UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOQUÍMICA)

LAYLA FARAGE MARTINS

**Análise do perfil de expressão de serina/treonina
fosfatases e prospecção da função biológica para algumas
dessas enzimas em *Dictyostelium discoideum***

- São Paulo -

Data de Depósito na SPG: 11/11/2010

LAYLA FARAGE MARTINS

**Análise do perfil de expressão de
serina/treonina fosfatases e prospecção da
função biológica para algumas dessas
enzimas em *Dictyostelium discoideum***

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutora em Ciências, área Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva

- São Paulo -

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO DE TODO OU PARTE DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO DO CONJUNTO DAS QUÍMICAS

Martins, Layla Farage/Farage, Layla

Análise do perfil de expressão de serina/treonina fosfatases e prospecção da função biológica para algumas dessas enzimas em *Dictyostelium discoideum* / Layla Farage Martins. --São Paulo, 2010.

Orientadora: Aline Maria da Silva.

160 f.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica.

Descritores: 1. Serina/treonina proteínas fosfatases. 2. Resposta a estresse. 3. Interação proteína-proteína. 4. Perfil de expressão gênica. 5. *Dictyostelium discoideum*. 6. Ameba social. I. da Silva, Aline Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). III. Título.

**“Análise do perfil de expressão de serina/treonina fosfatases e
prospecção da função biológica para algumas dessas enzimas
em *Dictyostelium discoideum*”**

LAYLA FARAGE MARTINS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado (a) por:

Profa. Dra. Aline Maria da Silva
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. Fábio Luis Forti
IQ - USP

Profa. Dra. Débora Schechtman
IQ - USP

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman
FCFRP - USP

Prof. Dr. Hernan Francisco Terenzi
UFSC

SÃO PAULO
13 DE DEZEMBRO DE 2010

Dedico...

**Aos meus pais, Soraya e Alfredo, a minha irmã, Mariana e ao meu
marido, Rafael, que com todo o amor e carinho não mediram esforços
para me incentivar.**

Agradeço...

♥ A Deus por sempre atender as minhas preces, me encaminhando para as melhores decisões e por colocar anjos no meu caminho onde quer que eu esteja.

♥ A Profa. Aline Maria da Silva pelo ótimo acolhimento, pela orientação atenciosa e paciente conduzida com grande competência. Pela amizade e preocupação maternas. Por representar um exemplo como profissional e pessoa, não hesitando em compartilhar seus conhecimentos e cedendo ótimas oportunidades para meu crescimento profissional. Por muitas vezes me fazer acreditar em mim mesma, dando crédito ao meu trabalho e opiniões.

♥ Aos meus eternos orientadores Profa. Lucia Mendonça-Previato e Prof. José Osvaldo Previato pela imensa amizade e carinho, por me recomendarem à Profa. Aline e sempre me acompanharem e aconselharem mesmo à distância.

♥ A dedicação e participação incansáveis do meu amado marido e grande companheiro Rafael da Silva Siqueira. Pelo incentivo constante e compreensão em todos os momentos.

♥ A minha amada mãe, Soraya Farage Martins e ao meu pai, Alfredo Perrotta Martins, pelo amor, conselhos e apoio incondicionais que serviram como alicerces para a minha trajetória e por sempre se fazerem presentes.

♥ A minha amada irmã, Mariana Farage Martins, em quem eu me espelho e me orgulho muito. Por estimular constantemente o meu interesse pela ciência, pela troca de experiências e pela preocupação fraternal de sempre.

♥ Aos meus amados e fiéis amigos, Daniela Gonzalez-Kristeller, Andréa Cristina Fogaça e Alexandre Sanchez pelo carinho, conselhos, ensinamentos, companheirismo e mimos. Por me fazerem sentir acolhida, amada e segura longe da minha terra natal.

♥ Ao querido Renato Astolfi Raposo pelo carinho, por me passar tranquilidade e pela ótima convivência.

♥ A querida Daniela Beton pela amizade e por me auxiliar em vários experimentos.

♥ As amigas Luciana Mantzouranis e Erica Michelle pela atenção e auxílio incondicionais durante todo o doutoramento.

♥ Aos colegas de laboratório Patrícia Pessoa da Silva, Paulo A. Zaini, Paulo de Paiva R. Amaral pelo convívio agradável e apoio.

- ♥ Ao apoio técnico, amizade e grande carinho de Marivon Pereira e Alexandre Sanchez.
- ♥ Aos professores Suely Lopes Gomes, Sergio Verjovski-Almeida, Walter Terra, Maria Júlia Manso Alves e Glaucia Mendes Souza e aos colegas desses laboratórios por gentilmente compartilharem aparelhos e reagentes.
- ♥ Ao meu querido aluno Oséias Junior por me ajudar muito nos momentos finais da tese.
- ♥ Ao professor Fabio Nakano pela ajuda com os *heat maps*.
- ♥ Aos professores Renato Mortara e Ivan Schumacher por me ajudarem nos experimentos de microscopia confocal e de fluorescência, respectivamente. Ao professor Fabio Luis Forti por me ajudar com a irradiação gama. A professora Nadja Cristhina de Souza Pinto pelas conversas sobre vias em resposta a dano de DNA e por ceder bleomicina.
- ♥ Aos “cafês com bobagem” da tarde e da manhã com participação dos “glaucios” e “alinios” que proporcionaram eventos de descontração, muitas doses de cafeína + calorias, além de discussões científicas produtivas; sendo primordiais para a higiene mental diária e para o surgimento de boas idéias.
- ♥ Ao grupo dos seminários em microbiologia molecular pelas sugestões e críticas construtivas.
- ♥ Aos meus maravilhosos avós Betinha, Shirley e Elias por rezarem para mim todos os dias e me incentivarem com muita dedicação e carinho.
- ♥ A família Farage Martins e Lopes Siqueira pela cumplicidade e pelo tratamento anti-estresse a base de passeios e risadas.
- ♥ A Lucy Navarro pelos sequenciamentos e aconselhamentos.
- ♥ A Célia Braga pelo inestimável auxílio na imunização e sangria dos camundongos.
- ♥ Ao funcionários do biotério do IQUSP pela eficiência.
- ♥ Ao Francisco Divino e Jailton dos Santos, do Setor de Xerox, pela simpatia e eficiência.
- ♥ Aos secretários da Secretaria de Pós-Graduação pela atenção e presteza.
- ♥ A FAPESP, CNPq e CAPES pelo patrocínio financeiro durante todo o trabalho.

RESUMO

Martins, L.F. **Análise do perfil de expressão de serina/treonina fosfatases e prospecção da função biológica para algumas dessas enzimas em *Dictyostelium discoideum*.** 2010. 160p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

A fosforilação reversível de proteínas em resíduos de serina e treonina, catalisada por quinases e fosfatases desempenha papel chave na regulação do crescimento e na diferenciação celular em eucariotos. As serina/treonina proteínas fosfatases (PSTPs) são atualmente divididas em três famílias denominadas PPP (*PhosphoProtein Phosphatase*), PPM (*Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent*) e FCP/SCP (*RNA polymerase II CTD phosphatase*), sendo que os membros da família PPP são, frequentemente, holoenzimas compostas de uma subunidade catalítica associada a uma ou mais subunidades reguladoras, as quais definem a função, localização e especificidade ao substrato da fosfatase. Neste trabalho, analisamos, através de RT-qPCR, o perfil de expressão dos genes codificadores de subunidades catalíticas de PPPs de *Dictyostelium discoideum* (PP1c, PP2Ac, PP4c, PP4c-like, PP6c e PP5c) e de 16 potenciais parceiros moleculares de algumas destas subunidades catalíticas, tais como DdI-2 e DdI-3, sabidamente inibidores da PP1c. Em resposta ao estresse térmico de células da fase de crescimento, detectamos o aumento dos níveis de transcritos de PP4c e PP6c e também de DdI-2, DdI-3 e DDB_G0292194, esta última, uma proteína de função desconhecida que interage com a PP1c em ensaios de duplo-híbrido em leveduras. Por outro lado, durante o estresse hiper-osmótico observamos a diminuição dos níveis de transcritos de quase todos os genes analisados com exceção de *DdI-2* e *DDB_G0292194*. O nível de expressão de *DdPP1c*, *DdI-2*, *DdI-3* e *DDB_G0292194* também foi analisado em resposta ao estresse oxidativo e apenas o *DDB_G0292194* foi induzido nesta condição. Os genes de PP1c, PP4c, PP5c e PP6c são expressos durante todo o ciclo de vida de *D. discoideum*, mas a expressão de alguns dos genes analisados aumenta em uma fase definida do ciclo de desenvolvimento como é o caso de *DDB_G0292194* que tem níveis de transcritos aumentados na fase de agregação. Este gene codifica uma proteína hipotética de 559 aminoácidos, que apresenta um domínio FHA (*ForkHead-Associated*) em sua região aminoterminal, além de uma sequência similar ao motivo consenso de ligação à PP1c. Ensaios no sistema de duplo-híbrido em leveduras confirmaram que a interação entre *DDB_G0292194* e *DdPP1c* independe do domínio FHA. Verificamos, também, que o mutante nocaute de *DDB_G0292194* apresenta uma morfologia alterada em condições padrões de cultivo, tanto na fase de crescimento como durante o desenvolvimento, além de uma maior sensibilidade ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio quando comparado à linhagem selvagem. Em conjunto, nossos resultados evidenciam a importância das PPPs na resposta a diferentes tipos de estresse e para o crescimento e desenvolvimento de *D. discoideum*.

Palavras chave: Serina/treonina proteínas fosfatases, resposta a estresse, interação proteína-proteína, perfil de expressão gênica, *Dictyostelium discoideum*, ameba social.

ABSTRACT

Martins, L.F. **Analysis of serine/threonine phosphatases expression profile and biological function prospection for some of these enzymes in *Dictyostelium discoideum***. 2010. 160p. PhD thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Reversible phosphorylation of proteins on serine and threonine residues, catalyzed by kinases and phosphatases plays a key role in growth and cell differentiation regulation in eukaryotes. Protein serine/threonine phosphatases (PSTPs) are currently divided into three families named PPP (Phosphoprotein Phosphatase), PPM (Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent) and FCP/SCP (RNA polymerase II CTD phosphatase). The PPP family members are often holoenzymes composed of a catalytic subunit associated with one or more regulatory subunits, which define function, localization and substrate specificity of the phosphatase. In this work, we have examined, by RT-qPCR, the expression profile of genes encoding PPP catalytic subunits of *Dictyostelium discoideum* (PP1c, PP2Ac, PP4c, PP4c-like, PP6c and PP5c) and 16 potential molecular partners for some of these catalytic subunits, such as DdI-2 and DdI-3, both known as PP1c inhibitors. In response to heat stress of growth phase cells, we detected increased levels of transcripts of PP4c and PP6c as well as of DdI-2, DdI-3, and DDB_G0292194, the latter a protein of unknown function that interacts with PP1c in yeast two-hybrid assays. Moreover, during the hyperosmotic stress we observed decreased transcript levels of nearly all genes examined except *DdI-2* and *DDB_G0292194*. The expression level of *DdPP1c*, *DdI-2*, *DdI-3* and *DDB_G0292194* was also analyzed in response to oxidative stress and only *DDB_G0292194* was induced in this condition. PP1c, PP4c, PP5c and PP6c genes are expressed throughout growth and development of *D. discoideum* while transcript levels of some the analysed genes were increased at a defined stage of the developmental cycle as in the case of *DDB_G0292194*, which increased during aggregation. This gene encodes a hypothetical protein of 559 amino acids bearing a FHA (ForkHead-Associated) domain in its aminoterminal region and a sequence matching the PP1c binding consensus motif. Yeast two-hybrid assays confirmed that *DDB_G0292194* and *DdPP1c* interaction does not depend on FHA domain. We also found that *DDB_G0292194* knockout mutant exhibits an altered morphology on standard growth and developmental conditions and shows an increased sensitivity to oxidative stress induced by hydrogen peroxide in comparison to the wild type strain. Taken together, our results highlight the importance of PPPs in the response to different types of stress and for growth and development of *D. discoideum*.

Keywords: Protein serine/threonine phosphatases, stress response, protein-protein interaction, gene expression profile, *Dictyostelium discoideum*, social amoebae

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASK: *apoptosis signal-regulating kinase*
ATM: *ataxia telangiectasia mutated*
ATR: quinase relacionada a ATM e Rad3
BLASTp: *Basic Local Alignment Search Tool* (para sequência de aminoácidos)
BSA: albumina de soro bovino
cAMP: 3',5' monofosfato cíclico de adenosina
Cdc25: *cell division cycle-25*
CDK: *cyclin-dependent kinase*
cDNA: DNA complementar
CDS: sequência codificadora
Cep170: *centrosomal protein of 170kDa*
DAPI: 4',6-diamino-2-aminoindol-diidrocloreto
DARPP-32: *dopamine and cAMP-regulated 32kD phosphoprotein*
Dd: *Dictyostelium discoideum*
DdI-2: inibidor-2 da PP1 de *Dictyostelium discoideum*
DdI-3: inibidor-3 da PP1 de *Dictyostelium discoideum*
DEPC: dietilpirocarbonato
DNA-PKcs: proteína quinase dependente de DNA
DNase: desoxirribonuclease
dNTP: desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato
DO: densidade óptica
DSP: fosfatase de dupla-especificidade
DSPK: quinase de dupla-especificidade
DTT: ditionitrito
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
EGTA: ácido etilenoglicol-bis-(beta-aminoetiléter)N,N'-tetracético
ERK: *Extracellular-signal regulated kinase*
EST: *expressed sequence tag*
FCP/SCP: *TFIIF-associating component of RNA polymerase II CTD phosphatase/small CTD phosphatase* (subfamília das PSTPs)
GADD34: *Growth-Arrest and DNA-Damage-inducible protein 34*
GSK3: *Glycogen synthase kinase-3*
HEAT: *Huntingtin-Elongation A subunit-TOR*
HK: histidina quinases

HSP: Proteínas de choque térmico

I-1, I-2 e I-3: inibidores do tipo 1, 2 e 3 da PP1

IPTG: isopropil- β -D-galactopiranosídeo

LiOAc: acetato de lítio

LMW: *low-molecular-weight* (subfamília das PTPs)

MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico

MYPT: *myosin phosphatase targetting subunit*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NIPP-1: *nuclear inhibitor of PP1*

ORF: *Open Read Frame*

pb: pares de base

PCR: reação em cadeia da polimerase

PEG: polietileno glicol

PFAM: *Protein families database*

PIPES: ácido (1,4-piperazina)-dietanosulfônico

PK: proteína quinase

PKA: proteína quinase dependente de cAMP

Plk: *polo-like kinase*

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila

PNUTS: *Phosphatase Nuclear Targeting Subunit*

PP: proteína fosfatase

PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 e PP7: PPs dos tipos 1, 2A, 2B, 4, 5, 6 e 7

PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 e PP7: PPs dos tipos 1, 2A, 2B, 4, 5, 6 e 7

PP1c, PP2Ac, PP2Bc...: subunidades catalíticas das respectivas PPs

PP2C: PP do tipo 2C

PPM: *Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent* (subfamília das PPs)

PPM: *Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent* (subfamília das PSTPs)

PPP: *Phosphoprotein Phosphatase* (subfamília das PSTPs)

PSI BLAST: *Position-Specific Iterated BLAST*

PSTP: serina/treonina proteína fosfatase

PTK: proteína tirosina quinase

PTP: proteína tirosina fosfatase

qPCR: PCR quantitativo

rDdl-3: Ddl-3 recombinante

RNAi: RNA de interferência

RNAse: Ribonuclease A

ROS: espécies reativas de oxigênio

rpm: rotações por minuto

RPTP: PTP do tipo receptor

RT: transcrição reversa

RT-PCR: PCR precedido por RT

RT-qPCR: qPCR precedido por RT

SAPs: *SIT4 associated proteins*

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SNF: *Sucrose Non-Fermenting*

TBS: Tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 contendo NaCl 150 mM

TCA: ácido tricloro-acético

TE: Tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 contendo EDTA 1mM

T_m: temperatura de fusão

TOR: *target of rapamycin*

TPR: repetições de tetratricopeptídeo

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

U: unidade de atividade enzimática

X-β-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

Sumário

1. Introdução	14
1.1. Serina/treonina proteínas fosfatases	14
1.2. Serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1)	18
1.3. Serina/treonina fosfatases do tipo 2A (PP2A), 4 (PP4) e 6 (PP6)	23
1.4. Serina/treonina fosfatase do tipo 5 (PP5)	29
1.5. <i>Dictyostelium discoideum</i> como organismo modelo	30
1.6. Fosforilação reversível em <i>D. discoideum</i>	37
1.7. Vias de sinalização de resposta a estresses em <i>D. discoideum</i>	41
2. Objetivos	47
3. Procedimentos experimentais	49
3.1. Procedimentos experimentais utilizando <i>D. discoideum</i>	49
3.1.1. Condições de manutenção e cultivo de células	49
3.1.2. Carenciamento de <i>D. discoideum</i>	50
3.1.3. Indução de estresse térmico, osmótico e oxidativo	51
3.1.4. Indução de dano ao DNA com bleomicina e irradiação gama	51
3.1.5. Avaliação da viabilidade celular	52
3.1.6. Curva de crescimento	52
3.1.7. Microscopia de células fixadas de <i>D. discoideum</i>	52
3.1.8. Transfecção de DNA por eletroporação	53
3.1.9. Preparação de DNA genômico	54
3.1.10. Minipreparação de DNA genômico de clones para análise por PCR	55
3.1.11. Preparação de RNA total	55
3.2. Procedimentos experimentais utilizando <i>Escherichia coli</i>	56
3.2.1. Manutenção e cultivo das bactérias	56
3.2.2. Preparo de bactérias competentes para transformação	57
3.2.3. Transformação de bactérias por choque térmico	57
3.2.4. Preparação de plasmídeos em pequena escala	58
3.2.5. Preparação de plasmídeos em larga escala	58
3.3. Procedimentos experimentais utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
3.3.1. Manutenção e cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	59
3.3.2. Transformação de leveduras em pequena escala	60
3.3.3. Ensaio de interação no sistema duplo-híbrido utilizando diluição seriada	60
3.4. Manipulação e análise de ácidos nucleicos	61
3.4.1. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído	61
3.4.2. Transferência de RNA para membrana de náilon (<i>Northern blot</i>) ...	61
3.4.3. Reação de polimerase em cadeia (PCR)	62
3.4.4. PCR semiquantitativa ou quantitativa em tempo real precedida por transcrição reversa	62
3.4.5. Eletroforese de DNA em gel de agarose	65
3.4.6. Transferência de DNA para membranas de náilon (<i>Southern blot</i>) ..	65
3.4.7. Preparação de sonda de DNA radioativa	66
3.4.8. Hibridização de DNA ou RNA com sonda radioativa	67
3.4.9. Digestão de DNA com enzimas de restrição	67
3.4.10. Eluição de fragmentos de DNA	67
3.4.11. Sequenciamento automatizado de DNA	67
3.4.12. Oligonucleotídeos para sequenciamento e PCR	68
3.4.13. Descrição das construções plasmidiais	68

3.5. Manipulação e análise de proteínas	78
3.5.1. Obtenção do DdI-3 recombinante (rDdI-3)	78
3.5.2. Obtenção do DdI-2 recombinante (rDdI-2)	79
3.5.3. Obtenção do DDB_G0292194_T recombinante	80
3.5.4. Purificação da proteína DdI-3 e DdI-2 recombinante a partir da fração solúvel	80
3.5.5. Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	81
3.5.6. Transferência eletroforética de proteínas	82
3.5.7. Detecção imunológica de proteínas	82
3.5.8. Imunização de coelhos para obtenção de anticorpo policlonal	83
3.5.9. Imunização de camundongos para obtenção de anticorpo policlonal	84
4. Resultados e Discussão	85
4.1. Avaliação da viabilidade de <i>D. discoideum</i> durante os estresses térmico, hiper-osmótico e oxidativo	85
4.2. Perfil de expressão de genes de subunidades catalíticas de PPPs e de suas potenciais subunidades reguladoras	87
4.2.1. Perfil de expressão na resposta ao estresse térmico	90
4.2.2. Perfil de expressão no estresse hiper-osmótico	95
4.2.3. Perfil de expressão no estresse oxidativo	99
4.2.4. Perfil de expressão ao longo do desenvolvimento	101
4.2.5. Análise do perfil de expressão proteico de DdI-3 e DdI-2 em <i>D.</i> <i>discoideum</i>	104
4.3. Caracterização da ORF hipotética DDB_G0292194	107
4.3.1. Clonagem da sequência codificadora de DDB_G0292194 para expressão recombinante em bactéria	112
4.3.2. Avaliação da interação de DDB_G0292194ΔFHA com DdPP1c através de ensaios de duplo-híbrido em leveduras	116
4.3.3. Obtenção de linhagens nocautes para DDB_G0292194	119
4.3.4. Caracterização morfológica do mutante ΔDDB_G0292194	126
4.3.5. Análise do papel de DDB_G0292194 na resposta a estresses	130
5. Considerações Finais	137
6. Referências Bibliográficas	139
Anexos	i
Figuras Suplementares	i
Material Suplementar	xi
1. Expressão recombinante de DdI-3	xi
2. Expressão recombinante de DdI-2	xvi
3. Preparação dos anti-soros anti-rDdI-3 e anti-rDdI-2	xvii
Súmula Curricular	xxii

1. Introdução

1.1. Serina/treonina proteínas fosfatases

As células apresentam diferentes mecanismos para modificar, de modo reversível, as funções de suas proteínas. Um destes é a fosforilação reversível de aminoácidos, catalisada por proteínas quinases e fosfatases, que afeta de 30-70% das proteínas celulares, podendo ocorrer em resíduos de tirosina, serina, treonina, cisteína, arginina, lisina, aspartato, glutamato e histidina. A fosforilação em resíduos de serina e treonina é predominante em células eucarióticas e desempenha papel chave na regulação de diversas vias de sinalização, tais como aquelas relacionadas à mitose, apoptose, transcrição e tradução (Walsh, 2006; Moorhead *et al.*, 2009; Virshup e Shenolikar, 2009).

O número de genes codificadores de tirosina quinases e tirosina fosfatases em mamíferos é de aproximadamente 100 em cada caso. No entanto, o genoma de mamífero codifica apenas 40 serina/treonina proteínas fosfatases (PSTP) um número bem abaixo dos 400 genes de serina/treonina quinases (Moorhead *et al.*, 2007). Possivelmente esta diferença numérica entre genes de serina/treonina quinases e de serina/treonina fosfatases se deva ao fato de que as quinases se diversificaram por duplicação gênica e subsequente especiação enquanto que as fosfatases se diversificaram através da formação de diferentes complexos protéicos ao longo da evolução (Hubbard e Cohen, 1993; Cohen, 1997; Ceulemans e Bollen, 2004).

Critérios bioquímicos foram utilizados por muitos anos para classificar as PSTPs em tipo 1 e tipo 2 (Ingebritsen e Cohen, 1983; Cohen *et al.*, 1989; Shenolikar e Nairn, 1991). As fosfatases do tipo-1 (PP1) são inibidas por concentrações nanomolares de duas proteínas termoestáveis, o inibidor do tipo-1 (I-1) e o inibidor do tipo-2 (I-2) e desfosforilam, *in vitro*, preferencialmente a subunidade β da fosforilase quinase. As fosfatases do tipo-2 são refratárias aos efeitos desses dois inibidores e desfosforilam preferencialmente a subunidade α da

fosforilase quinase. Além disso, as fosfatases do tipo-2 foram divididas em três subgrupos: PP2A, que é ativa na ausência de cátions divalentes, PP2B, dependente de Ca^{+2} e calmodulina e PP2C, dependente de Mg^{+2} .

Estes diferentes grupos de PSTPs também exibem sensibilidade distinta a toxinas de ocorrência natural como o ácido ocadáico. A PP2A é inibida por 0,1-1 nM de ácido ocadáico, uma IC_{50} de 10 a 100 vezes menor daquela necessária para inibir a PP1 ($\text{IC}_{50} \gg 10\text{nM}$). Por outro lado, a PP2B é inibida apenas na presença de concentrações micromolares desta toxina e a PP2C não é afetada (Cohen *et al.*, 1989; Shenolikar, 1994; Wera e Hemmings, 1995). Estudos posteriores verificaram que as PPs do tipo 1, 2A e 2B, classificadas sob esses critérios bioquímicos, correspondem as subunidades catalíticas de holoenzimas (Barton *et al.*, 1994; Cohen, 1997). Assim, a nomenclatura PP1c, PP2Ac e PP2Bc é frequentemente utilizada para designar de modo mais preciso as subunidades catalíticas das respectivas holoenzimas.

A determinação da sequência gênica de diferentes tipos de PSTPs em vários organismos reformulou a maneira de compreender essa família de enzimas possibilitando seu agrupamento em três famílias denominadas PPP (*PhosphoProtein Phosphatase*), PPM (*Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent*) e FCP/SCP (*TFIIF-associating component of RNA polymerase II CTD phosphatase/small CTD phosphatase*) (Figura 1), as quais estão presentes de leveduras a plantas e mamíferos, e, em alguns casos, também em procariotos (Barton *et al.*, 1994; Barford, 1996; Villafranca *et al.*, 1996; Cohen, 1997; Rusnak, 2000; Andreeva e Kutuzov, 2001; Beullens e Bollen, 2002; Kerk *et al.*, 2002; Cohen, 2004; Moorhead *et al.*, 2009; Shi, 2009b).

As proteínas da família PPP são definidas com base na presença de três motivos (-GDXHG-, -GDXVDRG- e -GNHE-, sendo X qualquer aminoácido) contidos em um domínio catalítico conservado de aproximadamente 280 resíduos, ausente nos componentes da família PPM. As PPPs subdividiram-se nas subfamílias PP1, PP2A, PP2B (calcineurina), PP5 e PP7. A subfamília da PP2A inclui também as

fosfatases denominadas PP4 e PP6. As enzimas da família PPP formam complexos multiméricos através da associação da subunidade catalítica (contendo o sítio catalítico) com uma ou mais subunidades reguladoras que definem a função, localização e especificidade ao substrato da fosfatase. Membros desta família estão presentes em todos os eucariotos e na maioria dos genomas de bactérias e archaea, os quais possuem pelo menos um representante similar à PPP.

A família PPM compreende as PP2C, a piruvato desidrogenase-fosfatase mitocondrial e outras serina/treonina fosfatases dependentes de Mn^{2+}/Mg^{2+} resistentes a microcistina, ácido ocadáico e outras toxinas inibidoras da família PPP. Ao contrário da família PPP, os membros da família PPM não possuem subunidades reguladoras, mas contêm domínios adicionais e motivos com sequências conservadas que auxiliam na especificidade do substrato. O domínio catalítico apresenta nove aminoácidos altamente conservados que incluem quatro aspartatos responsáveis por coordenar os íons metálicos necessários para catálise (Figura 1).

Apesar das diferenças de sequência primária, as enzimas da família PPP e PPM apresentam estrutura tridimensional e mecanismo catalítico muito semelhantes (Das *et al.*, 1996; Barford *et al.*, 1998). Dois íons metálicos se associam com a água presente no sítio catalítico que atua como um nucleófilo causando a hidrólise da ligação fosfomonoéster do substrato.

A família FCP/SCP compreende um grupo de fosfatases contendo o motivo DxTxT/V, necessário para atividade, e que possui como função única a desfosforilação das serinas do domínio carboxi terminal (CTD) da RNA polimerase II. A desfosforilação do CTD é requerida para reciclagem da RNA polimerase ao final do processo de transcrição e ainda pode desempenhar função em sua regulação (Shi, 2009b).

A seguir destacamos algumas características da PP1, PP2A, PP4, PP6 e PP5, visto que foram as principais enzimas estudadas neste trabalho.

A

Família	PPP	PPM	FCP
Motivos	-GDxHG- - GDxVDRG- - GNHE-	-ED- -GH(A/G)- - GD- -GD- -DG- - DN-	-ΨΨΨDLDxxΨΨ- - RPxxxF
Sítio ativo	Bimetal (Fe ³⁺ + Zn ²⁺)	Bimetal (Mn ²⁺)	Não determinado
Domínio catalítico	~280 aminoácidos	~250 aminoácidos	~150 aminoácidos
Mecanismo catalítico	Desfosforilação catalisada por ion metálico	Desfosforilação catalisada por ion metálico	Não determinado
Outras características	Alguns membros são ativos na ausência de ions e outros ativos por Ca ²⁺ . Alguns membros são inibidos por toxinas de ocorrência natural.	Dependente de Mg ²⁺ ou Mn ²⁺ para atividade. Alguns membros são ativados por Ca ²⁺ .	Dependente de Mg ²⁺ , alguns membros são parcialmente ativados por Mn ²⁺ ou Ca ²⁺ .

Figura 1. As três famílias de serina/treonina proteínas fosfatases (PSTP). (A) Tabela indicando as principais características das famílias PPP, PPM e FCP/SCP, adaptada de Cohen, 2004. Ψ, representa um dos seguintes aminoácidos hidrofóbicos: I, L, V, M e X, qualquer aminoácido. (B) Esquema da estrutura primária de membros de cada subfamília de PSTP. O domínio catalítico e os motivos comuns estão indicados, respectivamente, abaixo e acima de cada diagrama. Resíduos envolvidos na coordenação com metal e ligação do fosfato estão indicados em vermelho e azul, respectivamente. A família PPP contém três motivos dentro do domínio catalítico conservado de ~30 kDa: GDxHG, GDxVDRG, e GNHE. Demais domínios estão indicados: BBH (hélice de ligação a calcineurina B), CBD (domínio de ligação a calmodulina/Ca²⁺), AI (sequência autoinibitória), TRP (repetição tetratricopeptídeo), αJ (hélice que liga TPR), FCPH (domínio homólogo a FCP) e BRCT (domínio homólogo a C-terminal de BRCA1). Esquema retirado de Shi, 2009b.

1.2. Serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1)

A PP1 é uma das principais serina/treonina proteínas fosfatases encontradas nas células eucarióticas desempenhando papéis fisiológicos tão diversos quanto importantes, tais como a regulação do metabolismo de carboidratos e controle do ciclo celular, além de estar envolvida na recuperação de estresses e na apoptose (Ceulemans e Bollen, 2004).

Nas células, a subunidade catalítica da PP1 (PP1c) não existe livremente, mas sim em associação com uma ou mais subunidades não-catalíticas que modulam sua localização subcelular, especificidade ao substrato e atividade enzimática (Figuras 2A e 2B) (Hubbard e Cohen, 1993; Egloff *et al.*, 1997). Mais de 100 polipeptídeos que se associam com a PP1c em mamíferos, insetos e leveduras já foram identificados (Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Janssens e Goris, 2001; Cohen, 2002; Rudenko *et al.*, 2003; Ceulemans e Bollen, 2004; Moorhead *et al.*, 2007; Moorhead *et al.*, 2008; Bollen *et al.*, 2009; Virshup e Shenolikar, 2009; Bollen *et al.*, 2010).

Por outro lado, os genomas eucarióticos contêm entre um (*S. cerevisiae* e *Dictyostelium discoideum*) e oito (*Arabidopsis thaliana*) genes que codificam isoformas da PP1c. Em mamíferos foram clonados três genes e foram caracterizadas quatro isoformas da PP1c (duas formas diferem por *splicing* alternativo) que apresentam diferenças imperceptíveis nas figuras de difração de raios-X restritas aos aminoácidos do N- e C-terminal (Ohkura *et al.*, 1989; Dombradi *et al.*, 1990a; Dombradi *et al.*, 1990b; Sasaki *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1999; Bollen, 2001; Andrioli *et al.*, 2003).

A estrutura tridimensional da PP1c de mamíferos vem sendo detalhada através de estudos cristalográficos desta enzima em complexo com toxinas ou com ligantes protéicos. Até o momento, a PP1c já foi cristalizada em complexo com a caliculina A, microcistina, ácido ocadáico, com a MYPT1 (*myosin phosphatase targeting subunit 1*), espinofilina e inibidor-2. Estes estudos mostraram que a subunidade

catalítica da PP1 adota uma conformação compacta do tipo $\alpha\beta$ com um sanduíche β localizado entre dois domínios α -hélice como pode ser observado na Figura 2C. No centro ativo se localizam dois íons metálicos, Fe^{2+} e Zn^{2+} na enzima nativa e Mn^{2+} na enzima recombinante expressa em bactéria, na junção formada entre o sanduíche β e as duas α -hélices. Os íons são coordenados por três histidinas, dois aspartatos e uma asparagina. Três sulcos prováveis de ligação ao substrato determinados como: hidrofóbico, ácido e C-terminal, formam uma superfície na forma de Y que convergem para o sítio ativo (Barford e Keller, 1994; Egloff *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995; Gauss *et al.*, 1997; Sheppeck *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1999; Kita *et al.*, 2002; Terrak *et al.*, 2004; Hurley *et al.*, 2007; Ragusa *et al.*, 2010).

É importante destacar que a maioria das proteínas que interage com a PP1c foi identificada utilizando-se esta subunidade catalítica como isca em ensaios de duplo-híbrido em leveduras ou ainda por copurificarem com a PP1c (Campos *et al.*, 1996; Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Janssens e Goris, 2001; Cohen, 2002; Rudenko *et al.*, 2003; Ceulemans e Bollen, 2004). Contudo, ainda que não exista uma conservação explícita entre as sequências de aminoácidos das diversas proteínas que se associam a PP1c, estudos bioquímicos e cristalográficos identificaram um pequeno motivo consenso, chamado de motivo RVXF, em muitas destas subunidades (Egloff *et al.*, 1997; Wakula *et al.*, 2003).

O motivo RVXF foi originalmente definido como a sequência consenso de cinco aminoácidos [RK]-X(0,1)-[VI]-{P}-[FW], em que X é qualquer aminoácido e {P} é qualquer aminoácido exceto prolina (Wakula *et al.*, 2003). Posteriormente, utilizando alinhamentos de sequências e mutagênese sítio-dirigida para mapear os aminoácidos mais tolerantes em cada posição do motivo RVXF, a sequência foi definida como [HKR]-[ACHKMNQRSTV]-[V]-[CHKNQRST]-[FW] (Ceulemans e Bollen, 2006; Meiselbach *et al.*, 2006). Em geral, este motivo é flanqueado por aminoácidos básicos no N-terminal e por aminoácidos ácidos no C-terminal.

Figura 2. Estrutura e regulação da subunidade catalítica da PP1. (A) Ilustração de possíveis holoenzimas formadas com a PP1c que resultam na regulação de sua localização, especificidade a substrato e atividade. **(B)** Algumas proteínas que interagem com a PP1c regulando sua atividade estão representadas, sendo que subunidades que são inibitórias estão representadas em magenta. **(C)** Estrutura tridimensional da PP1c (em azul) ligada ao ácido oadáico (em amarelo). A superfície em forma de Y (rosa) é definida pelos três domínios da PP1. Os dois íons metálicos estão representados por duas esferas vermelhas. Figura composta a partir de Shi, 2009b, Bollen *et al*, 2009 e Virshup e Shenolikar, 2009.

A sequência RVXF se liga de forma estendida à curva hidrofóbica da PP1 distante 20 Å do sítio ativo. A ligação deste motivo não muda a conformação da PP1 e serve para ancorar a proteína de interação à PP1c. Este evento de interação é essencial, pois promove interações secundárias que contribuem para o ancoramento entre as proteínas e determina a atividade e especificidade da holoenzima ao substrato (Wakula *et al.*, 2003; Bollen *et al.*, 2010).

Muitas proteínas que se associam a PP1c são moduladoras de atividade e têm função inibitória tais como os inibidores I-1, I-2 e I-3 (Huang e Glinsmann, 1976; Ceulemans e Bollen, 2004), sendo que, neste caso, múltiplos contatos com a PP1c são aparentemente estabelecidos (Park e DePaoli-Roach, 1994; Endo *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2000; Weiser *et al.*, 2004). Estes inibidores bloqueiam o sítio ativo e inibem a desfosforilação de substratos. Algumas características são comuns a estas moléculas, como a termoestabilidade e a falta de uma estrutura tridimensional bem definida (Dancheck *et al.*, 2008). O I-1 foi isolado do músculo esquelético de coelho, mas é expresso em vários tecidos de vertebrados sendo ativado por fosforilação pela PKA em resposta a hormônios e neurotransmissores que elevam os níveis de cAMP, tais como adrenalina e dopamina, respectivamente (Shenolikar, 1995).

O I-2 foi a primeira proteína reguladora de fosfatase identificada e é conservada de levedura a mamíferos. Estudos de cristalografia indicam que o I-2 de mamíferos se complexa a PP1c adquirindo três regiões de interação organizadas: região 1 contendo os aminoácidos 12-17 que se liga no local adjacente ao da sequência RVXF; região 2 contendo os aminoácidos 44-56 que interage ao longo da curva de ligação do motivo RVXF através da sequência KSQKW e região 3 contendo os aminoácidos 148-151 que interage com o sítio catalítico. O C-terminal do I-2 é rico em aminoácidos ácidos, incluindo várias repetições de aspartato e glutamato. Foi observado que esta região é capaz de ativar a quinase Aurora-A, reguladora chave da mitose, e auxiliar na reativação da PP1 pela GSK3. A PP1c do complexo PP1c/I-2

é ativada quando o I-2 é fosforilado em treonina 72 por uma de várias proteínas quinases, incluindo GSK3, ERKs e CDKs, enquanto que a desfosforilação ocorre de forma autocatalítica (Satinover *et al.*, 2004; Hurley *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007).

A expressão transgênica do I-2 em camundongo sugere que a inibição da PP1c regule a contração cardíaca. Outros estudos que localizaram o I-2 nos centrossomos observaram mudanças dinâmicas na fosforilação do I-2 durante a mitose, indicando a participação do complexo PP1c/I-2 na divisão celular. O estresse oxidativo em células neuronais causa ativação da PP1c ao aumentar a fosforilação do I-2, sugerindo sua participação no controle da sobrevivência dos neurônios (Leach *et al.*, 2003; Zambrano *et al.*, 2004; Kirchhefer *et al.*, 2005).

O I-3 de humanos foi isolado a partir de sua interação física com a PP1c. Subsequentemente foi identificado o homólogo de I-3 em levedura denominado Ypil e mais recentemente em plantas, como *Arabidopsis thaliana* e *Vicia faba*. Análises bioquímicas e moleculares sugerem que esta proteína não atue apenas como um inibidor, mas como um regulador da localização e atividade da PP1c. Em humanos, o I-3 está localizado no nucléolo e nos centrossomos enquanto que o inibidor de levedura e planta se localiza tanto no núcleo quanto no citoplasma (Huang *et al.*, 2005; Pedelini *et al.*, 2007; Takemiya *et al.*, 2009).

As funções específicas do I-3 ainda não são totalmente conhecidas. Em levedura o Ypil interage com Sds22, uma subunidade reguladora da PP1c requerida para mitose (progressão da metáfase para anáfase) e responsável pelo direcionamento da PP1c para o substrato Aurora quinase, formando, assim, um complexo ternário com a PP1c. A deleção de *ypil* é letal e sua supressão condicional resulta em inibição do crescimento celular na metade da mitose, acompanhada de redução da PP1c nuclear e perda da Sds22 nuclear. *In vitro*, tanto Sds22 como I-3 são potentes inibidores da PP1c, mas apenas contra alguns substratos, como glicogênio fosforilase e caseína (Peggie *et al.*, 2002; Lesage *et al.*, 2007; Pedelini *et al.*, 2007; Bharucha *et al.*, 2008).

