

Arthur F Siqueira<sup>1</sup>, Zilma MA Cruz<sup>1,2,3</sup>, Suellen Queiroz<sup>1</sup>, Osvaldo JAM Rocha<sup>1,2</sup>, Daniela NES Soares<sup>1,2</sup> & Alessandro C Ramos<sup>1,2</sup>

## Desvendando a H<sup>+</sup>-Pirofosfatase vacuolar e o seu papel na biotecnologia vegetal

Unravelling the vacuolar H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase and its role on plant biotechnology

**Resumo** As proteínas de membrana são de fundamental importância para manter o funcionamento da célula e a homeostase iônica dos seres-vivos. Há uma diversidade de proteínas que ajudam a manter o gradiente iônico entre o meio intra e extracelular, entre as quais, a H<sup>+</sup>-ATPase e a H<sup>+</sup>-pirofosfatase (H<sup>+</sup>-PPase) tem um importante destaque. A H<sup>+</sup>-PPase está presente na membrana do vacúolo das células das plantas e sua principal função é transportar H<sup>+</sup> para o lúmen, criando uma força elétron-motriz que impulsiona o transporte secundário de íons e compostos orgânicos. Esta enzima é diferencialmente regulada em condições de stress conferindo uma maior tolerância das plantas aos fatores bióticos e abióticos. Atualmente, sabe-se que o gene que codifica a H<sup>+</sup>-PPase quando super-expressado, estimula o crescimento vegetal via um maior desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, maior absorção de água e nutrientes. Além disso, uma maior resistência ao stress salino foi observada. Novos estudos são realizados para elucidar os processos fisiológicos causados pela super-expressão da H<sup>+</sup>-PPase objetivando uma possível aplicação na produção vegetal, em solos com baixa fertilidade.

**Palavras-chave** H<sup>+</sup>-PPase, pirofosfatase, AVPI, super-expressão, estresse.

**Abstract** The membrane proteins are of fundamental importance to maintain cell function and homeostasis of life forms. There are a range of proteins that help to maintain intra and extracellular ion gradient, among these has a strong emphasis on the H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup> pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase). The plant H<sup>+</sup>-PPase are present in cell vacuole membrane, witch has the main function to transport H<sup>+</sup>

into the lumen, this ensures the promotion of electro-motive force for secondary transport of ions and organic compounds through the membrane. This enzyme is differentially regulated in conditions of stress. Such conditions were the basis for applied studies in plant production. Up to know, the H<sup>+</sup>-PPase when the gene codifying this enzyme is over-expressed, the plant growth is stimulated by mean greater root development and, consequently, higher absorption of water and nutrients, which promote better resistance to salt stress. Thus, further studies are required to elucidate the physiological processes caused by its overexpression with possible applications in plant production in soils with low fertility.

**Keywords** H<sup>+</sup>-PPase, pyrophosphatase, AVPI, over-expression, stress.

### Introdução

As células gastam aproximadamente 50% do seu total de reserva energética intracelular para manter o gradiente iônico transmembrana (Gaxiola *et al.* 2002). As proteínas que desempenham função em gradientes iônicos foram reveladas por meio de estudos bioquímicos e biofísicos. As bombas são proteínas de membrana que realizam o transporte ativo primário de íons como o H<sup>+</sup> ou Ca<sup>2+</sup> e podem também ser caracterizadas como eletrogênicas ou eletroneutras. O transporte eletrogênico se refere ao transporte do íons transmembrana e envolve a movimentação de cargas através das membranas. Ao passo que, o transporte eletroneutro, como diz o nome, não envolve movimentação de cargas transmembrana. Por exemplo, a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase de células animais transportam três íons Na<sup>+</sup> para cada dois íons K<sup>+</sup> que entram na célula, e como resultado o meio exterior fica positivamente carregado. Na membrana plasmática de plantas, fungos e bactérias, assim como no tonoplasto das plantas e outras endomembranas de plantas e animais, o próton (H<sup>+</sup>) é o principal íon que é transportado eletrogenicamente. A

1 Centro Universitário Vila Velha - UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Bairro Boa Vista, Vila Velha, ES. CEP 29101-770.

2 Mestrado em Ecologia de Ecossistemas

3 [zilma.cruz@terra.com.br](mailto:zilma.cruz@terra.com.br)

H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática é um sistema que gera um gradiente de potencial eletroquímico de H<sup>+</sup> através da membrana plasmática, enquanto a H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar e a H<sup>+</sup>-pirofosfatase (H<sup>+</sup>-PPase) geram o mesmo gradiente transmembranar para o interior do lúmen do vacúolo e também cisternas do Golgi (Taiz & Zeiger, 2002).

