**Estudo da função de *keaA* no controle do
crescimento, desenvolvimento e resposta a
estresses em *Dictyostelium discoideum***

RAQUEL BAGATTINI

Orientadora: Dra Gláucia Mendes Souza

**Tese de Doutorado
Departamento de Bioquímica
Instituto de Química
USP**

São Paulo, 7 de janeiro de 2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010544

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bagattini, Raquel

B144e   Estudo da função de *keaA* no controle do crescimento,
desenvolvimento e resposta a estresses em *Dictyostelium*
discoideum / Raquel Bagattini. -- São Paulo, 2005.
115p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Souza, Gláucia Mendes

1. Biologia molecular 2. Dictyostelium : Micologia
I. T. II. Souza, Gláucia Mendes, orientador.

574.88 CDD

Dedico esta tese,

aos meus pais, Arrigo e Maria de Lourdes, a minha irmã Patrícia e ao meu cunhado Guilherme que sempre estiveram ao meu lado, incentivando e me apoiando em todos os meus passos.

ao Renato pelo amor, ajuda e dedicação em todos os momentos nestes últimos 2 anos.

Agradeço:

À prof^a Dr^a Gláucia Mendes Souza, pelo ensinamentos, orientação e dedicação que estiveram sempre presente em todo o desenvolvimento deste trabalho

Agradecimentos

Às prof.^{as} Dr^a Aline Maria da Silva e Dr^a Suely Lopes Gomes pelo disponibilidade que sempre tiveram no empréstimo dos aparelhos e reagentes do seu laboratório e conselhos que foram muito importantes durante estes quatro anos.

Ao Dr. Willian Loomis pela doação do mutante DG1106

Ao Wesllej, Luciana e Rogrigo pela amizade e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho

Aos amigos, Ana Paula, Alcides, Alexandre, Andréa, Daniela Gonzales, Daniela Beton, Michelle, Juliana, Humberto e Luciana, Flávia Risso, Flávia Papini, Lídia, Fabiana que estiveram todos estes anos ao meu lado me apoiando e proporcionado os momentos de alegrias e incentivo que jamais esquecerei

A Alessandra, Alexandre, D. Cleusa e Sara pelo apoio técnico e amizade durante todos estes anos.

Aos amigos Adriana Quina, Juliana e Adriano pelo apoio e incentivo.

Aos demais amigos do bloco 12, pessoas do Laboratório , Josélia, Ana Cláudia, Karina e Ariel, Rafaela, Cristina, Tie, Silvia, Luciana, Sandra, Lucas, Ricardo, Helder, Camila, Milton, Apuã, Abimael, Renato, Denise, Adriana, Camille, Eduardo, Jefferson, Ana Paula, Giuliana, Ana Carolina, Paulinho, Patrícia, Paulo.

Índice

Índice das Figuras.....	3
Índice das Tabelas	3
Abreviaturas.....	3
Resumo.....	6
Abstract.....	8
1- Introdução.....	9
1.1- O microorganismo <i>Dictyostelium discoideum</i>	9
1.2- As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	13
1.3 - As vias de sinalização envolvendo ROS.....	17
1.4 – Os mecanismos de defesa celular a ROS.....	21
1.5 - A resposta a estresse nutricional	22
1.6 - A proteína quinase YakA e as quinases MNB.....	26
2- Objetivos.....	29
3 - Procedimentos experimentais	30
3.1- Condições de cultivo e manipulação das células de <i>Dictyostelium discoideum</i>	30
3.1.1- Cultivo das células	30
3.1.2- Cultivo em meio Líquido.....	30
3.2 - Tratamento das células.....	31
3.2.1 - Curva de crescimento	31
3.2.2 - Tratamento das células em crescimento e coleta de amostras para extração de RNA.....	31
3.2.3 - Carenciamento de <i>Dictyostelium</i> em placas SM, na presença de <i>Klebsiella aerogenes</i> e coleta de amostras para extração de RNA.....	31
3.2.4- Carenciamento de <i>Dictyostelium</i> em filtro e coleta de amostras para extração de RNA.....	32
3.2.5- Carenciamento de <i>Dictyostelium</i> em ágar-fosfato.....	33
3.2.6- Teste de viabilidade	33
3.2.7- Transfecção de DNA em <i>Dictyostelium</i> por eletroporação	33
3.2.8- Mutagênese insercional mediada por enzima de restrição (REMI) ...	34
3.3 - Procedimentos para manipulação e análise de RNA.....	35
3.3.1 - Extração de RNA.	35
3.3.2 - Eletroforese de RNA em gel de agarose.....	36
3.3.3 - Northern blot e hibridização RNA-DNA	37
3.4- Preparação de sondas de DNA radioativas	37
3.5 - Procedimentos para manipulação de bactérias	38
3.5.1 - Preparação de bactéria competente para transformação	38
3.5.2- Transformação de bactérias.....	38
3.6 - Preparação de plasmídeos	39
3.6.1- Mini-preparação pelo método de lise alcalina	39
3.6.2- Preparação em larga escala	39
3.7 - Procedimentos para manipulação e análise de DNA.....	41
3.7.1 - Isolamento de núcleos	41
3.7.2 - Isolamento de DNA genômico de <i>Dictyostelium</i>	41
3.7.3 - Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	42
3.7.4 - Eletroforese de DNA	42