O fenótipo causado pela supressão de *ypi1* se assemelha a inativação de *sds22* e por isso *ypi1* e *sds22* parecem atuar cooperativamente na regulação da atividade da PP1c. Em *A. thaliana* o I-3 é importante para progressão do início da embriogênese e desenvolvimento e a sua deleção pode causar letalidade do embrião, reforçando sua participação na regulação da mitose (Takemiya *et al.*, 2009). Em humanos o I-3 é um substrato fisiológico da caspase-3, sendo necessária sua degradação *in vivo* e re-distribuição da PP1 do núcleo para o citoplasma para que a apoptose ocorra (Huang e Lee, 2008).

Para muitas das proteínas identificadas como "parceiros moleculares" da PP1c são necessários estudos que confirmem a associação entre elas *in vivo* bem como o papel fisiológico desempenhado por essas holoenzimas.

1.3. Serina/treonina fosfatases do tipo 2A (PP2A), 4 (PP4) e 6 (PP6)

Como já mencionado, a subfamília da PP2A compreende as enzimas denominadas PP2A, PP4 e PP6. A PP2A é uma holoenzima encontrada em praticamente todas as células eucarióticas, regulando processos celulares tais como ciclo celular, tradução, transcrição, *splicing* e desenvolvimento do câncer, sendo conhecida como um importante supressor tumoral (Millward *et al.*, 1999; Janssens e Goris, 2001; Arroyo e Hahn, 2005; Gallego e Virshup, 2005; Janssens *et al.*, 2005; Mumby, 2007).

A PP2A existe como um heterotrímero que consiste de uma subunidade catalítica conservada de 36 kDa (PP2Ac), uma subunidade regulatória (PP2Ab) cuja massa molecular varia de 54 a 130 kDa e uma subunidade estrutural de 65 kDa (PP2Aa), composta de 15 repetições seriadas de um motivo de 39 aminoácidos denominado HEAT (*huntington/elongation/A subunit/TOR*) (Figura 3) (Mayer-Jaekel e Hemmings, 1994; Janssens e Goris, 2001).

Figura 3. Estrutura e regulação da subunidade catalítica da PP2A. (A) Estrutura heterodimérica da PP2A. A subunidade catalítica (verde) se liga as repetições HEAT da subunidade estrutural (cinza). **(B)** A estrutura heterotrimérica se forma pela associação das subunidades conservadas a e c e uma subunidade b variável. **(C)** Estrutura heterotrimérica da holoenzima PP2A envolvendo a subunidade reguladora B' (amarelo). Figura composta a partir de Shi, 2009b e Virshup e Shenolikar, 2009.

Associadas ao dímero formado pelas subunidades a e c da PP2A, já foram descritas dezenas de subunidades b, sugerindo a existência de diversas holoenzimas da PP2A, que possivelmente respondem pelos diferentes papéis fisiológicos atribuídos a essa enzima. Os mamíferos possuem dois genes de subunidade catalítica, dois de subunidade a e quatro classes de subunidades b codificadas por múltiplos genes em cada grupo designados como B, B', B'' e B''' (Eichhorn *et al.*, 2007). Ainda que não exista uma conservação entre as diferentes subunidades b, todas elas possuem dois motivos conservados envolvidos na associação com a subunidade estrutural a (Li e Virshup, 2002; Strack *et al.*, 2002).

A subunidade a assume um formato de ferradura para ligar a subunidade catalítica (PP2Ac) pela sua cauda C-terminal única, o que explica o fato da subunidade a se ligar apenas à PP2Ac e não a outras enzimas PPP. Cada repetição HEAT contém um par de α -hélices antiparalelas com uma volta composta de sequências altamente conservadas. A subunidade b interage próximo do sítio ativo da subunidade c, desta forma definindo a especificidade ao substrato.

A PP2Ac também pode se ligar a *alpha4*, proteína ortóloga de mamífero conhecida como Tap42 em levedura, que controla a sinalização via de sinalização TOR (*target of rapamycin*) (Jacinto *et al.*, 2001; Gingras *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2006; Xu e Deng, 2006; Moorhead *et al.*, 2007; Shi, 2009a). A *alpha4* também se liga a PP4c e PP6c, formando um complexo dimérico (Murata *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998). Análises recentes da rede de interações da PP2Ac através de ensaios de co-purificação acoplados a espectrometria de massa confirmaram a substituição de subunidades b por proteínas adicionais e a interação de outras proteínas com heterotrímeros conhecidos (Goudreault *et al.*, 2009).

A regulação das holoenzimas PP2A também ocorre pela fosforilação de um resíduo de tirosina e metilação de um resíduo de leucina existentes na região carboxi-terminal da subunidade catalítica, causando, respectivamente, inativação ou ativação da enzima (Chen *et*

al., 1994a; Favre *et al.*, 1994). A reativação da PP2Ac é estimulada por PTPA (*PhosphoTyrosyl Phosphatase Activator*), uma proteína evolutivamente muito conservada que promove a atividade intrínseca de tirosina fosfatase da PP2Ac (Cayla *et al.*, 1994; Rempola *et al.*, 2000).

Estudos sobre a localização celular da PP2A revelaram que as subunidades a e c predominam no núcleo, enquanto que a localização das subunidades b é bem variável, podendo ser encontradas no núcleo e no citoplasma (Turowski *et al.*, 1997; Gentry e Hallberg, 2002)

A PP4 é uma enzima com alta similaridade de sequência de aminoácidos com PP2Ac, também presente em diferentes organismos. Subunidades reguladoras que interagem com a subunidade catalítica da PP4 foram identificadas em mamíferos (Cohen *et al.*, 2005). De forma análoga à PP2A, a PP4 é carboximetilada, o que leva a diminuição de sua atividade *in vitro*. As subunidades reguladoras também podem sofrer modificações covalentes que influenciam na ligação a subunidade catalítica (Cohen *et al.*, 2005).

A PP4c existe como um complexo de alta massa molecular (450-600 kDa) em tecidos de mamíferos. Duas subunidades reguladoras estruturalmente distintas exclusivas da PP4c foram identificadas e denominadas R1 e R2 (Kloeker e Wadzinski, 1999; Hastie *et al.*, 2000). A R1 (105 kDa) contém 14 repetições do tipo HEAT similares às encontradas na subunidade estrutural a da PP2A. A R2 é uma proteína altamente assimétrica com peso molecular de 55 kDa apesar de ser eluída em coluna de gel filtração com peso correspondente a 450 kDa por estar associada a outras proteínas. Na presença de R1 ou R2, uma terceira subunidade, denominada R3, pode se ligar ao complexo formado com a PP4 e auxiliar na especificação do local de ação desta fosfatase (Gingras *et al.*, 2005; Hastie *et al.*, 2005).

Em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, a PP4 está localizada preferencialmente em centrossomos, sendo essencial para sua maturação (Helps *et al.*, 1998; Sumiyoshi *et al.*, 2002). Além disso, a PP4 também participa da montagem do *spliceosome* (Carnegie *et al.*, 2003). Em *S. cerevisiae*, a ortóloga da PP4 (Pph3p) ativa o fator de

transcrição Gln3p que modula a resposta a diferentes fontes de nitrogênio e carência nutricional (Bertram *et al.*, 2000), além de conferir resistência a agentes anti-tumorais como a cisplatina e oxaliplatina (Wu *et al.*, 2004).

Várias vias de sinalização, incluindo as vias de NF- κ B e TOR são aparentemente reguladas pela PP4 (Chen *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2002; Mihindukulasuriya *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2004). Mais recentemente foi demonstrado o envolvimento da PP4 na regulação de apoptose, proliferação e razão de mutação em células humanas (Martin-Granados *et al.*, 2008; Mourtada-Maarabouni e Williams, 2008). Ademais, a PP4 também parece desempenhar papel importante na maquinaria de reparo do DNA e na modulação da atividade da cromatina (Gingras *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005).

Nos últimos anos houve um grande avanço no entendimento sobre a função da PP4 na resposta ao dano do DNA e na identificação de subunidades reguladoras e proteínas de ligação da PP4. A PP4c, assim como a PP2Ac, desfosforila a variante de histona H2AX, uma proteína chave no reparo do DNA que é fosforilada em resposta a quebra dupla do DNA e deve ser desfosforilada para que o reparo se complete (Chowdhury *et al.*, 2008).

Outra proteína alvo da PP4c é a RPA (proteína de replicação A) que é um fator de ligação a fita simples de DNA crítica para replicação, recombinação e reparo do DNA e sua fosforilação reversível é essencial para um eficiente reparo do DNA danificado (Lee *et al.*, 2010). A PP4R2 medeia o reparo do DNA, juntamente com a PP4c e RPA, por isso, sua deleção resulta em *checkpoint* G2-M longo e hipersensibilidade das células ao dano do DNA. A PP2A parece ser importante após o dano do DNA enquanto que a PP4c é funcionalmente importante durante a fase S do ciclo celular (Chowdhury *et al.*, 2005).

A PP6, assim como a PP4, também é uma enzima com alta similaridade de sequência de aminoácidos com PP2Ac. A PP6 humana e de *Drosophila* são homólogas funcionais da fosfatase SIT4 de *S. cerevisiae* e da ppe1 de *S. pombe* (Bastians e Ponstingl, 1996; Goshima

et al., 2003), as quais estão envolvidas na regulação da progressão de G1 para S no ciclo celular, no brotamento, na transcrição e no metabolismo do glicogênio, entre outros processos, podendo ser localizada tanto no núcleo quanto no citoplasma (Stark, 1996; Clotet *et al.*, 1999; Zabrocki *et al.*, 2002).

A função da PP6 em metazoários ainda é praticamente desconhecida, entretanto há relato de que o nocaute da PP6 humana por siRNA resultou em elevadas taxas de apoptose (MacKeigan *et al.*, 2005). A região N-terminal da PPV/6A de *Drosophila* foi considerada crítica para o funcionamento desta enzima, sugerindo esta região deve possuir sítios que interagem com subunidades regulatórias específicas, que devem servir para aproximar a PPV/6A de seus substratos e/ou regular sua atividade e especificidade (Mann *et al.*, 1993).

Até o momento, a única subunidade da PP6 humana já identificada é a proteína *alpha4*, que é ortóloga da proteína Tap42 de levedura, como anteriormente mencionado (Murata *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Nanahoshi *et al.*, 1998). Por outro lado, em *S. cerevisiae*, além de Tap42, outras proteínas associadas à SIT4 foram identificadas sendo referidas como proteínas associadas a SIT4 (SAPs, *SIT4 associated proteins*), que são conservadas em outros eucariotos (Luke *et al.*, 1996; Stefansson e Brautigan, 2006).

Buscas por sequências similares a SAP de levedura identificaram SAPs em várias espécies, incluindo três proteínas humanas que foram nomeadas PP6R1, PP6R2 e pp6R3 que coimunoprecipitam com a PP6 mas não com a PP4 ou PP2A (Luke *et al.*, 1996; Stefansson e Brautigan, 2006). As proteínas SAPs já identificadas compartilham um motivo designado como domínio “SAPS” no banco de dados PFAM. Um estudo recente mostrou que o domínio SAPS da PP6R3 forma repetições helicoidais contendo aminoácidos negativamente carregados nas alças entre as hélices que são usados na associação específica com a PP6 (Guerignon *et al.*, 2009).

As SAPs aparentemente modulam diferentes funções celulares na levedura, tais como a via de sinalização TOR e fosforilação de eIF2 α . Os

três genes humanos que codificam proteínas ortólogas de SAPs são diferencialmente expressos em tecidos humanos e em certos tipos de câncer e desempenham a função de recrutar substratos específicos para a PP6 (Luke *et al.*, 1996; Stefansson e Brautigan, 2006).

1.4. Serina/treonina fosfatase do tipo 5 (PP5)

A serina/treonina fosfatase do tipo 5 (PP5) distingue-se das demais fosfatases da família PPP por conter em sua região N-terminal três ou quatro repetições do tetratricopeptídeo (TPR) que servem para manter a enzima inativa, sendo seu domínio catalítico estruturalmente semelhante ao domínio catalítico das demais fosfatases desta família (Chen *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1996; Bahl *et al.*, 2001; Chinkers, 2001; Kang *et al.*, 2001; Ramsey e Chinkers, 2002).

Os genes para a PP5 já foram identificados em organismos diversos como mamíferos, dípteros, plantas e fungos, sendo codificada por apenas um gene entre os eucariotos (Chen *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2000a; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2003). Em mamíferos, o nível do mRNA da PP5 varia entre tecidos, sendo particularmente mais alto em cérebro (Becker *et al.*, 1994; Bahl *et al.*, 2001) e a enzima localiza-se tanto no núcleo como no citoplasma (Chen *et al.*, 1994b; Brown *et al.*, 2000b; Chinkers, 2001).

A atividade fosfatase da PP5 livre é suprimida, pois o domínio TPR, conhecido motivo de interação proteína-proteína, é mantido junto à α -hélice C-terminal em uma conformação autoinibitória. Em células de mamíferos, a PP5 interage com as proteínas de choque térmico Hsp70 e Hsp90, chaperonas moleculares que, entre outras funções, regulam os estágios iniciais da atividade do receptor de esteróides. A interação com a Hsp90 ativa a PP5 pela desestabilização da interação do domínio N-terminal com o domínio catalítico C-terminal (Kang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005; Zeke *et al.*, 2005). Ademais, alguns dados da literatura sugerem que ácidos graxos de cadeia longa e/ou derivados do ácido araquidônico podem atuar como ativadores fisiológicos da PP5 (Chen e Cohen, 1997; Skinner *et al.*, 1997; Ramsey e Chinkers, 2002).

A PP5 tem sido identificada em complexos contendo muitas proteínas que iniciam ou regulam uma variedade de eventos celulares, incluindo o heterocomplexo Hsp90/receptor de glucocorticóide, o complexo promotor da anáfase com as subunidades do ciclo de divisão celular Cdc16/Cdc27, a quinase sinal de regulação da apoptose (ASK1), as proteínas serina/treonina quinases dependentes de DNA (DNA-PKcs), a quinase mutada da ataxia-telangiectasia (ATM), a quinase relacionada a ATM e Rad3 (ATR), subunidade A da PP2A, entre outros (Golden *et al.*, 2008a; Golden *et al.*, 2008b).

Com isso, os complexos protéicos formados com a PP5 estão envolvidos na regulação de processos celulares tais como modulação da atividade do receptor de glicocorticóides, apoptose, crescimento celular e na resposta a danos no DNA mediada pela quinase ATM (Chen *et al.*, 1996; Silverstein *et al.*, 1997; Zuo *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Hinds e Sanchez, 2008).

1.5. *Dictyostelium discoideum* como organismo modelo

30

Os dictyostelídeos são microorganismos que exibem uma multicelularidade condicional acompanhada de especialização do tipo celular e por esta razão são conhecidos como “amebas sociais” (Kessin, 2000). A espécie de ameba social mais estudada é *Dictyostelium discoideum*, a qual tem sido largamente utilizada há mais de 50 anos no estudo de uma variedade de processos biológicos importantes tais como mobilidade celular, quimiotaxia, fagocitose e sinalização celular envolvida em morfogênese e diferenciação celular. Estes estudos forneceram as primeiras descrições sobre quimioatração e proteínas de adesão celular em células eucarióticas (Konijn *et al.*, 1967; Muller e Gerish, 1978).

Este microorganismo eucariótico de vida livre possui de 10-20 µm de diâmetro e habita superfícies úmidas do solo, se alimentando predominantemente de bactérias por fagocitose e se dividindo por fissão binária (mitose). Como mostrado na Figura 4, o ciclo de vida de *D.*

discoideum alterna entre as fases unicelular (crescimento vegetativo) e multicelular (desenvolvimento).

Na fase de crescimento, as amebas são células não especializadas, haplóides idênticas que atingem alta densidade celular (10^7 células/mL) em cultivo, na presença de bactérias ou outros nutrientes como fonte de alimento. Os tempos de duplicação das linhagens variam de aproximadamente 3 horas na presença de bactérias, como *Escherichia coli* ou *Klebsiella aerogenes*, a 8-12 horas em meio de cultura livre de microorganismos (axênico). Linhagens capazes de crescer em meio axênico foram obtidas a partir da linhagem selvagem NC-4 e denominadas como linhagens AX, sendo que efetuam com grande eficiência a macropinocitose. Estas linhagens apresentam um crescimento ótimo em torno de 22°C que é progressivamente inibido em temperaturas acima de 25°C.

O desenvolvimento é disparado pela ausência de nutrientes e secreção de uma glicoproteína conhecida como PSF (*pre-starvation factor*) que causa a indução do primeiro conjunto de genes associados com o carenciamento, causando a agregação das amebas em resposta ao cAMP liberado por alguns indivíduos da população (Burdine e Clarke, 1995). O cAMP, por sua vez, se liga a receptores celulares associados a proteínas G heterotriméricas e desencadeia respostas coordenadas nas células sensibilizadas. Estas respostas incluem o deslocamento em direção às células que iniciaram a secreção de cAMP e a síntese e liberação de cAMP na forma de pulsos que atrai outras amebas mais afastadas.

Durante a migração, as células tornam-se adesivas e formam correntes que se reúnem até constituir um agregado compacto (*mound*) com $\sim 10^5$ células. Após agregação, as células diferenciam-se em células que originarão o talo (células pré-talo) ou os esporos (células pré-esporo), para cooperativamente formarem corpos de frutificação após 24 horas. A proporção de células pré esporos e pré talo é de respectivamente 80:20 (Loomis, 1993; Firtel, 1995; Aubry e Firtel, 1999; Chisholm e Firtel, 2004).

Figura 4. Ilustração esquemática do ciclo de vida de *Dictyostelium discoideum*. O tempo dos estágios de desenvolvimento assim como o nome dos principais tipos celulares está indicado. Adaptado de:

http://www.dictyostelium.com/dicty_1.html

http://www.lifesci.dundee.ac.uk/groups/pauline_schaap/organism.htm.

No estágio seguinte do desenvolvimento, o organismo multicelular assume forma mais alongada, e então duas alternativas se apresentam: a culminação ou, em determinadas condições, o estabelecimento de uma forma intermediária denominada pseudoplasmodio (*slug*). O pseudoplasmodio pode se deslocar em resposta a gradientes de luz e de temperatura. Em condições favoráveis a migração das células cessa na região anterior, enquanto as células da região posterior continuam em movimento até se disporem em torno e embaixo da região anterior, originando uma estrutura que se assemelha a um chapéu mexicano. Nesse momento inicia-se a culminação, que envolve um processo de alongamento das células pré-talo por vacuolização e deposição de celulose na sua superfície externa, formando o talo.

No decorrer desse processo, a massa de células pré-esporo ascende progressivamente em direção à extremidade do talo e origina um capsídeo globular terminal contendo esporos no seu interior. A liberação e germinação, estes esporos reiniciarão um novo ciclo assexuado (Loomis *et al.*, 1982; Devreotes, 1989b; Devreotes, 1989a; Darnell *et al.*, 1990; Kessin e Campagne, 1992; Gross, 1994; Maeda e Firtel, 1997; Soderbom e Loomis, 1998).

A regulação da expressão gênica diferencial é primordial durante todo o processo de desenvolvimento, sendo que o comprometimento de células que originarão esporos e células do talo ocorre já no pseudoplasmodio. Entre os fatores que regulam o desenvolvimento, o melhor caracterizado é DIF (*Differentiation Inducing Factor*), uma hexafenona clorada produzida pelas células pré-esporos e que age induzindo a diferenciação de células pré-talo. Este fator atua através da via de sinalização mediada pelos fatores de transcrição da família STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). A etapa final do desenvolvimento envolve sinalização mediada por histidina quinases típicas do sistema de dois componentes, e é disparada pela PKA. Além disso, os peptídeos SDF1 e SDF2 (*Spore Differentiation Factor*) secretados por células pré-talo controlam a maturação dos esporos (Kay e Williams, 1999; Williams *et al.*, 2006; Urushihara, 2009).

Recentemente, a análise do transcrito de *D. discoideum* através de sequenciamento massivo de última geração revelou que, durante o desenvolvimento, 69% do genoma é transcrito, sendo que 1.779 genes têm expressão reprimida, 3.777 genes são induzidos e 2.822 genes apresentam padrão transiente de indução e repressão da expressão. A maior mudança no perfil do transcrito ocorre na transição de unicelularidade para multicelularidade, mais especificamente entre 4 e 8 horas do desenvolvimento. Como esperado, a maioria dos genes induzidos estão associados com diferenciação, desenvolvimento dos esporos e regulação da transcrição enquanto que os genes reprimidos estão relacionados com a fase de crescimento, o que inclui genes relacionados à tradução (por exemplo, proteínas ribossômicas), à interação com bactérias e à organização do citoesqueleto (Van Driessche *et al.*, 2002; Parikh *et al.*, 2010).

D. discoideum exibe também a propriedade de dediferenciação que ocorre quando células durante o desenvolvimento retomam a proliferação se dispersas em local suprido de nutrientes. Análises do transcrito através de microarranjos de DNA revelaram que a dediferenciação é um processo controlado que envolve pelo menos uma histidina quinase (Kato *et al.*, 2004).

O genoma completo de *D. discoideum* apresenta 34 Mpb divididos em seis cromossomos e um elemento extracromossômico de 88kpb presente em torno de 100 cópias e que contem os genes de RNA ribossômico além de múltiplas cópias do genoma mitocondrial de 55,6 kpb. Os cromossomos variam de 4 a 8 Mbp e contém aproximadamente 12.500 genes codificadores de proteínas, os quais apresentam características peculiares como alto conteúdo de A/T (78%) e introns raros e pequenos (50-200pb) (Kay e Williams, 1999; Glockner *et al.*, 2002; Eichinger *et al.*, 2005; Loomis e Kuspa, 2005). Aminoácidos codificados por codons ricos em AT tais como asparagina, lisina, isoleucina, tirosina e fenilalanina são mais comuns em proteínas de *D. discoideum* do que em outros organismos, enquanto que aminoácidos

codificados por codons ricos em GC (prolina, alanina, arginina e glicina) são mais raros (Insall, 2005).

Estudos filogenéticos demonstraram que *D. discoideum* e espécies relacionadas se posicionam próximo à base da evolução dos metazoários, anterior à separação dos fungos, porém posterior à divergência do reino das plantas (Figura 5). Esta constatação aumenta a importância de *D. discoideum* como um modelo para o estudo dos mecanismos envolvidos na transição de organismos unicelulares para metazoários (Darnell, 1997; Baldauf *et al.*, 2000; Eichinger *et al.*, 2005). Atualmente, *D. discoideum* é reconhecido pelo *National Institute of Health* como um dos modelos de estudo em pesquisas biomédicas (<http://www.nih.gov/science/models>).

Além do interesse para estudos sobre evolução eucariótica, *D. discoideum* apresenta outras vantagens como organismo modelo destacando-se o genoma haplóide, facilidade de cultivo em laboratório, ciclo de vida relativamente curto, desenvolvimento sincrônico e possibilidade de manipulação genética. Métodos de transformação genética para *D. discoideum* foram desenvolvidos há mais de 20 anos e têm sido suplementados por uma variedade de técnicas incluindo o nocaute gênico por recombinação homóloga, silenciamento da expressão através de RNA antisense ou RNAi, super-expressão ectópica de genes mutantes ou selvagem, expressão de proteínas fusionadas a epitopos variados além de mutagênese por inserção aleatória (Eichinger e Rivero, 2006; Annesley e Fisher, 2009).

Figura 5. Árvore filogenética eucariótica mostrando a posição de *D. discoideum*. Comparações do proteoma de *D. discoideum* com o de representantes de outros grupos foram utilizadas para gerar esta árvore filogenética. Em muitos aspectos *D. discoideum* está mais próximo dos animais do que dos fungos devido à alta razão de divergência da linhagem fúngica. Figura adaptada de Einchiger *et al.*, 2005.

1.6. Fosforilação reversível em *D. discoideum*

Assim como nos demais organismos eucarióticos, os processos de crescimento e desenvolvimento de *D. discoideum* são regulados através de vias de sinalização envolvendo predominantemente a fosforilação reversível de proteínas. Os mecanismos de fosforilação reversível já identificados em *D. discoideum* incluem a fosforilação em resíduos de serina/treonina e tirosina e também o sistema de dois componentes que envolve a fosforilação de resíduos de histidina e aspartato.

Genes para 285 proteínas quinases putativas foram identificados no genoma de *D. discoideum* (Kimmel, 2005; Goldberg *et al.*, 2006). Esta análise mostrou que um conjunto de 46 subfamílias de quinases é conservado em *D. discoideum*, levedura e metazoários. Estas quinases estão relacionadas com processos celulares fundamentais mediando sinalização através de fosfolipídios (AKT e PDK1), cascatas de MAPKs, controle do ciclo celular (ex: CDK7, CDK8, CRK7), mitose (ex: NEK, AUR), controle do dano ao DNA (RAD53 e ATR) e homeostase energética (TOR, AMPK e GCN2).

Por outro lado, algumas quinases encontradas em metazoários foram perdidas em *D. discoideum* como é o caso de certas classes de tirosina quinases (PTKs), MAPKs responsivas ao estresse (p38 e JNK), CAMK2, MLCK, STKR e RAF. Porém, muitas quinases são típicas de *D. discoideum*, as quais estão envolvidas com aspectos únicos da biologia deste microorganismo, tais como quinases da subfamília da YAK, quinases envolvidas com a diferenciação do esporo (SplA e ZakA) e quinases envolvidas na transição do crescimento para o desenvolvimento (Gdt1 e Gdt2) (Goldberg *et al.*, 2006).

Aproximadamente 44 quinases de *D. discoideum* já foram alvos de inativação gênica, a maioria resultando em alterações fenotípicas relevantes, implicando-as diretamente no controle do crescimento e/ou desenvolvimento de *D. discoideum*. Entre estas citamos PKA, YAKA e as

MAPK (Aubry e Firtel, 1998; Loomis, 1998; Souza *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 2004; Kimmel, 2005).

Apesar do genoma de *D. discoideum* não codificar PTKs do tipo receptor, como ocorre em mamíferos, várias proteínas TKL (*Tyrosine Kinase-Like*) foram identificadas neste organismo e diversas proteínas fosforiladas em tirosina foram identificadas, incluindo a actina. A fosforilação reversível em tirosina desempenha papel importante no desenvolvimento de *D. discoideum* (Tan e Spudich, 1990). Por exemplo, a GSK3 (quinase da glicogênio sintase), uma quinase central no desenvolvimento de *D. discoideum*, é ativada pela quinase de dupla especificidade, ZAK1, e exerce alguns de seus efeitos através da fosforilação de STATa (Howard *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1999; Schilde *et al.*, 2004; Andrioli *et al.*, 2007; Strmecki *et al.*, 2007).

D. discoideum utiliza fatores de transcrição da família STAT como acontece nos metazoários, os quais são ativados em resíduos de tirosina, causando sua dimerização e importação para o núcleo (Bromberg e Darnell, 2000). Os STATs funcionam como ativadores transcrpcionais em vias de resposta ao estresse e estão envolvidos no controle do desenvolvimento multicelular e da diferenciação de tipos celulares específicos (Weeks, 2000; Fukuzawa *et al.*, 2001).

Além disso, várias histidina quinases (HKs) existentes em *D. discoideum* estão claramente implicadas na regulação do desenvolvimento e na osmoregulação (Schuster *et al.*, 1996a; Ott *et al.*, 2000; Anjard e Loomis, 2002; Thomason *et al.*, 2006). Entre as 14 HKs identificadas no genoma de *D. discoideum*, cinco delas possuem hélices transmembrânicas, sugerindo um papel na transdução de sinal extracelular.

Apesar do conhecido envolvimento de fosforilação em resíduos de tirosina, serina e treonina no crescimento e na diferenciação celular de *D. discoideum*, há ainda poucos estudos sobre as proteínas fosfatases que modulam estes processos. O genoma de *D. discoideum* prediz a existência de pelo menos 16 genes da família das proteínas tirosina fosfatases (PTPs), 26 da família das proteínas fosfatases de dupla

especificidade (DSPs), 15 da família PPM e 6 da família PPP (Anjard, 2005; Eichinger *et al.*, 2005; Gonzalez-Kristeller, 2007).

Algumas tirosina-fosfatases específicas (PTP1, PTP2 e PTP3) e de dupla especificidade já foram caracterizadas em *D. discoideum* (ortóloga da Cdc25 e MPL1) (Howard *et al.*, 1992; Ramalingam *et al.*, 1993; Howard *et al.*, 1994; Gamper *et al.*, 1996; Gamper *et al.*, 1999; Early *et al.*, 2001; Mayanagi *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2008). A PTP1 regula negativamente o fator de transcrição STATa, uma vez que em mutantes que não expressam esta fosfatase se observa um aumento na fosforilação em resíduos de tirosina de STATa coincidente com a sua retenção nuclear (Early *et al.*, 2001). O papel desempenhado para PTP2 ainda é pouco claro, enquanto que a PTP3 parece estar relacionada à resposta a diversos estresses (Howard *et al.*, 1994; Gamper *et al.*, 1999). A MPL1 é essencial para a regulação da fosforilação de ERK2 e para quimiotaxia de *D. discoideum* durante o desenvolvimento (Rodriguez *et al.*, 2008).

Estudos anteriores à elucidação do genoma, já haviam demonstrado que *D. discoideum* possui PP1, PP2A, PP2B, PP2C, PP4, PP5 e PP6 com características similares as enzimas descritas em outros organismos (Simon *et al.*, 1992; Dammann *et al.*, 1996; Horn e Gross, 1996; Hellstern *et al.*, 1997; Aubry e Firtel, 1998; Murphy e Egelhoff, 1999; Murphy *et al.*, 1999; Andrioli *et al.*, 2003; Fiorini, 2003).

A holoenzima PP2A de *D. discoideum* foi implicada na desfosforilação da cadeia pesada de miosina promovendo o rearranjo dos filamentos em *D. discoideum* (Murphy e Egelhoff, 1999; Murphy *et al.*, 1999), enquanto que um membro da subfamília das PP2C parece ser essencial para o desenvolvimento logo após a agregação (Aubry e Firtel, 1998). A PP2B (calcineurina) parece também desempenhar um papel na morfogênese, uma vez que o silenciamento da expressão de sua subunidade reguladora levou ao surgimento de corpos de frutificação aberrantes (Boeckeler *et al.*, 2006).

A subunidade catalítica da PP1 de *D. discoideum* (DdPP1c) origina-se a partir de um gene em cópia única no genoma o qual é

expresso ao longo de todo o ciclo de vida desse organismo. Ainda que sua sequência de aminoácidos tenha uma identidade de 80% com PP1c de outros organismos, a DdPP1c apresenta propriedades bioquímicas distintas, como por exemplo, uma menor sensibilidade a caliculina A, um inibidor específico de enzimas desta subfamília (Andrioli *et al.*, 2003). Algumas proteínas que possivelmente interagem com DdPP1c, modulando sua atividade e/ou especificidade, foram identificadas através de buscas na sequência do genoma deste microorganismo. Entre estas, uma proteína que atua como inibidora da atividade da DdPP1c e que é ortóloga do inibidor 2 da PP1 de mamíferos (DdI-2) (Sousa-Canavez *et al.*, 2007). Uma proteína ortóloga do inibidor 3 de mamíferos foi identificada em *D. discoideum* (DdI-3) e sua atividade inibidora da DdPP1c foi caracterizada *in vitro*, sendo 50 vezes mais potente do que DdI-2 (Gonzalez-Kristeller, 2007).

Experimentos baseados na utilização do sistema de duplo-híbrido em leveduras possibilitaram a identificação de 30 e 10 candidatos que interagem, respectivamente, com a subunidade catalítica da PP1 e da PP4 de *D. discoideum*. Aliando ferramentas de bioinformática foi iniciada a construção de um catálogo (*The Dictyostelium Phosphatome*) contendo as subunidades catalíticas e potenciais subunidades reguladoras das proteínas fosfatases codificadas no genoma de *D. discoideum*. Até o momento, 101 genes foram catalogados e classificados nas diferentes famílias das proteínas fosfatases, sendo 21 na família das PTPs, 26 na família das DSPs, 15 na família das PPMs e 31 na família das PPPs (Gonzalez-Kristeller, 2007).

A PP4c de *D. discoideum* é requerida não só para o desenvolvimento e quimiotaxia de *D. discoideum* como também para a expressão de vários genes relacionados com resposta ao dano do DNA e quimiotaxia induzida por carenciamento (Mendoza *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2007). Em *D. discoideum*, esta fosfatase é regulada pela quinase MEK1 (MAPK *kinase*-1) que funciona *upstream* ao complexo formado pela PP4c e pela subunidade reguladora SMKE (ortóloga a PP4R3, subunidade reguladora 3 da PP4c) durante a quimiotaxia e

desenvolvimento. Por sua vez, o produto gênico de *smkA* (SMEK) regula positivamente as funções da PP4c e permite sua translocação para o núcleo. As MEKs são quinases que fosforilam e ativam as ERKs-MAPKs, que por sua vez fosforilam os substratos efetores específicos, sendo requeridas para movimento celular e desenvolvimento multicelular (Ma *et al.*, 1997; Hastie *et al.*, 2000; O'Brien *et al.*, 2004; Pritchard *et al.*, 2004; Roux e Blenis, 2004; Keogh *et al.*, 2006; Murphy e Blenis, 2006).

1.7. Vias de sinalização de resposta a estresses em *D. discoideum*

D. discoideum possui mecanismos eficientes de resposta a estresses tais como choque osmótico, térmico e estresse oxidativo, já que está sujeito a variações ambientais constantes no seu habitat natural.

Em resposta a hipertonicidade as células encolhem, assumem um formato arredondado e rearranjam o citoesqueleto, sendo que a fosforilação/desfosforilação de actina e de miosina II foram relacionadas a estas alterações morfológicas. Ainda não se saiba qual quinase está envolvida nesta via, há evidência da participação da tirosina fosfatase 1 (PTP1) na desfosforilação da actina. A fosforilação da miosina II parece ser induzida pelo aumento dos níveis de cGMP através da guanilato ciclase solúvel (sGC) e pela quinase da cadeia pesada da miosina II ativada por uma proteína ligadora de cGMP. Sugere-se que a GTPase Rap1 esteja envolvida com a via de cGMP ao ativar sGC (Howard *et al.*, 1993; Jungbluth *et al.*, 1995; Kuwayama *et al.*, 1996; Bosgraaf *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002). A via que tem a participação de sGC, parece ativar o fator de transcrição STATc regulando a expressão de genes associados a resposta a este estresse, como ilustrado na Figura 6 (Araki *et al.*, 2003; Na *et al.*, 2007).

Figura 6. Prováveis vias de sinalização ativadas em resposta ao estresse hiper-osmótico em *D. discoideum*. Os sensores osmóticos não são conhecidos em *D. discoideum*. A via OPI (*Osmostress-Dependent Pathway 1*) está sob controle de DokA e leva a níveis elevados de cAMP, causando a ativação da PKA. A via cGMP nomeada OSP (*Osmostress-Dependent STATc Pathway*) leva a ativação e translocação nuclear do STATc. Uma terceira via de sinalização, a cascata da MAPK, foi proposta com base na regulação diferencial dos potenciais componentes de MAPK em *D. discoideum*. MP: membrana plasmática e MN: membrana nuclear. Esquema extraído de Na *et al.*, 2007.

Uma via paralela modulada pelos níveis de cAMP é mediada pela histidina quinase DokA (Figura 6). Os mutantes nocaute de DokA apresentam viabilidade celular reduzida quando expostos a alta osmolaridade, mas a elevação artificial da concentração de cAMP por adição de 8-bromo-cAMP recupera este fenótipo. Acredita-se que DokA é ativada por fosforilação em serina e que atue como uma fosfatase regulando negativamente o sistema de dois componentes Rde:RegA que é responsável pelo controle dos níveis de cAMP intracelular (Schuster *et al.*, 1996b; Ott *et al.*, 2000; Oehme e Schuster, 2001).

A maioria dos organismos responde ao aumento da temperatura através da síntese e acúmulo de proteínas de choque térmico (Hsp). As Hsps de alto peso molecular (Hsp 60, 70 e 90 kDa) possuem função de chaperonas, prevenindo a agregação de proteínas desnaturadas em células estressadas e garantindo o enovelamento adequado de proteínas nascentes em células não estressadas. As Hsps de baixo peso molecular (entre 20 e 30 kDa) estão relacionadas com termo tolerância, regulação da tradução em resposta ao estresse térmico, regulação do crescimento celular e como chaperonas moleculares (Loomis e Wheeler, 1982; Nover *et al.*, 1989; Knauf *et al.*, 1992; Jakob *et al.*, 1993; Kantorow e Piatigorsky, 1994; Linder *et al.*, 1996; Moerman e Klein, 1997).

D. discoideum possui seis Hsps anotadas no genoma com uma ou mais isoformas. Algumas destas proteínas já foram caracterizadas como é o caso da Hsp32 e da Hsp90. A Hsp32 é uma proteína nucleolar presente durante a fase de desenvolvimento e no crescimento vegetativo mesmo na ausência de choque térmico, mas sua expressão é induzida com o aumento da temperatura. Sugere-se que a Hsp32 seja necessária para o crescimento e/ou sobrevivência das células (de Maria *et al.*, 1997; Moerman e Klein, 1997; Moerman *et al.*, 1998; Moerman e Klein, 1998). Existem três isoformas da Hsp90 em *D. discoideum*: mitocondrial (TRAP1), de retículo endoplasmático regulada por glucose (Grp94) e a citoplasmática (HspD). A Grp94 está envolvida com resposta ao carenciamento, TRAP1 parece ser importante na resposta pré-

carenciamento e na diferenciação do esporo e HspD é importante na fase de agregação e pós-agregação (Sawarkar *et al.*, 2009).

O aumento da temperatura durante o crescimento de *D. discoideum* estimula o desenvolvimento, além disso, a composição de ácidos graxos na membrana das células é modificada (Das *et al.*, 1980; Saito *et al.*, 2005).

Uma via dependente de PKA em resposta ao estresse térmico, oxidativo e nitroativo foi proposta em *D. discoideum* (Figura 7). Nesta via participa a YakA, uma serina/treonina quinase que inibe o crescimento e acelera o desenvolvimento quando super-expressa em linhagens selvagens. Mutantes nulos para esta quinase perdem o controle do intervalo entre as divisões celulares, apresentando crescimento acelerado e pequeno tamanho celular. Além disso, estes mutantes são super sensíveis aos estresses oxidativo, nitrosoativo e térmico. A YakA é necessária para redução dos níveis de expressão de genes relacionados ao crescimento, em particular de *pufA*. PufA inibe a tradução do mRNA da subunidade catalítica de PKA (PKAc), portanto, a supressão da expressão de *pufA* resulta no aumento dos níveis de PKAc, aumento dos níveis protéicos da adenilil ciclase (*acaA*) e do receptor de cAMP (*carA*). Isto explicaria a indução do desenvolvimento de *D. discoideum* em consequência a estresses aplicados durante a fase de crescimento (Souza *et al.*, 1998; Taminato *et al.*, 2002; Mantzouranis, 2009).

Recentemente foi demonstrada a participação de *keaA* (membro da superfamília de proteínas que contém o domínio *kelch*) na via de sinalização que medeia estresses oxidativo, nitrosoativo e térmico em *D. discoideum*. A indução de transcritos de *keaA* só ocorre na presença de YakA sugerindo que KeaA seja regulada por esta quinase. Células deficientes em *keaA* são resistentes aos estresses oxidativo e nitrosoativo, apresentam uma redução na expressão de *pkaC*, *acaA* e *carA* e uma baixa produção de cAMP (Mantzouranis, 2009).

Figura 7. Via de sinalização proposta para a resposta a estresses em *D. discoideum*. As setas indicam ativação e as barras inibição. Esquema adaptado de Mantzouranis, 2009 e Taminato *et al.*, 2002.

D. discoideum é particularmente resistente a luz UV, radiação gama e substâncias químicas mutagênicas, no entanto, a base molecular para isto não é bem compreendida (Deering, 1988; Lee *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998).