Na membrana plasmática das plantas, as mais importantes bombas são as H<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>-ATPases e bombeiam o íon para o meio exterior, ou apoplasto. Conseqüentemente, outro mecanismo é necessário para direcionar a absorção ativa da maioria dos nutrientes, chamado transporte secundário de H<sup>+</sup>. Nele os solutos podem ser transportados pela membrana, a favor de um gradiente eletroquímico, por meio da combinação do H<sup>+</sup> com o íon. Este tipo de co-transporte é denominado de transporte secundário de H<sup>+</sup>. Existem dois tipos de transporte secundário, o simporte onde as duas substâncias se movem na mesma direção e a favor de um gradiente de concentração, e o antiporte em que os íons se movimentam em direções opostas. Entretanto, a energia que dirige esse transporte é proveniente da força próton-motriz, gerada pela hidrólise do ATP (Morsomme & Boutry, 1999). Tipicamente, o transporte pela membrana biológica é energizado por um sistema de transporte ativo primário acoplado a hidrólise de ATP.

---

## As H<sup>+</sup>-ATPases e sua regulação

A H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática possui diversos domínios funcionais. O transporte de H<sup>+</sup> para através da membrana plasmática gera um gradiente de pH e potencial elétrico, que impulsiona o transporte de muitas outras substâncias (íons e moléculas) através do sistema secundário de transporte de H<sup>+</sup>. A H<sup>+</sup>-ATPases e Ca<sup>2+</sup>-ATPases da membrana plasmática de plantas e fungos são membros de uma classe conhecida como ATPases tipo P, as quais são fosforiladas em parte do ciclo catalítico (Taiz, 2002). Em plantas, essas proteínas desempenham outras funções essenciais para o crescimento normal do vegetal como tolerância a sal, regulação do pH intracelular e expansão celular (Morsomme & Boutry, 1999).

Estas H<sup>+</sup>-ATPases são codificadas em uma família multigênica. Cada gene codifica uma isoforma da enzima. Assim como outras enzimas, a H<sup>+</sup>-ATPase é regulada pela concentração de substrato (ATP), pH, temperatura, e outros fatores. Além disso, podem ser reguladas por sinais específicos, tais como luz, hormônios e ataques de patógenos. Esse tipo de regulação é mediado por um domínio auto-inibitório especializado. Se o domínio auto-inibitório é removido através da ação de proteases, a enzima se torna irreversivelmente

ativada como demonstrado por Palmgren et al. (1991). Estes autores, utilizando anticorpos específicos, mostraram que o domínio auto-inibitório da proteína encontra-se na região C-terminal. Jahn et al. (1997), relataram que a proteína 14-3-3 interage diretamente com a região C-terminal e, conseqüentemente, com a H<sup>+</sup>-ATPase. Já a fucocina induz uma interação entre a proteína 14-3-3 e o domínio C-terminal da H<sup>+</sup>-ATPase estimulando a enzima (Sze et al. 1999).

O tonoplasto regula o tráfego de íons e metabólitos entre o citosol e o vacúolo, assim como a membrana plasmática regula a entrada de substâncias na célula. A H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar (também chamada de V-ATPase) difere tanto estruturalmente como funcionalmente da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática. A hidrólise do ATP pela ATPase vacuolar não envolve a formação de um intermediário fosforilado. Devido a este processo de fosforilação da ATPase de membrana plasmática, estas enzimas são altamente inibidas pelo ortovanadato (HVO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), um análogo do fosfato (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), que compete com o fosfato para a fosforilação do ácido aspártico no sítio catalítico da enzima, ou seja o ortovanadato se liga no sítio do fosfato, inibindo a enzima. A alta afinidade da enzima pelo vanadato é atribuída ao fato do íon se assemelhar à estrutura do fosfato. Já as ATPases vacuolares pertencem a uma classe geral de ATPases que estão presentes no sistema de endomembranas de todos os eucarióticos. São grandes complexos enzimáticos de aproximadamente 750 kDa, formados por diferentes subunidades e organizadas no complexo periférico catalítico, VI, e no complexo de canal integrado a membrana, V0. O complexo enzimático opera como pequenos motores rotatórios e são, especificamente, inibidas pela bafilomicina A1 e altas concentrações de nitrato. Entretanto, nenhum destes compostos inibem a ATPase da membrana plasmática (Palmgren et al., 1991; Sze et al. 1999; Taiz & Zeiger, 2002).

Estudos realizados por Morial, et al. (1999), mostraram elevada expressão da H<sup>+</sup>-ATPase nos pêlos radiculares de *Nicotiana glauca*, o que indica ser esta região, o principal local da nutrição mineral. Além disto elevada expressão de genes relacionados a H<sup>+</sup>-ATPase também foi observada na epiderme, no córtex e na endoderme.