3.7.5 - Eluição de fragmentos de DNA do papel	42
3.7.6 - Hibridização DNA/DNA (Southern blot).....	43
3.8 - Seqüenciamento	44
4- Resultados.....	46
4.1- Análise do papel de <i>yakA</i> na resposta a estresses.....	46
4.2- Isolamento de supressores da morte induzida por estresses no mutante <i>yakA</i> ⁻	51
4.3. Análise da seqüência do gene <i>keaA</i>	54
4.4- Análise do padrão de crescimento das células <i>keaA</i> ⁻	59
4.5. Análise do padrão de expressão do mRNA para <i>keaA</i>	66
4.6- Análise do padrão de desenvolvimento do mutante <i>keaA</i> ⁻	70
4.7- Análise do padrão de expressão de genes de desenvolvimento no mutante <i>keaA</i> ⁻	77
4.8- Análise do papel da <i>pkaC</i> na resposta a estresses	80
5- Discussão.....	85
5.1- Caracterização do padrão de crescimento e sensibilidade a estresses das células selvagens e mutantes de <i>Dictyostelium</i>	85
5.2- Isolamento de supressores da morte induzida por SNP no mutante <i>yakA</i> ⁻	87
5.3- Arquitetura do gene <i>keaA</i>	91
5.4- Análise da expressão de <i>keaA</i>	94
5.5- O padrão de desenvolvimento do mutante <i>keaA</i> ⁻	95
6- Conclusões.....	100
7- Perspectivas.....	102
8 - Referências Bibliográficas.....	103

Índice das Figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Dictyostelium discoideum</i>	12
Figura 2: Potenciais via de sinalização celular que pode agir sob ação do peróxido de hidrogênio.	19
Figura 3: Via de transdução de sinal que guia a formação do organismo multicelular	24
Figura 4: SNP, H ₂ O ₂ , espermina NONOato e temperatura elevadas inibem o crescimento de células selvagens	48
Figura 5: SNP induz a morte das células <i>yakA</i> ⁻	49
Figura 6: H ₂ O ₂ induz a morte das células <i>yakA</i>	50
Figura 7: Análise da disrupção do gene <i>keaA</i> na linhagem selvagem AX4 e no mutante <i>yakA</i> ⁻	53
Figura 8: Domínios presentes na proteína KeaA.....	56
Figura 9: Alinhamento das seqüências da família Kelch	57
Figura 10: Padrão de crescimento de <i>keaA</i>	61
Figura 11: Uma mutação em <i>keaA</i> suprime a morte induzida por SNP no mutante <i>yakA</i> ⁻	62
Figura 12: Uma mutação em <i>keaA</i> suprime a morte induzida por H ₂ O ₂ no mutante <i>yakA</i> ⁻	63
Figura 13: <i>keaA</i> ⁻ tem uma maior resistência a choque térmico	64
Figura 14: A expressão do mRNA <i>keaA</i> é induzida na presença de SNP ou H ₂ O ₂	68
Figura 15: A expressão de <i>keaA</i> é regulada durante o desenvolvimento.....	69
Figura 16: Colônias do mutante <i>keaA</i> ⁻ possuem morfologia alterada.....	72
Figura 17: O mutante <i>keaA</i> ⁻ apresenta deficiência no desenvolvimento quando crescido na presença de <i>Klebsiella aerogenes</i>	73
Figura 18: O mutante <i>keaA</i> ⁻ apresenta um atraso no processo de desenvolvimento quando carenciado em baixa densidade celular.....	74
Figura 19: O mutante nulo para <i>keaA</i> não apresenta um atraso significativo no processo de desenvolvimento quando carenciado em alta densidade celular	75
Figura 20: Não há indução da <i>pkaC</i> e <i>carA</i> na ausência do gene <i>keaA</i> durante a carência nutricional em baixa densidade.....	78
Figura 21: A <i>pkaC</i> é induzida na ausência do gene <i>keaA</i> durante a carência nutricional em alta densidade.....	79
Figura 22: A PKA está envolvida na inibição do crescimento em resposta a SNP	82
Figura 23: As células <i>yakA</i> ⁻ , <i>pkaC</i> ⁻ e <i>acaA</i> ⁻ são mais resistentes a choques térmicos	83
Figura 24: Via proposta que media a resposta a estresse em <i>Dictyostelium</i>	98