O estresse oxidativo é causado pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) tais como oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Estas ROS quando não combatidas pela ação de catalases e superóxido dismutase podem danificar os componentes celulares. Porém, a consequência mais importante do estresse oxidativo consiste nas lesões ao DNA que podem ser mutagênicas e causar instabilidade genômica se não forem reparadas (Laval, 1996; Poulsen *et al.*, 1998; Tamarit *et al.*, 1998; Bohr e Dianov, 1999; Cadet *et al.*, 1999). O genoma de *D. discoideum* codifica dois genes para catalase, *catA* e

catB, e um gene para superóxido dismutase, *sodA*. Os transcritos de *catA* e *sodA* são expressos durante o crescimento e desenvolvimento e o nível de proteína é mantido constante. Em contraste, *catB* codifica uma proteína maior que só é expressa nos estágios finais do desenvolvimento. O mutante nulo de *catA* apresenta uma sensibilidade aumentada ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Garcia *et al.*, 2000).

Além destas enzimas, *D. discoideum* dispõe das vias de reparo de DNA por recombinação homóloga (HR), não homóloga por junção das extremidades (NHEJ), por excisão de base (BER) e excisão de nucleotídeo (NER), que auxiliam na manutenção da integridade cromossômica contra os possíveis efeitos danosos causados pelo estresse oxidativo (Hsu *et al.*, 2006).

2. Objetivos

Os aspectos apresentados ao longo da Introdução ilustram o importante papel da fosforilação reversível na regulação de vias de sinalização em diversos processos celulares. Assim como em outros eucariotos, em *D. discoideum*, as proteínas quinases desempenham papel chave na regulação do crescimento e na diferenciação celular. Esta importância estende-se para proteínas fosfatases, ainda que o conhecimento relativo ao papel biológico destas enzimas seja menor. Nos últimos dez anos, nosso grupo tem investigado a bioquímica e a função de serina/treonina fosfatases no crescimento e desenvolvimento de *D. discoideum*, em particular a PP1. Como já detalhado, esta espécie desperta grande interesse como modelo de estudo por apresentar um estágio multicelular no seu ciclo de vida, o que possibilita o estudo de diversos aspectos de um organismo multicelular, com as vantagens do uso de um eucarioto menos complexo e passível de manipulação genética. Neste contexto, tivemos neste trabalho os seguintes objetivos específicos:

47

1) Analisar o perfil de expressão dos genes codificadores de subunidades catalíticas e reguladoras de fosfatases da família PPP durante o crescimento em resposta a diferentes condições de estresse e nas principais fases do desenvolvimento. Para esta análise selecionamos os genes da PP1c, PP2Ac, PP4c, PP5c, PP6c e de 16 proteínas que potencialmente interagem com as subunidades catalíticas e que foram previamente identificadas através de ensaios de duplo-híbrido em levedura e em buscas por similares no genoma e proteoma de *D. discoideum* tais como DdI-2, DdI-3 entre outras. Nossa expectativa era que este tipo de estudo possibilitasse, ainda que indiretamente, associar estes genes, em particular os que mostrarem um perfil de expressão diferencial nas condições investigadas, em vias de sinalização relacionadas a estresses e/ou ao desenvolvimento em *D. discoideum*.

2) Investigar em maior detalhe a função de um gene candidato a subunidade reguladora, selecionado a partir dos resultados obtidos nas análises dos perfis de expressão. O gene selecionado para este estudo foi *DDB_G0292194*, que codifica uma proteína hipotética de 559 aminoácidos, que interage com DdPP1c em ensaios de duplo-híbrido em leveduras. Propusemos a obtenção e avaliação fenotípica de linhagens de *D. discoideum* que tenham este gene inativado por recombinação homóloga, além da obtenção da proteína recombinante correspondente expressa em bactérias visando à futura preparação de anticorpos policlonais que possibilitem ampliar a caracterização funcional desta proteína.

3. Procedimentos experimentais

3.1. Procedimentos experimentais utilizando *D. discoideum*

Os protocolos experimentais utilizando *D. discoideum* descritos a seguir são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de protocolos descritos na literatura (Spudich, 1987; Sussman, 1987; Kuspa *et al.*, 2001; Eichinger e Noegel, 2003; Kreppel *et al.*, 2004; Rivero e Maniak, 2006). As condições descritas a seguir foram utilizadas tanto para a linhagem axênica selvagem (AX4) quanto para as linhagens mutantes obtidas neste trabalho.

3.1.1. Condições de manutenção e cultivo de células

A linhagem AX4 de *Dictyostelium discoideum*, utilizada em nossos experimentos, foi cedida pelo Dr. William Loomis (University of California, San Diego, EUA). O cultivo foi realizado em placas de meio SM [bacto peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,1% (p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v), glicose 1% (p/v), ágar 2% (p/v), KH_2PO_4 13,9 mM e $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3,4 mM, pH 6,4]. Para iniciar uma cultura, uma pequena porção de corpos de frutificação maduros de *D. discoideum* foi misturada a 0,3 mL de uma suspensão de bactérias *Klebsiella aerogenes* preparada em meio SM líquido (sem ágar). A mistura foi espalhada com alça de vidro em placas de meio SM que foram mantidas a 22°C até a formação de novos corpos de frutificação, seguindo-se armazenagem a 4°C por até 15 dias, quando um novo estoque era feito.

Estoques de células foram mantidos a -80°C. Para tanto, o sedimento de 5×10^7 células em crescimento foi suspenso em 2 mL de uma solução contendo HL-5 [proteose peptona nº2 1% (p/v), glicose 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), KH_2PO_4 2,5 mM e $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3,4 mM, pH 6,4] 90% (v/v) e DMSO 10% (v/v) e em seguida congelado em gelo seco e imediatamente armazenado a -80°C. Para iniciar a cultura a partir destes estoques, as células de *D. discoideum* eram descongeladas na presença de 0,3 mL de uma suspensão de bactérias *K. aerogenes* e a suspensão obtida semeada em meio SM, como descrito

anteriormente. Os estoques de células congeladas foram utilizados periodicamente como fonte de material para dar início a novas culturas em meio de crescimento sólido. Para iniciar cultivo em meio líquido, células em crescimento em meio sólido foram transferidas para um frasco contendo 10 mL de meio de cultura HL-5 e mantidas sob agitação de 200 rpm a 22°C. Após dois dias, o volume de meio foi aumentado para 50-250 mL. Os experimentos foram realizados com células em crescimento exponencial ($2-4 \times 10^6$ células/mL).

3.1.2. Carenciamento de *D. discoideum*

Para obtenção de células em diferentes fases de desenvolvimento, células provenientes de cultivos em meio HL-5 foram submetidas à carência nutricional sobre filtros de nitrocelulose Millipore de cor preta na porosidade de 0,45 µm e com 47 mm de diâmetro, como descrito por Sussman, 1987. Esses filtros foram fervidos em água destilada por 10 min por três vezes e colocados sobre pré-filtros (Schleicher & Schuel nº 8, 47 mm) previamente embebidos em tampão Sorensen (KH_2PO_4 20 mM, pH 6,4). As células foram coletadas por centrifugação a 500 xg por 5 min a 4°C e lavadas com tampão Sorensen por três vezes para retirada completa do meio de cultura. Aliquotas contendo 5×10^7 células suspensas em 0,5 mL de tampão Sorensen foram espalhadas uniformemente sobre os filtros e incubadas em câmara úmida a 22°C. Nessas condições, obtínhamos o desenvolvimento sincrônico e completo, até a formação do corpo de frutificação maduro, após período médio de 24 h a 22°C. Os estágios de desenvolvimento foram monitorados por observação na lupa e células de diversas fases do ciclo de vida foram ressuspensas em 1,0 mL de tampão Sorensen e imediatamente fotografadas ou coletadas. Para coleta das células do filtro, foi utilizado um tubo cônico de 50 mL contendo aproximadamente 25 mL de tampão Sorensen gelado. O tubo foi agitado vigorosamente até as células soltarem do filtro e depois centrifugado nas mesmas condições descritas acima. O sedimento foi processado de acordo com o experimento planejado.

Para o desenvolvimento em meio KK2, $0,5-2,5 \times 10^7$ células foram coletadas por centrifugação a 490 xg por 5 min a 20°C, suspensas em 40 mL de tampão Sorensen (KH_2PO_4 20 mM, pH 6,4) e lavadas neste tampão por 3 vezes. As células foram suspensas em 200 μL de tampão e espalhadas em placa contendo meio KK2 (KH_2PO_4 2,2 g/L, K_2HPO_4 0,7 g/L e ágar 15 g/L), seguindo-se incubação em câmara úmida escura a 22°C. As diferentes fases de desenvolvimento foram observadas em lupa e fotografadas nos tempos desejados.

3.1.3. Indução de estresse térmico, osmótico e oxidativo

O estresse térmico foi realizado pela transferência de metade de uma cultura de 500 mL em fase de crescimento exponencial a 22°C para 30°C por tempos variando de 30 min a 6h.

Para o estresse osmótico, 2 M de sorbitol foi adicionado a metade de uma cultura de 500 mL em crescimento exponencial para uma concentração final de 200 mM de sorbitol, seguindo-se incubação por 15 a 60 min a 22°C.

O estresse oxidativo foi provocado pela adição de 500 μM de H_2O_2 em metade de uma cultura de 500 mL em crescimento, seguindo-se incubação por 120 e 240 min a 22°C.

Após qualquer destes tratamentos, as células foram coletadas por centrifugação e imediatamente processadas ou congeladas em gelo seco/etanol para uso posterior.

3.1.4. Indução de dano ao DNA com bleomicina e irradiação gama

Nos ensaios com bleomicina, células crescidas na fase exponencial foram diluídas a 1×10^6 células/mL em 25% HL-5 / 75% meio KK2, seguindo-se adição de 0 (controle), 20, 40 ou 60 mU/mL de sulfato de bleomicina (Sigma) e incubação com agitação a 22° C por 16 h.

Para a irradiação, as células foram crescidas a 1×10^6 células/mL em meio HL-5 e irradiadas com doses de 20, 100, 250 ou 1.000 Gy de raios gama Co^{60} (1,89 kGy/h) em um Gammacell 200.

3.1.5. Avaliação da viabilidade celular

Após os tratamentos descritos anteriormente, as células foram contadas, diluídas em meio SM líquido e aproximadamente 200 células foram plaqueadas em meio sólido SM na presença de 400 µl de *K. aerogenes*. As placas foram incubadas a 22°C e as colônias foram contadas após 3 dias de crescimento. A porcentagem de sobrevivência foi calculada utilizando-se a relação do número de células tratadas pelo número de células não tratadas (controle).

3.1.6. Curva de crescimento

Células crescidas em meio líquido na fase exponencial foram diluídas a 5×10^5 células/mL em 10 mL de meio HL-5 e submetidas às seguintes condições de cultivo: incubação a 27 ou 30°C, adição de 200 ou 400 mM de sorbitol ou adição de 0,5 ou 1 mM de H₂O₂. O controle foi sempre mantido em HL-5 a 22°C. A partir do tempo 0 h, as células foram contadas com o auxílio da câmara de Neubauer em intervalos regulares, 2 vezes ao dia durante 5 dias. A fim de verificar a ocorrência ou não de recuperação do crescimento celular, após 5 h dos tratamentos as culturas foram centrifugadas a 490 xg por 5 min a 20°C, lavadas 1 vez com meio HL-5, suspensas neste mesmo meio e incubadas a 22°C.

52

3.1.7. Microscopia de células fixadas de *D. discoideum*

Para fixação de células em lamínula de vidro, 300 µL de uma cultura na fase exponencial foram adicionados sobre uma lamínula contida dentro de um poço de aproximadamente 35 mm. O tempo de espera para adesão das células à lamínula foi de 30 min a temperatura ambiente. Após adesão das células, cada poço foi lavado com 2 mL de PBM (KH₂PO₄ 20 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0,01 mM, pH ajustado para 6,1 com KOH). Em seguida foram adicionados 1,5 mL de uma solução 9:1 (v/v) de PBM/formaldeído 37% e as células foram fixadas por 30 min. Esta solução foi removida, seguindo-se a etapa de permeabilização das células e bloqueio pela adição de 1 mL de T50BS (Tris/HCl 50 mM,

pH 7.9, NaCl 200 mM e NaN_3 10 mM) contendo 5% de leite desnatado e 0,25% de Tween 20 por 15 min. As células foram coradas com DAPI (Molecular Probes) e faloidina marcada com fluoresceína isotiocianato (Sigma). As lâminulas foram mantidas submersas em PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8 mM e KH_2PO_4 1,5 mM, pH 7,2) até a visualização em microscópio confocal, Zeiss Axiovert 100 com uma objetiva de 100x Plana-Apocromática 1.4 em óleo de imersão, acoplada a um sistema confocal MRC-1024UV (BioRad).

Alternativamente, aproximadamente 5×10^5 células foram fixadas em suspensão com 3% de formaldeído por 1 h. Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas uma vez com PBM (20 mM KH_2PO_4 , 10 μM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH 6,1 com KOH). Uma solução contendo albumina 1% e saponina 0,05% em PBM foi adicionada para permeabilização e bloqueio. Após duas lavagens com PBM, as células foram coradas com DAPI e faloidina e visualizadas em microscópio de fluorescência *Nikon Camera DXM1200F*.

3.1.8. Transfecção de DNA por eletroporação

Para obtenção de mutantes de *D. discoideum* que tivessem o gene *BEC6V2_0_00495* inativado, utilizamos a técnica de substituição do gene por recombinação homóloga (Egelhoff *et al.*, 1991). Neste método o gene ou cDNA de interesse é previamente modificado pela inserção de um cassete contendo o gene de resistência ao antibiótico blasticidina e utilizado na transfecção das células. Os clones transfectantes resistentes ao antibiótico são analisados para verificação da eventual ocorrência de recombinação homóloga e inativação do gene alvo (Sutoh, 1993).

Aproximadamente 2×10^7 células da linhagem AX4 foram coletadas por centrifugação a 490 xg por 4 min a 4°C. As células foram lavadas 2 vezes com 4 mL de tampão EP ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 10 mM e sacarose 50 mM, pH 6,2) gelado. O precipitado celular foi suspenso em 100 μL de tampão EP⁺⁺ ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 10 mM, Sacarose 50 mM, MgSO_4 1 mM, NaHCO_3 1 mM, ATP 1 mM e CaCl_2 1 μM , pH 6,2)

contendo 10 µg de DNA. A suspensão foi transferida para uma cubeta gelada (2-mm *gene pulser cuvette*, Bio-Rad) e mantida em gelo por 1 min. Em seguida, as células foram submetidas a 3 pulsos de 0,9 msec a 0,68 kV, 24Ω e 25 µF no aparelho Electro Cell Manipulator BTX 630. Após a eletroporação, a cubeta foi mantida em gelo por 10 min, seguindo-se adição de 1 mL de meio de cultura HL-5. Metade do volume contido na cubeta (550 µL) foi transferido para 2 placas de cultura de células com 10 mL de HL-5 contendo sulfato de estreptomicina e penicilina 100 µg/mL.

As placas foram incubadas a 22°C e no dia seguinte foi adicionado 10 µg/mL de blasticidina, seguindo-se incubação por mais 7 dias. Após o crescimento na placa, os clones resistentes a blasticidina foram recuperados pipetando-se repetidamente o meio de cultura e submetidos a plaqueamento em diluições apropriadas para isolamento de clones em meio de cultura SM sólido contendo *K. aerogenes*.

3.1.9. Preparação de DNA genômico

Para isolamento de DNA genômico de *D. discoideum*, 5x10⁷ células foram coletadas por centrifugação a 500 xg por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e 75 µL de EDTA 150 mM (pH 8,0) gelado foram adicionados para suspensão das células em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 100 µL de sarcosil 10 % (p/v) e o tubo foi agitado moderadamente e incubado a 55°C por 30 min. Foram adicionados 250 µL de acetato de amônio 4 M e após agitação vigorosa a suspensão foi centrifugada a 16.000 xg por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v). O tubo foi agitado e centrifugado a 16.000 xg por 4 min a temperatura ambiente. Esta extração foi repetida por mais 2 vezes. A fase aquosa foi então extraída com clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v) e centrifugada nas mesmas condições descritas acima.

O DNA foi precipitado pela adição de 2,2 volumes de etanol 100 % e 0,1 volumes de acetato de potássio 3M (pH 5,5) à fase aquosa. O tubo

foi centrifugado a 16.000 xg por 15 min e o precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) nas mesmas condições. O etanol foi desprezado e precipitado foi seco por centrifugação a vácuo (Eppendorf Concentrator 5301) por 5 min e suspenso em 100 µL de TE (Tris/HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 7,5) contendo 10 µg/mL de RNase A. A concentração do DNA foi estimada pela medida da absorbância a 260nm, sendo que $Abs_{260nm}=1$ equivale a 50 µg de DNA fita dupla/mL, e sua qualidade avaliada em gel de agarose 1%.

3.1.10. Minipreparação de DNA genômico de clones para análise por PCR

Para extração de DNA de uma pequena quantidade de células crescidas em meio sólido ou líquido, um volume de células suspensas em meio de cultura ou água foram misturadas com quatro volumes de tampão de lise [Tris/HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, Igepal 0,45 % (v/v) e Tween 20 0,45 % (v/v), pH 8,3] contendo proteinase K (1 µL de 20 µg/µL para cada 25 µL de tampão de lise). O lisado celular foi incubado a 95°C por 1 min para inativação da proteinase K. Em seguida, 1 µL do lisado foi utilizado em ensaios de PCR.

55

3.1.11. Preparação de RNA total

Para extração de RNA total, o sedimento de células de *D. discoideum* equivalente a 2×10^7 células foi suspenso em 1 mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies) e incubado por 5 min a temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 0,2 volumes de CHCl₃, seguindo-se de agitação vigorosa e incubação por mais 3 min a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 16.000 xg por 15 min a 4°C e a fase aquosa transferida para outro tubo. A esta fase foi adicionado 1 volume de isopropanol, seguindo-se incubação por 10 min. Após centrifugação por 10 min a 4°C a 16.000 xg, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v) por centrifugação nas mesmas condições anteriores. O etanol foi desprezado e o precipitado seco por 10 min a temperatura ambiente. O precipitado de RNA foi suspenso em 50 µL de H₂O livre de RNase e a amostra

aquecida por 10 min a 65°C. A concentração e a pureza do RNA total foram estimadas pela medida da absorbância a 260nm e 280nm, sendo que $Abs_{260nm} = 1$ equivale a 40 µg de RNA/mL quando a razão $A_{260nm}/A_{280nm} \geq 1,8$. A integridade do RNA total obtido foi avaliada pela análise da proporção relativa das bandas do rRNA 18S e 26S em eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído. Em alguns casos a qualidade e quantidade do RNA total foram avaliadas no aparelho BioAnalyser (Agilent).

3.2. Procedimentos experimentais utilizando *Escherichia coli*

3.2.1. Manutenção e cultivo das bactérias

Repiques, estoques e culturas de *E. coli* foram realizados seguindo protocolos padrões. Para os experimentos de transformação de DNA foi utilizada a cepa Sure e para os experimentos de expressão de DdI-3 e DdI-2 recombinantes utilizamos as cepas BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS, respectivamente. Estas cepas foram obtidas da Stratagene, e apresentam os seguintes genótipos:

56

Sure: $e14^-(McrA^-) \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB rscJ sbcC umuC.Tn5 (kan^r) uvrC [F^+proAB lac^qZ \Delta M15 Tn10 (Tetr)]^c$

BL21(DE3): $F^- ompT hsd S_B (r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3)$

BL21(DE3)pLysS: $BF^- dcm ompT hsd S (r_B^- m_B^-) gal\lambda (DE3) [pLysS Cam^r]$

Culturas das bactérias foram armazenadas a -80°C em meio LB [Tryptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 0,5% (p/v), pH 7,5] ou 2X TY [Tryptona 1,6% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v) e NaCl 8,5 mM, pH 7,4] contendo glicerol 20% (v/v). Quando necessário, alíquotas destes estoques foram semeadas em placas de meio LB sólido [meio LB contendo ágar 2% (p/v)] ou, no caso da BL21(DE3)pLysS, em placas 2X TY sólido [meio 2X TY contendo ágar 1,5% (p/v)] contendo cloranfenicol 34 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 16-18 h.

Para obtenção de culturas em meio líquido, uma colônia foi inoculada em 3 mL de meio LB ou 2X TY líquido e crescida a 37°C, por 16-18 h sob agitação a 200 rpm.

3.2.2. Preparo de bactérias competentes para transformação

Inicialmente as bactérias foram estriadas em placas de meio LB sólido e incubadas a 37°C por 16-18 h. Posteriormente, uma colônia isolada foi inoculada em 3 mL de meio LB ou 2X TY líquido e crescida a 37°C, por 16-18 h a 200 rpm. Aproximadamente 0,5 mL de pré-inóculo foi transferido para 250 mL de meio SOB [extrato de levedura 0.5% (p/v), triptona 2% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM e MgSO₄ 10 mM] líquido fresco, seguindo-se crescimento a 22°C por 16-24 h até DO_{600nm} = 0,5. As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis, resfriadas em banho de gelo por 10 min e em seguida coletadas por centrifugação (8.461 xg por 10 min a 4°C). O sedimento foi suspenso em 80 mL de TB (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM, pH 6.7) gelado, mantido em gelo por 10 min e centrifugado nas condições anteriores. As células foram suspensas em 20 mL de TB gelado e 1,4 mL de DMSO, distribuídas em alíquotas de 500 µL, congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a -80°C.

3.2.3. Transformação de bactérias por choque térmico

Aproximadamente 0,1 mg do DNA plasmidial foi adicionado a 500 µL de bactérias competentes e a mistura foi mantida em gelo por 30 min. Em seguida as células foram incubadas em banho a 42°C por 90 seg, rapidamente resfriadas em gelo por 3 min, seguindo-se adição de 1 mL de meio LB, sendo a suspensão bacteriana então transferida para tubo de cultura e incubada a 37°C por 1 h a 200 rpm. Em seguida, 100 µL, 200 µL e 300 µL desta cultura foram semeados em placas de meio LB sólido contendo o antibiótico apropriado. Algumas colônias transformantes foram inoculadas em meio LB líquido contendo

antibiótico para posterior mini-preparação de plasmídeos e análise quanto à presença das construções plasmidiais de interesse.

3.2.4. Preparação de plasmídeos em pequena escala

As bactérias foram crescidas em 1,5 mL de LB contendo carbenicilina 100 µg/mL ou canamicina 30 µg/mL a 37°C por 16-18 h a 200 rpm e então submetidas a centrifugação a 16.000 xg por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 100 µL de solução GET/RNase (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, glicose 0,5 M, EDTA 10mM e RNase A 150 µg/mL) foram adicionados para suspensão do sedimento de bactérias. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de lise [SDS 1% (p/v) e NaOH 0,2 M] recém-preparada misturando-se delicadamente por inversão até completa homogeneização. A suspensão foi incubada por 5 min a temperatura ambiente, seguindo-se a adição de 200 µL de solução de neutralização (CH₃COOK 5 M, pH 4,8). Após mistura da suspensão por inversão suave do tubo, seguiu-se incubação por 20-30 min a 4°C e centrifugação a 16.000 xg por 15 min a temperatura ambiente. Do sobrenadante obtido, foram tomados 400 µL e adicionados a 300 µL de isopropanol, em um novo tubo. Após centrifugação a 16.000 xg por 10 min a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v) nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi seco a vácuo (Eppendorf concentrator 5301), suspenso em 25 µL de Tris.HCl 10mM, pH 8,0 ou água milli-Q e mantido a -20°C.

3.2.5. Preparação de plasmídeos em larga escala

A preparação de plasmídeos em larga escala seguiu os protocolos do *PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit* (Invitrogen) ou *Hispeed Plasmid Midi Kit* (Qiagen).

3.3. Procedimentos experimentais utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1. Manutenção e cultivo de *S. cerevisiae*

Células de *S. cerevisiae* das linhagens utilizadas, armazenadas a -80°C em meio YPD [Extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v) e glicose 2% (p/v)] contendo 25% de glicerol foram descongeladas e semeadas em YPD sólido [YPD contendo ágar 2% (p/v)]. As placas foram incubadas a 30°C por 48 h ou até que as colônias atingissem aproximadamente 2 mm de diâmetro. Em seguida, as placas foram seladas com filme plástico (Parafilm M) e armazenadas a 4°C até no máximo 2-3 meses. Para iniciar culturas líquidas, uma colônia da placa de estoque foi inoculada em meio YPD, seguindo-se incubação a 30°C por 16-18 h com agitação a 200-250 rpm. Para a maioria das linhagens esta condição gera uma cultura em fase estacionária ($DO_{600nm} > 1,5$). Para obtenção de culturas em fase exponencial, alíquotas de culturas em fase estacionária foram diluídas em meio fresco até $DO_{600nm} = 0,2-0,3$, seguindo-se incubação a 30°C com agitação (200 rpm) até a DO_{600nm} desejada. As linhagens utilizadas contêm plasmídeos com pelo menos uma marca nutricional que permite seleção de transformantes através de crescimento em meio SD complementado com os aminoácidos requeridos. O meio SD [YNB sem aminoácidos 0,67% (p/v), glicose 2% (p/v), solução de aminoácidos e bases 10x 10% (v/v)] foi preparado utilizando-se diferentes soluções de aminoácidos e bases concentradas 10X, as quais continham L-isoleucina 300 mg/L, L-valina 1.500 mg/L, hemissulfato de L-adenina 200 mg/L, L-arginina 200 mg/L, L-histidina 200 mg/L, L-leucina 1.000 mg/L, L-lisina 300 mg/L, L-metionina 200 mg/L, L-fenilalanina 500 mg/L, L-treonina 2.000 mg/L, L-triptofano 200 mg/L, L-tirosina 300 mg/mL, L-uracila 200 mg/L, omitindo-se para cada uma delas os componentes necessários para seleção, como por exemplo L-triptofano, L-histidina ou L-leucina.

3.3.2. Transformação de leveduras em pequena escala

A levedura AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3*, *GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2*, *URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ*) foi inoculada em 10 mL de YPD ou meio SD complementado com aminoácidos requeridos pela linhagem. A cultura foi incubada a 30°C até atingir $DO_{600nm} = 0,8-1,0$. Cerca de 8 mL da cultura foram transferidos para tubos estéreis e centrifugados a 3.220 xg por 5 min. As células foram suspensas em 2 mL de água estéril e centrifugadas novamente. Em seguida, adicionaram-se ao sedimento de células 200 µL da solução TE/LiOAc (Tris-HCl 0,01M, EDTA 1mM e $C_2H_3LiO_2$ 0,1M, pH 7,5) preparada na hora do uso. Aproximadamente 5 µg do DNA plasmidial de interesse foram transferidos para um tubo de microcentrífuga juntamente com 200 µg de DNA de espermatozóide de salmão (10 µg/µL). Cerca de 100 µL de células foram então misturados à solução de DNA, seguindo-se adição de 600 µL da solução PEG/LiOAc [PEG 4.000 40% (v/v), $C_2H_3LiO_2$ 0,1M]. A mistura foi incubada a 30°C por 30 min com agitação ocasional dos tubos e então submetida a choque térmico a 42°C por 15 min. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 3.220 xg por 2 min e o sobrenadante removido com auxílio da micropipeta. Por fim, as células foram suspensas em 0,4 mL de TE pH 7,5 estéril e semeadas em meio seletivo. As placas foram incubadas a 30°C por no mínimo 48 h ou até o aparecimento de colônias.

3.3.3. Ensaio de interação no sistema duplo-híbrido utilizando diluição seriada

As leveduras transformadas foram crescidas durante 16 h em meio SD contendo a mistura de aminoácidos sem triptofano e leucina (meio seletivo duplo). A absorbância das culturas foi medida a 600nm e uma alíquota foi diluída a 1 mL em meio seletivo duplo para obtenção de uma DO_{600nm} de ~0,2. Em seguida 10 µL de cada suspensão foram transferidos serialmente para tubos contendo 90 µL de meio seletivo duplo (4 diluições de 10 vezes a partir da suspensão

inicial). Foram aplicados 5 µl de cada suspensão em meio SD seletivo contendo histidina ou não (meio seletivo triplo). As placas foram incubadas a 30°C por 2-3 dias e o crescimento foi avaliado comparativamente.

3.4. Manipulação e análise de ácidos nucléicos

3.4.1. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído

A amostra de RNA (15-20 µg) a ser analisada foi misturada com 3 vezes o volume de tampão de amostra [formamida 65% (v/v), MOPS 10X 12% (v/v), formaldeído 8% (v/v), azul de bromofenol 3% (p/v) e brometo de etídeo 0,5 mg/mL], preparado em H₂O livre de RNase imediatamente antes da aplicação em gel de agarose contendo formaldeído [agarose 1,25% (p/v) e MOPS 1X contendo 16% (v/v) de formaldeído, adicionado após a fusão da agarose]. A solução de MOPS 10X corresponde a MOPS ácido 4,1% (p/v), acetato de sódio 0,4% (p/v) e EDTA 0,028% (p/v). A H₂O livre de RNase corresponde a H₂O previamente tratada com dietilpirocarbonato como descrito na literatura. A eletroforese foi realizada em baixa voltagem (75 V) em aparato mantido livre de contaminação com RNase.

3.4.2. Transferência de RNA para membrana de náilon (Northern blot)

Após eletroforese do RNA total, o gel foi incubado por 30 min sequencialmente em solução desnaturante (NaOH 0,05 M) e em solução de neutralização (Tris/HCl 0,1 M e NaCl 0,15 M, pH 7,5). As incubações foram realizadas a temperatura ambiente e sob agitação branda. A transferência para membrana de náilon foi realizada por 2 h no sistema de transferência por pressão (Posi Blot 30-30 *Pressure Blotter and Pressure Control Station*, Stratagene), seguindo-se as instruções do fabricante. Após a transferência, a membrana foi marcada com caneta na região de aplicação das amostras e a fixação do RNA foi feita diretamente no aparelho UV Stratalinker 1800 (Stratagene), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram imediatamente

utilizadas para hibridização ou embaladas em filme plástico e armazenadas.

3.4.3. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Os ensaios de PCR foram realizados em soluções contendo 0,2-1 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada dNTP (Stratagene), tampão da Taq DNA polimerase, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 50-100 ng de DNA molde em volume final de 50 μ L. A condição usual de programação dos ciclos do termociclador (Perkin Elmer) foi: desnaturação inicial por 4 min a 94°C, seguida de 30-35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50-60°C (variável de acordo com a T_m do oligonucleotídeo) e 1 min a 65-72°C. O produto da reação foi armazenado a 4°C e analisado em gel de agarose 1-2 %.

3.4.4. PCR semiquantitativa ou quantitativa em tempo real precedida por transcrição reversa

Para síntese da primeira fita de cDNA utilizamos 5 μ g de RNA total pré-tratado com RQ1 DNase livre de RNase (Promega) e da transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) e iniciadores dT12-18 ou dT20, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi diluído com água livre de nuclease e guardado congelado até o uso.

A PCR semiquantitativa foi realizada em soluções contendo 0,6 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada dNTP (Stratagene), tampão da Taq DNA polimerase, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 100 ng de cDNA em volume final de 20 μ L. A programação dos ciclos do termociclador (Perkin Elmer) foi: desnaturação inicial por 4 min a 94°C, seguida de 40 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 60°C e 45 seg a 70°C. As reações contendo os oligonucleotídeos de amplificação do mRNA H3a (gene constitutivo que codifica a histona 3) foram coletadas nos ciclos 20, 25 e 35 e as que continham os oligonucleotídeos de amplificação de uma região 3' terminal do mRNA BEC6V2_0_00495 foram coletadas nos ciclos 25, 32 e 40. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%.

Os ensaios de PCR quantitativa (qPCR) em tempo real foram feitos no equipamento ABI PRISM 5700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) utilizando-se parâmetros padrão. A mistura da PCR incluía 7,5 ou 10 µL de *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG* (Invitrogen), 600 nM de cada oligonucleotídeo e 20-75 ng de cDNA molde. Para confirmar a geração de produtos específicos, a PCR foi imediatamente seguida por análise da curva de fusão do produto de PCR, de acordo com as recomendações do fabricante (Applied Biosystems).

Para normalizar a quantidade de RNA total por amostra foram utilizados oligonucleotídeos para amplificação do mRNA IG7 (um gene de expressão constitutiva e invariável, frequentemente utilizado como normalizador em *D. discoideum*). A razão de expressão em cada amostra, comparada ao controle (células não tratadas ou tempo 0h) foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, como descrito em (Livak e Schmittgen, 2001), a partir de pelo menos duas réplicas biológicas (experimentos independentes) com ensaios de RT-qPCR realizados em triplicata.

As sequências dos oligonucleotídeos para RT-qPCR foram planejadas com o programa PRIMER EXPRESS 2.0 (Applied Biosystems) ou com o programa PRIMER3 para gerar amplicons de 50 a 150 pb (Tabela 1), sendo então encomendados à e encomendados à Prodimol Biotecnologia S.A. A eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos foi avaliada por RT-qPCR (E) através de um ensaio no qual a concentração de cDNA foi variada de 0.4-50 ng (Tabela 1). Estas eficiências foram calculadas após a geração dos interceptos pelo gráfico Ct versus log da concentração de cDNA a partir da equação: $E = 10^{[-1/\text{intercepto}]}$. Sendo que E igual a 2 corresponde a 100% de eficiência, pois implica que a cada ciclo a quantidade de produto de PCR resultante é o dobro da inicial. Todos os oligonucleotídeos foram considerados adequados para a realização do RT-qPCR e para a análise dos dados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

Tabela 1. Relação dos oligonucleotídeos, tamanho do amplicon e eficiência de amplificação de transcritos analisados por RT-qPCR.

Gene	Oligonucleotídeos (Sequência 5'-3')	Fragmento (pb)/E
<i>pppB</i> (<i>DdPP1c</i>)	F- GGAAAGCATTTACAGATTGCTTCA R- GAGACCACCATGCATACAAAAGAT	84/2.08
<i>DDB_G0292</i> <i>194</i>	F- TGACGATGATGGATTCCCTCCAAG R- AGCAGTTGTTGATGGCGAAGTTGG	142/2.06
<i>med26</i>	F- CATCATTGCCAGCATCTACA R- TGATGAGGAAAGGGATGTTG	117/2.18
<i>DDB_G0270</i> <i>118 (DdI-3)</i>	F- TGCACACAACAAGATCACCA R- GGTGGAGAATTTGGACCACT	118/2.19
<i>DDB_G0285</i> <i>313</i>	F- GGTCAACGTTTCAGGTTTGT R- CCACTGCTGCTATTTGGATG	137/2.2
<i>DDB_G0293</i> <i>300</i>	F- TGTAATTTGTCATCCACTTTTATCC R- CAAAGATCCAACATAAAGAAATTGG	101/2.22
<i>DDB_G0269</i> <i>300</i>	F- GGATCGAAAAGAAGATGATGC R- TTGGTGTTCAAGTTCCCAAA	145/2.1
<i>cwc15</i>	F- GAGTCGCTCATGGTAATCCTT R- CAACGGGTTTCATCTCTAGCTT	138/1.96
<i>dpiA</i> (<i>DdI-2</i>)	F- GAAAAGAGTGAATGGGATTGAG R- TTATCATCGCTGTCACCTTCTCA	119/1.72
<i>pprA</i>	F- ACATTGAAACCTTATGGTTGGGTAGA R- TCCAACCAAACCTTTGACACCA	132/1.99
<i>pppC</i> (<i>DdPP4c</i>)	F- TCAAAGAGAGTGAAGTTAGAGCATTATGT R- CACCACAATAGTTACTGGTGAATCTACT	95/2.27
<i>DDB_G0279</i> <i>647</i>	F- TTGCATTGGATCGTGTTTTT R- TACCACCTTTGCCCTTTACC	113/1.96
<i>pp4r1</i>	F- GGAACAAATACAGCTGAAGCA R- TGCTCAACGAGATAACCACAA	147/1.96
<i>smkA</i>	F- CAACACCAAAAAGAAAATTGGA R- GGTGATTCATCGCAACCAT	113/2.09
<i>ppp5C</i>	F- GGGGTAACCATGAGACAACC R- AAACGATTCATCCAACACGA	143/2.03
<i>snfA</i>	F- CCACATGAGATTATGGGTGAA R- TTGGCTTTCCATTAACCATTC	11/2.14
<i>anapc6</i> (<i>cdc16</i>)	F- CACATGGCGGTAGTAGTGGT R- AACCAAGATGCACCCATTCT	145/2.05
<i>anapc3</i> (<i>cdc27</i>)	F- GCCTTCTATGGCATTGGATT R- ACACCGAACTGGACTCATTG	103/2.02
<i>phoA</i> (<i>PP2Ac</i>)	F- CATTTTCTCCGCTCCAAACT R- TGTGGTTACCTCTTCTTGG	123/2.17
<i>pppA</i>	F- GGAGTTGATTGGGCAAAGA R- CAGTTGAAAGGGTTGAAATTGA	112/2.3
<i>pppD</i> (<i>PP6c</i>)	F- CCTCATTTGTGCTGCTCATC R- AGGATGGAAGCGACATTACC	123/2.17
<i>pho2B</i> (<i>PP4-like</i>)	F- TTTGGTCCGCTCCAAACTAT R- GGAGCAGCAGCATAGGTGT	103/2.08
<i>hspC</i>	F- GCTGCTCAACAACCAGAAAA R- TGGTTGTTTTGGTGCATTTT	124/n.d.
<i>acaA</i>	F- TCCTTTGGTTGCTGGTTGTA R- TCTTGAGCATTGGATTGCAT	101/n.d.
<i>ecmA</i>	F- AGCTGATAGTTGCGATTCCA	122/n.d.

	R- TACCTCCTGTACCACCACCA	
<i>rn1A</i>	F- GTGGTTCGGCACCTCGAT	67/2.06
(IG7)	R- CACCCCAACCCTTGGAAGT	
<i>gapA</i>	F- CAAATTTAGCCGCATTGAAA	95/n.d.
	R- TTTTCATCAACCACCTCCAA	
<i>gsr</i>	F- GTCAAATTTGTAAGTGAAGCATCCA	120/n.d.
	R- TGCCCAAATTACACATTCAACTG	

F, forward; R, reverse;
E, eficiência de amplificação;
n.d., não determinado

3.4.5. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A amostra de DNA a ser analisada foi previamente misturada com 0,1 volume de tampão de amostra [azul de bromofenol 0,25% (p/v) e sacarose 40% (p/v)] e a eletroforese foi realizada em gel de agarose [0,7-0,9% (p/v)] contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, a 80-90 V em TBE (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). A corrida foi interrompida após o corante ter percorrido aproximadamente 4/5 da distância entre o local da aplicação e o limite inferior do gel. O gel foi fotografado sob luz ultravioleta e os tamanhos dos fragmentos foram estimados mediante comparação com a mobilidade de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos.

65

3.4.6. Transferência de DNA para membranas de náilon (Southern blot)

O DNA genômico de *D. discoideum* (10 µg) digerido por enzimas de restrição foi separado por eletroforese em gel de agarose. O gel foi incubado por 30 min sequencialmente em solução de despurinação (HCl 0,25 M), em solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) e, finalmente, em solução de neutralização (Tris.base 1 M, pH 7,4 e NaCl 1,5 M). Todas as incubações foram realizadas a temperatura ambiente e sob agitação branda.

A transferência para membrana de náilon foi realizada por 1 hora no sistema de transferência por pressão (Posi Blot 30-30 Pressure Blotter and Pressure Control Station, Stratagene) seguindo-se as instruções do fabricante. Após a transferência, a membrana foi marcada com caneta na região de aplicação das amostras, e a fixação do DNA à

membrana foi feita diretamente no aparelho UV Stratalinker 1800 (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram imediatamente utilizadas para hibridização ou embaladas em filme plástico e armazenadas.

