



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular



**A INFLUÊNCIA DOS ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO NA TOXICIDADE
DO CÁDMIO E O ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA Pmr1 NO USO DA VIA
SECRETORA PARA DESINTOXICAÇÃO DE CÁDMIO EM *Saccharomyces
cerevisiae***

Cláudio Marcos Lauer Júnior

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**A INFLUÊNCIA DOS ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO NA TOXICIDADE
DO CÁDMIO E O ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA Pmr1 NO USO DA VIA
SECRETORA PARA DESINTOXICAÇÃO DE CÁDMIO EM *Saccharomyces
cerevisiae***

Cláudio Marcos Lauer Júnior

Orientador: Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Porto Alegre

2007

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do laboratório de Reparação de DNA em Eucariontes do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O presente trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES – PROCAD, Instituto de Educação para Pesquisa Desenvolvimento e Inovação Tecnológica – Royal, Unidade GENOTOX – ROYAL/Centro de Biotecnologia - UFRGS.

Aos meus pais, Cláudio e Maria, pela educação, dedicação, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. João Antonio Pêgas Henriques, a priori pela oportunidade oferecida. Pela orientação durante todo o meu mestrado, além da amizade desencadeada.

Ao professor Dr. Diego Bonatto, pela oportunidade. Pela orientação durante todo meu mestrado, além da amizade desencadeada nesse período de convivência. A confiança, bem como os conhecimentos compartilhados, que foram de suma importância para o meu crescimento pessoal e profissional. Além disso, foi ele que me transmitiu os primeiros votos de confiança em nível científico. Obrigado pela amizade e pelo grande conhecimento repassado.

A Dr^a. Jaqueline Cardone, que foi a pessoa responsável pela minha inserção nesse grupo de pesquisa, pela amizade e confiança compartilhada.

Aos professores membros da minha Comissão de Acompanhamento, Dr. Luiz Basso e Dr^a. Janete Fett, pela atenção e colaboração.

A Professora Dr^a. Kátia Valença Correia L. da Silva que me oportunizou a experiência didática nas disciplinas de Biofísica.

A todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Agradecimentos especiais ao Luciano Saucedo e a Silvia Centeno, pelo grande apoio e atenção prestados durante o período do desenvolvimento desse projeto.

A Márcia Vaz pela disponibilidade prestada, além do grande companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Biofísica.

A todos os colegas e amigos de laboratório: Dinara, Giovanni, Thales, Renato, Fernanda, Mateus, Cassiana, Jaqueline, Luis Fernando, Renata, Fabrício, Albanin, Knulp, Ana

Zilles, Ana Catarina, Betina, Nicolas, Rafael, Duda e Iuri. Estes agradecimentos são especiais, pois tais pessoas forneceram um ambiente agradável e amigável para o desenvolvimento desse trabalho, o que facilitou a superação de obstáculos ao desenvolvimento de um projeto de mestrado.

Às colegas do GENOTOX-ROYAL: Isabel, Miriana e Mirian.

A todos os colegas do Laboratório de Anatomia da FEEVALE: Marcelo (Didi), Jonas, Angelo, Douglas, Larisa, e Sr. Lauro. A amizade desenvolvida com essas pessoas, em tão pouco tempo, foi impressionante. São pessoas que ajudaram não somente na minha formação, mas também me trouxeram um grande aprendizado pessoal.

Ao Jonas, pela disponibilidade e ajuda em muitas etapas desse trabalho.

Ao Professor Günther, por relevar os meus freqüentes atrasos, mas que foram por uma boa causa.

Aos meus amigos da CRYPPTA: Valdir Salsa, Guga, Roger e Felipe. Vocês foram peças fundamentais para eu alcançar esse objetivo. O meu muito obrigado por tornarem os domingos divertidos.

Um parágrafo especial aos meus amigos “Janaína”, Flávio, Ana e Eugenia. O agradecimento a essas pessoas torna-se difícil, pois faltariam páginas para descrever tamanha gratidão a eles. O meu muito obrigado, por tudo o que vocês fizeram por mim. Vocês e eu sabemos, que sem ajuda de vocês, eu não teria começado, e muito menos terminado o mestrado. Muito obrigado esse título também é de vocês!

A Luciana pelo companheirismo, amizade, simplicidade e inteligência. Meu muito obrigado pelo apoio dado em um dos momentos mais cruciais para a realização desse projeto.

Aos meus pais, Cláudio e Maria. Inicialmente pessoas que me ensinaram a buscar meus sonhos e objetivos.

Aos meus irmãos, Gustavo, Roger e Thiago.

A minha família, pelo apoio dado em todos os momentos, essa força, foi crucial para a realização desse meu projeto.

Obrigado.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
I – INTRODUÇÃO.....	19
1. DISPONIBILIDADE DE METAIS E A CÉLULA	19
1.1. A ocorrência de metais pesados e mecanismos de toxicidade	20
1.2. Cálcio	20
1.3. Magnésio	21
1.4. Manganês	22
1.5. Cádmio	22
2. ORGANISMO MODELO - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.1. Metabolismo.....	24
3. PROCESSOS DE DESTOXIFICAÇÃO DE Cd²⁺ NA LEVEDURA <i>S. cerevisiae</i>...25	25
3.1. Queladores: Glutathione (GSH) e Metalotioneínas (MTs).....	25
3.2. Transportadores de Cd ²⁺ localizados no vacúolo (Ycf1p, Bpt1p).....	26
3.3 Transportadores de Cd ²⁺ localizados na membrana plasmática (Cad2p, Zrt1p, Alr1p, Yor1p).....	27
4. PRINCIPAIS TRANSPORTADORES INTRACELULARES DE CÁLCIO PRESENTES EM <i>S. cerevisiae</i>	30
4.1. Transportadores presentes na membrana vacuolar: Pmc1p e Vcx1p.	30
4.2. Transportador presente na membrana do Golgi: Pmr1p.....	32
II – OBJETIVOS.....	34
1. OBJETIVO GERAL	34

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
- CAPÍTULO I -	35
Protective activity of magnesium and calcium against toxic effects caused by cadmium on <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	36
Abstract	37
1. Introduction	38
2. Materials and methods	39
2.1 Chemicals.....	39
2.2. Strain and growth conditions.....	39
2.3. Drop test.....	40
2.4. Microscopic analyses and Methylene-blue staining.....	40
2.5. Target preparation for PIXE.....	41
2.6. Particle-Induced X-ray Emission (PIXE)	41
3. Results and discussion	41
3.1. Phenotypic analysis of <i>S. cerevisiae</i> BY4741, <i>gsh1Δ</i> , <i>ycf1Δ</i> and <i>zrt1Δ</i> mutants....	41
3.2. PIXE assay of intracellular Cd ²⁺ concentration.....	47
3.3. Cadmium uptake.....	48
3.4. Calcium and cadmium interaction.....	49
3.5. Magnesium and cadmium interaction.....	49
4. Conclusions	50
References.....	51
Acknowledgements.....	55
- CAPÍTULO II -.....	56
The Pmr1 protein, the major yeast Ca²⁺-ATPase of Golgi, regulates the intracellular levels of cadmium ion	57

Abstract	58
1. Introduction	59
2. Materials and methods	60
2.1. Strains, plasmids, growth conditions and molecular biology procedures.....	60
2.2. Yeast <i>PMR1</i> gene cloning and analysis	61
2.3. Yeast Cd ²⁺ sensitivity assay by drop test.....	62
2.4. Yeast survival curves	62
2.5. Particle-Induced X-ray Emission (PIXE)	62
3. Results and discussion	63
3.1. Phenotypic analysis of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains proficient and deficient in vacuolar and Golgi Cd ²⁺ -ATPases for Cd ²⁺ sensitivity.....	63
3.2. PIXE assay of intracellular Cd ²⁺ concentration.....	67
3.3. A model for Cd ²⁺ detoxification by Pmr1p in <i>S. cerevisiae</i>	68
Acknowledgments.....	72
References.....	73
V - DISCUSSÃO GERAL	78
1. A atividade protetora do magnésio e do cálcio contra os efeitos tóxicos causados pelo cádmio na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	78
2. A proteína Pmr1, que é a principal Ca²⁺-ATPases do Golgi em leveduras, regula o nível intracelular do íon cádmio	81
VI – CONCLUSÕES.....	85
6.1 Conclusão geral.....	85
6.2 Conclusões específicas	85
VII - PERSPECTIVAS	86
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Localização e expressão da proteína Alr1 em *S. cerevisiae*29
- Figura 2.** Modelo básico para sinalização e transporte de Ca^{2+} em *Saccharomyces cerevisiae*.
.....30
- Figura 3.**Tráfego de manganês sob altas concentrações ou condições tóxicas.33

CAPÍTULO I

- Figure 1.** Sensitivity of *S. cerevisiae* to CdCl_2 (chronic exposure, Cd^{2+} in solid medium).... 42
- Figure 2.** Sensitivity of BY4741 to 0.6 mM 43
- Figure 3.** Protection of BY4741 yeast strains by MgCl_2 and CaCl_2 against toxic effects of CdCl_2 44
- Figure 4.** Protection of *ycf1Δ* strain by MgCl_2 and CaCl_2 against toxic effects of CdCl_2 45
- Figure 5.** Protection of *zrt1Δ* strain by MgCl_2 and CaCl_2 against toxic effects of CdCl_2 46
- Figure 6.** Protection of *gsh1Δ* strain by MgCl_2 and CaCl_2 against toxic effects of CdCl_2 47

CAPÍTULO II

- Figure 1.** Sensitivity of *S. cerevisiae* to CdCl_2 (chronic exposure, Cd in the solid medium)..64
- Figure 2.** Sensitivity of proficient and deficient *PMR1* yeast strains to different concentrations of CdCl_2 66
- Figure 3.** Cytoplasmic Cd^{2+} content ($[\text{Cd}^{2+}]_c$) of yeast cells 67
- Figure 4.** Model proposed for Cd^{2+} detoxification mediated by Pmr1p in cells of *S. cerevisiae*.
..... 70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. *S. cerevisiae* strains used in this study **40**

Table 2. Stoichiometric analysis of cadmium by PIXE in *S. cerevisiae* cells. **48**

CAPÍTULO II

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* strains employed in this study. **61**

ABREVIATURAS

A°	Unidade de medida angstrom
Ade	Adenina
ATPases	Enzimas que catalisam a decomposição de Adenosina Trifosfato
°C	graus Celsius
[Ca ²⁺] _c	<i>Cytosolic free Ca²⁺ concentration</i>
(Ca ²⁺) _i	Cálcio ionizado intracelular
(Ca ²⁺) _o	Cálcio ionizado extracelular
CCE	<i>Capacitative Ca²⁺ entry</i>
cm	Unidade de medida, centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
G	Unidade de medida grama
H	Unidade de tempo
H ⁺	Íon monovalente de hidrogênio
HHD	<i>Hailey–Hailey disease</i>
His	Histidina
L	Unidade de medida litro
Leu	Leucina
mg	Unidade de medida miligrama
min	Minutos
mL	Unidade de medida mililitro
mm	Unidade de medida milímetro
mM	Unidade de medida milimolar
nM	Unidade de medida nanomolar
MMR	Reparo de erros de emparelhamento
Nramp	<i>Natural resistance-associated macrophage protein</i>
PIXE	<i>Particle-Induced X-ray Emission</i>
PMCA _s	<i>Plasma membrane Ca²⁺ ATPases</i>
Ppm	Partes por milhão
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto

SERCA	<i>Sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases</i>
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
SPCA	<i>Secretory pathway Ca⁺² ATPases</i>
SynCo	<i>Synthetic complete minus media</i>
Trp	Triptofano
Ura	Uracila
WT	Wild type
μM	Unidade de medida micromolar (10 ⁻⁶ mols)

RESUMO

O cádmio é um metal pesado com propriedades tóxicas e carcinogênicas. A toxicidade deste metal pode ser resultado da sua habilidade de (i) formar complexos com a glutatona, gerando aumento do estresse oxidativo, (ii) competir com o zinco por sítios de ligação em proteínas, (iii) causar quebras de fita simples no DNA e (iv) inibir a via associada ao reparo de erros no emparelhamento de bases do DNA. A absorção de cádmio para o interior celular pode ser feita por proteínas que transportam metais essenciais como zinco, cálcio, manganês e ferro, tal como a proteína Zrt1 de leveduras (transportador de alta afinidade para zinco). Em *Saccharomyces cerevisiae*, o mecanismo de desintoxicação de cádmio mais conhecido envolve a conjugação do metal com glutatona, formando complexos Cd.[GS]₂, que são transportados para o interior do vacúolo pela proteína Ycf1. Além disso, sabe-se que alguns poucos metais essenciais são capazes de reduzir a toxicidade do cádmio.

O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito protetor de íons de magnésio e cálcio contra os danos causados pelo cádmio em linhagens de *S. cerevisiae* mutantes para proteínas envolvidas com a homeostase de cádmio (*gsh1Δ*, *ycf1Δ* e *zrt1Δ*). Além disso, foi avaliado o envolvimento de proteínas transportadoras de cálcio presentes no complexo de Golgi e vacúolo (Pmr1p e Pmc1p, respectivamente) com a desintoxicação de cádmio por vesículas da via secretória de *S. cerevisiae*.

Os resultados demonstram que, tanto na linhagem selvagem quanto nas mutantes *gsh1Δ*, *ycf1Δ* e *zrt1Δ*, a presença de íons de cálcio ou magnésio é capaz de proteger as células contra os efeitos tóxicos do cádmio. Essa proteção está associada a uma redução do conteúdo intracelular de cádmio que ocorre nos tratamentos simultâneos com magnésio e cálcio.

Em relação aos transportadores de cálcio, foi possível observar que a linhagem *pmc1Δ* não é sensível à cádmio enquanto que a linhagem *pmr1Δ* é altamente sensível a presença do metal. Para confirmar o envolvimento da proteína Pmr1 com a desintoxicação de cádmio, a linhagem *pmr1Δ* foi submetida a um ensaio de complementação fenotípica utilizando-se um vetor centromérico contendo o gene *PMR1*. Os resultados deste ensaio confirmaram que o fenótipo de sensibilidade a cádmio da linhagem *pmr1Δ* pode ser revertido pela presença de uma cópia funcional do gene *PMR1*. Adicionalmente, os resultados utilizando PIXE (*Particle Induced X-Ray Emission*) para quantificar o conteúdo intracelular de cádmio mostraram que na *pmr1Δ* o acúmulo intracelular de íons Cd²⁺ é três vezes maior do

que na linhagem selvagem e na linhagem *pmr1* Δ contendo o vetor com o gene *PMR1* funcional.

A proteína Pmr1 é responsável pelo acúmulo de cálcio em vesículas do complexo de Golgi, as quais podem ser destinadas para a via secretória de *S. cerevisiae*. Considerando os resultados obtidos neste trabalho e a similaridade entre os íons Ca^{2+} e Cd^{2+} em termos de raio atômico, é possível inferir que o cádmio, assim como o cálcio, pode ser bombeado para o interior do Golgi pela Pmr1p e posteriormente transportado pela via secretória. Sendo assim, este trabalho descreve desintoxicação de cádmio envolvendo a eliminação do metal pela via secretória de *S. cerevisiae*.

ABSTRACT

Cadmium is a heavy metal with toxic and carcinogenic properties. The toxicity of this metal depends on its ability to: (I) produce complexes with glutathione, therefore increasing oxidative stress, (II) compete with zinc for binding to proteins, (III) cause DNA chain single breaks, and (IV) inhibit the mismatch repair pathway associated. Cadmium uptake into the cell occurs through proteins that transport essential metals, such as calcium, zinc, manganese, and iron, such as the yeast Zrt1 protein transporter with high zinc affinity. In *Saccharomyces cerevisiae*, the best known cadmium detoxification mechanism involves metal coupling with glutathione, forming the complex Cd[GS]₂, which is carried inside to the vacuole through the Ycf1 protein. Moreover, it is well known that some essential metals are capable of reducing cadmium toxicity.

The aim of the present study was to verify the protective effect of magnesium and calcium ions against the damages caused by cadmium in *S. cerevisiae* strains mutant for proteins involved with cadmium homeostasis (*gsh1Δ*, *ycf1Δ* e *zrt1Δ*). In addition, the involvement of a calcium transporter present in the Golgi apparatus and in the vacuole (Pmr1p and Pmc1p, respectively) with the detoxification of cadmium by vesicles of the secretory pathway of *S. cerevisiae* was evaluated.

The results demonstrated that both in the wild type strain and in *gsh1Δ*, *ycf1Δ*, and *zrt1Δ* mutant strains, the presence of calcium or magnesium ions was able to protect cells against the toxic effect of cadmium. This protection was associated with a reduction of intracellular cadmium content that occurs in the simultaneous treatments with magnesium and calcium.

As to calcium transporters, it was possible to observe that *pmc1Δ* is not sensitive to cadmium, whereas *pmr1Δ* is highly sensitive to the presence of this metal. In order to confirm the involvement of Pmr1p with cadmium detoxification, *pmr1Δ* strains were submitted to a phenotypic complementation assay using centromeric vector containing *PMR1* gene. The results of this assay confirmed that *pmr1Δ* cadmium sensitive phenotype can be reversed by the presence of a functional copy of *PMR1* gene. Additionally, when using PIXE (Particle Induced X Ray Emission) to quantify intracellular cadmium content, results showed that *pmr1Δ* intracellular accumulation of Cd²⁺ ions is three times higher than in the wild type strain, and the *pmr1Δ* containing the vector with *PMR1* functional gene.

Pmr1 protein is responsible for the accumulation of calcium in vesicles of Golgi apparatus, which can be directed to the secretory pathway of *S. cerevisiae*. Considering the results obtained in this study, and the similarity between Ca^{2+} and Cd^{2+} ions in terms of atomic radius, it is possible to infer that both cadmium and calcium can be pumped inside the Golgi apparatus by Pmr1p, and later transported by the secretory pathway. Therefore, this work describes cadmium detoxification involving the elimination of this metal by the secretory pathway of *S. cerevisiae*.

I – INTRODUÇÃO

1. DISPONIBILIDADE DE METAIS E A CÉLULA

A vida está constantemente em desenvolvimento e adaptação no planeta. Por tal motivo, a constituição elementar dos organismos vivos reflete a abundância, disponibilidade química e a reatividade dos elementos químicos presentes na hidrosfera e litosfera durante os estágios iniciais da evolução da vida (WILLIAMS & FRAUSTO DA SILVA 1996). Em todos esses processos, o meio exerce uma função crucial, agindo de forma direta ou indireta na interação de íons metálicos nos seres vivos. Por isso, todos os organismos, no decorrer da evolução, desenvolveram mecanismos de alta e de baixa afinidade que regulam a acumulação de íons metálicos, removendo do citoplasma aqueles presentes em excesso ou os não essenciais e, assim, evitando a toxicidade dos metais pesados.

Diversos mecanismos de resistência existem para diminuir ou impedir a toxicidade dos metais. Entre eles, a resistência aos metais que são sempre tóxicos e não exercem nenhum papel benéfico às células, como o cádmio e o mercúrio, e também a resistência aos metais como o cobre, o ferro e o zinco, que são tóxicos em concentrações elevadas, mas são absolutamente necessários em pequenas quantidades (SILVER & WAUDERHAUG, 1992).

O primeiro mecanismo de resistência envolve a síntese de compostos orgânicos que são liberados para o meio extracelular onde se ligam aos metais, para assim reduzir ou aumentar sua biodisponibilidade. Este é o caso dos sideróforos, que são excretados sob condições de carência de ferro, com a função de formar complexos sideróforos-Fe (III) permitindo deste modo, a entrada dos complexos via transportadores específicos presentes na membrana celular. (KALINOWSKI & RICHARDSON, 2005). Além disso, os íons metálicos podem ser limitados à superfície externa da célula pela seletividade encontrada na membrana plasmática. Assim, formas complexas são geralmente mais difíceis de serem transportados para o interior da célula.

Outro mecanismo distinto se baseia na capacidade das células de aumentar a taxa de excreção de íons metálicos usando as bombas de efluxo. Além disso, a resistência a metais pode ser resultado do seqüestro intracelular de íons. Este é um dos mecanismos mais importantes pelo qual as bactérias combatem a exposição a metais pesados. Esse seqüestro dos íons metálicos intracelulares é executado por oligopeptídeos e/ou proteínas ricas em grupamentos tiólicos, como as metalotioninas e a glutatona (YBARRA & WEBB, 1999). Todos esses mecanismos de resistência permitem a sobrevivência de células expostas a metais

tóxicos ou ao excesso de metais essenciais através da manutenção da homeostase metálica celular.

1.1. A ocorrência de metais pesados e mecanismos de toxicidade

Os metais pesados são encontrados em pequenas quantidades na natureza como resultado de atividades vulcânicas e erosão. Sendo assim, níveis tóxicos podem ocorrer naturalmente no solo, ou mais comumente, como resultado da poluição ambiental provocada por atividades industriais e/ou domésticas. Tais atividades estão acelerando os ciclos biogeoquímicos de um grande número de elementos (STROUHAL *et al.*, 2003), e contribuem para o aumento da deposição de metais pesados no ecossistema.

Do ponto de vista químico, os metais pesados são altamente reativos, o que explica a dificuldade de encontrá-los em estado puro na natureza, onde estão incorporados a minérios. No entanto, os últimos 50 anos foram caracterizados por um desenvolvimento da atividade industrial, a qual influenciou significativamente na separação destes metais dos minérios e na sua redistribuição no ambiente. Por exemplo, o aumento de insumos químicos na agricultura, indústrias metalúrgicas e a expansão do uso de derivados de petróleo, têm como resultado o aumento das concentrações tóxicas de metais no ambiente (SEMCZUK & SEMCZUK-SIKORA, 2001).

1.2. Cálcio

O Cálcio (Ca^{2+}) no meio intracelular medeia um grande número de respostas celulares com uma afinidade e especificidade elevada (STULL, 2000), sendo fundamental para uma grande variedade de processos intracelulares e extracelulares em todos os organismos. Intracelularmente, o Ca^{2+} está envolvido principalmente na proliferação, diferenciação e motilidade celular, no controle da contração muscular e da secreção hormonal (BERRIDGE, 1993), além de atuar como mensageiro e cofator enzimático. No meio extracelular, participa de numerosas funções essenciais, tais como coagulação sanguínea, adesão celular, manutenção da integridade do esqueleto e regulação da excitabilidade extracelular (BROWN, 1991; 1999).

O valor basal do cálcio intracelular (Ca^{2+}_i), geralmente em torno de 100 nM, é aproximadamente 10.000 vezes menor do que a concentração do cálcio ionizado extracelular (Ca^{2+}_o), que é de cerca de 1 mM. O Ca^{2+}_i pode sofrer rápidas elevações quando ocorre

ativação celular, devido à liberação de Ca^{2+} do estoque intracelular e/ou proveniente do Ca^{2+} extracelular (BROWN, 1991). Neste sentido, um mecanismo ultra-sensível a pequenas mudanças de Ca^{2+} regula e mantém a homeostase desse íon (BERRIDGE, 2002). Além disso, uma grande variedade de estímulos pode desencadear a abertura de canais específicos de Ca^{2+} na membrana plasmática ou no retículo endoplasmático, causando um massivo influxo e posteriormente a acumulação de íons de cálcio no citoplasma. Após a estimulação, os níveis basais de Ca^{2+} são restaurados por ATPases dependentes de Ca^{+2} e bombas antipórticas que transportam o Ca^{2+} do citoplasma através da membrana citoplasmática e de algumas membranas internas. Para regular as respostas aos sinais provocados por Ca^{+2} , as células desenvolveram um amplo número de transportadores (TON & RAO, 2004).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o vacúolo é o maior local de estocagem de Ca^{+2} , pois nele se encontra 95% do Ca^{2+} total presente na célula (DUNN *et al.*, 1994). Este grande estoque de Ca^{2+} é mantido por meio da ação de dois transportadores específicos: a ATPase dependente de Ca^{2+} Pmc1p e o antiportador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Vcx1p (CUNNINGHAM & FINK, 1994; POZOS *et al.*, 1996; AIELLO *et al.*, 2004).