Índice das Tabelas

Tabela I: O mutante <i>keaA</i> ⁻ é resistente a estresse nitrosoativo e oxidativo prolongado.....	65
Tabela II: O mutante <i>keaA</i> ⁻ é deficiente na agregação em baixas densidades	76
Tabela III: Índice de sobrevivência de células submetidas ao estresse nitrosoativo e choque térmico.....	84

Abreviaturas

BSA – albumina de soro bovino

CH₃COONa - acetato de sódio

CHCl₃ – clorofórmio

DEPC – dietil pirocarbonato

DTT - ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetra acético

EtOH - etanol

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HOCl - ácido hipocloroso

KCl – cloreto de potássio

KH₂PO₄ - fosfato de potássio monobásico

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MgSO₄ - sulfato de magnésio

MOPS – ácido morfolino propano sulfônico

NaCl – cloreto de sódio

NaOAc – acetato de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NaPO₄ – fosfato de sódio

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

NP-40 - nonidet P-40

ONOO⁻ - peroxinitrito

PKA – Proteína quinase dependente de cAMP

ROS - espécies reativas de oxigênio

SNAP - S-nitroso-N-acetilpenicilamina

SDS – dodecil sulfato de sódio

SNP - nitroprussiato de sódio

Resumo

O ciclo de vida de *Dictyostelium discoideum* é composto de duas fases independentes. Durante o crescimento vegetativo, as amebas crescem isoladas até que a fonte de nutrientes seja esgotada. A carência nutricional induz sua entrada num processo de desenvolvimento, que inclui a parada do crescimento, a agregação das células e a formação de um organismo multicelular onde as células se diferenciam em esporos que sobrevivem as condições desfavoráveis.

A proteína quinase YakA é requerida para a transição entre o crescimento e o desenvolvimento. YakA regula os níveis da PKA. Mutantes *yakA⁻* apresentam o crescimento acelerado, são deficientes no processo de agregação e são hiper-sensíveis a estresse oxidativo e nitrosoativo. Uma mutação em um segundo sítio em *keaA*, suprime a morte induzida por SNP (um gerador de óxido nítrico) no mutante *yakA⁻*. O papel de *keaA* foi determinado em resposta a estresse oxidativo, nitrosoativo e carênica nutricional. O gene *keaA* é necessário para o crescimento e desenvolvimento. Uma mutação em *keaA* confere resistência a estresse nitrosoativo/oxidativo confirmando que uma mutação em *keaA* confere resistência a estresse.

Um segundo supressor da morte induzida por SNP no mutante *yakA⁻* foi isolado pela mesma técnica de REMI e identificado como *pkaC* um regulador da resposta a estresse. YakA e PKA integram a resposta a vários estresse em *Dictyostelium*. Os resultados indicam que a *yakA* regula a parada do ciclo celular em resposta a estresses através da modulação de *keaA*. *keaA* regula, por sua vez, a expressão da *pkaC*, um regulador chave da produção de cAMP e do processo de desenvolvimento. A interação gênica entre estes elementos é

complexa e deve ser ajustada para permitir que as células sobrevivam a mudanças ambientais encontradas durante o seu ciclo de vida.

Abstract

Dictyostelium discoideum's life cycle is composed of two phases. During the vegetative phase, amoebae grow as single cells until the nutrients are depleted. Starvation induces a developmental program where isolated amoebae adopt a multicellular mode of living and differentiate into spores to survive the harsh conditions.

The protein Kinase YakA is required for the growth to development transition. YakA regulates the levels of PKA. *yakA* null cells have a faster cell cycle, are aggregation deficient and are hypersensitive to nitrosoative/oxidative stress. A second-site mutation in *keaA*, supresses the death induced by SNP, a generator of nitric oxide. The role for *keaA* has been determined in response to oxidative, nitrosoative and nutrient starvation stresses. *keaA* is required for proper growth and development. The *keaA*⁻ cells are more resistant to nitrosoative and oxidative stress confirming that a mutation in *keaA* confers stress resistance.

A second supressor of the death induced by SNP in the mutant *yakA*⁻ was isolated with REMI and identified *pkaC* as a regulator of the nitrosoative stress response. YakA and PKA may integrate the responses to several stresses in *Dictyostelium*.

