Nriagu, 1988; WHO, 1992). Estima-se que a concentração média de Cd^{2+} na crosta terrestre varie entre 0,1 e 0,5 ppm, podendo atingir concentrações de até 500 ppm em fosfatos marinhos e nas próprias rochas sedimentares (WHO, 2003; www.cadmium.ogr).

Em termos comerciais, o Cd^{2+} se diferencia de outros metais por ser altamente resistente à corrosão. Os componentes contendo Cd^{2+} podem resistir a temperaturas elevadas e à degradação por luz ultravioleta. Além disso, o Cd^{2+} é um ótimo condutor de calor e eletricidade. Por estas características, é utilizado no revestimento de polímeros e ligas de aço, na fabricação de componentes eletrônicos, pigmentos e baterias recarregáveis níquel-cádmio (Ni-Cd) (WHO, 2003). Mais recentemente, pesquisas têm investigado o uso deste metal na construção de nanoestruturas para a liberação controlada de drogas (Hullavarad, *et al.*, 2008).

A ampla aplicabilidade do Cd^{2+} em atividades econômicas de interesse humano resulta no aumento de sua deposição no ambiente. A queima de combustíveis fósseis, produção de ferro e aço, manufatura de cimento e descarte inadequado de baterias, destacam-se como as principais vias antropogênicas de geração de resíduos de Cd^{2+} (WHO, 2003). Na agricultura, o uso de fertilizantes fosfatados também contribui para a contaminação de alimentos, uma vez que a redução do pH do solo aumenta a taxa de captação de Cd^{2+} pelas plantas (Merrington *et al.*, 2001; Mirlean & Roisenberg, 2006). Até mesmo a água potável consumida pelos seres humanos, normalmente contém pequenas concentrações deste metal (WHO, 2003; dos Santos *et al.*, 2006).

Atualmente, existem diferentes tecnologias que permitem a reciclagem de Cd^{2+} , em especial aquele contido em baterias (Espinosa *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos, Japão e Europa a reciclagem de baterias em geral é regulamentada desde a década de 90. Nestes países, existem empresas e/ou associações capacitadas para receber e reciclar baterias Ni-Cd (Espinosa *et al.*, 2004). No Brasil, a regulamentação desse processo é feita pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) desde 1999, por meio da resolução 257/99 (CONAMA, 2008). Entretanto, não existe no país uma associação ou empresa responsável pela coleta das baterias de Ni-Cd, a qual centralize esforços não apenas para isso, mas também para a informação da população (Espinosa *et al.*, 2004). Essa coleta ficou restrita à iniciativa das empresas importadoras e é feita de maneira dispersa, o que eleva os custos e torna o processo de reciclagem pouco eficiente (Espinosa *et al.*, 2004).

Mesmo com o avanço da tecnologia, o Cd^{2+} continua sendo muito atrativo para a fabricação de determinados produtos. Por exemplo, as baterias Ni-Cd são vantajosas porque existem métodos bem estabelecidos para sua reciclagem, têm um melhor

desempenho quando comparadas com sistemas mais novos e possuem menor custo de produção (Espinosa *et al.*, 2004; Backman, 2008). Por outro lado, em diversos países a reciclagem e controle do uso deste metal estão longe dos padrões ideais e acidentes ambientais ainda são recorrentes. Por exemplo, em 2005 na China, uma empresa estatal de fundição provocou um derramamento de Cd^{2+} no rio Beijiang, deixando milhares de habitantes da cidade de Guangdong sem água potável por vários dias (ASIA NEWS, 2005).

Pesquisas realizadas na última década indicam que a contaminação por Cd^{2+} no âmbito nacional também oferece sérios riscos ao meio ambiente e à saúde humana. Um estudo de monitoramento feito na Baía de Todos os Santos (Salvador, BA) demonstrou que o nível de Cd^{2+} acumulado por organismos bentônicos nessa área é compatível com o observado em regiões contaminadas pelo metal (Amado-Filho *et al.*, 2008). Rodgher e colaboradores observaram que ao longo do reservatório do Rio Tiete (SP), o nível de Cd^{2+} pode superar em mais de dez vezes o limite determinado pelo CONAMA para águas destinadas ao consumo doméstico, irrigação e proteção de comunidades aquáticas (Rodgher *et al.*, 2005; CONAMA, 2008). Altas concentrações de Cd^{2+} também foram detectadas em *Saccharum spp* (cana-de-açúcar), cultivada no interior de São Paulo (Segura-Munõz *et al.*, 2006). O acúmulo de Cd^{2+} em cana-de-açúcar pode ter conseqüências diretas para a contaminação humana, seja pelo refino de açúcar comum, pelo consumo de caldo-de-cana ou ainda pelo uso de resíduos de cana como suplemento em solos agrícolas (Segura-Munõz *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, devido à maior regulamentação e ao avanço da tecnologia, tem sido observada uma redução na geração de resíduos de Cd^{2+} decorrente da atividade industrial. Em contrapartida, há uma tendência de aumento dos contaminantes gerados a

partir do lixo urbano. Por exemplo, a deposição de Cd^{2+} proveniente do refino de zinco na baía do Rio Septiba (SE), que era estimada em uma tonelada por ano na década de 80, atingiu níveis próximos de zero em 2005. No mesmo período de tempo, entretanto, a contaminação da baía por Cd^{2+} oriundo de resíduos sólidos urbanos aumentou cerca de cinco vezes (Lacerda & Molisani, 2006).

3. TOXICIDADE DO CÁDMIO PARA OS SERES HUMANOS

A exposição humana ao Cd^{2+} pode ocorrer por meio do consumo de alimentos ou água contaminados, pela inalação de ar contaminado ou fumaça de cigarro. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o limite seguro para a ingestão diária deste metal é de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dia. Entretanto, este valor oferece uma margem de segurança muito estreita entre os níveis inócuos de ingestão e os níveis que podem produzir efeitos adversos (Satarug & Moore, 2004).

O Cd^{2+} é um metal altamente tóxico e que possui um tempo de meia vida biológica estimado entre 15 e 20 anos. Nos seres humanos, a taxa de excreção renal de íons Cd^{2+} é baixa e, por isso, eles tendem a se acumular no corpo, particularmente nos rins e fígado (Nordberg, 1984; Jin *et al.*, 1998; Satarug *et al.*, 2002). Dentre os efeitos nocivos produzidos pelo Cd^{2+} , destacam-se as disfunções renais, a neurotoxicidade, as alterações do sistema reprodutivo, o comprometimento do metabolismo de Ca^{2+} e a fragilidade óssea (Staessen *et al.*, 1994; Kazantzis, 2004; Rigon *et al.*, 2004; Prozialeck *et al.*, 2007; Thompson & Bannigan, 2008). O Cd^{2+} também pode induzir o desenvolvimento de câncer de pulmão e próstata, sendo por isso classificado como agente carcinogênico tipo I pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (IARC, 1993; Huff *et al.*, 2007).

4. MECANISMOS DE TOXICIDADE DO CÁDMIO

A primeira linha de toxicidade do Cd^{2+} ocorre junto aos transportadores para metais essenciais localizados na membrana celular. Tanto em células eucarióticas quanto em procarióticas os íons Cd^{2+} podem competir com elementos como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+} por suas respectivas proteínas de importação, interferindo com o nível normal de captação destes metais (Himeno *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2002; Bresseler *et al.*, 2004; Clemens, 2006; Balamurugan *et al.*, 2009). Por outro lado, elementos essenciais como ferro e cálcio atuam como agonistas da captação de Cd^{2+} e por isso a baixa ingestão dietária destes micronutrientes favorece a absorção intestinal e o acúmulo de Cd^{2+} nos rins e fígado de mamíferos (Reeves & Chaney, 2008).

Em *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) foram identificados pelo menos três transportadores de membrana associados à captação de Cd^{2+} : Zrt1p, Smf1p e Fet4p. A proteína Zrt1 é um transportador de alta afinidade para Zn^{2+} , e as células mutantes para o gene *ZRT1* acumulam menos Cd^{2+} do que a linhagem selvagem (Gomes *et al.*, 2002). Além disso, o transporte de Zn^{2+} mediado por Zrt1p é fortemente inibido pela presença de íons Cd^{2+} (Gitan *et al.*, 2003). O gene *SMF1* codifica para uma proteína de membrana plasmática descrita originalmente como um transportador de alta afinidade para Mn^{2+} , mas que também contribui para a importação de Cu^{2+} e Cd^{2+} (Liu *et al.*, 1997). A captação de Cd^{2+} em leveduras também pode ser mediada pela proteína Fet4, a qual se caracteriza como um importador de ferro de baixa afinidade (Dix *et al.*, 1994; Jensen & Culotta, 2002).

Dentro das células a interação do Cd^{2+} com macromoléculas e rotas bioquímicas é bastante complexa e é provável que sua toxicidade provenha da soma de efeitos pleiotrópicos. Com base nos conhecimentos atuais, é possível estabelecer três linhas

principais relacionadas aos efeitos nocivos deste metal: (i) a indução de estresse oxidativo; (ii) a interferência com as vias de sinalização intracelular e (iii) a interferência com os mecanismos de reparação de DNA (Beyersmann & Hartwig, 2008).

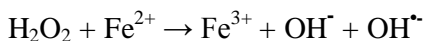
4.1. Geração de estresse oxidativo

Em condições fisiológicas, o Cd^{2+} não participa de reações de oxidorredução. Entretanto, diversos estudos demonstram que seus efeitos tóxicos e carcinogênicos podem ser provenientes da geração de estresse oxidativo. O tratamento com Cd^{2+} aumenta os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO), peroxidação lipídica, proteínas carboniladas e bases oxidadas no DNA (Stohs & Bagchi, 1995; Wätjen & Beyersmann, 2004; Nzungue *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo gerado pelo Cd^{2+} parece ser um efeito secundário de sua interação com moléculas biológicas. Por exemplo, sabe-se que enzimas antioxidantes como a glutatona redutase, a catalase e as superóxido dismutases são inibidas por íons Cd^{2+} (Serafini *et al.*, 1989; Balestrasse *et al.*, 2005; Tandoğan & Ulusu, 2007). A inibição da catalase parece envolver a ligação do Cd^{2+} ao anel imidazólico da enzima, o que impede a decomposição de H_2O_2 (Casalino *et al.*, 2002). A inibição da superóxido dismutase 1 (SOD1) possivelmente resulta da substituição de íons Mn^{2+} por Cd^{2+} , enquanto que a inibição da superóxido dismutase 2 (SOD2) provém de alterações topológicas na estrutura da enzima produzidas por sua ligação com Cd^{2+} (Casalino *et al.*, 2002). No caso da glutatona redutase, estudos cinéticos mostram que o Cd^{2+} pode agir tanto como inibidor competitivo para o substrato GSSG, quanto como inibidor não-competitivo para o substrato NADPH (Serafini *et al.*, 1989). Adicionalmente, os íons Cd^{2+} têm grande afinidade química pela glutatona (GSH; γ -Glu-Cys-Gly), um tripeptídeo que participa de

uma série de processos biológicos, incluindo a manutenção do equilíbrio redox e a resistência antioxidante. A conjugação de íons Cd^{2+} com GSH pode reduzir a disponibilidade intracelular desta molécula e, conseqüentemente, gerar estresse oxidativo (Almazan *et al.* 2000; Wolf & Baynes, 2007).

Outra característica relevante do Cd^{2+} é que ele pode substituir o ferro na estrutura de proteínas como a ferritina (Price & Joshi, 1983). O resultado dessa substituição é o aumento do conteúdo intracelular de íons Fe^{2+} no estado livre, os quais podem reagir com H_2O_2 pela reação de Fenton produzindo radical hidroxila (OH^{\bullet}), conforme mostrado abaixo:



As moléculas de OH^{\bullet} são altamente reativas e atuam prontamente na oxidação de biomoléculas como proteínas e lipídios de membrana (Valko *et al.*, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

A relação entre a toxicidade do Cd^{2+} e a geração de estresse oxidativo também é comprovada por estudos genéticos realizados em células de *S. cerevisiae*. Linhagens de levedura mutantes para genes que codificam proteínas de defesa antioxidante como as superóxido dismutases 1 e 2 (*SOD1* e *SOD2*), a tiorredoxina redutase 1 (*TRR1*), a glutatona redutase (*GLR1*) e as tiorredoxinas (*TRX1*, *TRX2* e *TRX3*) apresentam aumento de sensibilidade ao Cd^{2+} (Tamás *et al.*, 2005).

4.2. Interferência com as vias de sinalização intracelular e expressão gênica

A manutenção e a sobrevivência dos organismos vivos dependem da adequada coordenação de processos vitais como o crescimento, a proliferação celular e a defesa contra agentes estressores. Essa coordenação é mediada por mensageiros químicos, ou seja, moléculas que em resposta a estímulos intra ou extracelulares são capazes de modular a

atividade de vias bioquímicas por sinalizarem para a modificação pós-traducional de proteínas (em geral fosforilação) e/ou alteração da expressão de determinados genes. Os íons Ca^{2+} , as ERO e o AMP cíclico são exemplos de mensageiros intracelulares (Nelson & Cox, 2000; Halliwell & Gutteridge, 2007).

O tratamento com Cd^{2+} , em geral, altera as concentrações intracelulares de Ca^{2+} e isso pode influenciar a expressão de genes que apresentam, em suas regiões promotoras, elementos de resposta a Ca^{2+} , tal como o CREB (*cAMP-response binding protein*) (Takeda *et al.*, 2007). Além disso, os íons de Cd^{2+} podem mimetizar os íons Ca^{2+} na ligação a calmodulina, resultando na ativação de genes dependentes desta proteína (Chao *et al.*, 1984; Liu & Templeton, 2007).

O Cd^{2+} também pode interferir com a expressão gênica por meio da alteração do equilíbrio redox intracelular. O fator de transcrição AP1 (*Activator Protein 1*) regula a expressão de diversos genes de resposta a estresse por um mecanismo que é sensível ao padrão redox da célula. A proteína AP1 é um heterodímero formado pelo produto dos proto-oncogenes *c-jun* e *c-fos* (Halliwell & Gutteridge, 2007). Em células de mamíferos, esses dois genes apresentam aumento de expressão em resposta a Cd^{2+} e esse aumento pode ser mediado por alterações nos níveis de ERO (Wang & Templeton, 1998; Achanzar *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2000).

A atividade de uma série de proteínas e enzimas pode ser regulada pelo seu padrão de fosforilação. Nesse sentido, o controle adequado de cinases e fosfatases é fundamental para a regulação das vias de sinalização intracelular. O Cd^{2+} é conhecido por induzir cinases como a proteína cinase C, tirosina cinase e as MAPKs cinases (*Mitogen activated protein kinase*) ERK (*Extracellular signal-activated kinase*), JNK (*Jun N-terminal kinase*) e p38 (Beyersmann *et al.*, 1994; Larochelle *et al.*, 2001; Saydam *et al.*, 2002). As três

últimas estão envolvidas com o controle da proliferação e diferenciação celular (Waisberg *et al.*, 2003).

Os estudos recentes têm sugerido que o Cd^{2+} pode ter efeitos epigenéticos sobre a expressão gênica. A metilação do DNA é uma estratégia celular para a redução global da expressão gênica e a hipometilação está associada com a superexpressão de genes indutores de carcinogênese (Hoffmann *et al.*, 2005). Huang e colaboradores demonstraram que a proliferação celular induzida por baixas concentrações de Cd^{2+} pode ser correlacionada com o nível de hipometilação global do DNA. Esses resultados apontam para um novo mecanismo molecular relacionado aos efeitos carcinogênicos do Cd^{2+} (Huang *et al.*, 2008).

4.3. Interferência com os sistemas de reparação de DNA

Os sistemas de reparação de DNA são as principais linhas de defesa contra os danos causados por agentes ambientais ou pelo próprio metabolismo celular. O Cd^{2+} interfere com, pelo menos, três vias de reparação distintas, a saber: reparação por excisão de bases (BER – *base excision repair*), reparação por excisão de nucleotídeos (NER – *nucleotide excision repair*) e reparação de erros no emparelhamento de bases (MMR – *mismatch repair*) (Giaginis *et al.*, 2006). A via BER corrige pequenos danos gerados por oxidação, alquilação ou desaminação. O tratamento com Cd^{2+} diminui a eficiência de reparação de bases oxidadas do tipo 8-hidroxiguanina e inibe a atividade de proteínas dos passos iniciais do BER, tais como as glicosilases FpgI de procariotos e OGG1 de eucariotos (Potts *et al.*, 2001; Potts *et al.*, 2003). No caso da FpgI, Dally e Hartwig (1997) sugeriram que mecanismo de inibição pode envolver a substituição de Zn^{2+} por Cd^{2+} em domínios de

de zinco. A inibição da OGG1 pode ocorrer pela ligação de Cd^{2+} em sítios de ligação para Ca^{2+} ou nos resíduos Cys-253 e His-270 (Zharkov & Rosenquist, 2002).

A reparação por NER remove as lesões de DNA maiores, como os dímeros de pirimidina ou os 6-4 fotoprodutos gerados pela luz ultravioleta (UV), ou ainda danos induzidos por cisplatina e alguns hidrocarbonetos aromáticos carcinogênicos (Giaginis *et al.*, 2006). A presença de Cd^{2+} prejudica a interação de proteínas das fases iniciais do NER, tais como a XPA e a subunidade p44 do fator de transcrição TFHII, com suas seqüências de ligação no DNA de células de mamíferos (Asmuss *et al.*, 2000; Houben *et al.*, 2005). Essa interferência pode ser resultado da substituição de íons Zn^{2+} por íons Cd^{2+} em domínios “dedo de zinco” presentes nas referidas proteínas (Asmuss *et al.*, 2000; Houben *et al.*, 2005; Giaginis *et al.*, 2006).

O Cd^{2+} também interfere com a via MMR cuja finalidade é reparar inserções, deleções ou incorporação errônea de bases. Jin e colaboradores (2003) demonstraram que baixas doses de Cd^{2+} induzem hipermutabilidade em células de *S. cerevisiae* e que este efeito está relacionado com a inibição de MMR. Essa inibição ocorre por meio da inativação da atividade de ATPase do heterodímero Msh2p-Msh6p – o qual atua no reconhecimento precoce de erros de pareamento base-base e de inserções/deleções que levam a mudança no quadro de leitura do DNA (Banerjee & Flores-Rozas, 2005).

Recentemente, Serero e colaboradores (2008) demonstraram que em *S. cerevisiae* a inativação das proteínas Rad27 (*Radiation sensitive 27*) ou Dna2 (*DNA synthesis defective 2*) resulta em hipersensibilidade ao Cd^{2+} . A Rad27p é uma exonuclease 5'→3' que atua na reparação por excisão de bases e na maturação dos fragmentos de Okazaki durante a replicação. A Dna2p também atua no processamento destes fragmentos, apresentando domínios de atividade de helicase, nuclease dependente de ATP e ATPase dependente de

DNA. Os resultados deste trabalho sugerem que o processamento dos fragmentos de Okazaki durante a replicação do genoma também são alvo da toxicidade do Cd^{2+} (Serero *et. al*, 2008).

5. MECANISMOS DE DESINTOXICAÇÃO DE CÁDMIO

Os organismos vivos possuem diferentes estratégias para se proteger dos efeitos tóxicos do Cd^{2+} . Em procariotos, a principal estratégia de desintoxicação envolve a exportação do metal para o meio extracelular por proteínas de efluxo dependentes de ATP (Silver & Phung, 2005). Nos eucariotos a desintoxicação de íons Cd^{2+} ocorre, primariamente, por meio de sua conjugação com peptídeos ou proteínas ricas em grupamentos tiólicos como a GSH, as fitoquelatinas e as metalotioneínas.

A GSH (γ -Glu-Cys-Gly – Figura 1) está presente em praticamente todos os organismos de vida aeróbica e é necessária para o adequado funcionamento de diversos processos biológicos tais como manutenção do equilíbrio redox, proteção antioxidante, tamponamento intracelular, resistência a choque térmico e desintoxicação de xenobióticos (DeLeve & Kaplowitz, 1990; Wang & Ballaroti, 1998; Ballatori *et al.*, 2009). Esse tripeptídeo é sintetizado em duas reações sequenciais, sendo a primeira catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase e a segunda pela enzima glutathiona sintetase (Halliwell & Gutteridge, 2007). Em *S. cerevisiae*, a primeira enzima é codificada pelo gene *GSH1* e regulada pelos fatores de transcrição Yap1 (*Yeast AP-1*) e Skn7 (*Suppressor of kre null 7*), já a segunda é codificada pelo gene *GSH2* e parece ter expressão constitutiva (Penninckx, 2002). A GSH auxilia na desintoxicação do Cd^{2+} por se ligar aos íons Cd^{2+} formando complexos cádmio-bis(glutathionato) ($\text{Cd}-[\text{GS}]_2$) (Li *et al.*, 1997). Além de serem menos nocivos do que os íons Cd^{2+} livres, os complexos podem ser exportados para o ambiente

extracelular ou importados para o interior do vacúolo, como ocorre em *S. cerevisiae* (Li *et al.*, 1996; Nagy *et al.*, 2006).

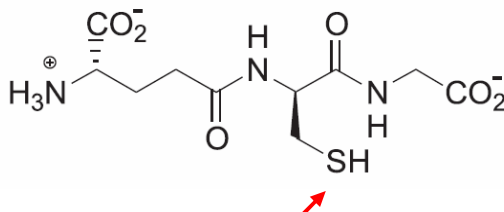


Figura 1. Estrutura da glutathiona (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina). O grupamento reativo da GSH é o tiol da cisteína (indicado pela seta), que atua como captador de espécies reativas de oxigênio e de metais pesados, principalmente íons cádmio. Adaptado de Huber & Almeida, 2008.

As fitoquelatinas (FQs – Figura 2) são polímeros $(\gamma\text{-Glu-Cys})_{2-11}\text{-Gly}$ sintetizados a partir de GSH pela ação da fitoquelatina sintase (FQS). Essa enzima catalisa a conversão de GSH em γ -glutamilcisteína (γ -EC) e glicina, seguida da transferência sequencial de unidades γ -EC para uma nova molécula de GSH ou para uma FQ n (fitoquelatina com n subunidades; Hirata *et al.*, 2005). A ativação da FQS depende da presença de íons metálicos como Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} e Pb^{2+} , sendo que os íons Cd^{2+} são os ativadores mais potentes (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). As FQs são encontradas em plantas, nematodos e na levedura *Schizosaccharomyces pombe*, mas não estão presentes em células de mamíferos ou em *S. cerevisiae* (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Hirata *et al.*, 2005). Assim como a GSH, as FQs formam complexos com íons Cd^{2+} , inativando-os e permitindo sua compartimentalização intracelular (Ortiz *et al.*, 1995; Vido *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 2005).

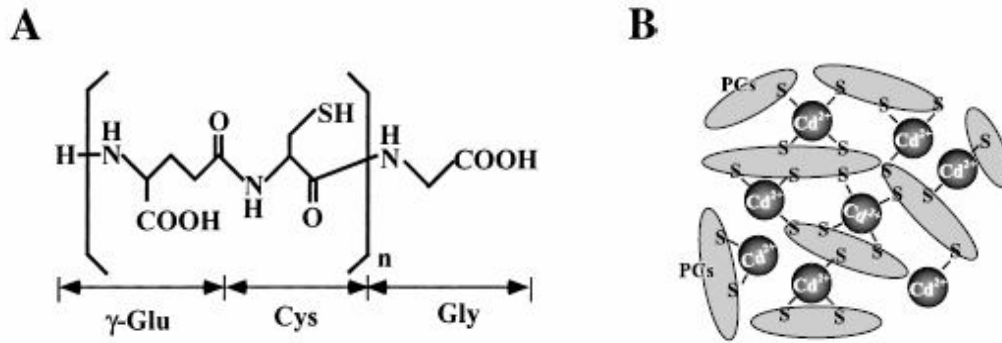


Figura 2. Estrutura das fitoquelatinas. (A) Estrutura primária e (B) Estrutura do complexo FQ-Cd²⁺. Fonte: Hirata *et al.*, 2005.

As metalotioneínas (MTs – Figura 3) são proteínas ligantes de metal que se caracterizam por apresentarem baixo peso molecular e por serem ricas em cisteína. Diferentemente da GSH e das FQs, as MTs são codificadas por genes e, portanto, sintetizadas a partir da tradução de seus respectivos RNA mensageiros nos ribossomos. Os genes codificadores de MTs foram identificados em procariotos, mamíferos, plantas e eucariotos unicelulares (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Em células de mamíferos, as MTs parecem exercer papel central na desintoxicação de Cd²⁺. Camundongos e linhagens de células de mamíferos que não expressam MTs são altamente sensíveis à toxicidade do Cd²⁺, enquanto que a superexpressão de MTs em células de camundongo confere resistência ao metal (Michalska *et al.*, 1993; Masters *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995). Por outro lado, em *S. cerevisiae* as MTs não têm uma participação relevante na desintoxicação de Cd²⁺. Neste organismo foram identificados dois genes que codificam para MTs: *CUP1* e *CRS5*. A deleção de *CRS5* resulta em aumento de sensibilidade ao cobre, mas não ao Cd²⁺ (Cullota *et al.*, 1994). Da mesma forma, os mutantes *cup1Δ* não apresentam aumento de sensibilidade a Cd²⁺ e o gene *CUP1* não é induzido em resposta ao tratamento com este metal (Vido *et al.*, 2001).

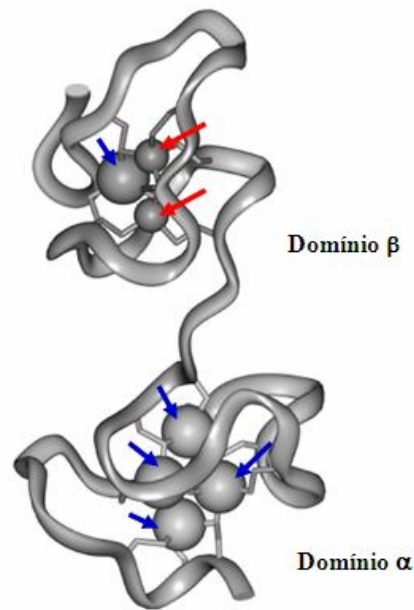


Figura 3. Estrutura tridimensional da metalotioneína. A imagem representa a estrutura cristalina de MT de fígado de ratos complexada com Zn (setas vermelhas) e Cd (setas azuis). Os resíduos 1 a 30 constituem o domínio β amino terminal e os resíduos 31 a 61 constituem o domínio α carboxi terminal. Os domínios α e β são unidos por um segmento conservado Lys-Lys e podem ligar, respectivamente, quatro e três átomos de zinco ou cádmio. Fonte: Romero-Isart &

5.1. Desintoxicação de cádmio em *S. cerevisiae*

Em *S. cerevisiae* a principal rota para a desintoxicação de Cd^{2+} envolve a conjugação de íons Cd^{2+} com GSH, formando complexos $\text{Cd}.\text{[GS]}_2$, os quais são transportados para o interior do vacúolo pela proteína Ycf1 (*Yeast cadmium factor 1*) (Li *et al.*, 1997).

A Ycf1 é uma proteína de membrana vacuolar pertencente à família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), subfamília ABCC/MRP de proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (*Multidrug resistance proteins*). Essa proteína catalisa o transporte de uma ampla variedade de substratos, incluindo substratos endógenos conjugados à GSH, complexos $\text{Cd-}[GS]_2$, glutationa dissulfeto (GSSG) e GSH livre (Li *et*

al., 1996, Li *et al.*, 1997; Chaudhuri *et al.*, 1997; Rebbeor *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2002). Além disso, é homóloga às proteínas humanas MRP1 (*Multidrug resistance associated protein 1*) e hCFTR (*human Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Szczyepka *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1996).

A estrutura da Ycf1p compreende a presença de dois domínios transmembrana (MSD1 e MSD2) e dois domínios citosólicos de ligação a nucleotídeos (NBD1 e NBD2), além de uma longa expansão N-terminal (NTE) que é característica dos membros da subfamília ABCC (Figura 4) (Paumi *et al.*, 2008). Nessa expansão existe um terceiro domínio transmembrana (MSD0) e ainda uma alça citosólica (L0) cuja deleção acarreta em perda de resistência ao Cd²⁺ (Mason & Michaelis, 2002).

A atividade da proteína Ycf1p pode ser regulada tanto ao nível de transcrição quanto por modificações pós-traducionais. Mutações que impedem a fosforilação dos resíduos Ser⁹⁰⁸ e Thr⁹¹¹ resultam em redução da capacidade de transporte de Ycf1p e aumento da sensibilidade ao Cd²⁺ (Eraso *et al.*, 2004). Por outro lado, o resíduo Ser²⁵¹ regula negativamente a atividade da proteína e, por consequência, é possível aumentar a resistência ao Cd²⁺ *in vivo* impedindo a fosforilação desse resíduo por mutação ou por deleção do gene *CKA* (*Casein kinase alpha subunit 1*) – que codifica a subunidade catalítica da serina/treonina cinase II (Paumi *et al.*, 2008). Em termos de transcrição, sabe-se que a expressão do gene *YCF1* em resposta ao Cd²⁺ é controlada pelo fator de transcrição Yap1p, que é homólogo ao AP1 de humanos. Em linhagens selvagens de *S. cerevisiae*, a superexpressão de *YAP1* ativa a região promotora do gene *YCF1* e confere resistência ao Cd²⁺. Essa resistência, entretanto, é perdida em mutantes *ycf1*Δ (Wemmie *et al.*, 1994).

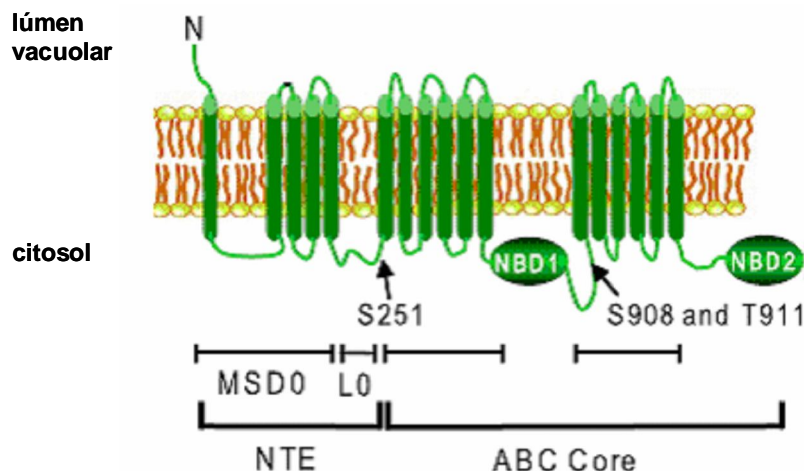


Figura 4. Estrutura da proteína Ycf1. Os domínios transmembrana (MSD1 e MSD2) e os domínios de ligação de nucleotídeos (NBD1 e NBD2) formam o núcleo ABC, presente em todas as proteínas da família ABC. A expansão N-terminal (NTE) é característica da subfamília ABCC/MRP e contém uma região transmembrana (MSD0) e uma alça citosólica (L0). A fosforilação dos resíduos S908 e T911 regula positivamente a atividade da proteína, enquanto que a fosforilação de S251 resulta em regulação negativa. Adaptado de Paumi *et al.*, 2008.

A compartimentalização de Cd^{2+} no vacúolo das células de *S. cerevisiae* também pode ser mediada pelos transportadores Bpt1p e Zrc1p. Assim como a Ycf1p, a proteína Bpt1 (*Bile pigment transporter 1*) é um transportador da família MRP localizado na membrana vacuolar e que pode transportar moléculas conjugadas a GSH ou glucoronato. Foi demonstrado que essa proteína contribui para a resistência ao Cd^{2+} em mutantes *ycf1* Δ (Sharma *et al.*, 2002). Entretanto, em linhagens selvagens a deleção isolada de *BPT1* não altera o fenótipo de sensibilidade ao metal, o que indica a contribuição de Bpt1p para a sua desintoxicação é pouco expressiva quando comparada com a contribuição da Ycf1p (Sharma *et al.*, 2002). A proteína vacuolar Zrc1 (*Zinc resistance conferring 1*) é membro da família CDF (*Cation diffusion facilitator*) e sua função original é estocagem de Zn^{2+} no

vacúolo. Entretanto, atua também como um supressor da toxicidade provocada por altas concentrações de Zn^{2+} ou por Cd^{2+} (Kaminozo *et al.*, 1989).

Outra estratégia utilizada por células de *S. cerevisiae* para conter a toxicidade do Cd^{2+} é baseada no efluxo do metal para o ambiente extracelular. Existem, pelo menos, três proteínas de membrana celular que podem auxiliar na desintoxicação de Cd^{2+} , são elas: Pca1p, Alr1p e Yor1p. A proteína Pca1 (*P-type cation-transporting ATPase*) foi a primeira a ser caracterizada como uma bomba de efluxo específica para Cd^{2+} em células eucarióticas. Essa proteína é regulada por um mecanismo pós-traducional que envolve seu rápido deslocamento para a membrana plasmática em resposta ao Cd^{2+} (Adele *et al.*, 2007). Os íons Cd^{2+} estabilizam a estrutura da proteína impedindo que ela seja marcada para degradação pela ligação da molécula de ubiquitina. Na ausência do metal, a Pca1p sofre ubiquitinação e é degradada no proteossoma antes de atingir a membrana plasmática. Esta regulação, mediada pelo próprio substrato, permite uma resposta celular rápida e eficiente para a desintoxicação de Cd^{2+} (Adele & Lee, 2008).

O gene *ALR1* (*Aluminum resistance 1*) codifica um transportador de membrana associado com a homeostase de Mg^{2+} . A deleção deste gene aumenta a sensibilidade ao Cd^{2+} e favorece seu acúmulo em células de levedura (Kern *et al.*, 2005). O transportador Yor1p (*Yeast oligomycin resistance 1*) é um membro da família ABC que difere da Ycf1p por não apresentar a expansão transmembrana na região N-terminal e por ficar localizado na membrana plasmática. A superexpressão de *YOR1* em mutantes *ycf1Δ* restaura o fenótipo selvagem de tolerância ao Cd^{2+} e diminui o acúmulo intracelular do metal. Entretanto, esses efeitos são observáveis apenas em células cultivadas em baixas temperaturas (Nagy *et al.*, 2006).

Embora a desintoxicação de Cd^{2+} possa ser associada ao funcionamento de proteínas individuais, as análises de fenótipo e de expressão gênica em larga escala apontam para alterações mais globais no metabolismo intracelular de *S. cerevisiae* em resposta à presença desse metal. Sob esta perspectiva, as proteínas associadas ao tráfego intracelular de vesículas emergem como um novo grupo que responde ao estresse induzido por Cd^{2+} e outros metais (Ruotolo *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008). Recentemente foram identificadas aproximadamente 40 proteínas que participam do processo de transporte vesicular em *S. cerevisiae* cuja deleção aumenta a sensibilidade a Cd^{2+} (Ruotolo *et al.*, 2008; Anexo I). A maioria destas proteínas atua em uma das vias de transporte associadas ao tráfego de vesículas do complexo de Golgi ou do complexo pré-vacuolar – um corpo multivesicular que recebe vesículas endossomais e do Golgi, e as direciona para o vacúolo ou de volta ao Golgi (Bowers & Stevens, 2005). Acredita-se que a regulação do transporte vesicular pode afetar a tolerância a metais por pelo menos três mecanismos distintos: (i) diminuindo o nível de transportadores de membrana que permitem o influxo de metais por meio de sua endocitose; (ii) enviando para a membrana plasmática maior número de proteínas que permitem efluxo de metais e (iii) direcionando para o vacúolo as proteínas necessárias para seu funcionamento adequado nos processos de desintoxicação celular (Ruotolo *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008).

6. CÁLCIO NO CONTEXTO BIOLÓGICO

O cálcio (Ca^{2+}), elemento essencial para os organismos vivos, participa de uma ampla variedade de processos biológicos, incluindo morfogênese, neurotransmissão, contração muscular, adesão, proliferação e morte celular (Dunican & Doherty, 2000; Maeda *et al.*, 2007; Rimessi *et al.*, 2008; Verkhratsky *et al.*, 2009). Nos vertebrados, o Ca^{2+} também é um componente crítico da matriz extracelular do tecido ósseo e do tecido

cartilagenoso (Arana-Chavez & Bradaschia-Correa, 2009). Adicionalmente, o Ca^{2+} se destaca como um mensageiro intracelular universal, papel que assumiu graças a sua abundância na crosta terrestre e a suas características químicas favoráveis (Schaub & Heizman, 2008). Íons divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} formam complexos mais estáveis e específicos com compostos orgânicos do que íons monovalentes como Na^+ e K^+ . Em relação aos íons Mg^{2+} , os íons Ca^{2+} têm uma configuração eletrônica que permite maior flexibilidade na coordenação com proteínas ligantes (Schaub & Heizman, 2008).

6.1. Aspectos gerais da homeostase de cálcio em células eucarióticas

A ligação do Ca^{2+} com pirofosfato ou fosfato inorgânico provenientes da quebra de ATP resulta na formação de sais insolúveis, o que limita sua solubilidade no citosol (Schaub & Heizman, 2008). Essa baixa solubilidade obriga as células a eliminarem Ca^{2+} para o meio extracelular ou a armazená-lo em compartimentos específicos como o retículo endoplasmático (RE) das células eucarióticas. Dentro do RE, a estocagem de Ca^{2+} é facilitada pela presença de proteínas tamponantes como as calsequestrinas. Uma única molécula de calsequestrina pode se ligar com até 40 moléculas de Ca^{2+} (Beard *et al.*, 2008; Schaub & Heizman, 2008). O resultado é que o nível citosólico de Ca^{2+} normalmente fica em torno de 10^{-7}M , enquanto que o nível armazenado no RE, bem como o observado no fluído extracelular de mamíferos, pode atingir concentrações de até 10^{-2}M (Alberts *et al.*, 2004; Schaub & Heizman, 2008).

Desta forma, quando um estímulo transiente induz a abertura de um canal de Ca^{2+} da membrana plasmática ou do RE, a concentração de Ca^{2+} no citoplasma pode aumentar de 10 a 20 vezes muito rapidamente. Este aumento é um sinal intracelular (sinal de Ca^{2+}) que culmina com a ativação de uma série de proteínas responsivas ao Ca^{2+} , as quais podem

redirecionar o funcionamento de processos intracelulares até que o estímulo cesse e a concentração citoplasmática do metal retorne para os níveis basais (Alberts *et al.*, 2004).

A geração de sinais de Ca^{2+} depende, portanto, da captação do metal a partir do meio extracelular ou de sua mobilização a partir de estoques intracelulares (por exemplo, RE). A entrada de Ca^{2+} através da membrana plasmática pode ser mediada por canais que respondem a alterações no potencial de membrana (VGCCs, *voltage-gated Ca^{2+} channels*) ou por canais que funcionam como receptores e que se abrem em resposta a estímulos do meio extracelular (TRPCs, *transient receptor potential channels*) (Nowycky & Thomas, 2002). Adicionalmente, o Ca^{2+} extracelular pode ser captado em resposta a reduções significativas no conteúdo de Ca^{2+} estocado no RE. Este mecanismo é chamado de entrada capacitativa de Ca^{2+} (CCE, *capacitative calcium entry*) e, embora não se conheçam os detalhes de sua operação, acredita-se que nos eucariotos superiores ela seja mediada por canais iônicos da família dos TRPCs (Nowycky & Thomas, 2002).

Na membrana do RE existem dois grupos bem caracterizados de canais que contribuem para a mobilização do Ca^{2+} : os receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) e os receptores rianodina (RyR), que recebem este nome por serem sensíveis a rianodina, um alcalóide de origem vegetal (Berridge *et al.*, 2000; Nowycky & Thomas, 2002). A via que leva à abertura dos canais de IP3 é um exemplo clássico da sinalização mediada por Ca^{2+} . Nesta via, os sinais são recebidos por receptores de membrana acoplados a proteína G. A ativação do receptor estimula a ativação da proteína G que, por sua vez, estimula uma enzima da família das fosfolipases de membrana a produzir IP3 e 1,2-diacilglicerol (DAG) pela hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2). O IP3 se difunde até o RE e promove a abertura dos receptores IP3. O Ca^{2+} liberado a partir destes receptores pode

ativar uma série de proteínas reguladoras, incluindo a proteína cinase C (dependente de DAG e Ca^{2+}) e a calmodulina (Nelson & Cox, 2000; Berridge, 2008).