3.4.7. Preparação de sonda de DNA radioativa

A marcação da sonda de DNA foi feita com o kit *Random Primers DNA Labeling System* (Invitrogen), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, utilizando 50 μCi de $[\alpha^{32}\text{-P}]$ dATP. Em cada reação de marcação foram utilizados 50-100 ng de fragmentos de DNA de 300-700 pb previamente desnaturados por fervura durante 5 min, seguindo-se resfriamento em gelo.

Para purificação da sonda radioativa, uma pequena quantidade de lã de vidro foi empacotada no fundo de uma seringa de 1 mL sem agulha apoiada em um tubo cônico de 15 mL e preenchida até 0,9 mL de resina Sephadex G-50 previamente equilibrada em TE. A resina foi lavada com 5-10 mL de STE (Tris/HCl 10 mM, NaCl 10 mM e EDTA 10 mM, pH 7,5) por centrifugação a 1.258 xg por 3 min a temperatura ambiente. Foram adicionados 50 μL da reação contendo a sonda radioativa seguindo-se eluição da sonda em tubo limpo, por centrifugação nas mesmas condições anteriormente descritas.

Para verificação da eficiência de incorporação radioativa, alíquotas de 1 μL da sonda purificada e não purificada foram adsorvidas em pedaços de papel de filtro (1 x 1 cm). Um pedaço de papel contendo a sonda não purificada e outro contendo a sonda purificada foram tratados com 25 mL de TCA 10 % (v/v) por 10 min a 4°C por 2 vezes. Em seguida, os papéis foram lavados com etanol absoluto e depois de secos a radioatividade foi medida em espectrofotômetro de cintilação (Beckman) e comparada com os papéis contendo as mesmas amostras que não tinham sido submetidas ao tratamento com TCA. Em geral, a atividade específica das sondas preparadas estava na faixa de 2×10^8 cpm/ μg de DNA.

3.4.8. Hibridização de DNA ou RNA com sonda radioativa

A membrana foi apoiada em uma tela de náilon e então colocada na garrafa de vidro contendo solução de hibridização [Formamida 50 % (v/v), Denhardtts 5X, SSPE 6X, SDS 0,1 % (p/v) e DNA de esperma de salmão 100 µg/mL previamente fervido por 5 min e resfriado em gelo]. A solução de Denhardtts corresponde a: Ficoll 1% (p/v), polivinilpirrolidona 1% (p/v) e BSA fração V 1% (p/v). A solução SSPE 20X corresponde a: NaCl 3 M, NaH₂PO₄ 0,2 M e EDTA 20 mM, pH 7,4. Esta pré-hibridização foi realizada a 37°C por pelo menos 2 h. Em seguida, a sonda radioativa previamente fervida por 5 min e resfriada em gelo foi adicionada a solução de hibridização, seguindo incubação 16 h a 37°C. Após hibridização, a membrana foi lavada 2 vezes com solução de lavagem [SSPE 0,5X, NaCl 3 M, NaH₂PO₄ 0,2 M, EDTA 20 mM e SDS 0,1 % (p/v), pH 7,4] por 30 min a 65°C, sob agitação branda. Após secagem ao ar, a membrana foi envolvida em filme plástico para exposição a filme de raios-X a -80° C por períodos variados.

67

3.4.9. Digestão de DNA com enzimas de restrição

A uma alíquota contendo 0,5-2,0 µg de DNA foram adicionadas 1-4 U de enzima de restrição por µg de DNA, acompanhada do tampão apropriado. A reação foi incubada a 37°C por 1-2 h e analisada por eletroforese de DNA em gel de agarose.

3.4.10. Eluição de fragmentos de DNA

Após separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose, o gel foi fotografado, a região do gel contendo os fragmentos de DNA de interesse foi recortada e o DNA foi extraído segundo as instruções do *Wizard SV Gel and PCR Clean up System* (Promega).

3.4.11. Sequenciamento automatizado de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado no aparelho ABI PRISM TM 3100 (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante. Em cada reação de sequenciamento foram utilizados 2,0µL de *Big dye*

terminator mix (Perkin Elmer), 100-200 ng de DNA, 9,6 pmol de cada oligonucleotídeo, Tris-HCl 200 mM pH 9,0 e MgCl₂ 5 mM em um volume final de 15 µL. A reação foi incubada 2 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 45 seg a 96°C, 30 seg a 50°C e 4 min a 60°C. Terminada a reação, as amostras foram precipitadas com etanol 100% e glicogênio 1 mg/mL, lavadas com etanol 70% (v/v), suspensas em 20 µL de formamida, desnaturadas a 94°C por 5 min e submetidas ao sequenciamento automatizado.

3.4.12. Oligonucleotídeos para sequenciamento e PCR

Os oligonucleotídeos sintéticos utilizados como iniciadores em PCR ou reações de sequenciamento de DNA foram planejados com auxílio do programa PRIMER3 e encomendados à Prodimol Biotecnologia S.A. (Tabela 2).

3.4.13. Descrição das construções plasmidiais

pCR2.1-DdI-3

Para clonagem do DdI-3 (393 pb) foram sintetizados os oligonucleotídeos pET-DdI-3F e pET-DdI-3R contendo em suas sequências um sítio de restrição para *NdeI* e *XhoI*, respectivamente. Os oligonucleotídeos foram planejados de forma a permitir a posterior subclonagem do cDNA de DdI-3 no vetor pET36b para expressão de DdI-3 recombinante em bactérias. Como molde, utilizamos o pCR2.1-DdI-3 previamente disponível no laboratório (Gonzalez-Kristeller, 2007). O fragmento de DNA amplificado foi ligado ao vetor pCR2.1, que é parte do *TA cloning kit* (Invitrogen), gerando a construção pCR2.1-DdI-3 (Figura 8A e 8B). As bactérias transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico carbenicilina.

Tabela 2. Relação dos oligonucleotídeos para PCR ou sequenciamento

Objetivo	Oligonucleotídeos (Sequência 5'-3')
Subclonagem do DdI-3	pET-DdI-3F: CGGCTTCATATGCACACAACAAGATCACC pET-DdI-3R: TTCGGCGAGCTCATGAGAATGATTTTC
<i>DDB_G0292194</i> Δ FHA	DDB_G0292194 Δ FHAF: CATATGGCAAAATCCCTATTATCAAAAAG DDB_G0292194 (Not) R: GCGGCCGCGTATGCAGCAGTTGT
Inserto clonado em pET36b	pET-36bF: TAATACGACTCACTATAGG pET-36bR: CTAGTTATTGCTCAGCGG
Inserto clonado em pCR2.1	M13R : GAGGAAACAGCTATGACC M13F (-20) : GTAAAACGACGGCCAG
Inserto clonado em pGADT7	T7: TAATACGACTCACTATAGGGCGA 3'AD: CTGTGCATCGTGCACCATCT
<i>DDB_G0292194</i> genômico	BECgenomicoF: GCACAGAACATTCTCAATTATCC BECgenomicoR: TGGATTCTATTTACATTTCTACAAGAG
DDB_G0292194 truncado (T):	BEC_965S: CATATGAGTAATAAAAGTGTACTTGG BEC_2: GTATGCAGCAGTTGTTGATGG
Região que flanqueia o cassete de blasticidina inserido no <i>DDB_G0292194</i>	BECBsRF_1: GAATGTCCTGTCTGGG BECBsRR_1: CTTTATCAAGTCGGTAGG BECBsRF_2: CGAACTCAAATACAGAACC BECBsRR_2: GGTCTAAATCCTTCGAC
Uma região do 3' do cDNA de <i>DDB_G0292194</i> em RT-PCR	BecRT-PCR_F- TGACGATGATGGATTCCCTCCAAG BecRT-PCR_R- AGCAGTTGTTGATGGCGAAGTTGG
Uma região do 3' do cDNA de H3a em RT-PCR	H3aF- GGTTCATAACAAGCCCATAAACAACTCCAG H3aR- CTCTAAGAGCGACAGTACCTGGTCTG

pET36b-DdI-3

Para testar a expressão do DdI-3 em bactérias, utilizamos o vetor pET36b (Novagen) (Figura 8C). Este vetor confere uma cauda de oito resíduos de histidina no C-terminal da proteína recombinante. A expressão da proteína recombinante está sob controle do promotor T7 e apresenta como marca de seleção a resistência a canamicina. O cDNA DdI-3 foi removido da construção pCR2.1-DdI-3 com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* e o inserto foi ligado no vetor pET36b previamente linearizado com as mesmas enzimas, originando a construção pET36b-DdI-3 (Figura 8D). A massa molecular calculada para rDdI-3 incluindo a cauda de histidinas é 17,6 kDa, correspondendo a uma proteína recombinante de 157 aminoácidos.

pAE-DdI-2

A construção pAE-DdI-2 contém a porção codificadora completa do DdI-2 (783 pb) exceto o códon de terminação TAA. Esta construção foi preparada pela clonagem do cDNA do DdI-2, removido da construção pCR-DdI-2. O vetor pAE confere uma cauda de seis resíduos de histidina e um espaçador de 16 aminoácidos ao N-terminal da proteína expressa. A expressão da proteína recombinante está sob controle do promotor T7 e apresenta como marca de seleção a resistência a ampicilina.

pCR2.1- DDB_G0292194ΔFHA

Para clonagem do DDB_G0292194ΔFHA (1093 pb) foram sintetizados os oligonucleotídeos DDB_G0292194F e DDB_G0292194R contendo em suas sequências um sítio de restrição para *NdeI* e *NotI* respectivamente, para facilitar posterior subclonagem do fragmento no vetor pET36b. Como molde para PCR, utilizamos DNA genômico de *D. discoideum*. O fragmento de DNA amplificado foi ligado ao vetor pCR2.1 (Invitrogen), gerando a construção pCR2.1-DDB_G0292194ΔFHA (Figura 9A). As bactérias transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico carbenicilina.

pET36b-DDB_G0292194ΔFHA

Para construção de pET36b-DDB_G0292194ΔFHA (Figura 9B), o inserto foi removido da construção pCR2.1-DDB_G0292194ΔFHA com as enzimas *NdeI* e *NotI* e ligado no vetor pET36b previamente linearizado com as mesmas enzimas. A massa molecular calculada para DDB_G0292194ΔFHA recombinante incluindo a cauda de histidinas é 42 kDa, correspondendo a uma proteína recombinante de 375 aminoácidos.

pCR2.1- DDB_G0292194 _T

Para clonagem do DDB_G0292194 truncado (716 pb) que não possui o domínio FHA nem as repetições de asparaginas foram sintetizados os oligonucleotídeos BEC_965S (contendo em sua sequência um sítio para a enzima de restrição *NdeI*) e BEC_2. O fragmento de DNA amplificado foi ligado ao vetor pCR2.1, que é parte do *TA cloning kit* (Invitrogen), gerando a construção pCR2.1-DDB_G0292194 _T (Figura 9C). As bactérias transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico carbenicilina.

pET36b-DDB_G0292194_T

A construção do pET36b-DDB_G0292194_T foi obtida pela remoção do fragmento de BEC6V2_0_00495_T (aproximadamente 716 pb) do pCR2.1- DDB_G0292194_T após digestão com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* e ligação no vetor pET36b previamente linearizado com as mesmas enzimas (Figura 9D). As bactérias transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico canamicina. A massa molecular calculada para DDB_G0292194_T recombinante incluindo a cauda de histidinas é 32 kDa, correspondendo a uma proteína recombinante de 259 aminoácidos.

Figura 8. Esquema das construções plasmidiais para subclonagem e expressão recombinante de Ddl-3. Plasmídeos utilizados para subclonagem de Ddl-3 visando a expressão da proteína recombinante: (A) pCR2.1, (B) pCR2.1-Ddl-3, (C) pET36b, (D) pET36b-Ddl-3.

Figura 9. Esquema das construções plasmidiais para subclonagem, expressão recombinante e nocaute de DDB_G0292194. Plasmídeos utilizados para clonagem do gene DDB_G0292194 visando a expressão da proteína recombinante ou obtenção da linhagem nocaute: (A) pCR2.1-DDB_G0292194ΔFHA, (B) pET36b-DDB_G0292194ΔFHA, (C) pCR2.1-DDB_G0292194_T, (D) pET36b-DDB_G0292194_T, (E) pCR2.1-DDB_G0292194 genômico e (F) pCR2.1-DDB_G0292194 genômico_BsR.

pCR2.1- DDB_G0292194 genômico

Para clonagem do gene DDB_G0292194 (2359 pb) a partir do DNA genômico da linhagem AX4 foram utilizados os oligonucleotídeos BecgenomicoF e BecgenomicoR. O fragmento de DNA amplificado foi ligado ao vetor pCR2.1, que é parte do *TA cloning kit* (Invitrogen), gerando a construção pCR2.1-BECgenomico (Figura 9E). As bactérias transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico carbenicilina.

pCR2.1- DDB_G0292194_BsR

O gene *DDB_G0292194* da construção pCR2.1- DDB_G0292194 genômico foi interrompido com a inserção de um cassete de expressão para resistência ao antibiótico blasticidina (Figura 9F). Para obtenção da construção pCR2.1-DDB_G0292194_BsR, o gene clonado (2359) foi digerido com a enzima *HincII*, linearizando a construção nas posições 620 e 1277 pb e liberando um fragmento de 657 pb (Figura 10A, canaleta 2). O cassete contendo o gene de resistência a blasticidina (BsR) foi removido do vetor pBsR519 (Putz e Zeng, 1998) pela enzima *EcoRV*, liberando um fragmento de aproximadamente 1,4 kpb (Figura 10A, canaleta 3).

Após a reação com a DNA ligase T4 e transformação de bactérias competentes SURE, os clones tiveram seu DNA plasmidial analisado para confirmação do sucesso da clonagem. Um clone contendo a inserção do cassete de BsR foi obtido. O *DDB_G0292194* modificado foi liberado do pCR2.1 (3,9 kbp) pela digestão com a enzima *EcoRI* originando um fragmento de 3,1 kbp. Este inserto foi utilizado para transfecção de *D. discoideum* para inativação do gene por recombinação homóloga e geração de linhagens nocautes.

Figura 10. Construção e análise do plasmídeo pCR2.1-DDB_G0292194_BsR. (A) O plasmídeo pCR2.1- DDB_G0292194 genômico foi digerido com a enzima de restrição *HincII*, liberando um fragmento de 657 pb (canaleta 2), sendo que o fragmento de 5,6 kpb corresponde ao vetor pCR2.1 ligado ao restante do gene DDB_G0292194 (G). O plasmídeo pBsR519 foi digerido com a enzima de restrição *EcoRV*, liberando um fragmento de 1,4 kpb que corresponde ao cassete de resistência a blasticidina (BsR) e uma banda do vetor de 2,7 kpb (canaleta 3). Os fragmentos de 5,6 kpb e de 1,4 kpb foram ligados com T4 ligase e a reação foi utilizada para transformação de *E. coli* (SURE). Preparações plasmidiais de clones resultantes desta transformação analisadas por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. (B) Perfil de restrição da preparação plasmidial de um dos clones obtidos, mostrando a liberação do fragmento de 3.1 kpb correspondente ao *DDB_G0292194* interrompido com o BsR (canaleta 3). Os dois diagramas exemplificam os tipos de ligação possíveis de serem obtidos e os tamanhos correspondentes resultantes da inserção do BsR (diagrama a, canaleta 3) ou religação das extremidades do plasmídeo pCR2.1-DDB_G0292194 (diagrama b, canaletas 2 e 4). O marcador de tamanho (1 kpb ladder, Invitrogen) pode ser observado na primeira canaleta das fotos de géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

pGADT7- DDB_G0292194ΔFHA

Para a subclonagem do DDB_G0292194_ΔFHA no vetor de expressão pGADT7 (Figura 11A) o fragmento de DNA DDB_G0292194_ΔFHA foi removido da construção pCR2.1-DDB_G0292194ΔFHA (Figura 9A) com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* e ligado no vetor pGADT7 previamente linearizado com as mesmas enzimas (Figura 11B). O vetor pGADT7 possibilita a expressão de proteínas em fusão com os aminoácidos 768-881 do domínio de ativação de GAL4 (DNA-AD). Em levedura, as proteínas de fusão são expressas a partir do promotor constitutivo *ADH1* (P_{ADH1}) e a transcrição terminada pelos sinais de terminação de transcrição *ADH1* (T_{ADH1}). A proteína de fusão é direcionada para o núcleo da levedura através de uma sequência de localização nuclear (SV40) adicionada à sequência do domínio de ativação. O vetor também contém o promotor T7 e codifica o epitopo HA em fusão com a proteína heteróloga expressa. Este vetor pode se replicar tanto em *E. coli* quanto em *S. cerevisiae* a partir de *oriC* e *ori2μ*, respectivamente. As células transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico ampicilina (Amp^r), no caso de bactéria, e com o marcador nutricional leucina (*LEU2*), no caso de levedura.

pGBKT7- DdPP1c

A construção pGBKT7-DdPP1c esquematizada na Figura 11C contém a porção codificadora completa de DdPP1c (Sousa-Canavez, 2005; Sousa-Canavez *et al.*, 2007). Esta construção foi previamente utilizada como isca no ensaio de duplo-híbrido em levedura. O vetor pGBKT7 expressa a proteína em fusão com os aminoácidos 1-147 do domínio de ligação a GAL4 (DNA-BD). Em levedura, as proteínas de fusão são expressas a partir do promotor constitutivo *ADH1* (P_{ADH1}) e a transcrição é terminada pelos sinais de terminação de transcrição, T7 e *ADH1* (T_{T7} e T_{ADH1}). A proteína de fusão é direcionada para o núcleo da levedura através de uma sequência de localização nuclear (SV40) adicionada à sequência do domínio de ligação. O vetor também contém o promotor T7 e codifica o epitopo c-Myc em fusão

com a proteína heteróloga. Além disso, pode se replicar tanto em *E. coli* quanto em *S. cerevisiae* a partir de oriC e ori 2 μ , respectivamente. As células transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico canamicina (kan^r) em bactérias e com o marcador nutricional triptofano (*TRP1*) em leveduras.

Figura 11. Esquema das construções plasmidiais utilizadas para avaliação da interação de DDB_G0292194 e DdPP1c em ensaios de duplo-híbrido em levedura. Plasmídeos utilizados no ensaio do sistema de duplo-híbrido em levedura: (A) pGADT7, (B) pGADT7-DDB_G0292194ΔFHA, (C) pGBKT7-DdPP1c.

3.5. Manipulação e análise de proteínas

3.5.1. Obtenção do DdI-3 recombinante (rDdI-3)

Para expressão do rDdI-3 foi utilizada a cepa BL21(DE3), transformada por choque térmico com a construção pET36b-DdI-3. Após a transformação, 6 clones foram inoculados em 3 mL de meio LB acrescido de canamicina 30 µg/mL e 1% de glucose e crescidos a 37°C, 200 rpm, por 14-16 h. Aliquotas de 1mL das culturas crescidas durante a noite foram centrifugadas a 16.000 xg por 1 minuto a temperatura ambiente e diluídas para DO_{600nm}= 0,1 em 10 mL de meio LB fresco contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo então incubadas a 37°C. Quando a cultura atingiu DO_{600nm}= 0,4, uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida) e submetida a centrifugação a 16.000 xg por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias suspenso em 100 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 1 mM e alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 6 h de incubação a 37°C.

As amostras coletadas da cultura induzida (1 mL) foram processadas como descrito acima, exceto que o sedimento de bactérias foi suspenso em 200 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras das culturas não induzida e induzida foram armazenadas congeladas a -20°C até utilização. Para expressão em maior escala, o clone bacteriano positivo para a expressão da proteína foi crescido em 45 ou 250 mL de meio LB acrescido de canamicina a 37°C, 200 rpm. Quando a cultura atingiu DO_{600nm}=0,4 uma alíquota de 1 mL foi retirada (cultura não induzida), adicionou-se IPTG na concentração final de 1 mM e alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 6 h de incubação. Amostras das culturas induzidas e não induzidas foram processadas como já descrito. O restante da cultura foi submetido à centrifugação a 4.000 xg por 20 min

a 4°C e o sedimento bacteriano foi suspenso em 1mL de tampão de lise [Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM, PMSF 1 mM e glicerol 10% (v/v)]. A suspensão foi submetida a sonicação com 6 pulsos de 10 seg cada, posição 3 (Branson Sonifier 450) com intervalos de incubação de 1 minuto em gelo entre cada pulso. O lisado foi fervido por 20 min e centrifugado a 9.880 xg por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento suspenso em 1 mL do tampão de lise. O perfil de indução das proteínas recombinantes foi avaliado pela eletroforese dos extratos bacterianos em SDS-PAGE e coloração com azul de Coomassie R.

3.5.2. Obtenção do DdI-2 recombinante (rDdI-2)

Para expressão do rDdI-2 foi utilizada a cepa BL21(DE3)pLysS, transformada por choque térmico com a construção pAE-DdI-2. Após a transformação, 6 clones foram inoculados em 3 mL de meio 2X TY acrescido de carbenicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL e crescidos a 37°C, 200 rpm, por 14-16 h. As culturas crescidas durante a noite foram diluídas para $DO_{600nm} = 0,1$ em 10 mL de meio 2X TY fresco contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo então incubadas a 37°C. Quando a cultura atingiu $DO_{600nm} = 0,4$, uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida) e submetida a centrifugação a 16.000 xg por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias suspenso em 100 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM e alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 3 h de incubação a 37°C. As amostras coletadas da cultura induzida (1 mL) foram processadas como já descrito no item 3.5.1.

Para expressão em maior escala, o clone bacteriano positivo para a expressão da proteína foi crescido em 45 ou 250 mL de meio LB acrescido de carbenicilina e cloranfenicol a 37°C, 200 rpm. Quando a cultura atingiu $DO_{600nm} = 0,4$ uma alíquota de 1 mL foi retirada (cultura não induzida), adicionou-se IPTG na concentração final de 1 mM e

alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 3 h de incubação. Amostras das culturas induzidas e não induzidas foram processadas como descrito no item 3.5.1.

3.5.3. Obtenção do DDB_G0292194_T recombinante

Para expressão do rDDB_G0292194 Δ FHA sem as repetições de asparaginas foi utilizada a cepa BL21(DE3), transformada por choque térmico com a construção pET36b-DDB_G0292194_T. Após a transformação, 6 clones foram inoculados em 3 mL de meio LB acrescido de canamicina 30 μ g/mL e 1% de glicose e crescidos a 37°C, 200 rpm, por 14-16 h. Alíquotas de 1mL das culturas crescidas durante a noite foram centrifugadas a 16.000 xg por 1 minuto a temperatura ambiente e diluídas para DO_{600nm}= 0,1 em 10 mL de meio LB fresco contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo então incubadas a 37°C. Quando a cultura atingiu DO_{600nm}= 0,4, uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida) e submetida a centrifugação a 16.000 xg por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias suspenso em 100 μ L de tampão de amostra para SDS-PAGE. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM e alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 4 h de incubação a 37°C. As amostras coletadas da cultura induzida (1 mL) foram processadas como já descrito no item 3.5.1.

Para expressão em larga escala, o clone bacteriano positivo para a expressão da proteína foi crescido em 50 mL de meio LB acrescido de canamicina a 37°C, 200 rpm, seguindo-se os procedimentos descritos no item 3.5.1, exceto que o tempo de indução com IPTG foi de 4 h a 37°C.

3.5.4. Purificação da proteína DdI-3 e DdI-2 recombinante a partir da fração solúvel

O sedimento correspondente a 45 mL de culturas bacterianas induzidas com IPTG foram submetidos à sonicação e processado conforme descrito acima. Aproximadamente 1 mL do sobrenadante

(fração solúvel) foi então incubado com 100 μ L da resina de Ni^{2+} -NTA agarose (Qiagen) previamente equilibrada com 2,5 mL de tampão de lise a 4°C por 1 h em homogeneizador (*Heavy dutyrotator*, Cole Parmer) em baixa velocidade. Foram realizadas 2 lavagens com 4 mL de tampão de lise por centrifugação a 16.000 xg por 1 minuto. A proteína foi eluída com 150 μ L de tampão de lise acrescido de 25, 50, 100, 150 e 300 mM de imidazol, seguindo-se incubação por 15 min em gelo, centrifugação nas condições anteriores e coleta do sobrenadante.

Após verificarmos a concentração de imidazol necessária para eluir as proteínas recombinantes, purificamos uma maior quantidade da proteína recombinante, a qual foi armazenada a -80°C em glicerol 10% (v/v). Assim, 5 sedimentos correspondentes a 45 mL de culturas bacterianas induzidas foram lisados e centrifugados separadamente, como descrito anteriormente. 500 μ L de resina equilibrada com 15 mL de tampão de lise foram incubadas com a fração solúvel do extrato bruto nas mesmas condições anteriores. Após essa incubação, a resina foi transferida para uma coluna (*Poly-Prep Chromatography Column*, Bio-Rad Laboratories), onde foi feita a eluição da proteína recombinante com 200 mM de imidazol a 4°C.

A concentração protéica dos inibidores recombinantes purificados foi estimada pelo método de Bradford tendo como padrão albumina de soro bovino (Bradford, 1976). A molaridade da solução de rDdI-3 e rDdI-2 purificados foi estimada a partir da massa molecular, calculada com base na sequência de aminoácidos predita para estas proteínas recombinantes.

3.5.5. Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS, em placas. As amostras a serem analisadas foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, DTT 25 mM, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v) e azul de bromofenol 0,025% (p/v)] e fervidas por 3 min antes da aplicação no gel. A eletroforese foi realizada a 200 V até que o azul de bromofenol

atingisse o limite inferior do gel. As proteínas foram visualizadas por coloração com azul de Coomassie R 0,2% (p/v), preparado em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), seguindo-se descoloração com ácido acético 7% (v/v) em metanol 30% (v/v). Após descoloração, os géis foram mantidos em glicerol 3% (v/v), por 1 hora antes de serem secos entre folhas de papel celofane a 70°C, por 45 min, em secador de gel (Bio-Rad Laboratories).

3.5.6. Transferência eletroforética de proteínas

Após separação das proteínas em SDS-PAGE, as mesmas foram submetidas à transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose pelo método semi-seco, como descrito por (Harlow e Lane, 1988). Quando necessário, a membrana foi corada com Ponceau S 0,1% (p/v) em ácido acético 10% (v/v) e descorada por lavagem com água destilada e então utilizada no procedimento para detecção imunológica de proteínas como descrito a seguir.

3.5.7. Detecção imunológica de proteínas

As membranas de nitrocelulose obtidas após transferência eletroforética de proteínas foram coradas com Ponceau-S 0,1% (p/v) dissolvido em ácido acético 10% (v/v). Em seguida, as membranas foram lavadas brevemente com água para remoção do excesso de corante e checagem da eficiência da transferência realizada. Estas membranas foram então incubadas em TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e NaCl 150 mM) contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado por 1 h a temperatura ambiente sob agitação lenta. Após esta etapa de bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo anti-His diluído 1:500 em TBS contendo 0,1% Tween-20 (v/v) por 1 h. A membrana foi submetida a seis lavagens de 10 min cada com TBS contendo 0,1% Tween-20 (v/v). Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente sob agitação, com anticorpos secundários conjugados a peroxidase diluídos em TBS contendo Tween-20 0,1% (v/v). As membranas foram novamente submetidas a seis lavagens com TBS

acrescido de Tween-20 0,1% (v/v) por 10 min cada. Finalmente, as proteínas contidas nas membranas que reagiram com os anticorpos foram reveladas colorimetricamente pela adição de uma solução de TBS pré-aquecida a 37°C contendo 20 mg cloronaftol, 17% metanol (v/v) e 15 µl de H₂O₂ preparados na hora ou segundo as instruções do *kit ECL Plus Western blotting detection system* (GE Healthcare), com tempos de exposição a filme de Raios-X de 1, 5 e 15 min.

3.5.8. Imunização de coelhos para obtenção de anticorpo policlonal

Para a imunização de dois coelhos machos, adquiridos comercialmente e mantidos no biotério do IQUSP, foram utilizadas alíquotas de 300 µg de rDdI-3 purificado. Antes da imunização, um volume total de 7 mL de sangue foram retirados do coelho para obtenção do soro pré-imune. Na primeira imunização, seis alíquotas de 50 µg de proteína recombinante foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com azul de Coomassie R-250 0.05% preparado em água Milli-Q e incubado por 10 min a temperatura ambiente com agitação. Em seguida o gel foi lavado com várias trocas de água por 2 h. As bandas de ~25 kDa foram cortadas do gel. O gel foi lavado com água Milli-Q e homogeneizado em água Milli-Q com um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. A amostra com um volume final de 1 mL foi misturada a 1 mL de adjuvante de Freund completo (Sigma) e injetado no coelho. Uma nova imunização foi repetida trinta dias após a primeira nas mesmas condições, exceto pelo uso do adjuvante de Freund incompleto (Sigma). Após dez dias o sangue do coelho foi coletado para obtenção do soro imune.

O sangue coletado (pré-imune e imune) foi incubado 1 h a 37°C, seguindo-se incubação a 4°C por uma noite. Este material foi submetido a centrifugação a 3.000 xg por 10 min a 4°C. Foi adicionada uma solução de sulfato de amônio saturada pH 6,8 numa proporção 1:1 ao sobrenadante. Esta etapa foi seguida de incubação por uma noite a temperatura ambiente e centrifugação a 3.000 xg por 30 min a 4°C. O precipitado foi suspenso em solução 50% saturada de

sulfato de amônio pH 6,8 e submetido a centrifugação nas mesmas condições anteriores. O precipitado final foi suspenso em 2 mL de NaCl 0,1 M e dialisado por 20 h contra 1.000 volumes de 0,1 M de NaCl a 4°C com uma troca. O material obtido foi aliquotado e mantido a -80°C.

3.5.9. Imunização de camundongos para obtenção de anticorpo policlonal

Para a primeira imunização de onze camundongos machos, fornecidos pelo biotério do IQUSP também responsável pela sua manutenção, foram utilizadas alíquotas de 45 µg de rDdI-2 purificada por animal. A amostra de proteína suficiente para imunizar os camundongos foi misturada com o mesmo volume de adjuvante de Freund completo (Sigma) e injetada nos animais. Novas imunizações foram repetidas semanalmente por mais 3 vezes após a primeira nas mesmas condições, exceto pelo uso de 14 µg de proteína por animal e do adjuvante de Freund incompleto (Sigma). Após uma semana da quarta imunização o sangue dos camundongos foi coletado para obtenção do soro imune. Um camundongo não imunizado foi utilizado para obtenção do soro controle.

O sangue coletado (controle e imune) foi incubado 1 h a 37°C, seguindo-se incubação a 4°C por uma noite. O material não coagulado foi coletado e submetido à centrifugação a 3.000 xg por 30 min a 4°C. O soro resultante foi aliquotado e mantido a -20° C.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação da viabilidade de *D. discoideum* durante os estresses térmico, hiper-osmótico e oxidativo

Antes de iniciarmos os experimentos para avaliar o perfil de expressão de um conjunto selecionado de genes relacionados a serina/treonina proteínas fosfatases de *D. discoideum* em resposta aos estresses térmico, hiper-osmótico e oxidativo, foram necessárias a padronização das condições de estresse e avaliação do estado das células através da verificação da viabilidade celular nestes tratamentos. A habilidade das células de *D. discoideum* em sobreviver a um estresse e de manter o crescimento após o tratamento foi monitorada pela formação de colônias em meio SM sólido na presença de bactérias. Escolhemos realizar o estresse térmico a 30°C, o estresse hiperosmótico pela adição de 200 mM de sorbitol e o estresse oxidativo pela adição de 500 μ M de H₂O₂ com base em dados da literatura (Maniak e Nellen, 1988; Taminato *et al.*, 2002; Araki *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2005; Na *et al.*, 2007). Vale lembrar que a temperatura ótima para o cultivo de *D. discoideum* é 22°C.

As porcentagens de sobrevivência das células após os diferentes estresses estão mostradas na figura 12. A exposição ao estresse térmico causou uma redução na viabilidade celular de aproximadamente 40% após 6 h de tratamento enquanto que o estresse osmótico causou uma redução na viabilidade celular de ~10-14% ao longo dos 60 min de tratamento (Figuras 12 A e B). Com relação ao estresse oxidativo, verificamos uma redução de até 10% da viabilidade em 4 h de tratamento com H₂O₂ (Figura 12C). Estes resultados são similares aos dados reportados na literatura (Taminato *et al.*, 2002; Araki *et al.*, 2003).

Portanto, comparativamente aos estresses hiper-osmótico e oxidativo, o estresse térmico prolongado representou o tratamento mais drástico com relação à manutenção da viabilidade celular. Ainda que tenhamos analisado o perfil de expressão em todos os intervalos

descritos, consideramos efetivamente como choque térmico a exposição a 30°C por 30 min e 1 h.

A

B

C

Figura 12. Sobrevivência das células de *D. discoideum* submetidas a diferentes estresses. Células AX4 foram crescidas a 22°C até a fase exponencial ($1-2 \times 10^6$ células/mL) e metade da cultura foi incubada a 30°C (A) ou mantida a 22°C e suplementada com 200 mM de sorbitol (B) ou 500 μ M de H_2O_2 (C). Nos tempos indicados ~200 células foram plaqueadas em associação com *K. aerogenes* e o número de colônias contados após 3-4 dias de crescimento a 22°C. A porcentagem de sobrevivência é relativa ao controle não tratado (22°C). Os resultados representam a média de pelo menos 3 experimentos independentes.

4.2. Perfil de expressão de genes de subunidades catalíticas de PPPs e de suas potenciais subunidades reguladoras

O perfil de expressão de genes codificadores de subunidades catalíticas da família PPP e de alguns candidatos a subunidades reguladoras destas enzimas (proteínas que interagem com as subunidades catalíticas) foi avaliado na resposta aos estresses térmico, osmótico ou oxidativo, realizados nas condições anteriormente definidas, e também nas principais fases de desenvolvimento de *D. discoideum*. Para esta avaliação realizamos ensaios de RT-qPCR para o conjunto de genes listados na tabela 3, o qual inclui 6 subunidades catalíticas da família PPP (PP1c, PP2Ac, PP4c, PP4c-like, PP5c e PP6c) e 16 candidatos a subunidades reguladoras previamente identificadas através de ensaios de duplo-híbrido em levedura e em buscas por similares no genoma e proteoma de *D. discoideum* tais como DdI-2, DdI-3 e outras (Gonzalez-Kristeller, 2007; Sousa-Canavez *et al.*, 2007).

Como resumido na tabela 3, algumas funções estão preditas para os produtos proteicos de vários destes genes, porém pouco é conhecido sobre as funções desempenhadas em *D. discoideum*. Estas informações foram em sua maioria extraídas da base dados do genoma de *D. discoideum* (*dictybase.org*). Nossa expectativa é que os resultados dos ensaios de RT-qPCR possibilitem, ainda que indiretamente, associar estes genes, em particular os que mostrarem um perfil de expressão diferencial nas condições investigadas, em vias de sinalização relacionadas a estresses e/ou ao desenvolvimento em *D. discoideum*.

Discutiremos a seguir, os perfis de expressão dos genes listados na tabela 3 para cada uma das condições em que as células de *D. discoideum* foram submetidas, os quais serão apresentados como *heatmaps* (Figuras 13 a 15) gerados a partir de dados obtidos em ensaios de RT-qPCR (Figuras Suplementares S1 a S6 incluídas no Anexo).

Tabela 3. Genes de *D. discoideum* cuja expressão foi avaliada por RT-qPCR

DictyBase ID	Gene	Produto gênico	Funções preditas [#]
DDB_G0275619	<i>pppB</i> ou <i>DdPP1c</i>	Subunidade catalítica da PP1	Regulação do metabolismo de carboidratos, do ciclo celular, da resposta a estresse e apoptose
DDB_G0292194	<i>DDB_G0292194*</i>	ORF hipotética	Desconhecida
DDB_G0275733	<i>med26*</i>	Provável subunidade 26 do complexo <i>mediator</i>	Mediador da atividade da RNA polimerase II
DDB_G0270118	<i>DDB_G0270118*</i>	Inibidor-3 da PP1c (DdI-3)	Inibição/regulação da PP1
DDB_G0285313	<i>DDB_G0285313*[@]</i>	Similar a Cep192	Provável proteína componente do centrôssomo que interage com a Polo-quinase (Plk)
DDB_G0293300	<i>DDB_G0293300*[@]</i>	Similar a proteína de suscetibilidade ao câncer mamário tipo 1	Desconhecida
DDB_G0269300	<i>DDB_G0269300*</i>	Similar a CD2BP***	Provavelmente envolvida em <i>splicing</i> de RNA
DDB_G0273383 DDB_G0273631	<i>cwc15^Δ</i>	CWC15	Provável fator de <i>splicing</i> do pré mRNA. Gene duplicado no genoma linhagem AX4
DDB_G0274315	<i>dpiA</i> ou <i>DdI-2</i>	Inibidor-2 da PP1c (DdI-2)	Chaperona molecular e inibidora da PP1
DDB_G0284039	<i>pprA</i>	Subunidade reguladora 7 da PP1c (similar a Sds22)	Participação na mitose
DDB_G0272116	<i>pppC</i> ou <i>pp4C</i>	Subunidade catalítica da PP4	Maturação do centrôssomo, recuperação ao dano de DNA, requerida para o desenvolvimento, quimiotaxia e expressão de vários genes envolvidos na respostas a estresse e movimento celular
DDB_G0281483	<i>pp4r1*</i>	Subunidade reguladora 1 da PP4c	Inibe a atividade desacetilase de histona 3 e regula as atividades da cromatina
DDB_G0289067	<i>smkA*</i>	Subunidade reguladora 3 da PP4c	Regula a via MEK. Regula positivamente as funções da PP4c
DDB_G0283187	<i>pho2B</i>	similar a PP4c (PP4-like)	Desconhecida
DDB_G0290263	<i>phoA</i> ou <i>pp2Ac</i>	Subunidade catalítica da PP2A	Modulação da progressão do ciclo celular, desenvolvimento, câncer, apoptose e ritmo circadiano
DDB_G0283601	<i>pppA</i>	Subunidade A da PP2A	Fortemente associada a PP2Ac, sendo a subunidade estrutural em que a subunidade B variável pode se ligar

Tabela 3. continuação

DictyBase ID	Gene	Produto gênico [#]	Funções preditas ^{##}
DDB_G0279647	<i>DDB_G0279647*</i>	Similar a Tap42/alfa-4	Interage com PP4, PP2A e PP6. Em levedura, interage com PP6, atuando na via de sinalização TOR
DDB_G0272118	<i>pppD</i> ou <i>ppp6c</i>	Subunidade catalítica da PP6	Regula a progressão do ciclo celular de G1 para S, o brotamento da levedura, transcrição e metabolismo de glicogênio
DDB_G0283157	<i>ppp5C</i>	Subunidade catalítica da PP5	Regula a atividade de proteínas quinases ativadas por estresses que causam dano ao DNA
DDB_G0277905	<i>snfA</i>	Similar a ASK1. Subunidade catalítica do complexo da proteína quinase ativada por AMP	Proteína quinase central na regulação do metabolismo de glicose e de lipídeos, na regulação da apoptose induzida por hipóxia, estresse oxidativo e rapamicina. Essencial para manutenção mitocondrial
DDB_G0286233	<i>anapc6</i> ou <i>cdc16</i>	Subunidade 6 do complexo que promove a anáfase	Importante na progressão do ciclo celular
DDB_G0288223	<i>anapc3</i> ou <i>cdc27</i>	Subunidade 3 do complexo que promove a anáfase	Ubiquitina ligase regulada pelo ciclo celular e transição mitótica (metáfase/anáfase)
DDB_G0272819	<i>hspC**</i>	HSP32	Proteína de choque térmico de <i>D. discoideum</i> . Os níveis de proteína e de mRNA decrescem durante o desenvolvimento.
DDB_G0277853	<i>ecmA**</i>	Proteína de matriz extracelular	Componente estrutural da haste de corpos de frutificação
DDB_G0281545	<i>acaA**</i>	ACA	Adenilil ciclase expressa durante a fase de agregação.
DDB_G0269140	<i>GAPA**</i>	Proteína ativadora da atividade GTPase de Ras	Proteína relacionada à Ras GAP necessária para a citocinese normal
DDB_G0272754	<i>gsr**</i>	Glutathiona redutase	Converte glutathiona oxidada em glutathiona reduzida

[#]O produto gênico predito segundo análises por BLAST ou conforme anotação disponível em *dictybase.org*. ^{##}A maioria das funções preditas listadas foi investigada em outros organismos conforme a anotação indicada na base de dados *dictybase.org* e/ou literatura citada no texto. As subunidades catalíticas de PPPs estão destacadas em cinza. * Codificam proteínas que interagem com DdPP1c ou DdPP4c em ensaios de duplo-híbrido em levedura. **Genes usados como controle positivo nos ensaios de RT-qPCR: desenvolvimento (*ecmA* e *acaA*), estresses térmico (*hspC*), osmótico (*gapA*) e oxidativo (*gsr*); ***a similaridade com esta proteína não é relevante e portanto possivelmente trata-se de anotação equivocada (Raposo, 2010); @ novos ensaios no sistema de duplo-híbrido não confirmaram a interação destas proteínas com a PP1c, pois mostraram ativação do genes repórteres independente da interação (Raposo, 2010).& Interação com a PP1 não averiguada.