The results indicate that *yakA* regulates the cell cycle arrest in response to stress through the modulation of *keaA*. *KeaA* regulates the expression of *pkaC*, a key regulator of cAMP prodution and development. Genetic interactions among these elements is complex and must be finely tuned in the many environmental changes cells endure during the life cycle.

1- Introdução

Dictyostelium discoideum é uma ameba social de vida livre que cresce no solo das matas alimentando-se de bactérias por fagocitose. A degradação dessas amebas ocorre através de um sistema endolisossomal similar ao de leucócitos e macrófagos que funciona coordenadamente para a degradação e eliminação dos componentes ingeridos (Neuhaus et al., 2002). Este microorganismo, muito semelhante em vários aspectos a metozoários mais complexos, é usado como modelo de estudo para uma variedade de processos básicos do desenvolvimento, incluindo a transdução de sinal, diferenciação celular e morfogênese.

1.1- O microorganismo *Dictyostelium discoideum*

O ciclo de vida de *Dictyostelium discoideum* é composto de duas fases independentes: a vegetativa e a do desenvolvimento. Durante a fase vegetativa as células crescem no solo como amebas isoladas. Com a detecção da exaustão de nutrientes, cerca de 10^5 células agregam-se entre si e iniciam um programa de desenvolvimento que culmina com a formação de esporos suportado por um talo e um disco basal que ancora este talo no substrato (Figura 1). Esse modo de vida multicelular adequa as células a sobreviverem em condições desfavoráveis.

A exaustão de nutrientes leva a uma mudança drástica no padrão de expressão gênica, no qual os genes vegetativos são inibidos e os genes essenciais ao desenvolvimento são induzidos. A formação do organismo multicelular e o padrão de expressão gênica são regulados por uma sofisticada via de sinalização celular induzida durante as primeiras horas de carência

nutricional (Reymond et al., 1995) pelo quimioatrativo extracelular cAMP. A exaustão dos nutrientes induz a síntese e secreção de cAMP por algumas amebas da população que se tornarão os centros de agregação. Quando estimuladas por cAMP, as células vizinhas respondem com a produção e secreção de cAMP, aumentando o sinal. Em resposta ao cAMP secretado pelo meio, as células adquirem uma forma alongada, tornam-se mutuamente adesivas e formam pontos de contato célula-célula entre suas extremidades polares, apresentando uma formação semelhante a correntes (*streams*) e se movendo coordenadamente no gradiente de concentração de cAMP para formar o agregado celular. Após cerca de 12 horas do início da carência, o agregado assume a forma de monte (*mound*) onde 70% das células começam a se diferenciar em células pré-esporos e o restante em células pré-talo. Nessa fase, os sub-tipos celulares estão posicionados aleatoriamente na estrutura. Após algumas poucas horas, forma-se um *tip* no topo da estrutura, quando as células pré-talo ali se posicionam e as células pré-esporos migram para a base. Durante a culminação, as células pré-talo invaginam por dentro da massa de células pré-esporos, diferenciando-se em talo e elevando a massa de células pré-esporos. Estas se diferenciam em esporos, formando o corpo de frutificação maduro. O processo inteiro se completa em 24 horas.

Os 34 Mb do genoma de *Dictyostelium* são distribuídos em 6 cromossomos de 4-6 Mb e um conteúdo gênico previsto de 11.000 genes (Glockner et al., 2002). Aproximadamente 73-77% dos pares de bases são constituídos por adeninas e timinas (Kimmel e Firtel, 1982). Os genes de *Dictyostelium* são proporcionalmente pequenos quando comparados aos de mamíferos, devido ao fato dos introns serem relativamente raros e possuírem

tamanho pequeno (100–160pb). As regiões promotoras têm 1-2 Kb, e possuem usualmente conteúdo de bases AT maior que 90% (Kay e Willians, 1999). O conteúdo AT é menor nas regiões traduzidas e maior nas regiões não codificantes e regiões inter-gênicas.

Dictyostelium contém 90 Kb de elementos extracromossomais que estão presentes em aproximadamente 100 cópias por núcleo (Firtel et al., 1976; Frankel et al., 1977; Cockburn et al., 1978) e 55 Kb de genoma mitocondrial. Entre os elementos extracromossomais encontramos plasmídeos e o DNA ribossomal.

Figura 1- Ciclo de vida de *Dictyostelium discoideum*. A seta mostra o corpo de frutificação maduro.

1.2- As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Alguns trabalhos sugerem que espécies reativas de oxigênio (ROS) têm um papel na morfogênese e desenvolvimento em *Dictyostelium* (Tao et al., 1997).