1.3. Magnésio

O magnésio é o cátion divalente mais abundante em células vivas quando comparado com outros macro e micronutrientes (LIU *et al.*, 2002). Além disso, o magnésio tem um reconhecido papel na manutenção da estabilidade da membrana, bem como um cofator com ATP. Mudanças na concentração de íons de magnésio no meio celular podem regular diferentes reações metabólicas em plantas, animais e microorganismos (OPEI *et al.*, 1999).

Waalkes & Poirier (1984) evidenciaram que o magnésio diminui a ligação do cádmio a sítios no DNA. Além disso, Littlefield *et al.* (1994) mostraram um efeito protetor do magnésio sobre quebras simples no DNA induzidas por cádmio. Outros estudos mostraram que o magnésio pode diminuir o efeito do cádmio sobre os espaços intracelulares e podócitos em células do epitélio amniótico humano (GUIET *et al.*, 1990). Em coelhos, foi demonstrado que a absorção de magnésio pode eliminar cádmio via urina (SOLDATOVIC *et al.*, 1998).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, os genes *ALR1* e *ALR2* foram identificados por sua capacidade de aumentar a tolerância ao alumínio quando superexpressos (MACDIARMID & GARDENER, 1998) e estão envolvidos com o transporte de magnésio, pois os mutantes *alr1* e *alr2* apresentam um crescimento reduzido em meio desprovido de magnésio. Corroborando

esta hipótese, Graschopf *et al.* (2001) demonstraram que a proteína Alr1 está localizada na membrana plasmática de *S. cerevisiae*, e que sua expressão pode ser controlada por diferentes concentrações de magnésio.

1.4. Manganês

O íon manganês (Mn^{2+}) é um elemento essencial que é acumulado e utilizado por todas as formas de vida. O manganês atua não somente como ativador de enzimas, mas também como constituinte estrutural de metaloenzimas, dentre as quais estão incluídas a arginase, desidrogenases, cinases e descarboxilases. Tanto como ativador ou como componente estrutural de enzimas, o Mn^{2+} é frequentemente o cátion prioritário, porém ele pode ser substituído parcialmente por Mg^{2+} com pouca ou nenhuma perda da atividade enzimática (CROWLEY *et al.*, 1999; KEEN *et al.*, 1999).

Apesar de ser um nutriente essencial, o Mn^{2+} também pode ser tóxico. A exposição ao Mn^{2+} pode causar severas lesões neurológicas em seres humanos, levando ao quadro de Parkinson, também conhecido como manganismo (PAL *et al.*, 1999; BARCELOUX 1999; WITHOLT *et al.*, 2000; UVERSKY *et al.*, 2001).

A importância biológica do manganês é reconhecida há um longo tempo, mas pouco ainda se sabe do mecanismo de homeostase do manganês. Em *S. cerevisiae*, as proteínas Smf1 e Smf2 pertencem à família de transportadores de metais Nramp (*natural resistance-associated macrophage protein*), que são amplamente conservadas, e atuam no importe e tráfico intracelular de Mn^{2+} (CELLIER *et al.*, 1995). Quando o nível intracelular de Mn^{2+} diminui, há um aumento na expressão das proteínas Smf1 e Smf2. Deste modo, com os transportadores acumulados na superfície da célula (Smf1p) e intracelularmente (Smf2p), ocorre um aumento no importe de íons de Mn^{2+} e sua disseminação intracelular (LIU & CULOTTA, 1999b; PORTNOY *et al.*, 2000; LUK & CULOTTA, 2001).

1.5. Cádmio

O íon cádmio (Cd^{2+}) é um elemento sem função biológica conhecida, porém é um dos mais perigosos poluentes ambientais (McMURRAY & TAINER, 2003). Devido a sua baixa excreção orgânica e um tempo de meia vida biológico de 10 a 30 anos, o cádmio tende a se acumular no corpo, causando seus efeitos deletérios (McMURRAY & TAINER, 2003).

Dentre os metais pesados, o cádmio constitui o exemplo típico de íon metálico cuja toxicidade depende da sua habilidade de produzir complexos. Possuindo uma alta afinidade pelos grupos sulfidrila das proteínas, compete com o zinco em proteínas e se liga de forma inespecífica ao DNA, causando quebras simples de cadeia (MCMURRAY & TAINER 2003).

Szczyпка *et al.* (1994) mostraram que o cádmio é mutagênico e carcinogênico e sugeriram que esses efeitos seriam provenientes da indução de estresse oxidativo. Corroborando esta hipótese, Brennan & Schiestl (1996) mostraram que linhagens de *S. cerevisiae* deficientes nas enzimas antioxidantes superóxido dismutase citoplasmática (Sod1p) e mitocondrial (Sod2p) são hipersensíveis a cádmio. Contudo, foi evidenciado que o estresse oxidativo induzido pelo cádmio é gerado de forma indireta e ocorre como resultado de alterações nos níveis intracelulares de glutatona e no balanço redox da célula. A exposição aguda ao cádmio inativa as enzimas tiol transferase (Glutaredoxina) e glutatona redutase por meio da quebração de seus di-tióis (SH-SH) vicinais e promove a retirada de glutatona de proteínas (deglutatioação) (CHRESTENSEN *et al.*, 2000). Vido *et al.* (2001) demonstraram que o cádmio provoca um aumento significativo na expressão da tioredoxina (Trx2p), e que linhagens disruptas para os genes das tioredoxinas (*trx1Δ*, *trx2Δ*) ou para a tioredoxina redutase (*trr1Δ*) são hipersensíveis ao cádmio. Stohs & Bagchi, (1995) demonstraram que o cádmio pode aumentar os níveis de peroxidação lipídica intracelular.

Jin *et al.* (2003) descreveram que o efeito carcinogênico do cádmio se deve à inibição do sistema de reparo de erros de emparelhamento (MMR) e não à geração (direta ou indireta) de lesões ao DNA. Segundo estes autores, o cádmio pode ter alto poder mutagênico mesmo quando está presente em concentrações que não seriam suficientes para gerar um número significativo de lesões ao DNA (na ordem de micromolar), mas que são semelhantes às concentrações de cádmio encontradas no meio ambiente e acumuladas em humanos expostos a níveis altos do metal. Portanto, é mais provável que o efeito mutagênico do cádmio seja resultado de sua capacidade inibir até 50% as enzimas envolvidas na reparação de erros emparelhamento (MMR), levando a alterações no quadro de leitura ribossômico e substituição de pares de bases no DNA (JIN *et al.*, 2003). Os resultados deste trabalho deixaram claro que uma substância não necessita gerar um aumento de danos ao DNA, mas apenas inibir a reparação normal de danos endógenos para ser classificada como mutagênica.

2. ORGANISMO MODELO - *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é provavelmente o organismo eucariótico mais estudado. Isso ocorre porque a levedura é facilmente cultivada em laboratório, e é um organismo extremamente adequado para estudos genéticos. Além disso, deve-se mencionar que a *S. cerevisiae* é o primeiro organismo eucariótico cujo genoma foi seqüenciado completamente. Aproximadamente 6000 genes foram identificados, sendo que a informação está livremente disponível na Internet em <http://www.yeastgenome.org>. Entretanto, as funções de muitos genes ainda não são conhecidas (VOLODYMYR & LUSHCHAK, 2006). A levedura *S. cerevisiae* é um valioso organismo modelo para doenças humanas, pois compartilha muitas proteínas homólogas tanto em suas estruturas e/ou funções. Além disso, é um modelo eucariótico no qual é tecnicamente fácil aumentar ou diminuir o nível da expressão gênica em cada gene (STURGEON *et al.*, 2006).

2.1. Metabolismo

A *S. cerevisiae* é caracterizada por sua habilidade de degradar glicose e frutose em etanol (*Crabtree effect*), tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias de crescimento. A glicose é a fonte de carbono preferida da levedura *S. cerevisiae*, uma preferência que é mediada por um complexo processo de repressão, ativação de genes e modificações pós-traducionais de proteínas usualmente conhecido como “repressão catabólica” (GANCEDO, 1998). Na presença de concentrações acima de um valor chamado de concentração típica, a glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas do ciclo de Krebs, enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais. A via a ser seguida pelo piruvato, neste caso, é a anaeróbica com a formação de etanol, encontrando-se reduzida à atividade mitocondrial na levedura. Em concentrações de glicose abaixo da concentração crítica (0,2% no meio) e em presença de O₂, o piruvato seguirá a via aeróbica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Ocorrendo, neste caso, uma gradativa desrepressão de genes que codificam (i) enzimas que participam da biossíntese de mitocôndrias; (ii) proteínas necessárias para a utilização de fontes de carbono alternativas e (iii) outros fatores necessários ao metabolismo respiratório (DE WINDE *et al.*, 1997; GANCEDO, 1998).

A *S. cerevisiae* apresenta um perfil de crescimento característico. Após um curto período de adaptação ao meio no qual foram introduzidas (chamado de fase *lag*), as células iniciam uma divisão celular a cada hora e meia (fase exponencial) com a energia proveniente

da fermentação da glicose. Quando a concentração da glicose cai abaixo do limite de repressão, há uma parada transitória no ciclo celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório (transição diáuxica). Após, reassumem a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), metabolizando o etanol produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem depletadas, as células entram na fase estacionária, na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (FUGE & WERNER-WASHBURNE, 1997).

3. PROCESSOS DE DESTOXIFICAÇÃO DE Cd²⁺ NA LEVEDURA *S. cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* não sintetiza fitoquelatinas, que são a primeira linha de defesa contra o cádmio para plantas, fungos filamentosos, várias leveduras e até mesmo em *Caenorhabditis elegans* (VATAMANIUK *et al.*, 2001). As fitoquelatinas são polímeros de (γ -glutamil-cisteína)_n-glicina, e são sintetizadas em resposta aos níveis tóxicos de metais pesados, sendo esta síntese dependente da concentração intracelular de glutathione. São produzidas por meio da clivagem da glicina de uma molécula de glutathione (γ -glutamil-cisteína-glicina) por uma enzima chamada fitoquelatina sintase, resultando em um fragmento de γ -glutamil-cisteína que é combinado a outra molécula de glutathione para formar a (γ -glutamil-cisteína)_n-glicina (AL-LAHHAM *et al.*, 1999). Este processo ocorre repetidamente, aumentando o número de unidades γ -glutamil-cisteína na molécula, cujos abundantes tióis complexam preferencialmente íons cádmio, mas também cobre e zinco. Estes complexos são transportados e mantidos no vacúolo. Em *S. cerevisiae*, esta função de quelação de metais é atribuída à glutathione (PENNINCKX, 2002).

3.1. Queladores: Glutathione (GSH) e Metalotioneínas (MTs)

A glutathione é um tripeptídeo (γ -glutamil-cisteína-glicina) importante na proteção celular contra formação de radicais livres, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos, como os xenobióticos. É sintetizada em dois passos por duas enzimas distintas: pela enzima γ -glutamil-cisteína sintetase (codificada pelo gene *GSH1*), que regula a produção de glutathione, e pela enzima glutathione sintetase (codificada pelo gene *GSH2*), capaz de catalisar a síntese de GSH pela adição da glicina a uma molécula γ -glutamil-cisteína. O grupamento reativo da glutathione é o tiol da

cisteína, que atua como captador de espécies reativas de oxigênio e de metais pesados, principalmente íons cádmio (PENNINCKX, 2002). A glutatona é essencial para eucariotos, e em *S. cerevisiae* atua na primeira linha de defesa contra a toxicidade de cádmio, inativando-o fisiologicamente pela formação do complexo bis(glutatiolato)-cádmio, $Cd(GS)_2$, que é transportado para o vacúolo pelas proteínas Ycf1p (PENNINCKX, 2002) e Bpt1p (KLEIN *et al.*, 2002).

Outro mecanismo comum utilizado pelos organismos para a resistência a metais tóxicos envolve a captação de íons metálicos intracelulares por proteínas de baixo peso molecular ricas em cisteína conhecidas como metalotioneínas (MTs) presentes em células eucarióticas. Os resíduos de cisteína geralmente estão presentes em motivos de seqüência Cys-X-Cys ou Cys-X-X-Cys. A presença múltipla destas seqüências predispõe as MTs a ligarem metais. Assim auxiliando na homeostase de zinco e cobre, na participação da fixação dos referidos metais essenciais, no controle das concentrações dos íons livres dentro da célula, no transporte aos seus destinos celulares e na neutralização de metais pesados tóxicos tais como o cádmio e o mercúrio, juntamente com a proteção celular contra o estresse oxidativo (KÄGI & SCHÄFFER, 1998). Em certas condições, como proliferação celular, algumas metalotioneínas são translocadas até o núcleo e assim suprem os níveis de cobre e zinco para as enzimas e fatores de transcrição que dependem destes íons essenciais (OGRA & SUZUKI, 2000).

Na levedura, os loci que codificam para metalotioneínas são o *CUP1* e o *CRS5*. O locus *CUP1*, dependendo da linhagem, contém de 1 a 14 cópias do gene da MT repetidas em série; a quantidade de cópias se correlaciona com resistência a cobre e ao cádmio. O locus *CRS5* codifica uma metalotioneína, cuja função na proteção a concentrações tóxicas de cádmio não se mostrou relevante (PEREGO & HOWELL, 1997).

3.2. Transportadores de Cd^{2+} localizados no vacúolo (Ycf1p, Bpt1p)

Células de *S. cerevisiae* com deleção no gene *YCF1* são hipersensíveis ao cádmio. Baseado em suas características estruturais primárias, Ycf1p (*Yeast-Cadmium Factor1*) pertence à superfamília de transportadores ABC (*ATP binding cassette proteins*), assim como hCFTR (*human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) e MRP1 (*multidrug resistance associated protein*) (PEREGO & HOWELL, 1997). O gene *YCF1* é ortólogo aos

genes MRP1 e MRP2 de mamíferos (REBBEOR *et al.*, 1998) e codifica um transportador dependente de ATP e magnésio localizado no vacúolo. A proteína Ycf1 de *S. cerevisiae* possui um importante papel na defesa celular contra íons Cd^{2+} após sua associação com o grupo tiol (SH) da glutatona, pois é responsável pelo transporte dos complexos $\text{Cd}(\text{GS})_2$ para o interior do vacúolo. Além disso, essa proteína também catalisa o transporte de conjugados de glutatona com outros metais e xenobióticos (como, por exemplo, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) do citoplasma para o interior do vacúolo (PENNINCKX, 2002).

O gene *BPT1* é transportador que pertence à superfamília ABC. A proteína Bpt1 pode transportar para o interior do vacúolo até um terço dos conjugados de glutatona formados no citoplasma (KLEIN *et al.*, 2002). Curiosamente, porém, não funciona na sua ótima capacidade de transporte na ausência de Ycf1p (o contrário não ocorre), o que leva a crer que haja alguma forma de interação entre estas proteínas, destacando a fundamental importância de Ycf1 na desintoxicação. Enquanto a expressão de Ycf1p aumenta drasticamente após certos estresses, como a exposição ao cádmio, a de Bpt1p varia moderadamente (SHARMA *et al.*, 2002). Os níveis vacuolares de Bpt1p aumentam quando as células de *S. cerevisiae* se aproximam da fase estacionária de crescimento (KLEIN *et al.*, 2002).

3.3 Transportadores de Cd^{2+} localizados na membrana plasmática (Cad2p, Zrt1p, Alr1p, Yor1p)

O gene *CAD2* foi identificado por codificar a proteína Cad2 que controla o nível intracelular de cádmio, aumentando os níveis de transporte deste metal para fora da célula, conferindo uma maior resistência às células de *S. cerevisiae* (SHIRAISHI *et al.*, 2000). Porém, o gene *CAD2* é uma mutação derivada da proteína Pca1, a qual exporta cobre por um transportador do tipo P-ATPase. Assim, a proteína Cad2 adquiriu uma nova função, realizando somente o efluxo de cádmio (SHIRAISHI *et al.*, 2000).

Na membrana plasmática de *S. cerevisiae*, os transportadores Zrt1 e Zrt2 são responsáveis pelo influxo de alta e de baixa afinidade de zinco (MACDIARMID *et al.* 2000). Gomes *et al.*, (2002) evidenciaram que o transportador Zrt1p de alta afinidade para zinco estaria envolvido com a importação de íons de cádmio em baixas concentrações (47,8 μM de CdSO_4), o que explicaria o baixo nível de oxidação intracelular e a alta tolerância à cádmio encontrados nos mutantes *zrt1Δ* (GOMES *et al.*, 2002).

A proteína Alr1 é um transportador de magnésio de alta afinidade que está localizado na membrana plasmática de *S. cerevisiae* (MAcDIARMID & GARDNER, 1998). A expressão e degradação deste transportador são controladas pela concentração de magnésio (figura 1) GRASCHOPF *et al.*, 2001. Em níveis normais de magnésio, a Alr1p é essencial para o crescimento de células de levedura. Entretanto, em meios com alta concentração de Mg^{2+} os níveis de expressão de Alr1p na membrana são drasticamente reduzidos (MAcDIARMID & GARDNER, 1998). Em recente estudo Kern *et al.* (2005), demonstrou que, em células de *S. cerevisiae*, a proteína Alr1 está envolvida com a desintoxicação de Cd^{2+} , devido à sua capacidade de executar o efluxo de Cd^{2+} para o meio extracelular.

A proteína Yor1 pertence à família de transportadores ABC e possui uma identidade de aproximadamente 30% com hMRP1 e a Ycf1p de *S. cerevisiae* (CUI *et al.*, 1996). Recentemente Nagy *et al.* (2006) demonstraram que, em *S. cerevisiae* incubada a uma temperatura de 23° C, a proteína Yor1 proporciona resistência ao cádmio. Esta resistência ocorre pela capacidade da Yor1p de transportar complexos $Cd(GS)_2$ para o exterior da célula, pois está localizada na membrana plasmática e utiliza um mecanismo molecular similar ao da proteína Ycf1 para efetuar o efluxo do cádmio.

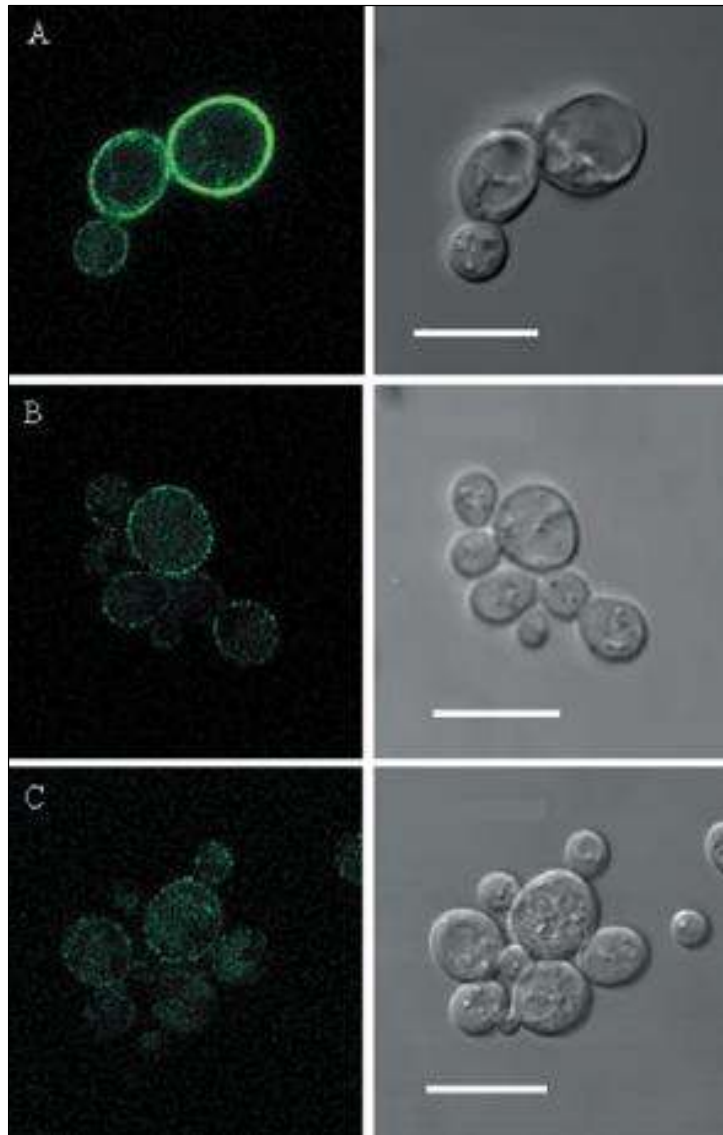


Figura 1. Localização e expressão da proteína Alr1 em *S. cerevisiae*, observada por microscópio confocal. A linhagem JS74A expressando a proteína fluorescente verde (GFP) foi crescida a 28° C por 12 horas em meio sintético, contendo magnésio nas concentrações de (A) 5 μ M; (B) 1 mM; (C) 200 mM. Figura correspondendo à diferença de contraste, mostrando à esquerda GFP expressado. Adaptado de Graschopf et al, (2001).

4. PRINCIPAIS TRANSPORTADORES INTRACELULARES DE CÁLCIO PRESENTES EM *S. cerevisiae*

4.1. Transportadores presentes na membrana vacuolar: Pmc1p e Vcx1p.

Em *S. cerevisiae* duas proteínas são conhecidas por mediar o transporte de Ca^{2+} entre o citoplasma e o vacúolo: a Vcx1p/Hum1p - que é uma bomba de troca de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ e a Pmc1p - que é uma ATPase dependente de Ca^{2+} (figura 2) (POZOS *et al.*, 1996; CUNNINGHAM & FINK, 1996; MISETA *et al.*, 1999).

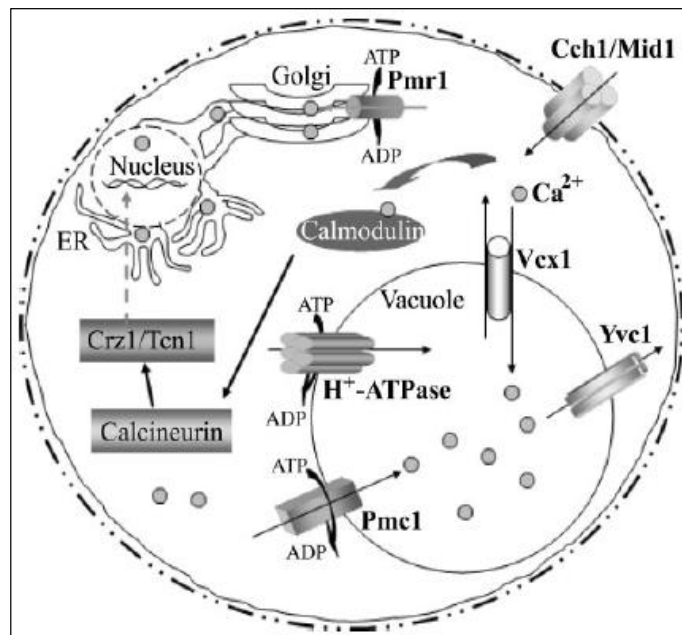


Figura 2. Modelo básico para sinalização e transporte de Ca^{2+} em *Saccharomyces cerevisiae*. O Ca^{2+} entra no citoplasma via membrana plasmática por meio das proteínas Cch1/Mid1, ou também pode ser liberado do vacúolo por meio da proteína Yvc1 em resposta a estímulos ambientais. O Ca^{2+} liga-se a calmodulina, ativando a proteína fosfatase calcineurina, que por sua vez ativa o fator de transcrição Crz1/Tcn1, conduzindo sua translocação para o núcleo e, subsequentemente, a transcrição de genes alvo. As flechas sólidas indicam o movimento do cálcio por transportadores de cálcio na membrana (Pmc1p e Pmr1p) e o antiportador vacuolar $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Vcx1). Adaptado de Ton & Rao (2004).