Canellas et al. (2002) e Zandonadi et al. (2006), em estudo com ácidos húmicos (AH), mostraram que estes estimulam o desenvolvimento de raízes de *Zea mays*, além de estimular a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática, aparentemente associado com uma habilidade do AH de promover uma expressão desta enzima. Façanha et al. (2001), relataram a bioatividade de AH isolados de estação de tratamento de esgoto e de vermicomposto, onde ambos estimularam a H<sup>+</sup>ATPase de membrana plasmática das raízes de milho e café. Além disto mostraram que a interação planta-AH promoveu uma redistribuição das massas moleculares dessas substâncias, sugerindo uma dinâmica de mobilização de subunidades funcionais dos AH por exsudatos das raízes.

## Regulação da H<sup>+</sup>-Pirofosfatase vacuolar: o futuro do desenvolvimento vegetal

A pirofosfatase (H<sup>+</sup>-PPase) é uma bomba de próton eletrogênica que acidifica o lúmen do vacúolo nas células de plantas (Rea & Poole, 1993). Ela é uma estrutura única que possui três características principais. Primeira: consiste de um único polipeptídeo com massa molecular em torno de 80 kDa. Segunda: a enzima utiliza um substrato de baixo custo denominado pirofosfato ou fosfato inorgânico (PPi). Terceira: essa eficiente bomba de prótons coexiste com a V-ATPase em células de plantas (Taiz, 1992). Esta propriedade é relacionada à função fisiológica da H<sup>+</sup>-PPase. As PPases podem ser divididas em três classes: PPase solúveis, PPase associada a membrana e H<sup>+</sup>-PPase. Somente a H<sup>+</sup>-PPase possui habilidade para transportar prótons através de membranas biológicas (Kieber et al. 1991).

Um estudo sobre o desenvolvimento de frutos de pêra indicou altos níveis de proteína com atividade da H<sup>+</sup>-PPase do tipo I, tanto em frutos jovens como naqueles em estágio de divisão celular (Gaxiola et al. 2007). A localização específica da H<sup>+</sup>-PPase na membrana do vacúolo foi demonstrada em várias espécies de plantas (Rea & Poole, 1993). Ela também foi detectada na membrana plasmática de *Chlamydomonas* (Robinson et al. 1998), mas sua significância fisiológica ainda é incerta. Entretanto, em *Chlamydomonas* existe a possibilidade de que a H<sup>+</sup>-PPase localizada na membrana plasmática seja resultado da fusão da membrana do vacúolo contrátil com a membrana plasmática (Robinson et al. 1998). Além disto, as H<sup>+</sup>-PPases foram identificadas em procariotos, plastídios e mitocôndria de diversos eucariotos e no citosol de células animais e fúngicas. A ocorrência de H<sup>+</sup>-PPases em diferentes grupos de eubactérias e achaeas, nas membranas internas (vacúolo e lisossomo) de plantas superiores e em diversos protistas fotossintéticos e não-fotossintéticos foram relatadas por Drozdowicz & Rea, 2001 e Pérez-Castiñera et al. 2002.

Drozdowicz et al. (1999) clonaram o gene que codifica a H<sup>+</sup>-PPase de arqueobactéria hipertermofílica, *Pyrobaculum aerophilum*. Este é o primeiro relato de H<sup>+</sup>-PPase bacteriana. Ainda que a função fisiológica da H<sup>+</sup>-PPase em *P. aerophilum* seja desconhecida. Robinson et al. 1998, demonstraram a presença de H<sup>+</sup>-PPase e V-ATPase em membranas e em vacúolos de outras espécies de Chlorophytas como *Chlamydomonas reinhardtii*, enquanto que Scott et al. (1998) demonstraram a presença da mesma proteína em acidocalcisoma de *Tripanosoma cruzi*.

As plantas possuem dois tipos filogeneticamente distintos de H<sup>+</sup>-PPases: o tipo I, que depende do K<sup>+</sup> citosólico para a sua atividade e é sensível moderadamente a inibição por Ca<sup>2+</sup>, e o tipo II, que é insensível a K<sup>+</sup> e extremamente sensível a Ca<sup>2+</sup> (Gaxiola, 2007). Foi relatado que a H<sup>+</sup>-PPase vacuolar é inibida

reversivelmente pelo Ca<sup>2+</sup> devido a formação do complexo CaPPi, que é um forte inibidor competitivo como as PPase solúveis (Baykov et al. 1999). O efeito inibitório de Na<sup>+</sup> sobre a H<sup>+</sup>-PPase foi relatado para membranas vacuolares de beterraba vermelha (Rea et al. 1985) e Zhen et al. (1994), relataram que o aminometilenedisfosfonato é um potente inibidor da H<sup>+</sup>-PPase.