Espécies reativas de oxigênio são produzidas naturalmente durante a síntese de ATP nas mitocôndrias a partir do oxigênio molecular (O_2) (Halliwell e Gutteridge, 1999). A cadeia de transporte de elétrons é considerada o maior sítio celular aeróbico de produção de ROS (Boveris e Chance, 1973; Staniek e Nohl, 1999; Leanaz, 1998; Han et al., 2001). Embora a redução do O_2 para água por quatros elétrons seja executada com grande eficiência pela citocromo c oxidase, cerca de 2% do O_2 acaba sendo reduzido parcialmente gerando espécies reativas de oxigênio (Figura 2) que reagem com uma variedade de biomoléculas (Klaus e Hirt, 2004). As espécies reativas de oxigênio incluem todos os radicais do oxigênio, tais como o radical superóxido e o radical hidroxila, e as espécies não radicalares, tais como o H_2O_2 , o oxigênio singlete, o ozônio (O_3), o ácido hipocloroso (HOCl) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) que são mais reativas que o oxigênio molecular no estado fundamental (Augusto et al., 1995). ROS também pode ser produzido pelo sistema microssomal do retículo endoplasmático (Chu e La Peyre, 1993; Winston et al., 1996) e por várias reações catalizadas pelas enzimas oxidases.

Originariamente, as ROS foram associadas a processos de defesa das células de mamíferos. As células fagocíticas, assim como os monócitos, macrófagos, neutrófilos e eusínófilos, formam uma grande quantidade de superóxido como parte do mecanismo de destruição de células estranhas. Durante a fagocitose de partículas estranhas, como, por exemplo, de bactérias,

as células fagocitárias são ativadas e geram uma grande quantidade de ROS no que é chamado de “burst respiratório”.

De modo geral, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é formado pela redução do O_2 por um elétron (equação 1). Na membrana celular de macrófagos e neutrófilos esta reação é catalisada pela NADPH oxidase (equação 2), usando o NADPH como doador de elétrons (Hancock et al., 2001).

Radicais $O_2^{\bullet-}$ gerados por esta enzima servem de material para produção de uma variedade de oxidantes reativos. Estes oxidantes são usados pelos macrófagos para matar os microorganismos invasores, mas ao mesmo tempo eles podem causar danos às células (Klaus e Hirt, 2004). O radical $O_2^{\bullet-}$ pode ser protonado, gerando o radical peridroxil ($HO_2^{\bullet}$) (equação 3). Se mais um elétron for adicionado ao radical superóxido, é formado o íon peróxido (O_2^{2-}) (equação 4), sendo o H_2O_2 a sua forma protonada (equação 5). Geralmente, em sistemas biológicos, o produto de redução do oxigênio por dois elétrons é o H_2O_2 e o produto da redução por quatro elétrons é a água (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A produção de peróxido de hidrogênio é potencialmente danosa para as células, mas a adição de 2 novos elétrons e 2 prótons converte o peróxido de hidrogênio em água (equação 6).

Qualquer sistema biológico que gere $\text{O}_2^{\bullet -}$ produzirá H_2O_2 , que atravessa a membrana biológica livremente e apresenta reatividade química moderada (Chance e col., 1979; Cadenas, 1995). O H_2O_2 pode também ser gerado por granulócitos durante a fagocitose pela enzima superóxido dismutase (equação 7).

Se um elétron for transferido para o peróxido de hidrogênio, é formado o radical hidroxila ($\text{HO}^{\bullet}$), uma espécie radicalar altamente reativa. Esse elétron pode ser transferido por metais de transição como o íon ferro (II), através da reação de Fenton (Walling e col., 1995) e o íon cobre (I) (Halliwell e Gutteridge, 1999). As equações 8 e 9 mostram as reações.

O superóxido também pode reagir com o óxido nítrico para formar a molécula reativa peroxinitrito (equação 10).

Assim, a formação dos ânions superóxido produz uma cascata de ROS. Alguns destes ROS, especialmente o peróxido de hidrogênio, são moléculas de sinalização.