O gene *VCX1* codifica uma bomba vacuolar trocadora de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ que está envolvida com a manutenção da homeostase do cálcio e transdução de sinais intracelulares. Vcx1p é

responsável por restaurar os níveis citosólico de Ca^{2+} em resposta a um aumento da concentração intracelular deste íon (POZOS *et al.*, 1996; CUNNINGHAM & FINK, 1996; MISETA *et al.*, 1999). Além disso, esta proteína compartilha seqüências similares com os transportadores de Ca^{2+} em mamíferos e de plantas (POZOS *et al.*, 1996; PITTMAN *et al.*, 2002).

Tanto *Vcx1p* como *Pmc1p* estão envolvidas no acúmulo de Ca^{2+} no vacuolo e ambas são reguladas por calcineurina, que é uma proteína fosfatase Ca^{2+} /calmodulina-dependente. A calcineurina induz a expressão de *PMCI* e de *PMRI* por meio da ação do fator de transcrição *Crz1p*. Entretanto, a atividade de *Vcx1p* é regulada negativamente por calcineurina em um mecanismo independente de *Crz1p* (STATHOPOULOS & CYERT, 1997; MATHEOS *et al.*, 1997). A regulação de *Vcx1p* envolve também a *Rcn1p* que age como um inibidor endógeno de retro alimentação da calcineurina (KINGSBURY & CUNNINGHAM, 2000).

O gene *PMCI* codifica uma ATPase que transporta o Ca^{2+} do citoplasma para dentro do vacuolo, auxiliando na regulação da homeostase deste metal. A seqüência primária da *Pmc1p* tem 40% de identidade com as ATPases dependentes de Ca^{2+} (PMCA's) da membrana plasmática de mamíferos, e similaridade com *Pmc1p* de *S. pombe* e as ATPases de Ca^{2+} de *T. brucei* e *A. thaliana* (CUNNINGHAM & FINK, 1994; GEISLER *et al.*, 2000; LUO *et al.*, 2004).

Além da *Pmc1p*, as células de *S. cerevisiae* possuem outra ATPase-dependente de Ca^{2+} : a *Pmr1p* (CUNNINGHAM & FINK, 1994) – que é a principal ATPase de Ca^{2+} expressa sob circunstâncias normais do crescimento. Entretanto, na ausência de *PMRI* ou em presença de níveis elevados de cálcio, a *Pmc1p* tem o seu nível de expressão aumentada (CUNNINGHAM & FINK, 1994; MARCHI *et al.*, 1999).

O gene *PMCI* não é essencial para a viabilidade, sua disrupção não afeta o cruzamento e a esporulação. Entretanto, a disrupção de *PMCI* resulta em inibição no crescimento e em uma grande redução do *pool* de Ca^{2+} no vacúolo e aumento das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} . Além disso, nos mutantes *pmc1*, o influxo de Ca^{2+} para o vacúolo pode ser restaurado pela inativação do complexo calcineurina. A disrupção simultânea de *CNA1* e de *CMP2*, que codificam as subunidades catalíticas da calcineurina, restaura o crescimento dos mutantes *pmc1*. A disrupção de *CNBI*, a subunidade regulatória da calcineurina, também restaura o crescimento desses mutantes (CUNNINGHAM & FINK, 1994; MARCHI *et al.*, 1999). A calcineurina diminui a tolerância ao Ca^{2+} dos mutantes *pmc1* por inibir a ativação de *VCXI* (CUNNINGHAM & FINK, 1996).

Em ambientes com elevadas concentrações de Ca^{2+} , uma maior expressão de *PMCI* é necessária para o crescimento celular. Entretanto, quando as concentrações de Ca^{2+} diminuem, o excesso da atividade da *Pmc1p* é regulado negativamente por *Nyv1p*, uma proteína vacuolar do complexo v-SNARE. *Nyv1p* liga-se a *Pmc1p* e inibe sua atividade no transporte de Ca^{2+} para dentro do vacúolo – *in vivo* e *in vitro* (TAKITA *et al.*, 2001).

4.2. Transportador presente na membrana do Golgi: *Pmr1p*

O gene *PMRI* codifica uma bomba ATPase de Ca^{2+} , localizada na membrana do Golgi (figura 2), que é responsável por transportar Ca^{2+} e Mn^{2+} para o interior da organela (RUDOLPH *et al.*, 1989; SORIN *et al.*, 1997; MANDAL *et al.*, 2000.). Essa proteína é o protótipo de uma família de transportadores conhecidos como SPCA (*Secretor Pathway Ca^{2+} -ATPases*), cujos membros são encontrados em *C. elegans*, *D. melanogaster* e em mamíferos (CULOTTA *et al.*, 2005). Mutações no gene humano ATP2C1, que é homólogo a *PMRI*, estão associadas ao desenvolvimento de uma doença que causa sérios problemas de pele, conhecida como doença de Hailey-Hailey (KELLERMAYER, 2005). Essa doença tem incidência de 1:5000 e se manifesta após os primeiros dez anos de vida, normalmente na puberdade (MISSIAEN *et al.* 2007). Embora, os genes ATP2C1 e *PMRI* tenham um grau de homologia de apenas 49%, o gene ATP2C1 é capaz de complementar inteiramente o fenótipo do mutante *pmr1Δ* de *S. cerevisiae* (TON *et al.*, 2002).

Tanto o cálcio quanto o manganês são utilizados nas modificações pós-traducionais de polipeptídeos que acontecem no interior das vesículas do Golgi. O Ca^{2+} é requerido para adesão das proteínas à membrana, enquanto que o Mn^{2+} é necessário para a glicosilação de proteínas. Por este motivo, a atividade de transporte da *Pmr1p* é essencial para o funcionamento adequado da via secretória de *S. cerevisiae*.

Adicionalmente, quando a concentração intracelular de Mn^{2+} se encontra muito alta, a *Pmr1p* atua na principal rota de desintoxicação deste metal. Neste caso, os íons Mn^{2+} são captados para o interior do Golgi pela *Pmr1p* e posteriormente eliminados da célula por meio de vesículas secretórias (DÜRR *et al.*, 1998, CULOTTA *et al.*, 2005). Mutantes *pmr1Δ* são extremamente sensíveis quando expostos a níveis tóxicos de Mn^{2+} , o que está associado a um maior acúmulo de Mn^{2+} no citosol (TON *et al.*, 2002; KELLERMAYER, 2005). Presumivelmente, em linhagens onde o gene *PMRI* é funcional, o excesso de manganês é bombeado para o interior do Golgi pela *Pmr1p* e retirado da célula por meio de vesículas da

via secretora, que se fundem com a superfície da membrana celular, liberando o manganês novamente no meio extracelular (figura 3) (CULOTTA *et al.*, 2005).

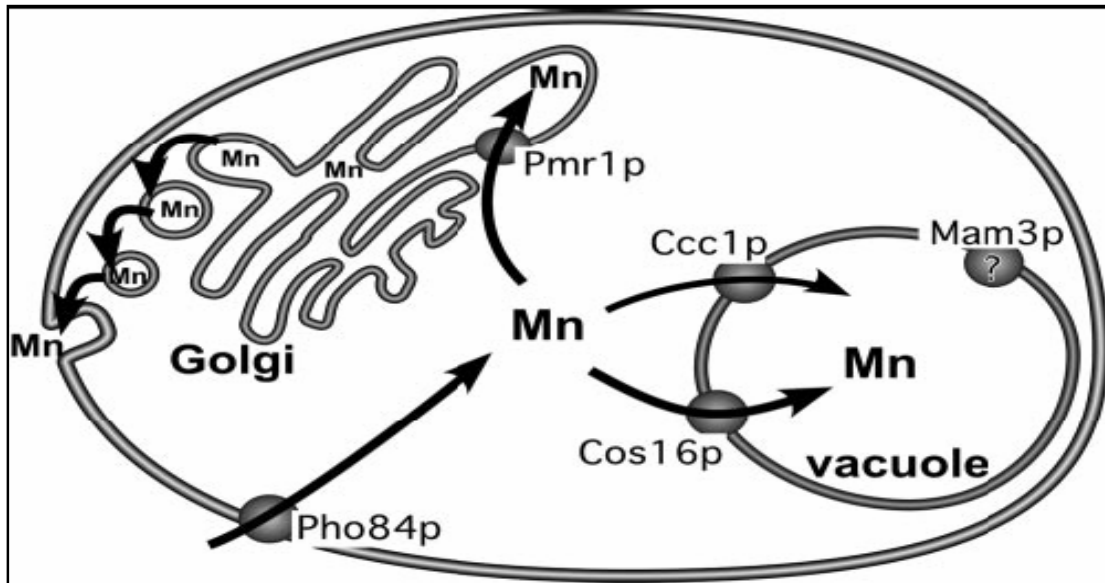


Figura 3. Tráfego de manganês sob altas concentrações ou condições tóxicas. Quando células de *S. cerevisiae* são colocadas em condições excedentes de manganês (~10 a 100 μ M), o metal é absorvido em grande quantidade na forma de fosfato de manganês, por meio do transportador de fosfato Pho84p. Contudo, dois sistemas de destoxificação sequestram o metal e ajudam a eliminar o excesso de manganês presente na célula. O excesso de manganês é bombeado para dentro do Golgi via Pmr1p e o metal é retirado da célula através da via secretora. O manganês também é sequestrado para dentro do vacúolo por Ccc1p e talvez por Cos16p. A função vacuolar de Mam3p não é conhecida, mas ela ajuda a contribuir com a toxicidade provocada por manganês. Adaptado de Culotta *et al.* (2005).

Os transportadores representam um grupo de proteínas conhecidas por seu importante papel na regulação homeostática dos íons metálicos, pois também atuam na defesa celular contra a toxicidade provocada por metais pesados. No entanto, ainda se conhece muito pouco a respeito do envolvimento das proteínas transportadoras com os mecanismos de resistência aos metais tóxicos.

II – OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento dos íons de cálcio e magnésio na redução da toxicidade do cádmio, bem como estudar a influência de transportadores de cálcio no processo de desintoxicação de cádmio pela via secretória em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação protetora de íons do magnésio nas linhagens selvagem, *ycf1Δ*, *gsh1Δ* e *ztr1Δ* contra os efeitos tóxicos provocados por cádmio, por meio da construção de curvas de crescimento.
- Avaliar a ação protetora de íons do cálcio nas linhagens selvagem, *ycf1Δ*, *gsh1Δ* e *ztr1Δ* contra os efeitos tóxicos provocados por cádmio, por meio da construção de curvas de crescimento.
- Verificar a influência da presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} sobre a captação de cádmio nas linhagens selvagem, *ycf1Δ*, *gsh1Δ* e *ztr1Δ*, por meio da técnica de PIXE (*Particle Induced X-Ray Emission*).
- Analisar a sensibilidade de mutantes para proteínas transportadoras de cálcio presentes no complexo de Golgi e vacúolo (*pmc1Δ* e *pmc1Δ*, respectivamente) em presença de cádmio.
- Executar ensaio de complementação fenotípica com o mutante *prm1Δ*, utilizando o vetor centromérico YcpLac33 contendo uma cópia funcional do gene de *PMR1* e executar ensaio para confirmar a reversão do fenótipo.
- Determinar a concentração intracelular de cádmio na linhagem selvagem (contendo o vetor YcpLac33 vazio) e na linhagem *prm1Δ* (contendo o vetor YcpLac33 vazio e carregando uma cópia funcional de *PMR1*) utilizando método PIXE (*Particle Induced X-Ray Emission*).

- CAPÍTULO I -

**Protective activity of magnesium and calcium against the toxic effects
caused by cadmium on *Saccharomyces cerevisiae*.**

Artigo a ser submetido Cell Biology and Toxicology

**Protective activity of magnesium and calcium against toxic effects
caused by cadmium on *Saccharomyces cerevisiae*.**

Cláudio Marcos Lauer-Júnior¹, Diego Bonatto², Johnny Ferraz Dias³, Maria-Lúcia
Yoneama³, João Antonio Pêgas Henriques^{1,2,*}

¹Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

²Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio
Vargas 1130, Bloco 57, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.

³Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento
Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

Short title: Protective activity against cadmium.

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

João Antonio Pêgas Henriques

Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, UFRGS,

Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brazil, 91507-970.

Telephone: 55-51-3308-7602; Fax: 55-51-3308-6084.

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

Contract/grant sponsor: FAPERGS, CAPES, GENOTOX/ROYAL laboratory.

Abstract

Cadmium is a heavy metal with toxic and carcinogenic properties. The biological effect of this metal depends on its ability to: (I) produce complexes with glutathione, therefore increasing oxidative stress, (II) compete with zinc for binding in proteins, (III) cause DNA single breaks and (IV) inhibit DNA repair, especially mismatch repair. In this work we focused on influence of calcium and magnesium ions on the toxicity caused by cadmium on *gsh1*, *ycf1* and *zrt1*, three protein mutant strains linked to the control of cadmium homeostasis in *S. cerevisiae*. Glutathione acts as a radical scavenger, with the redox-active sulfhydryl group reacting with oxidants/metals. Ycf1, a vacuolar glutathione S-conjugate pump mediates vacuolar accumulation of Cd–GSH complexes in this organelle, and Zrt1 protein mediates cadmium uptake. The results suggest that both magnesium and calcium ions could have a protective effect against damage caused by cadmium in yeast cells, and the PIXE analysis indicates that intracellular Cd²⁺ concentration is lower in strains supplemented with calcium or magnesium than in those exposed to Cd²⁺ only. The results indicated that calcium or magnesium ions can interfere with cadmium uptake to decreased intracellular Cd²⁺ content in cells and resulting increased of resistance in all strains as suggested by tested

Keywords: Calcium; Magnesium; Cadmium; Saccharomyces cerevisiae; Protection;

1. Introduction

Cadmium (Cd) is regularly found in ores along with zinc, copper and lead. Therefore, volcanic activity is one natural reason for temporary increases in environmental cadmium concentrations. Cadmium is a relatively abundant nonessential element widely used in industrial processes, as anticorrosive agent, stabilizer in PVC products, color pigment, neutron absorber in nuclear power plants, in the manufacturing of nickel-cadmium batteries, etc.. Moreover, phosphate fertilizers also present a big cadmium load [1]. Cd^{2+} is a highly toxic metal; in particular, it has been shown to produce cardiotoxicity [2], hepatotoxicity [3], as well as neuropathological and neurochemical changes in the central nervous system resulting in irritability and hyperactivity [4,5]. Cd is found in food (vegetables, grains, and cereals), water, and tobacco leaves. Therefore, Cd^{2+} is a metal considered to be a potential hazard for the general population. Cd^{2+} accumulates unevenly in human tissue, and it concentrates primarily in the lungs, liver, kidneys, brain, and heart [1,6]. A variety of mechanisms have been attributed to Cd^{2+} induced toxicity. Cd^{2+} interferes with the intracellular signaling network and gene regulation at multiple levels [7]. It has been reported that Cd^{2+} induces changes in activities of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase [8], and catalase [9]. Lipid peroxidation is also associated with Cd^{2+} toxicity [9]. In addition, this metal has been implicated in tumorigenesis [10], and is also associated with occurrences of the disease Itai-Itai, in which patients show a wide range of symptoms such as decreased bone mineralization, high fracture and osteoporosis rates. [11].

A few other metal compounds are known to reduce cadmium toxicity. Cd^{2+} toxicity in bacteria and fungi can be reduced by the incorporation of zinc (Zn^{2+}) and calcium (Ca^{2+}) [12,13]. Calcium ions contributed to the suppression of the toxicity of Cd^{2+} in teleost eggs [14]. Also, in acute Cd^{2+} intoxication of male Swiss mice, pretreatment with magnesium (Mg^{2+}) showed a significant decrease of Cd^{2+} in kidney [15]. It is also reported that selenium protected rats from harm caused by Cd^{2+} (16).

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been used as a model organism to study metal homeostasis and resistance mechanisms. Yeast responds to heavy metal toxicity in a variety of ways [17]. A general mechanism for heavy metal detoxification in yeast and in other organisms is metal chelation by a ligand, and, in some cases, its subsequent compartmentation as a ligand–metal complex [18]. In *S. cerevisiae*, one of the genes involved in GSH biosynthesis is *GSH1*, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase [17]. The main molecules responsible for the cytoplasmic sequestration of metals include glutathione (c-Glu-

Cys-Gly, GSH); small metal-binding peptides known as phytochelatins (c-Glu–Cys)_nGly), which are not present in *S. cerevisiae* yeast; and metallothioneins (small cysteine-rich proteins) [19,20]. Ycf1 protein (a vacuolar glutathione S-conjugate pump), is located in the vacuolar membrane, and has a particularly potent effect on *S. cerevisiae* sensitivity to cadmium [21]. It was reported that Ycf1 mediates the vacuolar accumulation of Cd–GSH complexes in this organelle [22], thus limiting cytoplasm concentrations of heavy-metal ions [22]. Ycf1 shares a high sequence similarity with the human multi-drug resistance associated protein Mrp1, and with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator hCFTR, which belongs to the ATP binding cassette super family of transporter proteins [22]. Moreover, one of the pumps linked to the control of Cd²⁺ influx is Zrt1 protein, which is a transporter with high affinity for zinc in yeasts and also mediates cadmium uptake [17]. We used yeast mutants for the genes *GSH1*, *YCF1*, and *ZRT1* to assess the influence of simultaneous administration of calcium and magnesium on cadmium toxicity. We also analyzed Cadmium intracellular concentration in yeast strains with a particle-induced X-ray emission (PIXE) method, a multi-elemental analysis that allows us to estimate and to quantifying metals present in biological samples.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

CdCl₂, MgCl₂ and CaCl₂, analytical grade, were purchased from Sigma Aldrich (USA).

2.2. Strain and growth conditions

Genotypes of yeast strains used in the present study are presented in Table 1. These strains are isogenic derivatives of strain BY4741 [17]. Stationary-phase cultures were obtained by inoculation of an isolated colony in YEL liquid media cultures (10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto-peptone, 20 g/L glucose) for 2 d at 30°C. The sensitivity assay and the treatments for PIXE (Particle-Induced X-ray Emission) were performed in SynCo synthetic complete media (0.17g/L yeast nitrogen base w/o amino acids and w/o ammonium sulfate, 5

g/L ammonium sulfate, and 20g/L glucose with appropriate amino acids or/and bases added at 20 mg/L), (pH 6.0), and incubated in a shaker at 30°C.

2.3. Drop test

Cd²⁺ sensitivity analysis was determined by the drop test. Yeast cultures in early stationary growth phase (2 days in YEL media) were harvested by centrifugation, washed twice with ultra-pure water, serially diluted (1:10 steps), and 10 µL from each dilution was plated on SynCo medium supplemented with 0.6 mM of CdCl₂ and 250 mM CaCl₂ or MgCl₂. Plates were photographed after 3 days of growth at 30°C.

2.4. Microscopic analyses and Methylene-blue staining

Conventional microscopy was performed on a Zeiss microscope using 400x magnification. Yeast cultures in early stationary growth phase (2 days in YEL media) were harvested by centrifugation, and washed twice with ultra-pure water. Strains were inoculated at density of 5x10⁶ cells/mL in SynCo medium with 0.6 mM CdCl₂ and 250 mM of CaCl₂ or MgCl₂, and incubated in a shaker (150 rpm) at 30°C for 24 h. One-mL aliquots were removed at the moment of the inoculation, and after 2, 4, 6, 8, and 24 hours. Yeast cells were harvested by centrifugation, washed with ultra-pure water, mixed with a 0.01 % methylene blue, and incubated for 5 min at room temperature. Live cells, which were not stained blue, were scored [23,24] in Neubauer chamber. The experiment was repeated at least three times. Mean values, along with the obtained standard deviations, are presented in diagrams in section 3.

Table 1. *S. cerevisiae* strains used in this study

Strain	Genotype	Source
BY4741 (wild type)	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15D0; ura3Δ0	1
<i>gsh1Δ</i>	like BY4741 except <i>gsh1::KanMX4</i>	1
<i>ycf1Δ</i>	like BY4741 except <i>ycf1::KanMX4</i>	1
<i>zrt1Δ</i>	like BY4741 except <i>zrt1::KanMX4</i>	1

1—Euroscarf, Frankfurt, Germany.

2.5. Target preparation for PIXE

For PIXE analysis, the cultures were obtained by inoculation of an isolated colony in YEL liquid medium cultures for 2 d at 30°C to a final density of approximately 2×10^8 cells/mL. Yeast cells were harvested by centrifugation, washed twice with sterile ultra-pure water, resuspended, and diluted to a final density of about 5×10^6 cells/mL in 10 mL in liquid SynCo medium with or without CdCl₂ at a final concentration of 0.6 mM with 250mM CaCl₂ or 250 mM MgCl₂, and then incubated in a shaker at 30°C. After 24 h, cells were harvested by centrifugation, washed twice with ultra-pure water, and resuspended in 100 mL of the same water. Cell suspensions were fixed on filters with 0.45- μ m diameter pores by vacuum filtration. Cell-containing filters and the blank control were mounted in on a ring support for PIXE measurements.

2.6. Particle-Induced X-ray Emission (PIXE)

PIXE analysis was carried out at a 3 MV Tandetron accelerator facility at the Physics Institute of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. All measurements were performed using a 2-MeV proton beam, with an average current of 5 nA. Acquisition time for each sample was 10 - 20 min. Beam spot at the target position was about 9 mm². Targets containing yeast cells, blank target, and 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 detected by an HPGe detector from EG&G (GLP series, EG&G Ortec, CA, USA), with an energy resolution of 180 eV at 5.9 keV. The detector was positioned at 45° relative to the beam axis. The electronics consisted of a Telenec245 amplifier associated to a PCA3 multi-channel analyzer (Oxford Instruments, TN, USA) running in a PC-compatible computer. GUPIX code [25,26] was used for data analysis.

3. Results and discussion

3.1. Phenotypic analysis of *S. cerevisiae* BY4741, *gsh1* Δ , *ycf1* Δ and *zrt1* Δ mutants

In order to test the interaction of divalent cations in *S. cerevisiae*, we carried out Cd²⁺ sensitivity experiments in the presence of calcium or magnesium. In the first series of experiments we performed phenotypic analysis of *S. cerevisiae*. The drop test analysis carried

out with strains is shown in Fig. 1. All strains showed high and similar sensitivity to CdCl₂ at a concentration of 0.6 mM (Fig. 1A) as compared to control. Figure 1B presents the strains which showed no sensitivity in SynCo medium supplemented with 250 mM Ca²⁺ or Mg²⁺. The result showed in 1C suggests that in the presence of Ca²⁺ and Mg²⁺ the strains were able to prevent cadmium toxicity in cells. However, *ycf1Δ* strain was more sensitive to Cd²⁺ treatment only when simultaneously treated with Mg²⁺.