Um elegante estudo, combinando análise filogenética e mutagênese sítio-dirigida, demonstrou que a substituição da alanina, na posição 460 da estrutura primária, por uma lisina, converte a H<sup>+</sup>-PPase de *C. hydrogeniformans* dependente de K<sup>+</sup> em uma forma independente do íon. Essa transição aparenta ser devido a uma simples substituição de K<sup>+</sup> pelo grupo NH<sup>3+</sup> do remanescente da lisina e ambos os tipos requerem Mg<sup>2+</sup> como cofator (Gaxiola et al. 2007). O real substrato para H<sup>+</sup>-PPase é o complexo Mg<sup>2+</sup>-PPi (Leigh et al. 1992; Baykov et al. 1993; Rea et al. 1993; Gordon-Weeks et al. 1996) e a enzima purificada requer fosfolípido para a catálise (Maeshima & Yoshida, 1989; Sarafian & Poole, 1989). Os valores aparentes de Km para o Mg<sup>2+</sup> foram descritos como 42 μM (Maeshima, 1991) e 20~23 μM (Gordon-Weeks et al. 1996). Entretanto, o número exato de sítios de ligação do Mg<sup>2+</sup> na H<sup>+</sup>-PPase, ainda é incerto. A ligação do Mg<sup>2+</sup> à H<sup>+</sup>-PPase não só ativa a enzima como também a protege de inativação pelo calor (Gordon-Weeks et al. 1996). O íon potássio também é essencial como cofator para a H<sup>+</sup>-PPase. A subunidade de ligação do Mg-PPi na H<sup>+</sup>-PPase do tonoplasto, aparenta ser o único polipeptídeo que constitui o complexo funcional da enzima (Sarafian et al. 1992).

A energia liberada pela hidrólise do PPi é menor quando comparada à hidrólise do ATP. A real energia liberada pela hidrólise do PPi no citoplasma foi calculado em 27.3 kJ/mol em pH 7.3 (Jiang et al. 1997). Entretanto, a H<sup>+</sup>-PPase vacuolar transporta somente um íon H<sup>+</sup> por uma molécula de PPi hidrolisada, enquanto que a ATPase vacuolar aparenta transportar dois íons de H<sup>+</sup> por ATP hidrolisado. Assim, a energia disponível por íon de H<sup>+</sup> transportado aparenta por ser a mesma, e as duas enzimas aparentam serem capazes de gerar gradientes de H<sup>+</sup> comparáveis.

Existem evidências de que a H<sup>+</sup>-PPase transporta K<sup>+</sup> para o vacúolo. Davies et al. (1992), ao estudarem vacúolos de beterraba, propuseram que a H<sup>+</sup>-PPase funciona como um simporte H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> com a taxa de acoplamento de 1.3H<sup>+</sup> : 1.7K<sup>+</sup> : 1 PPi. Obermeyer et al. (1996), também analisaram vacúolos de *Chenopodium rubrum* e obtiveram evidências para o possível papel da H<sup>+</sup>PPase no transporte de K<sup>+</sup>. Entretanto, existem evidências contraditórias, como a relatada por Sato et al. 1994, que em experimentos com H<sup>+</sup>-PPase reconstituído dentro do proteolipossomo e K<sup>+</sup>, não conseguiram confirmar o transporte de K<sup>+</sup>.

O primeiro cDNA de H<sup>+</sup>PPase foi clonado de *Arabidopsis thaliana* (Sarafian, et al. 1992). A partir de então,

outros cDNAs foram clonados de várias plantas terrestres, como a cevada (Tanaka et al. 1993), beterraba (Kim et al. 1994), tabaco (Lerchl et al. 1995), arroz (Sakakibara et al. 1996), *Vigna radiata* (Nakanishi & Maeshima, 1998), e abóbora (Muruyama et al. 1998). Foram relatadas que H<sup>+</sup>-PPases destas espécies são constituídas de 761 a 771 aminoácidos. Em comparação com H<sup>+</sup>-PPases de plantas terrestres, foram encontrados três segmentos bem conservados em *Chara*, *Acetabularia* e *Rhodospirillum*. O primeiro segmento conservado (CS1) inclui o domínio catalítico para a hidrólise do substrato (DVGADLVGKVE) (Rea & Poole, 1993; Rea et al. 1992), confirmado em estar exposto para o citosol (Takasu et al. 1997), baseado na estrutura tridimensional de PPases solúveis (Cooperman et al. 1992; Rea & Poole, 1993; Takasu et al. 1997; Baykov et al. 1999). O segundo segmento conservado (CS2) também está localizado na alça hidrofílica. O terceiro segmento (CS3), na região carboxiterminal, contém doze resíduos carregados. O CS3, talvez, está exposto para o citosol e desempenha um papel crítico na função catalítica juntamente com o CS1 e o CS2. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) é conhecido como um potente bloqueador da condutância de prótons é reativo com grupos carboxil das regiões hidrofóbicas das proteínas. As H<sup>+</sup>-PPases purificadas foram classificadas como [<sup>14</sup>C]DCCD (Maeshima & Yoshida, 1989; Nore et al. 1991) e inibidas pelo DCCD. A substituição do aminoácido Glu-305 (E305Q e E305D) e Asp-504 (D504N e D504E) interfere na hidrólise e na atividade da bomba de prótons. Dessa forma, foi concluído que o Glu-305 e o Glu-504 participam diretamente na ligação do DCCD e os aminoácidos críticos para a catálise (Zhen et al. 1997). Foi proposto que o sítio de ligação DCCD- (ou NCD-) está próximo do sítio de ligação do Mg<sup>2+</sup>. O aminoácido Glu-749 da H<sup>+</sup>-PPase da abóbora é conservado entre todas as H<sup>+</sup>-PPases estudadas, exceto a do *Rhodospirillum*. (Muruyama et al. 1998).