A calmodulina é uma proteína pequena, que possui quatro sítios de ligação para Ca^{2+} e que é altamente conservada. Nas células eucarióticas, esta proteína é o principal alvo dos sinais de Ca^{2+} e é também essencial para a sobrevivência (Kahl & Means, 2003; Yamniuk & Vogel, 2004). Quando a calmodulina é ativada pela ligação de pelo menos dois íons Ca^{2+} , sua estrutura sofre modificações conformacionais que permitem que ela se ligue em diferentes proteínas alvo e module suas atividades. Existem mais de uma centena de proteínas que possuem sítios de ligação para calmodulina, incluindo a calcinerina serina/treonina fosfatase e uma família multifuncional de cinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (Yamniuk & Vogel, 2004).

Quando o estímulo que gerou um sinal de Ca^{2+} cessa, as células precisam restabelecer a concentração basal do metal no citoplasma. Este processo depende do bombeamento ativo de íons Ca^{2+} para o lúmen de organelas ou para o meio extracelular. Nos eucariotos superiores, a captação de Ca^{2+} pelo RE é mediada por Ca^{2+} -ATPases da família SERCA [*sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pumps*], enquanto que o bombeamento do metal para o meio extracelular é feito pelos transportadores PMCA (*plasma membrane Ca^{2+} -ATPases*). Essas duas famílias de proteínas são compostas por ATPases cuja atividade de transporte depende de autofosforilação durante o ciclo catalítico (*P-type ATPases*) (Carafoli & Brini, 2000; Wuytack *et al.*, 2002).

A retirada de Ca^{2+} do citosol pode ocorrer ainda pelo bombeamento do metal para o complexo de Golgi, onde são expressos transportadores SERCA e SPCA (*secretory-pathway Ca^{2+} ATPases*). Os membros da família SPCA também são ATPases dependentes de autofosforilação. Entretanto, diferem dos transportadores SERCA por se localizarem

exclusivamente nos compartimentos finais do Golgi e por transportarem apenas uma molécula de Ca^{2+} ou Mn^{2+} a cada ciclo catalítico (proteínas SERCA transportam duas moléculas de Ca^{2+} por ciclo e não tem afinidade por Mn^{2+}) (Missiaen *et al.*, 2007). Cabe aqui ressaltar que o Ca^{2+} retido no RE e complexo de Golgi não apenas participa da sinalização intracelular, mas também é fundamental para processos de modificação pós-traducional e tráfego de proteínas ao longo da via secretória (Missiaen *et al.*, 2007). Além disso, o próprio Ca^{2+} pode ser concentrado e enviado para o fluido extracelular por vesículas secretórias. Por exemplo, a secreção de leite pelas glândulas mamárias envolve a produção de vesículas contendo caseína, lactose e Ca^{2+} em concentrações superiores a 10^{-2} M (Neville & Peaker, 1979; Wuytack *et al.*, 2003).

A mitocôndria é outra organela que participa do controle de distribuição interna de Ca^{2+} . O gradiente eletroquímico gerado pela cadeia transportadora de elétrons pode impulsionar a captação de Ca^{2+} por um sistema uniporte de baixa afinidade. Devido a essa baixa afinidade, a entrada de Ca^{2+} é mais eficiente quando a mitocôndria está próxima dos canais que liberam o metal (canais do RE). Uma vez que o nível basal de Ca^{2+} tenha sido restabelecido, a mitocôndria pode exportar para o citoplasma os íons Ca^{2+} que armazenou. Este processo é mediado por um antiporte Na^+/Ca^+ e, em condições específicas, pelo poro de transição de permeabilidade (PTP) (Berridge *et al.*, 2000; Leung & Halestrap, 2008).

Neste contexto de alternância entre captação e liberação, a mitocôndria contribui para modular a amplitude e a resposta espaço temporal dos sinais de Ca^{2+} (Berridge *et al.*, 2000). Por exemplo, em células de mamíferos as alterações no padrão de distribuição interna de Ca^{2+} estão associadas com a sinalização de morte celular programada. Em particular, a redistribuição de Ca^{2+} do retículo endoplasmático para a mitocôndria, gerando oscilações controladas nos níveis de Ca^{2+} , é um evento essencial para a que as células

sejam direcionadas para viver ou para morrer em resposta a determinados estímulos (Rong & Distelhorst, 2008).

6.2. Proteínas associadas à homeostase de cálcio em *S. cerevisiae*

Nos eucariotos superiores, as famílias de proteínas que controlam a homeostase de Ca^{2+} são compostas por diversos membros e isoformas tecido-específicas. Em *S. cerevisiae*, entretanto, a captação e a distribuição intracelular deste metal são reguladas por um pequeno grupo de proteínas (Bonilla & Cunningham, 2002). Um modelo de funcionamento integrado destas proteínas é apresentado na figura 5.

Na membrana plasmática das células de levedura, a entrada de Ca^{2+} é mediada pelo produto dos genes *CCH1* (*Calcium channel 1*) e *MID1* (*Mating pheromone-induced death 1*). A proteína Cch1 é um canal de Ca^{2+} de alta afinidade, homóloga à subunidade catalítica presente nos canais VGCCs de eucariotos superiores (Paidhungat & Garret, 1997; Ida *et al.*, 2007). Mid1 é uma proteína integral que se localiza com Cch1p na membrana plasmática, mas que também é expressa na membrana do RE (Locke *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2004). Estas duas proteínas trabalham em conjunto formando um sistema de captação de Ca^{2+} de alta afinidade, onde a Mid1p parece ter função regulatória sobre a Cch1p. Ambas as proteínas são importantes na regulação de alguns processos dependentes de sinais de Ca^{2+} , tais como indução de acasalamento, tolerância ao excesso de ferro, tolerância ao frio e resposta ao estresse alcalino (Paidhungat & Garret, 1997; Fischer *et al.*; 1997; Viladevall *et al.*, 2004; Peiter *et al.*; 2005).

Além do sistema de alta afinidade formado por Cch1p/Mid1p, um sistema de captação de baixa afinidade parece contribuir para a entrada de Ca^{2+} nas células de levedura durante a fusão celular do acasalamento. Este sistema ainda não está bem

caracterizado, mas existem evidências de que um de seus constituintes seja a proteína integral de membrana Fig1 (*Factor-induced gene 1*). Os mutantes *fig1Δ* são deficientes no passo de fusão célula-célula durante o acasalamento e esta deficiência pode ser suprimida pela presença de altas concentrações de Ca^{2+} (Erdman *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 2003).

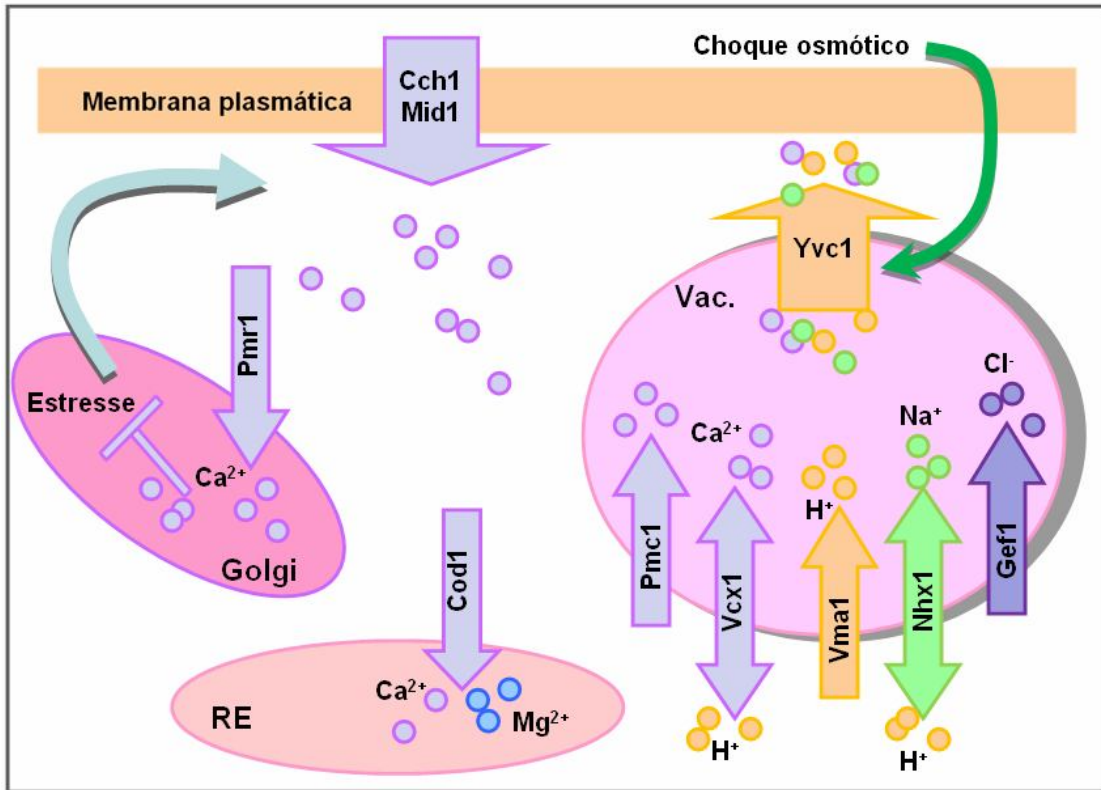


Figura 5. Homeostase de cálcio em células de *S. cerevisiae*. Um canal tipo VGCC (representado por Mid1p) promove o influxo de Ca^{2+} em resposta ao estresse provocado pela diminuição dos estoques de cálcio no complexo de Golgi e RE. O cálcio citosólico é bombeado para o complexo de Golgi pela Pmr1p (da família SPCA) e, possivelmente, para o RE pela Cod1p – a qual também pode transportar Mg^{2+} . A entrada de cálcio no vacúolo é mediada por Pmc1p (da família PMCA) e pelo trocador de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Vcx1p). O modelo também inclui a bomba de H^+ Vma1p que provê força próton motriz para concentrar Na^+ pelo trocador H^+/Na^+ (Nhx1) e Cl^- por um canal sensível a voltagem (Gef1p). A proteína Yvc1 (homóloga aos TRPCs de mamíferos) libera Ca^{2+} e possivelmente Na^+ e Cl^- em resposta ao choque osmótico, gerando um sinal de cálcio. RE: Reticulo endoplasmático; Golgi: complexo de Golgi; Vac: vacúolo. Adaptado de Bonilla & Cunningham, 2002.

Em leveduras, a estocagem de Ca^{2+} e o controle da sua distribuição intracelular são funções atribuídas principalmente ao vacúolo e não ao RE. De fato, a proteína Cod1/Spf1 (*Sensitivity to Pichia farinosa killer toxin 1*) é a única ATPase transportadora de Ca^{2+} presente no RE das células de *S. cerevisiae*, sendo necessária tanto para a manutenção da homeostase de Ca^{2+} quanto para o funcionamento adequado da organela. A interrupção do gene *COD1* provoca o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} e o aumento da transcrição de genes regulados pelo metal, além de ativar constitutivamente a via de resposta a proteínas mal enoveladas (Cronin *et al.*, 2002). Entretanto, um estudo realizado por Cronin e colaboradores (2002) indica que o substrato preferencial da Cod1p pode ser Mg^{2+} e não Ca^{2+} , sugerindo que a participação desta proteína na homeostase de Ca^{2+} pode ser indireta (Cronin *et al.*, 2002).

O vacúolo das células de *S. cerevisiae* controla a homeostase de Ca^{2+} por meio da atuação de três transportadores: Yvc1p, Vcx1p e Pmc1p. O gene *YVC1* (*Yeast vacuolar conductance 1*) codifica um canal iônico homólogo aos TRPCs de eucariotos superiores e que atua na liberação de Ca^{2+} para o citosol em resposta ao estresse osmótico (Palmer *et al.*, 2001; Denis & Cyert, 2002). A abertura de Yvc1p pode ser induzida por alterações mecânicas e possivelmente por alterações no potencial de membrana e no próprio nível de Ca^{2+} (Palmer *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003).

A proteína Vcx1 (*Vacuolar $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 1*) é um trocador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ que se caracteriza como um sistema de alta capacidade e baixa afinidade para entrada de Ca^{2+} no vacúolo, o qual participa da restauração dos níveis basais de Ca^{2+} após sua elevação abrupta no citosol (Miseta *et al.*, 1999). Em 2002, Denis e Cyert demonstraram pela primeira vez que as células de *S. cerevisiae*, assim como as de eucariotos superiores, podem gerar sinais de Ca^{2+} pela mobilização do metal a partir de um estoque interno. No

mesmo trabalho foi observado que a sinalização de resposta a estresse osmótico compreende a abertura de Yvc1p gerando um aumento transiente na concentração de Ca^{2+} no citosol com subsequente restauração dos níveis basais devido à atividade primária de Vcx1 (Denis & Cyert, 2002).

O gene *PMCI* (*Plasma membrane calcium 1*) codifica uma ATPase que transporta Ca^{2+} com alta afinidade do citoplasma para o vacúolo e cuja seqüência primária de aminoácidos possui 40% de identidade com diferentes isoformas de transportadores da família PMCA de mamíferos (Cunningham & Fink, 1994). A proteína Pmc1 atua na manutenção da homeostase de Ca^{2+} , mas não é essencial para a sobrevivência das células de *S. cerevisiae* em condições normais de cultivo. Entretanto, na ausência de Pmc1p as células tornam-se mais sensíveis à presença de concentrações elevadas de Ca^{2+} e diminuem a concentração do metal estocada dentro do vacúolo (Cunningham & Fink, 1994).

Além da Cod1p (na membrana do RE) e da Pmc1p (vacuolar), as células de *S. cerevisiae* possuem uma ATPase localizada na membrana do complexo de Golgi, a Pmr1p, que é a principal bomba de Ca^{2+} neste organismo (Marchi *et al.*, 1999). A proteína Pmr1 (*Plasma membrane ATPase related 1*) faz parte da família SPCA e é ortóloga da SPCA1 humana (Rudolph *et al.*, 1989; Missiaen *et al.*, 2007). As mutações no gene SPCA1/ATP2C1 estão associadas ao desenvolvimento da doença de Hailey-Hailey, caracterizada por erupções e descamações recorrentes na pele (Kellermayer, 2005).

A Pmr1p catalisa a importação de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} para o interior do complexo de Golgi, onde são necessários para o adequado processamento e tráfego de proteínas ao longo da via secretória (Rudolph *et al.*, 1989; Dürr *et al.*, 1998). Na ausência desta proteína, as células não conseguem manter os níveis adequados de Ca^{2+} nos compartimentos da via secretória e, como consequência, aumentam a captação do metal a

partir do meio extracelular e passam a acumular mais Ca^{2+} no citoplasma. Este processo é similar ao mecanismo de entrada capacitativa de Ca^{2+} que ocorre nas células de mamíferos e é dependente da atividade do sistema de transporte Cch1p/Mid1p (Csutora *et al.*, 1999; Locke *et al.*, 2000).

Outra função da Pmr1p é auxiliar na desintoxicação de manganês quando este se encontra em altas concentrações no citoplasma. Neste processo, a Pmr1p promove a captação de manganês para o complexo de Golgi e sua consequente eliminação para o meio extracelular por meio de vesículas secretórias (Culotta *et al.*, 2005). Adicionalmente, a Pmr1p também contribui para a tolerância ao Cd^{2+} por um mecanismo possivelmente análogo ao que opera na desintoxicação de manganês. A interrupção do gene *PMR1* provoca um aumento pronunciado na sensibilidade ao Cd^{2+} e favorece o acúmulo deste metal nas células de leveduras (Lauer Júnior *et al.*, 2008).

Em *S. cerevisiae* os transportadores de Ca^{2+} são controlados primariamente pela via sinalizada por calmodulina-calcinerina. A Vcx1p é regulada negativamente por calcinerina por um mecanismo pós-traducional. Já a expressão de *PMR1* e *PMCI* é regulada positivamente pela calcinerina por meio da ativação do fator de transcrição Crz1p/Tnz1p (Cunningham & Fink, 1994; Cunningham & Fink, 1996; Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos & Cyert; 1997). A calcinerina também pode influenciar a atividade do complexo Cch1p/Mid1p durante a sinalização de acasalamento. Neste caso, a fosfatase é necessária para promover a inibição da captação de Ca^{2+} por este complexo, por um sistema de retroalimentação (Muller *et al.*, 2003).

7. INFLUÊNCIA DO CÁDMIO SOBRE AS FUNÇÕES BIOLÓGICAS DO CÁLCIO

Em solução aquosa os átomos de Cd^{2+} assumem a forma de cátions divalentes com raio iônico muito similar ao observado nos íons Ca^{2+} (0,97 Å para o Cd^{2+} contra 0,99 Å para o Ca^{2+}). Esta semelhança explica a afinidade dos íons Cd^{2+} por uma série de proteínas com domínios de ligação para Ca^{2+} . De fato, o Cd^{2+} interfere com o funcionamento de diversos processos biológicos dependentes de Ca^{2+} e esta interferência pode ser uma de suas linhas de toxicidade.

O Cd^{2+} pode, por exemplo, se ligar à troponina C (TnC), que tem participação fundamental no processo de contração muscular. A ligação dos íons Cd^{2+} com a TnC ocorre de maneira cooperativa, provocando alterações conformacionais que são similares àquelas induzidas pelo Ca^{2+} (Drakenberg *et al.*, 1987; Chao *et al.*, 1990). Da mesma forma, os íons Cd^{2+} podem se ligar a todos os sítios de Ca^{2+} presentes na CaM e promover a expressão de genes dependentes desta proteína (Chao *et al.*, 1984; Akiyama *et al.*, 1990; Liu & Templeton, 2007).

Em células do epitélio renal, o Cd^{2+} substitui o Ca^{2+} nas E-caderinas, prejudicando a adesão célula-célula. As caderinas são moléculas de adesão dependentes de Ca^{2+} . Na presença deste metal, as células adjacentes expressando o mesmo tipo de caderina formam pontos de contato estáveis entre si, por um processo conhecido como adesão homotípica. Na presença de Cd^{2+} a união intercelular promovida pelas E-caderinas não é efetiva e por consequência a proliferação celular fica comprometida (Prozialeck *et al.*, 2003; Pokutta & Weis, 2007; Beyersmann & Hartwig, 2008).

A deposição de Cd^{2+} em células ósseas interfere com a calcificação, descalcificação e a remodelamento do tecido ósseo, provocando osteodistrofias no sistema esquelético (Goyer, 1997; Kazantzis, 2004). Já no sistema nervoso central, o Cd^{2+} pode competir com

Ca^{2+} e prejudicar o desenvolvimento cognitivo (Goyer, 1997). Em células de túbulos renais de ratos, a exposição ao Cd^{2+} resulta na inibição da atividade de ATPases de Ca^{2+} o que, provavelmente, é um efeito secundário resultante da perda do potencial de membrana mitocondrial e aumento na produção de ROS (Wang *et al.*, 2009).

O tratamento com Cd^{2+} provoca alterações na homeostase interna de Ca^{2+} nas células de mamíferos. Em especial, uma série de trabalhos tem associado o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} com a sinalização para a apoptose induzida por Cd^{2+} . Liu e colaboradores (2007) demonstraram que o Cd^{2+} aumenta o conteúdo de Ca^{2+} em células de carcinoma da tireóide por alterar o potencial da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, promover a liberação de citocromo C e AIF (*Apoptosis-inducing factor*), fatores mitocondriais pró-apoptóticos.

Nas células de túbulos renais de ratos o Cd^{2+} pode induzir apoptose por duas vias distintas: uma dependente e outra independente da ativação de caspases (proteases de cisteína associadas classicamente ao processo de apoptose). O mecanismo independente de caspases é ativado precocemente e é mediado pela calpaína, que é uma protease induzida por Ca^{2+} . Supõe-se que o Cd^{2+} pode ativar a calpaína diretamente por sua ligação à molécula ou indiretamente por provocar o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} (Lee *et al.*, 2006).

Em fibroblastos de hamster, o Cd^{2+} diminui o conteúdo de Ca^{2+} estocado no RE, como resultado primário da inibição de SERCA ATPases. Esse processo pode ser correlacionado com alterações morfológicas do RE e mitocôndria, com a ativação da via de resposta a proteínas mal enoveladas e com a ativação da caspase 12, que atua na resposta apoptótica do RE. Portanto, tanto as alterações na concentração de Ca^{2+} intracelular quanto o estresse do RE parecem estar envolvidos com a sinalização de apoptose após o

tratamento com Cd^{2+} (Biagioli *et al.*, 2008). Em hepatócitos de camundongos, a presença de Cd^{2+} eleva o nível de Ca^{2+} intracelular devido ao aumento da captação de íons Ca^{2+} do meio externo e subsequente liberação desses íons a partir de estoques intracelulares (Wang *et al.*, 2007).

8. METABOLISMO ENERGÉTICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM *S. cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* é um ótimo modelo para o estudo de fenômenos biológicos em células eucarióticas, uma vez que sua manipulação é relativamente simples e que muitos mecanismos genéticos e bioquímicos observados neste organismo são similares aos observados nos eucariotos superiores (Mustacchi *et al.*, 2006). Esta foi a primeira espécie eucariótica que teve o genoma completamente sequenciado. Foram identificados aproximadamente 6.000 genes, diversos deles codificando proteínas que tem homólogos estruturais e/ ou funcionais na espécie humana (Sturgeon *et al.*, 2006).

Em presença de oxigênio, as células de *S. cerevisiae* podem obter energia a partir de metabolismo anaeróbico (fermentação) ou aeróbico (respiração), dependendo da disponibilidade de glicose. Com altas concentrações de glicose, predomina o processo fermentativo e as células crescem exponencialmente (Entian & Barnett, 1992). Quando a concentração deste carboidrato decai para níveis abaixo de 0,2%, a célula passa por uma série de adaptações metabólicas que irão permitir a fixação da atividade respiratória a partir do consumo dos subprodutos da fermentação (principalmente etanol e glicerol). A fase que marca esta transição metabólica é conhecida como transição diáuxica (*diauxic shift*) e é caracterizada por uma parada momentânea no crescimento e pela alteração nos padrões de expressão gênica das células (De Winde *et al.*, 1996; De Winde *et al.*, 1997; Westerbeed-Marres *et al.*, 1988; Santangelo, 2006). Após a transição diáuxica as células

retomam o crescimento, porém mais lentamente do que durante o processo fermentativo. Depois de duas a quatro gerações, entram em fase estacionária devido à exaustão de nutrientes e a alta densidade de células no meio (Fuge & Werner-Washburne, 1997).

Em laboratório, é possível induzir a entrada das células de levedura em transição diáuxica substituindo a glicose do meio de cultura por outra fonte de carbono não fermentável, como glicerol ou etanol (Maris *et al.*, 2001). Isso ocorre porque a simples ausência de glicose é suficiente para desencadear a maioria das mudanças verificada ao longo do referido processo (Maris *et al.*, 2001). De fato, a glicose tem papel importante na sinalização intracelular de *S. cerevisiae*, uma vez que alterações nos níveis deste carboidrato promovem a ativação ou repressão de genes específicos por meio da sinalização mediada primariamente pelas vias Ras/AMPC/Pka e Snf3/Rgt2/Yck (Ashe *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000; Santangelo, 2006).

Durante a respiração mitocondrial, cerca de 1 a 3% do oxigênio usado pela cadeia de transporte de elétrons sofre redução incompleta e é convertido no radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que, por sua vez, pode levar à formação de outros derivados reativos tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (Halliwell & Gutteridge, 2007). Para compensar o aumento da produção de ERO, na fase aeróbica as células precisam de sistemas que promovam a desintoxicação destes compostos de forma mais eficiente. Em *S. cerevisiae* a transição do metabolismo anaeróbico para aeróbico é acompanhada por um aumento da resistência ao estresse oxidativo (Jamieson, 1992). Muitos genes ligados à desintoxicação de ERO elevam seu nível de expressão após a transição diáuxica, tais como os envolvidos na síntese de enzimas antioxidantes como a catalase, as superóxido dismutases (SOD) e as glutathione redutases (Costa & Moradas-Ferreira, 2001; Maris *et al.*, 2001). No caso da glutathione redutase, essa ativação é mediada

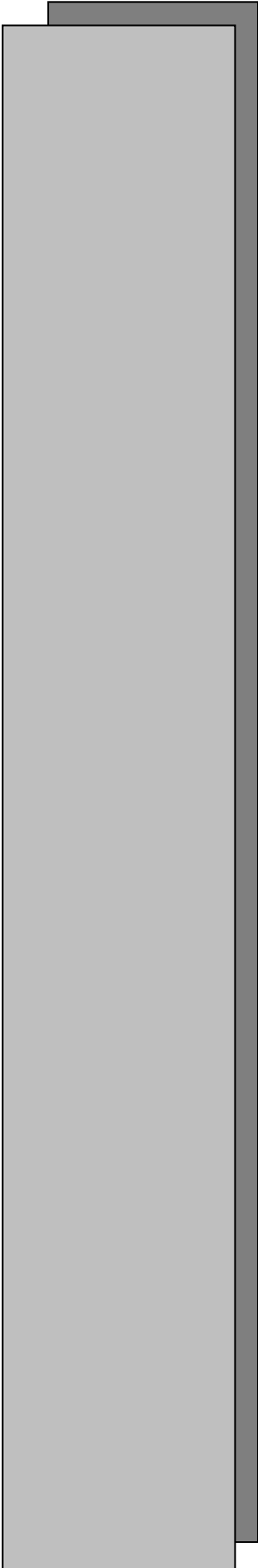
pelo fator de transcrição Yap1p, o qual tem um papel primordial na adaptação ao estresse oxidativo em resposta ao tratamento com H₂O₂ (Costa & Moradas-Ferreira, 2001). Após a transição diáuxica, também são induzidos genes ligados à síntese de glutathione e tioredoxinas, bem como genes ligados a homeostase de metais (metalotioneína, metalchaperones) (Costa & Moradas-Ferreira, 2001; Maris *et al.*, 2001).

Um dos componentes importantes para a proteção das células contra o estresse oxidativo é a regulação da homeostase de metais, pois estes elementos podem formar espécies reativas por meio de reações similares à de Fenton (ferro, cobre, cromo) ou diminuir a disponibilidade de compostos envolvidos com a desintoxicação de ERO (mercúrio, níquel, chumbo e Cd²⁺). Por outro lado, em concentrações adequadas, alguns metais, como o zinco, podem exercer função "protetora" devido à sua capacidade de prevenir a formação de ERO, além de atuarem como cofatores de enzimas antioxidantes (Stohs & Bagchi, 1995).

Na última década, o uso de *S. cerevisiae* permitiu importantes avanços na compreensão dos mecanismos relacionados à toxicidade e à desintoxicação do Cd²⁺, bem como na conexão destes processos com os sistemas de defesa antioxidante das células eucarióticas. Por exemplo, Jin e colaboradores (2003) demonstraram que os efeitos mutagênicos do Cd²⁺ se devem à inibição do sistema de reparo por erro no emparelhamento de bases (MMR) e não a produção de lesões no DNA. Esta foi uma descoberta importante do ponto de vista conceitual porque, até então, o termo "mutagênico" era essencialmente associado a substâncias capazes de produzir lesões diretas ou indiretas no DNA (Jin *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente, os estudos em *S. cerevisiae* também foram úteis para estabelecer novas correlações entre a atividade de proteínas dos sistemas de defesa

antioxidante e a prevenção dos efeitos mutagênicos do Cd^{2+} . Os complexos $\text{Cd}.[\text{GS}]_2$ parecem atuar como moduladores negativos da captação de Cd^{2+} ao nível de membrana plasmática, enquanto que a compartimentalização dos mesmos no interior do vacúolo protege as células dos efeitos mutagênicos do Cd^{2+} e possivelmente permite a reciclagem da GSH contida no complexo pela ação da enzima vacuolar γ -glutamil transpeptidase (Gomes *et al.*, 2002; Adamis *et al.*, 2007). As glutarredoxinas – enzimas que catalisam a glutationação de proteínas como mecanismo de proteção antioxidante – atuam na sinalização proapoptótica em resposta ao Cd^{2+} e, desta forma, previnem seus efeitos mutagênicos (Gomes *et al.*, 2008).



OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar novos mecanismos de tolerância ao cádmio em *S. cerevisiae*, com ênfase para a atuação da proteína Ycf1p durante o metabolismo respiratório e na sua contribuição para a resistência ao estresse oxidativo. Adicionalmente, o trabalho buscou investigar uma provável interação de proteínas associadas a homeostase de Ca^{2+} (em especial a proteína Pmr1) com a Ycf1p durante o processo de desintoxicação de Cd^{2+} .

1.1. *Objetivos Específicos*

- Comparar os níveis de sensibilidade a Cd^{2+} durante o metabolismo fermentativo e respiratório de células *S. cerevisiae*, bem como investigar a influência da Ycf1p na tolerância ao Cd^{2+} nestas duas condições metabólicas.
- Investigar os níveis de expressão do gene *YCF1* durante a transição do metabolismo fermentativo para o respiratório (transição diáuxica) em *S. cerevisiae*, tanto na presença quanto na ausência de Cd^{2+} .
- Analisar o perfil de captação de Cd^{2+} durante a transição do metabolismo fermentativo para o respiratório em *S. cerevisiae* e a influência da proteína Ycf1 sobre este processo.
- Averiguar o papel da proteína Ycf1 sobre a resistência ao estresse oxidativo durante o metabolismo respiratório das células de *S. cerevisiae*.
- Comparar a influência das proteínas Ycf1p e Pmr1p sobre a sensibilidade ao Cd^{2+} em células de *S. cerevisiae*, bem como verificar o efeito da disrupção simultânea dos genes *YCF1* e *PMR1* sobre esta sensibilidade.

- Fazer uma análise comparativa do perfil de captação de Cd^{2+} entre a linhagem selvagem (BY4741) e os mutantes isogênicos *ycf1* Δ , *pmr1* Δ e *pmr1* Δ *ycf1* Δ .
- Investigar a modulação dos níveis de RNAm do gene *YCF1* e de genes que codificam proteínas intracelulares associadas a homeostase de Ca^{2+} (*PMR1*, *PMCI*, *VCX1*, *YVC1*, *COD1*, *CMD1*) em resposta ao tratamento com Cd^{2+} , tanto na linhagem selvagem (BY4741) quanto nos mutantes isogênicos *ycf1* Δ , *pmr1* Δ e *pmr1* Δ *ycf1* Δ .



CAPÍTULO I

**THE ROLE OF THE YEAST ATP-BINDING CASSETTE YCF1p IN GLUTATHIONE
AND CADMIUM ION HOMEOSTASIS DURING RESPIRATORY METABOLISM**

Albanin Aparecida Mielniczki-Pereira, Ana Zilles Schuch, Diego Bonatto,
Cátia Ferreira Cavalcante, Delmo Santiago Vaitsman, Cristiano Jorge Riger,
Elis Cristina Araujo Eleutherio, João Antonio Pêgas Henriques.

Artigo publicado:

Toxicology Letters, 180 (2008): 21-27.



The role of the yeast ATP-binding cassette Ycf1p in glutathione and cadmium ion homeostasis during respiratory metabolism

Albanin Aparecida Mielniczki-Pereira^a, Ana Zilles Schuch^a, Diego Bonatto^b,
Cátia Ferreira Cavalcante^c, Delmo Santiago Vaitsman^c, Cristiano Jorge Riger^d,
Elis Cristina Araujo Eleutherio^d, João Antonio Pêgas Henriques^{a,b,e,*}

^a PPGBCM, CBiot/Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, Sala 113, Porto Alegre, RS 91507-970, Brazil

^b Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, Bloco 57, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

^c Departamento de Química Analítica/Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Av. Brigadeiro Trompowsky s/n, 21949-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Departamento de Bioquímica/Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Av. Brigadeiro Trompowsky s/n, 21949-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Departamento de Biofísica/Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 March 2008

Received in revised form 21 May 2008

Accepted 21 May 2008

Available online 29 May 2008

Keywords:

Ycf1p

GSH

Respiratory metabolism

Cadmium

Saccharomyces cerevisiae

ABSTRACT

Cadmium (Cd^{2+}) is a toxic environmental contaminant for biological systems, which can form complexes with reduced glutathione (GSH), and thus alter the intracellular redox state. In *Saccharomyces (S.) cerevisiae*, bis(glutathionato)cadmium ($\text{Cd}[\text{GS}]_2$) complexes can be removed from the cytosol and transported into the vacuole by a glutathione-conjugated pump, Ycf1p. In this study, we investigated the role of Ycf1p in Cd^{2+} detoxification during respiratory metabolism of *S. cerevisiae*, and the correlation of Ycf1p with GSH intracellular homeostasis. The results showed that in respiratory condition the mutant *ycf1* Δ is more tolerant to Cd^{2+} and to the oxidants *t*-BOOH and H_2O_2 than wild-type strain. This tolerance is probably related to the high content of GSH present in *ycf1* Δ mutant. The expression of *YCF1* promoter in the wild-type strain is naturally down-regulated after the transition from fermentative to respiratory metabolism (diauxic shift), and its induction in response to Cd^{2+} is dependent on GSH availability. Our data suggest that Ycf1p is involved in the maintenance of intracellular GSH homeostasis and it can interfere with the oxidative tolerance of yeast. Moreover, the detoxification of Cd^{2+} is dependent on GSH availability and on cellular metabolic status.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cadmium (Cd^{2+}) is an environmental contaminant that shown a long biological half life (15–20 years) as a consequence of its low excretion rate in the organism (Nordberg, 1984; Jin et al., 1998). Moreover, Cd^{2+} is classified as a carcinogen by the International Agency for Research on Cancer [<http://www.iarc.fr/index.html>], due to its correlation with the development of lung and prostate cancer (Huff et al., 2007). The deleterious effects of Cd^{2+} are not fully understood, but its toxicity seem be related to two distinct mechanisms. One assertion is that Cd^{2+} strongly inhibits the mismatch-repair pathway (Jin et al., 2003). Another assertion is that free intracellular Cd^{2+} causes depletion of reduced glutathione (GSH; γ -Glu-Cys-Gly), a tripeptide ubiquitous in eukaryotic cells.

GSH depletion can be threatening, as it is required for many biological processes, such as protein and DNA synthesis, cell cycle regulation, intracellular buffering, heat shock resistance, detoxification of xenobiotics, regulation of thiolredox status and antioxidant defense (DeLeve and Kaplowitz, 1990; Meister, 1984; Wang and Ballarotti, 1998).

Living organisms use several mechanisms to deal with the toxic effects of Cd^{2+} . In bacteria, the main system of resistance is the energy-dependent efflux of metal ions (Silver and Phung, 2005). In eukaryotes, Cd^{2+} can be chelated by GSH or other thiol-containing proteins like metallothioneins or phytochelatin, which are synthesized from GSH. These thiol-containing polypeptides are found in plants, worms, and the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* (Gehig et al., 2000; Duncan et al., 2006; Li et al., 1997; Vido et al., 1999). In *S. cerevisiae* the best characterized pathway that protects against Cd^{2+} toxicity involves its binding with GSH, and the formation of bis(glutathionato)cadmium ($\text{Cd}[\text{GS}]_2$) complexes. These complexes are removed from the cytosol and transported into the vacuole by specific transmembrane proteins such as the transporter pump Ycf1p (Li et al., 1997).

* Corresponding author at: Centro de Biotecnologia/Instituto de Biologia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, Sala 113, Porto Alegre, RS 91507-970, Brazil. Tel.: +55 51 3308 7602; fax: +55 51 3308 6084.

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br (J.A.P. Henriques).

Coded by the gene *YCF1*, Ycf1p is an ATP-binding cassette (ABC) protein that belongs to the multidrug resistance-associated protein subfamily (MRP/ABCC). The Ycf1p protein forms a vacuolar glutathione-conjugated pump that shares sequence homology to human MRP1, and to the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (hCFTR) (Li et al., 1996; Szczyepka et al., 1994). Ycf1p catalyzes the transport of a broad range of substrates, including *S*-(2,4-dinitrophenyl)glutathione, glutathione disulfide (GSSG), free GSH, and Cd-[GS]₂ complex. Another substrate transported by Ycf1p is the endogenous compound phosphoribosylaminoimidazole-glutathione, a red pigment that accumulates in the vacuoles of yeast *ade1* or *ade2* mutants when grown under adenine limitation conditions (Li et al., 1996, 1997; Rebbeor et al., 1998; Sharma et al., 2002; Chaudhuri et al., 1997).

Most drugs are transported by MRPs as conjugates of GSH, glucuronide, or sulfate (Cole and Deeley, 2006). Alternatively, some drugs are co-transported with free GSH, because free GSH is itself a direct substrate for Ycf1p (Cole and Deeley, 2006; Ballatori et al., 2005). The Ycf1p transport system accounts for about 70% of the GSH transport activity in vacuoles. The remaining activity is due to the V-ATPase-coupled system (Mehdi et al., 2001). Interestingly, the transport of GSH is not seen in vacuolar membrane vesicles isolated from the yeast strains lacking a functional Ycf1p (Rebbeor et al., 1998; Sharma et al., 2002).

As damaging reactive oxygen species (ROS) are generated by mitochondrial electron transport chain activity, the maintenance of GSH homeostasis is particularly important for protection against oxidative stress during respiratory metabolism (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006). In *S. cerevisiae*, the transition from fermentative to respiratory metabolism in response to glucose exhaustion (diauxic shift) is accomplished by an increase in the expression of antioxidant defense genes—including the gene *GSH1*, which codes for the first enzyme of GSH biosynthesis (Maris et al., 2001). Since the main pathway for Cd²⁺ detoxification in yeast involves GSH sequestration by Ycf1p, and Cd²⁺ toxicity is at least partially associated with GSH depletion and oxidative stress, it is relevant to analyze the disruption caused by this heavy metal in the face of respiratory activity.

In this work, we use the eukaryotic model *S. cerevisiae* to investigate the role of Ycf1p in Cd²⁺ detoxification during respiratory metabolism. Remarkably, in the last years the use of *S. cerevisiae* has allowed the gain of insights about the mechanisms related to cadmium toxicity and detoxification (Gomes et al., 2002, 2008; Adamis et al., 2007; Jin et al., 2003). We performing cytotoxic and gene reporter assays in strains proficient and deficient in Ycf1p. Then, we compared these results with measurements of total intracellular GSH and Cd²⁺ to further understand the relationship of oxidative stress to Cd²⁺ detoxification.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and plasmid

The strains of *S. cerevisiae* used in this study were WT BY4741 (Wild type; *MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) and Ycf1p-deficient *ycf1Δ* (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; *ycf1::kanMX4*), both obtained from Euroscarf (European *S. cerevisiae* Archive for Functional Analysis, Frankfurt, Germany). The *YCF1* reporter plasmid (pJAW736) was described in (Wemmie et al., 1994) and was provided by Dr. Scott Moye-Rowley (University of Iowa).

2.2. Cd²⁺ sensitivity assays

The strains were grown in rich medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 30 °C until stationary phase, then harvested by centrifugation (1 min/15,000 × g) and washed twice with distilled water. The cell number was determined by counting in a Neubauer chamber. The cellular assays were carried out in Synthetic Hartwell's complete medium (SC) (Burke et al., 2000) containing 5% glucose (for yeast fermenting cells) or 3% glycerol (for yeast respiring cells)

as carbon sources. For the survival assay, 5 × 10⁶ cells/mL were incubated for 24 h (180 rpm) at 30 °C in SC (with 5% glucose or 3% glycerol), supplemented or not with CdCl₂ (12, 48, 192 and 384 μM). After the treatments, cells were washed twice with distilled water and diluted to 1 × 10³ cells/mL. Aliquots of 100 μL were plated in SC solid medium (2% glucose) and incubated at 30 °C for 2–3 days for the determination of survival colonies. For the drop test, cells were washed twice and diluted between 10⁸ and 10³ cells/mL, and 10 μL of each dilution were plated in SC solid medium containing 3% glycerol with either Cd²⁺ and *N*-acetylcysteine (NAC, a GSH precursor compound) or 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, a GSH depleting compound). The plates were incubated for 5–6 days at 30 °C. Drop tests were also performed in the presence of H₂O₂ and *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), instead of Cd²⁺.

2.3. Quantification of total glutathione

Total glutathione (GSH + GSSG) was measured by photometric determination of 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), which was produced from DTNB in a kinetic assay, according to Akerboom and Sies (1981). For this procedure the strains were grown, washed and treated as described in Section 2.2. After 24 h, 2 × 10⁸ cells were collected by centrifugation, washed twice with distilled water, resuspended in 1 mL of cold buffer (100 mM sodium phosphate, 4 mM EDTA; pH 7.0) and disrupted by cycles of agitation with glass beads and ice bath (8 cycles × 40 s). The suspension was treated by the addition of an equal volume of 2 M HClO₄ and centrifuged for 10 min/15,000 × g. The supernatant was neutralized to pH 7.0–7.2 with 2 M KOH/0.3 3-[*N*-morpholino] propanesulfonic acid, and the insoluble residues were removed by centrifugation (10 min/10,500 × g). The enzymatic determination of total GSH was performed using 250 μL of neutralized supernatant. Glutathione concentration was calculated from the standard curve of GSSG and is expressed as GSH equivalent/2 × 10⁸ cells.