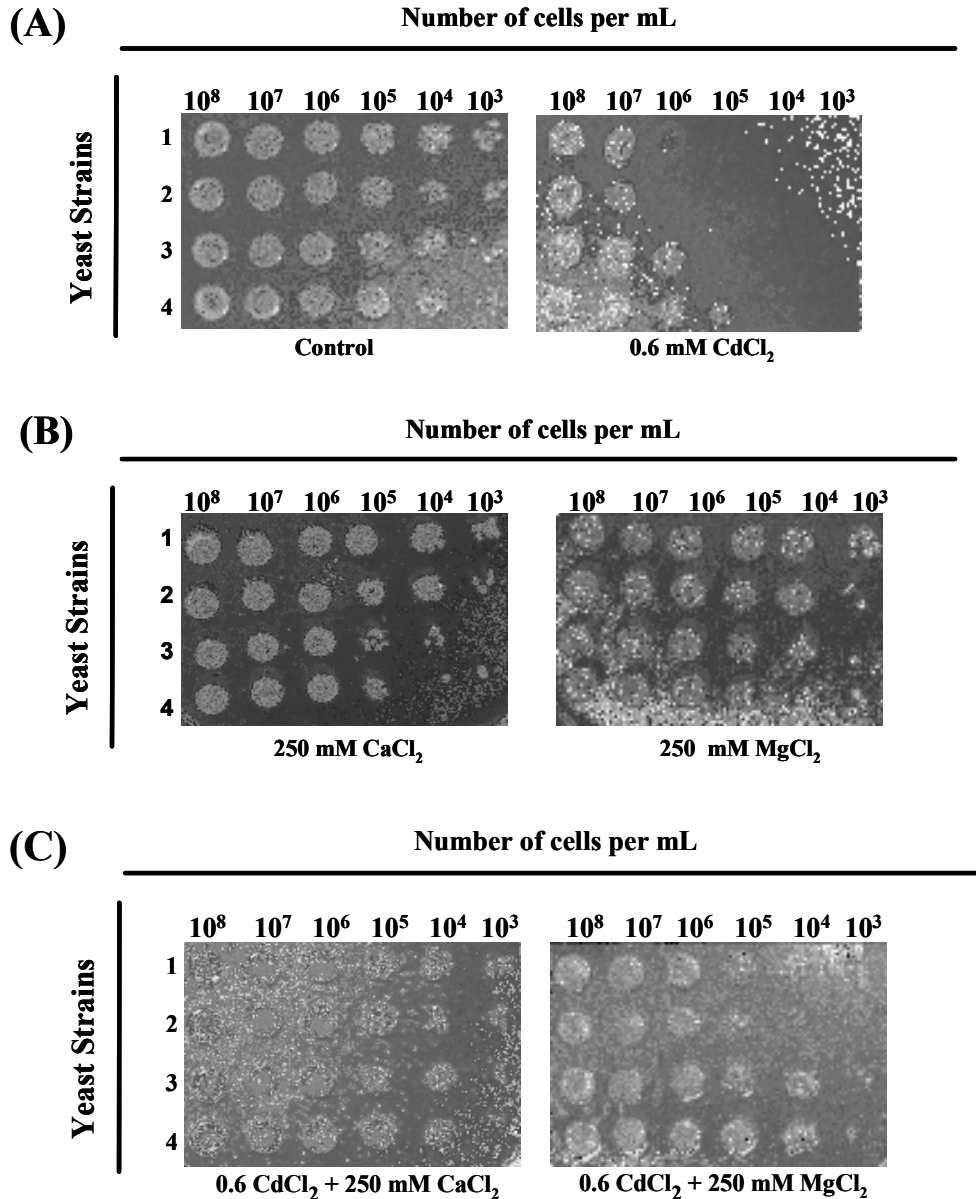


Figure 1. Sensitivity of *S. cerevisiae* to CdCl₂ (chronic exposure, Cd²⁺ in solid medium). **Panel (A)**, control (no CdCl₂) and 0.6 mM CdCl₂ addition. The number of cells per mL used in the drop test varied from 10⁸ to 10³. Yeast strains: 1. Strain BY4741; 2. Strain *ycf1Δ*; 3. Strain *gsh1Δ*; 4. Strain *zrt1Δ*; **Panel (B)**, 250mM CaCl₂ (no CdCl₂) and 250mM MgCl₂ (no CdCl₂). **Panel (C)**, 0.6 mM CdCl₂ with 250 mM and CaCl₂ and MgCl₂.

In order to confirm drop test results, cell number was estimated by methylene-blue staining; the treatment is described in section 2.4 [23]. Strains were inoculated in liquid medium containing CdCl₂, and aliquots were withdrawn at regular time intervals to confirm cell viability by methylene blue (Figure 2). The results showed that all strains were very sensitive during the first 4 hours of exposure to CdCl₂, and that sensitivity increased in 24 hours at a concentration of 0.6 mM (Figure 2).

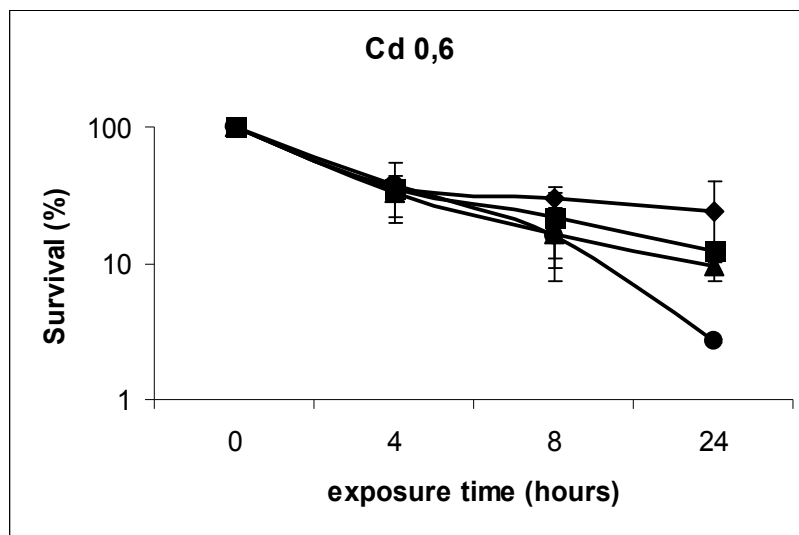


Figure 2. Sensitivity of BY4741 to 0.6 mM CdCl₂ (♦); *ycf1Δ* (■); *ztr1Δ* (▲); *gsh1Δ* (●) yeast strains. In some points, error bars (standard deviation) do not exceed the size of the symbol.

After the second series of experiments, we tested the influence of simultaneous exposure of yeast strains to cadmium when magnesium or calcium were included. The results showed that both, Mg²⁺ and Ca²⁺ were able to prevent Cd²⁺ toxicity in Wild Type strain, even when high concentrations of this metal were present (Figure 3). Ca²⁺ reduced the toxic effect of cadmium, and almost the same cellular growth as control without metals was obtained. The experiments with Mg²⁺ and Cd²⁺ also reduced Cd²⁺ toxicity, and showed a 50% protective effect as compared with the control. However, the growth of cells exposed to CdCl₂ was only inhibited during exposure time.

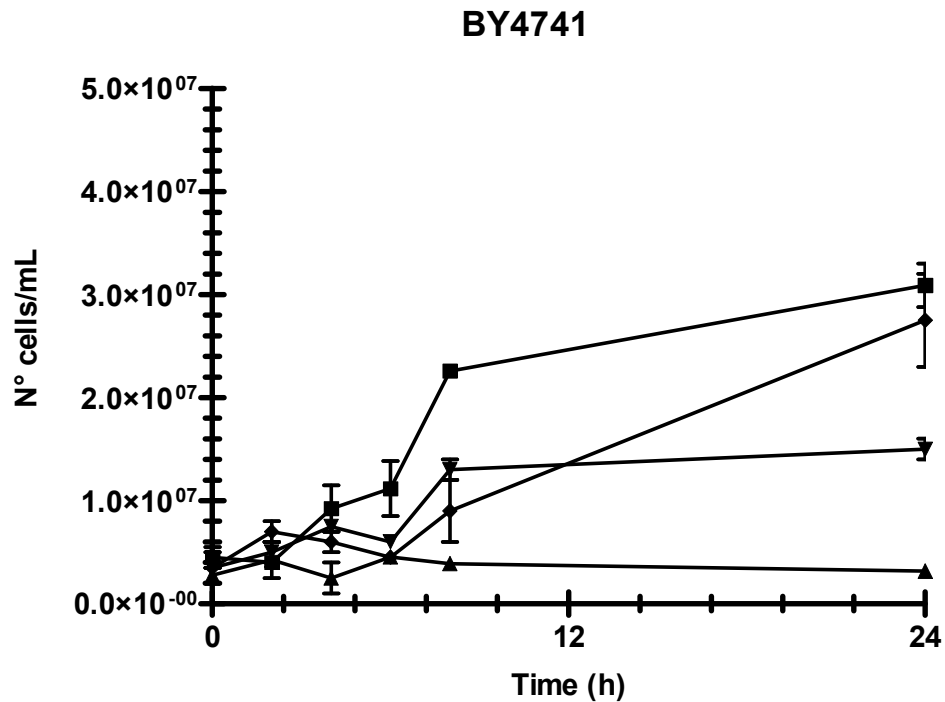


Figure 3. Protection of BY4741 yeast strains by MgCl₂ and CaCl₂ against toxic effects of CdCl₂. (■) Control; (▲) 0.6 mM of CdCl₂ only (▼); 0.6 mM of CdCl₂ + 250 mM of MgCl₂ (◆) 0.6 mM of CdCl₂ + 250 mM of CaCl₂. In some points, error bars (standard deviation) do not exceed the size of the symbol.

In *ycf1Δ* cells (Figure 4), which were exposed to Cd²⁺ with Ca²⁺ treatment, cellular viability was 50%, and the *ycf1Δ* cells grew less as compared to wild type cells submitted to the same treatment. Cd²⁺ treatment combined with magnesium increased 3 times viable cells concentration as compared to cells exposed to CdCl₂ only. It was observed that *ycf1Δ* cells acquired higher resistance to cadmium exposure. These findings confirm that Ca²⁺ and Mg²⁺ play a crucial role in conferring resistance to cadmium stress.

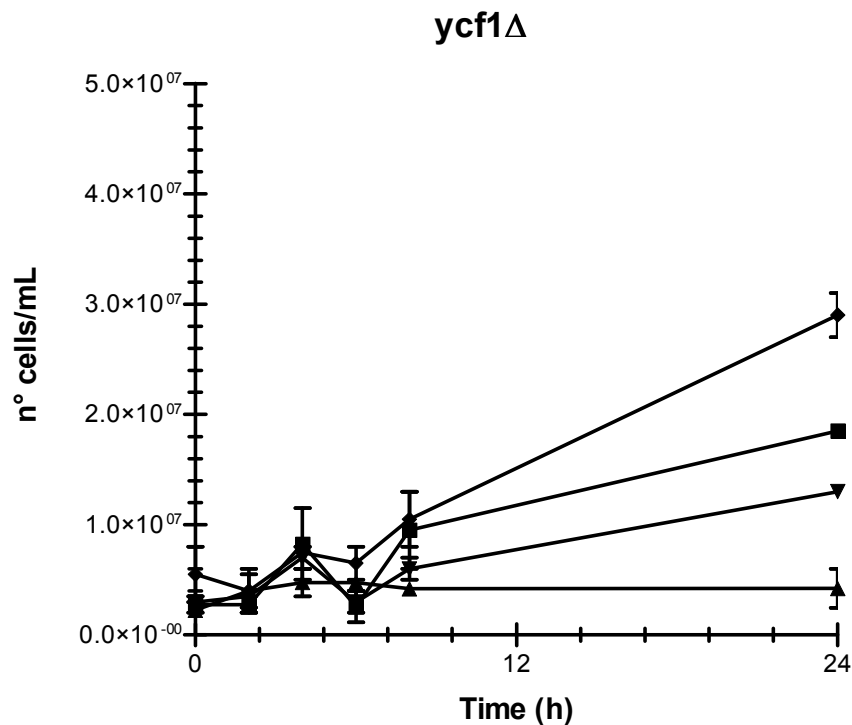


Figure 4. Protection of *ycf1*Δ strain by MgCl₂ and CaCl₂ against toxic effects of CdCl₂. (■) Control; (▲) 0.6 mM of CdCl₂ only (▼); 0.6 mM of CdCl₂ + 250 mM of MgCl₂ (◆) 0.6 mM of CdCl₂ + 250 mM of CaCl₂. In some points, error bars (standard deviation) do not exceed the size of the symbol.

Zrt1 protein, which is the transporter responsible for cadmium uptake mediation, was also evaluated under simultaneous exposure to cadmium and magnesium or calcium (Figure 5). The results showed that cellular viability was 50% in the cells exposed to CdCl₂ and CaCl₂ as compared to the control. In cells treated with Mg²⁺, cell viability was 45% after 24 h as compared to the control. The treatment with Ca²⁺ or Mg²⁺ showed a protective effect that was almost the same after 24-h exposure. However, cells exposed to CdCl₂ only had their growth inhibited during the time of exposure.

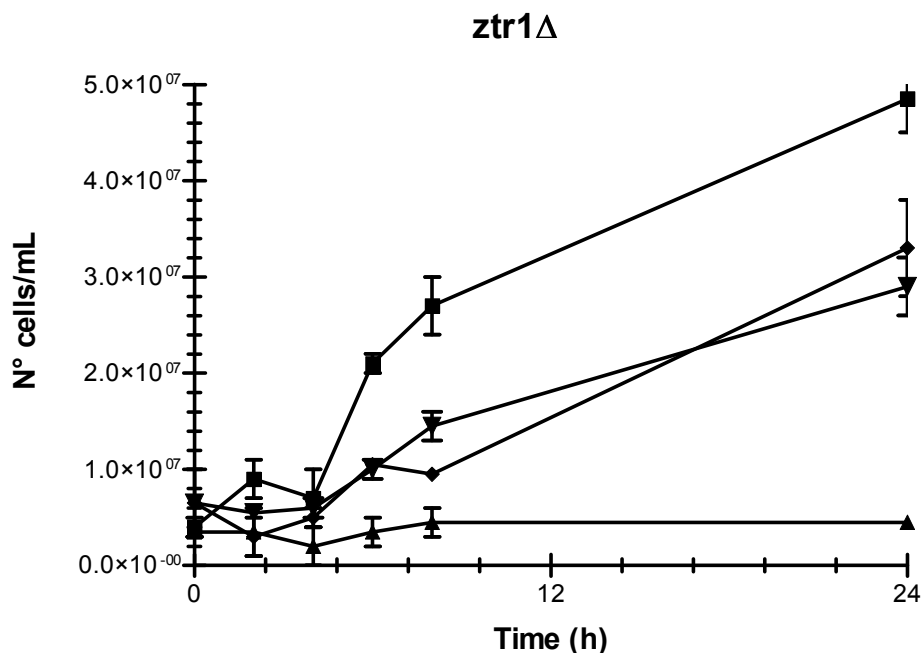


Figure 5. Protection of *ztr1Δ* strain by MgCl₂ and CaCl₂ against toxic effects of CdCl₂. (■) Control; (▲) 0.6 mM of CdCl₂ only (▼); 0.6 mM of CdCl₂ + 250 mM of MgCl₂ (◆) 0.6 mM of CdCl₂ + 250 mM of CaCl₂. In some points, error bars (standard deviation) do not exceed the size of the symbol.

In *gsh1Δ* cells treated with Ca²⁺ and exposed to Cd²⁺ (Figure 6), cell viability was 84%. Mg²⁺-treated cells presented 68% viability as compared to the control. However, the growth of cells exposed to CdCl₂ only was inhibited during the 24-h exposure time. The strain deficient in the synthesis of glutathione showed that both Ca²⁺ and Mg²⁺ had cytoprotective effect against Cd-induced toxicity or the toxicity potentiated by Cd + GSH deprivation. This result confirmed that the protective effect is not associated to the antioxidant defense system linked to glutathione.

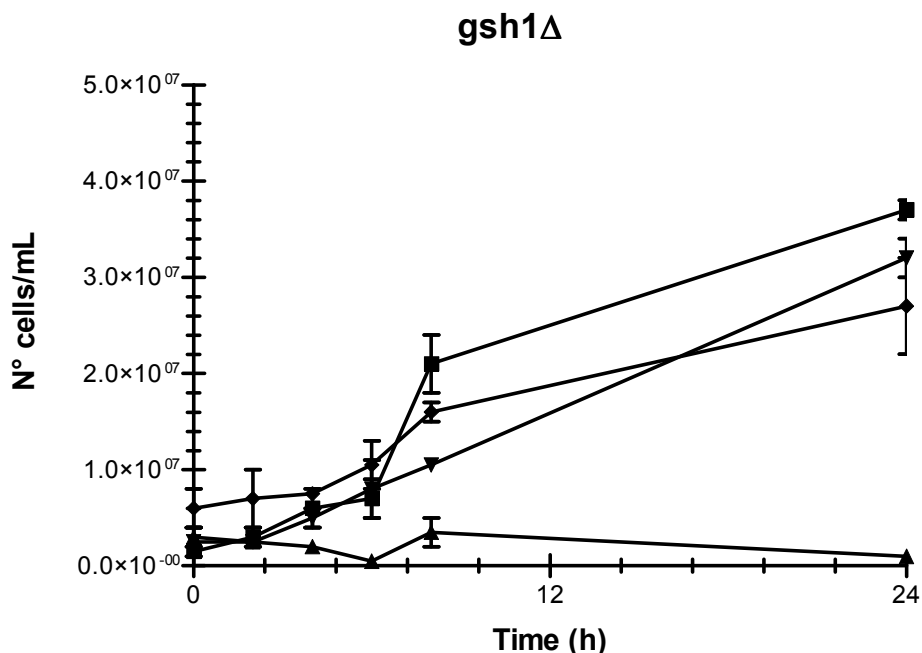


Figure 6. Protection of *gsh1Δ* strain by MgCl₂ and CaCl₂ against toxic effects of CdCl₂. (■) Control; (▲) 0.6 mM of CdCl₂ only (▼); 0.6 mM of CdCl₂ + 250 mM of MgCl₂ (◆) 0.6 mM of CdCl₂ + 250 mM of CaCl₂. In some points, error bars (standard deviation) do not exceed the size of the symbol.

To further understand the protective effect exerted by Mg²⁺ and Ca²⁺ in the control of cadmium homeostasis, we analyzed if the sensitivity of the studied strains to Cd²⁺ was related to an increase in the intracellular level of this ion in strains BY4741, *gsh1Δ*, *ycf1Δ*, *ztr1Δ*. We employed a multi-elemental method of analysis named particle-induced X-ray emission or PIXE.

3.2. PIXE assay of intracellular Cd²⁺ concentration

The results showed that both Ca²⁺ and Mg²⁺ ions had cytoprotective effect against Cd²⁺ toxicity in yeast strains (Figure 3-6). This suggests that these ions could change Cd²⁺ uptake or Cd²⁺ homeostasis. Considering this hypothesis, we compared Cd²⁺ levels in simultaneous treatment of yeast strains with Ca²⁺ and Mg²⁺ by applying the PIXE method, which allowed us to correlate the intracellular Cd²⁺ amount with its toxicity. In this sense, PIXE has been conventionally used to estimate metal contents in organic and inorganic materials [27,28]. For yeast cells, the stoichiometric ratio of intracellular metals was estimated considering cell density retained in the target and the metal density calculated from the PIXE results, expressed in ng/cm² (g of cells)⁻¹ dry weight.

Table 2. Stoichiometric analysis of cadmium by PIXE in *S. cerevisiae* cells.

Treatment \ Strain	A	B	C
	Cd ²⁺ content (ng/ cm ² / g of cell)	Cd ²⁺ content (ng/ cm ² / g of cell)	Cd ²⁺ content (ng/ cm ² / g of cell)
BY4741 (WT)	5389.1	541.2	707.1
<i>gsh1Δ</i>	6353.5	<LOD	<LOD
<i>ycf1Δ</i>	5424.5	<LOD	<LOD
<i>zrt1Δ</i>	7284.1	<LOD	<LOD

Cadmium content of yeast cells in different treatments. (A) Cells exposed to 0.6 mM CdCl₂; (B) Cells exposed to 0.6 mM CdCl₂ + 250 mM CaCl₂; (C) Cells exposed to 0.6 mM CdCl₂ + 250 mM MgCl₂. (<LOD) not present at limit of detection

PIXE results indicate that Cd²⁺ concentration is approximately 10-fold higher in strains exposed only to Cd²⁺ as compared to simultaneous exposure to CaCl₂ or MgCl₂ (Table 2). The study of wild type and mutant strains showed that uptake patterns were slightly different among the strains exposed to Cd²⁺. The strain *zrt1Δ* had the highest intracellular Cd²⁺ concentration in the tested strains. However, in PIXE, Cd²⁺ levels in simultaneous treatment with Ca²⁺ or Mg²⁺ were not present at limit of detection (LOD) in *gsh1Δ*, *ycf1Δ*, *zrt1Δ* strains. BY4741 in simultaneous treatment with Ca²⁺ or Mg²⁺ presented 10 times lower Cd²⁺ concentration as compared to Cd²⁺ exposure only. These data support our previous phenotypic results, indicating that strain sensitivity is due to an elevated intracellular Cd²⁺ content as compared with simultaneous exposure to CaCl₂ or MgCl₂. Although the modes of action of Cd²⁺ in cells remain to be elucidated, potential interactions of Cd²⁺ with Ca²⁺ and Mg²⁺ need more careful investigations.

3.3. Cadmium uptake

Little is known on how Cd²⁺ and other metal ions permeate cells. It was suggested that the manganese transport system with high affinity for Mn²⁺ is used for Cd²⁺ cellular uptake [29]. The transport system for Mn²⁺ is used for Cd²⁺ uptake in mammalian cells. The divalent metal transporter 1 (DMT1) is the only known mammalian transporter involved in the uptake of both Cd²⁺ and Mn²⁺. [29] or by a sulfhydryl-sensitive route [30, 31]. In excitable tissues, Cd²⁺ and Pb²⁺ may enter cells primarily by passing through voltage-sensitive calcium channels [32,33]. Also in bacteria, algae, and fungi, Cd²⁺ can be transported into the cells

through bivalent cation transporters [34]. Moreover, it was recently reported that Zrt1p is also responsible for the uptake of extracellular Cd^{2+} , with yeast *zrt1* mutants having low levels of intracellular Cd^{2+} [17]

3.4. Calcium and cadmium interaction

There is substantial evidence that Ca^{2+} and Cd^{2+} compete for binding sites in tissues such as gill or intestinal cells, [35]. Free Cd^{2+} ions have almost the same ionic radius as Ca^{2+} ions [36], and it is inevitable that Cd^{2+} ions will cross cell membranes via Ca^{2+} channels [37], and although Ca^{2+} transporters are the main entry route to Cd^{2+} , the opposite could also occur, i.e., the same mechanisms of the Ca^{2+} pump that control intracellular Ca^{2+} level may also be used as a Cd^{2+} efflux system. The protection provided by Ca^{2+} against Cd^{2+} possibly occurs by competing for Ca^{2+} channel access. Thus, an inhibitory effect protects the cells by limiting Cd^{2+} uptake. We can thus speculate that the rate of Cd^{2+} uptake by Ca^{2+} transporters decreases with increasing Ca^{2+} concentrations. In that case, the presence of 250 mM of CaCl_2 in CdCl_2 solution significantly decreased Cd^{2+} uptake in all strains of *S. cerevisiae*. Although the molar amount of Cd^{2+} was approximately 46 times lower than the amount of molar Ca^{2+} present in media, this is less than the amount of Cd^{2+} capable of inducing cell cycle arrest and cellular death. The biological effects of cadmium revealed that cadmium induced a delay in the transition from G1 to S phase of the cell cycle and slow progression through S phase [38].