Foi observado uma alta atividade da H<sup>+</sup>-PPase em membranas vacuolares de tecidos em crescimento em *Vigna radiata*, em comparação com partes maduras do hipocótilo (Maeshima, 1990). Assim, as H<sup>+</sup>-PPases de células em crescimento mantém a força osmótica, suficiente para compensar o efeito da diluição causado pelo influxo de água. Acredita-se que o alto nível de H<sup>+</sup>-PPase nestas células esteja relacionado à acidificação dos vacúolos, em expansão, e ao sistema de transporte secundário que utiliza a força próton-motriz. Esta enzima é considerada a principal bomba de prótons do vacúolo de membranas na maioria dos tecidos jovens. Em contraste, o nível da H<sup>+</sup>-PPase decresce durante o desenvolvimento tecidual, e o nível de V-ATPase permanece constante durante o crescimento e maturação. Como o resultado, a V-ATPase se torna a maior bomba de prótons de membranas vacuolares em tecidos maduros.

Façonha & Méis (1998), estudaram compararam H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase presentes em coleótilos e sementes de *Zea mays*, os resultados mostraram que a H<sup>+</sup>-ATPase é mais ativa que a H<sup>+</sup>-PPase nas vesículas do tonoplasto do coleótilo enquanto nas vesículas da semente ocorre o inverso. Tais resultados podem refletir a significância fisiológica destas enzimas em diferentes tecidos e estágios de maturação.

Em tecidos em desenvolvimento, RNAs, proteínas e celulose são ativamente sintetizados para a construção de células, e como resultado, uma grande quantidade de PPI é produzido como um co-produto destes processos metabólicos. É conhecido que a acumulação de elevadas concentrações de PPI no citosol, inibe as reações de polimerização. Assim, a H<sup>+</sup>-PPase vacuolar recolhe o PPI no citosol e o usa como fonte de energia para o transporte de prótons em vacúolos em expansão (Maeshima, 2000).

O nível de H<sup>+</sup>-PPase em plantas é regulado sobre condições de stress. Kasai et al. (1998), examinaram o efeito de nutrientes mineirais, como K<sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e Ca<sup>2+</sup> na H<sup>+</sup>-PPase em raízes de centeio. Tanto a hidrólise de PPI como o gradiente de transporte de prótons, em plantas crescidas com condições de deficiência mineral, foram três vezes maior do que as plantas crescidas em condições normais. Desde que não haja diferença na quantidade de proteína H<sup>+</sup>-PPase, acredita-se na ativação da H<sup>+</sup>-PPase no centeio, sobre condições de stress de nutrientes. Da mesma forma, a alta atividade da H<sup>+</sup>-PPase resulta em redução do nível de PPI nas raízes em meio com deficiência mineral. Kasai et al. (1998), sugeriram a possibilidade do Ca<sup>2+</sup> ou citoquinina em modular a atividade H<sup>+</sup>-PPase. Rea & Poole (1993), apontaram a importância da H<sup>+</sup>-PPase nas células de plantas sobre stress de anóxia e baixas temperaturas, o que foi confirmado por Carystinos et al. (1995) e Davies et al. (1997), que relataram a possibilidade da H<sup>+</sup>-PPase em substituir a V-ATPase em condições de stress energético, na manutenção do acidez no vacúolo.

---

## Aplicações da pirofosfatase na biotecnologia vegetal

Tanto no ambiente natural, quanto na agricultura, plantas são frequentemente submetidas a estresses ambientais. Alguns fatores ambientais como temperatura do ar, pode se tornar um fator estressante em apenas alguns minutos; outros, como a água disponível no solo, podem levar de dias a semanas, e outros ainda, como a deficiência de minerais no solo pode levar meses para se tornar um fator estressante. O conceito de *stress* é muitas vezes usado imprecisamente, e a terminologia pode ser confusa. *Stress* é usualmente definido como um fator externo que exerce

uma influência de desvantagem para a planta. (Taiz & Zeiger, 2002). O nível da H<sup>+</sup>-pirofosfatase em plantas é regulada sobre condições de estresse (Maeshima, 2000).