2.4. β-Galactosidase reporter assays

To access the pattern of *YCF1* expression during the growth of WT BY4741 strain in the presence of Cd²⁺, the cells were transformed with reporter plasmid pJAW736. This plasmid contains a non-coding *YCF1* region (−736 to −1 bp) with a *lacZ* reporter gene (Wemmie et al., 1994). The yeast transformation was performed by the lithium acetate method (Gietz and Woods, 2002). Cells were grown in SC with 2% glucose lacking uracil (SC ura[−]) at late exponential phase, then reinoculated in the same fresh medium (5 × 10⁶ cells/mL) supplemented or not with 48 μM of CdCl₂. This CdCl₂ concentration was chosen because it is comparable to the levels found in the environment as well as levels that can accumulate in the human body (Jin et al., 2003; Satarug and Moore, 2004). Over 24 h, aliquots were withdrawn at intervals of 2–4 h, for cell number determination and *YCF1* expression measurement. The β-galactosidase activity was measured as in Ausubel et al. (1995) and activity was expressed as units per optical density at 600 nm (OD₆₀₀) unit of cells.

2.5. Semiquantitative RT-PCR

The WT BY4741 strain was treated as described in section 2.4. After 6 h, cells were harvested for total RNA extraction using RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, USA) according to manufacturer's instructions. Equal amounts of total RNA (1.0 μg) previously treated with DNase I amplification grade (Promega, USA) were subjected to first strand cDNA synthesis using the poly-T antisense primer, and the M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA). PCR was carried out with *Taq* DNA polymerase using the first strand cDNA and specific primers for *YCF1* (5'-AAGACATTAGTTGGCCGAGAAAGGG-3' and 5'-TTTGGACCCAACACATGTCGATCA-3') or *ACT1* (actin, constitutive control) (5'-ATGGAAGATGGAGCCAAGC-3' and 5'-TCTGCCGTTATTGACCAAAC-3'). Both fragments were amplified with the same PCR program (one cycle of 94 °C for 1 min, followed by 28 cycles of 94 °C for 30 s/53 °C for 30 s/72 °C for 30 s, and a last cycle of 72 °C for 5 min). The size of fragments generated was 170 bp (with *YCF1* primers) and 164 bp (with *ACT1* primers). The semiquantitative RT-PCR was performed two times with RNA samples extract in independently days.

2.6. Atomic absorption

The yeast strains were prepared as they were for β-Galactosidase reporter assays (Section 2.4). To account for the ATP-dependent activity of Ycf1p, the procedure was carried in SC rather than in PBS buffer, which does not contain an energy source. To measure the residual Cd²⁺ concentration present in the media, 5-mL aliquots were centrifuged, and the supernatant solution was collected and subjected to atomic absorption (Atomic Absorption Spectrometer, PerkinElmer 3100). Cd²⁺ content was estimated by determining the difference in metal concentration between control medium without biomass and test medium containing biomass. The results were normalized with respect to sample cell density at each timepoint, and are expressed in percentage of Cd²⁺ absorbed by 10⁷ cells.

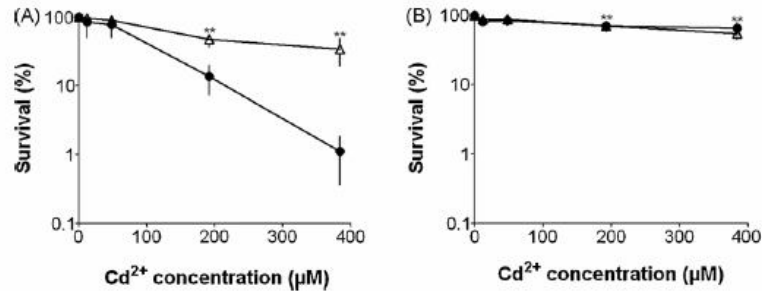


Fig. 1. Yeast tolerance to Cd^{2+} in fermentative and respiratory metabolism. Yeast strains were incubated under fermentative (5% glucose, A) or respiratory (3% glycerol, B) conditions, supplemented or not with CdCl_2 at varying concentrations. For each strain, comparisons were made between different carbon sources. Data are presented as mean \pm S.D. BY4741 (Δ) and $ycf1\Delta$ (\bullet). ** $p < 0.001$.

2.7. Statistical analysis

The statistical analyses were performed with one-way ANOVA plus Tukey's post-test, with p values < 0.05 accepted as statistically significant. All assays were performed at least three independent times.

3. Results and discussion

3.1. Tolerance of $ycf1\Delta$ to Cd^{2+} during respiratory metabolism

GSH is a very important component of the antioxidant defense system in eukaryotic cells, and in *S. cerevisiae* the expression of

GSH1 gene is increased during respiratory metabolism (Maris et al., 2000, 2001). The detoxification of Cd^{2+} by Ycf1p is dependent on ion binding with GSH. Moreover, the toxicity of this ion is associated with an increase in oxidative stress consequent to the reduction of the intracellular GSH pool. Thus, it is possible that the tolerance of yeast to Cd^{2+} could be different in fermentative versus respiratory metabolism. To test this hypothesis, the sensitivity of WT and $ycf1\Delta$ strains was analyzed under fermentative and respiratory conditions. During fermentative metabolism, the $ycf1\Delta$ strain was more sensitive to Cd^{2+} than WT (Fig. 1A). However, in respiratory medium both strains were statistically more tolerant to

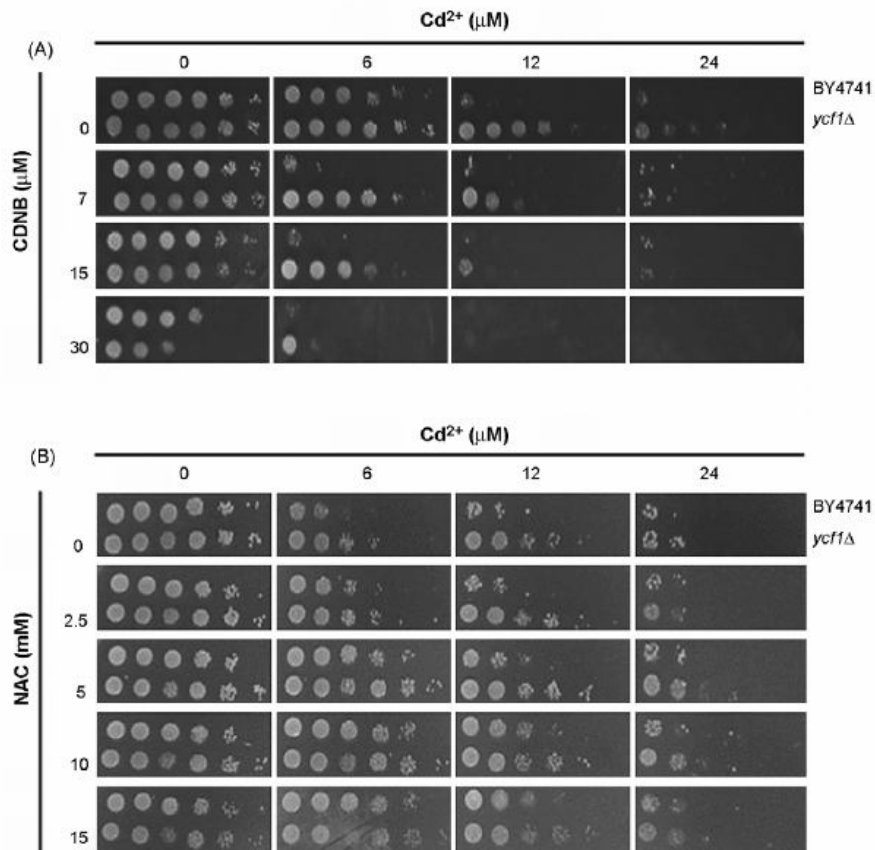


Fig. 2. Tolerance of $ycf1\Delta$ strain to Cd^{2+} stress during respiratory metabolism. Cells were diluted between 10^8 and 10^3 cells/mL, and $10\ \mu\text{L}$ of each dilution were plated in SC solid medium containing 3% glycerol plus Cd^{2+} and CDNB (A) or Cd^{2+} and NAC (B). In each square of the grid, WT BY4741 is shown in the upper row and $ycf1\Delta$ is shown in the lower row.

Cd^{2+} than in fermentative metabolism, and the *ycf1* Δ cells achieved the same Cd^{2+} tolerance as WT cells (Fig. 1B). Maris et al. (2000) reported that the expression of *GSH1* in YPH98 wild-type strain of *S. cerevisiae* increased by 2–3 times in the presence of glycerol, when compared to control glucose-containing medium. This observation could explain the higher tolerance to Cd^{2+} shown by WT and *ycf1* Δ strains during respiration as a consequence of increased intracellular GSH content, which facilitates the inactivation of Cd^{2+} ions.

We investigated this possibility in yeast cells with the drop test assay in the presence of CDNB and NAC. When compared to the survival assay, the chronic exposure of WT and *ycf1* Δ cells to 24 μ M Cd^{2+} in the glycerol drop test produces pronounced cell sensitivity (Fig. 2). However, Cd^{2+} tolerance of *ycf1* Δ respiring cells was confirmed in the same assay condition. In glucose medium, the pattern of sensitivity in the drop test was similar that observed in the survival curves (data not shown). The tolerance of the *ycf1* Δ strain was reverted by increasing concentrations of CDNB (Fig. 2A). Also, the presence of NAC in Cd^{2+} -containing medium could restore growth of the WT strain to a level similar to *ycf1* Δ (Fig. 2B). These data indicate a possible link between Cd^{2+} detoxification by Ycf1p and the maintenance of GSH homeostasis during respiratory metabolism in *S. cerevisiae*. This hypothesis is strengthened by the observation that the *ycf1* Δ strain is also more resistant to selenite than its isogenic counterpart (Pinson et al., 2000). Selenite is a powerful GSH-sequestering compound and Ycf1p could play a role in transporting it into the vacuole as GSH-complex. However, this storage might result in selenite sensitivity as a consequence of GSH depletion and/or inefficient regeneration of GSH (Pinson et al., 2000).

3.2. Increased accumulation of GSH in *ycf1* Δ strain during respiratory metabolism

To further elucidate mechanisms related to the Cd^{2+} tolerance and the maintenance of GSH homeostasis, total GSH content (GSH+GSSG) was quantified in WT and *ycf1* Δ strains after 24 h treatment in 5% glucose- or 3% glycerol-containing medium (Fig. 3). In agreement with established knowledge regarding increased *GSH1* expression in glycerol (Maris et al., 2000), both strains showed a higher content of total GSH in respiratory condition. In the WT

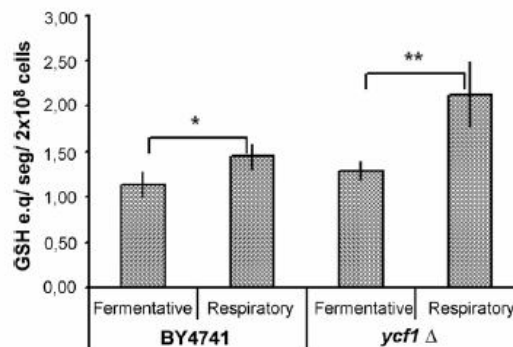


Fig. 3. Yeast accumulation of total glutathione in fermentative and respiratory metabolism. Data are presented as mean \pm S.D. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$.

strain, the difference of GSH content in respiring versus fermentative cells was $\sim 27\%$. Surprisingly, the difference in the *ycf1* Δ strain was $\sim 65\%$, more than twofold higher than that seen in WT. This increase in GSH content could explain the tolerance of *ycf1* Δ cells to both H_2O_2 and *t*-BOOH observed in respiratory medium (Fig. 4). As observed for Cd^{2+} , the growth of the WT strain could be restored to the *ycf1* Δ level by simultaneous treatment with NAC in the presence of H_2O_2 and *t*-BOOH (Fig. 4).

This result emphasizes that members of the MRP family participate in the physiological turnover of GSH and GS-conjugates, since export of these compounds from mammalian cells is the regulatory step before degradation by the ectoenzyme γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) (Ballatori et al., 2005). In *S. cerevisiae*, γ -GT is located at vacuolar membrane, where it acts to recycle GSH (Penninckx, 2002) and also possibly Cd-[GS]₂ complex (Adamis et al., 2007). As Ycf1p is the major vacuolar glutathione-conjugated transporter in yeast (Mehdi et al., 2001), it may have a physiological role in the control of GSH turnover, together with γ -GT. However, the data obtained from these experiments suggest that, in a stressed environment where GSH is necessary (e.g. Cd^{2+} , H_2O_2 or *t*-BOOH), the sequestering of GSH or GSH-containing compounds by Ycf1p could alter the redox state of cells, and interfere with their antioxidant defense systems.

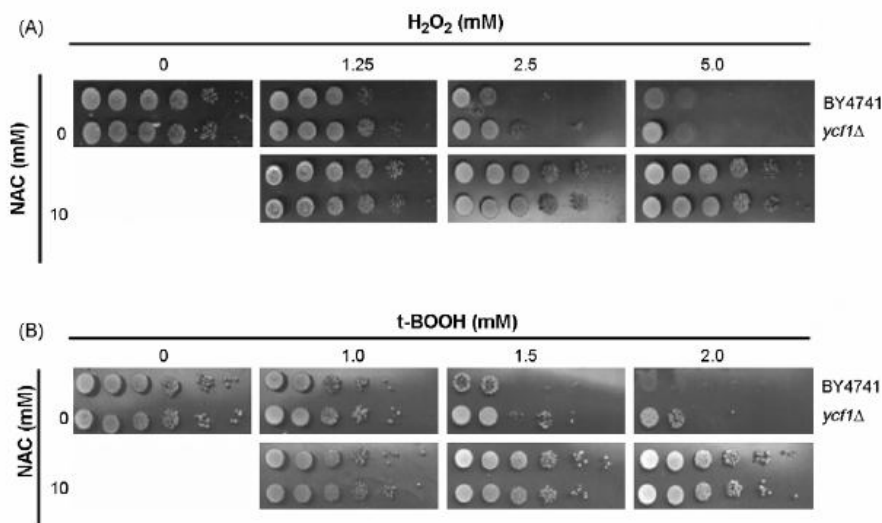


Fig. 4. Tolerance of *ycf1* Δ strain to oxidative stress during respiratory metabolism. Cells were diluted between 10^8 and 10^3 cells/mL, and 10 μ L of each dilution were plated in SC solid medium containing 3% glycerol + H_2O_2 (A) or *t*-BOOH (B). In each square WT BY4741 is shown in the upper row and *ycf1* Δ is shown in the lower row.

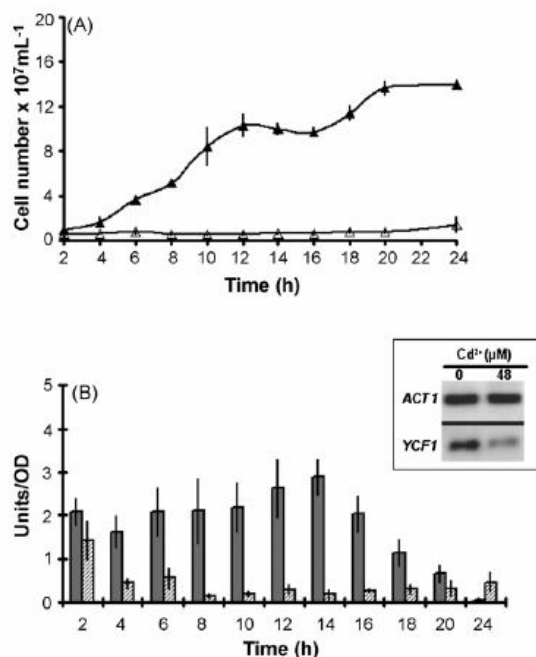


Fig. 5. Regulation of *YCF1* promoter during the growth of *S. cerevisiae*. (A) Growth in absence (▲) or presence (△) of Cd²⁺. (B) *YCF1* expression in absence (grey bars) or presence (crossed bars) of Cd²⁺. Inset: semi-quantitative RT-PCR performed with RNA extracted after 6-h treatment with CdCl₂ (48 μM), in the upper row is shown the expression of *ACT1* (constitutive control) and in the lower row is shown the expression of *YCF1*.

3.3. Regulation of *YCF1* promoter during the growth of *S. cerevisiae*

In an attempt to evaluate physiological correlation between *Ycf1p* activity and maintenance of redox homeostasis, we analyzed the pattern of *YCF1* expression through a complete growth curve of WT strain, in presence and absence of Cd²⁺. In *S. cerevisiae* the transition from the fermentative to respiratory metabolism is accomplished by an increase in ROS production. The antioxidant defense systems are also up-regulated when the yeast reaches the respiratory phase, which makes cells more resistant to oxidative stress (Jamieson, 1992; De Winde et al., 1996; Costa and Moradas-Ferreira, 2001). If *YCF1* is in fact related to redox maintenance, its expression should be differentially regulated along the growth curve.

In medium lacking Cd²⁺, a typical growth curve of *S. cerevisiae* includes the fermentative (4–12 h), diauxic shift (12–16 h) and the respiratory (18–24 h) phases (Fig. 5A). By contrast, in Cd²⁺-containing medium (48 μM) the growth of WT cells was completely inhibited without significant cell death, as reported above (Fig. 1A and B). This result can reflect a cell cycle arrest condition, since Cd²⁺ is known to induce a G2/M phase arrest in eukaryotic cells (Xie and Shaikh, 2006).

In the absence of Cd²⁺, the induction of *YCF1* promoter remains the same throughout the fermentative phase (Fig. 5B). However, a gradual and accentuated down-regulation of *YCF1* promoter occurs when cells reach the respiratory phase. Faced with respiratory metabolism, the cells are challenged by the increase in ROS production and thus need to change their metabolic scenario to ensure a proper antioxidant defense system, which includes the sustainable maintenance of GSH levels. Therefore, the data gathered about the accumulation of GSH in *ycf1 Δ* strain during respiratory growth

Table 1
YCF1 expression in WT strain after treatment with Cd²⁺ and NAC

	Units/OD
Control	2.19 ± 0.45
NAC (10 mM) only	2.39 ± 0.35
Cd ²⁺ (48 μM) only	0.65 ± 0.17
Cd ²⁺ (48 μM) + NAC (10 mM)	3.43 ± 0.53*

Data are presented as mean ± S.D. **p* < 0.001 vs. control, NAC only and Cd²⁺ only.

suggest that the natural down-regulation of *YCF1* promoter after diauxic shift is a pathway to “save” GSH. This hypothesis is in agreement with the oxidative tolerance to H₂O₂ and *t*-BOOH observed in *ycf1 Δ* strain.

In response to Cd²⁺ treatment, the induction of *YCF1* promoter was down-regulated at all timepoints (Fig. 5B). In addition, a direct measure of mRNA expression was performed in a semi-quantitative RT-PCR, and the result was similar to that observed in reporter assays (Fig. 5B, inset). Sharma et al. (2002) also conducted an analysis of the *YCF1* expression using a reporter plasmid, and showed that Cd²⁺ is able to stimulate its expression. This discrepancy with our results could be explained due to variable genetic background of the WT strains and/or to the distinct lengths of the *YCF1*-promoter region present in the reporter plasmids used in each study. We used a β-galactosidase-reporter fusion sequence containing –736 to –1 bp of upstream *YCF1* sequence, while Sharma et al. (2002) used a reporter containing –418 to –1 bp with a natural insertion of a cytosine at position –302. Wemmie et al. (1994) designed a set of *YCF1* β-galactosidase reporters with crescent deletions on the promoter region, and they observed that deletions in *YCF1* promoter between –546 and –303 bp resulted in increased induction. Thus, the β-galactosidase-reporter carrying only –418 bp of *YCF1* promoter could lack sequences related to negative regulation of this gene, which would be present in the construction used in this work.

Considering the physiological down-regulation of the *YCF1* promoter during respiratory metabolism, we raised the hypothesis that its induction by Cd²⁺ at our experimental concentration depends on GSH availability. This hypothesis was confirmed by our demonstration that the simultaneous treatment of WT cells with Cd²⁺ and NAC induced increased activation of *YCF1* promoter by about 45% (Table 1).

3.4. Cd²⁺ quantification in WT BY4741 and *ycf1 Δ* strains

The apparent prioritization of GSH homeostasis over transport of Cd–[GS]₂ complex by *Ycf1p* could lead to an accumulation of these complexes in the cytosol or cellular compartments, and therefore promote Cd²⁺ toxicity. Thus, yeast cells may have an additional mechanism to cope with the presence of Cd²⁺ ions.

We performed a time course Cd²⁺ quantification assay to analyze the relationship between *YCF1* expression pattern and the accumulation of Cd²⁺ (Fig. 6). In WT strain, we observed a nearly constant level of Cd²⁺ between 2 and 12 h, followed by gradual and slight decrease until 24 h, when the cells showed 50% of the initial Cd²⁺ uptake (11.44 ± 1.41% at 2 h against 6.66 ± 0.52% at 24 h). In *ycf1 Δ*, the content of Cd²⁺ at 2 h was two times higher than WT; however, the concentration of the metal uptake was markedly reduced by 6 h, and then gradually decreased during the following time points. Between 8 and 18 h, the uptake of Cd²⁺ by the mutant strain was statistically lower than by WT strain. After 24 h, the Cd²⁺ content in *ycf1 Δ* is reduced by approximately 50% as compared to the WT strain (6.66 ± 0.52% at 24 h in the WT against 2.88 ± 0.36% in the mutant strain)—this result is in accordance with previous work (Gomes et al., 2002).

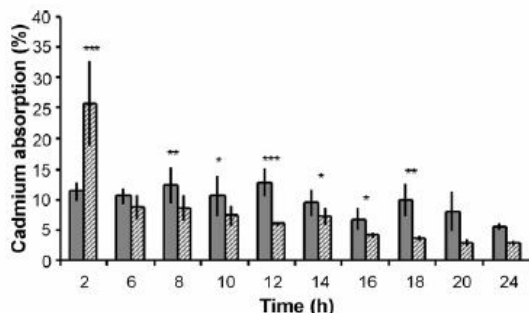


Fig. 6. Cd^{2+} quantification in WT BY4741 and *ycf1* Δ strains. WT BY4741 strain (grey bars) and *ycf1* Δ strain (crossed bars). Data are presented as mean \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Strains were compared at each time point.

The profile of Cd^{2+} uptake and *YCF1* expression allows us to infer that, at low concentrations of this ion, *YCF1* could be down-regulated in WT cells, and result in intracellular Cd^{2+} accumulation. Therefore, as in *ycf1* Δ cells, the cellular content of Cd^{2+} could be exported after some time by mechanisms independent of Ycf1p. Recent studies have reported the existence of other proteins located on the plasma membrane that can export Cd^{2+} from the cell. Nagy et al. (2006) have demonstrated that Cd^{2+} can be effluxed out of the cell by Yor1p, a member of the ABC family involved in Cd^{2+} resistance of yeast cells submitted at low temperatures. Kern et al. (2005) described the role of Alr1p in Cd^{2+} detoxification and efflux, though this protein is known for its role in magnesium homeostasis. Moreover, the P_{1b} -type ATPase coded by *PCA1* gene has been described as a new Cd^{2+} efflux pump. Cd^{2+} dramatically increases *Pca1p* expression through post-transcriptional regulation, and promotes relocation of the protein to the plasma membrane. Interestingly, *Pca1* is non-functional in some laboratory yeast strains (Adle et al., 2007). Ultimately, Cd^{2+} efflux could occur through channels of other divalent ions, because the atomic radius of Cd^{2+} is very similar to those of essential ions like Zn^{2+} and Ca^{2+} (Willians and da Silva, 1996).

In summary, our data indicate that Ycf1p is involved in intracellular GSH homeostasis maintenance, and that its performance in the detoxification of Cd^{2+} is dependent on GSH availability and cellular metabolic status. In an environment with low Cd^{2+} concentrations, the *YCF1* is down-regulated, which favors the cytosolic accumulation of Cd-[GS]₂ complexes. The Cd^{2+} that is not delivered to the vacuole can be eliminated from the cells by mechanisms independent of Ycf1p, as observed in the *ycf1* Δ strain. Ultimately, the regulation of *YCF1* expression is likely one of the metabolic adaptations that allow yeast cells to be most resistant to oxidative stress in the post-diauxic phase.

Acknowledgments

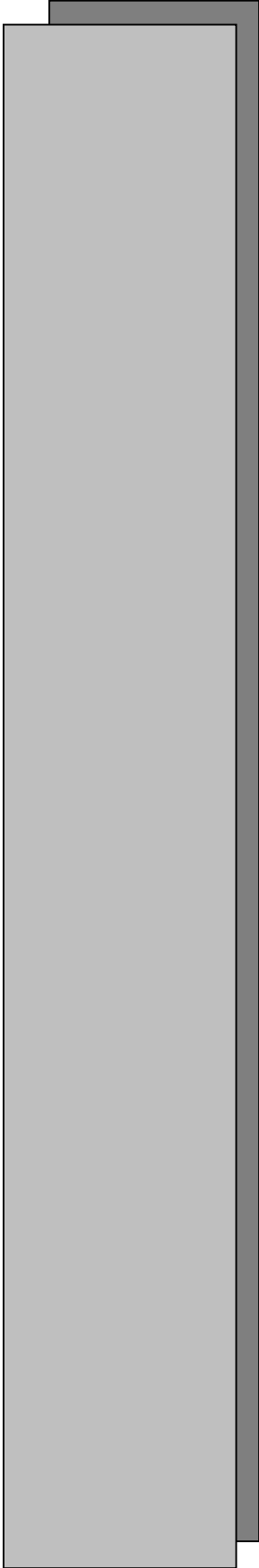
We thank Dr. Scott Moye-Rowley (University of Iowa) for kindly providing the reporter plasmid pJAW736. We also thank Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira for helpful comments on the manuscript. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROCAD/CAPES, Grant no. 0306053) and GENOTOX/Instituto ROYAL (Cbiot-UFRGS).

References

Adamis, P.D.B., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2007. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. *Toxicol. Lett.* 173, 1–7.

- Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C., 2006. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 639–645.
- Adle, D.J., Sinani, D., Kim, H., Lee, J., 2007. A cadmium-transporting P_{1b} -type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282, 947–955.
- Akerboom, T.P., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Method Enzymol.* 77, 373–382.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed. John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 13–30.
- Ballatori, N., Hammond, C.L., Cunningham, J.B., Krance, S.M., Marchan, R., 2005. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 238–255.
- Burke, D., Dawson, D., Stearns, T., 2000. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. CSH Laboratory Press, New York, p. 174.
- Chaudhuri, B., Ingavale, S., Bachhawat, A.K., 1997. *Apd1+*, a gene required for red pigment formation in *ade6* mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump. *Genetics* 145, 75–83.
- Cole, S.P., Deeley, R.G., 2006. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 438–446.
- Costa, V., Moradas-Ferreira, P., 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* 22, 217–246.
- De Winde, J.H., Crauwels, M., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Winderickx, J., 1996. Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur. J. Biochem.* 241, 633–643.
- DeLeve, L.D., Kaplowitz, N., 1990. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin. Liver Dis.* 10, 251–266.
- Duncan, K.E., Ngu, T.T., Salgado, M.T., Merrifield, M.E., Stillman, M.J., 2006. Peptide folding, metal-binding mechanisms, and binding site structures in metallothioneins. *Exp. Biol. Med.* 231, 1488–1499.
- Gehrig, P.M., You, C., Dallinger, R., Gruber, C., Brouwer, M., Kagi, J.H., Hunziker, P.E., 2000. Electrospray ionization mass spectrometry of zinc, cadmium, and copper metallothioneins: evidence for metal-binding cooperativity. *Protein Sci.* 9, 395–402.
- Gietz, R.D., Woods, R.A., 2002. Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Method Enzymol.* 350, 87–96.
- Gomes, D.S., Fragoso, L.C., Riger, C.J., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2002. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 21–25.
- Gomes, D.S., Pereira, M.D., Panek, A.D., Andrade, L.R., Eleutherio, E.C.A., 2008. Apoptosis as a mechanism for removal of mutated cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Grx2 under cadmium exposure. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 160–166.
- Huff, J., Lunn, R.M., Waalkes, M.P., Tomatis, L., Infante, P.F., 2007. Cadmium-induced cancers in animals and in humans. *Int. J. Occup. Environ. Health* 13, 202–212.
- Jamieson, D.J., 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.* 174, 6678–6681.
- Jin, T., Lu, J., Nordeberg, M., 1998. Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicology* 19, 529–535.
- Jin, Y.H., Clark, A.B., Slebos, R.J., Al-Rafai, H., Taylor, J.A., Kundel, T.A., Resnick, M.A., Gordenin, A., 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat. Gen.* 34, 326–329.
- Kern, A.L., Bonatto, D., Dias, J.F., Yonema, M., Brendel, M., Henriques, J.A.P., 2005. The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: insights from phylogenetic studies and particle-induced X-ray emission. *Biometals* 18, 31–41.
- Li, Z., Szczycka, M., Lu, Y., Thiele, D.J., Real, P.A., 1996. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* 271, 6509–6517.
- Li, Z., Lu, Y., Zhen, R., Szczycka, M., Thiele, D.J., 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 42–47.
- Maris, A.F., Kern, A.L., Picada, J.N., Boccardi, F., Brendel, M., Henriques, J.A.P., 2000. Glutathione, but not transcription factor Yap1, is required for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 37, 175–182.
- Maris, A.F., Assumpção, A.L., Bonatto, D., Brendel, M., Henriques, J.A.P., 2001. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr. Genet.* 39, 137–149.
- Mehdi, K., Thierie, J., Penninck, M.J., 2001. γ -Glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione. *Biochem. J.* 359, 631–637.
- Meister, A., 1984. New developments in glutathione metabolism and their potential application in therapy. *Hepatology* 4, 739–742.
- Nagy, Z., Montigny, C., Leverrier, P., Yeh, S., Goffeau, A., Garrigos, M., Falson, P., 2006. Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. *Biochimie* 88, 1665–1671.
- Nordeberg, M., 1984. General aspects of cadmium: transport, uptake and metabolism by the kidney. *Environ. Health Perspect.* 54, 13–20.

- Penninckx, M.J., 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2, 295–305.
- Pinson, B., Sagot, I., Daignan-Fornier, B., 2000. Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 36, 679–687.
- Rebbeor, J.F., Connolly, G.C., Dumont, M.E., Ballatori, N., 1998. ATP-dependent transport of reduced glutathione on YCF1, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 33449–33454.
- Satarug, S., Moore, M.R., 2004. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health Perspect.* 112, 1099–10103.
- Sharma, K.G., Mason, D.L., Liu, G., Rea, P.A., Bachhawat, A.K., Michaelis, S., 2002. Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryotic Cell* 3, 391–400.
- Silver, S., Phung, L.T., 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 587–605.
- Szczyпка, M.S., Wemmie, J.A., Moye-Rowley, W.S., Thiele, D.J., 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* 269, 22853–22857.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B., Labarre, J., 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* 18, 3325–3333.
- Wang, W., Ballarotti, N., 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50, 335–355.
- Wemmie, J.A., Szczyпка, M.S., Thiele, D.J., Moye-Rowley, W.S., 1994. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *J. Biol. Chem.* 269, 32592–32597.
- Willians, R.J.P., da Silva, J.R.F., 1996. *The Natural Selection of the Chemical Elements*. Clarendon Press, Oxford.
- Xie, J., Shaikh, Z.A., 2006. Cadmium induces cell cycle arrest in rat kidney epithelial cells in G2/M phase. *Toxicology* 224, 56–65.



CAPÍTULO II

**NEW INSIGHTS ABOUT THE Ca^{2+} -ATPASES CONTRIBUTION FOR CADMIUM
TOLERANCE IN YEAST**

Albanin Aparecida Mielniczki-Pereira, Ana Bárbara Hahn, Cristiano Jorge Riger,
Delmo Santiago Vaitsman, Elis Cristina Araujo Eleutherio, Diego Bonatto, João Antonio
Pêgas Henriques

Artigo a ser submetido para:
Toxicology Letters

New insights about the Ca²⁺-ATPases contribution for cadmium tolerance in yeast

Albanin Aparecida Mielniczki-Pereira^a, Ana Bárbara Hahn^a, Diego Bonatto^b, Delmo Santiago Vaitsman^c, Cristiano Jorge Riger^d, Elis Cristina Araujo Eleutherio^d, João Antonio Pêgas Henriques^{a,b,e*}

^aPPGBCM – CBiot/Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

^bInstituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, Bloco 57, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.

^cDepartamento de Química Analítica/Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Av. Brigadeiro Trompowsky s/n, 21949-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^dDepartamento de Bioquímica/Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Av. Brigadeiro Trompowsky s/n, 21949-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^eDepartamento de Biofísica/Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

***Address to which proofs should be sent:**

João Antonio Pêgas Henriques
Centro de Biotecnologia/ Instituto de Biologia, UFRGS,
Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, sala 113
Porto Alegre, RS, Brazil, 91507-970.
Telephone: 55-51-3308-7602; Fax: 55-51-3308-6084.
E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

Abstract

Cadmium (Cd^{2+}) is a toxic heavy metal which can trigger several toxic effects in eukaryotes, including neurotoxicity and impaired calcium (Ca^{2+}) metabolism. In the model organism *Saccharomyces (S.) cerevisiae*, the best characterized pathway for Cd^{2+} detoxification involves its conjugation with glutathione (GSH) and subsequent transport to the vacuoles by Ycf1p - an ATPase homologue to the human MRP1 (Multidrug resistance associated protein 1). However, it was recently described that Cd^{2+} tolerance can be mediated by Pmr1p – a Ca^{2+} pump located at Golgi membrane, possibly by a mechanism related to the secretory pathway. In this work, we investigate the relative contribution of Ycf1p and Pmr1p to Cd^{2+} tolerance in *S. cerevisiae*. For this purpose, we performed cytotoxic assays and analyses of Cd^{2+} content in single and double mutants for these proteins. Additionally, we also analyze the mRNA levels of intracellular Ca^{2+} -transporters upon Cd^{2+} stress. The results indicate that, in addition to Pmr1p, the vacuolar Ca^{2+} -ATPases Pmc1p also contribute with Ycf1p for Cd^{2+} detoxification in yeast cells. We propose a model where Pmc1p and Pmr1p Ca^{2+} -ATPases operate in an integrative manner with Ycf1p to promote Cd^{2+} detoxification.

Key words: *PMR1, PMC1, YCF1*, Ca^{2+} transporters, *Saccharomyces cerevisiae*

1. Introduction

Cadmium (Cd^{2+}) is a toxic heavy metal which is spread in the environment by natural phenomena like erosion of sedimentary rocks and volcanic eruptions or as result of anthropogenic activity, including production of nickel-cadmium batteries, alloys and paints (WHO, 2003). In humans, Cd^{2+} has a biological half-life of about 15-20 years (Nordberg, 1984) and can trigger neurotoxicity, renal dysfunction, impairment of calcium metabolism and bone fragility (Satarug et al., 2002; Kazantzis, 2004; Rigon et al., 2004). Besides, Cd^{2+} is classified as type I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (Huff et al., 2007).

The molecular basis of Cd^{2+} toxicity is complex and involves several biochemical pathways. However, it can be related to three major routes: i) induction of oxidative stress; ii) interference with intracellular signaling or iii) interference with DNA repair systems (Beyersmann & Hartwig, 2008). Moreover, Cd^{2+} can produce deleterious effects by competing and/or disrupting intracellular homeostasis of essential ions like calcium, iron, zinc and manganese (Himeno et al., 2002; Gomes et al., 2002; Clemens, 2006). In eukaryotes Cd^{2+} can be detoxified by its conjugation with glutathione (GSH) or other thiol-containing compounds like metallothioneins or phytochelatins (Li et al., 1997; Cobbett et al., 2002; Hirata et al., 2005). In the yeast *S. cerevisiae*, the complexes of bis(glutathionato)cadmium ($\text{Cd}-[\text{GS}]_2$) can be removed from the cytosol to the vacuole by specific transmembrane proteins such as the glutathione-conjugated transporter Ycf1p (Li et al., 1997).

The Ycf1p is an ATP-binding cassette protein that is homologous to the human multidrug resistance associated protein 1 (MRP1) and to the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (hCFTR) (Szczycka et al., 1994; Li et al., 1996). Upon Cd^{2+} stress, the promoter region of *YCF1* is regulated by the transcription factor Yap1p and by GSH availability (Wemmie et al., 1994; Mielniczki-Pereira, 2008). At post-translational level, the Ycf1p activity is induced by phosphorylation of Ser⁹⁰⁸ and Thr⁹¹¹; and down-regulated by phosphorylation of Ser²⁵¹ (Eraso et al., 2004; Paumi et al., 2008). In addition to Ycf1p it was recently described that an ATPase coded by *PMRI* can also contribute to Cd^{2+} tolerance in *S. cerevisiae* (Lauer-Júnior et al., 2008). The Pmr1p is a calcium (Ca^{2+}) pump located at Golgi membrane that belongs to the secretory-pathway Ca^{2+} -ATPases (SPCAs) family, which can promote Cd^{2+} detoxification possibly by a

mechanism associated to the secretory pathway (Missiaen et al., 2007; Lauer-Júnior et al., 2008).

Calcium (Ca^{2+}) is an essential element for living cells that participates in a broad variety of biological processes like morphogenesis, neurotransmission, cell adhesion and proliferation (Chattopadhyay and Brown, 2000). Moreover, this metal has a central role as intracellular cell messenger in eukaryotic cells (Schaub & Heizman, 2008). In aqueous solution, Cd^{2+} and Ca^{2+} ions have similar ionic radii (0,97 Å and 0,99 Å, respectively) and consequently several proteins containing Ca^{2+} binding motifs can also bind Cd^{2+} ions (Chao et al., 1990; Akiyama et al., 1990; Liu & Templeton, 2007). Considering that Pmr1p is the major Ca^{2+} ATPase of *S. cerevisiae* (Marchi et al., 1999), the use of this protein for Cd^{2+} detoxification is expected to alter calcium intracellular homeostasis and, as a consequence, the operation of other Ca^{2+} -transporters found in the cells.

In *S. cerevisiae* intracellular Ca^{2+} homeostasis is controlled by a small group of transporters, including the aforementioned protein Pmr1p, the vacuolar Ca^{2+} -ATPase Pmc1p, the vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchanger Vcx1p/Hum1p, and the vacuolar Yvc1p ionic channel (Bonilla and Cunningham, 2002). These transporters respond to the calmodulin/calcineurin-signaling pathway and are controlled by the transcription factor complex Tcn1p/Crz1p (Stathopoulos & Cyert; 1997; Matheos et al., 1997). Besides, the endoplasmic reticulum ATPase Cod1p/Spf1p also contributes to maintenance of intracellular Ca^{2+} levels in yeast (Cronin et al., 2002).

In this work, we investigate the relative contribution of Ycf1p and Pmr1p for Cd^{2+} tolerance in *S. cerevisiae*. For this purpose, we performed cytotoxic assays and analyses of Cd^{2+} content in single and double mutants for these proteins. Additionally, we analyze the transcriptional expression of yeast genes that encode intracellular Ca^{2+} -transporters (*PMR1*, *PMCI*, *VCX1*, *YVCI*, *COD1*) and calmodulin (*CMD1*) after Cd^{2+} stress. The results indicated a contribution of Ca^{2+} -ATPases in Cd^{2+} detoxification even in the presence of functional Ycf1p. We propose a model where Pmc1p and Pmr1p Ca^{2+} -ATPases operate in an integrative manner with Ycf1p to promote Cd^{2+} detoxification.

2. Materials and methods

2.1. Strains, plasmids and growth conditions

The strains of *S. cerevisiae* used in this work are isogenic of wild type BY4741 and their genotypes are described in Table 1. The strains were routinely maintained in YEPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) and pre-inoculated in SC complete medium (Burke et al., 2000) before experimental procedures. The *Escherichia coli* strain XL1-Blue (Table 1) was used as a recipient for cloning procedures and was grown in Luria–Bertani (LB) medium (1% tryptone, 0,5% yeast extract, 1% NaCl). For selection and propagation of plasmid-containing bacterial cells, the LB medium was supplemented with ampicillin solution at a final concentration of 150 µg/mL.

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* strains used in this study.

Organism	Strains	Genotypes	Source
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
	<i>ycf1Δ</i>	Idem BY4741 except <i>ycf1::kanMX4</i>	Euroscarf
	<i>pmr1Δ</i>	Idem BY4741 except <i>pmr1::kanMX4</i>	Euroscarf
	<i>pmr1Δycf1Δ</i>	Idem <i>pmr1Δ</i> except <i>ycf1::URA3</i>	This study
<i>E. coli</i>	XL-1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ.M15 Tn10</i> (Tetr)]	Invitrogen Corp.