3.5. Magnesium and cadmium interaction

Magnesium plays an important role in many biological processes. This element usually increases and stimulates protein synthesis through its effect on enzymes [39]. Magnesium protects the cell against oxyradical damage, and assists in the absorption and metabolism of B, C and E vitamins, which are important antioxidants for cell protection. Recent evidence suggests that vitamin E enhances glutathione levels, and may play a protective role in magnesium deficiency-induced cardiac lesions [40]. In fact, glutathione requires magnesium for its synthesis [41]. Glutathione synthetase requires B-glutamyl cysteine, glycine, ATP, and magnesium ions to form glutathione [42]. The authors argue that Mg^{2+} modulates selenium and GSH availability, and consequently selenium-dependent glutathione-peroxidase (GPX) activity. These data could account for the protective effect of Mg against Cd^{2+} -induced oxidative stress. In tests, the presence of a Se-independent form of

GPX, which was shown to be unaffected by Mg^{2+} [43], could explain the lack of the protective effect of Mg^{2+} in Cd^{2+} -induced lipid peroxidation [44]. However, the results of the present study (Figure 6) showed that both Ca^{2+} and Mg^{2+} produced cytoprotective effect against Cd^{2+} toxicity potentiated by Cd + GSH deprivation in a strain deficient in glutathione synthesis. This confirms that the protective effect is not associated to the antioxidant defense system linked to glutathione.

Interference of magnesium on cadmium effect was also tested in order to determine the effects of competition between Mg^{2+} and Cd^{2+} for Mg^{2+} ions transporting proteins, as it was shown that bivalent cations with an ionic radius of about 0.65-0.99 Å are effective stimulators of myofibrils ATPase activity [45]. There are still huge gaps in our knowledge of Mg^{2+} homeostasis in cells. For example, even in the yeast *S. cerevisiae*, for which all of the genes have been sequenced, only the genes that are important for the movement of Mg^{2+} into the cell are currently identified. Furthermore, we have no information on the control of Mg^{2+} storage, and only minimal information on the regulation of Mg^{2+} homeostasis in general.

4. Conclusions

The present study provided evidence that Mg^{2+} and Ca^{2+} interfere in the uptake of Cd^{2+} . The results reported here suggest a competition between Ca^{2+} , Mg^{2+} and Cd^{2+} . Moreover, Ca^{2+} channels represent one way of entry of Cd^{2+} , and the interference of Mg^{2+} on Cd^{2+} effect could stimulate the ATPase activity. In summary, we demonstrated that Ca^{2+} and Mg^{2+} increase cell viability in Cd-induced toxicity. Further studies are required to fully understand the complexity of Ca^{2+} homeostasis in *S. cerevisiae* cells, the interactions of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Cd^{2+} in Ca^{2+} -ATPase transporters. The biochemical and biological functions of these individual transporter proteins, specifically monitoring changes in gene expression during Cd^{2+} stress need to be analyzed.

References

- [1] Godt, J. Scheidig, F. Grosse-Siestrup, C. Esche, V. Brandenburg, P. Reich, A. and Groneberg, D. A. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupat. Med. Toxicol.* 22:1-6; 2006,
- [2] Limaye, D. A.; Shaikh, Z. A. Cytotoxicity of cadmium and characteristics of its transport in cardiomyocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154:59–66; 1999.
- [3] Tzirogiannis, K. N. Panoutsopoulos, G. I. Demonakou, M. D.; Hereti, R. I.; Alexandropoulou, K. N. Basayannis, A. C. and Mykoniatis, M. G. Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis. *Arch. Toxicol.* 77:694–701; 2003.
- [4] Antonio, M. T. Corpas, I. Leret, M. L. Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicol. Lett.* 104:1– 9; 1999.
- [5] Gupta, A. Gupta, A. Murthy, R. C. Chandra, S. V. Neurochemical changes in developing rat brain after pre- and postnatal cadmium exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51:12–17; 1993.
- [6] Gerhardsson, L. Englyst, V. Lundstrom, N. G. Sandberg, S. Nordberg, G. Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 16:261– 266; 2002.
- [7] Beyersmann, D. Hechtenberg, S. Cadmium, gene regulation, and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:247–261; 1997.
- [8] Hussain, T. Shukla, G. S. Chandra, S. V. Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and in vitro studies. *Pharmacol. Toxicol.* 60:355-358; 1987.
- [9] Shaikh, Z. A. Vu, T. T. Zaman, K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154:256-263; 1999.
- [10] Waalkes, M. P. Infante, P. Huff, J. The scientific fallacy of route specificity of carcinogenesis with particular reference to cadmium. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 20:119-121; 1994.
- [11] Uchida, M. Teranishi, H. Aoshima, K. Katoh, T. Kasuya, M. Inadera, H. Elevated urinary levels of vitamin D-binding protein in the inhabitants of a cadmium polluted area, jinzu river basin, Japan. *Tohoku J Exp. Med.* 211:269-74; 2007.

- [12] Kurek, E. Czaban, J. Bollag, J. M. Sorption of Cadmium by Microorganisms in Competition with Other Soil Constituents. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 n.5:1011-1015; 1982.
- [13] Hyo-Bong, H. Lewis, R. B. Jong-kyu K. Effect of zinc and calcium on intracellularly uptake of cadmium and growth of *Escherichia coli*. *Jour. Microbiol.* 302-306; 1995.
- [14] Michibata, H. Sahara, S. Kojima, M. K. Effects of calcium and magnesium ions on the toxicity of cadmium to the egg of the teleost, *Oryzias latipes*. *Environmental Research.* 40: 110-114; 1986.
- [15] Djukic-Cosic, D. Ninkovic, M. Malicevic, Z. Plamenac-Bulat, Z. Matovic, V. Effect of supplemental magnesium on the kidney levels of cadmium, zinc, and copper of mice exposed to toxic levels of cadmium. *Biol. Trace Elem. Res.* 114:281-91; 2006.
- [16] El-Sharaky, A. S., Newairy, A. A., Badreldeen, M. M. Eweda, S. M. Sheweita, S. A. Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats. *Toxicology.* 3:185- 93; 2007.
- [17] D. S. Gomes, L. C. Fragoso, C.J. Riger, A. D. Panek, E.C.A. Eleutherio. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1573:21– 25; 2002.
- [18] Vatamaniuk, O. K. Bucher, E. A. Ward, J. T. Rea, P. A. A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 276:20817– 20820; 2001
- [19] Cobbett, C. S. Phytochelatin and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiol.* 123:825– 832; 2000.
- [20] Cousins, R. J. Liuzzi, J. P. Lichten, L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J. Biol. Chem.* 281(34):24085-24089; 2006.
- [21] Li, Z. Lu, Y. Zhen, R. Szczycka, M. Thiele, D. Rea, P. A. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:42– 47; 1997.
- [22] Szczycka, M. 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. *J. Biol. Chem.* 269:22853– 22857; 1994.
- [23] Smart, K. Chambers, K. Lambert, I. Jenkins, C. Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57:18–23; 1999.

- [24] Teparic, R. Stuparevic, I. Mrsa, V. Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology* 150:3145–3150; 2004.
- [25] Viau, C. M. Yoneama, M. L. Dias, J. F. Pungartnik, C. Brendel, M. Henriques, J. A. P. Detection and quantitative determination by PIXE of the mutagen Sn²⁺ in yeast cells. *Beam Interactions with Materials & Atoms*. 2006.
- [26] Maxwell, J. A. Campbell, J. L. Teesdale, W. J. The GUELPH PIXE software package. *Nucl. Instrum. Meth. B.* 43:218-230; 1989.
- [27] Przybylowicz, W. J. Przybylowicz, J. M. Migula, P. Glowacka, E. Nakonieczny, M. Augustyniak, M. 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; 2003.
- [28] Kozai, N. Ohnuki, T. Komarneni, S. Uptake of cadmium by synthetic mica and apatite: observation by micro-PIXE, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 21:513-518; 2003.
- [29] Himeno, S. Yanagiya, T. Enomoto, S. Kondo, Y. Imura, N. Cellular cadmium uptake mediated by the transport system for manganese. *Tohoku J Exp Med.* 196(1):43-50; 2002.
- [30] Gerson, R. J. Shaikh, Z. A. Uptake and binding of cadmium and mercury to metallothionein in rat hepatocyte primary cultures. *Biochem J.* 208(2):465-72; 1982.
- [31] Hinkle, P. M. Kinsella, P. A. Osterhoudt, K. C. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium. *J. Biol.Chem.* 262(34):16333-16337; 1987
- [32] Bull, P.C. Cox, D. W. Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet.* 10:246–252; 1994.
- [33] Ballatori, N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ. Health Perspect.* 110(5):689-694; 2002.
- [34] Trevors, J. T. Stratton, G. W. Gadd, G. M. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32:447– 464; 1986.
- [35] Baldisserotto, B. Kamunde, C. Matsuo, A. Wood, C. M. A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 67:57-73; 2004.
- [36] Williams, R. J. P. Frausto da Silva, J. R. *The Natural Selection of the Chemical Elements.* Clarendon Press, Oxford.1996
- [37] Simkiss, K. Taylor, M. G. Transport of metals across membranes. *Metal Speciation and Aquatic Systems.*1–44; 1995.
- Rainbow, P. S. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Est. Cstl. Shell Sci.* 44:169–175; 1997.

- [38] James, L. Ning-Yuan S. Y. Kaiser, P. The Yeast Ubiquitin Ligase SCF^{Met30} Regulates Heavy Metal Response. *Mol. Biol. Cell* 16:1872–1882; 2005.
- [39] Lesko, K. and Simon-Sarkadi, L. Effect of cadmium stress on amino acid and polyamine content of wheat seedling. *Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.* 46:65–71; 2002.
- [40] Barbagallo, M. Dominguez, L. J. Tagliamonte, M. R. Resnick, L. M. Paolisso, G. Effects of Vitamin E and Glutathione on Glucose Metabolism: Role of Magnesium. *Hypertension* 34:1002-1006; 1999.
- [41] Linus Pauling Institute
<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/magnesium/index.html#function>
- [42] Minnich, V. Smith, M. B. Brauner, M. J. and Majerus, P. W. Glutathione biosynthesis in human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 50(3):507–513; 1971.
- [43] Vernet, P. Britan, A. Gueux, E. Mazur, A. Drevet J. R. Dietary magnesium depletion does not promote oxidative stress but targets apical cells within the mouse caput epididymis. *Biochem. Biophys. Acta* 1675:32–45; 2004.
- [44] Boujelben, M. Ghorbel, F. V. Makni-Ayadi, F. Guermazi, F. Croute, F. El-Feki, F. Lipid peroxidation and HSP72/73 expression in rat following cadmium chloride administration: Interactions of magnesium supplementation *Experimental and Toxicologic. Pathology* 57:437–443;
- [45] Schaub, M. C. and Ermini, M. Effect of Bivalent Cations on the Adenosine Triphosphatase of Actomyosin and its Modification by Tropomyosin and Troponin. *Biochem. J.* 111:777-783; 1969.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, CAPES-PROCAD and Instituto de Educação para pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Royal, Unidade GENOTOX-ROYAL, Centro de Biotecnologia - UFRGS.

- CAPÍTULO II -

**The Pmr1 protein, the major yeast Ca²⁺-ATPase of Golgi, regulates the
intracellular levels of cadmium ion**

Artigo submetido Cell Calcium

The Pmr1 protein, the major yeast Ca²⁺-ATPase of Golgi, regulates the intracellular levels of cadmium ion

Cláudio Marcos Lauer Júnior¹, Diego Bonatto², Albanin Aparecida Mielniczki-Pereira¹, Ana Zilles Schuch¹, Johnny Ferraz Dias³, Maria-Lúcia Yoneama³, João Antonio Pêgas Henriques^{1,2,*}

¹Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

²Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, Bloco 57, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.

³Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

Short title: Cd²⁺ detoxification by Pmr1p.

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

João Antonio Pêgas Henriques

Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, UFRGS,
Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brazil, 91507-970.

Telephone: 55-51-3308-7602; Fax: 55-51-3308-6084.

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

Contract/grant sponsor: FAPERGS, CAPES, GENOTOX-ROYAL.

Abstract

Cadmium ion (Cd^{2+}) is a non-essential, highly toxic heavy metal that shows similar ionic properties when compared to calcium ion (Ca^{2+}). These ionic similarities imply that Cd^{2+} is a Ca^{2+} -agonist, using the same biochemical pathways needed for Ca^{2+} homeostasis. In this sense, the Ca^{2+} -ATPases proteins are crucial to maintain the Ca^{2+} homeostasis. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the *PMCI* and *PMRI* genes codify for vacuolar and Golgi Ca^{2+} -ATPases, respectively, where Pmc1p belongs to the major route of Ca^{2+} and Mn^{2+} homeostasis. Thus, the present study investigates the importance of Pmc1p and Pmr1p for Cd^{2+} cellular detoxification and/or tolerance. Using standard techniques of yeast molecular research and a multi-elemental procedure named particle-induced X-ray emission (PIXE), it was possible to identify Pmr1 as a protein that directly participates in the detoxification of Cd^{2+} , possibly using the secretory pathway. The results allowed us to draw a model of Cd^{2+} detoxification where Pmr1p has a central role in cell survival in a Cd^{2+} -rich environment.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Pmr1p; Secretory pathway, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPases; Cadmium; PIXE.

1. Introduction

Ca^{2+} is an essential nutrient that plays a key role in the transduction of external signals through the cytoplasm of eukaryotic cells. Fluctuations in the cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) directly elicit a cellular response by altering the functions of Ca^{2+} -binding proteins and their targets [1]. A variety of stimuli can trigger the opening of Ca^{2+} -specific channels in plasma membrane or endoplasmic reticulum causing massive Ca^{2+} influx and accumulation in the cytoplasm. After stimulation, the 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 and several internal membranes. To regulate $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and induce the appropriate responses to Ca^{2+} signals, cells utilize a wide array of ion transporters and sensory factors [2].

Until now, a relatively small number of Ca^{2+} transporters appear to maintain the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Some of these Ca^{2+} transporters are: the vacuolar Ca^{2+} -ATPase Pmc1p [2]; the vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchanger Vcx1p/Hum1p [3,4]; the endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} -ATPase Cod1p/Spf1p [5-8]; and the Golgi Ca^{2+} -ATPase Pmr1p [9,10]. 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+} at 50 to 200 nM even when the environmental concentrations of this ion range from 1 mM to 100 mM [11-15].

Considering that two of four proteins responsible for yeast $[\text{Ca}^{2+}]_c$ homeostasis are located in the vacuole, it is not surprising that this organelle is the major Ca^{2+} storage and normally contains more than 95% of the total cellular Ca^{2+} [13,14]. Interestingly, it was shown that the loss of Pmr1p causes an increased sensitivity to high environmental Ca^{2+} levels when vacuolar Ca^{2+} transport is compromised, indicating that the Golgi apparatus also plays an important role in Ca^{2+} sequestration and exit from the cell [15-17]. In this sense, the Pmr1 protein was the first member of the secretory pathway of Ca^{2+} -ATPases (SPCA) identified in eukaryotes [18,19]. In humans, mutations in the Pmr1-homologous protein SPCA1 cause the acantholytic skin condition called Hailey–Hailey disease or HHD [20,21].

It is well known that some heavy metals like Al^{3+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , and Cd^{2+} may interact metabolically with Ca^{2+} . Cd^{2+} competes with Ca^{2+} in the nervous system and impairs the cognitive development. Moreover, Cd^{2+} interacts with Ca^{2+} in the skeletal system to produce osteodystrophies [22,23] and induces lung, kidney, prostate and testicular cancers in murine models [24]. Human epidemiological data suggest that Cd^{2+} causes tumors of the male reproductive system and induces respiratory tumors [25].

Despite all physiological information accumulated about the effects of Cd^{2+} in biological systems, the cellular routes for uptake from environment are not well understood. In this sense, it has been shown that Cd^{2+} could be captured and internalized through Ca^{2+} channels of the cytoplasmic membranes [26], which could be explained when we consider that both Ca^{2+} and Cd^{2+} have similar ionic radii [27]. Thus, considering the cellular mechanisms of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ homeostasis, it might be possible that Golgi could have a role on Cd^{2+} detoxification. In the current study, we examined how Cd^{2+} affects the phenotype of proficient and deficient yeast strains for *PMRI* gene. For this purpose, we used established techniques of yeast cytotoxicity assays to access the Cd^{2+} -induced sensitivity of these yeast strains. We also analysed the intracellular concentration of Cd^{2+} employing the multi-elemental technique named particle-induced X-ray emission (PIXE), which allows to estimate and quantify metals present in biological samples.

2. 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. (Calsbad, CA).

2.1. 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 [2]. Yeast was routinely grown on synthetic complete (SynCo) medium (0.17 g L^{-1} of yeast nitrogen base w/o amino acids and w/o ammonium sulfate, 65 g L^{-1} of ammonium sulfate, and 20 g L^{-1} of glucose with appropriate amino acids or/and 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 p*PMRI* were grown in SynCo minus uracil (SynCo-ura) medium.

Escherichia coli strain XL1-Blue (Table 1) was used as recipient for cloning procedures and was grown in 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 $150 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Techniques for yeast genetics were made according to Rose *et al.* [28]. Standard molecular procedures for yeast and *E. coli* transformation, plasmid isolation and DNA

manipulation were performed as described by Sambrook *et al.* [29] and Ausubel *et al.* [30]. The bi-functional, yeast-*E. coli* centromeric vector YCpLac33 [31] was employed for yeast transformation and *PMR1* cloning.

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

Organisms	Strains	Genotypes	Sources
<i>S. cerevisiae</i>			
	W303	<i>Mata ade2-1 his3-11 leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 can1-100</i>	[2]
	W303T	W303; YCpLac33	This study
	K605	<i>Mata ade2-1 his3-11 leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 can1-100 pmc1::TRP1</i>	[2]
	K610	<i>Mata his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 ura3-1 trp1-1 can1-100 pmr1::TRP1</i>	[2]
	CML100	K610; YcpLac33	This study
	CML200	K610; p <i>PMR1</i>	This study
<i>E. coli</i>	XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]</i>	Invitrogen

2.2. Yeast *PMR1* gene cloning and analysis

The *PMR1* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the phenol-chloroform purified genomic DNA of yeast W303 (Table 1) as a template. For PCR amplification, the proofreading *Pfx* enzyme was employed in order to avoid the introduction of mutations in *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),

antisense primer (5'-GGG CCC CAA GCT TGG TCT CTT TGT AAA GTT GAG AAT-3'). The underline in both sense and antisense primers indicates the restriction sites for *KpnI* and *XmaI* enzymes, respectively. Once amplified, the product was digested with *KpnI* and *XmaI*, gel purified, and the resulting fragment was cloned into plasmid YCpLac33. The *PMRI*-YCpLac33 plasmid was named p*PMRI*, and the presence of insert was confirmed by both double-digestion of p*PMRI* with *KpnI* and *XmaI* and by PCR amplification, followed by direct agarose gel analysis of *PMRI* fragment.

2.3. Yeast Cd²⁺ sensitivity assay by drop test

The Cd²⁺ sensitivity of yeast strains was determined by the drop test standard technique. In this case, yeast cultures in an early stationary phase of growth (1×10^8 cells mL⁻¹) were obtained after 2 d of growth in SynCo or SynCo-ura media at 30 °C. The yeast cultures were serially diluted (1:10 steps) in 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. Plates were photographed after 2 d of growth at 30 °C.

2.4. Yeast survival curves

Yeast cells from an early stationary phase (1×10^8 cells mL⁻¹) were re-inoculated in SynCo-ura medium containing different concentrations of CdCl₂ (from 20 µM to 160 µM) at final cellular concentration of 5×10^6 cells mL⁻¹. The yeast cultures were incubated for 24 h in shaker (180 rpm) 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 d for colony counting. The data for survival curve were obtained from three independent measurements.

2.5. Particle-Induced X-ray Emission (PIXE)

The target preparation for PIXE analysis consisted of growing the cells in plate cultures for 7 d at 30°C, followed by its scrap and suspension with sterile double-distilled water. The yeast cells were harvested by centrifugation, 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. CdCl_2 was added to the medium at a final concentration of 100 μM and the cultures were incubated at 30 °C for 24 h. After this period of incubation, the yeast cultures were harvested by centrifugation, washed three times with sterile ultrapure water, freeze-dried, crushed and pressed into pellets [32]. Two independent rounds of sample preparations and PIXE analysis were carried out. The average weight of the pellets was 0.085 g.

The PIXE analysis was carried out at the 3 MV Tandetron 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 ηA . The acquisition time for each sample was in the order of 10-20 min. The beam spot at the target position was about 9 mm^2 . The targets containing the yeast cells, the blank target, 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 detected by an HPGe detector from EG&G (GLP series, EG&G Ortec, CA, USA), with an energy resolution of 180 eV at 5.9 keV. The detector was positioned at 45° with respect to the beam axis. The electronics consisted of a Telenec245 amplifier associated with a PCA3 multi-channel analyzer (Oxford Instruments, TN, USA) running in a PC-compatible computer. The GUPIX code [33] was used for data analysis. The standardization procedure was carried out using a bovine liver standard from NIST (SRM –1577b) [32].

3. Results and discussion

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

With the purpose to analyse the sensitivity of yeast strains proficient and deficient in vacuolar and Golgi Ca^{2+} -ATPases (Table 1), we employed the drop test assay (Figs. 1A and 1B), 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 harbors the *pmr1* Δ mutation (Table 1), had the highest sensitivity to CdCl_2 at a final concentration of 0.02 mM (Fig. 1A). On the other hand, both strains W303 (WT; Table 1) and

K605 (*pmc1Δ*; Table 1) showed the same level of tolerance to CdCl₂ at 0.02 mM (Fig. 1A). In order to confirm that the mutation *pmr1Δ* is responsible for Cd²⁺ sensitivity, we transformed the strain K610 with a centromeric plasmid carrying the complete yeast *PMR1* gene (*pPMR1*) amplified by PCR (strain CML200; Table 1). In addition, W303 and K610 strains were also transformed with the empty vector YCpLac33 (W303T and CML100, respectively; Table 1) to be used as negative control. As expected, the CML200 strain (which contains a fully functional copy of *PMR1*) shows similar WT-level of sensitivity when compared to strain W303T (Fig. 1B). By its turn, the CML100 strain (harboring the empty vector YCpLac33) is highly sensitive to CdCl₂ for the same conditions of treatment (Fig. 1B).