O $\bullet\text{NO}$ pode ser formado de forma endógena através da enzima NOS, que converte o aminoácido L-arginina em $\bullet\text{NO}$ e L-citrulina ou por doadores de $\bullet\text{NO}$ exógeno (Knowles, 1997). H_2O_2 é um potente indutor da produção de $\bullet\text{NO}$ através das células endoteliais e parece estar envolvido na ativação da NOS pela fosforilação da serina 1179 e desfosforilação da treonina 495 (Thomas et al., 2002). Há três tipos de NOS: a NOS neuronal (nNOS), identificada nos tecidos do sistema nervoso; a NOS endotelial (eNOS), que é expressa constitutivamente nas células do epitélio e sintetiza o $\bullet\text{NO}$ necessário para a regulação da pressão sanguínea; e a NOS indutível (iNOS), cuja expressão é induzida em sítios de inflamação. O óxido nítrico do endotélio vascular foi identificado como um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), um ‘fator’ que relaxa os vasos sanguíneos. Em ratos e camundongos, fagócitos (especialmente macrófagos) são produtores de $\bullet\text{NO}$ durante a inflamação, mas fagócitos humanos são menos produtores de $\bullet\text{NO}$, pelo menos *in vitro* (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os doadores de óxido nítrico têm sido usados como nitrovasodilatadores em tratamento de doenças com vasoconstrição anormal, como por exemplo *angina pectoris*. São exemplos de doadores de $\bullet\text{NO}$: o SNP, SNAP, espermina NONOato, entre outros. SNP é usado como um relaxante muscular da parede das artérias. A liberação de $\bullet\text{NO}$ por SNP ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$) está representada na equação 11 (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.3 - As vias de sinalização envolvendo ROS

As espécies reativas de oxigênio podem ser utilizadas como moléculas sinalizadoras. Muitos estudos indicam o papel de ROS na indução ou inibição da proliferação celular, na ativação e inibição de apoptose e na indução de necrose (Gamaley e Klyubin, 1999). Alguns dos efeitos bioquímicos de ROS nas células estão representados na Figura 2. Essa figura mostra o peróxido de hidrogênio regulando as várias vias de transdução de sinal que levam à alteração da expressão gênica, inibição de fosfatase e à modulação da atividade enzimática devido a mudanças do estado redox.

A indução da expressão gênica pode ser regulada por peróxido de hidrogênio (Allen e Tresini, 2000). A adição de H_2O_2 ou xantina oxidase estimula a expressão de *c-fos* e *c-myc* (Crawford et al., 1988). O fator de transcrição nuclear ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) é ativado por H_2O_2 . Esse fator de transcrição localiza-se no citoplasma das células em associação com seu inibidor $\text{I}\kappa\text{B}$. A adição de H_2O_2 nas células resulta na dissociação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ do seu inibidor, e na translocação de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ para o núcleo (Schreck, et al., 1991). Outros fatores de transcrição são afetados endógenamente pela H_2O_2 , entre eles está o AP-1 (ativador de proteína 1: um complexo composto de produtos dos genes *jun* e *fos*) (Rao, et al., 1996).

As ROS podem estar também envolvidas com eventos de fosforilação de proteínas, como a MAP-quinase que é ativada por H_2O_2 em animais (Fialkow et al., 1994; Guyton et al., 1996) e plantas (Desikan et al., 1999; Kovtun, 2000), o que pode levar à modulação da expressão gênica. H_2O_2 pode inibir também as

fosfatases, provavelmente por oxidar as cisteínas no sítio ativo destas enzimas (Sullivan et al., 1994; Wu et al., 1998). Várias enzimas como a guanilil ciclase e fosfolipase C, A₂ e D são potenciais alvos de ROS que ataca diretamente as cisteínas destas enzimas.

Em *Dictyostelium* foi mostrado um papel para superóxido como uma molécula sinalizadora requerida no início do desenvolvimento, sendo necessário para que o desenvolvimento normal ocorra. Quando um *scavenger* de superóxido foi utilizado ou quando a enzima superóxido dismutase foi super-expressa, observou-se a inibição da formação de agregados. Sugere-se que a enzima NADH oxidase, que é similar à NADH oxidase de humano, seja a melhor candidata à produção de superóxido (Bloomfield e Pears, 2003).

Figura 2 – Potenciais via de sinalização celular que pode agir sob ação do peróxido de hidrogênio. Várias vias de transdução de sinal leva a alteração na expressão gênica, enquanto outras podem levar a modulação da atividade enzimática. O peróxido de hidrogênio estimula a expressão de c-fos, c-myc e c-jun. O fator de transcrição nuclear NF- κ B também é ativado por H_2O_2 resultando na dissociação de NF- κ B do seu inibidor e a translocação para o núcleo. Um outro fator de transcrição ativado é a AP-1, um ativador de proteína1. H_2O_2 está envolvida na fosforilação da MAP quinase em animais. O H_2O_2 pode inibir as fosfatases. Várias enzimas como a guanilil ciclase e fosfolipase C, A₂ e D são potenciais alvos de ROS, atacando diretamente as cisteínas destas enzimas.