2.2. Construction of double mutant *pmr1Δycf1Δ*

Standard molecular procedures for yeast and *E. coli* transformation, plasmid isolation, and DNA manipulation were performed as described by Ausubel et al. (1996). The bifunctional yeast–*E. coli* vector YCpLac33 (Gietz & Sugino, 1988) was used as template for amplification of *ycf1::URA3* disruption cassette.

The *pmr1Δycf1Δ* double mutant was obtained by disruption of *YCF1* gene by homologue recombination with an *ycf1::URA3* cassette. This cassette was amplified with Platinum's Taq DNA polymerase high fidelity (Invitrogen) and the primers described in table 2. Then, it was purified with PureLink™ gel extraction kit (Invitrogen) and employed for transformation of *pmr1Δ* strain. The disruption was confirmed by PCR and restriction analyses performed with phenol-chloroform purified genomic DNA from potential yeast transformant colonies selected in SC *ura*⁻.

2.3. Cd²⁺ sensitivity assays

The yeast strains were grown in SC medium at 30°C until stationary phase, then harvested by centrifugation (1 min/15,000×g) and washed twice with distilled water. For survival assays, 1.2 x 10⁷ cells/mL were treated in SC supplement or not with CdCl₂ (50, 100, 200 or 400 μM) and incubated for 4 h in an orbital shaker (100 rpm) at 30° C. After the treatments, cells were washed and diluted to 1.2 x 10³ cells/ mL. Aliquots of 100 μL were plated in SC solid medium and incubated at 30°C for 2-3 days for determination of survival colonies. For the drop test assay, cells were washed twice and diluted between 10⁸ and 10³ cells/ mL, and 10μL of each dilution were plated in SC solid medium containing CdCl₂ at the indicated concentration. The plates were incubated for 3-4 days at 30°C and then photographed.

2.4. Atomic absorption

The yeast strains were treated with 50 μM CdCl₂ as described in section 2.3. At 1 h intervals, 10 mL aliquots were collected. Then, 1 mL of these samples was used for survival determination and 9 mL were centrifuged and subjected to atomic absorption (Atomic Absorption Spectrometer, PerkinElmer 3100) for quantification of residual Cd²⁺ concentration in the supernatant. Cadmium content was estimated by determining the difference in metal concentration between control medium without biomass and test medium containing biomass. The results were normalized with respect to the number of surviving cells at each time point, and are expressed in micrograms of Cd²⁺ absorbed by 10⁷ surviving cells.

2.5. Semi quantitative RT-PCR

The strains were treated as described in section 2.3. After 4 h, cells were harvested for total RNA extraction using RNeasy® Mini Kit (Quiagen) according to manufacturer's instructions. About 200-300 ng of total RNA previously treated with DNase I amplification grade (Promega, USA) were subjected to first strand cDNA synthesis using the poly-T antisense primer, and the M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA). PCR was carried out with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and the specific primers described in Table 2. The reactions were performed with 20 ng of first strand cDNA, as exception in the case of *PMCI* and *CMDI* primers, for which were used 10 ng and 15 ng,

respectively. The *ACT1* gene was used as constitutive control. The PCR program used for all fragments was the follows: initial denaturation (94°C for 5 min), 27-31 cycles (94°C/30s; 60°C/60 s; 72°C/30 s), final extension (72 °C for 5min). All pairs of primers were tested with 27, 28, 29, 30 and 31 PCR cycles, and for each cDNA synthesized were made always two independent PCR reactions with the two best number of cycles for each gene. The semi-quantitative RT-PCR was performed at least three times with RNA samples extract in independent days.

The PCR products were submitted to electrophoresis in agarose gel (1.4%) stained with ethidium bromide. The images were acquired with Kodak Gel Logic 200 Imaging System and band intensity was measured with Kodak Molecular Imaging Software. The expression rate was obtained by dividing the band intensity of each individual gene for the intensity of correspondent *ACT1* band. The data are expressed as percentage of rate expression of treated samples in relation to the control sample, which was defined as relative expression.

Table 2. Primers used in this study.

Name	Sequence	Product length
<i>ycf1::URA3</i>	5'-ATGGCTGGTAATCTGTTCATGGGCCTGCAAGCTCTGTAGCAGTTGGACGATCGATGAT-3' 5'-TTAATTTTCATTGACCAAACAGCCTCCATGCACAGTGAACAGGGTTATTGTCTCATGAG-3'	1404 bp
<i>ACT1</i>	5'-TCTGCCGGTATTGACCAAAC-3' 5'-ATGGAAGATGGAGCCAAAGC-3'	164 bp
<i>YCF1</i>	5'- AAGACATTAGTTGGCGAGAAAAGGGA-3' 5'- AAGTGCCTGGCAACGTGTTTCATCAA-3'	146 bp
<i>PMR1</i>	5'- GGTACAGATGTAGCCAAAGAAGCCT-3' 5'- TAGTGCGGCAACAGAAGTAGACAAT-3'	150 bp
<i>PMCI</i>	5'-ACAGTCGCCGCTGTTGTTTC-3' 5'-CTGGTAATCGTTAGCGGCAC-3	171 bp
<i>VCX1</i>	5'-TGCCTTTAGAGCCACCCTAC-3' 5'-TGTTGCTCAAACAAGGCGTG-3'	156 bp
<i>COD1</i>	5'-GGCGACCTTAAAGGCTGTTG -3' 5'- TGACAGCAGCAAACAAGGCA-3'	160 bp
<i>YVC1</i>	5'-GCCGGAAAAACAATGGATCTC-3' 5'-GCCAGCTTCACAACCTTTGG-3'	170 bp
<i>CMD1</i>	5'- GCCCAGTGAAGCAGAAGTAAA -3' 5'- GCGGAGATTAACCATCACC -3'	180 bp

3. Results

3.1. Effect of *PMR1* deficiency in Cd²⁺ tolerance of the *ycf1*Δ strain

It was recently reported that yeast cells lacking a functional Pmr1p are very sensitive to Cd²⁺ stress (Lauer-Júnior et al., 2008). Therefore, we decided to investigate the relative contribution of this Ca²⁺-transporter for Cd²⁺ tolerance in relation to Ycf1p, the major factor associated with Cd²⁺ resistance in *S. cerevisiae*. For this purpose, we constructed a double mutant *pmr1*Δ*ycf1*Δ and compared its phenotype upon Cd²⁺ stress with single mutants for *YCF1* and *PMR1* genes. As expected, *ycf1*Δ cells were greatly sensitive to Cd²⁺ presence (Figure 1). Surprisingly, however, the strain *pmr1*Δ was not sensitive to Cd²⁺. Rather, in chronic Cd²⁺ treatments, this strain showed a moderate tolerance as compared to BY4741 (WT) (Figure 1A). Moreover, in double mutant *pmr1*Δ*ycf1*Δ the survival was restored to a level similar to that observed in the WT strain after the acute exposure to Cd²⁺ (Figure 1B).

These results were not in accordance with our previous observation that *pmr1*Δ (isogenic of W303 WT) is highly susceptible to Cd²⁺ treatment; and new survival assays confirmed that, in background of W303, this mutant is very sensitive to Cd²⁺ (data not shown). Although the data obtained in the background of BY4741 are in disagreement with the data obtained in the background of W303, they reinforced that Pmr1p can somehow respond to Cd²⁺ presence. In this sense, our next step was to analyze the profile of Cd²⁺ uptake to verify if, as previously observed in W303 background (Lauer-Júnior et al., 2008), the absence of Pmr1p in cells derived from BY4741 can also affect intracellular Cd²⁺ accumulation.

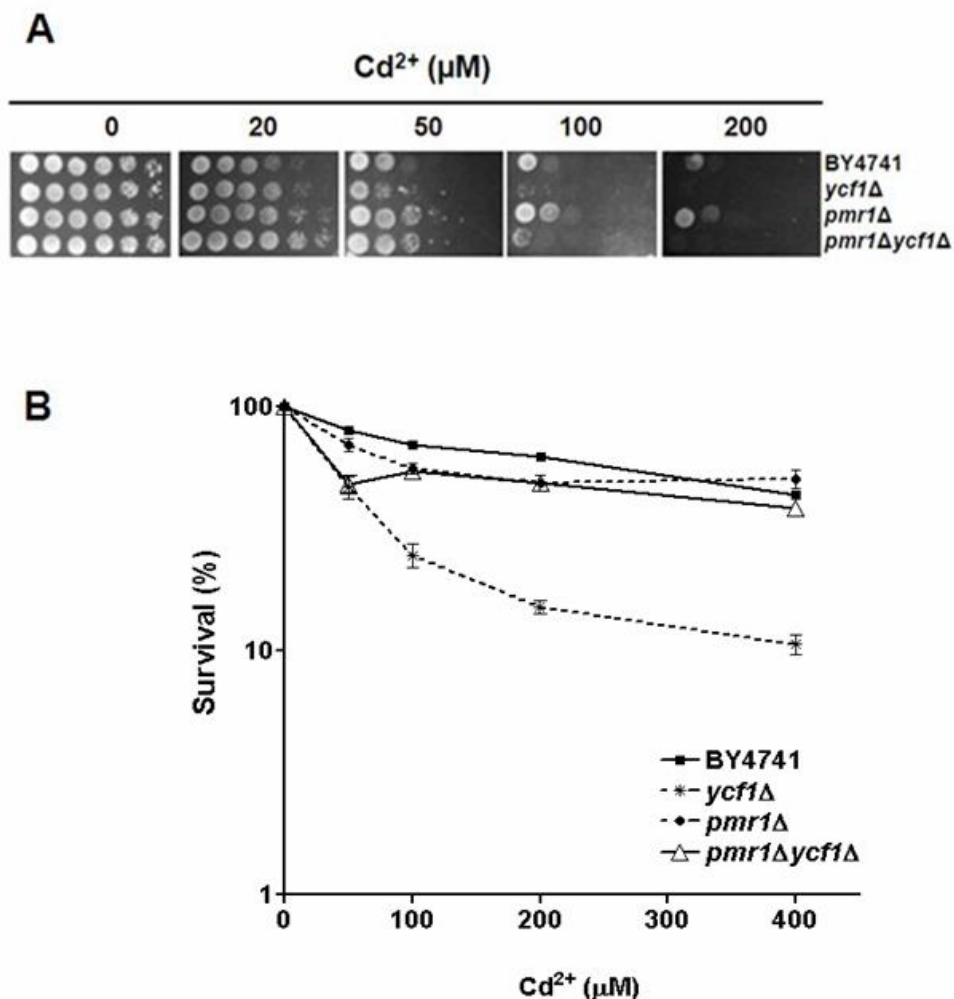


Figure 1. Yeast tolerance to Cd^{2+} . (A) Chronic exposure. Cells were diluted between 10^8 and 10^3 cells/mL, and $10\mu\text{L}$ of each dilution were plated in SC solid medium containing Cd^{2+} at the indicated concentration. (B) Acute exposure. About 1.2×10^7 cells/ mL were treated in SC medium supplemented or not with Cd^{2+} . After 4-h cells were diluted, plated and incubated at 30°C for survival determination. Data are expressed as mean \pm SEM. For some points, the error bars do not exceed the symbols size.

3.2. Profile of time-course Cd^{2+} uptake

To gain insights about the mechanism by which *PMR1* mutation can affect the tolerance of *ycf1* Δ strain to Cd^{2+} , a time-course Cd^{2+} uptake assay was performed (Figure 2). The results showed that BY4741 cells are loaded with Cd^{2+} during 2 h, but in the 3rdh about 43% of Cd^{2+} previously captured is release into the medium (0.82 ± 0.058 at 1h

against 0.47 ± 0.052 at 3h). In sequence, cells restart the capture of Cd^{2+} and after 4 h they have 60% more metal (1.34 ± 0.040) than in the first 2 h and also have the highest intracellular Cd^{2+} content as compared to the three mutant strains.

A significant variation in Cd^{2+} content over time was not detected for the *ycf1* Δ strain. However, after 4 h the Cd^{2+} present in this mutant is reduced about 26% in relation to the observed in WT cells (0.99 ± 0.004 in mutant strain), confirming previous data that indicated a decrease in Cd^{2+} accumulation in *ycf1* Δ (Gomes et al., 2002; Mielniczki-Pereira et al., 2008). Interestingly, *pmr1* Δ cells exhibited a profile of increasing Cd^{2+} accumulation over time; being that at 4h the Cd^{2+} content in these cells is approximately twice in relation to the 1st h (0.53 ± 0.092 and 1.09 ± 0.038 , respectively). The profile of *pmr1* Δ *ycf1* Δ was the same observed in the single mutant *pmr1* Δ , with the mutation in *YCF1* showing an additive effect upon Cd^{2+} uptake. These results confirm that Pmr1p is able to act in Cd^{2+} extrusion from the cells. Meanwhile, the mutation in *PMR1* (alone or simultaneously with *YCF1*) produces a delay in Cd^{2+} capture in relation to WT and to the single mutant *ycf1* Δ as seen in the 1st h of treatment (Figure 2); which can contribute to retard Cd^{2+} toxicity.

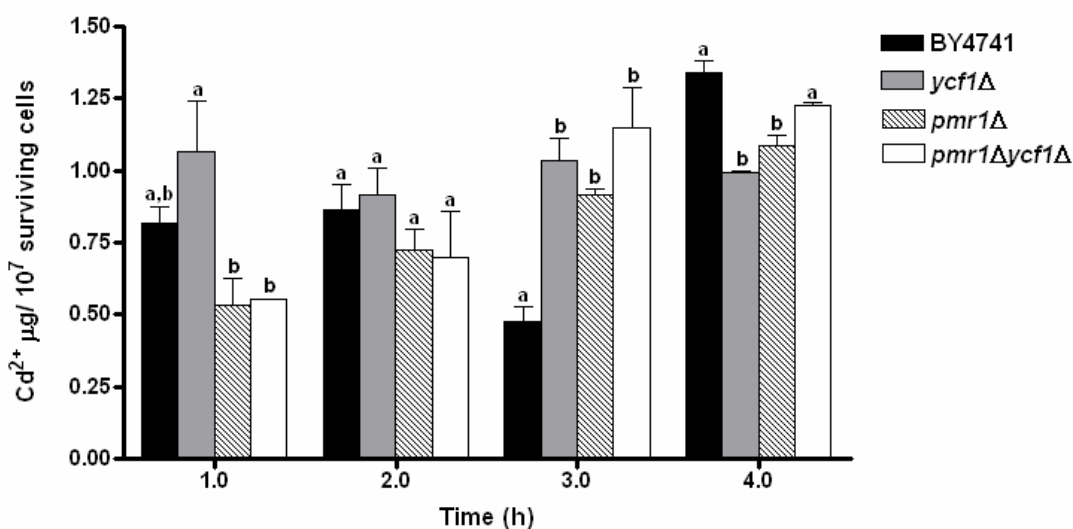


Figure 2. Profile of time-course Cd^{2+} uptake in BY4741 background. About 1.2×10^7 cells/mL were treated in SC supplement with $50 \mu\text{M}$ CdCl_2 and aliquots were collected at 1h-intervals. Data are presented as mean \pm SEM. Strains were compared at each time point by ANOVA one-way followed by Tukey–Kramer multiple comparisons test. The bars indicated by different letters are significantly different at the same time ($p < 0.05$).

3.3. Expression of Ca²⁺-intracellular transporters upon Cd²⁺ stress

The prevalence of the phenotype produced by *PMRI* mutation upon that produced by *YCFI* mutation after Cd²⁺ exposure (Figure 1) can indicate that *pmr1Δ* cells have intrinsic characteristics able to overcome the absence of Ycf1p. Considering this hypothesis, we tested if *YCFI* or other genes related to Ca²⁺ homeostasis can respond differentially to Cd²⁺ stress in the *pmr1Δ* strain. For this purpose, we investigated the Cd²⁺ effect upon the mRNA levels of *YCFI*, *PMCI*, *VCXI*, *YVCI*, *CODI*, and calmodulin (*CMDI*), a known regulator of Ca²⁺ homeostasis in yeast (Figure 3).

Expression of *YCFI* in the WT strain was strongly induced only in the highest Cd²⁺ concentration tested (400 μM), while the *PMRI* was not induced neither in 50 μM or 400 μM. Rather, this gene showed a tendency of down-regulation (Figure 3, A-B). A similar tendency was observed in the expression of *VCXI* transporter and of the regulatory gene *CMDI*. Expression of the *CODI* gene was not changed in response to Cd²⁺ presence, while *YVCI* suffered a slight increase in its expression in the presence of 400 μM Cd²⁺. Interestingly, *PMCI* (which codes for a vacuolar Ca²⁺-transporter) was the only up regulated at the concentration of 50 μM Cd²⁺ (Figure 3, A-B). Unlike the observed with WT cells, the expression of *PMRI* increased about 35% in the mutant *ycf1Δ* after both Cd²⁺ treatments; and a similar pattern was achieved by the genes *YVCI*, *CODI* and *CMDI* (Figure 3, C-D). In addition, in *ycf1Δ* cells the induction of *PMCI* was clearly stronger than that observed in WT cells.

In the single mutant *pmr1Δ* the general profile of *YCFI* expression is maintained as in WT, but a slight increase can be noted in the expression level at 400μM (Figure 3, E-F). The *YVCI* gene suffers a similar up-regulation in *pmr1Δ* as in *ycf1Δ* cells, while expression of the genes *VCXI*, *CODI* and *CMDI* increased only at 400 μM of Cd²⁺ in the absence of Pmr1p. Once again the raising of *PMCI* expression in response to Cd²⁺ was higher in *pmr1Δ* than in WT cells, such that its expression at 400 μM was comparable to that observed for *YCFI* (Figure 3, E-F). The double mutant *pmr1Δycf1Δ* showed enhanced activation of *PMCI* as compared to the *pmr1Δ* single mutant; achieving almost the same level observed in the *ycf1Δ* single mutant (Figure 3, G-H). The genes *VCXI* and *CMDI* were induced by Cd²⁺ in *pmr1Δycf1Δ* similarly as in *pmr1Δ*, but the expression of *CODI* followed the profile observed in *ycf1Δ* cells. In the case of *YVCI*, the absence of both

PMR1 and *YCF1* genes, results in loss of gene induction in response to Cd^{2+} (Figure 3, G-H).

The data showed that the *pmr1* Δ strain has a slight increase in the induction of *YCF1* in relation to the WT, but this increase alone is not sufficient to explain the resistance to Cd^{2+} observed in this mutant. In the same way, the differences in the Cd^{2+} -induction for the other analyzed genes are subtle between *ycf1* Δ and *pmr1* Δ . However, the early up-regulation of *PMCI* in response to Cd^{2+} observed in the WT strain points to the participation of Pmc1p in Cd^{2+} tolerance. Therefore, we hypothesized that the differences in Cd^{2+} tolerance observed in the background of BY4741 could be related to differences in the basal level of *PMCI* expression and we found that the expression of this gene in cells lacking Pmr1p is at least 2.5 times higher than in WT cells (Figure 4). In *ycf1* Δ mutants the basal level of *PMCI* is increased about 50%. Besides, in *pmr1* Δ mutants the basal expression of *YCF1* is also 70% higher than WT.

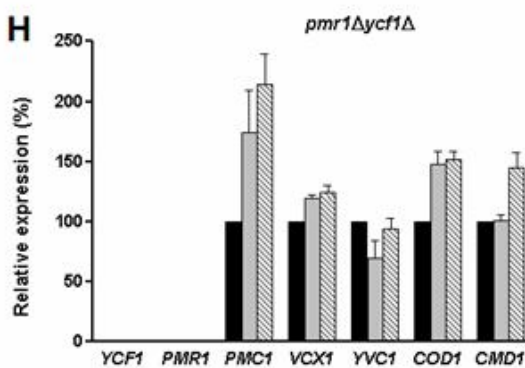
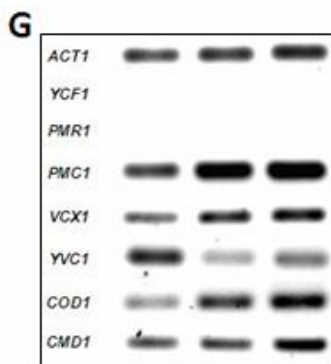
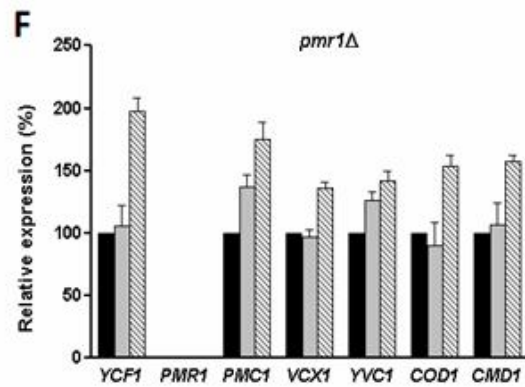
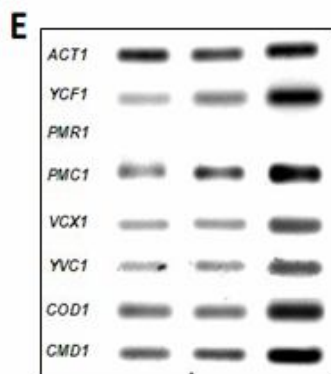
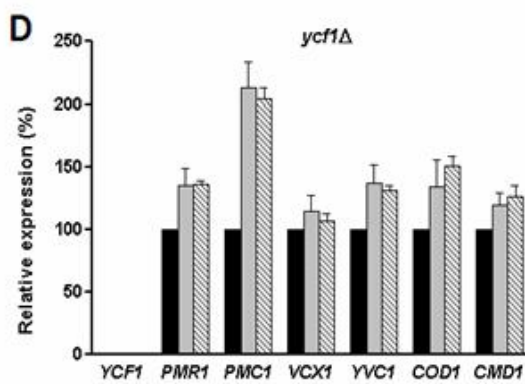
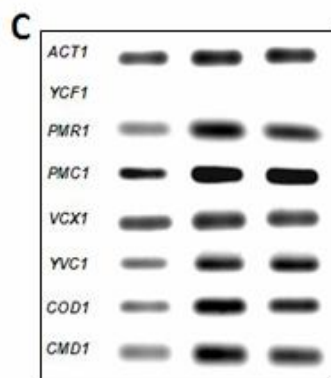
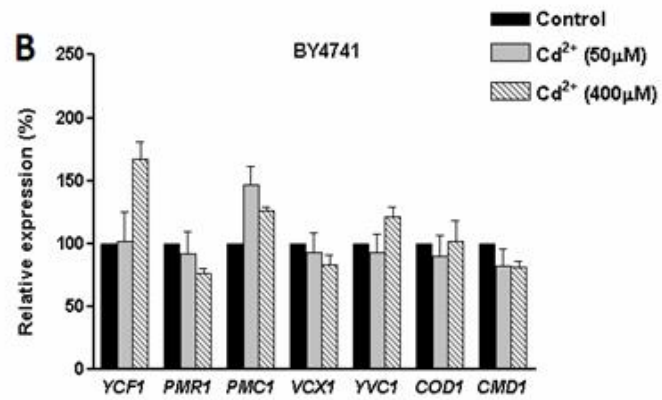
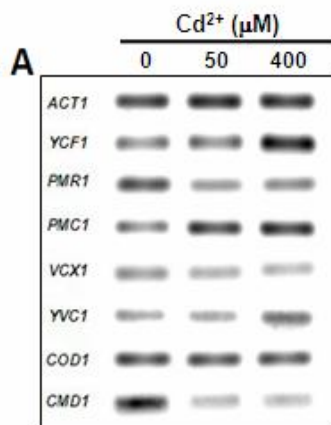


Figure 3. Profile of gene expression after Cd²⁺ treatment in BY4741 background. About 1.2 x 10⁷ cells/mL were treated in SC supplement or not with CdCl₂ (50 or 400μM). After 4 h, the cells were collected and total RNA extracted as described in materials and methods. (A,C,E,G) Representative images of bands obtained for each gene in BY4741, *ycf1Δ*, *pmr1Δ* and *pmr1Δycf1Δ* strains, respectively. Constitutive control (*ACT1*) is shown in the first line. (B,D,F,H) Graphic representation of expression pattern in BY4741, *ycf1Δ*, *pmr1Δ* and *pmr1Δycf1Δ* strains, respectively. Relative expression was calculated as described in materials and methods. The data are expressed as mean ± SEM.

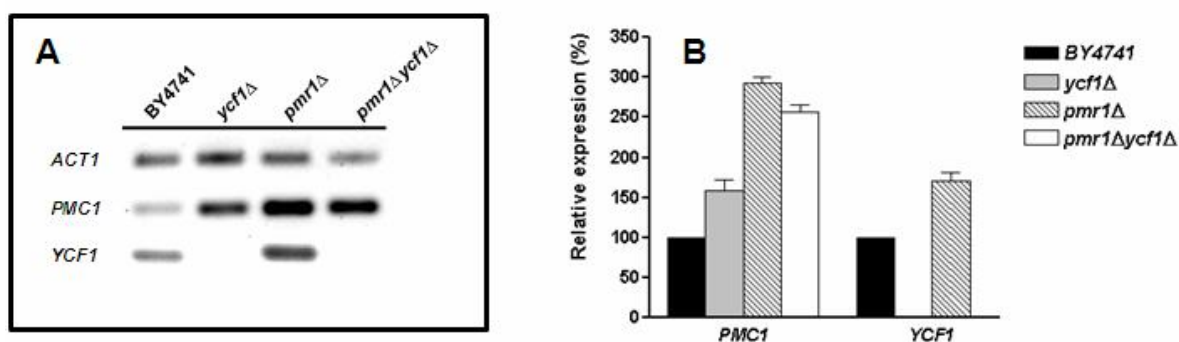


Figure 4. Basal expression of *PMCI* and *YCF1* genes in BY4741 background. About 1.2 x 10⁷ cells/mL were incubated in SC medium (not supplement with CdCl₂). After 4 h, the cells were collected and total RNA extracted as described in materials and methods. (A) Representative images of bands obtained in BY4741, *ycf1Δ*, *pmr1Δ* and *pmr1Δycf1Δ* strains, respectively. Constitutive control (*ACT1*) is shown in the first line. (B) Graphic representation of expression pattern. Relative expression was calculated as described in materials and methods. The data are expressed as mean ± SEM.

4. Discussion

In *S. cerevisiae*, the detoxification of Cd²⁺ ions is mainly associated to the activity of Ycf1p. However, recent works suggest that additional routes can help yeast cells to cope with Cd²⁺ toxicity. For example, low GSH availability down-regulates the *YCF1* promoter even in the presence of Cd²⁺ - which is strong evidence that accessory pathways related to Cd²⁺ tolerance are present in yeast (Mielniczki-Pereira et al., 2008). Moreover, we have

demonstrated that the Ca^{2+} ATPase Pmr1p participates in Cd^{2+} tolerance possibly by a mechanism involving the secretory pathway, since the *pmr1* Δ strain accumulates more Cd^{2+} than the WT strain W303 (Lauer-Júnior et al., 2008). In this work we investigated the relative contribution of Ycf1p and Pmr1p for Cd^{2+} resistance in *S. cerevisiae*.

We found that the Pmr1p can really act in the export of Cd^{2+} from the cells. In fact, WT BY4741 is able to release into the medium part of Cd^{2+} ions that it had previously incorporated; and this event allows a new round of Cd^{2+} uptake. In the absence of Pmr1p this capacity of Cd^{2+} export is lost; and cells accumulate increasing concentrations of the metal (Figure 2). The amount of Cd^{2+} incorporated by the *ycf1* Δ strain does not suffer a great variation over-time (Figure 2), possibly because the presence of $\text{Cd}-[\text{GS}]_2$ complexes in the cytosol has a feedback negative effect upon Cd^{2+} uptake as previously described (Gomes et al., 2002) and because these complexes are not good substrates for Pmr1p – which is a member of the secretory-pathway Ca^{2+} -ATPases (SPCAs) family, characterized to transport only a single molecule of Ca^{2+} or Mn^{2+} (Sorin et al., 1997; Missiaen et al., 2007). In addition, mutation in *PMR1*, alone or simultaneously with *YCF1*, produces a delay in Cd^{2+} capture. In the *pmr1* Δ strain, depletion of Ca^{2+} from secretory compartments is able to promote an increase in Ca^{2+} uptake from the extracellular medium by a mechanism that resembles the Ca^{2+} -capacitative entry (CCE) of mammalian cells (Locke et al., 2002). This process is mediated by increased activity of Cch1p/Mid1p – a cell membrane calcium transporter system (Locke et al., 2002); and it is expect that Cd^{2+} and Ca^{2+} can compete for it. We believe that the high-affinity of this transporter for Ca^{2+} ions, as well intracellular demand for these ions in the absence of Pmr1p, could favor the early uptake of Ca^{2+} instead of Cd^{2+} . After some time, competition between Ca^{2+} and Cd^{2+} should be softened by reduction of Ca^{2+} environmental levels and, in turn, Cd^{2+} uptake becomes more effective.

Despite of the clear time-course increased Cd^{2+} accumulation observed in mutants lacking functional Pmr1p, the participation of this transporter in Cd^{2+} detoxification seems to be a secondary event, since the *PMR1* gene is not induced by Cd^{2+} treatment in WT cells, even at high metal concentration (Figure 3, A-B). The expressions data indicate that the primary response to Cd^{2+} toxicity is mediated by the well known role of Ycf1p; with an additional contribution of the Ca^{2+} - transporter Pmc1p, which were the only ones up-regulated by Cd^{2+} in WT cells (Figure 3, A-B). Interestingly, it seemed that the *PMR1* gene

has an earlier activation in response to Cd^{2+} as compared with *YCF1* (Figure 3, A-B). Our previous observations showed that, in specific conditions (e.g. respiratory metabolism), small Cd^{2+} concentration can down-regulate the *YCF1* promoter and then “save” GSH for maintenance of the intracellular redox state (Mielniczki-Pereira et al., 2008). In this sense, *PMCI* arises as a good candidate to perform a GSH-independent mechanism of Cd^{2+} detoxification in the background of BY4741 cells. *PMCI* encodes a vacuolar Ca^{2+} transporter not essential for viability under normal growth conditions; however, it plays an essential role in yeast tolerance to high Ca^{2+} stress (Cunningham and Fink, 1994; Miseta et al., 1999). The ionic similarities between Ca^{2+} and Cd^{2+} ions, and the proeminent induction of *PMCI* in response to Cd^{2+} in the *ycf1* Δ strain (Figure 3, C-D), allow to infer that Pmc1p can really help yeast cells to cope with Cd^{2+} toxicity. In addition, strains lacking functional Ycf1p can also activate the *PMRI* gene as an accessory pathway to try to remove Cd^{2+} from the cytosol (Figure 3, C-D).

Deletion of the *PMRI* gene in cells derived from WT BY4741 can overcome the Cd^{2+} sensitivity produced by the absence of Ycf1p (Figure 1). This was a surprising result, since in a prior study Lauer-Junior and co-workers (2008) observed that *pmr1* Δ mutant derived from W303 is strongly sensible to Cd^{2+} exposure. However, testing both *pmr1* Δ mutants in the same assay conditions, we confirmed their distinct phenotypes face to Cd^{2+} stress (data not shown). This intriguing result prompted us to investigate the hypothesis that the *pmr1* Δ strain, isogenic to BY4741, has intrinsic characteristics that favor its survival in the presence of Cd^{2+} . In fact, we observed that *pmr1* Δ have a slight increase in the level of *YCF1* induction after Cd^{2+} exposure as compared to BY4741, but this increase alone is not sufficient to explain the restored resistance to Cd^{2+} observed in the double mutant *pmr1* Δ *ycf1* Δ . Moreover, the survival assay showed that at 50 μM of Cd^{2+} the double mutant has the same sensibility observed in the single mutant *ycf1* Δ (Figure 1B), which points to the activation of an Ycf1p-independent mechanism for restoring the resistance to Cd^{2+} in the absence of Pmr1p. Based on the aforementioned results, we hypothesized that this Ycf1p-independent mechanism could be related to *PMCI* basal expression; and our results showed that expression of *PMCI* in cells lacking Pmr1p is more than 2.5 times higher than in BY4741 WT cells under the absence of Cd^{2+} (Figure 4). Comparatively, a moderate increase in *PMCI* basal expression was also observed in *ycf1* Δ

(50%), which indicates that the compensative effect of Pmc1p in absence of Ycf1p could not be restricted to response to Cd²⁺ stress.

Previous work demonstrated that in WT yeast strain W303, the basal expression of *PMR1* gene is higher than *PMCI* during all growth phases, with *PMR1* reaching levels 12 folds higher than *PMCI* (Marchi et al., 1999). In the W303 isogenic-derived strain *pmr1Δ*, the expression of *PMCI* rises about 5 times, but still is at least two times smaller than the *PMR1* expression in WT cells (Marchi et al., 1999). However, our expression analysis points to high expression of *PMCI* as compared with *PMR1*. In fact, to perform the semi-quantitative RT-PCR we used about 20 ng of cDNA for analyzing all genes, except for the *CMD1* and *PMCI* genes. In the latter case, to avoid PCR saturation, it was necessary to reduce the cDNA amount to 15 ng and 10 ng, respectively (see Materials and Methods, section 2.5). This is a clear indication that the expression of *PMCI* is higher than *PMR1* in the genetic background of the BY4741 strain. Indeed, the literature data support that the *PMR1* and *PMCI* expression patterns could be strain-specific. Cunningham and Fink (1996) described that, in the genetic background of the W303, strain the double mutant *pmr1Δpmc1Δ* is not viable unless followed by the disruption of the calmodulin/calcinerium pathway (Cunningham and Fink, 1996). On the other hand, Kellermayer and co-workers (2003) have constructed viable *pmr1Δpmc1Δ* strains in the context of the WT strain SEY6210. In this sense, the primary use of Pmr1p or Pmc1p to retain Cd²⁺ toxicity could depend on the availability of each carrier. Therefore, rescue of Cd²⁺ tolerance in *pmr1Δ* and *pmr1Δycf1Δ* derived from BY4741 probably is obtained by a sum of the following factors: (i) increased of basal *YCF1* and *PMCI* expression (Figure 4); (ii) stronger up-regulation of *YCF1* and *PMCI* in response to Cd²⁺ (Figure 3, A-H); (iii) delay in Cd²⁺ uptake (figure 2). In addition, we do not discard other specific responses at post translational level or mediated by genes not included in our study. For example, both *YCF1* and *PMCI* can be differentially regulated at the post-translational level (Takita et al., 2001; Eraso et al., 2004; Paumi et al., 2008).

The results about expression of *YVC1*, *VCX1*, *COD1* and *CMD1* bring some ideas about cellular internal reorganization in response to Cd²⁺. In the WT strain, it was observed a slight increase of *YVC1* gene expression face to Cd²⁺ exposure and this phenotype was stronger in both *pmr1Δ* and *ycf1Δ* single mutants (Figure 3, A-F). The protein Yvc1p is a vacuolar ionic channel that acts in the generation of Ca²⁺ signals after osmotic stress and

after exposure to the antifungal drug amiodarone (Denis and Cyert, 2002; Gupta et al., 2003). However, this pathway is lost in the double mutant *pmr1Δycf1Δ* (Figure 3, G-H). Then, we speculate that Yvc1p can also produce Ca^{2+} signals in response to Cd^{2+} stress which, in turn, could activate biochemical pathways to cope with Cd^{2+} toxicity. In support of this hypothesis, Liu and co-workers (2007) demonstrated that apoptosis induced by Cd^{2+} in carcinoma human cells can be initiated by the rapid elevation of intracellular Ca^{2+} , followed by calcium-mediated activation of PI3K/Akt and mitochondrial impairment.

In the same way, variations in *VCXI* and *CMDI* expression could be related to intracellular signaling mediated by Ca^{2+} and/or a simple response to adjust Ca^{2+} homeostasis. Vcx1p is a vacuolar $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger involved in control of cytosolic Ca^{2+} concentration, which also promotes dissipation of Ca^{2+} signals by rapid capture of this ion into the vacuole (Miseta et al., 1999). The gene *CMDI* encodes for a Ca^{2+} binding protein that regulates many processes including responses to various stress conditions and which was described as a negative regulator of Vcx1p in response to high Ca^{2+} environmental concentrations (Stathopoulos & Cyert; 1997; Matheos et al., 1997). Meanwhile, at least at the mRNA level, this negative regulation of *VCXI* by *CMDI* was not observed in response to Cd^{2+} stress (Figure 3, A-H). Besides, the contribution to Vcx1p to direct Cd^{2+} detoxification could be minimal, since it is not induced by the metal in BY4741. Accordingly, it was reported that overexpression of *VCXI* provides only a moderate increase in Cd^{2+} resistance (Pittman et al., 2004). In view of the dual participation of Cod1p in unfolded protein response (UPR) and Ca^{2+} homeostasis (Cronin et al., 2002), their up-regulation seen in the three mutant strains (Figure 3, C-H) could point to an endoplasmic reticulum (ER) stress induced by Cd^{2+} toxicity. Indeed, it was recently demonstrated that in murine fibroblasts, Cd^{2+} treatment alters ER Ca^{2+} -homeostasis promoting UPR activation and apoptosis (Biagioli et al., 2008). New studies are necessary to confirm these hypotheses regarding *YVCI*, *VCXI*, *CODI* and *CMDI* responses to Cd^{2+} in yeast.

4.1. An integrative model of Ycf1p and Ca^{2+} -transporters operation upon Cd^{2+} stress

Based in our results, we propose an integrative model of Ycf1p and Ca^{2+} -transporters operation upon Cd^{2+} stress, with emphasis on the action of Pmr1p and Pmc1p (Figure 5). Yeast cells exposed to environmental Cd^{2+} take up this metal through the

activity of transporters of divalent essential metals; including the Cch1p/Mid1p high affinity Ca^{2+} system. Cd^{2+} competes with essential ions and, in the case of Ca^{2+} , the demand of internal cell compartments can drive Ca^{2+} or Cd^{2+} early capture. However, after some time, the reduction of Ca^{2+} external availability can favor the entry of Cd^{2+} into the cells, due to decrease in the proportion of $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{Cd}^{2+}]$ ions. Once inside cells, Cd^{2+} can bind two GSH molecules forming $\text{Cd}[\text{GS}]_2$ complexes, which, in turn, are removed from the cytosol by Ycf1p. Alternatively, Cd^{2+} can be detoxified by GSH-independent pathways, as those mediated by Pmr1p or Pmc1p. The choice for one or another pathway is probably related to a balance between Cd^{2+} toxicity and metabolic status of the cells. Low Cd^{2+} concentration and high intracellular necessities of GSH are expected to drive more Cd^{2+} to Pmr1p or Pmc1p. Cd^{2+} captured by Pmr1p into the Golgi will be released to the extracellular medium by the secretory pathway. On the contrary, high Pmc1p expression will promote Cd^{2+} sequestration into vacuoles. In cells with high expression of Pmc1p when compared to Pmr1p, the first carrier probably will be more responsive to Cd^{2+} . In high Cd^{2+} concentrations, simultaneous activation of GSH-dependent (e.g. Ycf1p) and independent detoxification systems can occur. In addition, if one of these mechanisms is impaired, cells will try a compensation by up-regulating those operative mechanisms. This situation could produce a high degree of cell injury, including inhibition of mismatch repair, lipid peroxidation, and extensive oxidation of proteins. As a result, cells could trigger an endoplasmic reticulum stress and activate unfolded protein response mediated by Cod1p. We also speculate that Ycv1p can produce Ca^{2+} signals in response to Cd^{2+} presence which, in turn, could activate biochemical pathways to cope with Cd^{2+} toxicity. Ultimately, Cd^{2+} can be exported out of the cells directly by membrane proteins, such as Yor1p, Alr1p or Pca1p. The protein Yor1p is an ABC transporter that provides Cd^{2+} resistance when cells are exposed to low temperatures. However, the mechanism of Yor1p action is postulated to be GSH-dependent (Nagy et al., 2004). The gene *ALR1* encodes an Mg^{2+} -transporter, which could contribute to Cd^{2+} detoxification and efflux out of cells (Kern et al., 2005). The P1b-type ATPase coded by the *PCAI* gene has been described as a new Cd^{2+} efflux pump. Cd^{2+} dramatically increases Pca1p expression through post-transcriptional regulation, and promotes relocation of the protein to the plasma membrane. However, Pca1p is non-functional in some laboratory yeast strains (Adele et al., 2007).