A super-expressão da H<sup>+</sup>-pirofosfatase (H<sup>+</sup>PPase), gene AVPI, em *Arabidopsis* resultou no aumento de divisões celulares no início da formação do organismo, hiperplasia (aumento do número celular), e elevou o transporte de auxina (Citado por Gaxiola et al. 2007). Segundo Gaxiola et al. (2007), mudanças na expressão do AVPI afetou a abundância e a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática, alterando o pH do apoplasto e o transporte de auxina em plantas. Além disso, em testes feitos com *Arabidopsis*, resultaram em aumento da tolerância a sal devido ao aumento da absorção e acumulação de íons Na<sup>+</sup> em seus vacúolos e conseqüentemente, uma maior capacidade osmorregulatória. Além disso, as plantas com super-expressão da AVPI revelaram a sua habilidade de resistir à escassez devido, obviamente, a uma dramática expansão do desenvolvimento radicular. Park et al. (2005), realizaram estudos sobre a super-expressão da H<sup>+</sup>-PPase vacuolar AVPI em um cultivo de tomate, visando a agricultura. Estudos bioquímicos e de transporte confirmaram a expressão funcional da proteína recombinante na linhagem dos tomates transgênicos. Mensurações da atividade hidrolítica da H<sup>+</sup>-PPase do tonoplasto de raízes de duas linhagens representativas XAVPID e plantas controle, mostraram que os transgênicos tiveram em média 56% de aumento de sua atividade em relação às plantas controle, enquanto a ATPase do tipo V, não sofreu modificações significativas. Em seguida, as plantas foram submetidas a estresse hídrico, durante um período de 13 dias, resultando em afetação de ambas as plantas (transgênica e controle). Entretanto, as plantas transgênicas demonstraram recuperação após o alívio do stress do déficit de água. Uma consistente explicação para tal resposta, está baseada no aumento do peso seco da raiz nas plantas mutantes. Estes mutantes não apresentaram fenótipos deletérios (ex: redução do crescimento vegetativo, floração, e produção do fruto) durante o seu crescimento e desenvolvimento. Uma possível conseqüência deletéria da super-expressão da H<sup>+</sup>-PPase poderia ser a acumulação de metais tóxicos nas frutas de plantas transgênicas. Li et al. (2005), observaram que alterações na expressão da AVPI produz plantas com típicas variações morfológicas de defeito hormonal. Em *Arabidopsis*, a super-expressão resulta também em maior aumento do número de folhas dispostas em rosetas, aumento significativo da área foliar, aumento do número de células, crescimento da raiz e peso-seco em relação às plantas selvagens.

Estudos realizados em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), realizado por Gaxiola, et al. (1999), mostraram a existência de várias proteínas associadas à tolerância e

desintoxicação de sal: canais de clorídeo, bombas de H<sup>+</sup> e antiporters Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Sendo assim, pode ser sugerido, analogicamente, que o mecanismo de desintoxicação em leveduras e em plantas é similar. Ramos et al. (2005), realizaram estudos associando a atividade atpásica e pirofosfatásica com inoculação de fungos micorrízicos (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*) em raízes de milho. Observaram que as raízes de milho, potencialmente colonizadas, tiveram atividade atpásica e pirofosfatásica estatisticamente superior ao do tratamento não inoculado. Sendo assim, pode ser feita analogia entre micorrização e plantas mutantes AVPI (H<sup>+</sup>PPase super-expressada), pois ambas causam efeitos semelhantes nos indivíduos. Dados moleculares relatam a capacidade do fungo micorrízico arbuscular de induzir a expressão de gene H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática na planta hospedeira (Murphy et al. 1996; Gianinazzi-Pearson et al. 2000; Ferrol et al. 2002; Krajinski et al. 2002).

Fica claro, que a H<sup>+</sup>-PPase do vacúolo de plantas é a enzima mais atrativa, segundo três pontos de vista, especialmente, a relação estrutura-função como um modelo de bomba de prótons, a evolução molecular como um marcador enzimático de vacúolo de plantas, e a relação fisiológica do vacúolo de plantas.

A H<sup>+</sup>-PPase está localizada na membrana do vacúolo, com poucas exceções, como já relatado. Não há informação disponível à respeito da(s) seqüência(s) de sinal de vários gêneros de proteínas de membrana. Todos os vacúolos de plantas, preparados de diversas espécies examinadas, demonstraram conter H<sup>+</sup>-PPase. Assim, esta enzima é presumidamente um elemento essencial de vacúolos gigantes nas células de plantas. Durante a evolução dos organismos, espécies de plantas ancestrais que já tinham H<sup>+</sup>-ATPase, passaram a ter a H<sup>+</sup>-PPase em conjunto. Provavelmente, a aquisição da H<sup>+</sup>-PPase permite a expansão dos vacúolo das células de plantas (Maeshima, 2000).

Destacamos que são necessários mais estudos relacionados a H<sup>+</sup>-PPase a as bombas de modo geral, para que se conheçam todos os benefícios de aplicações de plantas super-expressadas no ambiente.

---

## Referências

- Baykov AA, Bakuleva NP & Rea PA (1993) Steady-state kinetics of substrate hydrolysis by vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase: a simple three-state model. **European Journal of Biochemistry** 217: 755-762.
- Baykov AA, Cooperman BS, Goldman A & Lahti R (1999) Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. **Progress in Molecular and Subcellular Biology** 23: 127-150.