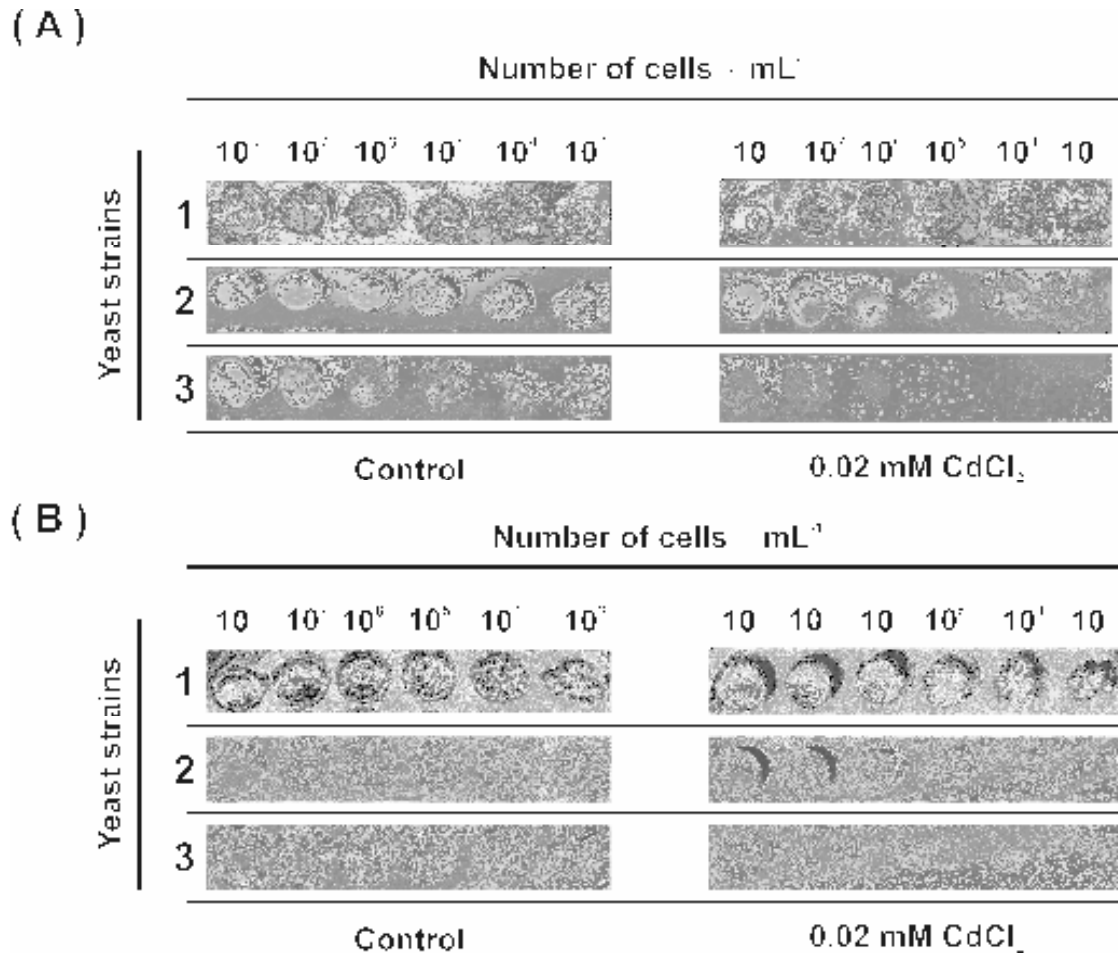


Figure 1. Sensitivity of *S. cerevisiae* to CdCl₂ (chronic exposure, Cd in the solid medium). **Panel (A)**, control (no CdCl₂) and 0.02 mM CdCl₂ added. The number of cells per mL used in the drop test varied from 10⁸ to 10³. Yeast strains: (1) W303; (2) K605; and (3) K610. **Panel (B)**, control (no CdCl₂) and 0.02 mM CdCl₂ added. Yeast strains: (1) W303T; (2) CML200; and (3) CML100.

It is interesting to note that the Pmr1 protein belongs to the yeast SPCAs family, which are a group of Mn^{2+} and Ca^{2+} transporting P-type ATPases, located at the Golgi apparatus [34,35]. These proteins are responsible for high affinity transport of Mn^{2+} and Ca^{2+} into the Golgi, where these ions are sequestered and effectively removed from the cytoplasm [36]. Members of this family have been identified in the genomes of diverse organisms, including *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, and *Homo sapiens*. In *S. cerevisiae*, the Pmr1p has distinct biochemical characteristics, which clearly separate this protein from the well-studied mammalian sarcoendoplasmic reticulum (SERCA) and plasma membrane (PMCA) Ca^{2+} -ATPases [19,37]. In the past few years, the yeast Pmr1p has received more attention due to the recognition that its mutated human homologue, hSPCA1, is responsible for the chronic benign pemphigus or Hailey–Hailey disease (HHD) [20,21].

To confirm the results obtained by drop test, we performed a survival curve with yeast strains W303T, CML100 and CML200 submitted for 24 h to increasing doses of Cd^{2+} . The data of survival curve clearly show that all strains with a functional copy of *PMR1* gene are resistant to Cd^{2+} doses from 20 μM to 160 μM (W303T and CML200 strains; Fig 2). On the other hand, the strain harboring the *pmr1* Δ mutation shows sensitivity to the lowest dose of $CdCl_2$ (CML100; Fig. 2). It should be noted that, despite the sensitivity of CML100 strain to $CdCl_2$ when compared to WT strain, there is not a dose-response effect for an increase of $CdCl_2$ concentration in the culture medium. This effect could be explained by the activation of other mechanisms related to Ca^{2+} homeostasis when the intracellular levels of Cd^{2+} surpass a determined threshold.

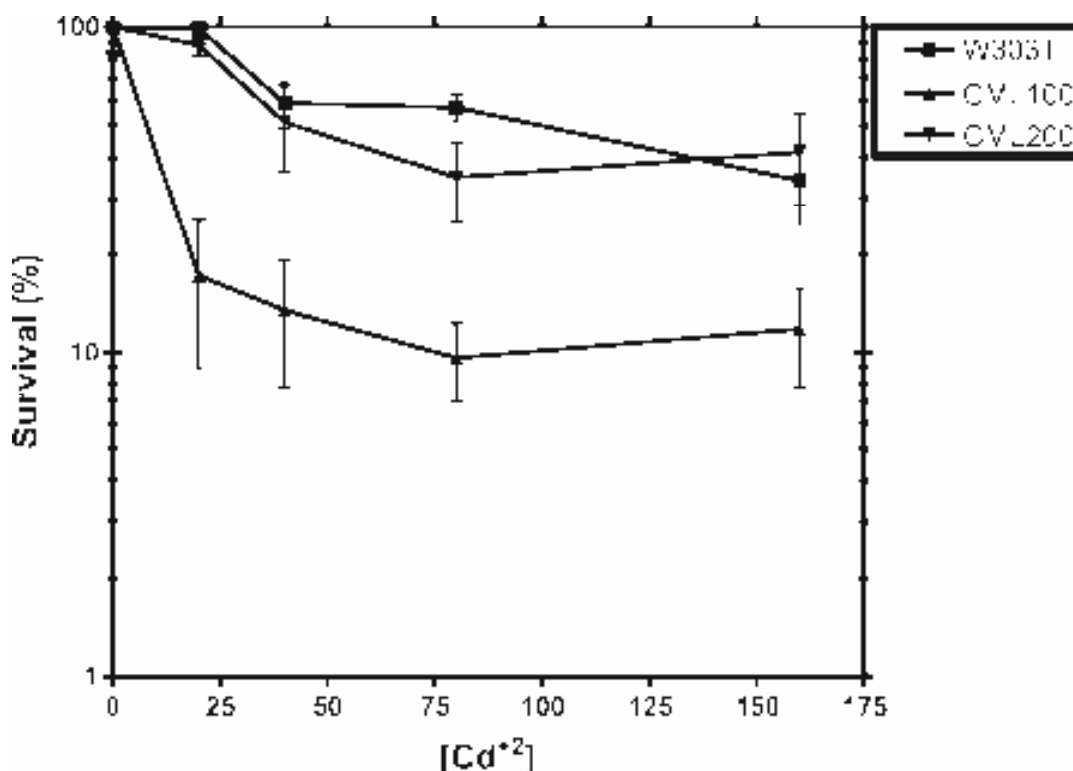


Figure 2. Sensitivity of proficient and deficient PMR1 yeast strains to different concentrations of CdCl₂. The name of yeast strains employed is described in the inset. The data represent an average of three independent experiments.

It is noteworthy to mention that Cd²⁺ is an element with restricted biological function [38], and is a heavy metal. A characteristic feature of Cd²⁺ is its ability to act not only as a dithiol reagent but also as a Ca²⁺ agonist, due to the extreme closeness of ionic radii of both bivalent metal ions [39]. Cd²⁺ can also be absorbed leading to toxic intracellular concentrations. In this sense, the high affinity Zn²⁺ uptake system, characterized by *ZRT1* gene, is also responsible for the uptake of extracellular Cd²⁺, having the yeast *zrt1* mutants low levels of intracellular Cd²⁺ [40]. Cd²⁺ is accumulated intracellularly due to its binding to cytoplasmic and nuclear material and, at elevated concentrations, it inhibits the biosynthesis of nucleic acids and proteins, and induces lipid peroxidation. Recently, it was proposed that Cd²⁺ can bind to DNA bases with little sequence specificity, inducing DNA single-strand breaks and a strong inhibition of the DNA mismatch repair pathway [41].

Thus, in order to evaluate if the sensibility of strain *pmr1Δ* to Cd²⁺ is related to an increase in the intracellular level of this ion, we employed a multi-elemental method of analysis known as particle-induced X-ray emission or PIXE.

3.2. PIXE assay of intracellular Cd²⁺ concentration

The phenotypic results of Cd²⁺ toxicity in yeast strains proficient and deficient in Pmr1p (Figs. 1 and 2) may suggest that Cd²⁺ is not being detoxified by *pmr1*Δ mutant. Considering this hypothesis, we compared the levels of Cd²⁺ in W303T, CML100, and CML200 strains (Table 1) applying the PIXE method, which allowed us to correlate the intracellular quantity of Cd²⁺ with its toxicity. In this sense, PIXE has been conventionally used to estimate metal contents in organic and inorganic materials [42,43]. For yeast cells, the stoichiometric ratio of intracellular metals was estimated considering the cell density retained in the target, and the metal quantity calculated from the PIXE results and expressed as ppm × g⁻¹ cell dry weight.

The PIXE results indicate that [Cd²⁺]_c is approximately 3-fold higher in the CML100 strain [4.37 ppm × g⁻¹ cell dry weight] than in both W303T [1.62 ppm × g⁻¹ cell dry weight] and CML200 [1.54 ppm × g⁻¹ cell dry weight] (Fig. 3). This data support our previous phenotypic results, indicating that the sensitivity of *pmr1*Δ mutant is due to an elevated intracellular Cd²⁺ content as compared to WT cells.

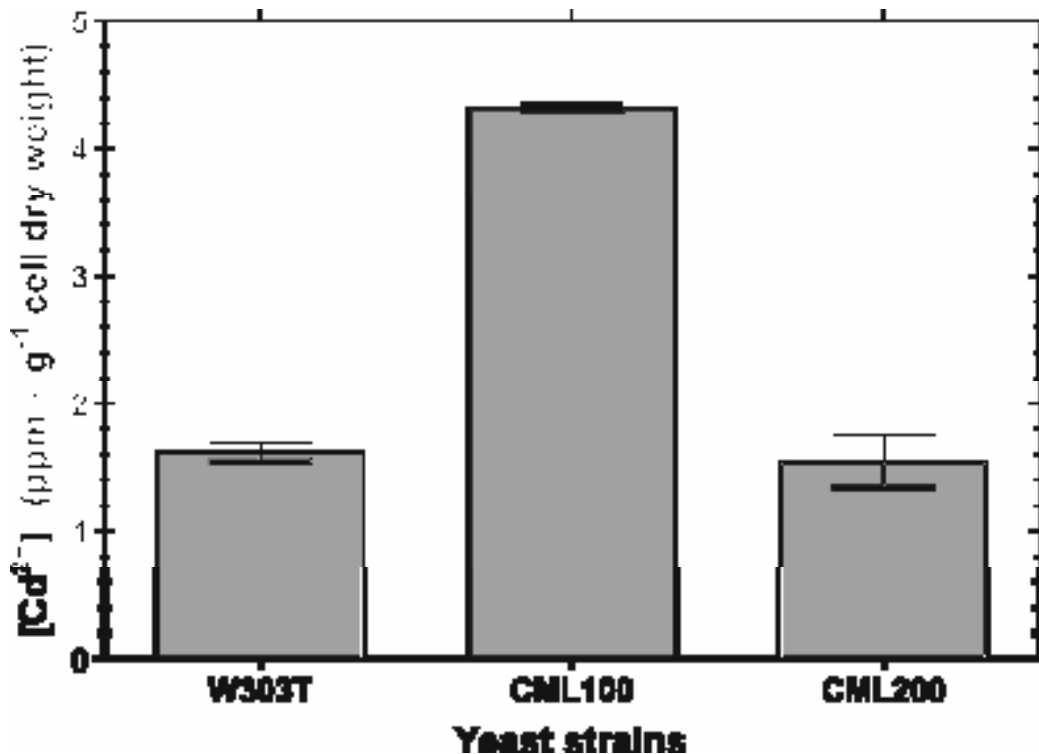


Figure 3. Cytoplasmic Cd²⁺ content ([Cd²⁺]_c) of yeast cells, proficient and deficient in Pmr1 protein, as analysed by the particle induced X-ray emission (PIXE) technique. The data was obtained from two independent experiments.

Interestingly, some studies showed that yeast *pmr1* Δ strain lacks the ability to properly maintain the normal Ca^{2+} and Mn^{2+} levels in compartments of the secretory pathway. This Ca^{2+} transport defect leads to an increased rate of Ca^{2+} uptake and accumulation by a mechanism that has many characteristics similar to the capacitative Ca^{2+} entry (CCE) response in non-excitabile mammalian cells [44-46]. Moreover, the Pmr1p is also the major route for eliminating toxic Mn^{2+} and mutant cells lacking Pmr1p are exquisitely sensitive to Mn^{2+} toxicity, accumulating very high levels of this metal ion in the cytosol [35,47,48]. It was postulated that the excess of Mn^{2+} that is pumped into the Golgi by Pmr1p proceeds to exit by secretory vesicles that merge within the cell surface and release the Mn^{2+} contents back into the extracellular environment [49]. In addition to its role on Mn^{2+} detoxification, the Golgi apparatus acts in the transport of Ca^{2+} into the exocrine fluid, a nutritional physiological process found in mammary epithelia for milk synthesis. It was reported that the Ca^{2+} concentration in rabbit milk can approach 100 mM [50], which is approximately a million times higher than the level of free Ca^{2+} inside the cell and 50 times higher than total Ca^{2+} in the blood. The human milk also contains a large amount of Ca^{2+} , with the level around 12 mM [51]. The Ca^{2+} secretion needed for milk synthesis occurs synchronously with the secretion of casein and lactose, an indicative that the transport occurs via Golgi-derived secretory vesicles [52]. Ca^{2+} is also released in millimolar concentrations from stimulated pancreas to produce pancreatic juice mainly via exocytosis [53,54]. Considering the similar ionic properties of Ca^{2+} and Cd^{2+} [55-57], and the results obtained in this work with yeast cells mutant for Pmr1p, it is not surprising that the proteins of Golgi complex associated with Ca^{2+} homeostasis could have an important role on Cd^{2+} detoxification.

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

Taking into account the results of this work, it is possible to suggest a model of intracellular control of Cd^{2+} level by Pmr1p. When a WT cell faces a Cd^{2+} -containing environment (Fig. 4A), some cytoplasmatic transmembrane pumps (e.g Ca^{2+} transporters) take up Cd^{2+} that can promptly react with two molecules of glutathione (GSH) inside the cell, generating bis(glutathionate)cadmium [(GS) $_2$ Cd]. Once formed, vacuolar transmembrane proteins (e.g Ycf1p) bind the [(GS) $_2$ Cd] conjugate and sequester it into the vacuole (Fig. 4A). The Ycf1 protein is a *S. cerevisiae* ATP-binding cassette (ABC) that has the capability to transport glutathione-conjugates to vacuole [58] and mutations in this protein render the yeast cells hypersensitive to Cd^{2+} at high doses when compared to the concentrations used for

*pmr1*Δ strain [59]. However, as observed in our work, the inability of a *pmr1*Δ strain to manage the excess of intracellular Cd²⁺ could be explained by the fact that Golgi is necessary to induce the formation of Cd²⁺-rich vesicles that exit the cell via the secretory pathway (Fig. 4B). In this case, the deficiency of exocytosis pathway mediated by the absence of Pmr1p increases the intracellular pool of Cd²⁺ and [(GS)₂Cd] in *S. cerevisiae*, leading to the vacuolar saturation with Cd²⁺ and [(GS)₂Cd], followed by the inhibition of thiol-dependent redox systems (Fig. 4B) [60]. Without Pmr1p to capture the excess of intracellular Cd²⁺, all biochemical systems become unstable [41]. In particular, the DNA mismatch repair system (MMR; Fig. 4B) is strongly inhibited by Cd²⁺ [41], leading to the accumulation of oxidized nucleotide residues in mitochondrial and nuclear genomes (Fig. 4B). Ultimately, an elevated generation of reactive oxygen species by thiol depletion associated with functional alterations in DNA repair systems result in the activation of DNA nucleases and caspase-related proteases, culminating in cellular death by apoptosis [61,62]. More biochemical experiments are being conducted in yeast cells in order to refine our model of Cd²⁺ detoxification by Pmr1p.

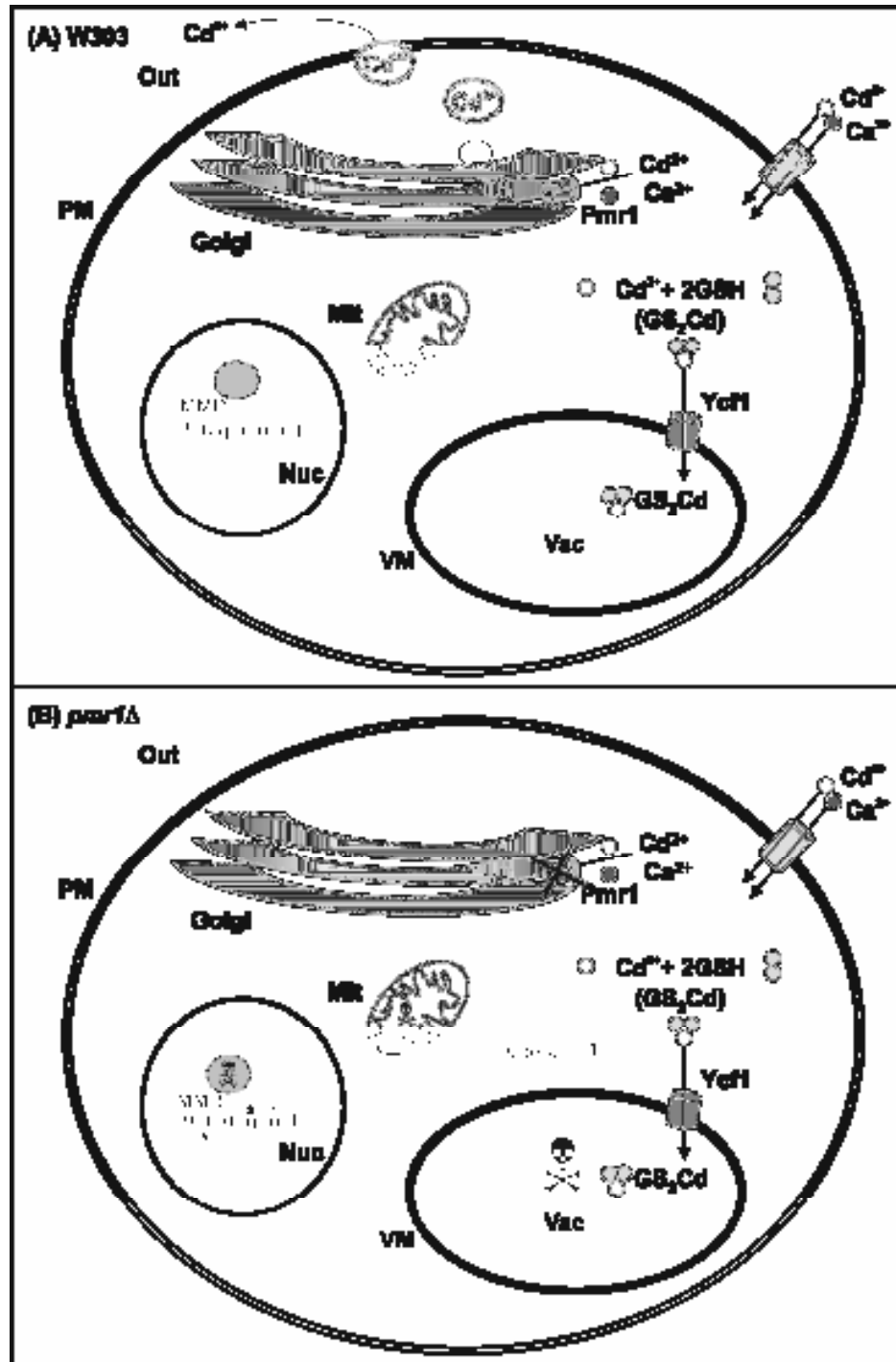


Figure 4. Model proposed for Cd^{2+} detoxification mediated by Pmr1p in cells of *S. cerevisiae*. In (A), the growth of a WT yeast cell in a culture medium containing both Cd^{2+} and Ca^{2+} induces the uptake of these ions by known transmembrane proteins, specially Ca^{2+} transporters. Once inside the cell, Cd^{2+} reacts with glutathione (GSH), generating the complex $[(\text{GS})_2\text{Cd}]$. These complexes are internalized into the vacuole by the Ycf1 proteins. On the other hand, Cd^{2+} ions could be transported to the Golgi by Pmr1p and excreted extracellularly by vesicles of exocytic pathway. In (B), a deleterious mutation of Pmr1p allows a cytoplasmic accumulation of free Cd^{2+} and $[(\text{GS})_2\text{Cd}]$ (indicated by an arrow). These complexes induce a

shutdown of glutathione and thiol-compounds synthesis, altering the redox homeostasis and impairing the uptake of [(GS)₂Cd] by vacuolar Ycf1p. In addition, DNA mismatch repair enzymes (MMR) and mitochondrial functions could also be blocked by an excess of intracellular Cd²⁺, leading to the accumulation of oxidized bases in DNA (represented by two stars). Finally, the inhibition of these important biochemical functions activate some nucleases that act on nuclear DNA (represented by scissor) leading to cell death (skull-and-crossbone representation). Abbreviations: extracellular environment (Out), nucleus (Nuc), mitochondria (Mit), plasma membrane (PM), vacuole (Vac), vacuole membrane (VM).

Acknowledgments

We thank Dr. G. R. Fink for kindly providing yeast strains. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), CAPES-PROCAD and Instituto de Educação para pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Royal, Unidade GENOTOX-ROYAL

References

- [1] Y. Anraku, Y. Ohya, H. Iida, Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1093 (1991) 169-177.
- [2] K.W. Cunningham, G.R. Fink, Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMCI*, a homolog of plasma membrane Ca^{2+} -ATPases, *J. Cell Biol.* 124 (1994) 351-363.
- [3] K.W. Cunningham, G.R. Fink, Calcineurin inhibits *VCXI*-dependent $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and induces Ca^{2+} ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 2226-2237.
- [4] T.C. Pozos, I. Sekler, M.S. Cyert, The product of *HUMI*, 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 (1996) 3730-3741.
- [5] S.R. Cronin, A. Khoury, D.K. Ferry, R.Y. Hampton, Regulation of HMG-CoA reductase degradation requires the P-type ATPase Cod1p/Spf1p, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 915-924.
- [6] S.R. Cronin, R. Rao, R.Y. Hampton, Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca^{2+} homeostasis, *J. Cell Biol.* 157 (2002) 1017-1028.
- [7] M. Bonilla, K.K. Nastase, K.W. Cunningham, Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress, *EMBO J.* 21 (2002) 2343-2353.
- [8] C. Suzuki, Y. I. Shimma, P-type ATPase *spf1* mutants show a novel resistance mechanism for the killer toxin SMKT, *Mol. Microbiol.* 32 (1999) 813-823.
- [9] A. Antebi, G.R. Fink, The yeast Ca^{2+} -ATPase homologue, *PMRI*, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution, *Mol. Biol. Cell*, 3 (1992) 633-654.
- [10] H.K. Rudolph, A. Antebi, G.R. Fink, C.M. Buckley et al., The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMRI*, a member of a Ca^{2+} -ATPase family, *Cell.* 58 (1989) 133-145.
- [11] A.F. Batiza, T. Schulz, P.H. Masson, Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 23357-23362.
- [12] H. Yoshimoto, K. Saltsman, A.P. Gasch et al., Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 10 (2002) 31079-31088.
- [13] T. Dunn, K. Gable, T. Beeler, Regulation of cellular Ca^{2+} by yeast vacuoles, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 7273-7278.