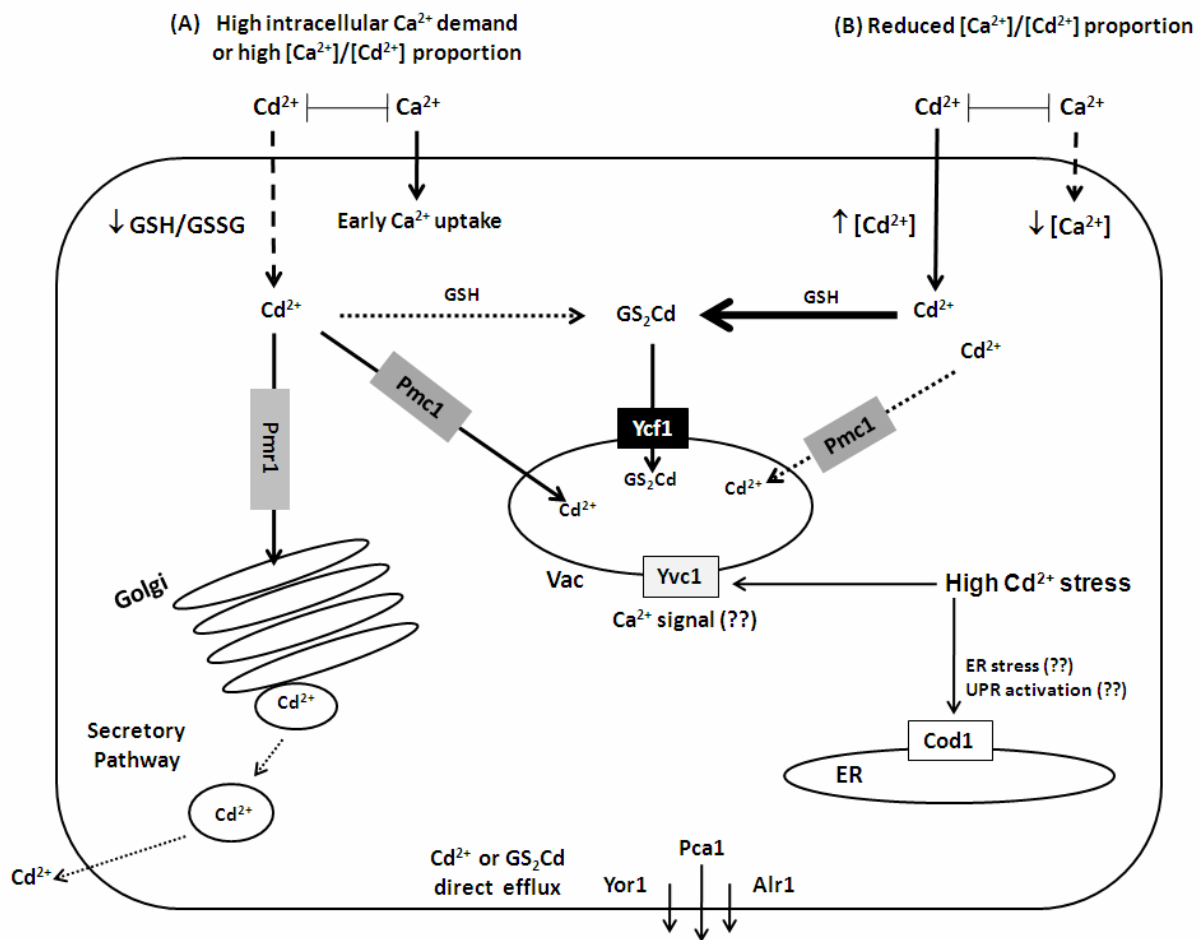


Figure 5. Integrative model of Ycf1p and Ca²⁺-transporters operation upon Cd²⁺ stress. (A) Low Cd²⁺ concentration and/or low GSH intracellular availability promotes Cd²⁺ detoxification by GSH independent mechanisms, as those mediated by Pmr1p or Pmc1p. This scenario can be achieved when cell's internal demand for essential ions improves their uptake through high-affinity transporters, resulting in a delay in Cd²⁺ uptake through same pathway (as observed in *pmr1*Δ cells). The use of Pmc1p or Pmr1p mediated detoxification will depend on the availability of each carrier. Since in this scenario, some Cd²⁺ are linked to GSH due to its high affinity for sulfidril groups; and the generated Cd.[GS]₂ complexes are sequestered into the vacuole by Ycf1p. **(B)** High intracellular Cd²⁺ can be achieved by long time exposure of the cells to the metal, which will reduce extracellular essential ions concentration and favor Cd²⁺ uptake due to decrease in the proportion of [Ca²⁺]/ [Cd²⁺] ions. In this scenario, the major pathway for Cd²⁺ detoxification is that mediated by Ycf1p. Besides, higher expression of *PMCI* and *PMRI* may contribute to the removal of Cd²⁺ from the cytosol. Pronounced Cd²⁺ stress produces a

high degree of cell injury and probably can trigger ER stress and activate the UPR pathway, which is mediated by Cod1p up-regulation. Besides, Ycv1p can produce Ca^{2+} signals in response to Cd^{2+} presence which, in turn, could activate biochemical pathways to cope with Cd^{2+} toxicity. In the two scenarios (**A and B**), some Cd^{2+} can be effluxed out of the cells directly by membrane proteins, such as Yor1p, Alr1p or Pca1p. Vac (vacuole), Golgi (Golgi apparatus), ER (endoplasmic reticulum), UPR (unfolded protein response). For more details see discussion text.

Acknowledgments

We thank Dra. Jacqueline Moraes Cardone and Dra. Cassiana Macagnan Viau for help with expression analyses. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROCAD/CAPES, Grant no. 0306053) and GENOTOX/Instituto ROYAL (CBiot-UFRGS).

References

- Adle, D.J., Sinani, D., Kim, H., Lee, J., 2007. A cadmium-transporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282, 947–955.
- Akiyama, K., Sutoo, D., Reid, D.G. 1990. A ¹H-NMR comparison of calmodulin activation by calcium and by cadmium. *Jpn. J. Pharmacol.* 53, 393-401.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed. John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 13–30.
- Beyersmann, D, Hartwig, A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* 82, 493–512.
- Biagioli, M., Pinton, P., Scudiero, R., Ragghianti, M., Bucci, S., Rizzuto, R. 2005. Aequorin chimeras as valuable tool in the measurement of Ca²⁺ concentration during cadmium injury. *Toxicology.* 208, 389-98.
- Bonilla, M., Cunningham, K.W. 2002. Calcium release and influx in yeast: TRPC and VGCC rule another kingdom. *Sci. STKE.* 127,1-3.
- Burke, D., Dawson, D., Stearns, T., 2000. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. CSH Laboratory Press, New York, p. 174.
- Chao, S. H., Bu, C. H., Cheung, W. Y. 1990. Activation of troponin C by Cd²⁺ and Pb²⁺. *Arch. Toxicol.* 64, 490-496.
- Chattopadhyay, N., Brown, EM. 2000. Cellular "sensing" of extracellular calcium (Ca²⁺)_o: emerging roles in regulating diverse physiological functions. *Cell Signal.* 12, 361-6.
- Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie.* 88,1707-1719.
- Cobbett, C. & Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53, 159–82.
- Cronin, S.R., Rao, R., Hampton, R.Y. 2002. Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. *J. Cell Biol.* 157, 1017–1028.
- Cunningham, K.W., Fink, G. 1996. Calcineurin inhibits VCX1-Dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2226–2237.
- Cunningham, K.W., Fink, G.R. 1994. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMCI*, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *J. Cell Biol.* 124, 351-363.

- Denis, D., Cyert, M.S. 2002. Internal Ca^{2+} release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J. Cell Biol.* 156, 29–34.
- Eraso, P., Martínez-Burgos, M., Falcón-Pérez, J.M., Portillo, F., Masón, M. J. 2004. Ycf1-dependent cadmium detoxification by yeast requires phosphorylation of residues Ser908 and Thr911. *FEBS Lett.* 577, 322–326.
- Gietz, R.D., Sugino, A. 1988. New yeast–*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527–534.
- Gomes, D.S., Fragoso, L.C., Riger, C.J., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2002. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 21–25.
- Gupta, S.S., Ton, V., Beaudry, V., Rulli, S., Cunningham, K., Rao, R. 2003. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 28831–28839.
- Himeno, S., Yanagiya, T., Enomoto, S., Kondo, Y., Amura, N. 2002. Cellular cadmium uptake mediated by the transport system for manganese. *Tohoku J. Exp. Med.* 196, 43–50.
- Hirata, K., Tsuji, N., Miyamoto, K. 2005. Biosynthetic regulation of phytochelatins, heavy metal-binding peptides. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 593–599.
- Huff, J., Lunn, R.M., Waalkes, M.P., Tomatis, L., Infante, P.F. 2007. Cadmium induced cancers in animals and in humans. *Int J Occup Environ Health.* 13, 202–212.
- Kazantzis, G. 2004. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *Biometals.* 17, 493–498.
- Kellermayer, R., Aiello, D.P., Miseta, A., Bedwell, D.M. 2003. Extracellular Ca^{2+} sensing contributes to excess Ca^{2+} accumulation and vacuolar fragmentation in a *pmr1* Δ mutant of *S. cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* 116, 1637–1646.
- Kern, A.L., Bonatto, D., Dias, J.F., Yonema, M., Brendel, M., Henriques, J.A.P., 2005. The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: insights from phylogenetic studies and particle-induced X-ray emission. *Biometals* 18, 31–41.
- Lauer-Júnior, C.M., Bonatto, D., Mielniczki-Pereira, A.A., Schuch, A.Z., Dias, J.F., Yoneama, M.L., Pêgas Henriques, J.A. 2008. The Pmr1 protein, the major yeast Ca^{2+} -ATPase in the Golgi, regulates intracellular levels of the cadmium ion. *FEMS Microbiol. Lett.* 285, 79–88.
- Li, Z., Lu, Y., Zhen, R., Szczypka, M., Thiele, D.J. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proceedings Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 42–47.
- Li, Z., Szczypka, M., Lu, Y., Thiele, D.J., Real, P.A. 1996. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* 271, 6509–6517.

- Liu, Y., Templeton, D.M. 2007. Cadmium activates CaMK-II and initiates CaMK-II-dependent apoptosis in mesangial cells. *FEBS Lett.* 581, 1481–1486.
- Liu, Z.M., Chen, G.G., Vlantis, A.C., Tse, G.M., Shum, C.K., Van Hasselt, C.A. 2007. Calcium-mediated activation of PI3K and p53 leads to apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1428–1436.
- Locke, E.G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y., Cunningham, K.W. 2000. A homolog of voltage-gated Ca²⁺ channels stimulated by depletion of secretory Ca²⁺ in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6686-6694.
- Marchi, V., Sorin, A., Wei, Y., Rao, R. 1999. Induction of vacuolar Ca²⁺-ATPase and H⁺/Ca²⁺ exchange activity in yeast mutants lacking Pmrl, the Golgi Ca²⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 454, 181-186.
- Matheos, D.N., Kingsbury, T.J., Ahsan, U.S., Cunningham, K.W. 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11, 3445-3458.
- Mielniczki-Pereira, A.A., Schuch, A.Z., Bonatto, D., Cavalcante, C.F., Vaitsman, D.S., Riger, C.J., Eleutherio, E.C.A., Henriques, J.A.P. 2008. The role of the yeast ATP-binding cassette Ycf1p in glutathione and cadmium ion homeostasis during respiratory metabolism. *Toxicol. Lett.* 180, 21–27.
- Miseta, A., Kellermayer, R., Aiello, D.P., Fu, L., Bedwell, D.M. 1999. The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.* 451, 132-136.
- Missiaen, L., Dode, L., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Wuytack, F. 2007. Calcium in the Golgi apparatus. *Cell Calcium* 41, 405–416.
- Nagy, Z., Montigny, C., Leverrier, P., Yeh, S., Goffeau, A., Garrigos, M., Falson, P. 2006. Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. *Biochimie* 88, 1665–1671.
- Nordberg, M., 1984. General aspects of cadmium: transport, uptake and metabolism by the kidney. *Environ. Health Perspect.* 54, 13-20.
- Paumi, C. M., Chuk, M., Chevelev, I., Stagljjar, I., Michaelis, S. 2008. Negative regulation of the yeast ABC transporter Ycf1p by phosphorylation within its n-terminal extension. *J. Biol. Chem.* 283, 27079–27088.
- Pittman, J.K., Cheng, N., Shigaki, T., Kunta, M., Hirschi, K.D. 2004. Functional dependence on calcineurin by variants of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p. *Mol. Microbiol.* 54, 1104–1116.
- Rigon, A.P., Cordova, F.M., Oliveira, C.S., Posser, T., Costa, A.P., Silva, I.G., Santos, D.A., Rossi, F.M., Rocha, J.B., Leal, R.B. 2004. Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38 MAPK. *Neurotoxicology.* 29, 727-734.

Satarug, S., Moore, M.R. 2004. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health Perspect.* 112, 1099-1103.

Schaub, M.C., Heizmann, C.W. 2008. Calcium, troponin, calmodulin, S100 proteins: from myocardial basics to new therapeutic strategies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 247–264.

Sorin, A., Rosas, G., Rao, R. 1997. *PMR1*, a Ca^{2+} -ATPase in Yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 272, 9895–9901.

Stathopoulos, A.M., Cyert, M.S. 1997. Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* 11, 3432-3444.

Szczyпка, M.S., Wemmie, J.A., Moye-Rowley, W.S., Thiele, D.J. 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* 269: 22853–22857.

Takita, Y., Engstrom, L., Ungermann, C., Cunningham, K.W. 2000. Inhibition of the $\text{Ca}^{(2+)}$ -ATPase Pmc1p by the v-SNARE protein Nyv1p. *J. Biol. Chem.* 276, 6200-6206.

Wemmie, J.A., Szczyпка, M.S., Thiele, D.J., Moye-Rowley, W.S. 1994. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J. Biol. Chem.* 269: 32592–32597.

WHO. Nordic Council of Ministers: Cadmium Review. World Health Organization, 1 (4): 1-24, 2003. Available in: http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr_cadmium.pdf.



DISCUSSÃO GERAL

O Cd^{2+} é um metal extremamente tóxico para os organismos vivos, mesmo em baixas concentrações (Satarug & Moore, 2004). Os mecanismos associados a esta toxicidade são complexos, uma vez que a presença de Cd^{2+} pode prejudicar direta ou indiretamente uma ampla variedade de rotas metabólicas, que incluem desde vias de formação de aminoácidos sulfurados até as vias de reparação de DNA (Beyersmann & Hartwig, 2008). É consenso, entretanto, que o tratamento com Cd^{2+} é um forte indutor de estresse oxidativo nos sistemas biológicos. Como o Cd^{2+} não é um metal com atividade redox, este efeito é proveniente da inibição de enzimas antioxidantes, da lesão de proteínas da cadeia respiratória mitocondrial ou da mobilização de GSH (Casalino *et al.*, 2002; Balestrasse *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2008). De fato, os íons Cd^{2+} têm alta afinidade pelo grupamento tiólico da GSH e podem formar complexos estáveis $\text{Cd}-[\text{GS}]_2$, reduzindo a disponibilidade intracelular deste metabólito (Li *et al.*, 1997).

A manutenção do equilíbrio entre a glutatona reduzida e a glutatona dissulfeto (GSH/GSSG) é um evento essencial para os organismos vivos, isso porque a GSH participa de diversos processos fisiológicos importantes tais como tamponamento intracelular, proliferação celular, apoptose e resistência ao estresse oxidativo (Ballaroti *et al.*, 2009). O controle inadequado da homeostase de GSH está associado à etiologia e/ou progressão de uma série de doenças humanas, incluindo doenças cardiovasculares, fibrose cística e doenças neurodegenerativas como o mal de Parkinson e o mal de Alzheimer (Ballaroti *et al.*, 2009). Neste sentido, proteínas que afetem direta ou indiretamente a manutenção dos níveis de GSH/GSSG devem ter uma regulação adequada de suas atividades.

Em *S. cerevisiae*, uma condição fisiológica que aumenta a demanda por GSH é a fixação da atividade respiratória – a qual promove maior geração de espécies reativas de

oxigênio a partir da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e, portanto, requer um funcionamento vigoroso de todos os sistemas de proteção antioxidante (Halliwell & Gutteridge, 2007). Neste cenário, é esperado que a formação e importação de complexos Cd-[GS]₂ para o vacúolo possam ter efeitos mais pronunciados sobre a manutenção de processos intracelulares dependentes de GSH. Com base nesta hipótese, o capítulo I deste trabalho descreve um estudo sobre o papel da proteína Ycf1 na desintoxicação de Cd²⁺ durante o metabolismo respiratório de *S. cerevisiae* e sua influência nos níveis intracelulares de GSH.

Um aspecto interessante deste trabalho foi demonstrar que, durante o metabolismo respiratório, a linhagem mutante *ycf1*Δ apresenta maior conteúdo intracelular de GSH do que a linhagem selvagem, além de maior tolerância ao Cd²⁺ e aos oxidantes *t*-butil-hidroperóxido e H₂O₂ (Capítulo I, Figuras 2-4). A implicação deste resultado é que a atividade de Ycf1p pode influenciar direta ou indiretamente a homeostase intracelular de GSH. Este fato não é surpreendente, uma vez que a degradação de GSH em células de *S. cerevisiae* é feita dentro do vacúolo pela enzima γ -glutamil transpeptidase (γ -GT, codificada pelo gene *EMC38*) e que a Ycf1p é responsável por 70% da capacidade de transporte de GSH para o interior desta organela (Mehdi *et al.*, 2001; Penninckx, 2002).

A γ -GT (Ecm38p) catalisa a transferência do núcleo γ -glutamil da GSH para um aminoácido aceptor, gerando o produto da transpeptidação e cisteinil-glicina que, por sua vez, é hidrolisado em seus aminoácidos constituintes cisteína e glicina. Adicionalmente, esta enzima pode catalisar a simples hidrólise de GSH ou outros GS-conjugados liberando L-glutamato. Em todos os casos, os aminoácidos livres formados (glutamato, cisteína e glicina) voltam para o citosol e podem ser reutilizados na síntese de novos compostos – incluindo a própria GSH (Penninckx, 2002). Desta forma, a atividade recicladora da

Ecm38p é especialmente alta quando as concentrações citoplasmáticas de GSH são baixas (Mehdi & Penninckx, 1997). Em *S. cerevisiae*, a ausência de Ecm38p promove um aumento de aproximadamente 60% na concentração endógena de GSH (Adamis *et al.*, 2007). Acredita-se que esse aumento seja resultado da indução de *GSH1* (que codifica a primeira enzima da via de biossíntese de GSH), conforme observado em células de camundongo também deficientes em γ -GT (Habib *et al.*, 2000; Adamis *et al.*, 2007).

A atividade de transporte da Ycf1p é estimulada pela enzima Ecm38p. Entretanto, a natureza molecular desta ativação não é conhecida (Mehdi *et al.*, 2001). A influência da Ecm38p sobre a Ycf1p indica que estas proteínas podem trabalhar em conjunto no controle da entrada e da reciclagem de GSH e GS-derivados dentro do vacúolo. Interessantemente, o aumento do conteúdo basal de GSH observado nas mutantes *ycf1* Δ é comparável ao observado nos mutantes *emc48* Δ (Adamis *et al.*, 2007; Capítulo I – Figura 3). Portanto, é possível inferir que a ausência e/ou redução de Ycf1p compromete a atividade recicladora da Ecm38p devido à falta de substrato, o que promove a indução de outros genes (por exemplo, *GSH1*) capazes de suprir a demanda celular por GSH. Corroborando esta hipótese, foi demonstrado que a interrupção do gene *YCF1* resulta em diminuição da atividade basal de Ecm38p (Adamis *et al.*, 2009-a). Adicionalmente, o perfil de indução do promotor *YCF1* na linhagem selvagem sugere que a redução da atividade de Ycf1p é um mecanismo natural de controle dos níveis de GSH, visto que a expressão de *YCF1* é drasticamente reduzida quando as células entram em metabolismo respiratório – situação em que a demanda intracelular por GSH é maior do que durante o metabolismo fermentativo (Capítulo I – Figura 5).

Outro aspecto relevante apresentado no capítulo I é que a indução transcricional de *YCF1* em resposta à Cd^{2+} depende da disponibilidade de GSH (Capítulo 1 – Tabela 1,

Figura 5). Este resultado sugere que a formação e a importação de complexos Cd-[GS]₂ para o vacúolo não são eventos desencadeados automaticamente pela presença de Cd²⁺. De fato, os trabalhos publicados na última década mostram que, em *S. cerevisiae*, os processos de captação e destinação intracelular de Cd²⁺ são regulados pela atividade de proteínas associadas ao metabolismo de GSH.

Existem, por exemplo, evidências de que em *S. cerevisiae* a formação de complexos Cd-[GS]₂ é dependente da atividade catalítica da glutatona transferase 2 (Gtt2p). As glutatona transferases são enzimas que catalisam o ataque nucleofílico do grupo tiol da GSH a diferentes substratos eletrofílicos, resultando na conjugação deste substrato com GSH ou na sua redução com concomitante produção de GSSG (Vuilleumier & Pagni, 2002; Kim *et al.*, 2001). Nas células de *S. cerevisiae*, o tratamento com Cd²⁺ promove um aumento de 25 vezes na expressão do gene *GTT2* (Fauchon *et al.*, 2002). Adicionalmente, o mutante *gtt2Δ* acumula aproximadamente três vezes mais Cd²⁺ do que as células selvagens. Acredita-se que este acúmulo excessivo de Cd²⁺ seja resultado da incapacidade das células *gtt2Δ* de catalisar a formação de complexos Cd-[GS]₂, os quais tem efeito inibitório sobre a entrada de Cd²⁺ a partir do meio extracelular (Gomes *et al.*, 2002; Adamis *et al.*, 2004).

Evidências indiretas também sugerem que a Ecm38p e a aminopeptidase vacuolar de leveduras (Lap4p) podem atuar na reciclagem da GSH a partir dos complexos Cd-[GS]₂ armazenados no vacúolo (Adamis *et al.*, 2007; Adamis *et al.*, 2009-b). Como a Lap4p possui atividade hidrolítica sobre regiões N-terminais de peptídeos e proteínas, é provável que ela possa hidrolisar dipeptídeos cisteinil-glicina gerados a partir da clivagem inicial dos Cd-[GS]₂ pela Ecm38p (Adamis *et al.*, 2009-b).

Recentemente Adamis e colaboradores (2009-a) mostraram que o tratamento com Cd^{2+} induz a atividade das enzimas Gtt2p e Ecm38p em linhagens selvagens de *S. cerevisiae*. A indução de Ecm38p, entretanto, é perdida no mutante *gtt2* Δ mas é mantida no mutante *ycf1* Δ . Por outro lado, a indução de Gtt2p é perdida tanto na linhagem *ecm38* Δ quanto na *ycf1* Δ . Os autores do trabalho propõem um modelo no qual a ausência de atividade de Ecm38p produziria acúmulo vacuolar de complexos $\text{Cd}-[\text{GS}]_2$, o que poderia modular negativamente a atividade de Ycf1p, de maneira similar ao que ocorre quando há excesso de GSH no interior desta organela (Mehdi et al., 2001). Assim, os complexos $\text{Cd}-[\text{GS}]_2$ ficariam no citoplasma e, por sua vez, diminuiriam a atividade da Gtt2p por retroalimentação negativa. Devido a esta inibição de Gtt2p, a formação de complexos $\text{Cd}-[\text{GS}]_2$ ficaria comprometida e, como resultado, as células poderiam manter altas concentrações citoplasmáticas de GSH – que é um forte inibidor da atividade de Ecm38p (Mehdi & Penninckx, 1997). Em presença de Gtt2p e ausência de Ycf1p, os complexos seriam formados normalmente e acumulariam no citosol, não podendo sofrer reciclagem vacuolar. O resultado seria a diminuição da disponibilidade da GSH no citosol (GSH não ligada à Cd^{2+}), o que tem efeito indutor sobre a atividade da Ecm38p (Mehdi & Penninckx, 1997; Adamis *et al.*, 2009-a).

Com base no modelo descrito acima e nos resultados apresentados no capítulo I (Capítulo I – Tabela 1, Figura 5), é possível concluir que a resposta das proteínas Ycf1, Gtt2 e Ecm38 à presença de Cd^{2+} está intimamente relacionada com a homeostase intracelular de GSH. Esta relação recíproca entre controle da toxicidade de Cd^{2+} e manutenção de GSH pode explicar o fato de a Ycf1p ser fundamental para a sobrevivência na presença de Cd^{2+} durante o metabolismo fermentativo (situação de menor demanda por GSH), mas não durante o metabolismo respiratório (situação de maior demanda por GSH)

(Capítulo I – Figura 1). Uma implicação importante destes resultados é que as células de *S. cerevisiae* devem possuir mecanismos alternativos para conter a toxicidade do Cd^{2+} em situações nas quais sua ligação com GSH não é favorável. Um dado interessante a este respeito é que a taxa de viabilidade após o tratamento com Cd^{2+} é maior nos mutantes *glt2Δ* do que na linhagem selvagem (Adamis *et al.*, 2004). Como estes mutantes são deficientes na conjugação de Cd^{2+} e GSH, a melhora de desempenho apresentada por eles na presença de Cd^{2+} deve ser proveniente de mecanismos que desintoxicam o metal em sua forma livre (íons não complexados com GSH).

Dentro deste contexto, o capítulo II apresenta os resultados de uma investigação sobre a contribuição de proteínas associadas com a homeostase de Ca^{2+} para a desintoxicação de Cd^{2+} em células de *S. cerevisiae*. Partindo das premissas de que estes dois metais têm raio iônico similar e de que íons Cd^{2+} podem se ligar e ativar algumas proteínas dependentes de Ca^{2+} (Akiyama *et al.*, 1990; Liu & Templeton, 2007), foi levantada a hipótese de que transportadores que controlam o nível citosólico de Ca^{2+} poderiam ser aproveitados para a desintoxicação do Cd^{2+} não complexado a GSH. Corroborando esta hipótese, Laúer-Júnior e colaboradores (2008 – Anexo III) mostraram que as linhagens deficientes no transportador de Ca^{2+} Pmr1p acumulam mais Cd^{2+} do que a linhagem selvagem isogênica (W303) e que isto resulta em pronunciada sensibilidade ao metal. Como a Pmr1p reside no complexo de Golgi e, dentre outras funções, auxilia na desintoxicação de Mn^{2+} promovendo sua eliminação para o meio extracelular por meio de vesículas secretórias (Culotta *et al.*, 2005), foi sugerido que um processo análogo poderia operar na desintoxicação de Cd^{2+} (Lauer Júnior *et al.*, 2008).

Com base nas informações acima, o estudo do capítulo II foi desenhado primariamente para analisar uma provável interação entre as proteínas Ycf1p e Pmr1p na

desintoxicação de Cd^{2+} pela comparação de fenótipos entre mutantes *ycf1Δ*, *pmr1Δ* e *pmr1Δycf1Δ*. Como a idéia era relacionar os resultados deste trabalho com os resultados descritos no capítulo I, a opção foi utilizar mutantes isogênicos da linhagem BY4741. Estes mutantes têm a vantagem de possuírem deleções estáveis, o que impede eventuais reversões fenotípicas. Além disso, o grupo do Prof. Dr. Pêgas Henriques havia constatado previamente que a linhagem *pmr1Δ* isogênica da W303 eventualmente apresenta alguns problemas de manipulação, como floculação (agregação) celular excessiva e curto tempo de viabilidade quando estocada a 4 °C.

Surpreendentemente, foi observado que, nos mutantes derivados da selvagem BY4741, a perda do gene *PMR1* resulta em aumento da tolerância ao Cd^{2+} (Capítulo II – Figura 1A). Mais ainda, a ausência deste gene promove a restauração da resistência a Cd^{2+} nos mutantes *ycf1Δ* (Capítulo II – figura 1B). Análises adicionais de sobrevivência com os mutantes *pmr1Δ* isogênicos da W303 e BY4741, realizadas estritamente sob as mesmas condições experimentais, reproduziram os resultados obtidos por Laúer-Júnior e colaboradores (2008) (Anexo II – Figura 1) e, portanto, confirmaram que o perfil de tolerância a Cd^{2+} nos mutantes *pmr1Δ* é linhagem-específico.

Os resultados acima levantaram uma questão essencial: a ausência de Pmr1p pode realmente mediar o processo de exportação de Cd^{2+} para o meio extracelular? Para responder esta questão foi elaborada uma análise temporal do perfil de captação de Cd^{2+} nas linhagens mutantes derivadas da BY4741 (capítulo II – Figura 2). Os resultados obtidos neste experimento mostraram que, de fato, a ausência de Pmr1p está associada a um acúmulo crescente, tempo dependente, de Cd^{2+} no ambiente intracelular. Por outro lado, a selvagem BY4741 alterna fases de captação e exportação do metal – perfil este que é similar ao obtido no capítulo I (Capítulo I – Figura 6). Estes dados são claros indícios de

que a *Pmr1p* pode, com maior ou menor eficiência, promover a exportação de Cd^{2+} para o meio extracelular.

Neste sentido, dois trabalhos de análise de fenótipo e expressão gênica em larga escala, realizados com linhagens derivadas de selvagens BY4741 (haplóide) ou BY4743 (diplóide), incluíram o gene *PMRI* na classe dos genes cuja deleção afeta moderadamente a sensibilidade a Cd^{2+} (Jin *et al.*, 2008; Thorsen *et al.*, 2009). A divergência entre estes resultados e aqueles apresentados no capítulo II possivelmente é proveniente de variações nas condições experimentais e nos parâmetros utilizados para incluir os mutantes na classe de sensibilidade. Por exemplo, no trabalho de Jin e colaboradores (2008) a sensibilidade foi definida com base na taxa de inibição de crescimento produzida pelo Cd^{2+} em culturas líquidas e utilizando meio rico (em contraste com o uso de meio sintético e determinação de sobrevivência nos experimentos do capítulo II).

Interessantemente, os resultados dos dois artigos supracitados (Jin *et al.*, 2008; Thorsen *et al.*, 2009), bem como outros trabalhos de análise gênica e/ou fenotípica em larga escala, têm demonstrado que genes associados a processos de transporte vesicular e exocitose estão entre os grupos mais responsivos ao estresse induzido por Cd^{2+} e outros metais. Quando os dados destes trabalhos são cruzados, há pouca sobreposição entre os genes individuais identificados por cada grupo como sendo responsivos ao Cd^{2+} (Thorsen *et al.*, 2009). Entretanto, quando é feita a sobreposição levando-se em conta grupos de genes funcionalmente relacionados, há maior coincidência entre os resultados e, essencialmente, todos apontam para as vias de resposta a estresse, tráfego intracelular e exocitose como rotas responsivas à presença de Cd^{2+} (Jin *et al.*, 2008; Ruotolo *et al.*, 2008; Serero *et al.*, 2008; Thorsen *et al.*, 2009).

A participação diferenciada da Pmr1p na desintoxicação de Cd²⁺ no genótipo da W303 em relação ao observado no genótipo da BY4741 remete para uma conclusão básica e bem estabelecida: variações fenotípicas e/ou genotípicas podem influenciar a forma como organismos da mesma espécie respondem a presença de um agente estressor comum. Um exemplo disso, no contexto da homeostase de Ca²⁺, é que duplos mutantes *pmr1Δpmc1Δ* derivados da W303 não são viáveis a menos que seja feita a interrupção simultânea de genes associados à via de sinalização mediada pela calmodulina/calcinerina (Cunningham & Fink, 1996). Por outro lado, Keller Mayer e colaboradores (2003) construíram mutantes *pmr1Δpmc1Δ* viáveis (e sem deleções adicionais) usando a linhagem selvagem SEY6210. Outro exemplo interessante é que, mesmo dentro de um grupo isogênico de células de *S. cerevisiae*, variações fenotípicas individuais no conteúdo interno de GSH podem fazer com que células isoladas a partir da mesma população apresentem graus diferenciados de sensibilidade ao Cd²⁺ (Smith *et al.*, 2007).

O perfil de absorção de Cd²⁺ (Capítulo II – Figura 2), bem como os dados demonstrando que a perda de *PMR1* pode conferir algum grau de sensibilidade a Cd²⁺ mesmo em células derivadas da BY4741 (Jin *et al.*, 2008), reforçavam a idéia de que a Pmr1p poderia contribuir, com maior ou menor eficiência, para a desintoxicação de Cd²⁺. Partindo deste pressuposto, foi levantada a hipótese de que a perda de *PMR1* poderia resultar numa alteração da expressão de *YCF1*. Experimentos preliminares confirmaram esta hipótese (Anexo II – Figura 2). Desta forma, partiu-se para uma análise mais detalhada no sentido de comparar o efeito do tratamento com Cd²⁺ sobre a expressão de *YCF1* e genes associados a homeostase de Ca²⁺ nas linhagens BY4741, *ycf1Δ*, *pmr1Δ* e *pmr1Δycf1Δ* (capítulo II – Figura 3). Dentro dos genes que participam da manutenção de Ca²⁺, foram selecionados para a análise aqueles localizados em compartimentos

intracelulares (*PMRI*, no Golgi; *PMCI*, *YVCI*, *VCXI*, no vacúolo; *CODI*, no RE) e aquele que codifica a calmodulina (*CMDI*) – uma vez que o produto deste gene exerce importante papel na regulação de processos dependentes de Ca^{2+} .

Mais uma vez foi possível observar que concentrações relativamente baixas de Cd^{2+} (50 μM), compatíveis com o que é encontrado no meio ambiente e com os níveis que podem acumular no organismo humano (Jin *et al.*, 2003; Satarug & Moore, 2004), não induzem a expressão de *YCFI* na selvagem BY4741 (Capítulo II – Figura 3, A-B). Entretanto, a expressão de *YCFI* também não foi reprimida por esta concentração de Cd^{2+} , contrastando com o observado no capítulo I (Capítulo I – Figura 5). Esta diferença pode ser explicada pelas variações experimentais entre as duas análises. Por exemplo, no capítulo I a análise de expressão foi feita utilizando-se um plasmídeo reporter não integrativo (pJAW736) e por isso, após receber o plasmídeo, as células foram invariavelmente mantidas em meio sintético seletivo (SC ura⁻). No meio sintético, a disponibilidade de GSH é menor do que no meio rico (Burke *et al.*, 2000) e isso pode ter favorecido a repressão do gene *YCFI*. Cabe ainda ressaltar que, para manter a homogeneidade experimental, o RT-PCR semi-quantitativo apresentado no primeiro capítulo também foi feito com células que haviam recebido o plasmídeo pJAW736. Ao contrário, para os experimentos do capítulo II as células foram mantidas em meio rico, tendo apenas uma passagem prévia por meio sintético antes da análise experimental. Por fim, para otimizar o processo de extração de RNA, a concentração de células utilizadas nos dois casos não foi a mesma (Capítulo I – Seções 2.1-2.5; Capítulo II – Seções 2.1, 2.3, 2.5).

Dentro das análises de expressão, um resultado que chamou a atenção foi a indução precoce de *PMCI* em resposta ao tratamento com Cd^{2+} na linhagem selvagem (único gene induzido no tratamento com 50 μM de Cd^{2+}), além da maior amplitude desta indução nos

três mutantes investigados – em especial na linhagem *ycf1Δ* (Capítulo II – Figura 3, A-H). Estes resultados indicam uma participação efetiva da Pmc1p na desintoxicação de Cd²⁺, especialmente quando a Ycf1p não está ativa. O gene *PMCI* codifica um transportador vacuolar de Ca²⁺ que não é essencial em condições normais de cultivo, mas que tem papel fundamental na proteção de células de levedura durante o estresse produzido por altas concentrações de Ca²⁺ (Cunningham & Fink, 1994; Miseta *et al.*, 1999). Os mutantes *pmr1Δ* derivados da W303 apresentam aumento basal na expressão de *PMCI*, o que serve como proteção contra os altos níveis de Ca²⁺ citosólico que são acumulados na ausência de Pmr1p (Marchi *et al.*, 1999). Esse aumento basal de *PMCI* também é observado nas linhagens *pmr1Δ* e, em menor proporção, na *ycf1Δ* isogênicas da BY4741 (Capítulo II – Figura 4). Estes dados confirmam que, tanto na W303 quanto na BY4741, a regulação de Pmc1p é coordenada com a atividade e/ou regulação do transportador Pmr1p. Entretanto, a contribuição relativa de cada transportador para a manutenção da homeostase metálica pode ser diferente nestas duas linhagens.

De fato, na selvagem BY4741 a expressão de *PMCI* em termos de RNAm é bem mais alta do que a expressão de *PMRI*. Isto foi evidenciado durante os experimentos de RT-PCR semi-quantitativo, nos quais a concentração de cDNA utilizadas com iniciadores para *PMCI* teve que ser reduzida pela metade em relação àquela utilizada com iniciadores *PMRI*, no sentido de evitar saturação das reações (Capítulo II – Seção 3.3). Por outro lado, a expressão basal de *PMRI* na linhagem W303 pode ser até 12 vezes mais alta do que a expressão de *PMCI* (Marchi *et al.*, 1999).

Dentro deste contexto, é razoável supor que o uso de transportadores de Ca²⁺ para a desintoxicação de Cd²⁺ pode ser um evento influenciado tanto pelo metabolismo geral da célula quanto por fatores cinéticos como a competição entre os íons Ca²⁺/Cd²⁺ e a

disponibilidade das próprias proteínas de transporte. Sob esta perspectiva é possível inferir que o uso preferencial de Pmr1p ou Pmc1p na manutenção da homeostase interna de Cd²⁺ poderia depender da disponibilidade relativa de cada transportador. Assim, a grande disponibilidade de Pmr1p na W303 permite melhor aproveitamento desta proteína para a desintoxicação de Cd²⁺, ao contrário do que acontece com a BY4741. Cabe ressaltar, entretanto, que mesmo no “genótipo” da BY4741 a Pmr1p pode eventualmente contribuir para desintoxicação de Cd²⁺, uma vez que nos mutantes *ycf1Δ* foi observada indução do gene *PMR1* após o tratamento com o metal (Capítulo II – Figura 3, B-C).

O conjunto de dados exposto acima sugere que as proteínas Pmr1p e Pmc1p contribuem com a Ycf1p na desintoxicação de Cd²⁺ em *S. cerevisiae*. A alta sensibilidade de mutantes *ycf1Δ* à presença de Cd²⁺ em células de diferentes genótipos genéticos, descrita amplamente na literatura, mostra que a Ycf1p constitui a linha de frente para a desintoxicação do metal, mesmo não sendo induzida em concentrações baixas de Cd²⁺. A este respeito, diversos trabalhos vêm mostrando que existe pouca coincidência entre genes essenciais para a tolerância a Cd²⁺ e aqueles que têm expressão alterada na presença do metal (Jin *et al.*, 2008; Thorsen *et al.*, 2009). Segundo Jin e colaboradores (2008), genes cuja deleção aumenta sobremaneira a sensibilidade a um determinado metal podem ser os elementos primários de uma via de desintoxicação, enquanto que os genes que respondem por alterações na expressão devem se constituir em elementos a jusante dentro da mesma via ou elementos de rotas alternativas de desintoxicação (Jin *et al.*, 2008). Além disso, é preciso considerar que o controle de Ycf1p em baixas concentrações de Cd²⁺ pode ser feito a nível pós-traducional, visto que este transportador é regulado também por fosforilação (Eraso *et al.*, 2004; Paumi *et al.*, 2008).

Em situações mais específicas, as proteínas Pmr1p ou Pmc1p podem contribuir para a desintoxicação de Cd^{2+} promovendo, respectivamente, sua exportação para o meio extracelular ou sua compartimentalização no vacúolo. Neste caso, é provável que situações que limitem a formação de complexos $\text{Cd}-[\text{GS}]_2$ favoreçam o acúmulo intracelular de Cd^{2+} no seu estado livre e, por consequência, a desintoxicação mediada por Pmr1p ou Pmc1p (dependendo da disponibilidade de um ou outro transportador). Por exemplo, as células mutantes *gtt2Δ* acumulam aproximadamente três vezes mais Cd^{2+} do que a selvagem isogênica BY4741. Entretanto, o tratamento com Cd^{2+} provoca maior perda de viabilidade na BY4741 do que na mutante *gtt2Δ* (Adamis *et al.*, 2004). Como neste mutante a formação de complexos $\text{Cd}-[\text{GS}]_2$ é ineficiente, é razoável propor que ocorra um acúmulo maior de Cd^{2+} no estado livre e que isso favoreça a desintoxicação do metal por meio da atividade da Pmc1p. Desta forma, ainda sobraria GSH livre para prevenir os efeitos oxidantes do Cd^{2+} , o que explicaria a alta viabilidade destas células após o tratamento com o metal.