- Britten CJ, Turner JC & Rea PA (1989) Identification and purification of substrate-binding subunit of higher plant H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase. **FEBS Letters** 256: 200-206.
- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL & Façanha AR (2002) Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase Activity in Maize Roots. **Plant Physiology** 130: 1951-1957.
- Carystinos GD, MacDonald HR, Monroy AF, Dhindsa RS & Poole RJ (1995) Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. **Plant Physiology** 108: 641-649.
- Cooperman BS, Baykov AA & Lahti R (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. **Trends in Biochemical Sciences** 17: 262-266.
- Davies JM, Darley CP & Sanders D (1997) Energetics of the plasma membrane pyrophosphatase. **Trends in Plant Sciences** 2: 9-10.
- Davies JM, Poole RJ, Rea PA & Sanders D (1992) Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89: 11701-11705.
- Davies JM, Poole RJ & Sanders D (1993) Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies. **Biochimica et Biophysica Acta** 1141: 29-36.
- Drozdowicz YM & Rea PA (2001) Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatases: from evolutionary backwaters into mainstream. **Trends in Plant Science** 6: 206-211.
- Drozdowicz YM, Lu YP, Patel V, Fitz-Gibbon S, Miller JH & Rea RA (1999) A thermostable vacuolar-type membrane pyrophosphatase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum*: implications for the origins of pyrophosphate-energized pumps. **FEBS Letters** 460: 505-512.
- Façanha AR & Méis L (1998) Reversibility of H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase in Tonoplast Vesicles from Maize Coleoptiles and Seeds. **Plant Physiology** 116: 1487-1495.
- Façanha AR, Façanha ALO, Olivares FL, Guridi F, Santos GA, Velloso ACX, Rumjanek VM, Brasil F, Schripsema J, Braz-Filho R, Oliveira MA & Canellas LP (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37: 1301-1310
- Ferrol N, Pozo MJ, Antelo M & Azcón-Aguilar C (2002) Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression in tomato plants. **Journal of Experimental Botany** 53: 1683-1687.
- Gaxiola RA, Fink GR & Hirschi KD (2002) Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. **Plant Physiology** 129: 967-973.
- Gaxiola RA, Palmgren MG & Schumacher K (2007) Plant proton pumps. **FEBS Letters** 581: 2204-2214.
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL & Fink GR (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 96: 1480-1485.
- Gianinazzi-Pearson V, Arnould C, Oufattole M, Arango M & Gianinazzi S (2000) Differential activation of H<sup>+</sup>-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. **Planta** 211: 609-613.
- Gordon-Weeks R, Steele SH & Leigh RA (1996) The role of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates and activators of the vacuolar H<sup>+</sup>-pumping inorganic pyrophosphatase (studies using ligand protection from covalent inhibitors). **Plant Physiology** 111: 195-202.
- Jahn T, Fuglsang AT, Olosson A, Brüntrup IM, Collinge DB, Volkmann D, Sommarin M, Palmgren MG & Larsson C (1997) The 14-3-3 protein interacts directly with the c-terminal region of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **The Plant Cell** 9: 1805-1814.
- Kasai M, Nakamura N, Kudo N, Sato H, Maeshima M & Sawada S (1998) The activity of the root vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in rye plants grown under conditions deficient in mineral nutrients. **Plant Cell Physiology** 39: 890-894.
- Kim Y, Kim EJ & Rea PA (1994) Isolation and characterization of cDNAs encoding the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of *Beta vulgaris*. **Plant Physiology** 106: 375-382.
- Krajinski F, Hause B, Gianinazzi-Pearson V & Franken P (2002) Mth1, a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. **Plant Biology** 4: 754-761.
- Leigh RA, Pope AJ, Jennings IR & Sanders D (1992) Kinetics of the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase from higher plants. The role of magnesium, pyrophosphate and their complexes as substrates, activators and inhibitors. **Plant Physiology** 100: 1698-1705.
- Lerchl J, König S, Zrenner R & Sonnewald U (1995) Molecular cloning, characterization and expression analysis of isoforms encoding tonoplast-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase in tobacco. **Plant Molecular Biology** 29: 833-840.
- Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL, Krizek B, Murphy AS, Gilroy S & Gaxiola R (2005) Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase AVPI regulates auxin-mediated organ development. **Science** 310: 121-125.
- Long AR, Williams LE, Nelson SJ & Hall JL (1995) Localization of membrane pyrophosphatase activity in *Ricinus communis* seedlings. **Journal of Plant Physiology** 146: 629-638.
- Maeshima M & Yoshida S (1989) Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. **Journal of Biological Chemistry** 264: 20068-20073.
- Maeshima M (1990) Development of vacuolar membranes during elongation of cells in mung bean hypocotyls. **Plant Cell Physiology** 31: 311-317.
- Maeshima M (1991) H(+)-translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. Inhibition by Ca<sup>2+</sup>, stabilization by Mg<sup>2+</sup> and immunological comparison with other inorganic pyrophosphatases. **European Journal of Biochemistry** 196: 11-17.
- Maeshima M (2000) vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. **Biochimica et Biophysica Acta** 1465: 37-51.
- Maruyama C, Tanaka Y, Mitsuda NT, Takeyasu K, Yoshida M & Sato MH (1998) Structural studies of the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase: sequence analysis and identification of the