- [14] Y. Eilam, H. Lavi, N. Grossowicz, Mechanism of stimulation of Ca^{2+} uptake by miconazole and ethidium bromide in yeasts: role of vacuoles in Ca^{2+} detoxification, *Microbios.* 44 (1985) 51-66.
- [15] A. Miseta, R. Kellermayer, D.P. Aiello, L. Fu, D.M. Bedwell, The vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchanger Vcx1p/Hu m1p tightly controls cytosolic Ca^{2+} levels in *S. cerevisiae*, *FEBS Lett.* 451 (1999) 132-136.
- [16] I. Tanida, A. Hasegawa, H. Iida, Y. Ohya, Y. Anraku, Cooperation of calcineurin and vacuolar H^+ -ATPase in intracellular Ca^{2+} homeostasis of yeast cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 10113-10119.
- [17] V. Marchi, A. Sorin, Y. Wei, R. Rao, Induction of vacuolar Ca^{2+} -ATPase and $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity in yeast mutants lacking Pmr1, the Golgi Ca^{2+} -ATPase, *FEBS Lett.* 4549 (1999) 181-186.
- [18] J.M. Kathryn, T. Takashi, A.R. Guy, Role for plasma membrane-related Ca^{2+} -ATPase-1 (ATP2C1) in pancreatic β -cell Ca^{2+} homeostasis revealed by RNA silencing, *Diabetes.* 253 (2004) 393-400.
- [19] A. Sorin, G. Rosas, R. Rao, *PMR1*, a Ca^{2+} -ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 9895–9901.
- [20] Z. Hu, J.M. Bonifas, J. Beech et al., Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey–Hailey disease, *Nat. Genet.* 24 (2000) 61–65.
- [21] R. Sudbrak, J. Brown, C. Dobson-Stone, Hailey–Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca^{2+} pump, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 1131–1140.
- [22] G. Kazantzis, Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism, *BioMetals.* 17 (2004) 493-498.
- [23] R.A. Goyer, Toxic and essential metal interactions, *Annu. Rev. Nutr.* 17 (1997) 37-50.
- [24] M.P. Waalkes, T.P. Coogan, R.A. Barter, Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium, *Crit. Rev. Toxicol.* 22 (1992) 175-201.
- [25] J.M. Peters, T. Duncan, H. Falk, G. Oberdorster, T.J. Smith, Contribution of metals to respiratory cancer, *Environ. Health Perspect.* 70 (1986) 71-83.
- [26] D. Beyersmann, S. Hechtenberg, Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144 (1997) 247-261.
- [27] P.S. Rainbow, W.H. Black, Cadmium, zinc and the uptake of calcium by two crabs, *Carcinus maenas* and *Eriocheir sinensis*, *Aquat. Toxicol.* 25 (2005) 45-65.

- [28] M.D. Rose, F. Winston, P. Hieter, *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- [29] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [30] F. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, 3rd Edn. Wiley Interscience Co., USA, 1996.
- [31] R.D. Gietz, A. Sugino, New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites, *Gene*, 74 (1988) 527-534.
- [32] C.M. Viau, M.-L. Yoneama, J.F. Dias, C. Pungartnik, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Detection and quantitative determination by PIXE of the mutagen Sn^{2+} in yeast cells, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 249 (2006) 706-709.
- [33] J.L. Campbell, T.L. Hopman, J.A. Maxwell, The Guelph PIXE software package III: alternative proton database, *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B* 170 (2000) 193-204.
- [34] F. Wuytack, L. Raeymaekers, L. Missiaen, PMR1/SPCA Ca^{2+} pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca^{2+} store, *Eur. J. Physiol.* 446 (2003) 148–153.
- [35] V.K. Ton, D. Mandal, C. Vahadji, R. Rao, Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca^{2+} , Mn^{2+} -ATPase defective in Hailey-Hailey disease, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6422–6427.
- [36] D. Andal, S.J. Rulli, R. Rao, Packing interactions between transmembrane helices alter ion selectivity of the yeast golgi $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase *PMR1*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 35292-35298.
- [37] Y. Wei, V. Marchi, R. Wang, R. Rao, An N-terminal EF hand-like motif modulates ion transport by Pmr1, the yeast Golgi $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, *Biochemistry* 38 (1999) 14534-14541.
- [38] T.W. Lane, M.A. Saito, G.N. George, I.J. Pickering, R.C. Prince, F.M. Morel, Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom, *Nature*, 435 (2005) 42.
- [39] E.A. Belyaeva, V.V. Glazunov, S.M. Korotkov, Cd^{2+} versus Ca^{2+} -produced mitochondrial membrane permeabilization: a proposed direct participation of respiratory complexes I and III, *Chem. Biol. Interact.* 150 (2004) 253–270.
- [40] D.S. Gomes, L.C. Fragoso, C.J. Riger, A.D. Panek, E.C.A. Eleutherio, Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1573 (2002) 21-25.
- [41] C.T. McMurray, J.A. Tainer, Cancer, cadmium and genome integrity, *Nat. Genet.* 34 (2003) 34239-34241.

- [42] W.J. Przybylowicz, J.M. Przybylowicz, P. Migula, E. Glowacka, M. Nakonieczny, M. Augustyniak, 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 (2003) 343-348.
- [43] N. Kozai, T. Ohnuki, S. Komarneni, Uptake of cadmium by synthetic mica and apatite: observation by micro-PIXE, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B 210 (2003) 513-518.
- [44] P. Csutora, Z. Su, H.Y. Kim, Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (1999) 121-126.
- [45] E.G. Locke, M. Bonilla, L. Liang, Y. Takita, K.W. Cunningham, A homolog of voltage-gated Ca^{2+} channels stimulated by depletion of secretory Ca^{2+} in yeast, Mol. Cell. Biol. 20 (2000) 6686-6694.
- [46] R. Kellermayer, D.P. Aiello, A. Miseta, D.M. Bedwell, 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 (2003) 1637-1646.
- [47] R. Kellermayer, Hailey-Hailey disease as an orthodisease of *PMR1* deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*, FEBS Lett. 579 (2005) 2021-2025.
- [48] P.J. Lapinskas, K. W. Cunningham, X.F. Liu, G.R. Fink, V.C. Culotta, Mutations in *PMR1* suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase, Mol. Cell. Biol. 15 (1995) 1382-1388.
- [49] V.C. Culotta, M. Yang, M.D. Hall, Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*, Eukaryotic Cell, 4 (2005) 1159-1165.
- [50] D.B. Shennan, M. Peaker, Transport of milk constituents by the mammary gland, Physiol. Rev. 80 (2000) 925-951.
- [51] R. Greger, U. Windhorst, *Comprehensive Human Physiology: From Cellular Mechanisms to Integration*, Berlin, Springer-Verlag, 1996: pp 2427-2449.
- [52] M.C. Neville, P. Peaker, The secretion of calcium and phosphorus into milk, J. Physiol. 290 (1979) 59-67.
- [53] C. Marteau A. Gerolami, Influence of hypercalcemia on ionized calcium concentration in pancreatic juice of the dog, J. Lab. Clin. Med. 123 (1994) 565-573.
- [54] H. Teufel, P. Stock, H. Rohmoser, M.M. Forell, Calcium secretion in the isolated perfused canine pancreas, Res. Exp. Med. (Berl.) 176 (1979) 51-68.
- [55] R.J.P. Williams, J. R. Frausto da Silva, The natural selection of the chemical elements. Oxford, Clarendon Press, 1996.

- [56] K. Simkiss, M.G. Taylor, Transport of metals across membranes, In: A. Tessier, D.R. Turner (Eds.), Metal speciation and aquatic systems. New York, John Wiley & Sons, 1995: pp. 1-44.
- [57] P.S. Rainbow, Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. Est. Coast. Shelf Sci. 44 (1997) 169-175.
- [58] Z.S. Li, Y.P. Lu, R.G. Zhen, M. Szczyпка, D.J. Thiele, P.A. Rea, A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalized transport of bis(glutathionato)cadmium, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (1997) 42-47.
- [59] P. Perego, S.B. Howell, Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ion in yeast, Toxicol. Appl. Pharmacol. 147 (1997) 312-318.
- [60] U.H. Dormer, J. Westwater, N.F. McLaren, N.A. Kent, J. Mellor, D.J. Jamieson, Cadmium-inducible expression of the yeast *GSH1* gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network, J. Biol. Chem. 275 (2000) 32611-32616.
- [61] F. Madeo, E. Fröhlich, M. Ligr et al., Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast, J. Cell Biol. 145 (1999) 757-767.
- [62] F. Madeo, E. Herker, C. Maldener et al., A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast, Mol Cell. 9 (2002) 911-

V - DISCUSSÃO GERAL

O resultado do aumento das concentrações tóxicas de metais presentes no solo (SEMCZUK & SEMCZUK-SIKORA, 2001) e no ambiente aquático é quase sempre o resultado de múltiplos componentes tóxicos (KRASNOV *et al.*, 2007). O cádmio é um íon metálico altamente tóxico e amplamente utilizado na indústria, por exemplo, em pigmentos, tintas, na galvanização de metais e confecção de baterias (WANG *et al.*, 2003).

O cádmio é um íon metálico sem função biológica conhecida e é transportado através das membranas por transportadores de cátions essenciais ou canais que não são completamente seletivos (CLEMENS *et al.*, 1998). Além disso, os canais de voltagem também estão implicados na absorção de Cd^{2+} via membrana (LACROIX & HONTELA, 2006). Uma vez dentro da célula, o íon cádmio possui alta afinidade pelos grupos sulfidríla das proteínas, compete com o cálcio em proteínas e possui efeito carcinogênico devido à inibição do reparo de erros de emparelhamento (BANERJE & FLORES-ROZA, 2005).

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a toxicidade do Cd^{2+} , o objetivo deste trabalho foi verificar a influência do Ca^{2+} e Mg^{2+} contra os danos causados pelo Cd^{2+} (Capítulo I), bem como estudar a influência de transportadores intracelulares de cálcio no processo de desintoxicação de cádmio pela via secretória em células de *Saccharomyces cerevisiae* (Capítulo II).

1. A atividade protetora do magnésio e do cálcio contra os efeitos tóxicos causados pelo cádmio na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Os íons de cádmio podem ser absorvidos pelas células por meio de processos de difusão facilitada envolvendo proteínas transportadoras presentes na superfície da membrana celular ou também por meio das vias de cálcio, devido ao tamanho similar dos íons de cálcio e de cádmio (RAINBOW & BLACK, 2005). Adicionalmente, o transportador de alta afinidade para zinco (Zrt1p) localizado na membrana plasmática de *S. cerevisiae* (MACDIARMID *et al.* 2000) também parece estar associado à importação de íons de cádmio em baixas concentrações (GOMES *et al.*, 2002).

Dentro da célula, a atividade tóxica do cádmio pode ser diminuída por meio de sua ligação a peptídeos ricos em cisteína como as metalotioneínas e glutatona. O gene *GSH1* que codifica a enzima γ -glutamil-cisteína sintetase, a qual regula a produção de glutatona junto com a enzima glutatona sintetase (codificada pelo gene *GSH2*), tem um papel importante na proteção contra a toxicidade do cádmio. Em *S. cerevisiae*, a glutatona atua na defesa contra a toxicidade do cádmio inativando-o fisiologicamente pela formação de complexos bis(glutatiolato)-cádmio, $\text{Cd}(\text{GS})_2$, que são transportados para o vacúolo pela proteína Ycf1p (PENNINCKX, 2002). A proteína Ycf1 (*Yeast-Cadmium Factor1*), de *S. cerevisiae*, possui um importante papel na defesa celular contra íons Cd^{+2} após sua associação com o grupo tiol (SH) da glutatona, pois medeia o transporte de conjugados de glutatona com cádmio do citoplasma para o interior do vacúolo (PENNINCKX, 2002).

Fundamentalmente os principais mecanismos de homeostase metálica envolvem duas importantes estratégias: (i) o controle em nível de proteínas transmembrana transportadoras de metais, tanto na membrana plasmática quanto no vácuolo e (ii) a atuação de quelantes representados pelas moléculas de glutatona, metalotioneínas e outras proteínas ricas em cisteína (PEREGO & HOWELL, 1997). O presente estudo investigou a influência dos íons divalentes de cálcio e magnésio sobre a toxicidade do cádmio em linhagens de *S. cerevisiae* deficientes tanto para o sistema relacionado ao influxo de cádmio (representado por *ztr1Δ*), quanto para o sistema de quelação e compartimentalização deste metal (representados por *gsh1Δ* e *ycf1Δ*, respectivamente).

Com os resultados apresentados no Capítulo I (figura 1) mostrou-se que todas as linhagens de leveduras testadas (selvagem, *ztr1Δ*, *gsh1Δ* e *ycf1Δ*) são extremamente sensíveis quando expostas a altas concentrações de Cd^{2+} (0,6 mM). No entanto, as células de leveduras que foram expostas ao tratamento simultâneo contendo Cd^{2+} e Mg^{+2} ou Cd^{2+} e Ca^{2+} , constatou-se uma recuperação praticamente total do crescimento celular em todas as linhagens. Para confirmar a influência dos tratamentos com Ca^{2+} e Mg^{2+} contra a toxicidade do cádmio, foram montadas curvas de crescimento, utilizando-se a técnica de coloração com azul de metileno, que permite distinguir células vivas e mortas por observação direta ao microscópio óptico (Capítulo I, figura 2-6). Nesse estudo observou-se que a linhagem selvagem exposta ao Cd^{2+} teve crescimento exclusivamente nos tratamentos simultâneos com Mg^{2+} ou Ca^{2+} ; o mesmo foi observado para as linhagens mutantes *ycf1Δ*, *ztr1Δ* e *gsh1Δ*. As análises utilizando o PIXE indicaram que os efeitos

de proteção exercidos pelos íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} sobre todas as linhagens testadas se devem a uma diminuição da quantidade intracelular de Cd^{2+} após o tratamento simultâneo com esses íons. Estes dados corroboram os resultados fenotípicos e indicam que a sensibilidade das linhagens é devido a um alto nível de Cd^{2+} contido intracelularmente.

É interessante ressaltar que a linhagem selvagem acumulou mais cádmio após os tratamentos simultâneos com Ca^{2+} ou Mg^{2+} do que as mutantes *ycf1Δ*, *zrt1Δ* e *gsh1Δ*, mas que, no entanto, o efeito protetor desses metais sobre essa linhagem foi muito similar ao observado com os mutantes (exceto no caso de cálcio para a linhagem *ycf1Δ*). Isso significa que, se por um lado células selvagens acumulam mais cádmio, por outro possuem mecanismos adequados para evitar a toxicidade das concentrações residuais do metal que permanecem no interior celular após o co-tratamento com magnésio e cálcio.

Segundo Gomes *et al.* (2002), no mutante *zrt1Δ* a captação de cádmio é extremamente reduzida após tratamento com 48 μM deste metal. Neste trabalho, entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de cádmio acumulados pela linhagem selvagem e pela linhagem *zrt1Δ*. A proteína Zrt1p é um transportador de alta afinidade para zinco, o que significa que atua preferencialmente em condições onde a concentração Zn^{2+} é baixa. Considerando que íons Cd^{2+} podem competir com íons Zn^{2+} , é possível inferir que a captação de cádmio por Zrt1p também ocorra num sistema de alta afinidade. Desta forma, a atuação de Zrt1p na captação de cádmio seria fisiologicamente mais importante na presença de baixas concentrações do metal, enquanto que em ambientes com altas concentrações de cádmio, outros transportadores de membrana (possivelmente sistemas de baixa afinidade para importe de metais essenciais divalentes) teriam uma maior contribuição para a entrada de cádmio nas células de *S. cerevisiae*. Neste sentido, já foi demonstrado que uma alta concentração de Cd^{2+} pode entrar na célula, provavelmente por meio de transportadores de Ca^{2+} , Mn^{2+} (PERFUS-BARBEOCH *et al.* 2002).

Outro aspecto a ser ressaltado é que, nos tratamentos com $\text{Cd}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Cd}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, o mutante *gsh1Δ* não foi mais sensível do que a linhagem selvagem, o que exclui a possibilidade de que o efeito protetor esteja ligado à ação antioxidante da glutatona.

Os dados apresentados demonstraram claramente o efeito protetor do Ca^{2+} e Mg^{2+} , contra a toxicidade do cádmio nas linhagens *gsh1Δ*, *ycf1Δ* e *zrt1Δ*, e que tal proteção possivelmente está relacionada à um mecanismo de competição entre os íons. Desta maneira, a

diminuição dos efeitos provocados pela exposição ao Cd^{2+} ocorreria pela limitada absorção do metal em presença de excesso de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Em resumo, este trabalho mostrou pela primeira vez que Ca^{2+} e Mg^{2+} podem proteger as células de *S. cerevisiae* contra os efeitos tóxicos provocados pelo Cd^{2+} . Michibata *et al.* (1986) mostraram que o Ca^{2+} pode diminuir a toxicidade do Cd^{2+} em ovos de teleosteo, enquanto que o Mg^{2+} não apresentou proteção. Entretanto, recentemente, Boujelben *et al.* (2006) mostraram que ratos que foram suplementados com magnésio apresentaram redução nos níveis de peroxidação lipídica e no acúmulo de Cd^{2+} nos órgãos. Estudos demonstraram ainda que o pré-tratamento com magnésio pode diminuir os níveis de cádmio no fígado de camundongos (HYO-BONG *et al.* 1995; DJUKIC-COSSIC *et al.*, 2006) constataram que a toxicidade do cádmio pode ser reduzida em bactérias quando o meio é suplementado com cálcio ou Zinco.

Os mecanismos, dos quais o Mg^{2+} e o Ca^{2+} influenciam na desintoxicação e/ou na restrição da entrada de Cd^{2+} nas células, precisam ser melhor estudados. Além disso, compreender e identificar transportadores de Ca^{2+} e Mg^{2+} que tenham possível envolvimento com o Cd^{2+} é de suma importância para o entendimento da homeostase deste metal.

2. A proteína Pmr1, que é a principal Ca^{2+} -ATPases do Golgi em leveduras, regula o nível intracelular do íon cádmio

Em *S. cerevisiae*, o gene *PMCI* codifica para uma proteína de membrana vacuolar que possui similaridade com as ATPases de Ca^{2+} de células de mamíferos, conhecidas como PMCA. Além disso, outra proteína que tem um importante papel na homeostase de Ca^{2+} em leveduras é a Pmr1p – uma ATPase cuja localização se dá nas cisternas medianas do complexo de Golgi e cuja função está relacionada com influxo de Ca^{2+} para o interior deste compartimento intracelular (MANDAL *et al.* 2000).

Nos vertebrados, três famílias de Ca^{2+} -ATPases contribuem para a remoção do Ca^{2+} utilizado no citoplasma durante a recuperação de um sinal de estimulação: as PMCA (*plasma-membrane Ca^{2+} -ATPases*) que retira o Ca^{2+} para fora da célula, as SERCA (*sarco/endoplasmic-reticulum*) e as SPCA (*secretory-pathway Ca^{2+} ATPases*), que bombeiam Ca^{2+} para o interior de organelas para ser estocado. Todas estas proteínas contêm um motivo altamente conservado de

fosforilação. O conhecimento a respeito das SPCAs é muito limitado quando comparado com as bombas já bem caracterizadas como as SERCA e as PMCA.

O complexo de Golgi está envolvido na classificação e no processamento de proteínas que transitam pela via secretora das células. Na maioria das células eucarióticas, o Golgi ocupa uma posição perinuclear que é ideal para a regulação de múltiplos processos celulares. As mudanças na concentração do cálcio dentro do lúmen do Golgi ou ainda no citosol regulam a função desta organela (BURGOYNE & CLAGUE, 2003; WUYTACK *et al.*, 2003). Além disso, o Golgi é um local que serve para a estocagem de cálcio, pois possui mecanismos de liberação e retenção deste metal (PINTON *et al.*, 1998).

A habilidade do Golgi de seqüestrar cálcio foi adquirida provavelmente em um período precoce durante a evolução, pois as bombas de Ca^{2+} localizadas nele se mostram conservadas em plantas (ORDENES *et al.*, 2002), em leveduras (ATENBI & FINK, 1992) e em protozoários (ALMEIDA *et al.*, 2000). Quando se altera a expressão das ATPases de Ca^{2+} presentes no Golgi, se observa defeito nas funções celulares. Por exemplo, mutações no gene que codifica a proteína SPCA1, que se localiza no Golgi provocam uma doença de pele chamada de Hailey-Hailey (MISSIAEN *et al.*, 2007; KELLERMAYER, 2005).

O complexo de Golgi também está envolvido com a regulação da homeostase de manganês, especialmente quando há um excesso deste metal no citosol da célula de levedura. Neste caso, os íons Mn^{2+} são bombeados para o interior do Golgi por ação da Pmr1p e retirados da célula por meio de vesículas da via secretora, as quais se fundem com a superfície da membrana celular e liberam o manganês novamente ao meio extracelular (CULOTTA *et al.*, 2005).

No Capítulo II (figura 1), mostrou-se que a disrupção de *PMR1* causa aumento de sensibilidade a cádmio, enquanto que a disrupção do gene *PMCI* não altera a tolerância a este metal. Por meio de ensaio de complementação fenotípica com um plasmídeo centromérico (YcpLac33) contendo uma cópia funcional do gene *PMR1*, foi possível reverter a sensibilidade da linhagem *pmr1Δ* ao cádmio (Capítulo I, figura 2). Esses dados comprovam que existe um envolvimento da Pmr1p com a desintoxicação de cádmio.

Para investigar a participação da Pmr1p no controle da homeostase intracelular de cádmio em *S. cerevisiae*, foi utilizada a técnica de PIXE para determinar o conteúdo de cádmio acumulado pelas linhagens selvagem (contendo o vetor YcpLac33 vazio) e *pmr1Δ* (contendo o

vetor YcpLac33 vazio ou carregando uma cópia funcional de *PMRI*). Como resultado, foi possível observar que no mutante *pmr1Δ* contendo o plasmídeo vazio, o acúmulo de cádmio é cerca de três vezes maior do que na linhagem selvagem ou no mutante *pmr1Δ* contendo a cópia funcional de *PMRI*.

Dessa forma, fica claro que, além dos conhecidos papéis da Pmr1p na manutenção da homeostase de cálcio e manganês, esse transportador também tem uma participação importante na desintoxicação de cádmio, utilizando a via secretora para eliminar os íons de cádmio, cálcio e manganês. Sabe-se que a Pmr1p tem alta afinidade por Ca^{2+} / Mn^{2+} (TON *et al.*, 2002). Entretanto, pouco se sabe sobre sua função no transporte de outros metais divalentes, assim como, sobre a participação do Golgi em processos de desintoxicação de metais pesados. Neste sentido, é importante destacar que este é o primeiro trabalho que descreve o uso da via secretora como um mecanismo de efluxo para o cádmio em células eucarióticas.