Outro aspecto interessante que pode ser observado a partir das análises de expressão é a relação entre os níveis de RNAm do gene que codifica a calmodulina (*CMD1*) e seus alvos de regulação (*VCXI*, *PMR1* e *PMR1*). A calmodulina (Cam1p) é uma proteína que, quando ativada por Ca^{2+} , regula o funcionamento de uma série de outras proteínas, incluindo a fosfatase calcineurina. Segundo os dados da literatura, a ativação calmodulina/calcineurina regula negativamente a atividade de *VCXI* e positivamente a atividade de *PMR1* e *PMCI* durante o estresse produzido por altas concentrações de Ca^{2+} (Cunningham & Fink, 1994; Cunningham & Fink, 1996; Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos & Cyert; 1997). Pelos resultados apresentados no capítulo II é possível observar que, pelo menos em termos de concentração de RNAm, a regulação destas

proteínas em resposta ao Cd^{2+} difere da regulação em resposta com Ca^{2+} (Capítulo II – Figura 3, A-H).

Por exemplo, na BY4741 ocorre leve redução na expressão de *CMD1* e, portanto, seria esperado um aumento em *VCX1* – o qual não foi o observado (Capítulo II – Figura 3, A-B). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que o efeito inibitório da calmodulina/calcinerina sobre a Vcx1p parece envolver um mecanismo de regulação pós-traducional (Cunningham & Fink, 1996). No caso da *PMCI*, seria esperado que sua expressão seguisse o mesmo perfil do gene *CMD1* – o que também não foi observado na linhagem BY4741. Estas divergências não são de todo surpreendentes, tendo em vista que estudos anteriores demonstraram que a resposta de determinados genes à via sinalizada pela calmodulina/calcineurina pode ser estímulo-específica. O gene *PMCI*, por exemplo, é regulado por esta via durante o tratamento com excesso de Ca^{2+} , mas não durante o tratamento com o fator de acasalamento α (Stathopoulos & Cyert, 1997). Para esclarecer o efeito do tratamento com Cd^{2+} sobre a regulação de genes associados a homeostase de Ca^{2+} pela via da calmodulina em *S. cerevisiae*, são necessários estudos adicionais.

O perfil de expressão do gene *COD1* é outro aspecto relevante apresentado no capítulo II. Este gene codifica uma ATPase residente do RE que contribui para o controle das concentrações de Ca^{2+} nas células de *S. cerevisiae*. Porém, um estudo realizado por Cronin e colaboradores (2002) indica que o substrato preferencial da Cod1p pode ser Mg^{2+} e não Ca^{2+} , sugerindo que a participação desta proteína na homeostase de Ca^{2+} pode ser indireta (Cronin *et al.*, 2002). Adicionalmente, a proteína Cod1 parece ter um papel importante na sinalização da via de resposta de proteínas mal enoveladas (*Unfolded Protein Response* - UPR) – a qual pode ser desencadeada por estresse no RE (Cronin *et al.*, 2002).

No capítulo II é possível observar que na linhagem selvagem BY4741 a expressão de *CODI* não é alterada em resposta a Cd^{2+} (Capítulo II – Figura 3, A-H). No simples mutante *pmr1* Δ a indução de *CODI* só é observada com o tratamento de 400 μM de Cd^{2+} , enquanto que no simples mutante *ycf1* Δ o fenômeno ocorre já na concentração de 50 μM . No duplo mutante *pmr1* Δ *ycf1* Δ , prevalece o fenótipo observado em *ycf1* Δ . Esta resposta de indução de *CODI* pode ser adequadamente correlacionada com o perfil de sobrevivência de cada linhagem na concentração de 50 μM de Cd^{2+} (Capítulo II – Figura 1B). Com base nesta correlação e no fato de que o Cd^{2+} pode promover a degradação de proteínas recém-sintetizadas (Medicherla & Goldberg, 2008), é possível supor que concentrações tóxicas do metal comprometem a síntese e/ou renovação de proteínas gerando uma resposta UPR mediada por Cod1p. Na linhagem selvagem BY4741, o funcionamento adequado das vias de desintoxicação poderia minimizar os efeitos da degradação protéica induzida por Cd^{2+} , tornando desnecessária a ativação do gene *CODI*. Corroborando esta hipótese, estudos recentes comprovam que o tratamento com Cd^{2+} altera a homeostase de Ca^{2+} no RE, promovendo a ativação da via UPR em células de mamíferos (Biagioli *et al.*, 2008). Interessantemente, o gene *CODI* também foi incluído por Thorsen e colaboradores (2009) na lista de genes cuja deleção promove sensibilidade a Cd^{2+} .

Em resumo, os resultados deste trabalho apontam para Pmr1p e Pmc1p como proteínas auxiliares na desintoxicação de Cd^{2+} em *S. cerevisiae*, as quais podem ser ativadas em situações onde a formação e posterior importação de complexos Cd -[GS]₂ por Ycf1p não é adequada ao metabolismo celular. Com relação aos demais transportadores de Ca^{2+} analisados, são necessários maiores estudos para elucidar seus papéis dentro deste processo. É importante ressaltar que a regulação das vias mediadas por Ycf1p, Pmr1p e Pmc1p deve ser coordenada com a regulação de transportadores de membrana que também

podem atuar na desintoxicação de Cd^{2+} – tais como Yor1p, Alr1p e Pca1p (Kern *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2006; Adle *et al.*, 2007).



CONCLUSÕES

1. CONCLUSÃO GERAL

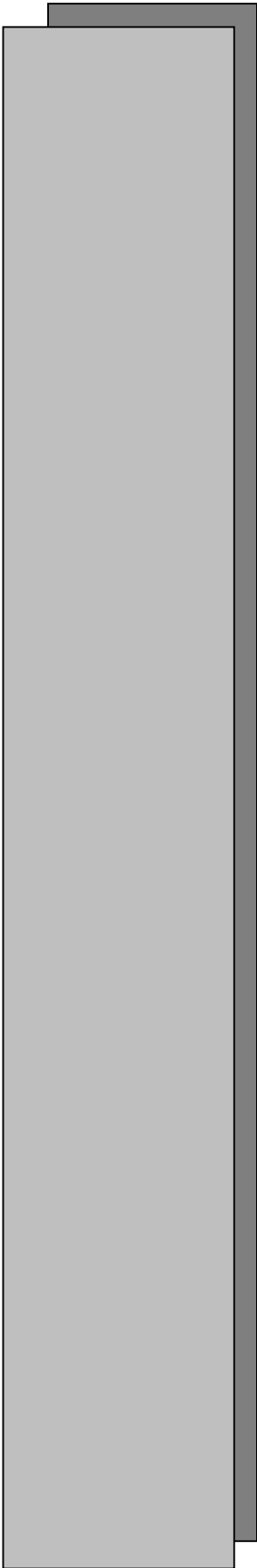
Em resumo, os resultados deste trabalho apontam para uma refinada coordenação entre Ycf1p e as ATPases de Ca^{2+} Pmr1p e Pmc1p durante a desintoxicação de Cd^{2+} em *S. cerevisiae*. Como amplamente relatado na literatura, a atividade da Ycf1p se constitui na rota primária para contenção da toxicidade do metal. Entretanto, fatores como disponibilidade de GSH, metabolismo energético (fermentativo ou respiratório) e disponibilidade de transportadores específicos, podem promover a desintoxicação de Cd^{2+} por Pmr1p ou Pmc1p de forma independente de GSH. Os dados deste estudo, associados aos dados de literatura, evidenciam um surpreendente grau de complexidade na resposta celular à presença de Cd^{2+} , o que reflete o alto grau de toxicidade do metal. Desta forma, é possível concluir que, ao longo de sua evolução, as células eucarióticas desenvolveram sistemas especializados para lidar com a presença de Cd^{2+} (por exemplo, Ycf1p em leveduras ou MRPs em mamíferos), mas que também passaram a aproveitar, quando necessário, sistemas primariamente destinados a manutenção da homeostase de metais essenciais como rotas auxiliares de desintoxicação de Cd^{2+} .

1.1. Conclusões Específicas

- A redução da expressão da proteína Ycf1p contribui para aumentar os níveis de GSH intracelulares nas células de *S. cerevisiae*. Como consequência, é provável que esta proteína auxilie na aquisição de resistência ao estresse oxidativo observada após a transição diáuxica (metabolismo fermentativo para respiratório).
- A ativação do promotor do gene *YCF1* em resposta ao tratamento com Cd^{2+} depende da disponibilidade de GSH. Em situações onde a demanda intracelular por GSH é maior e a concentração de Cd^{2+} é pouco citotóxica, o gene *YCF1* é regulado

negativamente pela presença de Cd^{2+} e, conseqüentemente, devem ser ativadas vias de desintoxicação independentes de Ycf1p.

- As ATPases de Ca^{2+} Pmr1p e Pmc1p podem promover a desintoxicação de Cd^{2+} de forma independente de GSH. Estas vias são ativadas possivelmente em situações metabólicas que não favorecem a formação de complexos $\text{Cd}-[\text{GS}]_2$.
- O uso primário de Pmr1p ou Pmc1p para a desintoxicação de Cd^{2+} pode depender da disponibilidade e/ou de atividade relativa de cada transportador, fatores que podem variar entre diferentes linhagens selvagens de *S. cerevisiae*.
- A regulação dos transportadores *VCX1*, *YVC1*, *PMCI* e *PMRI* pela calmodulina durante o estresse com Cd^{2+} é diferente da regulação observada durante o estresse com Ca^{2+} .
- Embora sejam necessários maiores estudos, o produto do gene *COD1* surge como um candidato a mediador da resposta de estresse de RE e de proteínas mal enoveladas desencadeadas pelo Cd^{2+} nas células de *S. cerevisiae*.



PERSPECTIVAS

As perspectivas futuras para continuidade deste trabalho são:

- Investigar o grau de influência da proteína Ycf1 sobre a manutenção dos níveis intracelulares de GSH e resposta ao estresse oxidativo em células de *S. cerevisiae*, por meio da interrupção de *YCF1* em linhagens deficientes para genes associados ao metabolismo de GSH (*GSH2*, *ECM38*, *GTT2*, *GR*, *GPX1*, *GPX2*, entre outros).
- Analisar se a contribuição de Pmr1p e Pmc1p para a desintoxicação de Cd²⁺ de fato está relacionada com a demanda intracelular de GSH, comparando a eficiência destes transportadores na promoção de tolerância a Cd²⁺ durante o metabolismo fermentativo e respiratório de *S. cerevisiae*. Neste caso, é prevista uma investigação simultânea com linhagens isogênicas da BY4741 e da W303.
- Averiguar uma possível participação do gene *COD1* na resposta de estresse de RE em resposta ao Cd²⁺ nas células de *S. cerevisiae*.
- Investigar, de forma mais refinada, se a resposta dos genes *PMR1* e *PMCI* ao estresse gerado por Cd²⁺ depende da sinalização mediada pela via calmodulina/calcinerina.
- Investigar a possível contribuição do sistema de transporte de Ca²⁺ Cch1p/Midp para a entrada de Cd²⁺ nas células de *S. cerevisiae*.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHANZAR, W. E.; ACHANZAR, K. B.; LEWIS, J. G.; WEBBER, M. M.; WAALKES, M. P. Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164: 291–300, 2000.

ADAMIS, P. D. B.; GOMES, D. S.; PINTO, M. L. C. C.; PANEK, A. D., ELEUTHERIO, E. C. A. The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicology Letters*, 154: 81–88, 2004.

ADAMIS, P. D. B.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. *Toxicology Letters*, 173: 1–7, 2007.

ADAMIS, P. D. B.; MANNARINO, S. C.; ELEUTHERIO, E. C. A. Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium–glutathione complex. *FEBS Letters*, 583: 1489–1492, 2009. (a)

ADAMIS, P. D. B.; MANNARINO, S. C.; RIGER, C. J.; DUARTE, G.; CRUZ, A.; PEREIRA, M. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Lap4, a vacuolar aminopeptidase I, is involved in cadmium-glutathione metabolism. *Biometals*, 22: 243–249, 2009. (b)

ADLE, D. J.; SINANI, D.; KIM, H.; LEE J. A cadmium-transporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 947-955, 2007.

ADLE, D.J. & LEE, J. Expressional control of a cadmium-transporting P1B-type ATPase by a metal sensing degradation signal. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 31460-31468, 2008.

AKIYAMA, K.; SUTOO, D.; REID, D. G. A ¹H-NMR comparison of calmodulin activation by calcium and by cadmium. *Japanese Journal of Pharmacology*, 53: 393-401, 1990.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. B. *Biologia molecular da célula*. Artmed, Porto Alegre, Brasil. 2004.

ALMAZAN, G.; LIU, H. N.; KHORCHID, A.; SUNDARARAJAN, S.; MARTINEZ-BERMUDEZ, A. K.; CHEMTOB S. Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. *Free Radical Biology & Medicine*, 29:858-69, 2000.

AMADO-FILHO, G. M.; SALGADO, L. T.; REBELO, M. F.; REZENDE, C. E.; KAREZ, C.S.; PFEIFFER, W. C. Heavy metals in benthic organisms from Todos os Santos Bay, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68: 95-100, 2008.

ARANA-CHAVEZ, V. E.; BRADASCHIA-CORREA, V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell biology*, 41: 446-450, 2009.

ASHE, M. P.; DE LONG, S. K.; SACHS, A. B. Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Molecular Biology of Cell*, 11: 833-848, 2000.

ASIA NEWS. Agência de notícias *online*. Cadmium spill in the Beijiang River leaves millions of people without water. Data de publicação: 22/12/2005. Disponível em: <http://www.asianews.it/>. Acesso: 30/01/2009.

ASMUSS, M.; MULLENDERS, L. H.; EKER, A.; HARTWIG, A. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis*, 21: 2097–2104, 2000.

BACKMAN, C. Global supply and demand of metals in the future. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 71: 1244–1253, 2008.

BALAMURUGAN, K.; HUA, H.; GEORGIEV, O.; SCHAFFNER, W. Mercury and cadmium trigger expression of the copper importer Ctr1B, which enables *Drosophila* to thrive on heavy metal-loaded food. *Biological Chemistry*, 390: 109-13, 2009.

BALESTRASSE, K. B.; NORIEGA, G. O.; BATLLE, A.; TOMARO, M. L. Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in soybean nodules. *Free Radical Research*, 39:145-51, 2005.

BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; NOTENBOOM, S.; SHI, S.; TIEU, K.; HAMMOND, C. L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry*, 390: 191–214, 2009.

BANERJEE, S. & FLORES-ROZAS, H. Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2–MSH6 complex. *Nucleic Acids Research*, 33: 1410-1419, 2005.

BEARD, N. A.; WEI, L.; CHEUNG, S. N.; KIMURA, T.; VARSÁNYI, M.; DULHUNTY, A. F. phosphorylation of skeletal muscle calsequestrin enhances its Ca²⁺-binding capacity and promotes its association with junctin. *Cell Calcium*, 44: 363-373, 2008.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 1: 11-21, 2000.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, *In press*, 2008.

BEYERSMANN, D.; BLOCK, C.; MALVIYA, A. N. Effects of cadmium on nuclear protein kinase C. *Environmental health perspectives*, 102: 177–180, 1994.

BEYERSMANN, D & HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 82:493–512, 2008.

- BIAGIOLI, M.; PIFFERI, S.; RAGGHIANI, M.; BUCCI, S.; RIZZUTO, R.; PINTON, P. Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis. *Cell Calcium*, 43: 184–195, 2008.
- BONILLA, M. & CUNNINGHAM, K. W. Calcium release and influx in yeast: TRPC and VGCC rule another kingdom. Science's STKE: signal transduction knowledge environment, 127 (PE17): 1-3, 2002.
- BRESSLER, J. P.; OLIVI, L.; CHEONG, J. H.; KIM, Y.; BANNONA, D. Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012: 142-152, 2004.
- BURKE, D., DAWSON, D., STEARNS, T. Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. CSH Laboratory Press, New York, p. 174. 2000.
- CARAFOLI, E. & BRINI, M. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:152–161, 2000.
- CASALINO, E.; CALZARETTI, G.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 179: 37–50, 2002.
- CHAO, S. H.; SUZUKI, Y.; ZYSK, J. R.; CHEUNG, W.Y. Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. *Molecular Pharmacology*, 26: 75–82, 1984.
- CHAO, S. H.; BU, C. H.; CHEUNG, W. Y. Activation of troponin C by Cd²⁺ and Pb²⁺. *Archives of Toxicology*, 64(6): 490-496, 1990.
- CHAUDHURI, B.; INGAVALE, S.; BACHHAWAT, A. K. Apd1+, a gene required for red pigment formation in ade6 mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump. *Genetics*, 145: 75–83, 1997.
- CLEMENS, S. Toxic metal accumulation: responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88:1707-1719, 2006.
- COBBETT, C. & GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 159–82, 2002.
- CONAMA. Resoluções do Conama: resoluções vigentes publicadas entre julho de 1984 e novembro de 2008 - 2. ed. / Conselho Nacional do Meio Ambiente. – Brasília: Conama, 2008.
- COSTA, V. & MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22: 217-246, 2001.

- 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*, 157: 1017–1028, 2002.
- CSUTORA, P.; SU, Z.; KIM, H. Y. Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 121-126, 1999.
- CULOTTA, V.C.; HOWARD, W. R.; LIU, X. F. CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 25295-25302, 1994.
- CULOTTA, V. C.; YANG, M.; HALL, M. D. Manganese Transport and Trafficking: Lessons Learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4: 1159-1165, 2005.
- CUNNINGHAM, K. W. & FINK, G. R. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMCI*, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *The Journal of Cell Biology*, 124: 351-363, 1994.
- CUNNINGHAM, K. W. & FINK, G. Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 2226–2237, 1996.
- DALLY, H. & HARTWIG, A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 18: 1021–1026, 1997.
- DE WINDE, J. H.; CRAUWELS, M.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J. M.; WINDERICKX, J. Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *European Journal of Biochemistry*, 241: 633-643, 1996.
- DE WINDE, J. H.; THEVELEIN, J. M.; WINDERCRUX, J. Adaptation to nutrient depletion in yeast. In: Hohmann, S; Mager, WH (editores). *Yeast stress responses*. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1997.
- DELEVE, L. D. & KAPLOWITZ, N. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Seminars in Liver Disease*, 10: 251–266, 1990.
- DENIS, D. & CYERT, M. S. Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *The Journal of Cell Biology*, 156:29–34, 2002.
- DIX, D.; BRIDGHAM, J. T.; BRODERIUS, M. A.; BYERSDORFER, C. A.; EIDE, D. J. The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 26092–26099, 1994.
- DOS SANTOS, W. N. L.; COSTA, J. L.O.; ARAÚJO, R. G. O.; JESUS, D. J.; COSTA, A. C. S. An on-line pre-concentration system for determination of cadmium in drinking water using FAAS. *Journal of Hazardous Materials B*, 137: 1357–1361, 2006.

DRAKENBERG, T.; FORSEN, S.; THULIN, E.; VOGEL, J. H. The binding of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Cd^{2+} to tryptic fragments of skeletal muscle troponin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 262: 672-678, 1987.

DUNICAN, D. J.; DOHERTY, P. The generation of localized calcium rises mediated by cell adhesion molecules and their role in neuronal growth cone motility. *Molecular Cell Biology Research Communications*, 3: 255-63, 2000.

DÜRR, G.; STRAYLE, J.; PLEMPER, R.; ELBS, S.; KLEE, S. K.; CATTY, P.; WOLF, D. H.; RUDOLPH, H. K. The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca^{2+} and Mn^{2+} required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Molecular Biology of the Cell*, 9: 1149-1162, 1998.

ENTIAN, K. D. & BARNETT, J. A. Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Biochemical Sciences*, 17: 506-510, 1992.

ERASO, P.; MARTÍNEZ-BURGOS, M.; FALCÓN-PÉREZ, J. M.; PORTILLO, F.; MASÓN, M. J. Ycf1-dependent cadmium detoxification by yeast requires phosphorylation of residues Ser908 and Thr911. *FEBS Letters*, 577: 322-326, 2004.

ERDMAN, S.; LIN, L.; MALCZYNSKI, M.; SNYDER, M. Pheromone-regulated Genes Required for Yeast Mating Differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 140:461-483, 1998.

ESPINOSA, D. C. R.; BERNARDES, A. M.; TENÓRIO, J. A. S. An overview on the current processes for the recycling of batteries. *Journal of Power Sources*, 135: 311-319, 2004.

FAUCHON, M.; LAGNIEL, G.; AUDE, J.; LOMBARDIA, L.; SOULARUE, P.; PETAT, C.; MANGUERIE, G.; SENTENAC, A.; WERNER, M.; LABARRE, J. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Molecular Cell*, 9: 713-723, 2002.

FISCHER, M.; SCHNELL, N.; CHATTAWAY, J.; DAVIES, P.; DIXON, G.; SANDERS, D. The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Letters*, 419: 259-262, 1997.

FREITAS, M. B. J. G.; PENHA, T. R.; SIRTOLI, S. Chemical and electrochemical recycling of the negative electrodes from spent Ni-Cd batteries. *Journal of Power Sources*, 163: 1114-1119, 2007.

FUGE, E. K. & WERNER-WASHBURNE, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Hohmann, S.; Mager, W. H (editores). Yeast stress responses. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1997.

GIAGINIS, C.; GATZIDOU, E.; THEOCHARIS, S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 213: 282-290, 2006.

- GITAN, R.S.; SHABABI, M.; KRAMER, M.; EIDE, D. J. A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 39558-39564, 2003.
- GOMES, D. S.; FRAGOSO, L. C.; RIGER, C. J.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1573: 21-25, 2002.
- GOMES, D. S.; PEREIRA, M. D.; PANEK, A. D.; ANDRADE, L. R.; ELEUTHERIO, E. C. Apoptosis as a mechanism for removal of mutated cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Grx2 under cadmium exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780: 160-166, 2008.
- GOYER, R. A. Toxic and essential metal interactions. *Annual Review of Nutrition*, 17: 37-50, 1997.
- HABIB, G. M.; SHI, Z. Z.; OU, C. N.; KALA, G.; KALA, S. V.; LIEBERMAN, M.W. Altered gene expression in the liver of gammaglutamyl transpeptidase-deficient mice. *Hepatology*, 32: 556-562, 2000.
- HALLIWELL, B & GUTTERIDGE. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press Inc., Nova Iorque, Estados Unidos da América. 2007.
- HIMENO, S.; YANAGIYA, T.; ENOMOTO, S.; KONDO, Y.; AMURA, N. Cellular cadmium uptake mediated by the transport system for manganese. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 196: 43-50. 2002.
- HIRATA, K.; TSUJI, N.; MIYAMOTO, K. Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metal-binding peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100: 593-599, 2005.
- HOFFMANN, M. J. & SCHULZ W. A. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochemistry and Cell Biology*, 83: 296-321, 2005.
- HOUBEN, K.; WASIELEWSKI, E.; DOMINGUEZ, C.; KELLENBERGER, E.; ATKINSON, R. A.; TIMMERS, H.T.; KIEFFER, B.; BOELEN, R. Dynamics and metal exchange properties of C4C4 RING domains from CNOT4 and the p44 subunit of TFIIH. *Journal of Molecular Biology*, 349: 621-637, 2005.
- HUANG, D.; ZHANG, Y.; QI, Y.; CHEN, C.; JI, W. Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation. *Toxicology Letters*, 179: 43-47, 2008.
- HUBER, P. C. & ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31: 1170-1179, 2008.

HUFF, J.; LUNN, R. M.; WAALKES, M. P.; TOMATIS, L.; INFANTE, P. F. Cadmium induced cancers in animals and in humans. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 13: 202–212, 2007.

HULLAVARAD, N. V.; HULLAVARAD, S. S.; KARULKAR, P.C. Cadmium sulphide (CdS) nanotechnology: synthesis and applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8: 3272-3299, 2008.

IARC. International Agency for Research on Cancer Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing Industry. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 58. Lyon, pp 119–237, 1993. Disponível em: <http://www.iarc.fr>. Acesso: 29/01/2009.

IDA, K.; TENG, J.; TADA, T.; SAKA, A.; TAMAI, M.; IZUMI-NAKASEKO, H.; ADACHI-AKAHANE, S.; IIDA, H. Essential, completely conserved glycine residue in the domain III S2–S3 linker of voltage-gated calcium channel $\alpha 1$ subunits in yeast and mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (35): 25659–25667, 2007.

JAMIESON, D. J. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *Journal of Bacteriology*, 174: 6678-6681, 1992.

JENSEN, L. T. & CULOTTA, V. C. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* *FET4* by oxygen and iron. *Journal of Molecular Biology*, 318: 251-60, 2002.

JIN, T.; LU, J.; NORDBERG, M. Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicology*, 19: 529–535, 1998.

JIN, Y. H.; CLARK, A. B.; SLEBOS, R. J.; AL-REFAI, H.; TAYLOR, J. A.; KUNKEL, T. A.; RESNICK, M. A.; GORDENIN, D. A. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nature Genetics*, 34: 326–329, 2003.

JIN, Y. H.; DUNLAP, P. E.; MCBRIDE, S. J.; AL-REFAI, H.; BUSHEL, P. R.; FREEDMAN, J. H. Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS genetics*, 4: e1000053, 2008.

KAHL, C. R. & MEANS, A. R. Regulation of cell cycle progression by calcium calmodulin-dependent pathways. *Endocrine Reviews*, 24: 719–736, 2003.

KAMIZONO, A; NISHIZAWA, M.; TERANISHI, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics*, 219: 161-167, 1989.

KAZANTZIS, G. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *Biometals*, 17: 493–498, 2004.

KELLERMAYER, R. Hailey–Hailey disease as an orthodisease of *PMRI* deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 579: 2021–2025, 2005.

- KELLERMAYER, R.; AIELLO, D. P.; MISETA, A.; BEDWELL, D. M. Extracellular Ca^{2+} sensing contributes to excess Ca^{2+} accumulation and vacuolar fragmentation in a *pmr1*Δ mutant of *S. cerevisiae*. *Journal of cell science*, 116: 1637-1646, 2003.
- KERN, A. L.; BONATTO, D.; DIAS, J. F.; YONEMA, M.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J. A. P. The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: insights from phylogenetic studies and particle-induced X-ray emission. *Biometals*, 18: 31–41, 2005.
- KIM, H. G.; PARK, K. N.; CHO, Y. W.; PARK, E. H.; FUCHS, J. A.; LIM, C. J. Characterization and regulation of glutathione S-transferase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et biophysica Acta*, 1520: 179–185, 2001.
- LACERDA, L. D. & MOLISANI, M. M. Three decades of Cd and Zn contamination in Sepetiba Bay, SE. Brazil: Evidence from the mangrove oyster *Crassostreaa rhizophorae*. *Marine Pollution Bulletin*, 52: 969–987, 2006.
- LANE, T. W.; SAITO, M. A.; GEORGE, G. N.; PICKERING, I. J.; PRINCE, R. C. & MORELL, F. M. M. A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, 435: 42, 2005.
- LAROCHELLE, O.; GAGNE, V.; CHARRON, J.; SOH, J. W.; SEGUIN, C. Phosphorylation is involved in the activation of metal regulatory transcription factor 1 in response to metal ions. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 41879–41888, 2001.
- LAUER JÚNIOR, C. M.; BONATTO, D.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SCHUCH, A. Z.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L.; PÊGAS HENRIQUES, J. A. The Pmr1 protein, the major yeast Ca^{2+} -ATPase in the Golgi, regulates intracellular levels of the cadmium ion. *FEMS Microbiology Letters*, 285: 79-88, 2008.
- LEE, W.; ABOUHAMED, M.; THÉVENOD, F. Caspase-dependent and -independent pathways for cadmium-induced apoptosis in cultured kidney proximal tubule cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 91: F823–F832, 2006.
- LEUNG, A. W. C.; HALESTRAP, A.P. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777: 946–952, 2008.
- LIU, Y.; LIU, J.; ISZARD, M. B.; ANDREWS, G. K., PALMITER, R. D.; KLAASSEN C. D. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 135: 222-228, 1995.
- LI, Z.; SZCZYPKA, M.; LU, Y.; THIELE, D. J.; REAL, P. A. The yeast cadmium factor protein (*YCF1*) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 6509–6517, 1996.
- LI, Z.; LU, Y.; ZHEN, R.; SZCZYPKA, M.; THIELE, D. J. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of

bis(glutathionato)cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 42–47, 1997.

LIU, X. F.; SUPEK, F.; NELSON, N.; CULOTTA, V. C. Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 11763-11769, 1997.

LIU Z. M.; CHEN, G. G.; VLANTIS, A. C.; TSE, G.M.; SHUM, C. K.; VAN HASSELT, C. A. Calcium-mediated activation of PI3K and p53 leads to apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 1428 – 1436, 2007.

LIU, Y. & TEMPLETON, D. M. Cadmium activates CaMK-II and initiates CaMK-II-dependent apoptosis in mesangial cells. *FEBS Letters*, 581: 1481–1486, 2007.

LOCKE, E. G.; BONILLA, M.; LIANG, L.; TAKITA, Y.; CUNNINGHAM, K. W. A Homolog of voltage-gated Ca²⁺ channels stimulated by depletion of secretory Ca²⁺ in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18): 6686-6694, 2000.

MAEDA, Y.; NITANAI, Y.; ODA, T. From the crystal structure of troponin to the mechanism of calcium regulation of muscle contraction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 592: 37-46, 2007.

MARCHI, V.; SORIN, A.; WEI, Y.; RAO, R. Induction of vacuolar Ca²⁺-ATPase and H⁺/Ca²⁺ exchange activity in yeast mutants lacking Pmrl, the Golgi Ca²⁺-ATPase. *FEBS Letters*, 454: 181-186, 1999.

MARIS, A.; ASSUMPÇÃO, A. L. K.; BONATTO, D.; BRENDÉL, M.; HENRIQUES, J. A. P. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Current Genetics*, 39: 137-149, 2001.

MASON, D. L. & MICHAELIS, S. Requirement of the N-terminal extension for vacuolar trafficking and transport activity of yeast Ycf1p, an ATP-binding cassette transporter. *Molecular Biology of the Cell*. 13: 4443–4455, 2002.

MASTERS, B. A.; KELLY, E. J.; QUAIFFE, C. J.; BRINSTER, R. L.; PALMITER, R. D. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 584-588, 1994.

MATHEOS, D. N.; KINGSBURY, T. J.; AHSAN, U. S.; CUNNINGHAM, K. W. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 11: 3445-3458, 1997.

MEDICHERLA, M. & GOLDBERG, A. L. Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *The Journal of cell biology*, 182: 4 663–673, 2008.

- MEHDI, K.; PENNINGCKX, M. J. An important role for glutathione and γ -glutamyl transpeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 143: 1885-1889, 1997.
- MEHDI, K.; THIERIE, J.; PENNINGCKY, M. J. γ -Glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism. *The Biochemical Journal*, 359: 631-637, 2001.
- MENDOZA-CÓZATL, D.; LOZA-TAVERA, H.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, A.; MORENO-SÁNCHEZ, R. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 653-671, 2005.
- MERRINGTON, G.; MILLER D.; MCLAUGHLIN M. J.; KELLER M. A. Trophic barriers to fertilizer Cd bioaccumulation through the food chain: a case study using a plant-insect predator pathway. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41: 151-156, 2001.
- MICHALSKA, A. E. & CHOO, K. H. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 8088-8092, 1993.
- MIRLEAN, N. & ROISENBERG, A. The effect of emissions of fertilizer production on the environment contamination by cadmium and arsenic in southern Brazil. *Environmental Pollution*, 143: 335-340, 2006.
- MISETA, A.; KELLERMAYER, R.; AIELLO, D. P.; FU, L.; BEDWELL, D. M. The vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca^{2+} levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Letters*, 451: 132-136, 1999.
- MISSIAEN, L.; DODE, L.; VANOEVERLEN, J.; RAEYMAEKERS, L.; WUYTACK, F. Calcium in the Golgi apparatus. *Cell Calcium*, 41: 405-416, 2007.
- MULLER, E. R.; MACKIN, N. A.; ERDMAN, S. E.; CUNNINGHAM, K. W. Fig1p Facilitates Ca^{2+} Influx and Cell Fusion during Mating of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 38461-38469, 2003.
- MUSTACCHI, R.; HOHMANN, S.; NIELSEN, J. Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast*, 23: 227-238, 2006.
- NAGY, Z.; MONTIGNY, C.; LEVERRIER, P.; YEH, S.; GOFFEAU, A.; GARRIGOS, M.; FALSON, P. Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. *Biochimie*, 88: 1665-1671, 2006.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Nova Iorque, Estados Unidos da América. 2000.
- NEVILLE, M. C. & PEAKER, P. The secretion of calcium and phosphorus into milk. *The Journal of Physiology*, 290: 59-67, 1979.

- NIEVES, J. W. Osteoporosis: the role of micronutrients. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 1232S-1239S, 2005.
- NORDBERG, M. General aspects of cadmium: transport, uptake and metabolism by the kidney. *Environmental Health Perspectives*, 54: 13-20, 1984.
- NOWYCKY, M. C. & THOMAS, A. Intracellular calcium signaling. *Journal of Cell Science*, 115: 3715-3716, 2002.
- NRIAGU, J. O. Quantitative assessment of world-wide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333: 134-139, 1988.
- NZENGUE, Y.; STEIMAN, R.; GARREL, C.; LEFEBVRE, E.; GUIRAUD, P. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: Role of glutathione in the resistance to cadmium. *Toxicology*, 243: 193-206, 2008.
- ORTIZ, D. F.; RUSCITTI, T.; MCCUE, K. F.; OW, D.W. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 4721-4728, 1995.
- PACHECO, C. C.; PASSOS, J. F.; CASTRO, A. R.; MORADAS-FERREIRA, P.; DE MARCO, P. Role of respiration and glutathione in cadmium-induced oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *Archives Microbiology*, 189:271-278, 2008.
- 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*, 17(11): 6339-6347, 1997.
- PALMER, C. P.; ZHOU, X.; LIN, J.; LOUKIN, S. H.; KUNG, C.; SAIMI, Y. A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca^{2+} -permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 7801-7805, 2001.
- PAUMI, C. M.; CHUK, M.; CHEVELEV, I.; STAGLJAR, I.; MICHAELIS, S. Negative regulation of the yeast ABC transporter Ycf1p by phosphorylation within its N-terminal extension. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 27079-27088, 2008.
- PEITER, E.; FISCHER, M.; SIDAWAY, K.; ROBERTS, S. K.; SANDERS, D. The *Saccharomyces cerevisiae* Ca^{2+} channel Cch1p/Mid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity. *FEBS Letters*, 579(25): 5697-5703, 2005.
- PENNINCKX, M. J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus nonconventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2: 295-305. 2002.
- POKUTTA, S. & WEIS, W. I. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annual Review of Cell and Developmental*, 23: 237-261, 2007.

- POTTS, R. J.; BESPALOV, I. A.; WALLACE, S. S.; MELAMEDE, R. J.; HART, B.A. Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallothionein. *Toxicology*, 161: 25–38, 2001.
- POTTS, R. J.; WATKINS, R. D.; HART, B. A. Cadmium exposure down-regulates 8-oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology*, 184: 189–202, 2003.
- PRICE D.J. & JOSHI J. G. Ferritin. Binding of beryllium and other divalent metal ions. *The Journal of Biological Chemistry*, 258: 10873-80, 1983.
- PROZIALECK, W. C.; LAMAR, P. C.; LYNCH, S. M. Cadmium alters the localization of N-cadherin, E-cadherin, and β -catenin in the proximal tubule epithelium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 189: 180–195, 2003.
- PROZIALECK, W. C.; VAIDYA, V. S.; LIU, J.; WAALKES, M. P.; EDWARDS, J. R.; LAMAR, P. C.; BERNARD, A. M.; DUMONT, X.; BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney International*, 72: 985-993, 2007.
- REBBEOR, J. F.; CONNOLLY, G. C.; DUMONT, M. E.; BALLATORI, N. ATP-dependent transport of reduced glutathione on *YCF1*, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 33449–33454, 1998.
- REEVES, P. G. & CHANEY, R. L. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. *Science of the Total Environment*, 398:13–19, 2008.
- RIGON, A. P.; CORDOVA, F. M.; OLIVEIRA, C. S.; POSSER, T.; COSTA, A. P.; SILVA, I.G.; SANTOS, D. A.; ROSSI, F. M.; ROCHA, J. B.; LEAL, R. B. Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38 MAPK. *Neurotoxicology*, 29: 727-734, 2004.
- RIMESSI, A.; GIORGI, C.; PINTON, P.; RIZZUTO, R. The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777: 808-816, 2008.
- RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; ROCHA, O.; FRACÁCIO, R.; PEREIRA, R. H. G.; RODRIGUES, M. H. S. Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tietê River (São Paulo, Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, 65(4): 697-710, 2005.
- ROMERO-ISART, N. & VASAK, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88: 388–396, 2002.

RONG, Y.; DISTELHORST, C. W. Bcl-2 Protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *The Annual Review of Physiology*, 70: 73–91, 2008.

RUDOLPH, H. K.; ANTEBI, A.; FINK G. R.; BUCKLEY, C. M.; DORMAN, T. E.; LEVITRE, J.; DAVIDOW, L. S.; MAO, J. I.; MOIR, D. T. The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMRI*, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell*, 58: 133-145, 1989.

RUOTOLO, R.; MARCHINI, G.; OTTONELLO, S. Membrane transporters and protein traffic networks differentially affecting metal tolerance: a genomic phenotyping study in yeast. *Genome Biology*, 9: R67, 2008.

SANTANGELO, G. M. Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 253–282, 2006.

SATARUG, S. & MOORE, M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental Health Perspectives*, 112: 1099-1103, 2004.

SATARUG, S.; BAKER, J. R.; REILLY, P. E.; MOORE, M. R.; WILLIAMS, D. J. Cadmium levels in the lung, liver, kidney cortex, and urine samples from australians without occupational exposure to metals. *Archives of Environmental Health*, 57: 69-77, 2002.

SAYDAM, N.; ADAMS, T. K.; STEINER, F.; SCHAFFNER, W.; FREEDMAN, J. H. Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 20438–20445, 2002.

SCHAUB, M. C. & HEIZMANN, C. W. Calcium, troponin, calmodulin, S100 proteins: from myocardial basics to new therapeutic strategies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369: 247–264, 2008.

SEGURA-MUNÓZ, S. I.; OLIVEIRA, A. S.; NIKAIDO, M.; TREVILATO, T. M. B. BÓCIO, A.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; DOMINGO, J. L. Metal levels in sugar cane (*Saccharum spp.*) samples from an area under the influence of a municipal landfill and a medical waste treatment system in Brazil. *Environment International*, 32: 52-57, 2006.

SERAFINI, M. T.; ROMEU, A.; AROLA, L. Zn(II), Cd(II) and Cu(II) interactions on glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry international*, 18: 793-802, 1989.

SERERO, A.; LOPES, J.; NICOLAS, A.; BOITEUXA, S. Yeast genes involved in cadmium tolerance: Identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity. *DNA Repair*, 7: 1262–1275, 2008.

SHARMA, K.G.; MASON, D. L.; LIU, G.; REA, P. A.; BACHHAWAT, A. K.; MICHAELIS, S. Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryotic Cell*, 3: 391–400, 2002.

SHENKIN, A. The key role of micronutrients. *Clinical Nutrition*, 25: 1–13. 2006.

SILVER, S. & PHUNG, L.T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32: 587–605. 2005.

SILVER, S. & WAUDERHAUG, M. Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiological Reviews*, 56: 195-264, 1992.

SMITH, M. C. A.; SUMNER, E. R.; AVERY, S. V. Glutathione and Gts1p drive beneficial variability in the cadmium resistances of individual yeast cells. *Molecular Microbiology*, 66: 699–712, 2007.

STAESSEN, J. A.; LAUWERYS, R. R.; IDE, G.; ROELS, H. A.; VYNCKE, G.; AMER, Y. A. Renal function and historical environmental cadmium pollution from zinc smelters. *Lancet*, 1523-1527, 1994.

STATHOPOULOS, A. M. & CYERT, M. S. Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes & Development*, 11: 3432-3444, 1997.

STOHS, S.J. & BAGCHI D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(2): 321-36, 1995.

STURGEON, C. M.; KEMMER, D.; ANDERSON, H. J.; ROBERGE M. Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnology Journal*, 1: 1289-1298, 2006.

SZCZYPKA, M. S.; WEMMIE, J. A.; MOYE-ROWLEY, W. S.; THIELE, D. J. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 22853–22857, 1994.

TAKEDA, H.; KITAOKA, Y.; HAYASHI, Y.; KUMAI, T.; MUNEMASA, Y.; FUJINO, H.; KOBAYASHI, S.; UENO, S. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates the phosphorylation of CREB in NMDA-induced retinal neurotoxicity. *Brain Research*, 1184: 306-315, 2007.

TAMÁS, M. J.; LABARRE, L.; TOLEDANO, M. B.; WYSOCKI, R. Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast. *Topics in Current Genetics*, 14: 395-454, 2005.

TANDOĞAN, B. & ULUSU, N.N. The inhibition kinetics of yeast glutathione reductase by some metal ions. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 224: 489-95, 2007.