4.2.1. Perfil de expressão na resposta ao estresse térmico

Os ensaios de RT-qPCR de células submetidas ao choque térmico a 30°C, mostraram, como esperado, o aumento dos níveis do transcrito *hspC*, sendo o nível máximo de indução verificado após 2 h de tratamento (Figuras 13 e S1). Estes dados são consistentes com análises através de *Northern blot* descritas na literatura (de Maria *et al.*, 1997). Portanto, consideramos nossas condições experimentais para o estresse térmico adequadas.

As figuras 13, S1 e S2 mostram que embora o nível do transcrito de *DdPP1c* não tenha aumentado em resposta ao choque térmico, o nível de transcritos de proteínas que interagem com *DdPP1c* (*DdI-3*, *DdI-2*, *pprA*, *DDB_G0292194* e *DDB_G0293300*) foi aumentado no mínimo duas vezes relativamente ao controle mantido a 22°C. É interessante notar que estudos de imunofluorescência sobre a localização da *DdI-3* (*Ypi1*) em levedura demonstram que o aumento da temperatura de incubação de 24° C para 37° C por 1 h causa um aumento transitório dos níveis de *Ypi1* nuclear, retornando aos níveis similares de incubação na menor temperatura após 2 h (Bharucha *et al.*, 2008). Como já mencionado, *Ypi1* é capaz de interagir com a *sds22* auxiliando no direcionamento nuclear da *PP1c* para o substrato Aurora quinase, além de serem potentes inibidores da *PP1c* para alguns substratos (Peggie *et al.*, 2002; Lesage *et al.*, 2007; Pedelini *et al.*, 2007; Bharucha *et al.*, 2008). Isto sugere que *DdI-3* e *sds22* possam ter algum papel nuclear importante em resposta ao aumento da temperatura e no controle da atividade da *PP1c* relacionado, por exemplo, à divisão celular. Já a *DdI-2* é uma conhecida chaperonina para a *PP1c* e o aumento dos níveis do gene *DdI-2* durante o estresse térmico poderia indicar uma tentativa de manutenção da estabilidade da atividade da *PP1c* (Alessi *et al.*, 1993).

Por outro lado, transcritos de *med26*, *cwc15*, e *DDB269300* mantiveram seus níveis próximos do controle com apenas um discreto aumento entre 0,5 e 1 h de estresse. De acordo com a anotação

automática do dictyBase (<http://dictybase.org>) estes últimos genes estão envolvidos em processos celulares relacionados, envolvendo processamento de RNA, porém a interação de *cwc15* com a PP1c não foi confirmada (Tabela 3). Estes resultados indicam um provável envolvimento da PP1, possivelmente em associação com *DdI-3*, *DdI-2* e/ou *DDB_G0292194* na resposta ao estresse térmico.

Os transcritos de *DDB_G0285313* e *DDB_G0293300* também tiveram níveis aumentados no choque térmico, sendo que o primeiro aumenta rapidamente na exposição ao choque térmico, e em seguida sofre drástica repressão. Estes genes foram inicialmente selecionados para nossos estudos com base nos resultados da varredura da biblioteca de duplo-híbrido com a isca DdPP1c (Gonzalez-Kristeller, 2007). Entretanto dados recentes (Raposo, 2010) não confirmaram sua interação com DdPP1c.

Interessantemente, observamos o aumento de expressão dos genes de PP4c e PP6c (Figuras 13 e S1), assim como do gene *DDB_G0279647* que codifica uma proteína homóloga a Tap42 de levedura/alfa-4 de mamíferos, a qual é capaz de interagir com as 3 fosfatases da subfamília 2A: PP4c, PP6c e PP2Ac (Murata *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998). Observamos que a indução de expressão gênica de *DDB_G0279647* (nos tempos 0 e 1 h) é coincidente com o significativo aumento nos níveis dos transcritos de PP4c (em 1 h) e PP6c (em 0 h). A Tap42 é essencial para a viabilidade da levedura e participa da via de sinalização comandada pela TOR quinase que é inativada em resposta a carência nutricional e pela adição de rapamicina (Di Como e Arndt, 1996). A supressão de Tap42 em levedura causa hipersensibilidade das células a rapamicina e a alta temperatura (37°C), além de uma resposta prolongada a genes de estresse (Duvet *et al.*, 2003). Em mamíferos, alfa-4 é um inibidor essencial para apoptose ao dirigir a desfosforilação dos fatores de transcrição p53 e c-Jun (Kong *et al.*, 2004). Assim, com base em nossos resultados de RT-qPCR, podemos inferir que em *D. discoideum* esta proteína também deva participar da resposta ao estresse térmico, possivelmente, em associação com PP4c e/ou PP6c.

Vale ressaltar que os níveis de transcritos de outras subunidades reguladoras de PP4c (*pp4r1* e *smkA*) não mostraram níveis aumentados relevantes no estresse térmico.

O gene *pho2B* que codifica uma subunidade similar a PP4c (PP4-like) é modulado de modo distinto do gene PP4c e não apresenta uma indução significativa em resposta ao choque térmico (Figura S1). A subunidade regulatória *pppA* apresenta praticamente o mesmo perfil de expressão que a PP2Ac, e, portanto, os genes destas proteínas parecem não responder ao estresse térmico (Figuras 13, S1 e S2).

Os níveis de expressão do transcrito de PP5c e da ciclina *cdc16* (*anapc6*) são praticamente invariáveis durante todo o estresse de temperatura (Figura 13, S1 e S2). Além disso, o nível do transcrito de *anapc3* (*cdc27*, ubiquitina ligase) que foi diminuído nos 30 min iniciais da resposta ao choque térmico é restaurado aos níveis do controle após 2h (Figura 13 e S2). Como já mencionado, a PP5 forma complexos com muitas proteínas incluindo as subunidades Cdc16/Cdc27 que são parte do complexo promotor da anáfase (Ollendorff e Donoghue, 1997; Golden *et al.*, 2008a; Golden *et al.*, 2008b). Como mostram as medidas de viabilidade celular (Figura 12), durante o estresse térmico as células não se multiplicam e, portanto, não esperaríamos indução na expressão de *cdc16* e *cdc27*. Em concordância com estes dados, apesar de observarmos logo no início da resposta ao estresse térmico um aumento nos níveis dos transcritos de *pprA* (Figura 13 e S2), que codifica uma subunidade moduladora da PP1c com participação na mitose, há uma diminuição gradual destes níveis ao longo do estresse (MacKelvie *et al.*, 1995; Peggie *et al.*, 2002; Pinsky *et al.*, 2006).

Por outro lado, os níveis do transcrito que codifica ASK1 (*snfA*) são aumentados após 30 min da exposição das células a 30°C (Figura 13 e S2). Complexos contendo PP5 e ASK1 (quinase regulada pelo sinal de apoptose) já foram identificados em mamíferos (Morita *et al.*, 2001) e, além disso, o gene de ASK1 é ativado na resposta a hipóxia, estresse oxidativo e rapamicina, sendo que esta enzima é negativamente regulada pela PP5 (Morita *et al.*, 2001; Gallego e Virshup, 2005; Golden

et al., 2008b). Logo, em *D. discoideum* a alta temperatura poderia induzir um sinal de apoptose que pode ou não progredir dependendo da regulação mediada pela PP5.

Nossos dados implicam um possível envolvimento de PP1, PP4, PP6 e PP5 na resposta ao estresse térmico em *D. discoideum*. De fato as proteínas fosfatases PP1, PP2A e PP5 já vêm sendo implicadas neste tipo de estresse. Os genes das proteínas de choque térmico (HSP) são regulados em nível transcricional pelo fator de transcrição 1 do choque térmico (HSF1) que ao ser ativado pelo estresse se liga aos elementos nos genes de HSP. Esta resposta causa uma modulação das vias de sinalização que levam a ativação de proteínas quinases (PI-3K, ERK, P38MK, PKA e Junk) e fosforilação do HSF1 em resíduos de serina. Estas modificações conduzirão a uma sentença de adaptação ou de morte celular (Calderwood, 2010).

Muito dos efeitos morfológicos e fenotípicos em decorrência do choque térmico podem ser explicados pela agregação de proteínas e desequilíbrio da homeostase de proteínas em geral. O estresse térmico brando leva a uma re-organização dos filamentos de actina em fibras de estresse, enquanto que o severo resulta em agregação e colapso dos filamentos. Além disso, processos nucleares como o *splicing* também são afetados (Richter *et al.*; Toivola *et al.*; Welch *et al.*, 1985; Welch e Suhan, 1986).

Em mamíferos, após o choque térmico a PP1c se descomplexa do inibidor, NIPP1, e desfosforila o fator de *splicing* sequência-específico SR38p, tornando sua atividade inibida e, conseqüentemente, causando a supressão do *splicing* do pré-mRNA (Shi e Manley, 2007). Um membro da família HSF (HSF2) se liga a subunidade A da PP2Ac bloqueando a interação entre as duas subunidades e quando super-expresso estimula a atividade da PP2Ac, indicando a relevância da HSF2 como reguladora da PP2A *in vivo* (Hong e Sarge, 1999). A PP5c se liga as HSPs 70 e 90, mas em resposta ao ácido ariquidônico e nocodazole (agente despolimerizador de microtúbulo) a fosfatase se dissocia das HSPs e se transloca para o citoplasma, sugerindo que a PP5c é requerida em

processos de estresse e eventual parada do ciclo celular (Zeke *et al.*, 2005).

Choque térmico

Figura 13. Perfil do nível de expressão do mRNA de subunidades catalíticas e potenciais reguladoras das PPPs de *D. discoideum* em resposta ao choque térmico. Células em fase de crescimento foram incubadas a 30°C ou mantidas a 22°C (amostra controle) pelos tempos indicados e o RNA total foi submetido aos ensaios de RT-qPCR. O *heatmap* foi gerado a partir dos dados obtidos nos ensaios de RT-qPCR apresentados nas Figuras S1 e S2, sendo considerados todos os valores experimentais de $\Delta\Delta C_t$ (e não $2^{-\Delta\Delta C_t}$) de pelo menos três réplicas biológicas independentes. As cores verde e vermelha indicam, respectivamente, aumento e diminuição dos níveis de cada transcrito relativamente a amostra controle, de acordo com escala mostrada. Os genes das subunidades catalíticas de PPPs estão sublinhados. O gene utilizado como controle positivo do estresse térmico (*hspC*) está em negrito.

4.2.2. Perfil de expressão no estresse hiper-osmótico

A resposta de *D. discoideum* ao estresse hiper-osmótico em nossas condições experimentais foi confirmada através da expressão do gene *gapA* que apresentou nível máximo de indução após 30 min do tratamento, consistente com resultados obtidos através de *Northern blot* e de microarranjos de DNA (Araki *et al.*, 2003; Na *et al.*, 2007) (Figura 14 e S3). Este gene codifica uma proteína ativadora da atividade de GTPase de Ras (Ras-GAP) e que é necessária para a citocinese normal das células de *D. discoideum*. A expressão do *gapA* é induzida por estresse hiper-osmótico, sendo dependente da ativação de Dd-STATc que funciona como um transdutor de sinal e fator de transcrição durante a transição da fase unicelular para multicelular de *D. discoideum* e em resposta aos estresses hiper-osmótico, térmico e oxidativo (Araki *et al.*, 2003; Na *et al.*, 2007).

As figuras 14 e S3 mostram que, durante o estresse hiper-osmótico, os níveis dos transcritos de *DdPP1*, *PP4c* e *pho2B* (*PP4-like*) são diminuídos a partir dos tempos iniciais do tratamento (15 min), enquanto que para *PP5c* e *PP6c* esta diminuição é verificada mais tardiamente (após 45 min).

Por outro lado, o gene de *PP2Ac* parece ser moderadamente induzido em 0.5 h de estresse e reprimido nos tempos mais tardios (Figuras 14 e S3), de modo similar ao observado para o gene de sua subunidade estrutural A (*pppA*) (Figura S4), evidenciando provável co-regulação na expressão destes genes. A expressão dos transcritos de *DDB_G0279647* mostrou uma ligeira indução em 0.25 h e 1 h de estresse (Figuras 14 e S4). Como já mencionado, este gene codifica uma proteína homóloga a Tap42 de levedura/alfa-4 de mamíferos, a qual é capaz de interagir com *PP4c*, *PP6c* e *PP2Ac*. Este perfil de expressão está mais próximo ao observado *PP2Ac*, sugerindo que no estresse hiper-osmótico Tap42/alfa-4 de *D. discoideum* possivelmente interage com *PP2Ac*, e não com *PP4c* e/ou *PP6c* como parece ocorrer no estresse

térmico, estando talvez implicada na resposta inicial e de adaptação ao estresse hiper-osmótico em *D. discoideum*.

Dentre as subunidades que potencialmente interagem com a DdPP1c, notamos uma clara indução da expressão dos transcritos de *DdI-2* e *DDB_G0292194* (Figuras 14 e S4) em resposta ao estresse hiper-osmótico. Ainda que em menor proporção, os níveis dos transcritos de *DdI-3* e *pprA* (Sds22) também são induzidos, respectivamente, após 15 e 30 min de estresse (Figuras 14 e S4). Estes dados demonstram uma aparente co-regulação da expressão de *DdI-3*, *pprA* e *DdI-2* durante o estresse hiper-osmótico, sugerindo a participação destes genes na resposta a este estresse, por exemplo na modulação negativa da divisão celular, visto que o crescimento das células também é reduzido nesta condição (Figura 12). A co-regulação da expressão destes 3 genes também parece ocorrer na resposta ao choque térmico (Figuras 13 e S2). Estes dados merecem atenção especial, e será interessante futuramente investigar a inter-relação de *DdI-3*, *DdI-2* e *Sds22* na modulação da função da PP1c em *D. discoideum*.

Os níveis dos transcritos de *med26*, *DDB_G0293300*, *cwc15* e *DDB_G0269300* são reprimidos pelo estresse hiper-osmótico enquanto que *DDB_G0285313* exibiu um aumento significativo imediatamente ao início (tempo 0h) do estresse hiper-osmótico (Figuras 14 e S4). Ainda que, assim como no caso de *DDB_G0293300*, a interação de *DDB_G0285313* com DdPP1c não tenha sido confirmada (Raposo, 2010) é interessante observar que este gene exiba uma resposta aos estresses tanto hiper-osmótico como térmico (Figuras 13, 14, S2 e S4).

Assim como verificado no estresse térmico, os níveis dos transcritos de *anapc6* e *anapc3* (codificam, respectivamente, *cdc16* e *cdc27* que são prováveis subunidades reguladoras de PP5c) também são reprimidos em resposta ao estresse hiper-osmótico (Figura 14 e S2), sendo consistente com o fato de que as proteínas codificadas por estes genes estão envolvidas com a progressão do ciclo celular e promoção da proliferação que podem estar interrompidos durante estes estresses.

Curiosamente, a expressão de *snfA* (serina/treonina quinase que interage com a PP5c) exibe mesmo perfil observado para PP5c (Figuras 14, S3 e S4), isto é, aumento no nível dos transcritos após 15-30 min do estresse, seguido de diminuição após 45 min. Como já mencionado, esta quinase tem sido associada com a resposta a estresses em *D. discoideum* e em outros organismos (Golden *et al.*, 2008b; Francione *et al.*, 2009).

A expressão do gene da subunidade regulatória da PP4c (*pp4r1*) parece ser reprimida durante o estresse hiper-osmótico (Figura S4), sendo o mesmo observado para a expressão da subunidade catalítica (Figura S3). Em contrapartida, o nível transcrito de *smkA*, que codifica uma subunidade reguladora da PP4c, é levemente induzido no início deste estresse, sendo após 45 min, moderadamente reprimido (Figura S4).

Portanto, a maioria dos genes analisados apresentam uma redução dos níveis de expressão em resposta ao estresse hiper-osmótico, consistente com dados de microarranjos de DNA que também revelaram um significativo maior número de genes reprimidos comparado ao de induzidos, sugerindo que *Dictyostelium* reprime muitos processos celulares a fim de sobreviver ao estresse (Na *et al.*, 2007).

Figura 14. Perfil do nível de expressão do mRNA de subunidades catalíticas e potenciais reguladoras das PPPs de *D. discoideum* em resposta ao estresse hiper-osmótico. Células em fase de crescimento foram incubadas a 22°C suplementadas ou não (amostra controle) como 200 mM de sorbitol pelos tempos indicados e o RNA total foi submetido aos ensaios de RT-qPCR. O *heatmap* foi gerado a partir dos dados obtidos nos ensaios de RT-qPCR apresentados nas Figuras S3 e S4, sendo considerados todos os valores experimentais de $\Delta\Delta C_t$ (e não $2^{-\Delta\Delta C_t}$). As cores verde e vermelha indicam, respectivamente, aumento e diminuição dos níveis de cada transcrito relativamente ao controle não tratado, de acordo com escala mostrada. Os genes das subunidades catalíticas de PPPs estão sublinhados. O gene utilizado como controle positivo do estresse térmico (*gapA*) está em negrito.

4.2.3. Perfil de expressão no estresse oxidativo

Pelo fato dos genes *DdI-2*, *DdI-3* e *DDB_G0292194* que codificam proteínas que interagem com a PP1c terem se destacado nas análises de expressão em resposta aos estresses térmico e hiper-osmótico, resolvemos também analisá-los na resposta ao estresse oxidativo. O perfil dos demais genes avaliados nos estresses térmico e hiper-osmótico não foi investigado no estresse oxidativo. O gene *gsr* que codifica uma glutathione redutase em *D. discoideum* foi escolhido como controle positivo visto que em análises de microarranjos de DNA a expressão deste gene mostrou ser relevante neste estresse (Mantzouranis, 2009). A figura 15 mostra que apenas o *DDB_G0292194* foi significativamente induzido nesta condição. Como será mostrado adiante, este gene também é expresso diferencialmente ao longo do desenvolvimento, e foi então selecionado para uma caracterização mais detalhada.

Figura 15. Análise do nível de expressão do mRNA de potenciais subunidades reguladoras da PP1c de *D. discoideum* em resposta ao estresse oxidativo.

Células da linhagem AX-4 em fase de crescimento exponencial foram incubadas a 22°C na ausência (barra branca) ou na presença de H₂O₂ 500 µM (barra cinza) pelos tempos indicados e o RNA total foi submetido aos ensaios de RT-qPCR para análise do nível dos transcritos dos genes: *gsr* (A), *DdPP1c* (B), *DDB_G0292194* (C), *DdI-2* (D) e *DdI-3* (E). O nível de expressão do gene constitutivo IG7 foi utilizado para normalizar a quantidade de cDNA nos ensaios e a razão de expressão em cada amostra foi calculada em relação às células controle de cada tempo. Cada gráfico representa a média de três experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata.

4.2.4. Perfil de expressão ao longo do desenvolvimento

Além de monitorarmos a progressão no desenvolvimento de *D. discoideum* induzido pela carência nutricional através da observação das diferentes formas na lupa (Figura 4), acompanhamos o perfil de expressão dos genes *acaA* e *ecmA* que são, respectivamente, marcadores dos tempos iniciais e finais do desenvolvimento. As figuras 16 e S5 mostram que os níveis dos transcritos de *acaA* e *ecmA* aumentaram, respectivamente, entre 4-12 h e 16-24 h do desenvolvimento, exibindo um perfil similar ao descrito na literatura (Van Driessche *et al.*, 2002; Siol *et al.*, 2006; Whitney *et al.*, 2006).

Nas figuras 16, S5 e S6 podemos observar que praticamente todos os genes avaliados apresentam diminuição no nível de seus transcritos no início do desenvolvimento (após 2 h). Estes transcritos, exceto os transcritos de PP5c, pprA e DDB_G0279647, têm níveis aumentados após este período, sendo que alguns (DdPP1c, PP2Ac, PP4c, pho2B, PP6c, DDB_G0285313, DDB_G0293300, DDB_G0269300, cwc15, DdI-2, pp4r1, smkA, pppA, snfA, anapc6 e anapc3) retornam, ao longo do desenvolvimento, aos níveis observados no tempo 0h, sofrendo nova redução após 16 h. Interessantemente, alguns genes apresentam aumento da expressão em uma fase definida do ciclo de desenvolvimento (12 h), como é o caso de *DDB_G0293300*, *DDB_G0285313*, *snfA*, *anapc6* e *anapc3* (Figura S6). Nesta fase do desenvolvimento (entre 9 e 15 h) a maioria das células está na fase S do ciclo celular e somente 20 h após a germinação do esporo se observa a mitose (Muramoto e Chubb, 2008). Esta observação corrobora com o fato de proteínas como anapc3, anapc6, I-2 e I-3 estarem envolvidas na progressão da mitose (Huang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008a). A localização e o nível de expressão do I-2 variam ao longo do ciclo celular. A expressão de I-2 é maior durante a fase S e mitose, estando a proteína localizada no citossol durante a fase G1 e no núcleo na fase S (Brautigan *et al.*, 1990; Kakinoki *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2008b). Além

disso, podemos indicar uma possível participação dos outros genes no controle do ciclo celular e/ou progressão do ciclo multicelular.

De maneira geral, o perfil de expressão que observamos para vários destes genes, coincide com dados obtidos por análises de microarranjos disponíveis no dictyBase (Van Driessche *et al.*, 2002; Iranfar *et al.*, 2003).

Os dados de RT-qPCR mostram que os níveis do transcrito de *DdPP1c* são bem reduzidos após 16 h do desenvolvimento, um perfil que é acompanhado pelos transcritos de proteínas que interagem com a PP1c, como *DdI-3* e *DdI-2*. Além destes, observamos que os níveis do transcrito de *DDB_G0292194* são muito aumentados (~3,5 vezes) na fase de agregação (8h) (Figuras S6).

Os perfis de expressão de PP2Ac, PP4c, *pho2B* (*PP4c-like*) e PP6c se assemelham ao de *DdPP1c*. Coincidentemente, os genes *pp4r1*, *smkA* e *pppA* que codificam proteínas que potencialmente interagem com algumas destas fosfatases exibiram perfil similar, exceto por *DDB_G0279647* (Tap42/alfa-4) (Figura S5 e S6).

102

Ressaltamos que os níveis do transcrito de PP5c mostram-se drasticamente diminuídos ao longo de todo o desenvolvimento (Figura S5). Interessantemente, as proteínas relacionadas a esta fosfatase (*snfA*, *anapc6* e *anapc3*) também tem seus respectivos transcritos em níveis reduzidos durante todo o desenvolvimento, com exceção do tempo 12 h, único ponto em que os transcritos retomam ao nível inicial (Figura S6). Sabendo que as proteínas codificadas por *anapc3* e *anapc6* estão relacionadas com a divisão celular, nosso dado é consistente com a observação de que ocorre replicação do DNA nuclear em torno de 12 h do desenvolvimento, correspondendo à maior fração de células em fase S (Muramoto e Chubb, 2008). O conjunto de nossos dados indica que os níveis do transcrito de PP5 são ligeiramente modulados positivamente no estresse térmico e negativamente no estresse hiper-osmótico e no desenvolvimento, sugerindo o envolvimento desta enzima principalmente no crescimento de *D. discoideum*. Fica a questão se *snfA*, *anapc6* e *anapc3*, que aparentemente são importantes após a fase

de formação do agregado compacto (12 h), desempenham seus papéis de maneira independente de PP5c, caso os níveis desta proteína reflitam os níveis de seu transcrito.

Figura 16. Perfil do nível de expressão do mRNA de subunidades catalíticas e potenciais reguladoras das PPPs durante o desenvolvimento de *D. discoideum*. Células em fase de crescimento foram submetidas à carência nutricional em filtros para indução do desenvolvimento. As células foram coletadas nas diferentes fases do desenvolvimento nos tempos indicados e o RNA total foi submetido aos ensaios de RT-qPCR. O *heatmap* foi gerado a partir dos dados obtidos nos ensaios de RT-qPCR apresentados nas Figuras S5 e S6, sendo considerados todos os valores experimentais de $\Delta\Delta C_t$ (e não $2^{-\Delta\Delta C_t}$). A cor verde e vermelha indica, respectivamente, aumento e diminuição dos níveis de cada transcrito relativamente ao tempo 0 h, de acordo com escala mostrada. Os genes das subunidades catalíticas de PPPs estão sublinhados. Os genes utilizados como marcadores da progressão ao longo do desenvolvimento (*acaA* e *ecmA*) estão em negrito.

4.2.5 Análise do perfil de expressão protéico de DdI-3 e DdI-2 em *D. discoideum*

As análises do perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento de *D. discoideum* e na resposta a diferentes estresses, mostrou o nível dos transcritos de DdI-3 e DdI-2 é significativamente aumentado em resposta ao estresse térmico. O estresse hiper-osmótico também modula positivamente o nível dos transcritos destes genes. Além disso, verificamos que ao longo do desenvolvimento, o nível dos transcritos de DdI-3 e DdI-2 é aumentado, e particularmente no caso de DdI-2 a modulação positiva é relevante (Figuras S2, S4 e S6). Interessantemente, as proteínas codificadas por estes genes nunca foram implicadas com vias de diferenciação celular e de resposta a estresse em outros organismos, apesar de diversas outras funções fisiológicas já terem sido detectadas tanto para I-2 como para I-3. Por exemplo, com relação à participação do I-2 no controle da separação dos centrossomos durante a mitose em mamíferos enquanto I-3 contribui para a progressão da mitose e localização nuclear da PP1c (Peggie *et al.*, 2002; Leach *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Lesage *et al.*, 2007; Pedelini *et al.*, 2007; Bharucha *et al.*, 2008; Takemiya *et al.*, 2009).

Para esclarecer se a variação na abundância dos transcritos de DdI-3 e DdI-2 era acompanhada por uma variação de seus níveis protéicos foi necessário obter anticorpos específicos contra estas proteínas. Para tal, a sequência codificadora de ambas as proteínas foi expressa em bactérias e as respectivas proteínas recombinantes foram purificadas e utilizadas na obtenção de anticorpos policlonais. Avaliamos que tais anticorpos seriam ferramentas úteis para futuros estudos, visando uma caracterização funcional mais detalhada destes inibidores de DdPP1c. Vale lembrar que em nosso laboratório, foi demonstrado que tanto DdI-2 como DdI-3 recombinantes são capazes de inibir, especificamente, a atividade de DdPP1c (Gonzalez-Kristeller, 2007; Sousa-Canavez *et al.*, 2007).

A descrição detalhada das etapas de clonagem, expressão e purificação de DdI-2 e DdI-3 recombinantes para preparação de anticorpos, respectivamente em camundongos e coelho, está apresentada como material suplementar (anexo, Figuras S7 a S12). Os anti-soros obtidos se mostraram razoavelmente específicos (Figura S11 e S12) quando testados contra extratos de *E. coli* e adequados para detecção de DdI-3 e DdI-2 em *immunoblots*.

Os anti-soros obtidos para rDdI-3 e rDdI-2 foram então utilizados em membranas contendo o extrato celular de *D. discoideum* obtido em diferentes fases do desenvolvimento ou durante o crescimento sob estresse térmico e osmótico o que nos permitiu detectar uma banda proeminente com as massas moleculares de ~37 kDa e ~25 kDa, respectivamente, referentes à DdI-2 e DdI-3 neste microorganismo. A massa molecular predita para estas proteínas com base em suas respectivas sequências primárias é de 17,6 e 31 kDa, porém estas proteínas apresentam migração anômala em SDS-PAGE (Figuras S9 e S10) (Sousa-Canavez, 2005; Gonzalez-Kristeller, 2007; Sousa-Canavez *et al.*, 2007).

Os dados reunidos na Figura 17 mostram que o nível de expressão destas proteínas permanece praticamente constante nas condições analisadas. Embora este resultado não corresponda diretamente ao perfil de expressão gênica observado nas condições testadas (Figuras 13, 14 e 16), a imunodetecção representa um dado muito mais qualitativo do que quantitativo. Além disso, é descrito na literatura que estes inibidores apresentam um alto grau de reciclagem na célula, sugerido também pelo fato de possuírem grande sensibilidade a proteases, não sendo comum, portanto, se verificar o acúmulo destas proteínas (Zhang *et al.*, 1998).

A

B

Figura 17. Nível de expressão das proteínas Ddl-2 e Ddl-3 em diferentes extratos de *D. discoideum*. Amostras de extratos celulares obtidos a partir de $\sim 1 \times 10^6$ células da linhagem AX4 durante diferentes fases do desenvolvimento ou de células da fase de crescimento submetidas ao choque térmico de 30°C ou estresse osmótico com 200 mM de sorbitol pelos tempos indicados foram submetidas a SDS-PAGE. Os polipeptídeos foram transferidos para membranas de nitrocelulose, seguindo-se incubação com os anti-soros policlonais anti-Ddl-2 (A) ou anti-Ddl-3 (B) na diluição 1:250 e detecção por quimioluminescência (kit ECL – GE Healthcare), utilizando-se como anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo (A) ou de coelho (B). Os marcadores de massa molecular estão indicados à direita de cada painel. A detecção de actina com anticorpo monoclonal anti-actina (1:1000, Santa Cruz) foi utilizada para normalizar a quantidade de proteína aplicada no gel. Os gráficos representam a quantificação de Ddl-2 e Ddl-3 normalizada pelo programa ImageJ.

4.3. Caracterização da ORF hipotética *DDB_G0292194*

Dentre os genes relacionados a PPPs que tiveram seus perfis de expressão investigados ao longo do desenvolvimento e nos estresses térmico, hiperosmótico e oxidativo, selecionamos *DDB_G0292194* para uma caracterização adicional na tentativa de desvendar seu papel biológico em *D. discoideum*. Os resultados discutidos anteriormente mostram que os transcritos deste gene apresentaram níveis significativamente aumentados nas 3 condições de estresses que testamos. Além disso, o perfil de expressão de *DDB_G0292194* é claramente modulado ao longo do desenvolvimento de *D. discoideum*.

Como já mencionado, *DDB_G0292194* foi selecionado através de ensaios do sistema de duplo-híbrido em que foi utilizada a DdPP1c como isca na varredura de bibliotecas de cDNA de *D. discoideum*, sendo portanto um candidato a parceiro molecular da PP1c (Gonzalez-Kristeller, 2007).

De acordo com as informações disponíveis no dictyBase (<http://dictybase.org>), o gene *DDB_G0292194* está localizado no cromossomo 6, sendo sua sequência codificada por dois exons de 359 pb e 1322 pb separados por um intron de 258 pb, como esquematizado na figura 18A. A ORF hipotética deste gene apresenta 559 aminoácidos (Figura 18B), para qual, até o momento, não estão indicados ortólogos no dictyBase.

Ainda assim, realizamos buscas utilizando BLASTp ou PSI-BLAST na base de sequências do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) na tentativa de identificarmos potenciais ortólogos de *DDB_G0292194*, sendo que nenhuma proteína similar foi identificada. Todavia, estas análises confirmaram a presença do domínio FHA (*ForkHead-Associated*) na região aminoterminal da ORF codificada por *DDB_G0292194* (Figura 18 B e C). Interessantemente, este domínio também é encontrado no inibidor nuclear da PP1c de mamíferos, NIPP1 (Van Eynde *et al.*, 1995). Além do *DDB_G0292194*, os genes *pinA* e *fhkC*, e três ORFs hipotéticas *DDB_G0271054*, *DDB_G0293190* e *DDB_G0280133* de *D. discoideum* codificam proteínas com o domínio

FHA. *PinA* codifica uma peptidil-prolil isomerase estando relacionada com enovelamento de proteínas, já *fhkC* codifica uma proteína quinase similar à Chk2 de mamíferos e RAD53 de levedura, envolvidas no controle do ciclo celular.

Os domínios FHA são encontrados em proteínas de eucariotos e procariotos, estando presentes em mais de 700 proteínas eucarióticas tais como quinases, fosfatases, quinesinas (proteínas motoras), fatores de transcrição que se ligam ao DNA, proteínas que se ligam ao RNA e enzimas metabólicas. Este domínio reconhece resíduos de fosfotreonina e sua estrutura é organizada em um sanduíche β formado de seis e cinco folhas β . Quatro aminoácidos são requeridos para a interação com a fosfoproteína e se localizam na margem das cinco folhas β que se ligam aos substratos fosforilados. As proteínas que possuem este domínio estão envolvidas com a regulação do crescimento celular, divisão, diferenciação, apoptose, resposta ao dano de DNA, transcrição, transporte intracelular e/ou degradação de proteínas (Durocher e Jackson, 2002; Yaffe e Smerdon, 2004; Liang e Van Doren, 2008).

108

A figura 18B mostra a sequência de 559 aminoácidos da provável proteína codificada por *DDB_G0292194* e um esquema representando a localização do domínio FHA. A massa molecular estimada desta ORF hipotética é de ~63 kDa e com pI teórico de 4,7. Uma sequência correspondente ao motivo consenso [R/K]-X1-[V/I]-X2-[F/W] de ligação a PP1c foi identificada.

Outra característica bastante peculiar desta ORF consiste da presença de repetições sequenciais de asparagina presentes em duas regiões da proteína, uma localizada na porção N-terminal contendo 28 asparaginas e outra na porção central da proteína contendo 44 asparaginas (Figura 18B). Curiosamente, o provável domínio FHA se localiza entre estas duas repetições ricas em asparagina.

O genoma de *D. discoideum* é rico em A+T favorecendo a formação de códons do tipo NNT ou NNA (N= qualquer nucleotídeo), o que também é observado no genoma de *Plasmodium*, e refletido na composição das proteínas (Eichinger *et al.*, 2005). Aminoácidos

codificados por códons do tipo WWN (W=A ou T e N= qualquer base, designando Asn, Lys, Ile, Tyr e Phe) são bastante comuns em proteínas de *D. discoideum* e repetições consecutivas de trinucleotídeos são especialmente abundantes nos exons de *D. discoideum*, correspondendo a repetições de sequências de aminoácidos. Os trechos de poliasparaginas e poliglutaminas contendo ≥ 20 aminoácidos são predominantes e estão presentes em 2.090 das 12.500 proteínas preditas no genoma de *D. discoideum*. Algumas evidências indicam que estes homopeptídeos podem mediar ou modular interações proteína-proteína, podendo ser encontrados em proteínas quinases, fatores de transcrição, helicases de RNA e proteínas ligadoras de RNA (Eichinger *et al.*, 2005).

Diferentes tamanhos e sequências de homorepetições de aminoácidos têm sido associados a classes específicas de proteínas em eucariotos. Em levedura, proteínas contendo homorepetições (PCH) estão envolvidas em regulação de transcrição e transdução de sinal. Em *Drosophila*, as PCHs estão associadas com desenvolvimento e regulação da transcrição. Em humanos, estas proteínas estão relacionadas com doenças tais como Huntington, Alzheimer e Parkinson, já que domínios ricos em glutamina e asparagina possuem uma predisposição para formar fibras amilóides (Katti *et al.*, 2000; Young e Justice, 2000; Karlin *et al.*, 2002a; Karlin *et al.*, 2002b; Singh *et al.*, 2004).

Utilizando ferramentas de bioinformática, estudos das PCHs de *Plasmodium falciparum* e comparação com os proteomas de outros eucariotos indicaram que as proteínas de *P. falciparum* e *D. discoideum* apresentam tendências semelhantes a possuírem PCHs e domínios similares a príons. Em *P. falciparum*, as PCHs aparecem em diferentes classes funcionais de proteínas, no entanto, as homorepetições são mais representativas em proteínas relacionadas com reparo de DNA, organização do citoesqueleto e adesão celular (Singh *et al.*, 2004). A vantagem biológica conferida aos organismos pelo enriquecimento de homorepetições de aminoácidos permanece desconhecida.

A predição de localização subcelular da proteína codificada por *DDB_G0292194* através de comparações com motivos e assinaturas presentes em bases públicas como PROSITE e PFAM sugere uma localização nuclear com 88% de confiança, embora não haja uma sequência sinal. Para predição foi utilizada a ferramenta disponível em <http://cubic.bioc.columbia.edu/services/loctree/out/9179418.html>.

Figura 18. Estrutura do gene *DDB_G0292194* e sequência da ORF hipotética. (A) Esquema extraído da página do dictyBase (<http://dictybase.org>) que descreve a estrutura do gene *DDB_G0292194* localizado no cromossomo 6 de *D. discoideum*. A predição automática de genes indica a existência de dois exons (caixas grossas em rosa) separados por um íntron (traço fino) que compõem a sequência codificadora denominada DDB0219724. A orientação das setas indica o sentido da transcrição do gene. (B) Sequência de aminoácidos predita (559 aminoácidos) para o produto do gene *DDB_G0292194* que apresenta massa molecular estimada de ~63 kDa. O domínio FHA está assinalado em cinza, as repetições de asparaginas (N) estão sublinhadas e os aminoácidos em negrito (KNIKF) representam uma sequência candidata a motivo RVxF de ligação à PP1c. (C) Esquema representando a localização de um provável domínio FHA na ORF hipotética codificada por *DDB_G0292194*, o qual foi identificado pelos programas de localização de domínios proteicos indicados à direita do quadro.

4.3.1. Clonagem da sequência codificadora de DDB_G0292194 para expressão recombinante em bactéria

O clone de cDNA correspondente ao gene DDB_G0292194 que foi selecionado nos ensaios de duplo-híbrido utilizando-se a PP1c como isca não estava completo, representando uma porção mais central da sequência codificadora (ver figura 21 adiante). Assim, decidimos realizar a clonagem de segmentos da sequência codificadora desde gene para confirmarmos a interação de seu produto com DdPP1c em novos ensaios de duplo-híbrido em leveduras bem como para obtenção da proteína recombinante expressa em bactérias a ser utilizada para preparação de anticorpos policlonais específicos.

Optamos, inicialmente, pela clonagem de parte do cDNA do DDB_G0292194, que não inclui a sequência referente ao domínio FHA, para verificarmos a dependência desde domínio para interação com DdPP1c (ver adiante). Além disso, visto que o genoma de *D. discoideum* codifica outras proteínas com domínio FHA, a utilização de uma proteína recombinante sem este domínio na geração de anticorpos, certamente garantiria maior especificidade destes anticorpos.