É preciso ressaltar que apesar de os resultados indicarem que o cádmio pode ser desintoxicado pela via de forma similar ao que ocorre com o manganês, muitos aspectos bioquímicos e fisiológicos do transportador Pmr1p precisam ser esclarecidos, uma vez que diferentemente do cálcio e do manganês, o cádmio não exerce função biológica conhecida (CUNNINGHAM & FINK 1994; CULOTTA *et al.*, 2005). O cálcio e o manganês têm um papel fundamental para uma grande variedade de processos intracelulares, agindo como cofatores para uma ampla gama de enzimas (CROWLEY *et al.*, 1999; KEEN *et al.*, 1999; STULL, 2000). O cálcio ainda atua como sinalizador intracelular (BARRON & ALBEKE, 2000) e é conhecido por ser um dos maiores responsáveis por mudanças na absorção de outros metais em animais como peixes (BARRON & ALBEKE, 2000), anfíbios (WRIGHT, 1988), insetos (GRAIG *et al.*, 1999), oligoqueta (RATHORE & KHANGAROT, 2003) e mexilhões (WANG & EVANS, 1993). Por outro lado, o cádmio não possui função biológica conhecida até o presente momento (McMURRAY & TAINER, 2003). Então, é provável que o sequestro de íons de Cd^{2+} pela Pmr1p seja um resultado primário da alta similaridade entre os íons de Ca^{2+} e Cd^{2+} , ao invés de uma adaptação evolutiva frente à toxicidade provocada por esse metal. O raio atômico do íon cálcio é de 0,92 Å, contra um raio de 0,94 Å do íon de cádmio (WILLIAMS *et al.*, 1996). Tal similaridade pode provocar um efeito mimético entre os dois tipos íons de forma que a Pmr1p não seria suficientemente seletiva para evitar a captação de cádmio. Entretanto, esse mecanismo pouco seletivo agiria em benefício da célula, mostrando uma vantagem adaptativa em captar íons

que poderiam provocar toxicidade celular, como no caso do Mn^{2+} (quando em elevadas concentrações) e Cd^{2+} .

VI – CONCLUSÕES

6.1 Conclusão geral

Com esse estudo, conclui-se que o Ca^{2+} e Mg^{2+} protegeram as células de *S. cerevisiae* contra os efeitos tóxicos provocados pelo Cd^{2+} , mesmo em leveduras deficientes para processos ligados a homeostase do Cd^{2+} (*zrt1Δ*, *gsh1Δ* e *ycf1Δ*). Além disso, mostrou-se que a Pmr1p de *S. cerevisiae* tem um papel importante na resistência aos efeitos tóxicos provocados pelo Cd^{2+} , contribuindo para a desintoxicação deste metal por um mecanismo possivelmente associado à via secretora.

6.2 Conclusões específicas

- O cloreto de cálcio protege as linhagens: selvagem, *gsh1Δ*, *ycf1Δ* e *zrt1Δ* contra a toxicidade provocada por cádmio.
- O cloreto de magnésio protege as linhagens: selvagem, *gsh1Δ*, *ycf1Δ* e *zrt1Δ* contra a toxicidade provocada por cádmio.
- O mutante *pmr1Δ* é extremamente sensível ao cloreto de cádmio.
- O mutante *pmr1Δ* acumula uma maior quantidade intracelular de cádmio do que sua respectiva linhagem isogênica.
- O fenótipo de sensibilidade ao cádmio apresentado pelo mutante *pmr1Δ* pode ser revertido pela complementação com um plasmídeo contendo o gene *PMR1* funcional.
- O mutante *pmc1Δ* não apresenta sensibilidade ao cloreto de cádmio.

VII - PERSPECTIVAS

O transporte de metais desperta a curiosidade de muitos pesquisadores, pois seus mecanismos biológicos e evolutivos continuam a nos desafiar em termos de funções, sistemas de armazenamento, desintoxicação e manutenção de homeostase. Estamos apenas começando a compreender os papéis de cálcio, manganês e cádmio, junto ao aparelho de Golgi e a via secretora. Com esse trabalho, esperamos contribuir para uma maior elucidação do transporte de cádmio intracelular e seus mecanismos de desintoxificação, além de abrir novas possibilidades de investigação, tendo as seguintes perspectivas:

- medir níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSH) utilizando ensaios bioquímicos específicos, avaliando linhagens selvagem, *gsh1Δ*, *ycf1Δ* e *zrt1Δ* de *S. cerevisiae*;
- testar a sensibilidade da linhagem mutante para a proteína calmodulina em tratamentos simultâneos com cálcio e cádmio, já que esta proteína é fundamental para o equilíbrio homeostático do cálcio;
- testar a sensibilidade do mutante *pmr1Δ* aos outros metais bivalentes;
- observar o transporte do cádmio retido em vesículas da via secretora por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIELLO, D. P.; FU, L.; MISETA, A.; SIPOS, K. & BEDWELL, D. M. The Ca²⁺ Homeostasis Defects in a *pgm2Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by excessive vacuolar Ca²⁺ uptake mediated by the Ca²⁺-ATPase Pmc1p. *Journal of Biological Chemistry.*, v. 279, n. 37, p. 38495–38502, 2004.

AL-LAHHAM, A.; ROHDE, V.; HEIM, P.; LEUCHTER, R.; VEECK, J.; WUNDERLICH, C.; WOLF, K. & ZIMMERMANN, M. Biosynthesis of phytochelatins in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, v.15, n. 5, p. 385-396, 1999.

ALMEIDA, J. C. A.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. & OKOROKOV, L. A. Calcium sequestrating in the early-branching amitochondrite protozoan *Tritrichomonas foetus*: an important role of the Golgi complex and its calcium ATPase, *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1615, p. 60–68, 2000.

ANTEBI, A. & FINK, G.R. The yeast calcium ATPase homologue, Pmr1, is required for normal Golgi function and localises in a novel Golgi like distribution. *Mol. Biol. Cell*, v. 3, p. 633–654, 1992.

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

BARCELOUX, D. G. Manganese. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, v. 37, p. 293–307, 1999.

BARRON, M. G. & ALBEKE, S. Calcium control of zinc uptake in rainbow trout. *Aquat Toxicol.*, vol. 50, p. 257-264, 2000.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*, v. 361, p. 315–325, 1993.

BERRIDGE, M. J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle, *Cell Calcium*, v. 32, p. 235–249, 2002.

BOUJELBEN, M.; GHORBEL, F.; VINCENT, C.; MAKNI-AYADI, F.; GUERMAZI, F.; CROUTE, F. & EL-FEKI A. Lipid peroxidation and HSP72/73 expression in rat following cadmium chloride administration: Interactions of magnesium supplementation. *Experim. Toxicol. Pathol.*, v. 57, p. 437–443, 2006.

BRENNAN, R.J. & SCHIESTL, R.H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat. Res.*, v. 356, p. 171-178, 1996.

BROWN, E. M. Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium sensing receptor. *Am. J. Med.*, v. 106, p. 238-253, 1999.

BROWN, E. M. Extracellular Ca^{2+} sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca^{2+} and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol. Rev.*, v. 71, p. 371-411, 1991.

BURGOYNE, R. D. & CLAGUE, M. J. Calcium and calmodulin in membrane fusion, *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1641, p. 137–143, 2003.

CELLIER, M.; PRIVE, G.; BELOUCHI, A.; KWAN, T.; RODRIGUES, V.; CHIA, W. & GROS, P. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, p. 10089–10093, 1995.

CHRESTENSEN, C. A.; STARKE, D. W. & MIEYAL, J. J. Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 34, p. 26556-26565, 2000.

CLEMNES, S.; ANTOSIEWICZ, D. M.; WARD, J. M.; SCHACHTMAN, P. D. & SCHROEDER, J. I. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Plant biology.*, v. 95, p. 12043-12048, 1998.

CRAIG, A.; HARE, L. & TESSIER, A. Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in aquatic insect *Chironomus staegri*. *Aquat Toxicol.*, v. 44, p. 255-262, 1999.

CROWLEY, J. A.; TRAYNOR, D. A. & WEATHERBURN, D. C. Enzymes and proteins containing manganese: an overview, p. 209–257. In A. Sigel and H. Sigel (ed.), Manganese and its role in biological processes. *Metal ions in biological systems*, v. 37. Marcel Dekker, New York, N.Y, 1999.

CUI, Z.; HIRATA, D.; TSUCHIYA, E.; OSADA, H. & MIYAKAWA T., The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1/Yor1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions. *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 14712–14716, 1996

CULOTTA, V. C.; YANG, M. & HALL, M. D. Manganese Transport and Trafficking: Lessons Learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, v. 4, p. 1159–1165, 2005.

CUNNINGHAM, K. W. & FINK, G. R. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMCI*, a homolog of plasma membrane Ca^{2+} ATPases. *J. of Cell Biology*, v. 124, n. 3, p. 351-363, 1994.

CUNNINGHAM, K. W. & FINK, G. R. Calcineurin inhibits *VCX1*-dependent $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and induces Ca^{2+} ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, v. 16, p. 2226-2237, 1996.

CUNNINGHAM, K. W. & FINK, G. R. Ca^{2+} transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Exp. Biol.*, v. 196, p. 157–166, 1994.

DE WINDE, J. H.; THEVELEIN, J. M.; WINDERCRIX, J. Adaptation to nutrient depletion in yeast. In: HOHMANN, S.; MANGER, W.H. (ed.). *Yeast stress responses*, New York: Springer, p. 7-52, 1997.

DJUKIC-COSIC, D.; NINKOVIC, M.; MALICEVIC, Z.; PLAMENAC-BULAT, Z. & MATOVIC, V. Effect of supplemental magnesium on the kidney levels of cadmium, zinc, and copper of mice exposed to toxic levels of cadmium. *Biol. Trace Elem. Res.*, v. 114, n. 1-3, p. 281-291, 2006.

DUNN, T.; GABLE, K., & BEELER, T. Regulation of cellular Ca^{2+} by yeast vacuoles *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 7273–7278, 1994.

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*, v. 9, p. 1149-1162, 1998.

FUGE, E. F. & WERNER-WASHBURNE, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: HOHMANN, S.; MANGER, V.H. (ed). *Yeast stress responses.*, New York; Springer. p. 53-74, 1997.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbial Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 334-361, 1998.

GOMES, D.S.; FRAGOSO, L.C.; RIGER, C.J.; PANEK, A.D. & ELEUTHERIO E.C.A. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1573 p. 21– 25, 2002.

GRASCHOPF, A.; STADLER, J. A.; HOELLERER, M. K.; EDER, S.; SIEGHARDTI, M.; KOHLWEIN, S. D. & SCHWEYEN, R. J. The yeast plasma membrane protein Alr1 controls

Mg²⁺ homeostasis and is subject to Mg²⁺-dependent control of its synthesis and degradation. *J. of Biol. Chem.*, v. 276, n. 19, p. 16216–16222, 2001.

GEISLER, M.; FRANGNE, N.; GOMES, E.; MARTINOIA, E. & PALMGREN, M. G. The *ACA4* gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast. *Plant Physiology*, v. 124, p. 1814–1827, 2000.

GUIET, B.A.; BARA, M. & DURLACH, J. Magnesium: a competitive inhibitor of lead and cadmium. Ultrastructural studies of the human amniotic epithelial cell. *Magnes Res.*, v. 1, p. 31-36, 1990.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3a ed. Oxford University Press, New York, 2000.

HYO-BONG, H.; LEWIS R. B. & JONG-KYU K., Effect of zinc and calcium on intracellularly uptake of cadmium and growth of *Escherichia coli*. *Jour. Microbiol.*, p. 302-306, 1995

JIN, Y. H.; CLARCK, A. B.; SLEBOS, R. J. C.; AL-REFAI, H.; TAYLOR, J. A.; KUNKEL, T. A.; RESNICK, M. A. & GONDENIN, D. A. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet.*, v. 34, n. 3, p. 326, 2003.

KAGI, H. J. & CHAFFER, A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, v. 27, p. 8509-8515, 1998.

KALINOWSKI, D. S. & RICHARDSON, D. R. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol. Rev.*, v.57, p. 547–583, 2005.

KEEN, C. L.; ENSUNSA, J. L. & CLEGG, M. S. Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese, p. 90–114. In A. Sigel and H. Sigel (ed.), Manganese and its role in biological processes. *Metal Ions in Biological Systems*, v. 37. Marcel Dekker, New York, N.Y, 1999.

KLEIN, M.; MAMNUM, Y.M.; EGGMANN, T.; SCHÜLER, C.; WOLFGER, H.; MARTINOIA, E. & KUCHLER, K. The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Letters*, v. 520, p. 63-67, 2002.

KERN, A. L.; BONATTO, D.; DIAS, J. F.; YONEMA, M. L. BRENDEL, M.; & HENRIQUES J. A. P. The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: insights from phylogenetic studies and particule-induced X-ray emission. *Biometals*, v. 18, p. 31-41, 2005.

KELLERMAYER, R. Hailey–Hailey disease as an orthodisease of PMR1 deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, v. 579, p. 2021–2025, 2005.

KINGSBURY, T. J. & CUNNINGHAM, K. W. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes & Dev.*, v. 14, p. 1595-1604, 2000.

KRASNOV, A.; AFANASYEV, S. & OIKARI, A. Hepatic responses of gene expression in juvenile brown trout (*Salmo trutta lacustris*) exposed to three model contaminants applied singly and in combination. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 26 p. 100-109, 2007.

LACROIX, A. & HONTELA, A. Role of calcium channels in cadmium-induced disruption of cortisol synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, v. 2, p. 141-147. 2006.

LI, L.; CHEN, O. S.; WARD, D. M. & KAPLAN, J. Ccc1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 29515–29519, 2001.

LITTLEFIELD, N. A.; HASS, B. S.; JAMES, S. J. & POIRIER, L. A. Protective effect of magnesium on DNA strand breaks induced by nickel or cadmium. *Cell Biol. Toxicol.*, v. 2, p. 127-135, 1994.

- LIU, G. J.; MARTÍN, D. K.; GARDNER, R. C. & RYAN, P. R. Large Mg^{2+} -dependent currents are associated with the increased expression of *ALR1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 213, n. 2, p. 231-237, 2002.
- LIU, X. F. & CULOTTA, V. C. Post-translational control of Nramp metal transport in yeast: role of metal ions and the *BSD2* gene. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 4863–4868. 1999b.
- LUK, E. & CULOTTA, V. C. Manganese superoxide dismutase in *S. cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nramp metal transporter, Smf2p. *J. Biol. Chem.* v. 276, p. 47556–47562, 2001.
- LUO, S.; ROHLOFF, P.; COX, J.; UYEMURA, S. A. & DOCAMPO, R. *Trypanosoma brucei* plasma membrane-type Ca^{2+} -ATPase 1 (*TbPMC1*) and 2 (*TbPMC2*) genes encode functional Ca^{2+} -ATPases localized to the acidocalcisomes and plasma membrane, and essential for Ca^{2+} homeostasis and growth. *J. Biological Chemistry*, v. 279, p. 14427–14439, 2004.
- LUSHCHAK, V. I., Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochim. Pol.*, v. 53, p. 679-84, 2006.
- MACDIARMID, C.W. & GARDNER, R.C. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 3, p. 1727-1732, 1998.
- MACDIARMID, C. W.; GARTHER, A. L. & EIDE, D. Zinc transporter that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, v.19, n.12, p. 2845-2845, 2000.
- MANDAL, D.; WOOLF T. B. & RAO R. Manganese selectivity of Pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue Gln783 in transmembrane segment 6. *J. of Biological chemistry*. v. 275, p. 23933–23938, 2000.

MARCHI, V.; SORIN, A.; WEI, Y. & RAO, R. Induction of vacuolar Ca²⁺-ATPase and H⁺/Ca²⁺ exchange activity in yeast mutants lacking Pmr1, the Golgi Ca²⁺-ATPase. *FEBS Letters*, v. 454, p. 181-186, 1999.

MATHEOS, D. P.; 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 & Dev*, v. 11, p. 3445-3458, 1997.

McMURRAY, C. & TAINER, J. A. Cancer, cadmium and genome integrity. *Nat. Genet.*, v.34, n. 3, p. 239, 2003.

MICHIBATA, H.; SAHARA, S. & KOJIMA, M. K. Effects of cadmium and magnesium ions on toxicity of cadmium to the egg of the teleost *Oryzias latipes*. *Environm. Research*, v. 40, p. 110-114, 1986.

MISETA, A.; KELLERMAYER, R.; AIELLO, D. P.; FU, L. & BEDWELL, D.M. The vacuolar Ca²⁺/H exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Letters*, v. 451, p. 132-136, 1999.

MISSIAEN, L.; DODE, L.; VANOEVERELEN, J.; RAEYMAEKERS, L. & WUYTACK, F.; Calcium in the Golgi apparatus. *Cell Calc.*, v. 41, n. 5, p. 405-416, 2007.

NAGY, Z.; MONTIGNYA, C.; LEVERRIERA, P.; YEHA, S.; GOFFEAU, A.; GARRIGOSA, M. & FALSONA, P. Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification, *Biochimie*, v. 88 p. 1665–1671, 2006

OGRA, Y. & SUZUKI, K. T. Nuclear traffic of metallothionein; possible mechanism and current knowledge. *Cell Mol. Biol.*, v.46, n. 2, p. 357-365, 2000.

OPEI, Z. M.; WARD, J. M. & SCHOROEDER, J.J. Magnesium sensitizes slow vacuolar channels to physiological cytosolic calcium and inhibits fast vacuolar channels in fava bean guard cells. *Plant Physiol.*, v. 121, p. 977-986, 1999.

ORDENES, V. R.; REYES, F. C.; WOLFF, D. & ORELLANA, A. A thapsigargin sensitive calcium pump is present in the pea Golgi apparatus membrane. *Plant Physiol.*, v. 129, p. 1820–1828, 2002.

PAL, P. K.; SAMII, A. D. & CALNE, B. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology, *Neurotoxicology*, v. 20, p. 227–238, 1999.

PENNINCKX, M. J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeast. *FEMS Yeast Res.*, v. 2, p. 295-305, 2002.

PEREGO, P. & HOWELL, S. B. Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 147, p. 312-318, 1997.

PERFUS-BARBEOCH, L.; LEONHARDT, N.; VAVASSEUR, A. & FORESTIER, C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant J.*, v. 32, p. 539–548, 2002.

PINTON, P.; POZZAN, T. & HIRSUTO, R. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *Embo J.* v. 17, p. 5298–5308, 1998.

PITTMAN, J. K., SREEVIDYA, C. S., SHIGAKI, T., UEOKA-NAKANISHI, H. & HIRSCHI, K. D. Distinct N-terminal regulatory domains of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporters. *Plant Physiology*, v. 130, p. 1054–1062, 2002.

PORTNOY, M. E.; LIU, X. F. & CULOTTA, V. C. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.*, v. 20, p. 7893–7902, 2000.

POZOS, T. C.; SEKLER, I. & CYERT, M. S. 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.*, v. 16, p. 3730-3741, 1996.

RAINBOW, P. S. & BLACK, W. H. Cadmium, zinc and the uptake of calcium by two crabs, *Carcinus maenas* and *Eriocheir sinensis*. *Aquatic Toxicology*, v. 72, p. 45–65, 2005.

RATHORE, R. S. & KHANGAROT, B. S. Effects of water hardness and metal concentration on a freshwater *Tubifex tubifex* Muller. *Water Air Soil Pollut.*, v. 142, p. 341-356, 2003.

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. *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 50, p. 33449-33454, 1998.

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 *PMR1*, a member of a Ca^{2+} ATPase family. *Cell*, v. 1, p. 133-45, 1989.

SEMCZUK, M. & SEMCZUK-SIKORA, A. New data on toxic metal intoxication (Cd, Pb, and Hg in particular) and Mg status during pregnancy. *Med. Sci. Monit.*, v. 7, n. 2, p. 332-340, 2001.

SHARMA, K. G.; MANSON, 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. *Eukaryot. Cell.*, v. 1, n. 3, p. 391-400, 2002.

SHIRAISHI, E.; INOUHE, M.; JOHO, M. & TOHOYAMA H. The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper-transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.*, v. 37, p. 79-86, 2000.

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

SOLDATOVIC, D.; MATOVI, V.; VUJANOVIC, D. & STOJANOVIC, Z. Contribution to interaction between magnesium and toxic metals: the effect of prolonged cadmium intoxication on magnesium metabolism in rabbits. *Magnes. Res.*, v. 4, p. 283-288, 1998.

SORIN, A.; ROSAS, G. & RAO, R. PMR1, a Ca²⁺-ATPase in Yeast Golgi, has properties distinct from Sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J. Biological Chemistry*, v. 272, p. 9895–9901, 1997.

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

STOHS, S. J. & BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 18, p. 321-336, 1995.

STROUHAL, M.; KIZEK, R.; VACEK, J.; TRNKOVA, L. & NEMEC, M. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry*, v. 60, p. 29-36, 2003.

STRYER, L. *Biochemistry*. 4. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1997.

STULL, J. T. Ca²⁺-dependent cell signaling through calmodulin activated protein phosphatase and protein kinases minireview Series. *J. of Biological Chemistry*, v. 276, n. 4, p. 2311–2312, 2000.

STURGEON C.M., KEMMER D., ANDERSON H.J., ROBERGE M. Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnol. J.*, v. 1, p. 1289-98, 2006

SZCYPKA, M. S.; WEMMIE, J. A.; MOYE-ROWLEY, W. S. & THIELE, D. J. A yeast metal resistance protein similar similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance associated protein. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 22853-22857, 1994.

TAKITA, Y.; ENGSTROM, L.; UNGERMANN, C. & CUNNINGHAM, K. W. Inhibition of the Ca^{2+} -ATPase Pmc1p by the v-SNARE Protein Nyv1p. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 6200–6206, 2001.

TON, V., MANDAL, D., CORDELIA, V. & RAO, R. Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca^{2+} , Mn^{2+} -ATPase defective in Hailey-Hailey disease. *J. Biol. Chem.* v. 277, p. 6422–6427, 2002.

TON, V. & RAO, R. Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} transporting ATPases. *Am. J. Cell Physiol.*, v. 287, p. 580-589, 2004.

UVERSKY, V. N., LI, J. & FINK, A. L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 44284–44296, 2001.

VATAMANIUK, A. K.; BUCHER, E. A.; WARD, J. T. & REA, P. A. A new pathway for heavy metal detoxification in animals. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 24, p. 20817-20820, 2001.

VIDO, K.; SPECTOR, D.; LAGNIEL, G.; LOPEZ, S.; TOLEDANO, M. B. & LABARRE, J. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 8469-8474, 2001.

WAALKES, M. P. & POIRIER, L. A. *In vitro* cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.75, p. 539-546, 1984.

WANG, Y. & EVANS, R. D. Influence of cadmium concentration on uptake by the freshwater mussel *Ellioptio complata*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, v. 50, p. 2591-2596, 1993.

WANG, C. Y.; SHI, J. D.; YANG, P.; KUMAR, P. G.; LI, Q. Z.; Q.RUN, Q. G.; SU, Y. C.; SCOTT, H. S.; KAO, K. J. & SHE J. X. Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP). *Gene*. v. 306, p. 37-44, 2003.

WILLIAMS, R. J. P. & FRAUSTO DA SILVA, J. R. *The Natural Selection of the Chemical Elements*. Clarendon Press, Oxford, 1996.

WITHOLT, R.; GWIAZDA, R. H. & SMITH, D. R. The neurobehavioral effects of subchronic manganese exposure in the presence and absence of pre-parkinsonism. *Neurotoxicol. Teratol.*, v. 22, p. 851-861, 2000.

WRIGHT, D. A. Cadmium and calcium interactions in the fresh-water amphipod *Gammarus pulex*. *Freshw Biol.*, v.10, p. 123-133, 1988.

YBARRA, G. R. & WEBB, R. Effects of divalent metal cations and resistance mechanisms of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain. *Journal of Hazardous Substance Research.*, v. 2, p. 1-9, 1999.