- TAO, L.; YANG, S.; XIE, M.; KRAMER, P. M.; PEREIRA, M. A. Hypomethylation and overexpression of c-jun and c-myc protooncogenes and increased DNA methyltransferase activity in dichloroacetic and trichloroacetic acid-promoted mouse tumors. *Cancer Letters*, 158: 185–193, 2000.
- THOMPSON, J. & BANNIGAN, J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology*, 25: 304–315, 2008.
- THORSEN, M.; PERRONE, G. G.; KRISTIANSSON, E.; TRAINI, M.; YE, T.; DAWES, I. W.; NERMAN, O.; TAMÁS, M. K. Genetic basis of arsenite and cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 10: 105-120, 2009.
- VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOLA, J.; IZAKOVIC, M.; MAZURA, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1–40, 2006.
- VERKHRATSKY, A.; ANDEROVA, M.; CHVATAL, A. Differential calcium signalling in neuronal-glia networks. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 14: 2004-2016, 2009.
- VIDO, K.; SPECTOR, D.; LAGNIEL, G.; LOPEZ, S.; TOLEDANO, M. B.; LABARRE, J. Tolerante to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *The EMBO journal*, 18: 3325–3333, 1999.
- VIDO, K.; SPECTOR, D.; LAGNIEL, G.; LOPEZ, S.; TOLEDANO, M. B.; LABARRE, J. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 8469-8474, 2001.
- VILADEVALL, L.; SERRANO, R.; RUIZ, A.; DOMENECH, G.; GIRALDO, J.; BARCELÓ, A.; ARIÑO, J. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 43614-43624, 2004.
- VUILLEUMIER, S.; PAGNI, M. The elusive role of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 138–146: 2002.
- WAISBERG, M.; JOSEPH, P.; HALE, B.; BEYERSMANN, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192: 95–117, 2003.
- WANG, W. & BALLAROTI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacological reviews*, 50: 335–355, 1998.
- WANG, Z. & TEMPLETON, D. M. Induction of c-fos protooncogene in mesangial cells by cadmium. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 73–79, 1998.
- WANG, S. S.; CHEN, L.; XIA, S. K. Cadmium is acutely toxic for murine hepatocytes: effects on intracellular free Ca²⁺-homeostasis. *Physiological Research*, 56: 193-201, 2007.

WANG, L.; CAO, J.; CHEN, D.; LIU, X.; LU, H.; LIU, Z. Role of oxidative stress, apoptosis, and intracellular homeostasis in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to cadmium. *Biological Trace Element Research*, 127: 53–68, 2009.

WÄTJEN, W. & BEYERSMANN, D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Influence of oxidative stress. *Biometals*, 17: 65–78, 2004.

WEMMIE, J. A.; SZCZYPKA, M. S.; THIELE, D. J.; MOYE-ROWLEY, W. S. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 32592–32597, 1994.

WESTERBEED-MARRES C. A.; MOORE, M. M.; AUTOR, A. P. Regulation of manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. The role of respiratory chain activity. *European Journal of Biochemistry*, 174: 611-620, 1988.

WHO. Cadmium. Environmental Health Criteria, 134. World Health Organization, 1992. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>. Acesso: 25/02/2009.

WHO. Nordic Council of Ministers: Cadmium Review. World Health Organization, 1 (4): 1-24, 2003. Disponível em http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr_cadmium.pdf. Acesso: 25/01/2009.

WILLIAMS, C. R. & HARRISON, R. M. Cadmium in the atmosphere. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 40: 29-36, 1984.

WILLIAMS, R. J. P. The natural selection of the chemical elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53: 816-829, 1997.

WOLF, M. B. & BAYNES J. W. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biometals*, 20:73-81, 2007.

WUYTACK, F.; RAEYMAEKERS, L.; MISSIAEN, L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, 32: 279–305, 2002.

WUYTACK, F.; RAEYMAEKERS, L.; MISSIAEN, L. PMR1/SPCA Ca²⁺ pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca²⁺ store. *European Journal of Physiology*, 446: 148–153, 2003.

www.cadmium.org. Acesso: 25/02/2009

YAMNIUK, A. P. & VOGEL, H. J. Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides. *Molecular Biotechnology*, 27: 33-57, 2004.

YIN, Z.; HATTON, L.; BROWN, A. J. Differential post-transcriptional regulation of yeast mRNAs in response to high and low glucose concentrations. *Molecular Microbiology*, 35: 553-565, 2000.

YOSHIMURA, H.; TADA, T.; IIDA, H. Subcellular localization and oligomeric structure of the yeast putative stretch-activated Ca^{2+} channel component Mid1. *Experimental Cell Research*, 293: 185–195, 2004.

ZHARKOV, D. O. & ROSENQUIST, T. A. Inactivation of mammalian 8-oxoguanine-DNA glycosylase by cadmium(II): implications for cadmium genotoxicity. *DNA Repair*, 1: 661–670, 2002.

ZHOU, X.; BATIZA, A. F.; LOUKIN, S. H.; PALMER, C. P.; KUNG, C.; SAIMI, Y. The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is mechanosensitive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 7105-7110, 2003.



ANEXOS

ANEXO I

Genes associados ao tráfego de vesículas do Golgi, cuja deleção resulta em aumento sensibilidade ao Cd²⁺

GENE*	Descrição do nome
<i>CLC1</i>	<i>Clathrin light chain 1</i>
<i>COG5</i>	<i>Conserved oligomeric Golgi complex 5</i>
<i>COG8</i>	<i>Conserved oligomeric Golgi complex 8</i>
<i>ENT3</i>	<i>Epsin N-terminal homology 3</i>
<i>ERV41</i>	<i>ER vesicle 41</i>
<i>ERV46</i>	<i>ER vesicle 46</i>
<i>GET2</i>	<i>Guided entry of tailanchored proteins 2</i>
<i>GET3</i>	<i>Guided entry of tailanchored proteins 3</i>
<i>GGA2</i>	<i>Golgi-localized, gamma-adaptin 2</i>
<i>NHX1</i>	<i>Na⁺/H⁺ exchanger 1</i>
<i>PEP7</i>	<i>Carboxypeptidase Y-deficient 7</i>
<i>PEP8</i>	<i>Carboxypeptidase Y-deficient 8</i>
<i>RGP1</i>	<i>Reduced growth phenotype 1</i>
<i>RIC1</i>	<i>Ribosome control 1</i>
<i>SAC1</i>	<i>Suppressor of actin 1</i>
<i>SEC22</i>	<i>Secretory 22</i>
<i>SEC66</i>	<i>Secretory 66</i>
<i>VAM10</i>	<i>Vacuolar morphogenesis 10</i>
<i>VPS1</i>	<i>Vacuolar protein sorting 1</i>
<i>VPS3</i>	<i>Vacuolar protein sorting 3</i>
<i>VPS5</i>	<i>Vacuolar protein sorting 5</i>
<i>VPS13</i>	<i>Vacuolar protein sorting 13</i>
<i>VPS8</i>	<i>Vacuolar protein sorting 8</i>
<i>VPS9</i>	<i>Vacuolar protein sorting 9</i>
<i>VPS17</i>	<i>Vacuolar protein sorting 17</i>
<i>VPS21</i>	<i>Vacuolar protein sorting 21</i>
<i>VPS29</i>	<i>Vacuolar protein sorting 29</i>
<i>VPS30</i>	<i>Vacuolar protein sorting 30</i>
<i>VPS35</i>	<i>Vacuolar protein sorting 35</i>
<i>VPS38</i>	<i>Vacuolar protein sorting 38</i>
<i>VPS45</i>	<i>Vacuolar protein sorting 45</i>
<i>VPS51</i>	<i>Vacuolar protein sorting 51</i>
<i>VPS54</i>	<i>Vacuolar protein sorting 54</i>
<i>YPT6</i>	<i>Yeast protein two 6</i>

*Fonte: Ruotolo et al., 2008 (Suplemento online)

Genes associados à via de seleção para o corpo multivesicular dependente de ubiquitinação, cuja deleção resulta em aumento sensibilidade ao Cd²⁺

GENE*	Descrição do nome
<i>ARO1</i>	<i><u>A</u>romatic amino acid requiring 1</i>
<i>DID2</i>	<i><u>D</u>oa4-<u>i</u>ndependent <u>d</u>egradation 2</i>
<i>DID4</i>	<i><u>D</u>oa4-<u>i</u>ndependent <u>d</u>egradation 4</i>
<i>DOA4</i>	<i><u>D</u>egradation of <u>a</u>lpha 4</i>
<i>MVB12</i>	<i><u>M</u>ultivesicular <u>b</u>ody sorting factor of 12 kilodaltons</i>
<i>SNF7</i>	<i><u>S</u>ucrose <u>n</u>onfermenting 7</i>
<i>SNF8</i>	<i><u>S</u>ucrose <u>n</u>onfermenting 8</i>
<i>SRN2</i>	<i><u>S</u>uppressor of <u>r</u>na1-1 2</i>
<i>STP22</i>	<i><u>S</u>terile <u>p</u>seudoreversion 22</i>
<i>VPS20</i>	<i><u>V</u>acuolar <u>p</u>rotein <u>s</u>orting 20</i>
<i>VPS24</i>	<i><u>V</u>acuolar <u>p</u>rotein <u>s</u>orting 24</i>
<i>VPS25</i>	<i><u>V</u>acuolar <u>p</u>rotein <u>s</u>orting 25</i>
<i>VPS27</i>	<i><u>V</u>acuolar <u>p</u>rotein <u>s</u>orting 27</i>
<i>VPS28</i>	<i><u>V</u>acuolar <u>p</u>rotein <u>s</u>orting 28</i>
<i>VPS36</i>	<i><u>V</u>acuolar <u>p</u>rotein <u>s</u>orting 36</i>
<i>VPS4</i>	<i><u>V</u>acuolar <u>p</u>rotein <u>s</u>orting 4</i>

*Fonte: Ruotolo et al., 2008 (Suplemento online)

ANEXO II

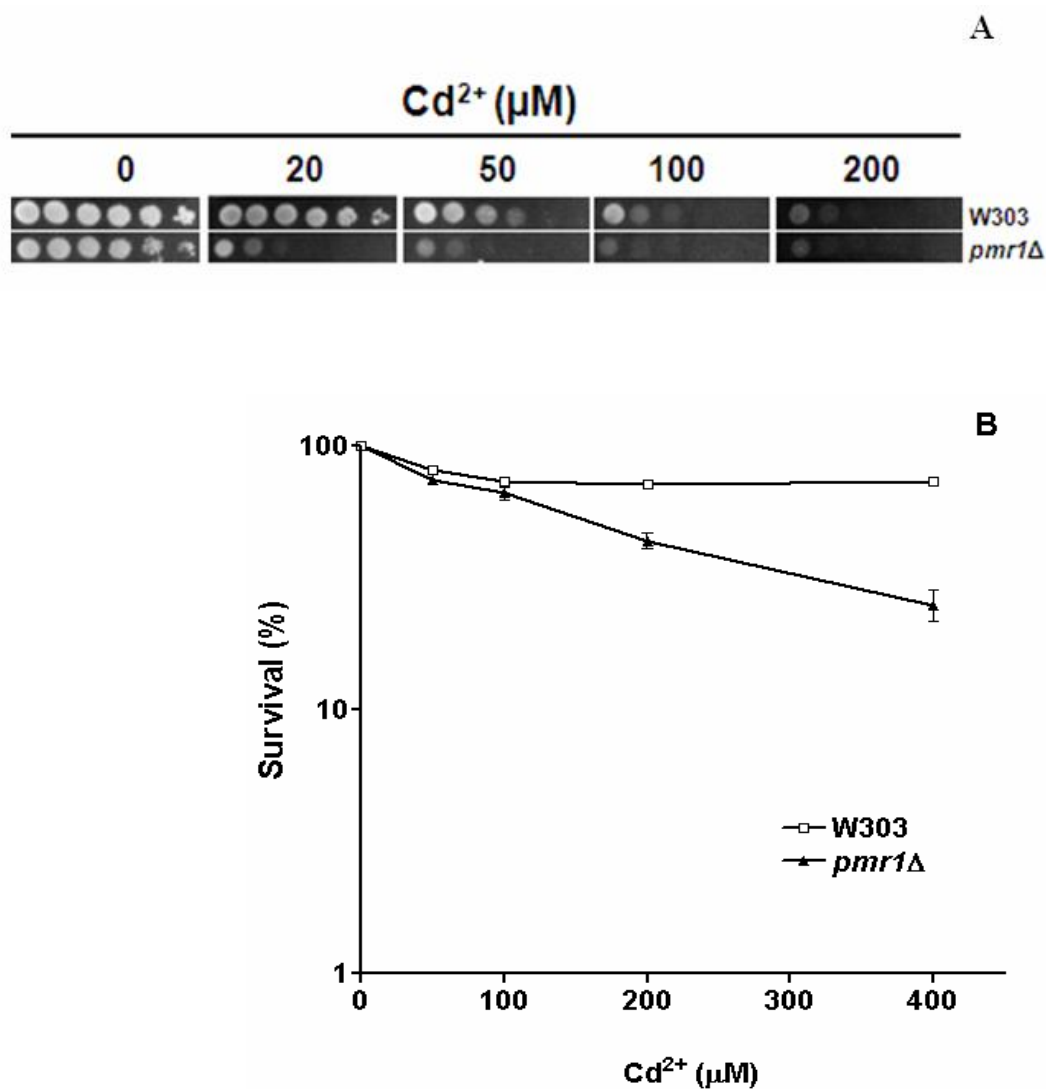


Figura 1. Sensibilidade da linhagem *pmr1Δ* derivada da W303 ao tratamento com Cd²⁺. (A) Exposição crônica. As células foram diluídas entre 10⁸ e 10³ células/mL e 10μL de cada diluição foram semeados em meio sólido contendo as concentrações de Cd²⁺ indicadas. (B) Exposição aguda. Aproximadamente 1,2 x 10⁷ células/ mL foram tratadas em meio sintético suplementado ou não com Cd²⁺. Após 4h, aproximadamente 500 células foram semeadas em meio sintético e incubadas a 30° C para a contagem das colônias sobreviventes. Os dados são expressos como média ± SEM. Para alguns pontos, a barra de erro não excede o tamanho do símbolo.

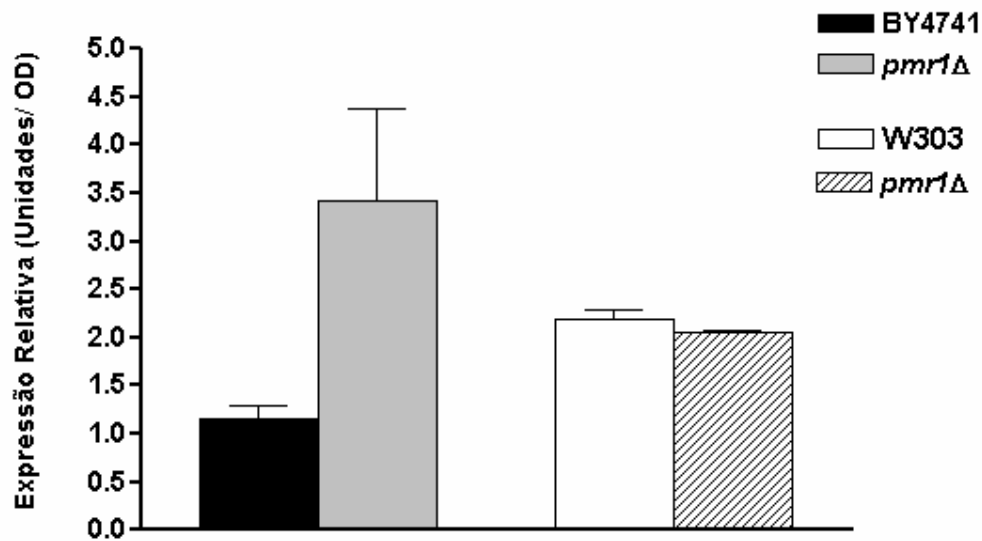


Figura 2. Regulação basal do promotor *YCF1* no genótipo das selvagens W303 e BY4741. As células de *S. cerevisiae* foram transformadas com o plasmídeo reporter pJAW736, da mesma forma como descrito no capítulo I (seção 2.4). Aproximadamente $1,2 \times 10^7$ células/mL foram tratadas em meio sintético sem Cd^{2+} . Após 4 h, as células foram coletadas e a expressão do promotor *YCF1* foi determinada pelo ensaio de β -galactosidade. O mutante *pmr1*Δ representado pela barra cinza é isogênico da BY4741, o mutante *pmr1*Δ representado pela barra tracejada é isogênico da W303. Os dados foram expressos como média \pm SEM.

The Pmr1 protein, the major yeast Ca^{2+} -ATPase in the Golgi, regulates intracellular levels of the cadmium ion

Cláudio Marcos Lauer Júnior^{1,2}, Diego Bonatto³, Albanin Aparecida Mielniczki-Pereira¹, Ana Zilles Schuch¹, Johnny Ferraz Dias⁴, Maria-Lúcia Yoneama⁴ & João Antonio Pêgas Henriques^{1,3}

¹Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; ²Universitário Feevale, Campus II, Novo Hamburgo, RS, Brazil; ³Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Bloco, Caxias do Sul, RS, Brazil; and ⁴Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence: João Antonio Pêgas Henriques, Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brazil, 91507-970. Tel.: +55 51 3308 7602; fax: +55 51 3308 6084; e-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

Received 25 December 2007; accepted 23 April 2008.

First published online 29 May 2008.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2008.01214.x

Editor: Derek Jamieson

Keywords

Saccharomyces cerevisiae; Pmr1p; secretory pathway; Ca^{2+} / Mn^{2+} -ATPases; cadmium; particle-induced X-ray emission.

Introduction

Calcium is an essential nutrient that plays a key role in the transduction of external signals through the cytoplasm of eukaryotic cells. Fluctuations in cytosolic free calcium ion concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) directly elicit a cellular response by altering the functions of Ca^{2+} -binding proteins and their targets (Anraku *et al.*, 1991). A variety of stimuli can trigger the opening of Ca^{2+} -specific channels in the plasma membrane or the endoplasmic reticulum (ER), causing massive Ca^{2+} influx and accumulation in the cytoplasm. After stimulation, basal $[\text{Ca}^{2+}]_c$ levels are restored by Ca^{2+} -ATPases and antiporters that transport Ca^{2+} from the cytoplasm through the plasma membrane to the extracellular environment as well as through several internal membranes into organelles capable of storing excess Ca^{2+} . Cells use a wide array of ion transporters and sensory factors to regulate $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and produce appropriate responses to Ca^{2+} signals (Cunningham & Fink, 1994).

Abstract

Cadmium is a nonessential, highly toxic heavy metal that shows ionic properties similar to calcium. These ionic similarities imply that the cadmium ion, Cd^{2+} , is a calcium ion, Ca^{2+} , receptor-agonist, affecting the same biochemical pathways involved in Ca^{2+} homeostasis. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the *PMC1* and *PMR1* genes encode vacuolar and Golgi Ca^{2+} -ATPases, respectively. The *PMR1* protein product Pmr1p is involved in both Ca^{2+} and Mn^{2+} homeostasis. This study investigated the importance of Pmc1p and Pmr1p for Cd^{2+} cellular detoxification. Using the standard techniques of yeast molecular research and a multielemental procedure named particle-induced X-ray emission, Pmr1p was identified as a protein that directly participates in the detoxification of Cd^{2+} , possibly through the secretory pathway. The results allow us to posit a model of Cd^{2+} detoxification where Pmr1p has a central role in cell survival in a Cd^{2+} -rich environment.

Currently, a relatively small number of Ca^{2+} transporters are known to maintain $[\text{Ca}^{2+}]_c$ homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, including: the vacuolar Ca^{2+} -ATPase Pmc1p (Cunningham & Fink, 1994); the vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchanger Vcx1p/Hum1p (Cunningham & Fink, 1996; Pozos *et al.*, 1996); the ER Ca^{2+} -ATPase Cod1p/Spf1p (Suzuki & Shimma, 1999; Cronin *et al.*, 2000, 2002; Bonilla *et al.*, 2002); and the Golgi Ca^{2+} -ATPase Pmr1p (Rudolph *et al.*, 1989; Antebi & Fink, 1992). These transporters respond to the calmodulin/calcineurin-signaling pathway and are controlled by the transcription factor Tcn1p/Crz1p, keeping the intracellular levels of Ca^{2+} between 50 and 200 nM, although the environmental concentrations of this ion may range from < 1 to > 100 mM (Eilam *et al.*, 1985; Dunn *et al.*, 1994; Batiza *et al.*, 1996; Miseta *et al.*, 1999; Yoshimoto *et al.*, 2002).

Given that two of the four proteins responsible for yeast $[\text{Ca}^{2+}]_c$ homeostasis are located in the vacuole, it is not surprising that this organelle serves as the major location for

Ca²⁺ sequestration and normally contains more than 95% of the total cellular Ca²⁺ (Eilam *et al.*, 1985; Dunn *et al.*, 1994). Loss of the Golgi-associated Pmr1p increases sensitivity to high environmental Ca²⁺ levels when vacuolar Ca²⁺ transport is compromised, indicating that the Golgi complex also plays an important role in Ca²⁺ sequestration and expulsion from the cell (Tanida *et al.*, 1995; Marchi *et al.*, 1999; Miseta *et al.*, 1999). Pmr1p was the first member of the secretory pathway Ca²⁺-ATPases (SPCAs) to be identified in eukaryotes (Sorin *et al.*, 1997; Kathryn *et al.*, 2004). In humans, mutations in the Pmr1-homologous protein SPCA1 cause the acantholytic skin condition Hailey–Hailey disease (HHD) (Hu *et al.*, 2000; Sudbrak *et al.*, 2000).

Heavy metal ions such as Al³⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, and Cd²⁺ can interact metabolically with Ca²⁺-binding molecules. Cd²⁺ competes with Ca²⁺ in the nervous system and this interaction can impair cognitive development; this Cd²⁺–Ca²⁺ interaction can also produce osteodystrophies in the skeletal system (Goyer, 1997; Kazantzis, 2004). Furthermore, Cd²⁺ exposure can induce lung, kidney, prostate, and testicular cancers in murine models (Waalkes *et al.*, 1992). Human epidemiological data suggest that Cd²⁺ causes tumors of the male reproductive system and induces respiratory tumors (Peters *et al.*, 1986).

Despite the vast amount of physiological information about the effects of Cd²⁺ in biological systems, the cellular routes for uptake from the environment are not yet well understood. Cd²⁺ could be captured and internalized through Ca²⁺ channels of the cytoplasmic membranes (Beyersmann & Hechtenberg, 1997), because both Ca²⁺ and Cd²⁺ have similar ionic radii (Rainbow & Black, 2005). In this study, we examined how Cd²⁺ affects the phenotype of yeast strains proficient and deficient for the *PMR1* and *PMC1* genes. For this purpose, we used established yeast cytotoxicity assays to compare the Cd²⁺ sensitivity of these yeast strains. We also analyzed the intracellular concentration of Cd²⁺ using the multielemental technique

called particle-induced X-ray emission (PIXE), which has been successfully used to quantify metals present in biological samples (Kern *et al.*, 2005).

Materials and methods

Unless otherwise stated, all chemicals for yeast and bacterial cultures as well as for molecular biology procedures were purchased from Sigma-Aldrich Corp. (St Louis, MO), BD Biosciences Co. (San Jose, CA), and Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA).

Strains, plasmids, growth conditions, and molecular biology procedures

The yeast *S. cerevisiae* strains used in this work are all isogenic derivatives of wild-type (WT) strain W303 (Table 1), and have been described previously (Cunningham & Fink, 1994). Yeast was routinely grown on synthetic complete (SynCo) medium (0.17 g L⁻¹ of yeast nitrogen base without amino acids or ammonium sulfate, 65 g L⁻¹ of ammonium sulfate, and 20 g L⁻¹ of glucose with appropriate amino acids or/and nitrogen bases added at 20 mg L⁻¹. For solid SynCo, the medium was supplemented with 20 g L⁻¹ of bacto-agar). All yeast strains containing the plasmids YCpLac33 and pPMR1 were grown in SynCo minus uracil (SynCo-ura) medium.

Escherichia coli strain XL1-Blue (Table 1) was used as a recipient for cloning procedures and was grown in Luria–Bertani (LB) medium (10 g L⁻¹ of tryptone, 5 g L⁻¹ of yeast extract, and 10 g L⁻¹ of NaCl). For selection and propagation of plasmid-containing bacterial cells, the LB medium was supplemented with ampicillin solution at a final concentration of 150 µg mL⁻¹.

Techniques for yeast genetics were performed as described by Rose *et al.* (1990). Standard molecular procedures for yeast and *E. coli* transformation, plasmid isolation, and DNA manipulation were performed as described by Sambrook *et al.* (1989) and Ausubel *et al.* (1996).

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* strains used in this study

Organisms	Strains	Genotypes	Phenotypes	Sources
<i>S. cerevisiae</i>	W303	<i>Mata ade2-1 his3-11 leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 can1-100</i>	Wild-type (WT)	Cunningham & Fink (1994)
	W303T	W303; YCpLac33	WT; empty vector	This study
	K605	<i>Mata ade2-1 his3-11 leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 can1-100 pmc1::TRP1</i>	<i>pmc1Δ</i> mutant	Cunningham & Fink (1994)
	K610	<i>Mata his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 ura3-1 trp1-1 can1-100 pmr1::TRP1</i>	<i>pmr1Δ</i> mutant	Cunningham & Fink (1994)
	CML100	K610; YCpLac33	<i>pmr1Δ</i> mutant; empty vector	This study
	CML200	K610; pPMR1	Rescue <i>pmr1Δ</i> ; PMR1	This study
<i>E. coli</i>	XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacqZ.M15 Tn10 (Tetr)]</i>		Invitrogen Corp.

The bifunctional yeast–*E. coli* centromeric vector YCpLac33 (Gietz & Sugino, 1988) was used for yeast transformation and *PMR1* cloning.

Yeast *PMR1* gene cloning and analysis

The *PMR1* gene was amplified by the PCR using phenol–chloroform purified genomic DNA from W303 yeast (Table 1) as a template. For PCR amplification, the proof-reading *Pfx* enzyme was used in order to avoid the introduction of mutations into the *PMR1* sequence. The following primers were used for *PMR1* amplification: sense primer (5'-G GGT ACC CCC CCT CAT CAC AAC GAC ATC GTG TTT CAT CT-3); and antisense primer (5'-GGG CCC CAA GCT TGG TCT CTT TGT AAA GTT GAG AAT-3'). The underlined bases in both the sense and the antisense primers indicate the restriction sites for the *KpnI* and *XmaI* enzymes, respectively. Once amplified, the product was digested with *KpnI* and *XmaI*, gel purified, and the resulting fragment was cloned into the plasmid YCpLac33. The *PMR1*-YCpLac33 plasmid was named p*PMR1*, and the presence of insert was confirmed by both double digestion of p*PMR1* with *KpnI* and *XmaI* and by PCR amplification, followed by direct agarose gel analysis of *PMR1* fragment.

Yeast Cd²⁺ sensitivity assay by drop test

The Cd²⁺ sensitivity of yeast strains was determined by the drop test standard technique. Briefly, yeast cultures in an early stationary phase of growth (1×10^8 cells mL⁻¹) were obtained after 2 days of growth in SynCo or SynCo-ura media at 30 °C. The yeast cultures were serially diluted (1:10 at each step) in a sterile saline solution (0.9% of NaCl) and 10 µL of each suspension was plated on SynCo or SynCo-ura media supplemented or not with 0.02 mM of CdCl₂. Negative controls were performed on media without CdCl₂. Plates were photographed after 2 days of growth at 30 °C.

Yeast survival curves

Yeast cells from an early stationary phase (1×10^8 cells mL⁻¹) were reinoculated in SynCo-ura medium containing different concentrations of CdCl₂ (from 20 to 160 µM) at a final density of 5×10^6 cells mL⁻¹. The yeast cultures were incubated for 24 h in a shaker (180 r.p.m.) at 30 °C. The yeast cells were harvested by centrifugation, washed twice with sterile ultrapure water, and diluted to a final concentration of 2×10^3 cells mL⁻¹. Aliquots of 100 µL were plated in triplicate on SynCo-ura medium and incubated at 30 °C for 3 days for colony counting. The data for survival curve were obtained from three independent measurements.

PIXE

For PIXE analysis, cells were cultured on plates for 7 days at 30 °C, then harvested by scraping and suspended in sterile double-distilled water. The yeast cells were centrifuged, washed twice with sterile ultrapure water, resuspended, and diluted to a final density of about 5×10^6 cells mL⁻¹ in 200 mL of liquid SynCo-ura medium. CdCl₂ was added to the medium at a final concentration of 100 µM and the cultures were incubated at 30 °C for 24 h. After incubation, the yeast cultures were harvested by centrifugation, washed three times with sterile ultrapure water, freeze-dried, crushed, and pressed into pellets (Viau *et al.*, 2006). Two independent samples were prepared, and PIXE analyses were carried out on each one individually. The average weight of the pellets was 0.085 g.

The PIXE analysis was carried out at the 3 MV Tandemron accelerator facility at the Physics Institute of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. All measurements were performed using a 2 MeV proton beam with an average current of 5 mA. The acquisition time for each sample was 10–20 min. The beam spot at the target position was about 9 mm². The samples containing the yeast cells, the blank, and the calibration targets were placed in a target holder, which accommodates up to 10 specimens. Each sample was positioned in the proton beam by means of an electric-mechanical system. The characteristic X-rays induced by the proton beam were simultaneously detected by an HPGe detector from EG&G (GLP series, EG&G Ortec, CA), with an energy resolution of 180 eV at 5.9 keV, and a lithium-doped silicon detector (SLP series, EG&G Ortec), with an energy resolution of about 155 eV at 5.9 keV. The GUPIX code (Campbell *et al.*, 2000) was used for data analysis. The standardization procedure was carried out using a bovine liver standard NIST (SRM-1577b) (Viau *et al.*, 2006).

The PIXE spectrum for a yeast sample treated with CdCl₂ is described in Fig. 1. The Kα⁻ line (c. 23.2 keV) of Cd was used in order to obtain the elemental concentration of this element in the W303T, CML100, and CML200 strains. The relationship among the elemental concentration *C*, the experimental X-ray yield *Y* (obtained from the Cd-peak area of the PIXE spectrum; Fig. 1), and the theoretical yield *Y_T* (which contains all physical parameters relevant to the process) follows the mathematical expression:

$$C = Y / (Q \times \Omega \times \varepsilon \times t \times Y_T)$$

where *t* is the X-ray transmission through any absorbers placed between the target and the detector's crystal, ε and Ω are the detector's efficiency and solid angle, respectively, and *Q* is the charge accumulated during the irradiation. For yeast cells, the stoichiometric ratio of intracellular metals was estimated considering the cell density retained in the target. The metal quantity was calculated from the PIXE

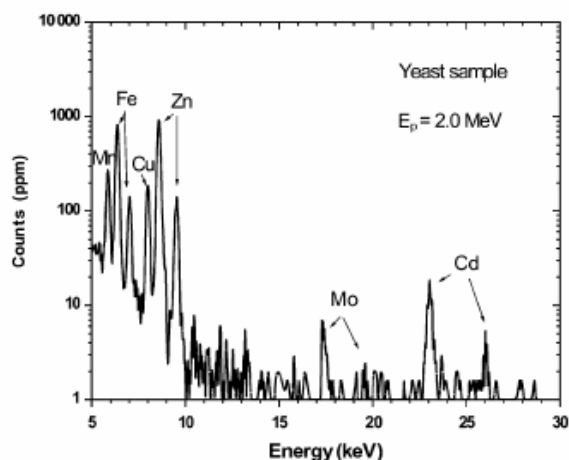


Fig. 1. PIXE spectrum of a yeast sample. This spectrum clearly shows the presence of Cd X-ray peaks. Other elements such as Mn, Fe, Cu, Zn, and Mo were also detected. The most intense peaks of each element are $K\alpha$ -lines and the less intense ones are $K\beta$ -lines. This spectrum was only used to analyze Cd high-energy X-ray peaks. Therefore, the Ca X-ray peak is not present in this spectrum. E_p , energy of the proton.

results and expressed as ppm g^{-1} of cell dry weight. Other elements such as Mn, Fe, Cu, Zn, and Mo were also present in yeast samples (Fig. 1).

Results and discussion

Phenotypic analysis for Cd^{2+} sensitivity of *S. cerevisiae* strains proficient and deficient in vacuolar and Golgi Ca^{2+} -ATPases

To analyze the sensitivity of yeast strains proficient and deficient in vacuolar and Golgi Ca^{2+} -ATPases (Table 1), we used the drop test assay (Fig. 2a and b), which is currently used for an initial screening of specific yeast phenotypic characteristics, like Cd^{2+} toxicity. The results indicated that the yeast strain K610, which has the *pmr1* Δ mutation (see Table 1), had the highest sensitivity to CdCl_2 at a final concentration of 0.02 mM (Fig. 2a). On the other hand, both strains W303 (WT; Table 1) and K605 (*pmc1* Δ ; Table 1) showed the same tolerance to CdCl_2 at 0.02 mM (Fig. 2a).

In order to confirm that the mutation *pmr1* Δ is responsible for Cd^{2+} sensitivity, we transformed the strain K610 with a centromeric plasmid carrying the complete yeast *PMR1* gene (*pPMR1*) amplified by PCR (strain CML200). In addition, the W303 and K610 strains were also transformed with the empty vector YCpLac33 (W303T and CML100, respectively) to be used as a negative control. While the CML100 strain (harboring the empty vector YCpLac33) was highly sensitive to CdCl_2 exposure, the CML200 strain (with a fully functional 'rescue' copy of

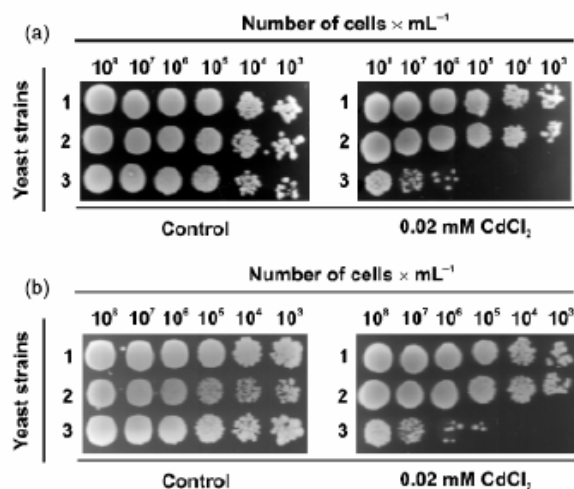


Fig. 2. Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to chronic exposure to CdCl_2 in solid medium. (a) Control (no CdCl_2) and 0.02 mM CdCl_2 . The number of cells per milliliter used in the drop test varied from 10^8 to 10^3 . Yeast strains: (1) W303, (2) K605, and (3) K610. (b) Control (no CdCl_2) and 0.02 mM CdCl_2 . Yeast strains: (1) W303T, (2) CML200, and (3) CML100.

PMR1) exhibited reduced sensitivity that was comparable with that observed in the WT strain W303T (Fig. 2b).

Both *Pmc1p* and *Pmr1p* belong to the yeast SPCA family, which are Mn^{2+} - and Ca^{2+} -transporting P-type ATPases located in the vacuole membrane and Golgi apparatus, respectively (Ton *et al.*, 2002; Wuytack *et al.*, 2003). These proteins are responsible for high-affinity transport of Mn^{2+} and Ca^{2+} into the Golgi, where these ions are sequestered from the cytoplasm (Andal *et al.*, 2003). SPCA genes have been identified in diverse organisms, including *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, and *Homo sapiens*. In *S. cerevisiae*, the *Pmr1p* has distinct biochemical characteristics, which clearly distinguish it from the well-studied mammalian sarcoendoplasmic reticulum (SERCA) and plasma membrane Ca^{2+} -ATPases (PMCA) (Sorin *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 1999). The yeast *Pmr1p* has received more attention in recent years because its mutated human homolog, hSPCA1, has been found to be responsible for HHD (Hu *et al.*, 2000; Sudbrak *et al.*, 2000).

To confirm the results of the drop test, we exposed the yeast strains W303T, CML100, and CML200 to increasing doses of Cd^{2+} for 24 h. The resulting survival curves clearly showed that all strains with a functional copy of the *PMR1* gene were resistant to Cd^{2+} doses from 20 to 160 μM (Fig. 2). On the other hand, the strain harboring the *pmr1* Δ mutation exhibited sensitivity to the lowest dose of CdCl_2 (Fig. 3). It should be noted that, despite the sensitivity of the *pmr1* Δ strain to CdCl_2 relative to the WT strain, there is no dose-response effect to increased CdCl_2 concentrations in the culture medium. This may be due to the activation of

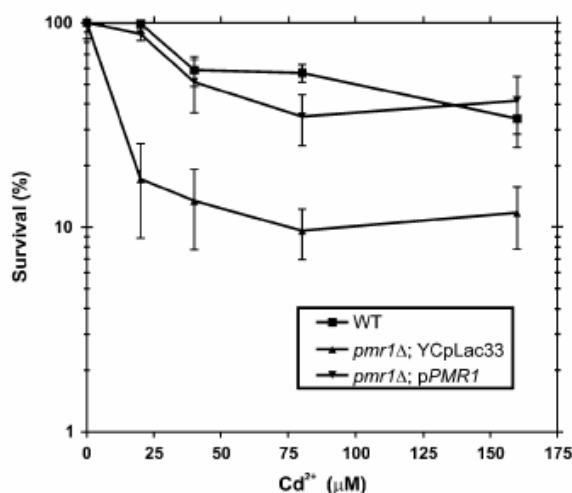


Fig. 3. Sensitivity of proficient and deficient *PMR1* yeast strains to different concentrations of CdCl₂. The names of the yeast strains used are included in the inset. The data represent an average of three independent experiments.

other mechanisms related to Ca²⁺ homeostasis when the intracellular levels of Cd²⁺ surpass a determined threshold.

PIXE assay of intracellular Cd²⁺ concentration

The phenotypic results of Cd²⁺ toxicity in yeast strains proficient and deficient in Pmr1p (Figs 2 and 3) suggest that Cd²⁺ is not detoxified by the *pmr1*Δ mutant. To answer this question, we compared the levels of Cd²⁺ in the W303T, CML100, and CML200 strains using the PIXE method, which allowed us to correlate the intracellular quantity of Cd²⁺ with its toxicity. PIXE has been used conventionally to estimate metal content in organic and inorganic materials (Kozai *et al.*, 2003; Przybyłowicz *et al.*, 2003).

The PIXE results indicate that the [Cd²⁺]_c is approximately threefold higher in the *pmr1*Δ strain (4.37 ppm g⁻¹ cell dry weight) than in both the W303T (1.62 ppm g⁻¹ cell dry weight) and the *pmr1*Δ strain containing the plasmid pPMR1 (1.54 ppm g⁻¹ cell dry weight; Fig. 4a). These data support our previous phenotypic results, indicating that the sensitivity of the *pmr1*Δ mutant is due to an elevated intracellular Cd²⁺ content compared with the W303T cells. One interesting aspect of this work is that the [Ca²⁺]_c is lower in the CML100 strain (203 ppm g⁻¹ cell dry weight) when compared with both W303T (317 ppm g⁻¹ cell dry weight) and CML200 (274 ppm g⁻¹ cell dry weight) strains (Fig. 4b) after exposure to Cd²⁺. Cd²⁺ being a Ca²⁺-agonist, it is possible that the elevated [Cd²⁺]_c of the CML100 strain inhibits the uptake of extracellular Ca²⁺, resulting in diminished [Ca²⁺]_c.

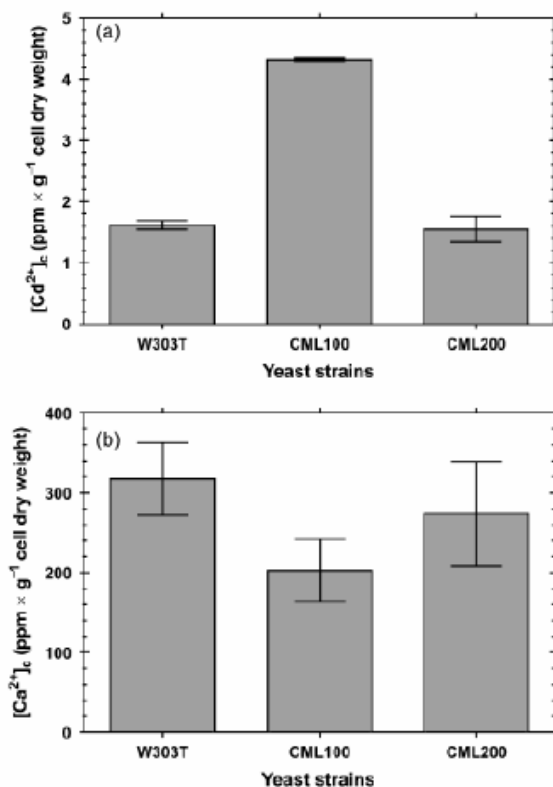


Fig. 4. Cytoplasmic Cd²⁺ ([Cd²⁺]_c; (a) and Ca²⁺ ([Ca²⁺]_c; (b) content of yeast cells, proficient and deficient in Pmr1 protein, as analyzed by the PIXE technique. The data were obtained from two independent experiments and are presented as mean ± SD.