Assim, utilizamos os oligonucleotídeos DDB_G0292194 Δ FHAF e DDB_G0292194(Not)R contendo sítios de restrição para *Nde*I e *Not*I, respectivamente, para amplificação de um segmento de 1093 pb a partir do DNA genômico. O produto de PCR foi eluído do gel e clonado no vetor pCR2.1, gerando a construção pCR2.1-DDB_G0292194 Δ FHA cuja autenticidade foi verificada por sequenciamento de DNA. Esta construção foi então digerida com *Nde*I e *Not*I e o fragmento resultante foi subclonado no pET36b digerido com as mesmas enzimas. A figura 19 demonstra as etapas desta clonagem.

A construção pET36b-DDB_G0292194 Δ FHA foi então utilizada para transformação da cepa bacteriana BL21(DE3) (Stratagene), sendo que a expressão da proteína recombinante foi somente observada quando a indução com IPTG foi realizada a 20°C por 16 h. Nestas condições observamos a indução de um polipeptídeo de ~38 kDa e outro de ~56 kDa (Figura 20). A rDDB_G0292194 Δ FHA é composta de

375 aminoácidos, apresenta um pI teórico de 4.9 e uma massa molecular esperada de 42 kDa, incluindo a cauda de histidina. Assim, a detecção da banda de 56 kDa utilizando o anticorpo monoclonal anti-His parece corresponder a rDDB_G0292194ΔFHA (Figura 20C).

Em ensaios de purificação que foram realizados em coluna de Ni²⁺-NTA-agarose, verificamos que o polipeptídeo de ~38 kDa não é retido na coluna (dados não apresentados), o que é indicativo da ausência da cauda de histidina, reforçando a suposição de que a banda de 56 kDa corresponde a proteína recombinante rDDB_G0292194ΔFHA. Contudo, a quantidade de proteína recombinante obtida foi insuficiente para imunização de animais.

Na tentativa de contornar este problema, resolvemos clonar um fragmento (716 pb, 259 aminoácidos) da região codificadora de *DDB_G0292194* no vetor de expressão pET36b, excluindo o domínio FHA e as regiões ricas em asparagina (pET36b- *DDB_G0292194T*) que eventualmente estariam dificultando a expressão em *E. coli*. Como esperado, a proteína rDDB_G0292194_T foi expressa em maior quantidade, purificada e utilizada na imunização de camundongos (dados não apresentados). Infelizmente, contudo, não tivemos sucesso na obtenção de anticorpos policlonais específicos (dados não apresentados).

A quantidade de rDDB_G0292194ΔFHA e rDDB_G0292194_T obtida, tão pouco foi suficiente para realização de ensaios de interação *in vitro* com DdPP1c recombinante. Além disso, realizamos várias tentativas de amplificação, por RT-PCR, da região codificadora completa do cDNA de *DDB_G0292194*, não obtendo sucesso em nenhum destes ensaios, o que impossibilitou a tentativa de obtermos a proteína rDDB_G0292194 íntegra.

Figura 19. Análise da amplificação da sequência codificadora de *DDB_G0292194ΔFHA* e respectivas construções plasmidiais. (A) Amplificação do *DDB_G0292194ΔFHA* por PCR. A seta indica o tamanho de 1093 pb esperado (canaleta 2). A banda contendo o fragmento de DNA foi cortada e eluída do gel. (B) Análise do fragmento de DNA purificado do gel (canaleta 2). (C) O *DDB_G0292194 ΔFHA* foi clonado no vetor pCR2.1 usando o TA cloning kit (Invitrogen) (canaleta 2) e digerido com *NdeI* e *NotI* para liberação do inserto (canaleta 3). A seta indica o tamanho esperado de 1093 pb do inserto. (D) Análise dos plasmídeos de 4 clones obtidos após a transformação da cepa SURE com a ligação pET36b/ *DDB_G0292194 ΔFHA*. (E) Confirmação da ligação de pET36b/ *DDB_G0292194ΔFHA* pela digestão dos plasmídeos com *NdeI* e *NotI*. A digestão dos plasmídeos originou um fragmento de 1093 pb como esperado (canaletas 2-5). O marcador de tamanho 1 kb DNA ladder está indicado nas canaletas 1C-E/3B e o 100 pb DNA ladder está indicado nas canaletas 1A e B.

A **B** **C**

Figura 20. Expressão do DDB_G0292194ΔFHA recombinante. (A) A cultura de bactérias BL21(DE3) transformada com a construção pET36b (canaletas 1 e 2) ou pET36b-DDB_G0292194ΔFHA (canaletas 3-14) crescida a 37°C por 16 h foi diluída em meio fresco até DO_{600nm} atingir 0,4. Foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 4 h a 37°C (canaletas 3-8) ou por 16 h a 20°C (canaletas 9-14). Os extratos protéicos de culturas não induzidas (canaletas ímpares) e induzidas com IPTG (canaletas pares) foram separados em SDS-PAGE 10%. (B) Indução em maior escala (50 mL) de um dos clones de bactéria transformada com pET36b-DDB_G0292194ΔFHA que aparentemente induziu a proteína recombinante a 20°C por 16 h. Os extratos protéicos da cultura não induzida (canaleta 1) e induzida com IPTG (canaleta 2) foram separados e o restante da cultura foi centrifugado, suspenso em 1 mL de tampão de lise e sonificado. O lisado bacteriano, o sobrenadante (canaleta 3) e o precipitado (canaleta 4) foram analisados em SDS-PAGE 10%. Os géis foram corados com azul de Coomassie. (C) Imunodeteção do extrato bacteriano da cultura não induzida (canaleta 1) e induzida com IPTG (canaleta 2) utilizando anticorpo monoclonal anti-HisHRP (1:500) por 1 h em temperatura ambiente. O reconhecimento da proteína foi detectado por quimioluminescência (kit ECL - GE Healthcare). As setas grossa e fina em A-C indicam respectivamente polipeptídeos de ~ 38 kDa e/ou ~56 kDa que foram induzidos na condição testada.

4.3.2. Avaliação da interação de DDB_G0292194ΔFHA com DdPP1c através de ensaios de duplo-híbrido em leveduras

Como mencionado anteriormente, utilizando-se a DdPP1c como isca em ensaios de duplo-híbrido (Fields e Song, 1989; Fields e Sternglanz, 1994), foram selecionados 30 clones distintos de cDNA que codificam proteínas que potencialmente interagem com a DdPP1c, entre estes um clone de cDNA relacionado ao gene DDB_G0292194 (Gonzalez-Kristeller, 2007). A interação do produto protéico derivado deste e de vários outros clones de cDNA selecionados na varredura com DdPP1c foi confirmada, através de novos ensaios de duplo-híbrido em leveduras (Raposo, 2010). No entanto, o cDNA deste clone não representa a sequência codificadora completa do gene DDB_G0292194 como esquematizado na Figura 21, não possuindo significativa parte da região aminoterminal e do carboxiterminal, ainda que inclua alguns aminoácidos do domínio FHA.

Como não conseguimos obter a sequência codificadora completa de DDB_G0292194 para realizar ensaios de duplo-híbrido para confirmação de sua interação com DdPP1c, resolvemos realizar estes ensaios utilizando DDB_G0292194ΔFHA (Figura 21). Desta forma poderíamos verificar a dependência do domínio FHA na interação com DdPP1c.

Para realizar o ensaios de duplo-híbrido em levedura, o fragmento de DNA de 1093 nucleotídeos referente ao DDB_G0292194ΔFHA foi removido da construção pCR2.1-DDB_G0292194ΔFHA pela digestão com *NdeI* e *EcoRI* e em seguida subclonado no vetor pGADT7. A construção pGADT7-DDB_G0292194ΔFHA (Figura 11) foi utilizada para transformar leveduras da linhagem AH109 já contendo a isca pGBKT7-DdPP1c ou pGBKT7 (controle negativo). Após a transformação as leveduras foram semeadas em meio de cultura sem triptofano, leucina e histidina para avaliação da interação (Figura 22). Observamos que apenas as leveduras contendo pGBKT7-DdPP1c/pGADT7-DDB_G0292194ΔFHA e pGBKT7-p53/pACT2-antígeno-T (controle

positivo) cresceram em meio seletivo triplo (sem triptofano, leucina e histidina) (Figura 22). Para confirmação deste resultado 4 diluições seriadas das leveduras contendo pGBKT7-p53/pACT2-antígeno-T, pGBKT7-LAM/ pACT2-antígeno-T (controle negativo), pGBKT7-DdPP1c/pGADT7- DDB_G0292194 Δ FHA e pGBKT7 / pGADT7-DDB_G0292194 Δ FHA (controle negativo) foram semeadas em meio de cultura seletivo duplo (sem triptofano e leucina) e triplo (Figura 22). Verificamos o crescimento de todas as leveduras em meio seletivo duplo, mas apenas as leveduras transformadas com pGBKT7-p53 / pACT2-antígeno-T e pGBKT7-DdPP1c / pGADT7-DDB_G0292194 Δ FHA cresceram em meio sem histidina até as maiores diluições. Estes resultados confirmam a interação entre DDB_G0292194 e DdPP1c independente do domínio FHA.

Figura 21. Representação esquemática da sequência de aminoácidos dos variantes de DDB_G0292194. A sequência codificadora de DDB_G0292194 (1), de DDB_G0292194 Δ FHA (2) e do clone isolado com a isca DdPP1c na varreduras das bibliotecas do sistema de duplo-híbrido (3) estão representadas pelas barras em cinza. Em cinza escuro está representada a localização do domínio FHA. A região onde se encontra o provável motivo RvxF (338KNIKF342) de ligação a PP1c está indicada.

Figura 22. Interação entre DDB_G0292194ΔFHA e DdPP1c. (A) A cepa AH109 foi transformada com a construção pGBKT7-DdPP1c (1) e em seguida com o plasmídeo pGADT7- DDB_G0292194ΔFHA (6). O clone 4 (controle positivo da interação) foi obtido após transformação de AH109 com pGBKT7-p53 e pGADT7-antígenoT, enquanto o clone 3 (controle negativo da interação) foi obtido após transformação com pGBKT7-Lam e pGADT7-antígenoT. Os clones 1 e 2 correspondem às linhagens AH109 transformadas apenas com pGADT7- DDB_G0292194ΔFHA e pGBKT7-DdPP1c, respectivamente. A interação foi analisada pela ativação do repórter HIS3. Os transformantes que continham os dois plasmídeos selecionados em meio seletivo duplo (+His) foram semeados em meio seletivo triplo (-His). (B) Os duplo transformantes foram semeados em meio SD sem triptofano e leucina contendo (+His) ou não His (-His) em 4 diluições diferentes (seriadas 10x a partir da DO_{600nm} ~0.2). As placas foram incubadas a 30°C por 2-3 dias e escaneadas.

4.3.3. Obtenção de linhagens nocautes para DDB_G0292194

Com o objetivo de investigar a função desempenhada pela proteína codificada pelo gene DDB_G0292194, identificada como sendo uma provável subunidade regulatória da PP1c em *D. discoideum*, decidimos obter linhagens nocautes através da substituição do DDB_G0292194 pelo gene completo interrompido por um segmento de DNA (cassete) que codifica resistência ao antibiótico blasticidina (BsR).

Para obtenção destas linhagens nocautes de *D. discoideum*, a construção pCR2.1-DDB_G0292194_BsR (Figura 9) foi linearizada por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, liberando um inserto de 3.1 kpb que foi utilizado na eletroporação de células da linhagem AX4 de *D. discoideum*. Os clones transfectantes resistentes à blasticidina foram plaqueados em associação com *K. aerogenes* e após crescimento das colônias uma amostra de alguns clones foi coletada, as células lisadas em tampão de lise e uma alíquota do lisado celular foi analisada por PCR (PCR de colônia). Cada clone mutante foi identificado por 1 letra seguida de 1 número.

A Figura 23 mostra a PCR do extrato celular da linhagem selvagem AX4 e de 5 mutantes obtidos, utilizando 2 pares de oligonucleotídeos diferentes – DDB_G0292194 Δ FHAF/BEC_2 (Par 1) e BEC_965S/ BEC_2 (Par 2) (Figura 23A). O Par 1 só permite a amplificação de um fragmento de 1093 pb do gene DDB_G0292194 intacto, ou seja, que não foi interrompido pelo BsR como pode ser observado na amostra selvagem (Figura 23B, canaleta 3). Já o Par 2 amplifica um fragmento de 716 pb do gene que está presente tanto na amostra selvagem como nas mutantes (Figura 23C). Com relação aos mutantes, parece ter ocorrido a recombinação homóloga em três dos cinco analisados, pois não apresentaram uma banda de aproximadamente 1.1 kpb com o Par 1 de oligonucleotídeos.

Figura 23. Análise da obtenção de clones nocautes para o DDB_G0292194 por PCR. (A) Diagrama ilustrativo mostrando as posições dos oligonucleotídeos DDB_G0292194 Δ FHAF(1), BEC_965S (2) e BEC_2 (3) desenhados para amplificação de um fragmento de 1.093 pb do gene DDB_G0292194 selvagem e de 716 pb do gene selvagem ou recombinate interrompido pelo BsR (caixa cinza). (B) Produtos de PCR amplificados pelos oligonucleotídeos 1 e 3 do lisado celular da linhagem selvagem (canaleta 3) e de linhagens resistentes a blasticidina (canaletas 4 a 8). A banda de aproximadamente 1.1 kpb era esperada para amostra selvagem. (C) Produtos de PCR amplificados pelo oligonucleotídeos 2 e 3 do lisado celular da linhagem selvagem (canaleta 3) e de linhagens resistentes a blasticidina (canaletas 4 a 8). A banda de aproximadamente 700 pb era esperada para todas as amostras. O marcador de tamanho (1 kpb ladder, Invitrogen) pode ser observado na primeira canaleta. A canaleta 2 corresponde ao controle negativo da reação (desprovida de molde de DNA). As figuras B e C mostram fotos de géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

A fim de confirmar os resultados de PCR com as linhagens nocautes foram realizadas novas PCRs de colônia com mais 2 pares de oligonucleotídeos diferentes, BECBsRF_1/BECBsRR_1 e BECBsRF_2/BECBsRR_2, que anelam no gene *DDB_G0292194* e amplificam a região de inserção do BsR nos mutantes, resultando em uma banda de menor tamanho na amostra selvagem (778 pb ou 990 pb) em comparação com as amostras mutantes (aproximadamente 1.5 kpb ou 1.7 kpb). Como pode ser observado na Figura 24, dois clones escolhidos confirmaram a ocorrência da recombinação homóloga com os novos pares de oligonucleotídeos. Outros 2 mutantes obtidos de um segundo experimento independente de transformação (réplica biológica da transformação e recombinação homóloga) mostraram o mesmo padrão de bandas esperado para os nocautes de *DDB_G0292194* (Figura 24 D e E).

Figura 24. Análise da obtenção de clones nocautes para o DDB_G0292194 por PCR. (A) Produtos de PCR amplificados pelos oligonucleotídeos DDB_G0292194semFHAF/BEC_2 do lisado celular da linhagem selvagem (canaleta 2) e de linhagens resistentes a blasticidina (canaletas 3 e 4). A banda de aproximadamente 1.1 kpb era esperada para amostra selvagem. Bandas inespecíficas são observadas para as amostras mutantes. (B) Produtos de PCR amplificados pelo oligonucleotídeos BECBsRF_1/BECBsRR_1 do lisado celular da linhagem selvagem (canaleta 2) e de linhagens resistentes a blasticidina (canaletas 3 e 4). A banda de 778 pb era esperada para amostra selvagem e de aproximadamente 1.5 kpb para as amostras mutantes. (C) Produtos de PCR amplificados pelo oligonucleotídeos BECBsRF_2/BECBsRR_2 do lisado celular da linhagem selvagem (canaleta 2) e de linhagens resistentes a blasticidina (canaletas 3 e 4). A banda de 990 pb era esperada para amostra selvagem e de aproximadamente 1.7 kpb para as amostras mutantes. Em D e E estão mostradas as análises realizadas com 2 clones nocautes obtidos de uma transformação independente. (D) Produtos de PCR amplificados pelos oligonucleotídeos BEC_965S/BEC_2 do lisado celular da linhagem selvagem (canaleta 2) e de linhagens resistentes a blasticidina (canaletas 3 e 4). A banda de aproximadamente 716 pb era esperada para todas as amostras. (E) Análise idêntica a descrita em (C). O marcador de tamanho (1 kpb ladder, Invitrogen ou 1 kpb Fast Gene Ruler ladder, Fermentas) pode ser observado na primeira canaleta. A canaleta Br corresponde ao controle negativo da reação (desprovida de molde de DNA). As figuras mostram fotos de géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

Para confirmação da obtenção da linhagem nocaute para o gene *DDB_G0292194*, foi verificado o nível de expressão gênica do *DDB_G0292194* no mutante e no selvagem através de um experimento de RT-PCR semiquantitativa. O RNA total de um clone mutante e da linhagem selvagem foi extraído e utilizado para síntese de cDNA. O cDNA de cada amostra foi utilizado nas reações de RT-PCR semiquantitativa. A ausência de expressão do mRNA para *DDB_G0292194* de um dos mutantes e sua presença na linhagem selvagem pode ser verificada na Figura 25 que mostra a amplificação de uma banda de 143 pb referente a uma região do mRNA *DDB_G0292194* na amostra selvagem (WT 1) e que na amostra mutante não aparece (Mutante 1). A banda de 97 pb correspondente a amplificação de uma região do mRNA H3a (controle positivo) é evidente para as duas amostras (WT 2 e Mutante 2).

Figura 25. Análise da expressão do DDB_G0292194 na linhagem selvagem e mutante por RT-PCR semiquantitativa. O RNA total de células da linhagem selvagem e mutante extraído com Trizol foi utilizado como molde para síntese da primeira fita de cDNA, seguindo-se amplificação por PCR pelo número de ciclos indicados com o pares de oligonucleotídeos BecRT-PCR_F/BecRT-PCR_R (A) e H3aF/H3aR (B). A banda de 143 pb referente a região 3' terminal do cDNA do DDB_G0292194 era esperada para linhagem selvagem mas não no mutante, enquanto que a banda de 97 pb referente a região 3' terminal do cDNA do H3a (controle positivo) era esperada para ambas as amostras. O marcador de tamanho (100 pb ladder, Invitrogen) pode ser observado na primeira canaleta. A canaleta Br corresponde ao controle negativo da reação (desprovida de molde de DNA).

Utilizando o *Southern blot* como experimento complementar confirmatório da obtenção da linhagem mutante, observamos um padrão diferencial de bandas geradas quando o DNA genômico da linhagem selvagem e de duas linhagens mutantes foi digerido com a enzima de restrição *NdeI* (Figura 26).

Figura 26. Análise do DNA genômico da linhagem selvagem e mutante para DDB_G0292194 por Southern blot. (A) Esquema da posição relativa da *NdeI* encontrada no gene DDB_G0292194, do local aproximado de inserção do BsR na linhagem mutante e do fragmento de DNA gerado por PCR utilizado como molde para síntese da sonda radioativa. (B) O DNA total de células vegetativas da linhagem selvagem (WT) ou mutante (M1 e M2) de AX4 foi purificado e submetido a digestão com as enzimas de restrição *EcoRV* e *NdeI* para subsequente hibridização com sonda radioativa derivada de um fragmento de 716 pb do DDB_G0292194.

4.3.4. Caracterização morfológica do mutante $\Delta DDB_G0292194$

A fim de determinar a morfologia geral do mutante $\Delta DDB_G0292194$ em comparação com a linhagem selvagem AX4 foram feitas imagens das células durante o crescimento e nas diferentes fases de desenvolvimento. A Figura 27 mostra que as células mutantes possuem uma tendência a formar agregados disformes durante o crescimento em meio líquido. Imagens realizadas em microscópio de fluorescência e confocal utilizando células fixadas e coradas com DAPI, que marca núcleo, e Faloidina, que marca filamentos de actina, sugerem que as células mutantes apresentam um citoesqueleto mais desestruturado quando comparado com o selvagem (Figura 28).

Um dos clones mutante foi escolhido para dar prosseguimento à caracterização. As fases de desenvolvimento das linhagens selvagem (AX4) e mutante (D4) foram monitoradas em placas de KK2 ou em filtros de nitrocelulose e os fenótipos comparados como pode ser observado na Figura 29. As células selvagens agregam em 8-10 h sendo o mesmo fenótipo observado para o mutante. A formação do corpo de frutificação é completada em 24 h nas células selvagens. Neste ponto observa-se uma estrutura aberrante e atrasada do mutante com relação ao selvagem, no entanto, após algumas horas esta estrutura dá lugar a corpos de frutificação aparentemente normais misturados a talos muito compridos frequentemente desprovidos de cápsula de esporos. Os esporos eventualmente produzidos pela linhagem mutante não apresentam viabilidade comprometida já que se verifica crescimento em placas de SM em associação com *K. aerogenes* a partir deles.

Estes resultados indicam que o nocaute de *DDB_G0292194* não compromete a viabilidade das células ou esporos, mas é importante para a morfologia das células durante a fase de crescimento e para o desenvolvimento completamente normal durante carenciamento.

Figura 27. Morfologia de células vegetativas da linhagem selvagem (AX4) e mutante Δ DDB_G0292194 (clone D4). As células foram crescidas em meio axênico e visualizadas por microscopia com contraste de fase em diferentes magnitudes. A barra branca representa 10 μ m.

A **B**

128

Figura 28. Microscopia de fluorescência de células de linhagem selvagem e do mutante $\Delta DDB_G0292194$. As células das linhagens selvagem (WT) e do nocaute $\Delta DDB_G0292194$ (mutante) foram fixadas com formaldeído e coradas com DAPI e Faloidina acoplada a fluoresceína para visualização do núcleo (azul) e citoesqueleto (vermelho ou verde), respectivamente, em microscópio confocal (A) ou em microscopia de fluorescência (B). As setas em (B) indicam as células com morfologia amorfa após a fixação. A barra branca em (B) representa 10 μm.

Figura 29. Morfologia das linhagens selvagem (AX4) e mutante (D4) durante dois estágios do desenvolvimento. A linhagem selvagem e o mutante Δ DDB_G0292194 foram submetidos a carência nutricional em placa de KK2 e mantidos a 22°C em câmara úmida no escuro. O período de formação dos agregados (A) e os corpos de frutificação (B a D) foram fotografados respectivamente em torno de 8 h e 24 h. O talo alongado observado em (D) é frequente no mutante.

4.3.5 Análise do papel de DDB_G0292194 na resposta a estresses

Com o objetivo de investigar as prováveis vias que *DDB_G0292194* possa estar envolvido, foram realizadas curvas de crescimento de células da linhagem selvagem (AX4) e mutante (D4) de *D. discoideum* crescidas na fase exponencial em meio de cultura axênico submetidas a tratamentos que causam estresse térmico (27°C ou 30°C), osmótico (200 mM ou 400 mM de sorbitol) e oxidativo (0,5 mM ou 1 mM de H₂O₂). A Figura 30 mostra que as curvas de crescimento de AX4 e D4 a 22°C são similares, assim como é observado quando as células são submetidas aos estresses térmico e osmótico. Interessantemente, comparada com a linhagem selvagem, a linhagem D4 é mais sensível ao estresse oxidativo causado pela adição de 1mM de peróxido de hidrogênio.

O perfil de crescimento das células submetidas somente a 5 h de estresse e em seguida retornadas às condições ótimas de crescimento após lavagem do agente estressante e incubação a 22°C, foi avaliado e observou-se que as células AX4 recuperam o crescimento após todos os estresses testados (Figura 31). O mutante D4 retoma o crescimento após estresse térmico e osmótico, mas não após estresse oxidativo com 1 mM de H₂O₂.

Figura 30. Curvas de crescimento da linhagem selvagem AX4 e mutante D4 em condições de estresse. Células da linhagem Ax4 e D4 (mutante $\Delta DDB_G0292194$) foram diluídas a 5×10^5 células/mL em meio HL-5 e incubadas sob agitação. (A) O efeito do estresse térmico foi avaliado pela incubação das culturas a 22°C (controle), 27°C ou 30°C. (B) O estresse hiperosmótico foi realizado pela adição de sorbitol 200 mM ou 400 mM às culturas mantidas a 22°C. (C) O estresse oxidativo foi realizado pela adição de H_2O_2 0,5 mM ou 1 mM às culturas mantidas a 22°C. Células controle não receberam adição dos agentes estressantes. Nos tempos indicados, alíquotas de células foram coletadas para contagem em duplicata na câmara de Neubauer. A razão (R) indica o número de células no tempo indicado dividido pelo número inicial de células. Os gráficos foram construídos a partir de três experimentos independentes.

Figura 31. Avaliação da recuperação do crescimento da linhagem selvagem AX4 e mutante D4 após condições de estresse. Células da linhagem Ax4 e D4 (mutante Δ DDB_G0292194) foram diluídas a 5×10^5 células/mL em meio HL-5 e incubadas sob agitação e submetidas ao estresse por 5 h sendo em seguida lavadas uma vez com HL-5 e suspensas em meio de cultura fresco. (A) O efeito do estresse térmico foi avaliado pela incubação das culturas a 22°C (controle), 27°C ou 30°C. (B) O estresse hiper-osmótico foi realizado pela adição de sorbitol 200 mM ou 400 mM às culturas mantidas a 22°C. (C) O estresse oxidativo foi realizado pela adição de H₂O₂ 0,5 mM ou 1 mM às culturas mantidas a 22°C. Aliquotas de células foram coletadas para contagem em duplicata na câmara de Neubauer nos tempos indicados. A razão (R) indica o número de células no tempo determinado dividido pelo número de células inicial. Os gráficos foram construídos a partir de três experimentos independentes.

Para confirmar os resultados observados pelas curvas de crescimento, a viabilidade das células selvagem e mutante foi verificada após crescimento por 2 h, 4 h e 24 h nas condições de estresse já descritas. Para isso, após os tratamentos nos tempos determinados as células foram plaqueadas em placas de SM em associação com bactérias *K. aerogenes* e as colônias formadas foram contadas. O percentual de sobrevivência em comparação às células não tratadas foi determinado. A figura 32 mostra que em 2 h e 4 h de estresse já há uma queda na viabilidade das células selvagem e mutante variando de 20 a 60%. Os estresses causados por 1 mM de H₂O₂ e 0.4 M de Sorbitol são os que mais afetaram a viabilidade nestes tempos. Como esperado, em 24 h ambas as linhagens são sensíveis a 400 mM de Sorbitol e à incubação a 30°C, apresentando menos de 20% de sobrevivência nestas condições. Com relação ao estresse oxidativo o mutante se mostra aproximadamente 5x mais sensível a 1 mM de peróxido de hidrogênio do que o selvagem, indicando que a inibição do crescimento observado nas primeiras 24 h frente a este estresse se deve à morte da maior parte das células e não à uma parada da divisão celular.

Figura 32. Viabilidade das linhagens selvagem e mutante frente a diferentes condições de estresse. Células em crescimento exponencial da linhagem selvagem (WT) e Δ DDB_G0292194 (mutante D4) foram incubadas com H₂O₂ ou sorbitol nas concentrações indicadas a 22° C. O estresse térmico foi realizado pela incubação das culturas a 27° C ou 30° C. Após 2 h, 4 h ou 24 h aproximadamente 200 células foram plaqueadas em associação com *K. aerogenes* até a formação de colônias para contagem. A porcentagem de sobrevivência é relativa ao controle não tratado. Este resultado representa a média de pelo menos 3 experimentos independentes.

Diante da maior sensibilidade do mutante ao estresse oxidativo, resolvemos verificar a possibilidade de envolvimento de *DDB_G0292194* com a via de reparo do DNA em resposta a quebra da dupla fita. Para tanto, a quebra da dupla fita de DNA foi induzida por tratamento das células da linhagem selvagem e mutante com bleomicina ou irradiação gama. A figura 33 mostra os gráficos com o percentual de sobrevivência das células tratadas em comparação com as não tratadas, indicando que a linhagem selvagem e a mutante possuem uma mesma sensibilidade aos agentes que causam dano ao DNA. Este resultado sugere que *DDB_G0292194* não deva participar da via que repara a quebra da dupla fita de DNA, ou a célula dispõe de vias alternativas que compensem a ausência deste gene.

A

B

Figura 33. Viabilidade das linhagens selvagem e mutante após tratamento com bleomicina e irradiação gama. Células em crescimento exponencial da linhagem selvagem (WT) e mutante nulo para DDB_G0292194 foram incubadas com concentrações crescentes de bleomicina (Sigma) por 16 h (A) ou irradiadas com diferentes doses de irradiação gama Co^{65} (B). Após os tratamentos aproximadamente 200 células foram plaqueadas em associação com *K. aerogenes* até a formação de colônias para contagem. A porcentagem de sobrevivência é relativa ao controle não tratado. Este resultado representa a média de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

5. Considerações Finais

As análises do perfil de expressão dos genes relacionados às PPPs em *D. discoideum* demonstraram que durante o estresse hiper-osmótico e no desenvolvimento há uma repressão da maioria dos genes analisados enquanto que se observa uma maior indução em resposta ao estresse térmico. A expressão gênica das subunidades catalíticas e dos candidatos a subunidades reguladoras é modulada diferentemente de acordo com a condição estudada (estresse térmico, estresse osmótico e desenvolvimento), indicando uma implicação das PPPs na resposta a estresses.

Os genes que codificam proteínas que interagem com a DdPP1c, DdI-2, DdI-3 e *DDB_G0292194*, tiveram uma indução gênica relevante em pelo menos uma de todas as condições analisadas. Sendo que, *DDB_G0292194* se destacou por ter seus níveis de expressão elevados mediante todos os tratamentos. Os níveis proteicos de DdI-2 e DdI-3, no entanto, foram detectados sem maiores variações nos extratos de *D. discoideum*, indicando a expressão e reciclagem destas proteínas ao longo dos tratamentos.

A ORF hipotética *DDB_G0292194*, que codifica uma provável proteína nuclear contendo um domínio FHA aminoterminal localizado entre duas regiões ricas em asparagina e uma sequência candidata a domínio RVxF de ligação à PP1c na região central, interage com a DdPP1c em ensaios de duplo-híbrido em levedura independentemente do domínio FHA.

A presença do domínio FHA é comumente relacionada com proteínas que participam de vias em resposta a estresse e/ou controle do ciclo celular tais como Chk2, Rad53, Dun1 e Cep170 (Durocher *et al.*, 2000; Huang e Elledge, 2000; Guarguaglini *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Smolka *et al.*, 2006). A Cep170 apresenta um domínio FHA na região aminoterminal e interage com a Plk1, sendo expressa durante todo o ciclo celular de células de mamíferos. O estudo de mutantes nocautes por RNAi e superexpressando Cep170 sugerem sua

participação na organização dos microtúbulos e morfologia celular (Guarguaglini *et al.*, 2005).

Verificamos que o mutante nocaute de DDB_G0292194 apresenta uma morfologia alterada em condições padrões de cultivo, tanto na fase de crescimento como durante o desenvolvimento, além de uma maior sensibilidade ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio quando comparado à linhagem selvagem, sugerindo uma possível correlação deste gene com controle do ciclo celular.

A fim de verificarmos se DDB_G0292194 poderia estar relacionada com a via de reparo em resposta a quebra da dupla fita de DNA tratamos a linhagem mutante e a selvagem com bleomicina e irradiação gama, no entanto, não observamos diferença de sensibilidade entre as linhagens. Embora este resultado sugira que DDB_G0292194 não seja essencial ou não participe nesta via de reparo ao DNA, de maneira muito similar ao observado em nosso trabalho, os mutantes nocautes das proteínas Ku80 e DNA-PKcs envolvidas em vias de reparo de DNA em *D. discoideum* apresentam crescimento e culminação aberrante, mas nenhum defeito óbvio, e não apresentam sensibilidade aumentada à bleomicina durante o crescimento quando comparado ao controle selvagem (Hudson *et al.*, 2005). Além disso, as células de *D. discoideum* são especialmente resistentes à luz UV, radiação-γ e produtos químicos que causam dano ao DNA, mas a base desta resistência ainda não é bem compreendida (Deering, 1988; Yu *et al.*, 1998).

Desta forma, demonstramos evidências da participação e importância das PPPs em resposta a diferentes tipos de estresse e para o crescimento e desenvolvimento apropriado de *D. discoideum*. A caracterização inicial do gene DDB_G0292194 de função desconhecida sugere que sua associação com as vias de reparo do DNA/ciclo celular juntamente com a PP1, embora outros experimentos sejam necessários para confirmação desta hipótese e da interação *in vivo* entre DDB_G0292194 e DdPP1c.

6. Referências Bibliográficas

1. **Aggen, J. B., Nairn, A. C. e Chamberlin, R.** 2000. Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol* 7:R13-23.
2. **Alessi, D. R., Street, A. J., Cohen, P. e Cohen, P. T.** 1993. Inhibitor-2 functions like a chaperone to fold three expressed isoforms of mammalian protein phosphatase-1 into a conformation with the specificity and regulatory properties of the native enzyme. *Eur J Biochem* 213:1055-66.
3. **Ali, A., Zhang, J., Bao, S., Liu, I., Otterness, D., Dean, N. M., Abraham, R. T. e Wang, X. F.** 2004. Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes Dev* 18:249-54.
4. **Andreeva, A. V. e Kutuzov, M. A.** 2001. Nuclear localization of the plant protein Ser/Thr phosphatase PP7. *Mol Cell Biol Res Commun* 4:345-52.
5. **Andrioli, L. P., Souza, G. M. e da Silva, A. M.** 2007. Staurosporine induces tyrosine phosphorylation in *Dictyostelium discoideum* proteins. *Cell Biochemistry and Function* 25:555-561.
6. **Andrioli, L. P., Zaini, P. A., Viviani, W. e Da Silva, A. M.** 2003. *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase-1 catalytic subunit exhibits distinct biochemical properties. *Biochem J* 373:703-11.
7. **Anjard, C.** 2005. Multigene families of *Dictyostelium*, p. 59-82. In W. F. Loomis e A. Kuspa (ed.), *Dictyostelium Genomics*. Horizon Bioscience, Norfolk.
8. **Anjard, C. e Loomis, W. F.** 2002. Histidine kinases of *Dictyostelium*, p. 421-438. In R. D. A. M. Inouye (ed.), *Histidine Kinases in Signal Transduction*. Academy Press, San Diego.
9. **Annesley, S. J. e Fisher, P. R.** 2009. *Dictyostelium discoideum*-a model for many reasons. *Molecular and Cellular Biochemistry* 329:73-91.
10. **Araki, T., Tsujioka, M., Abe, T., Fukuzawa, M., Meima, M., Schaap, P., Morio, T., Urushihara, H., Katoh, M., Maeda, M., Tanaka, Y., Takeuchi, I. e Williams, J. G.** 2003. A STAT-regulated, stress-induced signalling pathway in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 116:2907-15.
11. **Arroyo, J. D. e Hahn, W. C.** 2005. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene* 24:7746-55.
12. **Aubry, L. e Firtel, R.** 1999. Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:469-517.
13. **Aubry, L. e Firtel, R. A.** 1998. Spalten, a protein containing Galpha-protein-like and PP2C domains, is essential for cell-type differentiation in *Dictyostelium*. *Genes Dev* 12:1525-38.
14. **Bahl, R., Bradley, K. C., Thompson, K. J., Swain, R. A., Rossie, S. e Meisel, R. L.** 2001. Localization of protein Ser/Thr phosphatase 5 in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 90:101-9.
15. **Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I. e Doolittle, W. F.** 2000. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 290:972-7.
16. **Barford, D.** 1996. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* 21:407-12.
17. **Barford, D., Das, A. K. e Egloff, M. P.** 1998. The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and

- regulation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 27:133-164.
18. **Barford, D. e Keller, J. C.** 1994. Co-crystallization of the catalytic subunit of the serine/threonine specific protein phosphatase 1 from human in complex with microcystin LR. *J Mol Biol* 235:763-6.
 19. **Barton, G. J., Cohen, P. T. e Barford, D.** 1994. Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur J Biochem* 220:225-37.
 20. **Bastians, H. e Ponstingl, H.** 1996. The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J Cell Sci* 109 (Pt 12):2865-74.
 21. **Becker, W., Kentrup, H., Klumpp, S., Schultz, J. E. e Joost, H. G.** 1994. Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain. *J Biol Chem* 269:22586-92.
 22. **Bertram, P. G., Choi, J. H., Carvalho, J., Ai, W., Zeng, C., Chan, T. F. e Zheng, X. F.** 2000. Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *J Biol Chem* 275:35727-33.
 23. **Beullens, M. e Bollen, M.** 2002. The protein phosphatase-1 regulator NIPP1 is also a splicing factor involved in a late step of spliceosome assembly. *J Biol Chem* 277:19855-60.
 24. **Bharucha, J. P., Larson, J. R., Gao, L., Daves, L. K. e Tatchell, K.** 2008. Ypi1, a positive regulator of nuclear protein phosphatase type 1 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 19:1032-1045.
 25. **Boeckeler, K., Tischendorf, G., Mutzel, R. e Weissenmayer, B.** 2006. Aberrant stalk development and breakdown of tip dominance in *Dictyostelium* cell lines with RNAi-silenced expression of calcineurin B. *BMC Dev Biol* 6:12.
 26. **Bohr, V. A. e Dianov, G. L.** 1999. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 81:155-60.
 27. **Bollen, M.** 2001. Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci* 26:426-31.
 28. **Bollen, M., Gerlich, D. W. e Lesage, B.** 2009. Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. *Trends in Cell Biology* 19:531-541.
 29. **Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M. J. e Beullens, M.** 2010. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends in Biochemical Sciences* 35:450-458.
 30. **Bosgraaf, L., Russcher, H., Smith, J. L., Wessels, D., Soll, D. R. e Van Haastert, P. J.** 2002. A novel cGMP signalling pathway mediating myosin phosphorylation and chemotaxis in *Dictyostelium*. *EMBO J* 21:4560-70.
 31. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
 32. **Brautigan, D. L., Sunwoo, J., Labbe, J. C., Fernandez, A. e Lamb, N. J.** 1990. Cell cycle oscillation of phosphatase inhibitor-2 in rat fibroblasts coincident with p34cdc2 restriction. *Nature* 344:74-8.
 33. **Bromberg, J. e Darnell, J. E.** 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19:2468-2473.

34. **Brown, G. P., Blitzner, R. D., Connor, J. H., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R. e Landau, E. M.** 2000a. Long-term potentiation induced by theta frequency stimulation is regulated by a protein phosphatase-1-operated gate. *J Neurosci* 20:7880-7.
35. **Brown, L., Borthwick, E. B. e Cohen, P. T.** 2000b. Drosophila protein phosphatase 5 is encoded by a single gene that is most highly expressed during embryonic development. *Biochim Biophys Acta* 1492:470-6.
36. **Burdine, V. e Clarke, M.** 1995. Genetic and physiologic modulation of the prestarvation response in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 6:311-25.
37. **Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J. P., Ravanat, J. L. e Sauvaigo, S.** 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424:9-21.
38. **Calderwood, S. K.** 2010. Heat shock proteins in breast cancer progression--a suitable case for treatment? *Int J Hyperthermia* 26:681-5.
39. **Campos, M., Fadden, P., Alms, G., Qian, Z. e Haystead, T. A.** 1996. Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography. *J Biol Chem* 271:28478-84.
40. **Carnegie, G. K., Sleeman, J. E., Morrice, N., Hastie, C. J., Pegg, M. W., Philp, A., Lamond, A. I. e Cohen, P. T.** 2003. Protein phosphatase 4 interacts with the Survival of Motor Neurons complex and enhances the temporal localisation of snRNPs. *J Cell Sci* 116:1905-13.
41. **Cayla, X., Van Hoof, C., Bosch, M., Waelkens, E., Vandekerckhove, J., Peeters, B., Merlevede, W. e Goris, J.** 1994. Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, a protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 269:15668-75.
42. **Ceulemans, H. e Bollen, M.** 2004. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84:1-39.
43. **Ceulemans, H. e Bollen, M.** 2006. A tighter RVxF motif makes a finer Sift. *Chem Biol* 13:6-8.
44. **Chen, J., Parsons, S. e Brautigan, D. L.** 1994a. Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 269:7957-62.
45. **Chen, J., Peterson, R. T. e Schreiber, S. L.** 1998. Alpha 4 associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6. *Biochem Biophys Res Commun* 247:827-32.
46. **Chen, M. S., Silverstein, A. M., Pratt, W. B. e Chinkers, M.** 1996. The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *J Biol Chem* 271:32315-20.
47. **Chen, M. X. e Cohen, P. T.** 1997. Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. *FEBS Lett* 400:136-40.
48. **Chen, M. X., McPartlin, A. E., Brown, L., Chen, Y. H., Barker, H. M. e Cohen, P. T.** 1994b. A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *Embo J* 13:4278-90.