O óxido nítrico tem uma variedade de efeitos em diferentes tecidos e células (Lancaster, 1992; Stamler, 1994; Schimmitdt e Walter, 1994). Baixos níveis de NO têm a função de mediar a comunicação celular da transmissão neuronal e inibir a agregação plaquetária e relaxamento vascular. Altas concentrações de NO têm ação antitumoral e antimicrobiana. O efeito tóxico do NO está associado com enzimas chaves do metabolismo celular e/ou crescimento. Como molécula sinalizadora, NO interage com o grupo heme das proteínas como da guanilil ciclase, aumentando os níveis de cGMP que pode ser a chave da indução da vasodilatação por NO . NO ou compostos doadores de NO aumentam a produção de cGMP, *in vitro* e *in vivo* (Moncada et al., 1991; Palmer et al., 1987; Koesling et al., 1991).

As células de *Dictyostelium* produzem NO durante todo o crescimento e aumentam relativamente a produção de NO durante a fase de pré-agregação, na transição do crescimento para o desenvolvimento (Tao et al., 1997). A adição de compostos geradores de NO inibe a agregação (Tao et al., 1992) por impedir a iniciação da produção dos pulsos de cAMP (Tao et al., 1996). O mecanismo pelo qual NO inibe a sinalização de cAMP não está claro. A inibição dos compostos doadores de NO da agregação celular é máxima quando as células são expostas a NO durante as primeiras horas de carência nutricional (Tao et al., 1997). Em outros sistemas, NO pode inibir enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a cis-aconitase, levando a hipótese da diminuição dos níveis de ATP (Lancaster, 1992; Stamler, 1994). Em *Dictyostelium*, a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é inibida, mas esta

inibição é rapidamente revertida (com 10 minutos) o que não poderia explicar os efeitos de $\cdot\text{NO}$ na diferenciação celular (Tao et al., 1992, 1994).

1.4 – Os mecanismos de defesa celular a ROS

O controle da produção de ROS em células aeróbicas é feito por enzimas antioxidantes que convertem o íon superóxido em H_2O_2 através da enzima SOD, a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio pela enzima catalase (CAT), ou a utilização da H_2O_2 para oxidar substratos pelas peroxidases (glutathione peroxidases). O sistema de enzimas antioxidantes é suplementado por pequenas moléculas antioxidantes como glutathionas, α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno e ácido ascórbico (vitamina C) (Di Giulio et al., 1989; Storey, 1996).

Os íons superóxido podem ser removidos para a forma de peróxido de hidrogênio pela enzima SOD. A forma citossólica contém Cu ou Zn (CuZn-SOD), enquanto a forma mitocondrial em sua forma contém Mn (Mn-SOD) (Fridovich, 1997). H_2O_2 pode ser removida pela glutathione peroxidase ou catalase.

Aparentemente, o estado redox das células é crucial para o correto funcionamento de muitas enzimas, e pode ser usado para alterar a sua atividade. Assim, alterações no estado redox podem agir como um mecanismo de sinalização (Gamaley e Klyubin, 1999). Uma das mais importantes moléculas redox-sensíveis é a glutathione (GSH). GSH é oxidada por ROS, formando a glutathione oxidada (GSSG).

Em *Dictyostelium* há duas enzimas catalases: a catalase A e a catalase B (Garcia et al., 2000). Estas catalases são diferencialmente expressas

durante o crescimento e o desenvolvimento. A enzima catalase A (CatA) está presente durante o crescimento das células e por todo o desenvolvimento. A enzima catalase B (Cat B) é expressa nos estágios tardios do desenvolvimento, tendo os níveis de expressão dramaticamente aumentados durante a culminação. A atividade da enzima CatA está aumentada nas células pré-talo e está localizada no peroxissomo, enquanto a CatB é específica para as células pré-esporos e está presente no citossol (Garcia et al., 2000). O padrão de expressão das enzimas sugere que a enzima CatB funcione na proteção/estabilidade dos esporos maduros, e que esta enzima tem um papel na regulação da diferenciação e morfogênese de *Dictyostelium* (Garcia et al., 2003). Um “burst” na produção de espécies de peróxidos foi evidenciado durante o início do desenvolvimento em linhagem deficiente em catalase (Fisher et al., 1991).

1.5 - A resposta a estresse nutricional

As vias de transdução de sinal que guiam a formação do organismo multicelular são induzidas pelo quimioatrativo cAMP. Este nucleotídeo cíclico liga-se ao domínio extracelular do receptor do tipo serpentina cAR1 induzindo a ativação do complexo heterotrimérico da proteína G, composta pelas subunidades $G\alpha$, β e γ (Insall et al., 1994b; Wu et al., 1995). A subunidade β da proteína G se associa com a proteína CRAC através de um domínio PH (*pleskstrin* homology), com a proteína PiaA (Pianissimo) e juntamente com a ERKB (Map quinase de *Dictyostelium*) ativa a adenilil ciclase a produzir cAMP a partir de ATP (Chen 1997; Insall et al., 1994a; Lilly e Devreotes, 1994; Maeda et al, 1996; Segal et al, 1995).