Some studies have shown that the yeast *pmr1*Δ strain is unable to properly maintain normal Ca²⁺ and Mn²⁺ levels in compartments of the secretory pathway. This Ca²⁺ transport defect leads to an increased rate of Ca²⁺ uptake and accumulation by a mechanism that resembles the capacitative Ca²⁺ entry response in nonexcitable mammalian cells (Csutora *et al.*, 1999; Locke *et al.*, 2000). Moreover, it was demonstrated that the *pmr1* mutant strain, when grown on culture media containing lower or normal levels of Ca²⁺, accumulates high quantities of this ion in the vacuole as a consequence of the elevated activity of Pmc1p, which explains the low Ca²⁺-sensitive phenotype of *pmr1* strains (Halachmi & Eilam, 1996). In this sense, both Pmr1p and Pmc1p are positively controlled by the calmodulin and calcineurin complex in the presence of an elevated [Ca²⁺]_c (Cunningham & Fink, 1996). Interestingly, a yeast *pmc1pmr1* double mutant is inviable even at low Ca²⁺ concentrations (Cunningham & Fink, 1996), a condition that can be reverted by: (1) the action of calcineurin-inactivating immunosuppressive drugs FK506/FKBP-12 and cyclosporin A/cyclophilin A, (2) by null mutations in the calcineurin A or B subunit, or (3) by point

mutations in calmodulin (Cunningham & Fink, 1994) that destroy its high-affinity Ca^{2+} -binding sites (Geiser *et al.*, 1991). The inactivation of both calmodulin and calcineurin induces the vacuolar Vcx1 protein, a low-affinity $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger that is related to Ca^{2+} homeostasis and signal transduction (Cunningham & Fink, 1996).

Pmr1p is the major route for eliminating toxic Mn^{2+} ; mutant cells lacking Pmr1p are extremely sensitive to Mn^{2+} toxicity and accumulate very high cytosolic Mn^{2+} levels (Lapinskas *et al.*, 1995; Ton *et al.*, 2002; Kellermayer, 2005). It was postulated that the excess Mn^{2+} is pumped into the Golgi by Pmr1p, and then exits the cell in secretory vesicles that merge with the plasma membrane and release the Mn^{2+} back into the extracellular environment (Culotta *et al.*, 2005). In addition to its role in Mn^{2+} detoxification, the Golgi apparatus acts in the transport of Ca^{2+} into the exocrine fluid, a physiological process used in the mammary glands for milk synthesis. The Ca^{2+} concentration in rabbit milk can approach 100 mM (Shennan & Peaker, 2000), which is approximately a million times higher than the intracellular free Ca^{2+} level and 50 times higher than total Ca^{2+} in blood. Human breast milk also contains high levels of Ca^{2+} , around 12 mM (Greger & Windhorst, 1996). The Ca^{2+} secretion needed for milk synthesis occurs synchronously with the secretion of casein and lactose, indicating that the transport occurs via Golgi-derived secretory vesicles (Neville & Peaker, 1979). Ca^{2+} is also released in millimolar concentrations, mainly by exocytosis from the stimulated pancreas to produce pancreatic juice (Teufel *et al.*, 1979; Marteau & Gerolami, 1994). In light of the similar ionic properties of Ca^{2+} and Cd^{2+} (Simkiss & Taylor, 1995; Williams & da Silva, 1996; Rainbow, 1997) and the results described herein in yeast cells with mutated Pmr1p, it is not surprising that Golgi complex proteins associated with Ca^{2+} homeostasis would be implicated in Cd^{2+} detoxification.

A model for Cd^{2+} detoxification by Pmr1p in *S. cerevisiae*

Based on our results, we propose the following models for the control of intracellular Cd^{2+} levels by Pmr1p. When a WT cell faces a Ca^{2+} - and Cd^{2+} -containing environment (Fig. 5a), the cytoplasmic transmembrane Ca^{2+} transporters (e.g. Cch1p and Mid1p) take up Ca^{2+} and Cd^{2+} . It is expected that both divalent ions should compete for the Ca^{2+} transporters. Supporting this fact, a study performed by Lansdown *et al.* (2001) using a murine model for skin wound healing showed that wounds receiving Cd^{2+} show a local increase in Zn^{2+} content and a low Ca^{2+} level as a consequence of Cd^{2+} interaction with transmembrane and carrier proteins.

Once inside the cell, both Ca^{2+} and Cd^{2+} activate the calmodulin/calcineurin complex (Suzuki *et al.*, 1985), which

promotes the expression of genes related to stress tolerance and Ca^{2+} homeostasis (including those encoding for Pmr1p and Pmc1p; Fig. 5a) by means of the transcription factor Tcn1p/Crz1p (Kellermayer *et al.*, 2003). By contrast, the level of Vcx1p is reduced by environmental Ca^{2+} , and its activity is further repressed by calcineurin activation through a posttranslational mechanism (Fig. 5a; Yoshimoto *et al.*, 2002). The transcription factor Tcn1p/Crz1p also controls the expression of the *GPX2* gene, which codifies for a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase that protects the cells against oxidative stress (Fig. 5a; Tsuzi *et al.*, 2004), demonstrating that the control of Ca^{2+} homeostasis is linked to antioxidative protection. As observed, Gpx2p exerts a protective effect against Cd^{2+} in mammalian cells (Crouse *et al.*, 2005). An other biochemical process that is induced by Cd^{2+} is DNA mismatch repair, which repairs oxidative base damages and allows the cells to tolerate Cd^{2+} (Fig. 5a; McMurray & Tainer, 2003).

In its turn, yeast mutants lacking Pmr1p exhibit high rates of Ca^{2+} influx and elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ due to stimulation of Cch1p and Mid1p (Locke *et al.*, 2000) when the cells are grown on culture media containing a normal divalent ion concentration (Fig. 5b). This process resembles the capacitative Ca^{2+} entry mechanisms in animal cells where depletion of secretory Ca^{2+} pools promotes Ca^{2+} influx through the plasma membrane channels and refilling of the depleted organelles (Putney & McKay, 1999). In yeast, excessive activity of the vacuolar Ca^{2+} transporters Pmc1p and Vcx1p can compete with Pmr1p for Ca^{2+} and activates the capacitative Ca^{2+} entry-like mechanism (Locke *et al.*, 2000). Therefore, the activity of vacuolar Ca^{2+} transporters must be balanced with Pmr1p activity to avoid depletion of secretory organelles and inefficient use of energy for Ca^{2+} sequestration in the vacuole, which is not observed in the *pmr1Δ* strain. This model is in agreement with our data, where the *pmr1Δ* strain is sensitive to low doses of Cd^{2+} (Fig. 3) and has a high $[\text{Cd}^{2+}]_c$ (Fig. 4a), indicating an increase of divalent ion uptake from the extracellular environment. Moreover, the extracellular competition between Ca^{2+} and Cd^{2+} for Ca^{2+} receptors located at the cellular membrane is also a factor that influences the tolerance of the cell against Cd^{2+} (Fig. 5b). As expected, we observed a lower $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in the presence of Cd^{2+} (Fig. 4b) when the *pmr1Δ* cells were grown in the standard concentration of Ca^{2+} normally found in SynCo medium. This model also considers that the sensitivity of cells against Cd^{2+} is induced by a mild oxidative stress generated by glutathione depletion. Cd^{2+} can promptly react with two molecules of glutathione inside the cell, generating bis(glutathionato)cadmium $[(\text{GS})_2\text{Cd}]$ that accumulates, and promotes a redox shift towards oxidation. Thus, without Pmr1p to capture the excess of intracellular Cd^{2+} by means of secretory vesicles, all biochemical systems become unstable

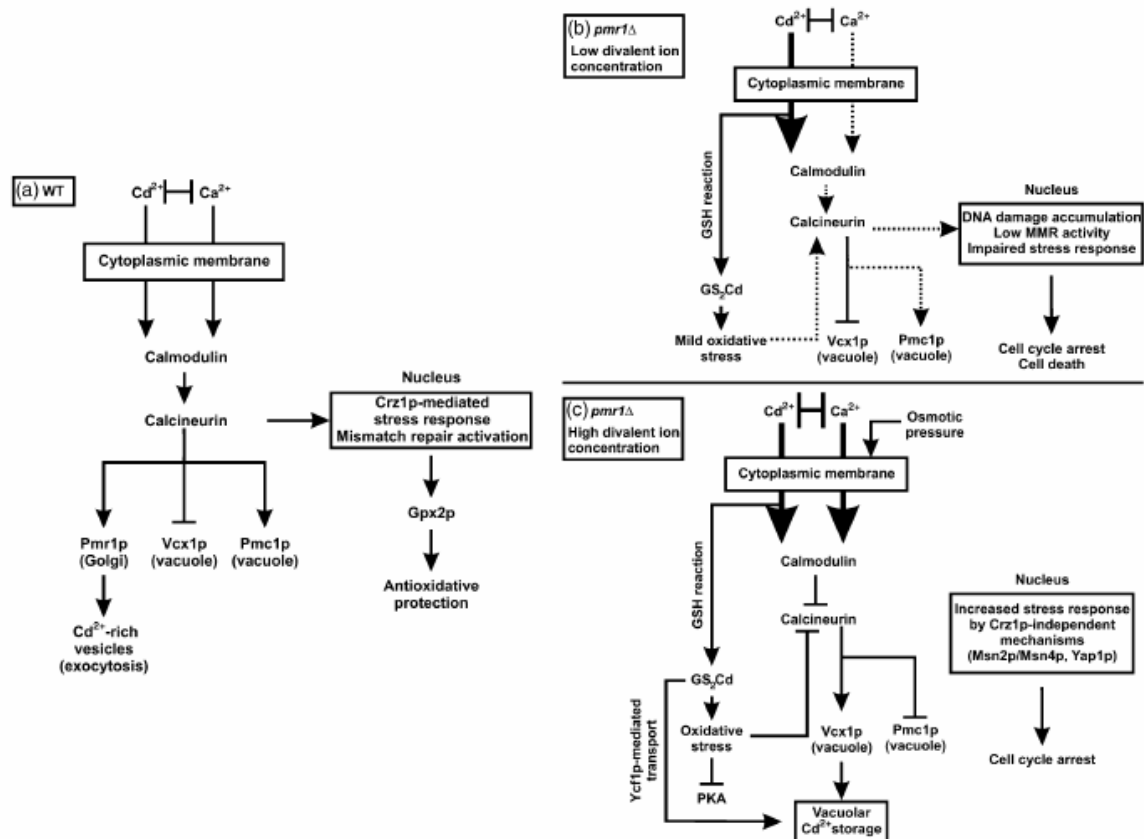


Fig. 5. Models proposed for Cd²⁺ detoxification mediated by Pmr1p in *Saccharomyces cerevisiae* in culture medium containing Ca²⁺ and Cd²⁺. In (a), the growth of a WT yeast cell in the presence of both Cd²⁺ and Ca²⁺ induces the uptake of these ions by known transmembrane proteins, especially Ca²⁺ transporters. It is also expected that both ions compete for Ca²⁺ transporters. Once inside the cell, Cd²⁺ and Ca²⁺ activate the calmodulin/calcineurin complex that: (i) controls the stress-associated transcription factor Tcn1p/Crz1p and (ii) induces the activity of Pmr1p and Pmc1p. Once the activity of Pmr1p is increased, the Cd²⁺ ions could be transported to the Golgi and excreted extracellularly by vesicles of the exocytic pathway. In (b), a *pmr1Δ* strain that grows in the presence of low divalent ion concentration increased the uptake of these ions. Despite the extracellular competition between Ca²⁺ and Cd²⁺, there is an accumulation of free Cd²⁺ in the cytoplasm (thick arrow) and a lower influx of Ca²⁺ (dotted arrow), diminishing the activity of the calmodulin and calcineurin complex and inducing a shift in the redox balance. In (c), a *pmr1Δ* strain that grows in the presence of a high divalent ion concentration has an elevated cytoplasmic concentration of Cd²⁺ (thick arrows) that blocks the function of the calmodulin/calcineurin complex. The high [Cd²⁺]_c promotes a shutdown of glutathione and thiol-compounds synthesis, altering the redox homeostasis and leading to: (i) a stress response by the activation of Msn2p/Msn4p and Yap1p transcription factors and (ii) inhibition of PKA, resulting in cell cycle arrest and increased resistance to Cd²⁺ and Ca²⁺. For additional details about the models, please refer to the main text of the manuscript.

(McMurray & Tainer, 2003). In particular, the DNA mismatch repair system (MMR; Fig. 5b) is strongly inhibited by Cd²⁺ (McMurray & Tainer, 2003), leading to the accumulation of oxidized nucleotide residues in both the mitochondrial and the nuclear genomes (Fig. 5b). Moreover, it was demonstrated that oxidative stress is able to diminish the activity of calcineurin (Ullrich *et al.*, 2003). Ultimately, increased production of reactive oxygen species due to thiol depletion and inhibition of thiol-dependent redox systems (Dormer *et al.*, 2000), associated with functional alterations in DNA repair systems and a diminished activity of calmo-

dulin/calcineurin complex (Fig. 5b), results in an impaired genic response as a consequence of the low activity of Tcn1p/Crz1p, followed by the action of DNA nucleases and caspase-related proteases, culminating in cell cycle arrest and cellular death by apoptosis (Madeo *et al.*, 1999, 2002).

We also considered an alternative model where a *pmr1Δ* strain can grow and tolerate the presence of a high extracellular concentration of Cd²⁺ and Ca²⁺ (Fig. 5c). We observed that increasing levels of Cd²⁺ do not lower the survival of the *pmr1Δ* strain as expected (Fig. 2), indicating

that other Ca^{2+} and Cd^{2+} -tolerance mechanisms are activated in this condition. It was observed that Pmc1p is strongly upregulated in a *pmr1* Δ strain, this condition being necessary for cellular proliferation in the presence of excessive extracellular Ca^{2+} (Matheos *et al.*, 1997). In addition, the excessive Ca^{2+} also activates the vacuolar Vcx1p transporter, which accounts for Ca^{2+} tolerance in the Pmr1p-defective strain (Cunningham & Fink, 1996). Considering this information, it should be possible that a high extracellular concentration of Cd^{2+} and Ca^{2+} decreases the sensitivity of a *pmr1* Δ strain towards the opposite ion as a result of competition between both divalent ions at the cytoplasmic membrane (Fig. 5c). This phenomenon was already described for a yeast *pmr1*-deficient strain grown in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} (Szigeti *et al.*, 2005). On the other hand, an increase in the uptake of Cd^{2+} in the absence of Pmr1p induces a strong oxidative stress response that inactivates the calmodulin/calcineurin complex and stimulates the activity of Vcx1p (Fig. 5c). This same oxidative stress generated by Cd^{2+} and/or the osmotic stress caused by a high concentration of Ca^{2+} can induce other stress-related transcriptional activators, like the proteins Msn2/Msn4 and Yap1.

Msn2p and Msn4p activate transcription through stress-response elements and upregulate the expression of 180 genes in response to environmental stress (Martinez-Pastor *et al.*, 1996). As with Tcn1p/Crz1p, Msn2p/Msn4p are regulated primarily through their subcellular localization. Under optimal conditions, both proteins are phosphorylated by protein kinase A (PKA) and are cytosolic. Upon inactivation of PKA, Msn2p/Msn4p rapidly accumulate in the nucleus, where they activate stress-induced gene transcription (Fig. 5c; Kafadar & Cyert, 2004). Another transcription factor that is activated by Cd^{2+} -generating oxidative stress is Yap1p (Fig. 5c; Wemmie *et al.*, 1994). The genes regulated by Yap1p include those that belong to the antioxidant protection network (Wemmie *et al.*, 1994). Among the genes controlled by Yap1p is *YCF1*, which codes for the Ycf1 protein, an ATP-binding cassette (ABC) protein that can transport glutathione-conjugates to the vacuole (Li *et al.*, 1997). It was described that mutations in this protein render yeast cells hypersensitive to Cd^{2+} at high doses compared with the concentrations used for the *pmr1* Δ strain (Perego & Howell, 1997). In this sense, the activation of Msn2/Msn4p and Yap1p under conditions of elevated Ca^{2+} and Cd^{2+} concentration should increase the resistance of the *pmr1* Δ strain against both divalent ions, a condition that was observed in our work (Fig. 2).

Considering the models obtained in this work about the functions of Pmr1p on Cd^{2+} tolerance, we are now performing additional biochemical experiments in order to refine the data collected in this work.

Acknowledgements

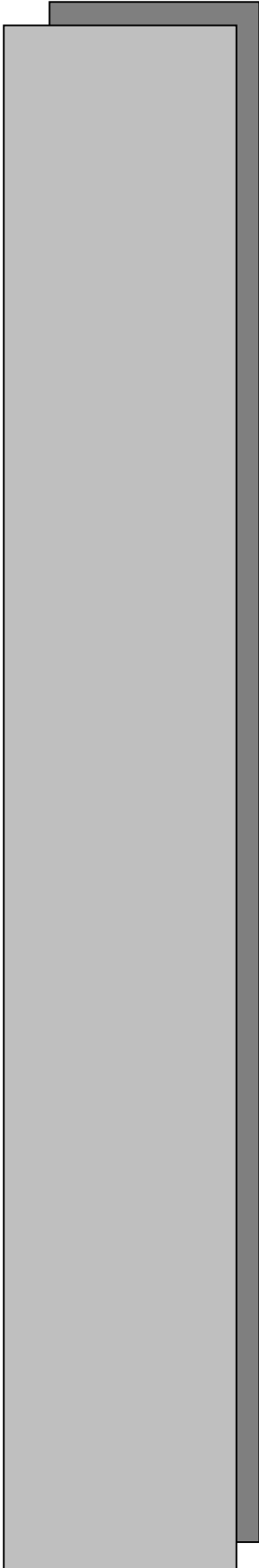
We thank Dr G.R. Fink (Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge) for kindly providing yeast strains. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and GENOTOX/ROYAL (Laboratório de Genotoxicidade/Instituto Royal – UFRGS).

References

- Andal D, Rulli SJ & Rao R (2003) Packing interactions between transmembrane helices alter ion selectivity of the yeast golgi $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase PMR1. *J Biol Chem* **278**: 35292–35298.
- Anraku Y, Ohya Y & Iida H (1991) Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1093**: 169–177.
- Antebi A & Fink GR (1992) The yeast Ca^{2+} -ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell* **3**: 633–654.
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore RE, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Co., New York.
- Batiza AF, Schulz T & Masson PH (1996) Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *J Biol Chem* **271**: 23357–23362.
- Beyersmann D & Hechtenberg S (1997) Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **144**: 247–261.
- Bonilla M, Nastase KK & Cunningham KW (2002) Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J* **21**: 2343–2353.
- Campbell JL, Hopman TL & Maxwell JA (2000) The Guelph PIXE software package III: alternative proton database. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* **170**: 193–204.
- Cronin SR, Khoury A, Ferry DK & Hampton RY (2000) Regulation of HMG-CoA reductase degradation requires the P-type ATPase Cod1p/Spf1p. *J Cell Biol* **148**: 915–924.
- Cronin SR, Rao R & Hampton RY (2002) Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca^{2+} homeostasis. *J Cell Biol* **157**: 1017–1028.
- Croute F, Beau B, Murat JC, Vincent C, Komatsu H, Obata F & Soleilhavoup JP (2005) Expression of stress-related genes in a cadmium-resistant A549 human cell line. *J Toxicol Environ Health A* **68**: 703–718.
- Csutora P, Su Z & Kim HY (1999) Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 121–126.
- Culotta VC, Yang M & Hall MD (2005) Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **4**: 1159–1165.
- Cunningham KW & Fink GR (1994) Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking

- PMCI, a homolog of plasma membrane Ca²⁺-ATPases. *J Cell Biol* **124**: 351–363.
- Cunningham KW & Fink GR (1996) Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 2226–2237.
- Dormer UH, Westwater J, McLaren NE, Kent NA, Mellor J & Jamieson DJ (2000) Cadmium-inducible expression of the yeast *GSH1* gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network. *J Biol Chem* **275**: 32611–32616.
- Dunn T, Gable K & Beeler T (1994) Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles. *J Biol Chem* **269**: 7273–7278.
- Eilam Y, Lavi H & Grossowicz N (1985) Mechanism of stimulation of Ca²⁺ uptake by miconazole and ethidium bromide in yeasts: role of vacuoles in Ca²⁺ detoxification. *Microbios* **44**: 51–66.
- Geiser JR, van Tuinen D, Brockerhoff SE, Neff MM & Davis TN (1991) Can calmodulin function without binding calcium? *Cell* **65**: 949–959.
- Gietz RD & Sugino A (1988) New yeast–*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527–534.
- Goyer RA (1997) Toxic and essential metal interactions. *Annu Rev Nutr* **17**: 37–50.
- Greger R & Windhorst U (1996) *Comprehensive Human Physiology: From Cellular Mechanisms to Integration*, pp. 2427–2449. Springer-Verlag, Berlin.
- Halachmi D & Eilam Y (1996) Elevated cytosolic free Ca²⁺ concentrations and massive Ca²⁺ accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking *PMR1*, a homolog of Ca²⁺-ATPase. *FEBS Lett* **392**: 194–200.
- Hu Z, Bonifas JM, Beech J, Bench G, Shigihara T, Ogawa H, Ikeda S, Mauro T & Epstein EH Jr (2000) Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey–Hailey disease. *Nat Genet* **24**: 61–65.
- Kafadar KA & Cyert MS (2004) Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot Cell* **3**: 1147–1153.
- Kathryn JM, Takashi T & Guy AR (2004) Role for plasma membrane-related Ca²⁺-ATPase-1 (ATP2C1) in pancreatic β-cell Ca²⁺ homeostasis revealed by RNA silencing. *Diabetes* **253**: 393–400.
- Kazantzis G (2004) Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *BioMetals* **17**: 493–498.
- Kellermayer R (2005) Hailey–Hailey disease as an orthodisease of *PMR1* deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **579**: 2021–2025.
- Kellermayer R, Aiello DP, Miseta A & Bedwell DM (2003) Extracellular Ca²⁺ sensing contributes to excess Ca²⁺ accumulation and vacuolar fragmentation in a *pmr1Δ* mutant of *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* **116**: 1637–1646.
- Kern AL, Bonatto D, Dias JF, Yoneama ML, Brendel M & Henriques JAP (2005) The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: insights from phylogenetic studies and particle-induced X-ray emission. *BioMetals* **18**: 31–41.
- Kozai N, Ohnuki T & Komarneni S (2003) Uptake of cadmium by synthetic mica and apatite: observation by micro-PIXE. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* **210**: 513–518.
- Lansdown ABG, Sampson B & Rowe A (2001) Experimental observation in the rat on the influence of cadmium on skin wound repair. *Int J Exp Path* **82**: 35–41.
- Lapinskas PJ, Cunningham KW, Liu XF, Fink GR & Culotta VC (1995) Mutations in *PMR1* suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol Cell Biol* **15**: 1382–1388.
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ & Rea PA (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalized transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 42–47.
- Locke EG, Bonilla M, Liang L, Takita Y & Cunningham KW (2000) A homolog of voltage-gated Ca²⁺ channels stimulated by depletion of secretory Ca²⁺ in yeast. *Mol Cell Biol* **20**: 6686–6694.
- Madeo F, Fröhlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH & Fröhlich KU (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **145**: 757–767.
- Madeo F, Herker E, Maldener C *et al.* (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* **9**: 911–917.
- Marchi V, Sorin A, Wei Y & Rao R (1999) Induction of vacuolar Ca²⁺-ATPase and H⁺/Ca²⁺ exchange activity in yeast mutants lacking Pmr1, the Golgi Ca²⁺-ATPase. *FEBS Lett* **454**: 181–186.
- Marteau C & Gerolami A (1994) Influence of hypercalcemia on ionized calcium concentration in pancreatic juice of the dog. *J Lab Clin Med* **123**: 565–573.
- Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H & Estruch F (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* **15**: 2227–2235.
- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US & Cunningham KW (1997) Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**: 3445–3458.
- McMurray CT & Tainer JA (2003) Cancer, cadmium and genome integrity. *Nat Genet* **34**: 34239–34241.
- Miseta A, Kellermayer R, Aiello DP, Fu L & Bedwell DM (1999) The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hu m1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* **451**: 132–136.
- Neville MC & Peaker P (1979) The secretion of calcium and phosphorus into milk. *J Physiol* **290**: 59–67.
- Perego P & Howell SB (1997) Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ion in yeast. *Toxicol Appl Pharmacol* **147**: 312–318.
- Peters JM, Duncan T, Falk H, Oberdorster G & Smith TJ (1986) Contribution of metals to respiratory cancer. *Environ Health Perspect* **70**: 71–83.

- Pozos TC, Sekler I & Cyert MS (1996) The product of *HUM1*, a novel yeast gene, is required for vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange and is related to mammalian $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. *Mol Cell Biol* **16**: 3730–3741.
- Przybyłowicz WJ, Przybyłowicz JM, Migula P, Glowacka E, Nakonieczny M & Augustyniak M (2003) Functional analysis of metals distribution in organs of the beetle *Chrysolina pardalina* exposed to excess of nickel by micro-PIXE. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* **210**: 343–348.
- Putney JW Jr & McKay RR (1999) Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* **21**: 38–46.
- Rainbow PS (1997) Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Est Coast Shelf Sci* **44**: 169–175.
- Rainbow PS & Black WH (2005) Cadmium, zinc and the uptake of calcium by two crabs, *Carcinus maenas* and *Eriocheir sinensis*. *Aquat Toxicol* **25**: 45–65.
- Rose MD, Winston F & Hieter P (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Rudolph HK, Antebi A, Fink GR, Buckley CM, Dorman TE, LeVitre J, Davidow LS, Mao JI & Moir DT (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMRI*, a member of a Ca^{2+} -ATPase family. *Cell* **58**: 133–145.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shennan DB & Peaker M (2000) Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol Rev* **80**: 925–951.
- Simkiss K & Taylor MG (1995) Transport of metals across membranes. *Metal Speciation and Aquatic Systems* (Tessier A & Turner DR, eds), pp. 1–44. John Wiley & Sons, New York.
- Sorin A, Rosas G & Rao R (1997) *PMRI*, a Ca^{2+} -ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J Biol Chem* **272**: 9895–9901.
- Sudbrak R, Brown J & Dobson-Stone C (2000) Hailey–Hailey disease is caused by mutations in *ATP2C1* encoding a novel Ca^{2+} pump. *Hum Mol Genet* **9**: 1131–1140.
- Suzuki C & Shimma YI (1999) P-type ATPase *spfl* mutants show a novel resistance mechanism for the killer toxin SMKT. *Mol Microbiol* **32**: 813–823.
- Suzuki Y, Chao SH, Zysk JR & Cheung WY (1985) Stimulation of calmodulin by cadmium ion. *Arch Toxicol* **57**: 205–211.
- Szigeti R, Miseta A & Kellermayer R (2005) Calcium and magnesium competitively influence the growth of a *PMRI* deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Microbiol Lett* **251**: 333–339.
- Tanida I, Hasegawa A, Iida H, Ohya Y & Anraku Y (1995) Cooperation of calcineurin and vacuolar H^{+} -ATPase in intracellular Ca^{2+} homeostasis of yeast cells. *J Biol Chem* **270**: 10113–10119.
- Teufel H, Stock B, Rohrmoser H & Forell MM (1979) Calcium secretion in the isolated perfused canine pancreas. *Res Exp Med* **176**: 51–68.
- Ton VK, Mandal D, Vahadji C & Rao R (2002) Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca^{2+} , Mn^{2+} -ATPase defective in Hailey–Hailey disease. *J Biol Chem* **277**: 6422–6427.
- Tsuzi D, Maeta K, Takatsume Y, Izawa S & Inoue Y (2004) Distinct regulatory mechanism of yeast *GPX2* encoding phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase by oxidative stress and a calcineurin/*Crz1*-mediated Ca^{2+} signaling pathway. *FEBS Lett* **569**: 301–306.
- Ullrich V, Namgaladze D & Frein D (2003) Superoxide as inhibitor of calcineurin and mediator of redox regulation. *Toxicol Lett* **139**: 107–110.
- Viau CM, Yoneama M-L, Dias JF, Pungartnik C, Brendel M & Henriques JAP (2006) Detection and quantitative determination by PIXE of the mutagen Sn^{2+} in yeast cells. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* **249**: 706–709.
- Waalkes MP, Coogan TP & Barter RA (1992) Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit Rev Toxicol* **22**: 175–201.
- Wei Y, Marchi V, Wang R & Rao R (1999) An N-terminal EF hand-like motif modulates ion transport by *Pmr1*, the yeast Golgi $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase. *Biochemistry* **38**: 14534–14541.
- Wemmie JA, Szczyпка MS, Thiele DJ & Moye-Rowley WS (1994) Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J Biol Chem* **269**: 32592–32597.
- Williams RJP & da Silva JRF (1996) *The Natural Selection of the Chemical Elements*, Clarendon Press, Oxford.
- Wuytack F, Raeymaekers L & Missiaen L (2003) *PMRI*/*SPCA* Ca^{2+} pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca^{2+} store. *Eur J Physiol* **446**: 148–153.
- Yoshimoto H, Salzman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO & Cyert MS (2002) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/*Crz1p* signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **10**: 31079–31088.



CURRICULUM VITAE

MIELNICZKI-PEREIRA, A.A.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Albanin Aparecida Mielniczki Pereira

Nascimento: 04/04/1978 – Curitiba, Paraná, Brasil.

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamento de Biofísica

Av. Bento Gonçalves, 9500 – Prédio 43422 – Lab. 210.

Fone: (51) 3308-7602

Endereço eletrônico: albanin@gmail.com, albanin@hotmail.com

2. FORMAÇÃO

Mestrado: Biologia Funcional e Molecular (Concentração em Bioquímica)

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Campinas – SP, 2001-2003.

Graduação: Licenciatura em Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Porta Grossa – PR, 1997-2000.

3. ESTÁGIOS

1. Estágio didático voluntário

Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Unicamp.

Orientação: Profa. Dra. Eneida de Paula

Período: março a agosto de 2002.

Atividades: Membro do corpo docente das disciplinas Bioquímica Básica e Tópicos especiais em Biologia (Práticas em Bioquímica), ofertadas para o curso de Enfermagem.

2. Estágio de iniciação científica

Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia Geral da UEPG

Orientação: Prof. Dr. Marcos Pillegi

Período: agosto de 1999 a julho de 2000.

Projeto desenvolvido: Produção de vacinas contra malária e hepatite-B em alfaces transgênicas.

3. Estágio voluntário

Laboratório de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof. Dr. Marcos Pillegi

Período: 03 a 31 de janeiro de 2000.

Atividades: desenvolvimento de técnicas básicas de biologia molecular (PCR, preparação de tampões e soluções em geral, eletroforese em gel de agarose, quantificação de ácidos nucleicos).

4. Estágio didático curricular

Colégio Estadual Professor General Osório – Ponta Grossa – PR.

Supervisor: Prof. Dr. Ademir José Rosso.

Período: abril a setembro de 2000.

Atividades: Estágio didático supervisionado para ensino fundamental e médio.

5. Estágio voluntário

Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da UEPG

Orientação: Profa. Dra. Mariza Boscacci Marques

Período: fevereiro a novembro de 1999.

Atividades: preparação e acompanhamento de aulas práticas, reformulação de estudos dirigidos, monitoria de estudos dirigidos em sala de aula, discussões metodológicas e de avaliação.

6. Estágio de iniciação científica

Laboratório de Citologia do Departamento de Biologia Geral da UEPG

Orientação: Profa. Dra. Maria Albertina de Miranda Soares

Período: agosto de 1998 a julho de 1999.

Projeto desenvolvido: Estudo do ritmo circadiano do índice metafásico, no epitélio intestinal de ratos em fase de desenvolvimento pós-natal.

7. Estágio voluntário

Laboratório de Citologia do Departamento de Biologia Geral da UEPG

Orientação: Profa. Dra. Maria Albertina de Miranda Soares

Período: março a dezembro de 1998.

Atividades: organização e limpeza de vidraria do laboratório, preparo de soluções e materiais para aulas práticas, monitoria nas aulas práticas da disciplina de Citologia para o curso de Ciências Biológicas.

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL E DIDÁTICA

1. Universidade Estadual do Alto Uruguai e das Missões

Erechim – RS.

Período: março de 2009 a atual.

Disciplinas ministradas: - Biologia celular.

- Genética humana e aplicada.

- Citologia, histologia e embriologia geral.

2. Escola Estadual da Barragem do Rio Passo Fundo

Entre Rios do Sul – RS.

Período: abril a dezembro de 2004.

Disciplinas ministradas: - Biologia para o ensino médio (1º, 2º e 3º)

- Ciências para o ensino fundamental (8ª série).

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

RIGER, C. J.; VILELA, L. F.; DOS SANTOS, C. F.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Mutation induction by metals detected in the p53 functional assay. Artigo submetido: *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*.

LAUER JÚNIOR, C. M.; BONATTO, D.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SCHUCH, A. Z.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M.; HENRIQUES, J. A. P. The Pmr1 protein, the major yeast Ca-ATPase in the Golgi, regulates intracellular levels of the cadmium ion. *FEMS Microbiology Letters*, 285: 95-100, 2008.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SCHUCH, A. Z.; BONATTO, D.; CAVALCANTE, C.; VAITSMAN, D.; RIGER, C.; ELEUTHERIO, E.; HENRIQUES, J. A. P. The role of the yeast ATP-binding cassette Ycf1p in glutathione and cadmium ion homeostasis during respiratory metabolism. *Toxicology Letters*, 180: 21 - 27, 2008.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; CHIAVEGATTO, C. W.; LOPEZ, J. A.; COLLI, W.; MANSO, M. J. A.; GADELHA, F. R. *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. *Acta Tropica*, 101: 54 - 60, 2007.

GOMES, J. R.; PEREIRA, A. A. M.; BARTH, L.; SILVA, J. S.; LEITE, M. L.; WILLE, A. C. M., SOARES, M. A. M. Circadian variation of the cell proliferation in the jejunal epithelium of rats at weaning phase. *Cell Proliferation*, 38:147 - 152, 2005.

FINZI, J. K.; CHIAVEGATTO, C. W.; CORAT, K. F.; LOPEZ, J. A.; CABRERA, O. G.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; COLLI, W.; MANSO, M. J. A.; GADELHA, F. R. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 133: 37 - 43, 2004.

PILEGGI, M.; PEREIRA, A. A. M.; SILVA, J. S.; PILLEGI, S. A. V.; PEDROSA, F. O.; VERMA, D. P. S. An improved method for transformation of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing resistance. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 44: 191 - 196, 2001.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; LAUER JUNIOR, C. M.; HAHN, A. B.; BONATTO, D., HENRIQUES, J. A. P. (Seminário) Defining new cellular mechanisms for cadmium detoxification and/or tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In “*Toxicity and Oxidative Stress symposium*” - XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology. Águas de Lindóia, 2008.

HAHN, A. B.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; BONATTO, D., HENRIQUES, J. A. P. Análise da interação bioquímica entre as proteínas Ycf1 e Pmr1 durante a desintoxicação de cádmio em *Saccharomyces cerevisiae*. In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, Caxambu. Programa e Resumos, FESBE, CD-room. 2008.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; HAHN, A. B.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P. Contribuição linhagem-específica dos genes *YCF1* e *PMR1* para a desintoxicação de cádmio em *Saccharomyces cerevisiae*. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador. Livro de Programa e Resumos da SBG, 2008.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; HAHN, A. B.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P. Perfil de expressão dos genes *YCF1*, *VCX1*, *COD1*, *CMD1* e *PMCI* em resposta à Cd²⁺ em células de *Saccharomyces cerevisiae*. In: X Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) - Centro de Biotecnologia, Porto Alegre. 2008.

RIGER, C. J.; VILELA, L. F.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; HENRIQUES, J. A. P.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Toxicity and carcinogenesis of heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia. Program and Abstracts of XXXVII Annual Meeting Of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and XI Congress Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 2008.

HAHN, A. B.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P. Estudo preliminar da interação bioquímica entre as proteínas Ycf1 e Pmr1 na desintoxicação de cádmio em *S. cerevisiae*. In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) - Centro de Biotecnologia, Porto Alegre. 2007.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SCHUCH, A. Z.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P. Influence of Ycf1p upon GSH homeostasis and cadmium detoxification during respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. In: V Meeting of Society of Free Radical Biology and Medicine - V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, Montevideo. Free Radicals in Montevideo - Book of Abstracts, 2007.

SCHUCH, A. Z.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P. Influência da disponibilidade de glutatona sobre a expressão da proteína Ycf1p em resposta a cádmio em *Saccharomyces cerevisiae*. In: XIX Salão de Iniciação Científica - UFRGS, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2007.

LAUER JUNIOR, C. M.; BONATTO, D.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SCHUCH, A. Z.; HENRIQUES, J. A. P. Envolvimento da proteína Pmr1 na tolerância ao cádmio em *Saccharomyces cerevisiae*. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) - Centro de Biotecnologia, Porto Alegre. 2006.

SCHUCH, A. Z.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P. Regulação da expressão do gene *YCF1* pelo fator de transcrição Yap1p em *Saccharomyces cerevisiae*. In: XVII Salão de Iniciação Científica - UFRGS, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2006.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SCHUCH, A. Z.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P. Role of Ycf1 protein on cadmium sensibility during respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) - Centro de Biotecnologia, Porto Alegre. 2006.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SCHUCH, A. Z.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P. Role of Ycf1 protein on cadmium sensibility during respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia. Livro de Programa e Resumos da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SCHUCH, A. Z.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P. Regulação da captação de metais e resistência ao estresse oxidativo durante a transição do metabolismo fermentativo para respiratório em levedura. In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) - Centro de Biotecnologia, Porto Alegre. 2005.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; GADELHA, F. R. Differential behaviour of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in two strains of *Trypanosoma cruzi* with different resistance to oxidative stress. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu. Livro de Programa e Resumos da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, p.239, 2003.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; CASTILHO, T. M.; FLOETER-WINTER, L. M.; LOPEZ, J. A.; COLLI, W.; MANSO, M. J. A.; GADELHA, F. R. *Trypanosoma cruzi* exposure to hydrogen peroxide: effects on glucose-6-phosphate dehydrogenase and trypanredoxin peroxidase. In: XXX Annual meeting on Basic Research in Chagas Disease and XIX Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology, Caxambu. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 45, p. 70, 2003.

FINZI, J. K., LOPEZ, J. A., CABRERA, O. G., MIELNICZKI-PEREIRA, A. A., COLLI, W., MANSO, M. J. A., GADELHA, F. R. Behavior of *Trypanosoma cruzi* trypanredoxin peroxidase overexpressing cells exposed to hydrogen peroxide. In: XXIX Annual meeting on Basic Research

in Chagas Disease and XVIII Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology, 2002, Caxambu. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 44, p. 49, 2002.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; GADELHA, F. R. Variations in glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities throughout the growth of *Trypanosoma cruzi*. In: XXIX Annual meeting on Basic Research in Chagas Disease and XVIII Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology, Caxambu. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 44, p. 49, 2002.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SILVA, J. S.; PILEGGI, M. Montagem do vetor contendo o antígeno para hepatite-B e obtenção de *Agrobacterium tumefaciens* contendo esta construção In: IX Encontro Regional de Iniciação Científica, Londrina, 2000.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SILVA, J. S.; PILEGGI, M.; JASNIEVSKI, F. L.; POVALUK, M. O gene P5CS confere resistência ao estresse por congelamento e alta concentração salina em linhagens de alface transgênica *Lactuca sativa*. In: 46^a Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 218, 2000.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SILVA, J. S.; PILEGGI, M. Resistência de linhagens de alface transgênicas (*Lactuca sativa* L., c.v. "grand rapids") contendo o gene P5CS, ao estresse osmótico. In: V Encontro Paranaense de Genética, Maringá. Anais do V Encontro Paranaense de Genética, v. 2, p. 23, 2000.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SILVA, J. S.; BARTH, L.; GOMES, J. R.; SOARES, M. A. M. Estudo do ritmo circadiano do índice metafásico no epitélio intestinal de ratos em fase de desenvolvimento pós-natal. In: VIII Encontro Anual de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq, Cascavel. Anais do VIII Encontro Anual de Iniciação Científica, v. 2., p.131 – 131, 1999.