49. **Chen, S. H., Smolka, M. B. e Zhou, H. L.** 2006. FHA domain mediated protein interaction network of Dun1 identifies its novel functions in the DNA damage response. *Faseb Journal* 20:A509-A509.
50. **Chinkers, M.** 2001. Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol Metab* 12:28-32.
51. **Chisholm, R. L. e Firtel, R. A.** 2004. Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:531-41.
52. **Cho, D. H., Choi, Y. J., Jo, S. A., Ryou, J., Kim, J. Y., Chung, J. e Jo, I.** 2006. Troglitazone acutely inhibits protein synthesis in endothelial cells via a novel mechanism involving protein phosphatase 2A-dependent p70 S6 kinase inhibition. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 291:C317-C326.
53. **Chowdhury, D., Keogh, M. C., Ishii, H., Peterson, C. L., Buratowski, S. e Lieberman, J.** 2005. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular Cell* 20:801-809.
54. **Chowdhury, D., Xu, X. Z., Zhong, X. Y., Ahmed, F., Zhong, J. N., Liao, J., Dykxhoorn, D. M., Weinstock, D. M., Pfeifer, G. P. e Lieberman, J.** 2008. A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Molecular Cell* 31:33-46.
55. **Clotet, J., Gari, E., Aldea, M. e Arino, J.** 1999. The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 19:2408-15.
56. **Cohen, P., Klumpp, S. e Schelling, D. L.** 1989. An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett* 250:596-600.
57. **Cohen, P. T.** 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* 22:245-51.
58. **Cohen, P. T.** 2002. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115:241-56.
59. **Cohen, P. T., Chen, M. X. e Armstrong, C. G.** 1996. Novel protein phosphatases that may participate in cell signaling. *Adv Pharmacol* 36:67-89.
60. **Cohen, P. T., Philp, A. e Vazquez-Martin, C.** 2005. Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions. *FEBS Lett* 579:3278-86.
61. **Cohen, P. T. W.** 2004. Overview of protein serine/threonine phosphatases, *Protein Phosphatases*, vol. 5.
62. **Dammann, H., Hellstern, S., Husain, Q. e Mutzel, R.** 1996. Primary structure, expression and developmental regulation of a Dictyostelium calcineurin A homologue. *Eur J Biochem* 238:391-9.
63. **Dancheck, B., Naim, A. C. e Peti, W.** 2008. Detailed Structural Characterization of Unbound Protein Phosphatase 1 Inhibitors. *Biochemistry* 47:12346-12356.
64. **Darnell, J. E., Jr.** 1997. Phosphotyrosine signaling and the single cell:metazoan boundary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11767-9.
65. **Darnell, J. E., Jr., Lodish, H. e Baltimore, D.** 1990. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Inc., New York.
66. **Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T. e Barford, D.** 1996. Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *Embo J* 15:6798-809.

67. **Das, J. B., Joshi, I. D. e Philippart, A. I.** 1980. Depression of glucose utilization by Intralipid in the post-traumatic period: an experimental study. *J Pediatr Surg* 15:739-45.
68. **de la Fuente van Bentem, S., Vossen, J. H., Vermeer, J. E., de Vroomen, M. J., Gadella, T. W., Jr., Haring, M. A. e Cornelissen, B. J.** 2003. The subcellular localization of plant protein phosphatase 5 isoforms is determined by alternative splicing. *Plant Physiol* 133:702-12.
69. **de Maria, A. C., Moerman, A., Klein, C. e Gomes, S. L.** 1997. Cloning, structural analysis and expression of the gene encoding Hsp32 from *Dictyostelium discoideum*. *Gene* 193:173-180.
70. **Deering, R. A.** 1988. DNA repair in *Dictyostelium*. *Dev Genet* 9:483-93.
71. **Devreotes, P.** 1989a. Cell-Cell Interactions in *Dictyostelium* Development. *Trends in Genetics* 5:242-245.
72. **Devreotes, P.** 1989b. *Dictyostelium discoideum*: a model system for cell-cell interactions in development. *Science* 245:1054-8.
73. **Di Como, C. J. e Arndt, K. T.** 1996. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev* 10:1904-16.
74. **Dombradi, V., Axton, J. M., Barker, H. M. e Cohen, P. T.** 1990a. Protein phosphatase 1 activity in *Drosophila* mutants with abnormalities in mitosis and chromosome condensation. *FEBS Lett* 275:39-43.
75. **Dombradi, V., Axton, J. M., Brewis, N. D., da Cruz e Silva, E. F., Alphey, L. e Cohen, P. T.** 1990b. *Drosophila* contains three genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1. *Eur J Biochem* 194:739-45.
76. **Durocher, D. e Jackson, S. P.** 2002. The FHA domain. *FEBS Lett* 513:58-66.
77. **Durocher, D., Taylor, I. A., Sarbassova, D., Haire, L. F., Westcott, S. L., Jackson, S. P., Smerdon, S. J. e Yaffe, M. B.** 2000. The molecular basis of FHA Domain : Phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Molecular Cell* 6:1169-1182.
78. **Duvel, K., Santhanam, A., Garrett, S., Schneper, L. e Broach, J. R.** 2003. Multiple roles of Tap42 in mediating rapamycin-induced transcriptional changes in yeast. *Mol Cell* 11:1467-78.
79. **Early, A., Gamper, M., Moniakis, J., Kim, E., Hunter, T., Williams, J. G. e Firtel, R. A.** 2001. Protein tyrosine phosphatase PTP1 negatively regulates *Dictyostelium* STATA and is required for proper cell-type proportioning. *Dev Biol* 232:233-45.
80. **Egelhoff, T. T., Titus, M. A., Manstein, D. J., Ruppel, K. M. e Spudich, J. A.** 1991. Molecular genetic tools for study of the cytoskeleton in *Dictyostelium*. *Methods Enzymol* 196:319-34.
81. **Egloff, M. P., Cohen, P. T., Reinemer, P. e Barford, D.** 1995. Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol* 254:942-59.
82. **Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T., Cohen, P. e Barford, D.** 1997. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J* 16:1876-87.
83. **Eichhorn, P. J., Creighton, M. P., Wilhelmsen, K., van Dam, H. e Bernards, R.** 2007. A RNA interference screen identifies the protein

- phosphatase 2A subunit PR55gamma as a stress-sensitive inhibitor of c-SRC. PLoS Genet 3:e218.
84. **Eichinger, L. e Noegel, A. A.** 2003. Crawling into a new era-the *Dictyostelium* genome project. EMBO J 22:1941-6.
 85. **Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glockner, G., Rajandream, M. A., Sucgang, R. et al.** 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. Nature 435:43-57.
 86. **Eichinger, L. e Rivero, F.** 2006. *Dictyostelium discoideum* Protocols (Methods in Molecular Biology), vol. 34th.
 87. **Endo, S., Zhou, X., Connor, J., Wang, B. e Shenolikar, S.** 1996. Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. Biochemistry 35:5220-8.
 88. **Favre, B., Zolnierowicz, S., Turowski, P. e Hemmings, B. A.** 1994. The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. J Biol Chem 269:16311-7.
 89. **Feng, Z. H., Wilson, S. E., Peng, Z. Y., Schlender, K. K., Reimann, E. M. e Trumbly, R. J.** 1991. The yeast GLC7 gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. J Biol Chem 266:23796-801.
 90. **Fields, S. e Song, O.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature 340:245-6.
 91. **Fields, S. e Sternglanz, R.** 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. Trends Genet 10:286-92.
 92. **Fiorini, L. C.** 2003. Identificação de genes codificadores de serina/treonina fosfatases em *Dictyostelium discoideum* e caracterização funcional da proteína fosfatase do tipo 4 (PP4). Departamento de Bioquímica, USP, São Paulo.
 93. **Firtel, R. A.** 1995. Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. Genes Dev 9:1427-44.
 94. **Francione, L., Smith, P. K., Accari, S. L., Taylor, P. E., Bokko, P. B., Bozzaro, S., Beech, P. L. e Fisher, P. R.** 2009. Legionella pneumophila multiplication is enhanced by chronic AMPK signalling in mitochondrially diseased *Dictyostelium* cells. Dis Model Mech 2:479-89.
 95. **Fukuzawa, M., Araki, T., Adrian, I. e Williams, J. G.** 2001. Tyrosine phosphorylation-independent nuclear translocation of a dictyostelium STAT in response to DIF signaling. Mol Cell 7:779-88.
 96. **Gallego, M. e Virshup, D. M.** 2005. Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. Curr Opin Cell Biol 17:197-202.
 97. **Gamper, M., Howard, P. K., Hunter, T. e Firtel, R. A.** 1996. Multiple roles of the novel protein tyrosine phosphatase PTP3 during *Dictyostelium* growth and development. Mol Cell Biol 16:2431-44.
 98. **Gamper, M., Kim, E., Howard, P. K., Ma, H., Hunter, T. e Firtel, R. A.** 1999. Regulation of *Dictyostelium* protein-tyrosine phosphatase-3 (PTP3) through osmotic shock and stress stimulation and identification of pp130 as a PTP3 substrate. J Biol Chem 274:12129-38.
 99. **Garcia-Gimeno, M. A., Munoz, I., Arino, J. e Sanz, P.** 2003. Molecular characterization of Ypil, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. J Biol Chem 278:47744-52.
 100. **Garcia, M. X., Foote, C., van Es, S., Devreotes, P. N., Alexander, S. e Alexander, H.** 2000. Differential developmental expression and cell type specificity of *Dictyostelium* catalases and their response to oxidative stress and UV-light. Biochim Biophys Acta 1492:295-310.

101. **Gauss, C. M., Sheppeck, J. E., 2nd, Nairn, A. C. e Chamberlin, R.** 1997. A molecular modeling analysis of the binding interactions between the okadaic acid class of natural product inhibitors and the Ser-Thr phosphatases, PP1 and PP2A. *Bioorg Med Chem* 5:1751-73.
102. **Gentry, M. S. e Hallberg, R. L.** 2002. Localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A subunits throughout mitotic cell cycle. *Mol Biol Cell* 13:3477-92.
103. **Gingras, A. C., Caballero, M., Zarske, M., Sanchez, A., Hazbun, T. R., Fields, S., Sonenberg, N., Hafen, E., Raught, B. e Aebersold, R.** 2005. A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics* 4:1725-40.
104. **Glockner, G., Eichinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J. A., Bankier, A. T., Dear, P. H., Lehmann, R., Baumgart, C., Parra, G., Abril, J. F., Guigo, R., Kumpf, K., Tunggal, B., Cox, E., Quail, M. A., Platzer, M., Rosenthal, A. e Noegel, A. A.** 2002. Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 418:79-85.
105. **Goldberg, J., Huang, H. B., Kwon, Y. G., Greengard, P., Nairn, A. C. e Kuriyan, J.** 1995. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376:745-53.
106. **Goldberg, J. M., Manning, G., Liu, A., Fey, P., Pilcher, K. E., Xu, Y. e Smith, J. L.** 2006. The *dictyostelium* kinome--analysis of the protein kinases from a simple model organism. *PLoS Genet* 2:e38.
107. **Golden, T., Aragon, L. V., Rutland, B., Tucker, J. A., Shevde, L. A., Samant, R. S., Zhou, G., Amable, L., Skarra, D. e Honkanen, R. E.** 2008a. Elevated levels of Ser/Thr protein phosphatase 5 (PP5) in human breast cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1782:259-270.
108. **Golden, T., Swingle, M. e Honkanen, R. E.** 2008b. The role of serine/threonine protein phosphatase type 5 (PP5) in the regulation of stress-induced signaling networks and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 27:169-178.
109. **Gonzalez-Kristeller, D. C.** 2007. Identificação e caracterização de subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases de *Dictyostelium discoideum*. Doutorado. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, IQUSP.
110. **Goshima, G., Iwasaki, O., Obuse, C. e Yanagida, M.** 2003. The role of Ppe1/PP6 phosphatase for equal chromosome segregation in fission yeast kinetochore. *Embo J* 22:2752-63.
111. **Goudreault, M., D'Ambrosio, L. M., Kean, M. J., Mullin, M. J., Larsen, B. G., Sanchez, A., Chaudhry, S., Chen, G. I., Sicheri, F., Nesvizhskii, A. I., Aebersold, R., Raught, B. e Gingras, A. C.** 2009. A PP2A Phosphatase High Density Interaction Network Identifies a Novel Striatin-interacting Phosphatase and Kinase Complex Linked to the Cerebral Cavernous Malformation 3 (CCM3) Protein. *Molecular & Cellular Proteomics* 8:157-171.
112. **Gross, J. D.** 1994. Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiol Rev* 58:330-51.
113. **Guarguaglini, G., Duncan, P. I., Stierhof, Y. D., Holmstrom, T., Duensing, S. e Nigg, E. A.** 2005. The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. *Mol Biol Cell* 16:1095-107.
114. **Guergnon, J., Derewenda, U., Edelson, J. R. e Brautigan, D. L.** 2009. Mapping of protein phosphatase-6 association with its SAPS domain

- regulatory subunit using a model of helical repeats. *Bmc Biochemistry* 10:-.
115. **Harlow, E. e Lane, D.** 1988. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 116. **Hastie, C. J., Borthwick, E. B., Morrison, L. F., Codd, G. A. e Cohen, P. T.** 2005. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. *Biochim Biophys Acta* 1726:187-93.
 117. **Hastie, C. J., Carnegie, G. K., Morrice, N. e Cohen, P. T.** 2000. A novel 50 kDa protein forms complexes with protein phosphatase 4 and is located at centrosomal microtubule organizing centres. *Biochem J* 347 Pt 3:845-55.
 118. **Hellstern, S., Dammann, H., Husain, Q. e Mutzel, R.** 1997. Overexpression, purification and characterization of *Dictyostelium* calcineurin A. *Res Microbiol* 148:335-43.
 119. **Helps, N. R., Brewis, N. D., Lineruth, K., Davis, T., Kaiser, K. e Cohen, P. T.** 1998. Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* 111 (Pt 10):1331-40.
 120. **Hinds, T. D. e Sanchez, E. R.** 2008. Protein phosphatase 5. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40:2358-2362.
 121. **Hong, Y. e Sarge, K. D.** 1999. Regulation of protein phosphatase 2A activity by heat shock transcription factor 2. *J Biol Chem* 274:12967-70.
 122. **Horn, F. e Gross, J.** 1996. A role for calcineurin in *Dictyostelium* discoideum development. *Differentiation* 60:269-275.
 123. **Howard, P. K., Gamper, M., Hunter, T. e Firtel, R. A.** 1994. Regulation by protein-tyrosine phosphatase PTP2 is distinct from that by PTP1 during *Dictyostelium* growth and development. *Mol Cell Biol* 14:5154-64.
 124. **Howard, P. K., Sefton, B. M. e Firtel, R. A.** 1992. Analysis of a spatially regulated phosphotyrosine phosphatase identifies tyrosine phosphorylation as a key regulatory pathway in *Dictyostelium*. *Cell* 71:637-47.
 125. **Howard, P. K., Sefton, B. M. e Firtel, R. A.** 1993. Tyrosine phosphorylation of actin in *Dictyostelium* associated with cell-shape changes. *Science* 259:241-4.
 126. **Hsu, D. W., Gaudet, P., Hudson, J. J., Pears, C. J. e Lakin, N. D.** 2006. DNA damage signaling and repair in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Cycle* 5:702-8.
 127. **Hu, M. C., Tang-Oxley, Q., Qiu, W. R., Wang, Y. P., Mihindukulasuriya, K. A., Afshar, R. e Tan, T. H.** 1998. Protein phosphatase X interacts with c-Rel and stimulates c-Rel/nuclear factor kappaB activity. *J Biol Chem* 273:33561-5.
 128. **Huang, F. L. e Glinsmann, W. H.** 1976. Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 70:419-26.
 129. **Huang, H. S. e Lee, E. Y. C.** 2008. Protein phosphatase-1 inhibitor-3 is an in vivo target of caspase-3 and participates in the apoptotic response. *Journal of Biological Chemistry* 283:18135-18146.
 130. **Huang, H. S., Pozarowski, P., Gao, Y., Darzynkiewicz, Z. e Lee, E. Y.** 2005. Protein phosphatase-1 inhibitor-3 is co-localized to the nucleoli and centrosomes with PP1gamma1 and PP1alpha, respectively. *Arch Biochem Biophys* 443:33-44.

131. **Huang, M. e Elledge, S. J.** 2000. The FHA domain, a phosphoamino acid binding domain involved in the DNA damage response pathway. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 65:413-421.
132. **Hubbard, M. J. e Cohen, P.** 1993. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 18:172-7.
133. **Hudson, J. J. R., Hsu, D. W., Guo, K., Zhukovskaya, N., Liu, P. H., Williams, J. G., Pears, C. J. e Lakin, N. D.** 2005. DNA-PKcs-dependent signaling of DNA damage in *Dictyostelium discoideum*. *Current Biology* 15:1880-1885.
134. **Hurley, T. D., Yang, J., Zhang, L., Goodwin, K. D., Zou, Q., Cortese, M., Dunker, A. K. e DePaoli-Roach, A. A.** 2007. Structural basis for regulation of protein phosphatase 1 by inhibitor-2. *J Biol Chem* 282:28874-83.
135. **Ingebritsen, T. S. e Cohen, P.** 1983. The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem* 132:255-61.
136. **Insall, R.** 2005. The *Dictyostelium* genome: the private life of a social model revealed? *Genome Biol* 6:222.
137. **Iranfar, N., Fuller, D. e Loomis, W. F.** 2003. Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell* 2:664-70.
138. **Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K. T., Schmelzle, T. e Hall, M. N.** 2001. TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Molecular Cell* 8:1017-1026.
139. **Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. e Buchner, J.** 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268:1517-20.
140. **Janssens, V. e Goris, J.** 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353:417-39.
141. **Janssens, V., Goris, J. e Van Hoof, C.** 2005. PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev* 15:34-41.
142. **Jeong, J. Y., Johns, J., Sinclair, C., Park, J. M. e Rossie, S.** 2003. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* protein Ser/Thr phosphatase T1 and comparison to its mammalian homolog PP5. *BMC Cell Biol* 4:3.
143. **Jungbluth, A., Eckerskorn, C., Gerisch, G., Lottspeich, F., Stocker, S. e Schweiger, A.** 1995. Stress-induced tyrosine phosphorylation of actin in *Dictyostelium* cells and localization of the phosphorylation site to tyrosine-53 adjacent to the DNase I binding loop. *FEBS Lett* 375:87-90.
144. **Kakinoki, Y., Somers, J. e Brautigan, D. L.** 1997. Multisite phosphorylation and the nuclear localization of phosphatase inhibitor 2-green fluorescent protein fusion protein during S phase of the cell growth cycle. *J Biol Chem* 272:32308-14.
145. **Kang, H., Sayner, S. L., Gross, K. L., Russell, L. C. e Chinkers, M.** 2001. Identification of amino acids in the tetratricopeptide repeat and C-terminal domains of protein phosphatase 5 involved in autoinhibition and lipid activation. *Biochemistry* 40:10485-90.
146. **Kang, R., Kae, H., Ip, H., Spiegelman, G. B. e Weeks, G.** 2002. Evidence for a role for the *Dictyostelium* Rap1 in cell viability and the response to osmotic stress. *J Cell Sci* 115:3675-82.

147. **Kantorow, M. e Piatigorsky, J.** 1994. Alpha-crystallin/small heat shock protein has autokinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3112-6.
148. **Karlin, S., Brocchieri, L., Bergman, A., Mrazek, J. e Gentles, A. J.** 2002a. Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:333-8.
149. **Karlin, S., Chen, C., Gentles, A. J. e Cleary, M.** 2002b. Associations between human disease genes and overlapping gene groups and multiple amino acid runs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17008-13.
150. **Katoh, M., Shaw, C., Xu, Q., Van Driessche, N., Morio, T., Kuwayama, H., Obara, S., Urushihara, H., Tanaka, Y. e Shaulsky, G.** 2004. An orderly retreat: Dedifferentiation is a regulated process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7005-10.
151. **Katti, M. V., Sami-Subbu, R., Ranjekar, P. K. e Gupta, V. S.** 2000. Amino acid repeat patterns in protein sequences: their diversity and structural-functional implications. *Protein Sci* 9:1203-9.
152. **Kay, R. R. e Williams, J. G.** 1999. The *Dictyostelium* genome project: an invitation to species hopping. *Trends Genet* 15:294-7.
153. **Keogh, M. C., Kim, J. A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J. C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., Lieberman, J., Shen, X., Buratowski, S., Haber, J. E., Durocher, D., Greenblatt, J. F. e Krogan, N. J.** 2006. A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* 439:497-501.
154. **Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D. W., Barsam, B., Veretnik, S. e Gribskov, M.** 2002. The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiol* 129:908-25.
155. **Kessin, R. H.** 2000. Evolutionary biology. Cooperation can be dangerous. *Nature* 408:917, 919.
156. **Kessin, R. H. e Campagne, M. v. L.** 1992. The development of a social amoeba. *American Scientist* 80:556-565.
157. **Kim, L., Liu, J. e Kimmel, A. R.** 1999. The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell* 99:399-408.
158. **Kimmel, A. R.** 2005. The *Dictyostelium* kinome: Protein kinase signaling pathways that regulate growth and development., p. 211-234. In W. F. Loomis eA. Kuspa (ed.), *Dictyostelium Genomics*. Horizon Bioscience, Norfolk.
159. **Kirchhefer, U., Baba, H. A., Boknik, P., Breeden, K. M., Mavila, N., Bruchert, N., Justus, I., Matus, M., Schmitz, W., Depaoli-Roach, A. A. e Neumann, J.** 2005. Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Res* 68:98-108.
160. **Kita, A., Matsunaga, S., Takai, A., Kataiwa, H., Wakimoto, T., Fusetani, N., Isobe, M. e Miki, K.** 2002. Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Structure (Camb)* 10:715-24.
161. **Kloeker, S. e Wadzinski, B. E.** 1999. Purification and identification of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase 4. *J Biol Chem* 274:5339-47.
162. **Knauf, U., Bielka, H. e Gaestel, M.** 1992. Over-expression of the small heat-shock protein, hsp25, inhibits growth of Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett* 309:297-302.

163. **Kong, M., Fox, C. J., Mu, J., Solt, L., Xu, A., Cinalli, R. M., Birnbaum, M. J., Lindsten, T. e Thompson, C. B.** 2004. The PP2A-associated protein alpha4 is an essential inhibitor of apoptosis. *Science* 306:695-8.
164. **Konijn, T. M., van de Meene, J. G. C., Bonner, J. T. e Barkley, D. S.** 1967. The acrasin activity of adenosine-3', 5'-cyclic phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 58:1152-1154.
165. **Kreppel, L., Fey, P., Gaudet, P., Just, E., Kibbe, W. A., Chisholm, R. L. e Kimmel, A. R.** 2004. dictyBase: a new *Dictyostelium discoideum* genome database. *Nucleic Acids Res* 32:D332-3.
166. **Kuspa, A., Sugang, R. e Shaulsky, G.** 2001. The promise of a protist: the Dictyostelium genome project. *Funct Integr Genomics* 1:279-93.
167. **Kuwayama, H., Ecke, M., Gerisch, G. e Van Haastert, P. J.** 1996. Protection against osmotic stress by cGMP-mediated myosin phosphorylation. *Science* 271:207-9.
168. **Laval, J.** 1996. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol Biol (Paris)* 44:14-24.
169. **Leach, C., Shenolikar, S. e Brautigan, D. L.** 2003. Phosphorylation of phosphatase inhibitor-2 at centrosomes during mitosis. *J Biol Chem* 278:26015-20.
170. **Lee, D. H., Pan, Y. F., Kanner, S., Sung, P., Borowiec, J. A. e Chowdhury, D.** 2010. A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* 17:365-U138.
171. **Lee, S. K., Yu, S. L., Alexander, H. e Alexander, S.** 1998. A mutation in repB, the dictyostelium homolog of the human xeroderma pigmentosum B gene, has increased sensitivity to UV-light but normal morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1399:161-72.
172. **Lesage, B., Beullens, M., Pedelini, L., Garcia-Gimeno, M. A., Waelkens, E., Sanz, P. e Bollen, M.** 2007. A complex of catalytically inactive protein phosphatase-1 sandwiched between Sds22 and inhibitor-3. *Biochemistry* 46:8909-19.
173. **Li, M., Satinover, D. L. e Brautigan, D. L.** 2007. Phosphorylation and functions of inhibitor-2 family of proteins. *Biochemistry* 46:2380-9.
174. **Li, X. e Virshup, D. M.** 2002. Two conserved domains in regulatory B subunits mediate binding to the A subunit of protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem* 269:546-52.
175. **Liang, X. e Van Doren, S. R.** 2008. Mechanistic insights into phosphoprotein-binding FHA domains. *Acc Chem Res* 41:991-9.
176. **Lin, Q., Buckler, E. S. t., Muse, S. V. e Walker, J. C.** 1999. Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases. *Mol Phylogenet Evol* 12:57-66.
177. **Linder, B., Jin, Z., Freedman, J. H. e Rubin, C. S.** 1996. Molecular characterization of a novel, developmentally regulated small embryonic chaperone from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 271:30158-66.
178. **Livak, K. J. e Schmittgen, T. D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8.
179. **Loomis, W. F.** 1993. Lateral inhibition and pattern formation in Dictyostelium. *Curr. Topics Dev. Biol.* 28:1-46.
180. **Loomis, W. F.** 1998. Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:684-94.
181. **Loomis, W. F. e Kuspa, A.** 2005. Dictyostelium Genomics. Horizon Bioscience, Norfolk.

182. **Loomis, W. F., Wheeler, S. e Schmidt, J. A.** 1982. Phosphorylation of the major heat shock protein of *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol* 2:484-9.
183. **Loomis, W. F. e Wheeler, S. A.** 1982. Chromatin-associated heat shock proteins of *Dictyostelium*. *Dev Biol* 90:412-8.
184. **Luke, M. M., Della Seta, F., Di Como, C. J., Sugimoto, H., Kobayashi, R. e Arndt, K. T.** 1996. The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol Cell Biol* 16:2744-55.
185. **Ma, H., Gamper, M., Parent, C. e Firtel, R. A.** 1997. The *Dictyostelium* MAP kinase kinase DdMEK1 regulates chemotaxis and is essential for chemoattractant-mediated activation of guanylyl cyclase. *Embo J* 16:4317-32.
186. **MacKeigan, J. P., Murphy, L. O. e Blenis, J.** 2005. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 7:591-600.
187. **MacKelvie, S. H., Andrews, P. D. e Stark, M. J.** 1995. The *Saccharomyces cerevisiae* gene SDS22 encodes a potential regulator of the mitotic function of yeast type 1 protein phosphatase. *Mol Cell Biol* 15:3777-85.
188. **Maeda, M. e Firtel, R. A.** 1997. Activation of the mitogen-activated protein kinase ERK2 by the chemoattractant folic acid in *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 272:23690-5.
189. **Maeda, M., Lu, S., Shaulsky, G., Miyazaki, Y., Kuwayama, H., Tanaka, Y., Kuspa, A. e Loomis, W. F.** 2004. Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA. *Science* 304:875-8.
190. **Maniak, M. e Nellen, W.** 1988. A Developmentally Regulated Membrane-Protein Gene in *Dictyostelium-Discoideum* Is Also Induced by Heat-Shock and Cold Shock. *Molecular and Cellular Biology* 8:153-159.
191. **Mann, D. J., Dombradi, V. e Cohen, P. T.** 1993. *Drosophila* protein phosphatase V functionally complements a SIT4 mutant in *Saccharomyces cerevisiae* and its amino-terminal region can confer this complementation to a heterologous phosphatase catalytic domain. *Embo J* 12:4833-42.
192. **Mantzouranis, L.** 2009. Análise do transcriptoma regulado pela YakA e do papel de KeaA no desenvolvimento de *Dictyostelium discoideum*. Doutorado. Departamento de Bioquímica, USP, São Paulo.
193. **Martin-Granados, C., Philp, A., Oxenham, S. K., Prescott, A. R. e Cohen, P. T. W.** 2008. Depletion of protein phosphatase 4 in human cells reveals essential roles in centrosome maturation, cell migration and the regulation of Rho GTPases. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40:2315-2332.
194. **Mayanagi, T., Maeda, Y., Hirose, S., Arakane, T., Araki, T. e Amagai, A.** 2004. Cloning, sequencing, and expression of the genomic DNA encoding the protein phosphatase cdc25 in *Dictyostelium discoideum*. *Development Genes and Evolution* 214:510-514.
195. **Mayer-Jaekel, R. E. e Hemmings, B. A.** 1994. Protein phosphatase 2A--a 'menage a trois'. *Trends Cell Biol* 4:287-91.
196. **Meiselbach, H., Sticht, H. e Enz, R.** 2006. Structural analysis of the protein phosphatase 1 docking motif: molecular description of binding specificities identifies interacting proteins. *Chem Biol* 13:49-59.

197. **Mendoza, M. C., Booth, E. O., Shaulsky, G. e Firtel, R. A.** 2007. MEK1 and protein phosphatase 4 coordinate *Dictyostelium* development and chemotaxis. *Molecular and Cellular Biology* 27:3817-3827.
198. **Mendoza, M. C., Du, F., Iranfar, N., Tang, N., Ma, H., Loomis, W. F. e Firtel, R. A.** 2005. Loss of SMEK, a novel, conserved protein, suppresses mek1 null cell polarity, chemotaxis, and gene expression defects. *Molecular and Cellular Biology* 25:7839-7853.
199. **Mihindukulasuriya, K. A., Zhou, G., Qin, J. e Tan, T. H.** 2004. Protein phosphatase 4 interacts with and down-regulates insulin receptor substrate 4 following tumor necrosis factor-alpha stimulation. *J Biol Chem* 279:46588-94.
200. **Millward, T. A., Zolnierowicz, S. e Hemmings, B. A.** 1999. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* 24:186-91.
201. **Moerman, A. M., de Maria, A. C., Gomes, S. L. e Klein, C.** 1998. Heat shock alters poly(A) tail length of *Dictyostelium discoideum* hsp32 RNA. *DNA Cell Biol* 17:635-41.
202. **Moerman, A. M. e Klein, C.** 1997. Developmental regulation of Hsp32, a small heat shock protein in *Dictyostelium discoideum*. *Exp Cell Res* 237:149-57.
203. **Moerman, A. M. e Klein, C.** 1998. *Dictyostelium discoideum* Hsp32 is a resident nucleolar heat-shock protein. *Chromosoma* 107:145-54.
204. **Moorhead, G. B., Trinkle-Mulcahy, L., Nimick, M., De Wever, V., Campbell, D. G., Gourlay, R., Lam, Y. W. e Lamond, A. I.** 2008. Displacement affinity chromatography of protein phosphatase one (PP1) complexes. *BMC Biochem* 9:28.
205. **Moorhead, G. B. G., De Wever, V., Templeton, G. e Kerk, D.** 2009. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochemical Journal* 417:401-409.
206. **Moorhead, G. B. G., Trinkle-Mulcahy, L. e Ulke-Lemee, A.** 2007. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8:234-244.
207. **Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H. e Ichijo, H.** 2001. Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *Embo J* 20:6028-36.
208. **Mourtada-Maarabouni, M. e Williams, G. T.** 2008. Protein phosphatase 4 regulates apoptosis, proliferation and mutation rate of human cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1783:1490-1502.
209. **Muller, K. e Gerish, G. A.** 1978. A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregating *Dictyostelium* cells. *Nature* 274:445-449.
210. **Mumby, M.** 2007. The 3D structure of protein phosphatase 2A: New insights into a ubiquitous regulator of cell signaling. *Acs Chemical Biology* 2:99-103.
211. **Muramoto, T. e Chubb, J. R.** 2008. Live imaging of the *Dictyostelium* cell cycle reveals widespread S phase during development, a G2 bias in spore differentiation and a premitotic checkpoint. *Development* 135:1647-57.
212. **Murata, K., Wu, J. e Brautigan, D. L.** 1997. B cell receptor-associated protein alpha4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10624-9.

213. **Murphy, L. O. e Blenis, J.** 2006. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in Biochemical Sciences* 31:268-275.
214. **Murphy, M. B. e Egelhoff, T. T.** 1999. Biochemical characterization of a *Dictyostelium* myosin II heavy-chain phosphatase that promotes filament assembly. *Eur J Biochem* 264:582-90.
215. **Murphy, M. B., Levi, S. K. e Egelhoff, T. T.** 1999. Molecular characterization and immunolocalization of *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase 2A. *FEBS Lett* 456:7-12.
216. **Na, J., Tunggal, B. e Eichinger, L.** 2007. STATc is a key regulator of the transcriptional response to hyperosmotic shock. *BMC Genomics* 8:123.
217. **Nanahoshi, M., Nishiuma, T., Tsujishita, Y., Hara, K., Inui, S., Sakaguchi, N. e Yonezawa, K.** 1998. Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by alpha4 protein and its yeast homolog Tap42. *Biochem Biophys Res Commun* 251:520-6.
218. **Nimmo, G. A. e Cohen, P.** 1978. The regulation of glycogen metabolism. Purification and characterisation of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 87:341-51.
219. **Nover, L., Scharf, K. D. e Neumann, D.** 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol* 9:1298-308.
220. **O'Brien, L. E., Tang, K., Kats, E. S., Schutz-Geschwender, A., Lipschutz, J. H. e Mostov, K. E.** 2004. ERK and MMPs sequentially regulate distinct stages of epithelial tubule development. *Developmental Cell* 7:21-32.
221. **Oehme, F. e Schuster, S. C.** 2001. Osmotic stress-dependent serine phosphorylation of the histidine kinase homologue DokA. *BMC Biochem* 2:2.
222. **Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. e Yanagida, M.** 1989. The fission yeast *dis2+* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell* 57:997-1007.
223. **Ollendorff, V. e Donoghue, D. J.** 1997. The serine/threonine phosphatase PP5 interacts with CDC16 and CDC27, two tetratricopeptide repeat-containing subunits of the anaphase-promoting complex. *J Biol Chem* 272:32011-8.
224. **Ott, A., Oehme, F., Keller, H. e Schuster, S. C.** 2000. Osmotic stress response in *Dictyostelium* is mediated by cAMP. *Embo Journal* 19:5782-5792.
225. **Parikh, A., Huang, E., Dinh, C., Zupan, B., Kuspa, A., Subramanian, D. e Shaulsky, G.** 2010. New components of the *Dictyostelium* PKA pathway revealed by Bayesian analysis of expression data. *Bmc Bioinformatics* 11:-.
226. **Park, I. K. e DePaoli-Roach, A. A.** 1994. Domains of phosphatase inhibitor-2 involved in the control of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *J Biol Chem* 269:28919-28.
227. **Pedelini, L., Marquina, M., Arino, J., Casamayor, A., Sanz, L., Bollen, M., Sanz, P. e Garcia-Gimeno, M. A.** 2007. YPI1 and SDS22 proteins regulate the nuclear localization and function of yeast type 1 phosphatase Glc7. *J Biol Chem* 282:3282-92.
228. **Peggie, M. W., MacKelvie, S. H., Bloecher, A., Knatko, E. V., Tatchell, K. e Stark, M. J.** 2002. Essential functions of Sds22p in chromosome stability and nuclear localization of PP1. *J Cell Sci* 115:195-206.

229. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
230. **Pinsky, B. A., Kotwaliwale, C. V., Tatsutani, S. Y., Breed, C. A. e Biggins, S.** 2006. Glc7/protein phosphatase 1 regulatory subunits can oppose the Ipl1/aurora protein kinase by redistributing Glc7. *Mol Cell Biol* 26:2648-60.
231. **Poulsen, H. E., Prieme, H. e Loft, S.** 1998. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* 7:9-16.
232. **Pritchard, C. A., Hayes, L., Wojnowski, L., Zimmer, A., Marais, R. M. e Norman, J. C.** 2004. B-raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 24:5937-5952.
233. **Puta, F. e Zeng, C.** 1998. Blastocidin resistance cassette in symmetrical polylinkers for insertional inactivation of genes in *Dictyostelium*. *Folia Biol (Praha)* 44:185-8.
234. **Ragusa, M. J., Dancheck, B., Critton, D. A., Nairn, A. C., Page, R. e Peti, W.** 2010. Spinophilin directs protein phosphatase 1 specificity by blocking substrate binding sites. *Nature Structural & Molecular Biology* 17:459-U100.
235. **Ramalingam, R., Shaw, D. R. e Ennis, H. L.** 1993. Cloning and functional expression of a *Dictyostelium discoideum* protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 268:22680-5.
236. **Ramos, C. R., Abreu, P. A., Nascimento, A. L. e Ho, P. L.** 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* 37:1103-9.
237. **Ramsey, A. J. e Chinkers, M.** 2002. Identification of potential physiological activators of protein phosphatase 5. *Biochemistry* 41:5625-32.
238. **Raposo, R. A.** 2010. Análise de interações da subunidade catalítica da fosfatase do tipo 1 (PP1c) de *Dictyostelium discoideum* identificadas através do sistema de duplo-híbrido em leveduras. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica, IQUSP, São Paulo.
239. **Rempola, B., Kaniak, A., Migdalski, A., Rytka, J., Slonimski, P. P. e di Rago, J. P.** 2000. Functional analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 262:1081-92.
240. **Richter, K., Haslbeck, M. e Buchner, J.** The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* 40:253-66.
241. **Rivero, F. e Maniak, M.** 2006. Quantitative and microscopic methods for studying the endocytic pathway. *Methods Mol Biol* 346:423-38.
242. **Rodriguez, M., Kim, B., Lee, N. S., Veeranki, S. e Kim, L.** 2008. MPL1, a novel phosphatase with leucine-rich repeats, is essential for proper ERK2 phosphorylation and cell motility. *Eukaryotic Cell* 7:958-966.
243. **Roux, P. P. e Blenis, J.** 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:320-+.
244. **Rudenko, A., Bennett, D. e Alphey, L.** 2003. Trithorax interacts with type 1 serine/threonine protein phosphatase in *Drosophila*. *EMBO Rep* 4:59-63.
245. **Rusnak, F.** 2000. Manganese-activated phosphatases. *Met Ions Biol Syst* 37:305-43.