- residues modified by fluorescent cyclohexylcarbodiimide and maleimide. **Plant Cell Physiology** 39: 1045-1053.
- Moriau L, Michelet B, Bogaerts P, Lmabert L, Michel A, Oufattole M & Boutry M (1999) Expression analysis of two gene subfamilies encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Nicotiana glumbaginifolia* reveals the major transport functions of this enzyme. **The Plant Journal** 19: 31-41.
- Morsomme P & Boutry M (1999) The plant membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta** 1465: 1-16.
- Murphy PJ, Langridge P, Smith SE (1996) Cloning plant genes differentially expressed during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist** 135: 291-301.
- Nakanishi Y & Maeshima M (1998) Molecular cloning of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of Mung Bean. **Plant Physiology** 116: 598-597.
- Nore BF, Sakai-Nore Y, Maeshima M, Baltscheffsky M & Nyrén P (1991) Immunological cross-reactivity between proton-pumping inorganic pyrophosphatases of widely phylogenetic separated species. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 181: 962-967.
- Obermeyer G, Sommer A & Bentrup F-W (1996) Potassium and voltage dependence of the inorganic pyrophosphatase of intact vacuoles from *Chenopodium rubrum*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1284: 203-212.
- Palmgren MG, Sommarin M, Serrano R & Larsson C (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the c-terminal region of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of Biological Chemistry** 266: 20470-20475.
- Park S, Li J, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang H, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD & Gaxiola RA (2005) Up-regulation of H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-Ppase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 102: 18830-18835.
- Pérez-Castiñeira JR, López-Marquéz RL, Villalba JM, Losada M & Serrano A (2002) Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 99: 15914-15919.
- Ramos AC, Martins MA & Façanha RA (2005) Atividade atpásica e pirofosfatásica em microcromossomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 29: 207-213
- Rea PA & Poole RJ (1985) Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Tonoplast Vesicles. **Plant Physiology** 77: 46-52
- Rea PA & Poole RJ. (2000) Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 44: 157-180.
- Rea PA, Kim Y, Sarafian V, Poole RJ, Davies JM & Sanders D (1992) Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. **Trends in Biochemical Sciences** 17: 348-353.
- Robinson DG, Hoppenrath M, Oberbeck K, Luykx P & Ratajczak R (1998) Localization of pyrophosphatase and V-ATPase in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Botanica Acta** 111: 108-122.
- Sakakibara Y, Kobayashi H & Kasamo K (1996) Solation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase isoforms from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology** 31: 1029-1038.
- Sarafian V & Poole RJ (1989) Purification of an H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase from vacuole membranes of Red Beet. **Plant Physiology** 91: 34-38.
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ & Rea PA (1992) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy Sciences USA** 89: 1775-1779.
- Sato MH, Kasahara M, Ishii N, Homareda H, Matsui H, Yoshida M (1994) Purified vacuolar inorganic pyrophosphatase consisting of a 75-kDa polypeptide can pump H<sup>+</sup> into reconstituted proteoliposomes. **Journal of Biological Chemistry** 269: 6725-6758.
- Scott DA, Souza W de, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SNJ & Docampo R (1998) Presence of a plant-like proton pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry** 273: 22151-22158.
- Sze H, Li X & Palmgren MG (1999) Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. **The Plant Cell** 11: 677-689.
- Taiz L & Zeiger E (2002) **Plant Physiology**. 3ed. Sinauer.
- Taiz L (1992) The plant vacuole. **Journal of Experimental Biology** 172: 113-122.
- Takasu A, Nakanishi Y, Yamauchi T & Maeshima M (1997) Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of Mung Bean with peptide antibodies **Journal of Biochemistry** 122: 883-889.
- Tanaka Y, Chiba K, Maeda M & Maeshima M (1993) Molecular cloning of cDNA for vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase in *Hordeum vulgare*. **Biochemistry and Biophysics Research Communication** 190: 1110-1114.
- Zandonadi DB, Canellas LP & Façanha AR (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps **Planta** 225:1583-1595.
- Zhen RG, Baykov AA, Bakuleva NP & Rea PA (1994) Aminomethylenediphosphonate: a potent type-specific inhibitor of both plant and phototrophic bacterial H<sup>+</sup>-pyrophosphatases. **Plant Physiology** 104: 153-159.