246. **Saito, T., Kato, A., Ochiai, H. e Morita, N.** 2005. Temperature adaptation in Dictyostelium: role of Delta5 fatty acid desaturase. *Microbiology* 151:113-9.
247. **Sasaki, K., Shima, H., Kitagawa, Y., Irino, S., Sugimura, T. e Nagao, M.** 1990. Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 81:1272-80.
248. **Satinover, D. L., Leach, C. A., Stukenberg, P. T. e Brautigan, D. L.** 2004. Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8625-30.
249. **Sawarkar, R., Visweswariah, S. S., Nellen, W. e Nanjundiah, V.** 2009. Histone deacetylases regulate multicellular development in the social amoeba Dictyostelium discoideum. *J Mol Biol* 391:833-48.
250. **Schilde, C., Araki, T., Williams, H., Harwood, A. e Williams, J. G.** 2004. GSK3 is a multifunctional regulator of Dictyostelium development. *Development* 131:4555-4565.
251. **Schuster, S. C., Noegel, A. A., Oehme, F., Gerisch, G. e Simon, M. I.** 1996a. The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of Dictyostelium. *Embo Journal* 15:3880-3889.
252. **Schuster, S. C., Noegel, A. A., Oehme, F., Gerisch, G. e Simon, M. I.** 1996b. The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of Dictyostelium. *Embo J* 15:3880-9.
253. **Shenolikar, S.** 1994. Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol* 10:55-86.
254. **Shenolikar, S.** 1995. Protein phosphatase regulation by endogenous inhibitors. *Semin Cancer Biol* 6:219-27.
255. **Shenolikar, S. e Nairn, A. C.** 1991. Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 23:1-121.
256. **Sheppeck, J. E., 2nd, Gauss, C. M. e Chamberlin, A. R.** 1997. Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg Med Chem* 5:1739-50.
257. **Shi, Y. e Manley, J. L.** 2007. A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock. *Mol Cell* 28:79-90.
258. **Shi, Y. G.** 2009a. Assembly and structure of protein phosphatase 2A. *Science in China Series C-Life Sciences* 52:135-146.
259. **Shi, Y. G.** 2009b. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* 139:468-484.
260. **Silverstein, A. M., Galigniana, M. D., Chen, M. S., Owens-Grillo, J. K., Chinkers, M. e Pratt, W. B.** 1997. Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem* 272:16224-30.
261. **Simon, M. N., Winckler, T., Mutzel, R., Veron, M. e da Costa Maia, J. C.** 1992. Serine/threonine protein phosphatases in Dictyostelium discoideum: no evidence for type I activity. *Biochem Biophys Res Commun* 184:1142-51.
262. **Singh, G. P., Chandra, B. R., Bhattacharya, A., Akhouri, R. R., Singh, S. K. e Sharma, A.** 2004. Hyper-expansion of asparagines correlates with an abundance of proteins with prion-like domains in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 137:307-19.
263. **Siol, O., Dingermann, T. e Winckler, T.** 2006. The C-module DNA-binding factor mediates expression of the dictyostelium aggregation-specific adenyl cyclase ACA. *Eukaryot Cell* 5:658-64.

264. **Skinner, J., Sinclair, C., Romeo, C., Armstrong, D., Charbonneau, H. e Rossie, S.** 1997. Purification of a fatty acid-stimulated protein-serine/threonine phosphatase from bovine brain and its identification as a homolog of protein phosphatase 5. *J Biol Chem* 272:22464-71.
265. **Smolka, M. B., Chen, S. H., Maddox, P., Enserink, J., Albuquerque, C., Wei, X., Desai, A., Kolodner, R. e Zhou, H. L.** 2006. An FHA domain-mediated protein interaction network links rad53 to cytokinesis. *Faseb Journal* 20:A932-A933.
266. **Soderbom, F. e Loomis, W. F.** 1998. Cell-cell signaling during Dictyostelium development. *Trends Microbiol* 6:402-6.
267. **Sousa-Canavez, J. M.** 2005. Caracterização molecular da proteína DdI-2 e mapeamento de seus domínios de interação com a proteína fosfatase do tipo-1 de Dictyostelium discoideum. *Instituto de Química*:155.
268. **Sousa-Canavez, J. M., Beton, D., Gonzalez-Kristeller, D. C. e da Silva, A. M.** 2007. Identification and domain mapping of Dictyostelium discoideum type-1 protein phosphatase inhibitor-2. *Biochimie* 89:692-701.
269. **Souza, G. M., Lu, S. e Kuspa, A.** 1998. YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in Dictyostelium. *Development* 125:2291-302.
270. **Spudich, J. A. (ed.).** 1987. *Dictyostelium discoideum: Molecular Approaches to Cell Biology*, vol. 28. Academic Press, Inc, Orlando.
271. **Stark, M. J.** 1996. Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast* 12:1647-75.
272. **Stefansson, B. e Brautigan, D. L.** 2006. Protein phosphatase 6 subunits with conserved saps domain target Ikappa Bepsilon. *J Biol Chem*.
273. **Strack, S., Ruediger, R., Walter, G., Dagda, R. K., Barwacz, C. A. e Cribbs, J. T.** 2002. Protein phosphatase 2A holoenzyme assembly: identification of contacts between B-family regulatory and scaffolding A subunits. *J Biol Chem* 277:20750-5.
274. **Strmecki, L., Bloomfield, G., Araki, T., Dalton, E., Skelton, J., Schilde, C., Harwood, A., Williams, J. G., Ivens, A. e Pears, C.** 2007. Proteomic and microarray analyses of the Dictyostelium Zak1-GSK-3 signaling pathway reveal a role in early development. *Eukaryotic Cell* 6:245-252.
275. **Sumiyoshi, E., Sugimoto, A. e Yamamoto, M.** 2002. Protein phosphatase 4 is required for centrosome maturation in mitosis and sperm meiosis in *C. elegans*. *J Cell Sci* 115:1403-10.
276. **Sussman, M.** 1987. Cultivation and synchronous morphogenesis of Dictyostelium under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol* 28:9-29.
277. **Sutoh, K.** 1993. A transformation vector for dictyostelium discoideum with a new selectable marker bsr. *Plasmid* 30:150-4.
278. **Takemiya, A., Ariyoshi, C. e Shimazaki, K.** 2009. Identification and Functional Characterization of Inhibitor-3, a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 in Plants. *Plant Physiology* 150:144-156.
279. **Tamarit, J., Cabiscol, E. e Ros, J.** 1998. Identification of the major oxidatively damaged proteins in Escherichia coli cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem* 273:3027-32.
280. **Taminato, A., Bagattini, R., Gorjao, R., Chen, G., Kuspa, A. e Souza, G. M.** 2002. Role for YakA, cAMP, and protein kinase A in regulation of

- stress responses of *Dictyostelium discoideum* cells. *Mol Biol Cell* 13:2266-75.
281. **Tan, J. L. e Spudich, J. A.** 1990. Developmentally regulated protein-tyrosine kinase genes in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol* 10:3578-83.
 282. **Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T. e Dominguez, R.** 2004. Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* 429:780-4.
 283. **Thomason, P. A., Sawai, S., Stock, J. B. e Cox, E. C.** 2006. The histidine kinase homologue DhkK/Sombrero controls morphogenesis in *Dictyostelium*. *Developmental Biology* 292:358-370.
 284. **Toivola, D. M., Strnad, P., Habtezion, A. e Omary, M. B.** Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biol* 20:79-91.
 285. **Tung, H. Y., Wang, W. e Chan, C. S.** 1995. Regulation of chromosome segregation by Glc8p, a structural homolog of mammalian inhibitor 2 that functions as both an activator and an inhibitor of yeast protein phosphatase 1. *Mol Cell Biol* 15:6064-74.
 286. **Turowski, P., Favre, B., Campbell, K. S., Lamb, N. J. e Hemmings, B. A.** 1997. Modulation of the enzymatic properties of protein phosphatase 2A catalytic subunit by the recombinant 65-kDa regulatory subunit PR65alpha. *Eur J Biochem* 248:200-8.
 287. **Urushihara, H.** 2009. The Cellular Slime Mold: Eukaryotic Model Microorganism. *Experimental Animals* 58:97-104.
 288. **Van Driessche, N., Shaw, C., Katoh, M., Morio, T., Sugang, R., Ibarra, M., Kuwayama, H., Saito, T., Urushihara, H., Maeda, M., Takeuchi, I., Ochiai, H., Eaton, W., Tollett, J., Halter, J., Kuspa, A., Tanaka, Y. e Shaulsky, G.** 2002. A transcriptional profile of multicellular development in *Dictyostelium discoideum*. *Development* 129:1543-52.
 289. **Van Eynde, A., Wera, S., Beullens, M., Torreken, S., Van Leuven, F., Stalmans, W. e Bollen, M.** 1995. Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing. *J Biol Chem* 270:28068-74.
 290. **Villafranca, J. E., Kissinger, C. R. e Parge, H. E.** 1996. Protein serine/threonine phosphatases. *Curr Opin Biotechnol* 7:397-402.
 291. **Virshup, D. M. e Shenolikar, S.** 2009. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33:537-45.
 292. **Wakula, P., Beullens, M., Ceulemans, H., Stalmans, W. e Bollen, M.** 2003. Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 278:18817-23.
 293. **Walsh, C. T.** 2006. Posttranslational modification of proteins:expanding nature's inventory. Roberts and Company Publishers, Greenwood Village, Colorado.
 294. **Wang, W., Cronmiller, C. e Brautigan, D. L.** 2008a. Maternal phosphatase inhibitor-2 is required for proper chromosome segregation and mitotic synchrony during *Drosophila* embryogenesis. *Genetics* 179:1823-33.
 295. **Wang, W., Stukenberg, P. T. e Brautigan, D. L.** 2008b. Phosphatase inhibitor-2 balances protein phosphatase 1 and aurora B kinase for chromosome segregation and cytokinesis in human retinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 19:4852-62.
 296. **Weeks, G.** 2000. Signalling molecules involved in cellular differentiation during *Dictyostelium* morphogenesis. *Curr Opin Microbiol* 3:625-30.
 297. **Weiser, D. C., Sikes, S., Li, S. e Shenolikar, S.** 2004. The inhibitor-1 C terminus facilitates hormonal regulation of cellular protein

- phosphatase-1: functional implications for inhibitor-1 isoforms. *J Biol Chem* 279:48904-14.
298. **Welch, W. J., Feramisco, J. R. e Blose, S. H.** 1985. The mammalian stress response and the cytoskeleton: alterations in intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci* 455:57-67.
 299. **Welch, W. J. e Suhan, J. P.** 1986. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* 103:2035-52.
 300. **Wera, S. e Hemmings, B. A.** 1995. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* 311 (Pt 1):17-29.
 301. **Whitney, N., Pearson, L. J., Lunsford, R., McGill, L., Gomer, R. H. e Lindsey, D. F.** 2006. A putative Ariadne-like ubiquitin ligase is required for *Dictyostelium discoideum* development. *Eukaryot Cell* 5:1820-5.
 302. **Williams, R. S., Boeckeler, K., Graf, R., Muller-Taubenberger, A., Li, Z., Isberg, R. R., Wessels, D., Soll, D. R., Alexander, H. e Alexander, S.** 2006. Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol Med* 12:415-24.
 303. **Wu, H. I., Brown, J. A., Dorie, M. J., Lazzeroni, L. e Brown, J. M.** 2004. Genome-wide identification of genes conferring resistance to the anticancer agents cisplatin, oxaliplatin, and mitomycin C. *Cancer Res* 64:3940-8.
 304. **Xing, Y., Xu, Y. H., Chen, Y., Jeffrey, P. D., Chao, Y., Lin, Z., Li, Z., Strack, S., Stock, J. B. e Shi, Y. G.** 2006. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell* 127:341-353.
 305. **Xu, L. J. e Deng, X. M.** 2006. Suppression of cancer cell migration and invasion by protein phosphatase 2A through dephosphorylation of mu- and m-calpains. *Journal of Biological Chemistry* 281:35567-35575.
 306. **Yaffe, M. B. e Smerdon, S. J.** 2004. The use of in vitro peptide-library screens in the analysis of phosphoserine/threonine-binding domain structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33:225-44.
 307. **Yamaguchi, Y., Katoh, H., Mori, K. e Negishi, M.** 2002. Galpha(12) and Galpha(13) interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity. *Curr Biol* 12:1353-8.
 308. **Yang, J., Hurley, T. D. e DePaoli-Roach, A. A.** 2000. Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif. *J Biol Chem* 275:22635-44.
 309. **Yang, J., Roe, S. M., Cliff, M. J., Williams, M. A., Ladbury, J. E., Cohen, P. T. e Barford, D.** 2005. Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *Embo J* 24:1-10.
 310. **Yeh, P. Y., Yeh, K. H., Chuang, S. E., Song, Y. C. e Cheng, A. L.** 2004. Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin-induced NF-kappaB activation by protein phosphatase 4-mediated NF-kappaB p65 Thr dephosphorylation. *J Biol Chem* 279:26143-8.
 311. **Young, L. R. e Justice, L. N.** 2000. Parkinson's disease: focus on management alternatives. *Am J Manag Care* 6:93-113; quiz 114-6.
 312. **Yu, S. L., Lee, S. K., Alexander, H. e Alexander, S.** 1998. Rapid changes of nucleotide excision repair gene expression following UV-irradiation and cisplatin treatment of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res* 26:3397-403.
 313. **Zabrocki, P., Van Hoof, C., Goris, J., Thevelein, J. M., Winderickx, J. e Wera, S.** 2002. Protein phosphatase 2A on track for nutrient-induced signalling in yeast. *Mol Microbiol* 43:835-42.

314. **Zambrano, C. A., Egana, J. T., Nunez, M. T., Maccioni, R. B. e Gonzalez-Billault, C.** 2004. Oxidative stress promotes tau dephosphorylation in neuronal cells: the roles of cdk5 and PP1. *Free Radic Biol Med* 36:1393-402.
315. **Zeke, T., Morrice, N., Vazquez-Martin, C. e Cohen, P. T.** 2005. Human protein phosphatase 5 dissociates from heat-shock proteins and is proteolytically activated in response to arachidonic acid and the microtubule-depolymerizing drug nocodazole. *Biochem J* 385:45-56.
316. **Zhang, J., Zhang, L., Zhao, S. e Lee, E. Y.** 1998. Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. *Biochemistry* 37:16728-34.
317. **Zhang, X., Ozawa, Y., Lee, H., Wen, Y. D., Tan, T. H., Wadzinski, B. E. e Seto, E.** 2005. Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes Dev* 19:827-39.
318. **Zhao, S. e Lee, E. Y.** 1997. Targeting of the catalytic subunit of protein phosphatase-1 to the glycolytic enzyme phosphofructokinase. *Biochemistry* 36:8318-24.
319. **Zhou, G., Golden, T., Aragon, I. V. e Honkanen, R. E.** 2004. Ser/Thr protein phosphatase 5 inactivates hypoxia-induced activation of an apoptosis signal-regulating kinase 1/MKK-4/JNK signaling cascade. *J Biol Chem* 279:46595-605.
320. **Zhou, G., Mihindukulasuriya, K. A., MacCorkle-Chosnek, R. A., Van Hooser, A., Hu, M. C., Brinkley, B. R. e Tan, T. H.** 2002. Protein phosphatase 4 is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 277:6391-8.
321. **Zuo, Z., Urban, G., Scammell, J. G., Dean, N. M., McLean, T. K., Aragon, I. e Honkanen, R. E.** 1999. Ser/Thr protein phosphatase type 5 (PP5) is a negative regulator of glucocorticoid receptor-mediated growth arrest. *Biochemistry* 38:8849-57.

Anexos

Figuras Suplementares

Material Suplementar

Súmula Curricular

Figura S1. Análise do nível de expressão do mRNA de subunidades catalíticas de PPPs de *D. discoideum* durante o choque térmico. Células da linhagem AX-4 em fase de crescimento exponencial foram incubadas a 22°C (barra branca) ou a 30°C (barra cinza) pelos tempos indicados e o RNA total foi submetido aos ensaios de RT-qPCR para análise do nível dos transcritos dos genes: *hspC*, que representa o gene de controle positivo para o estresse (A), *DdPP1c* (B), *pp2Ac* (C), *pp4c* (D), *pho2B* (E), *ppp5c* (F) e *ppp6c* (G). O nível de expressão do gene constitutivo IG7 foi utilizado para normalizar a quantidade de cDNA nos ensaios e a razão de expressão em cada amostra foi calculada em relação às células controle de cada tempo. Cada gráfico representa a média de três experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata.

Figura S2. Análise do nível de expressão do mRNA de potenciais subunidades reguladoras das PPPs de *D. discoideum* durante o choque térmico. Legenda na próxima página.

Figura S2. Análise do nível de expressão do mRNA de potenciais subunidades reguladoras das PPPs de *D. discoideum* durante o choque térmico. Células da linhagem AX-4 em fase de crescimento exponencial foram incubadas a 22°C (barra branca) ou a 30°C (barra cinza) pelos tempos indicados e o RNA total foi submetido aos ensaios de RT-qPCR para análise do nível dos transcritos dos genes: DDB_G0292194 (A), med26 (B), DdI-3 (C), DDB_G0285313 (D), DDB_G0293300 (E), DDB_G0269300 (F) e *cwc15* (G) DdI-2 (H) *pprA* (I) *pp4r1* (J) *smkA* (L) *pppA* (M) DDB_G0279647 (N) *snfA* (O) *anapc6* (P) *anapc3* (Q). O nível de expressão do gene constitutivo IG7 foi utilizado para normalizar a quantidade de cDNA nos ensaios e a razão de expressão em cada amostra foi calculada em relação às células controle de cada tempo. Cada gráfico representa a média de três experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata.

Figura S3. Análise do nível de expressão do mRNA de subunidades catalíticas de PPPs de *D. discoideum* em resposta ao estresse hiper-osmótico. Células da linhagem AX-4 em fase de crescimento exponencial foram incubadas a 22°C na ausência (barra branca) ou na presença de sorbitol 200 mM (barra cinza) pelos tempos indicados e o RNA total foi submetido aos ensaios de RT-qPCR para análise do nível dos transcritos dos genes: *gapA*, que representa o gene de controle positivo para o estresse (A), *DdPP1c* (B), *pp2Ac* (C), *pp4C* (D), *pho2B* (E), *ppp5c* (F) e *ppp6c* (G). O nível de expressão do gene constitutivo IG7 foi utilizado para normalizar a quantidade de cDNA nos ensaios e a razão de expressão em cada amostra foi calculada em relação às células controle de cada tempo. Cada gráfico representa a média de três experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata.

Figura S4. Análise do nível de expressão do mRNA de potenciais subunidades reguladoras de PPPs de *D. discoideum* em resposta ao estresse hiper-osmótico. Legenda na próxima página.

Figura S4. Análise do nível de expressão do mRNA de potenciais subunidades reguladoras de PPPs de *D. discoideum* em resposta ao estresse hiperosmótico. Células da linhagem AX-4 em fase de crescimento exponencial foram incubadas a 22°C na ausência (barra branca) ou na presença de sorbitol 200 mM (barra cinza) pelos tempos indicados e o RNA total foi submetido aos ensaios de RT-qPCR para análise do nível dos transcritos dos genes: DDB_G0292194 (A), med26 (B), DdI-3 (C), DDB_G0285313 (D), DDB_G0293300 (E), DDB_G0269300 (F) e *cwc15* (G) DdI-2 (H) *pprA* (I) *pp4r1* (J) *smkA* (L) *pppA* (M) DDB_G0279647 (N) *snfA* (O) *anapc6* (P) *anapc3* (Q). O nível de expressão do gene constitutivo IG7 foi utilizado para normalizar a quantidade de cDNA nos ensaios e a razão de expressão em cada amostra foi calculada em relação às células controle de cada tempo. Cada gráfico representa a média de três experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata.

Figura S5. Análise do nível de expressão do mRNA de subunidades catalíticas de PPPs nas diferentes fases do desenvolvimento de *D. discoideum*. Células da linhagem AX-4 em fase de crescimento exponencial foram submetidas à carência nutricional em filtros para indução do desenvolvimento e o RNA total foi submetido aos ensaios de RT-qPCR para análise do nível dos transcritos dos genes: *acaA* (A) e *ecmA* (B), que são marcadores da progressão no desenvolvimento, *DdPP1c* (C), *pp2Ac* (D), *pp4c* (E), *pho2B* (F), *ppp5c* (G) e *ppp6c* (H). O nível de expressão do gene constitutivo IG7 foi utilizado para normalizar a quantidade de cDNA nos ensaios e a razão de expressão em cada amostra foi calculada em relação às células controle de cada tempo. Cada gráfico representa a média de dois experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata.

Figura S6. Análise do nível de expressão do mRNA de potenciais subunidades reguladoras de PPPs nas diferentes fases do desenvolvimento de *D. discoideum*. Legenda na próxima página.

Figura S6. Análise do nível de expressão do mRNA de potenciais subunidades reguladoras de PPPs nas diferentes fases do desenvolvimento de *D. discoideum*. Células da linhagem AX-4 em fase de crescimento exponencial foram submetidas à carência nutricional em filtros para indução do desenvolvimento e o RNA total foi submetido aos ensaios de RT-qPCR para análise do nível dos transcritos dos genes: DDB_G0292194 (A), med26 (B), DdI-3 (C), DDB_G0285313 (D), DDB_G0293300 (E), DDB_G0269300 (F) e *cwc15* (G) DdI-2 (H) *pprA* (I) *pp4r1* (J) *smkA* (L) *pppA* (M) DDB_G0279647 (N) *snfA* (O) *anapc6* (P) *anapc3* (Q). O nível de expressão do gene constitutivo IG7 foi utilizado para normalizar a quantidade de cDNA nos ensaios e a razão de expressão em cada amostra foi calculada em relação às células controle de cada tempo. Cada gráfico representa a média de três experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata.

Material Suplementar

1. Expressão recombinante de DdI-3

A sequência codificadora completa de *DdI-3* foi clonada no vetor de expressão pAE (Ramos *et al.*, 2004) para caracterização de sua atividade inibitória frente a PP1c e, embora a quantidade do inibidor expressa fosse suficiente para a realização dos ensaios enzimáticos, esta construção origina pouca proteína recombinante (Gonzalez-Kristeller, 2007). A fim de obter uma maior quantidade de proteína foi necessário subclonar o *DdI-3* em outro vetor de expressão, e para tal escolhemos o vetor pET36b (Novagen).

A sequência codificadora completa do *DdI-3* (393 pb) foi então amplificada por PCR usando os oligonucleotídeos pET-DdI-3F e pET-DdI-3R contendo sítios de restrição para *NdeI* e *XhoI*, respectivamente (Tabela 2). O produto de PCR foi clonado no pCR2.1 originando a construção pCR2.1-DdI-3 (Figura S7). Posteriormente o inserto foi removido desta construção pela digestão sequencial com *NdeI* e *EcoRI*, sendo o fragmento gerado purificado e ligado ao pET36b previamente digerido pelas mesmas enzimas.

A construção pET36b-DdI-3 foi então sequenciada e verificamos a ocorrência de mutação de um único nucleotídeo (A para T na posição 168) que resulta na troca de uma arginina na posição 56 para uma serina (R56S) na proteína recombinante predita (Figura S8). Assim, passamos a designar esta construção como pET36b-DdI3R56S. Curiosamente esta mutação se insere na seqüência que corresponde ao motivo consenso [R/K]-X1-[V/I]-X2-[F/W] (conhecido como RVxF) conservado na maioria das proteínas que interagem com a PP1c (Egloff *et al.*, 1997; Zhao e Lee, 1997; Aggen *et al.*, 2000; Cohen, 2002; Wakula *et al.*, 2003; Terrak *et al.*, 2004; Ceulemans e Bollen, 2006; Meiselbach *et al.*, 2006). Como esta construção seria usada simplesmente para expressão da proteína recombinante utilizada na forma desnaturada para a geração de anticorpos policlonais, demos sequência a obtenção da proteína recombinante, a qual é expressa fusionada em sua região

carboxiterminal a oito resíduos de histidina que possibilita sua purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

A construção pET36b-DdI3R56S foi então utilizada para transformação da cepa bacteriana BL21(DE3) (Stratagene). Após a transformação, 6 colônias foram selecionadas para crescimento e indução com IPTG 1 mM por 6 horas a 37°C. Na figura S9 mostramos o resultado da indução de três clones selecionados, sendo que a proteína rDdI-3R56S recombinante de ~25 kDa foi claramente induzida nestas condições (canaletas 2I – 4I). O rDdI-3R56S é composta de 157 aminoácidos, apresenta um pI teórico de 6,51 e um alto conteúdo de aminoácidos hidrofílicos (Asp + Glu= 15,9%, Ser + Thr= 21%, Lys + Arg= 13,4%). Observamos que o pET36b (vetor vazio) resulta na expressão de uma proteína de ~23 kDa (canaleta 1), cuja identidade desconhecemos.

Como pode ser observado na figura S9A, rDdI-3R56S migra em SDS-PAGE como um polipeptídeo com massa molecular de cerca de 25 kDa, embora a massa molecular estimada para esta proteína seja de aproximadamente 17,6 kDa. Esta migração anômala em SDS-PAGE também é observada para I-3 de humano e Ypilp, e provavelmente é consequência do alto conteúdo de aminoácidos hidrofílicos nestas proteínas que resulta em menor ligação de moléculas de SDS e menor mobilidade na eletroforese (Zhang *et al.*, 1998; Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).

Selecionamos um dos clones bacterianos que aparentemente melhor expressava rDdI-3 para indução em maior volume e purificação da proteína. Tanto I-2 como I-3 comportam-se como proteínas solúveis e termoestáveis (Nimmo e Cohen, 1978; Zhang *et al.*, 1998). Sendo assim, fervemos o lisado bacteriano por 20 minutos e após centrifugação analisamos o precipitado e o sobrenadante em SDS-PAGE. A figura S9B mostra que rDdI-3 não se agrega por desnaturação após fervura, permanecendo no sobrenadante, o qual foi então utilizado diretamente na purificação em coluna de Ni²⁺-NTA-agarose. Após aplicação do sobrenadante do lisado bacteriano à resina, procedemos a coleta do material não adsorvido seguindo-se lavagens e

eluição da proteína adsorvida com tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (Figura S9C). O maior nível de eluição de rDdI-3R56S foi com 300 mM. A figura S9D mostra a detecção do rDdI-3R56S com o anticorpo monoclonal anti-His.

Figura S7. Construção do pET36b-DdI-3 a partir do pCR2.1-DdI-3. (A) O produto de PCR gerado pela amplificação da sequência completa do cDNA de DdI-3 foi clonado no pCR2.1 utilizando o TA cloning kit (Invitrogen) (canaleta 2). A construção foi digerida com *NdeI*, linearizando o pCR2.1-DdI-3 (canaleta 3). O DdI-3 foi removido do plasmídio após digestão com *EcoRI* (canaleta 4) e ligado ao vetor pET36b previamente digerido com as mesmas enzimas. (B) Digestão do pET36b-DdI-3 com *NdeI* e *EcoRI* após a minipreparação de plasmídeos de dois clones bacterianos oriundos da transformação da cepa bacteriana SURE com a ligação pET36b/DdI-3 (Canaletas 3 e 4). Canaleta 2, pET36b-DdI-3 digerido. Os tamanhos dos fragmentos esperados nos géis em (A) e (B) estão indicados por seta. O marcador de tamanho (1kb DNA ladder) pode ser observado na canaleta 1 de cada gel.

A	
DdI-3	ATGCACACAACAAGATCACCAACTTTAGCAAGTTCACCAACTACAACAACAACGACAACA 60
recombinante	ATGCACACAACAAGATCACCAACTTTAGCAAGTTCACCAACTACAACAACAACGACAACA 60 *****
DdI-3	ACAACTCTTCTTCAAAGTAGTGGCAGTACTAATAGTGGTCCAATTCTCCACCA 120
recombinante	ACAACTCTTCTTCAAAGTAGTGGCAGTACTAATAGTGGTCCAATTCTCCACCA 120 *****
DdI-3	ACATTAAGACTTGTCTTGGAACACCAAAAAAGATAAAAAGAGAGTTCAATGGAAT 180
recombinante	ACATTAAGACTTGTCTTGGAACACCAAAAAAGATAAAAAGAGAGTTCAATGGAAT 180 *****
DdI-3	GAAGGGATTGTAGATAACGAAATTTATCAAAAAAATCAAAAAATGTTGTATCTTT 240
recombinante	GAAGGGATTGTAGATAACGAAATTTATCAAAAAAATCAAAAAATGTTGTATCTTT 240 *****
DdI-3	CATAAAAGAAACCTTATGATGAAAGTAGTATGAAAGTGAAGACGAACATAGAGCTATA 300
recombinante	CATAAAAGAAACCTTATGATGAAAGTAGTATGAAAGTGAAGACGAACATAGAGCTATA 300 *****
DdI-3	AAACAAAACCAAAACAAACGAAGAGTGCGAATGTGAACATGAACATGGTGATCATAAT 360
recombinante	AAACAAAACCAAAACAAACGAAGAGTGCGAATGTGAACATGAACATGGTGATCATAAT 360 *****
DdI-3	GACCATGGTCATGAAGAAATCATTCTCATTA----- 393
recombinante	GACCATGGTCATGAAGAAATCATTCTCATGAGCTCGCCGAAAAGCCGAATTCGAGCTCC 420 ***** *
DdI-3	----- 474
recombinante	GTCGACAAGCTTGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACCCTAA 474
B	
DdI-3	MHTTRSPTLASSPTTTTTTTTTLLQTSSSGSTNSGPNSPPTLRLVLGKPPKKDKKRVQWN 60
recombinante	MHTTRSPTLASSPTTTTTTTTTLLQTSSSGSTNSGPNSPPTLRLVLGKPPKKDKKSVQWN 60 *****
DdI-3	EGIVDNENLSKKKSKKCCIFHKKKPYDESSDESEDEHRAIKQPKQNEECECEHEHGDHN 120
recombinante	EGIVDNENLSKKKSKKCCIFHKKKPYDESSDESEDEHRAIKQPKQNEECECEHEHGDHN 120 *****
DdI-3	DHGHEENHSH----- 130
recombinante	DHGHEENHSHLAEPNSSSVDKLAAALEHHHHHHHH 157 *****

Figura S8. Alinhamento das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do DdI-3 e do DdI-3 recombinante obtido neste trabalho. (A) sequência de nucleotídeos. (B) sequência de aminoácidos. As letras em negrito sublinhadas no nucleotídeo de posição 168 e no aminoácido 56 indicam a mutação observada no DdI-3 recombinante subclonado no vetor pET36b. As letras pintadas de cinza indicam a sequência contendo o motivo conservado “RVxF” de ligação a PP1c.

Figura S9. Análise da expressão, purificação e detecção de Ddi-3 recombinante. (A) Extratos bacterianos protéicos de culturas controles não induzidas (NI) e de culturas induzidas com IPTG (I). (B) Lisado bacteriano fervido por 20 min após sonicação e centrifugado. O precipitado (P) e sobrenadante (S) estão indicados. (C) rDdi-3R56S purificada em coluna de Ni^{+2} -NTA-agarose a partir de culturas induzidas, sonicadas e fervidas (LF). A fração não adsorvida à resina (FT) e após lavagem com o mesmo tampão utilizado na lise das bactérias (L) estão indicadas. As eluições foram feitas com 25, 50, 100, 150 e 300 mM de imidazol (E1 a E5). (D) Imunodeteção de amostras de extratos celulares bacterianos transformados com pET36b (canaletas 1) e pET36b-Ddi-3R56S (canaletas 2) controles (NI) ou induzidas com 1 mM IPTG (I) e de rDdi-3R56S purificada em coluna de Ni^{+2} -NTA agarose (canaletas 3 e 4) com anticorpo monoclonal anti-HisHRP (1:500) por 1 h em temperatura ambiente. O reconhecimento das proteínas foi detectado por método colorimétrico. As setas indicam o polipeptídeo de ~25 kDa correspondente à rDdi-3R56S induzida. Os retângulos pretos indicam o polipeptídeo de ~23 kDa induzido nas bactérias transformadas com pET36b vazio.

2. Expressão recombinante de DdI-2

A expressão de DdI-2 recombinante foi feita a partir da construção pAE-DdI-2, disponível no laboratório (Sousa-Canavez *et al.*, 2007), sendo que neste caso, a proteína é expressa em fusão aminoterminal a uma sequência com seis resíduos de histidina,

A construção pAE-DdI-2 foi transformada na cepa bacteriana BL21(DE3)pLys (Stratagene). Esta cepa foi escolhida, pois apresenta pouco ou nenhum vazamento de expressão da proteína recombinante na ausência do indutor IPTG e foi bastante adequada para expressão de DdI-2 de *D. discoideum* (Sousa-Canavez *et al.*, 2007). Após a transformação, 6 colônias foram selecionadas para crescimento e indução com IPTG 1 mM por 3 horas a 37°C. Na figura S10A mostramos o resultado da indução de dois clones selecionados, sendo que a proteína rDdI-2 recombinante foi claramente induzida nestas condições. O rDdI-2 é uma proteína ácida com pI teórico de 4,26 composta de 261 aminoácidos e que apresenta massa molecular esperada de 31 kDa mas migra em SDS-PAGE com tamanho de ~50 kDa (Sousa-Canavez *et al.*, 2007). De forma semelhante, o ortólogo de I-2 de levedura (Glc8) também migra com tamanho 40% maior do que o predito pela sequência primária da proteína (Tung *et al.*, 1995).

Um dos clones foi selecionado para expressão de rDdI-2 em maior quantidade. Como já mencionado, I-2 e I-3 são proteínas solúveis e termoestáveis (Nimmo e Cohen, 1978; Zhang *et al.*, 1998). Portanto, fervemos o lisado bacteriano por 20 minutos e após centrifugação, confirmamos através de SDS-PAGE que a proteína recombinante permanecia no sobrenadante (Figura S10B). Assim como realizado para obtenção de rDdI-3R56S, a fração solúvel dos lisados bacterianos fervidos preparados a partir de uma cultura induzida com IPTG a 37°C, foi submetida a cromatografia de afinidade em Ni⁺²-NTA-agarose. Após aplicação do sobrenadante do lisado bacteriano fervido ou não à resina, procedemos à coleta do material não adsorvido, lavagens e material adsorvido eluído com tampão contendo 300 mM de imidazol (Figura

S10C, E1-5). A figura S10D mostra a detecção de rDdI-2 purificado com o anticorpo monoclonal anti-His.

3. Preparação dos anti-soros anti-rDdI-3 e anti-rDdI-2

A proteína rDdI-3R56S foi expressa em maior quantidade, purificada, dosada e extraída do gel de SDS-PAGE 10% corado com azul de comassie R-250 para ser utilizada nas inoculações em coelho para produção de anticorpos policlonais. O soro pré-imune de dois coelhos foi coletado e em seguida 300 µg da proteína recombinante foram inoculados em cada coelho. O soro imune foi coletado 10 dias após a segunda injeção. A figura S11 mostra um dado de imunodetecção em membrana de nitrocelulose contendo o extrato celular de bactérias BL21(DE3) transformadas com pET36b-DdI-3R56S induzidas ou não com IPTG e com a rDdI-3R56S purificada utilizando os soros pré-imune e imune obtidos de um dos coelhos. Os resultados indicam que o soro policlonal obtido reconhece a rDdI-3R56S. Em seguida, o soro imune foi testado em membrana de nitrocelulose contendo extratos proteicos de diferentes fases do desenvolvimento de *D. discoideum* (Figura S11C). Este resultado indica que o soro policlonal obtido reconhece especificamente um polipeptídeo de ~25 KDa dos extratos de *D. discoideum*, correspondente a DdI-3.

Figura S10. Análise da expressão, purificação e detecção de DdI-2 recombinante. (A) Extratos bacterianos protéicos de culturas transformadas com pAE vazio (canaleta 1) ou pAE-DdI-2 (canaletas 2 e 3), controles não induzidas (NI) e de culturas induzidas com IPTG (I) a 37°C por 3 h. (B) Amostra do lisado bacteriano sonicado, fervido por 20 min e centrifugado. O precipitado (P) e sobrenadante (S) estão indicados. (C) rDdI-2 purificada em coluna de Ni²⁺-NTA-agarose a partir do sobrenadante (S) de culturas induzidas, sonicadas e fervidas (a) ou do lisado bruto (LB) não fervido (b). A fração não adsorvida à resina (FT) e após lavagens sucessivas com o mesmo tampão utilizado na lise das bactérias (L) estão indicadas. As eluições foram feitas 300 mM de imidazol, respectivamente (E1 a E3). (D) Imunodeteção da rDdI-2 purificada em coluna de Ni²⁺-NTA-agarose (1) e do extrato bacteriano de culturas transformadas com pAE-DdI-2 induzida (2) com anticorpo monoclonal anti-HisHRP (1:500) por 1 h em temperatura ambiente. O reconhecimento das proteínas foi detectado por quimioluminescência (kit ECL - GE Healthcare). As setas indicam o polipeptídeo de ~50 kDa correspondente à rDdI-2.

Figura S11. Análise dos soros pré-imune e imune contra o DdI-3 recombinante preparados em coelho. (A) Amostras do rDdI-3R56S purificado em coluna de Ni^{2+} -NTA agarose (canaletas 1) e de extratos celulares lisados da cepa BL21(DE3) transformada com pET36b-DdI-3R56S induzidas (canaletas 2) ou não (canaletas 3) com IPTG separadas em SDS-PAGE 10%. A membrana de nitrocelulose contendo os polipeptídeos foi incubada com os soros pré-imune e imune anti-DdI-3R56S na diluição 1:100. (B) Amostras equivalentes a 2,5 μg (canaleta 1) e 0,25 μg (canaleta 2) de rDdI-3R56S purificado em coluna de Ni^{2+} -NTA agarose separadas em SDS-PAGE 10%. A membrana de nitrocelulose contendo os polipeptídeos foi incubada com os soros pré-imune ou anti-soros anti-DdI-3R56S obtido após a 2ª. imunização na diluição 1:250. (C) Extratos proteicos correspondentes a 1×10^6 células em diferentes fases do desenvolvimento de *D. discoideum* separadas em SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com soro imune na diluição 1:500. O reconhecimento das proteínas foi detectado por quimioluminescência (kit ECL-GE Healthcare). A seta indica o polipeptídeo com massa molecular esperada de ~25 kDa correspondente a rDdI-3R56S e DdI-3.

A proteína rDdI-2 também foi expressa em maior quantidade, purificada, dosada e concentrada em Microcon Centrifugal Filter (Millipore) para ser utilizada nas inoculações em camundongos para produção de anticorpos policlonais. Um camundongo não inoculado foi utilizado para obtenção do soro controle e em seguida 45 µg da proteína recombinante foram inoculados em cada um dos onze camundongos. As imunizações seguintes foram feitas com inoculações de 14 µg de rDdI-2. Uma pequena alíquota do soro imune foi coletado após uma semana da terceira imunização para a realização de um teste preliminar. Como mostrado na figura S12A, obtivemos anti-soro que reconhece a proteína recombinante. Este anti-soro foi testado em membrana de nitrocelulose contendo polipeptídeos de diferentes fases do desenvolvimento de *D. discoideum*. A figura S12B mostra que o soro reconhece dois polipeptídeos com menor intensidade, de aproximadamente 64 e 20 KDa, e um polipeptídeo de aproximadamente 47 KDa com um tamanho mais próximo do esperado para DdI-2 (31 KDa).

A **B**

xxi

Figura S12. Análise do anti-soro anti-DdI-2 preparado em camundongos.

(A) Amostras equivalentes a 1,5 µg de rDdI-2 purificado em coluna de Ni²⁺-NTA agarose foram submetidas a separação em SDS-PAGE 10%. Após a separação, os polipeptídeos foram transferidos para membranas de nitrocelulose, seguindo-se incubação com os soros pré-imune e o imune anti-DdI-2 obtidos após 3 imunizações dos camundongos na diluição 1:250. (B) Extratos proteicos correspondentes a 1x10⁶ células em diferentes fases do desenvolvimento de *D. discoideum* separadas em SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com soro imune na diluição 1:250. O reconhecimento das proteínas foi detectado por quimioluminescência (kit ECL - GE Healthcare). A seta indica o polipeptídeo com massa molecular de ~47 kDa correspondente à rDdI-2 (a banda negativa indica excesso de proteína) e DdI-2.