A exportação do cAMP para o meio extracelular é feita em pulsos que oscilam de 6 em 6 minutos. A propagação desses pulsos guia as células vizinhas a migrarem em direção a esses sinais através de um processo de quimiotaxia formando um agregado celular.

Os níveis de cAMP extracelular são controlados por uma fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico codificada por *PdsA* (Sugang et al., 1997) e seu inibidor PDI, uma glicoproteína que é secretada pelas células durante as primeiras 8 horas de desenvolvimento (Franke e Kessin, 1981). A expressão do gene PDI é inibida quando os níveis de cAMP estão altos (Wu e Franke, 1990). Os níveis de cAMP intracelular são controlados pela fosfodiesterase RegA (Shaulsky et al., 1998; Thomason et al., 1998). A RegA é inibida pela Map quinase ErkB. A ErkB é ativada pela estimulação do receptor de cAMP (cAR1) (Maeda et al., 1996; Segal et al., 1995). Assim, o cAMP é acumulado intracelularmente, quando a atividade da adenilil ciclase (ACA) é estimulada e a atividade de RegA está inibida (Kuspa et al., 2001).

Altos níveis de cAMP intracelular ativam a proteína quinase dependente de cAMP (PKA) por se ligar a subunidade regulatória da PKA (*pkaR*), liberando a subunidade catalítica (*pkaC*) que se torna ativa. Com o aumento da atividade da PKA há uma inibição da ErkB e a RegA, agora ativa, hidroliza o cAMP em 5'AMP proporcionando a reassociação do complexo *pkaR* e *pkaC* (Figura 3). RegA também pode ser ativada via uma histidina quinase (Thomason e Kay, 2000). Assim, várias vias de sinalização convergem para a regulação dos níveis de cAMP e da atividade da PKA.

Expressão de

Figura 3 – Via de transdução de sinal que guia a formação do organismo multicelular. A via de transdução de sinal que guia a formação do organismo multicelular é induzida pelo quimioatrativo cAMP. Esse nucleotídeo cíclico liga-se ao domínio extracelular do receptor do tipo serpentina cAR1 induzindo a ativação do complexo heterotrimérico da proteína G, composta pelas subunidades $G\alpha$, β e γ . A subunidade β da proteína G se associa com a proteína CRAC através de um

domínio PH (*pleckstrin homology*), e juntamente com a ERKB (MAP quinase de *Dictyostelium*) ativa a adenilil ciclase a produzir cAMP a partir de ATP.

A exportação do cAMP para o meio extracelular é feita em pulsos que oscilam de 6 em 6 minutos. A propagação desses pulsos guia as células vizinhas a migrarem em direção a esses sinais através de um processo de quimiotaxia formando um agregado celular.

Os níveis de cAMP extracelular são controlados por uma fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico codificada por PDE. Os níveis de cAMP intracelular são controlados pela fosfodiesterase RegA. A RegA é inibida pela MAP quinase ErkB. A ErkB é ativada pela estimulação do receptor de cAMP (cAR1).

Altos níveis de cAMP intracelular ativam a proteína quinase dependente de cAMP (PKA) por se ligar a subunidade regulatória da PKA (*pkaR*), liberando a subunidade catalítica (*pkaC*) que se torna ativa. Com o aumento da atividade da PKA há uma inibição da ErkB e RegA, agora ativa, hidroliza o cAMP em 5'AMP proporcionando a reassociação do complexo *pkaR* e *pkaC*.

Num período anterior à total exaustão de nutrientes, as células experimentam condições de pré-carência, caracterizadas pela diminuição de nutrientes e aumento da densidade celular.

A glicoproteína PSF, um fator autócrino secretado para o meio durante o crescimento, tem seu aumento no meio proporcional à densidade celular (Clarke e Gomer, 1995). Quando a concentração de PSF excede três vezes a quantidade de bactérias disponíveis, as células respondem com a ativação da expressão de genes de desenvolvimento, incluindo a adenilil ciclase, *acaA*, e o receptor de cAMP, *carA*. Os mRNAs desses genes acumulam por várias horas antes da depleção dos nutrientes (Söderborm e Loomis, 1998).

1.6 - A proteína quinase YakA e as quinases MNB

Vários aspectos citados acima são coordenados pela quinase YakA em *Dictyostelium*. YakA pertence a uma família de quinases que inclui Yak1 de levedura, as quinases similares a Dyrk/MNB e várias outras quinases identificadas em camundongo, *C. elegans*, *Arabidopsis*, humanos e *Drosophila*.

O tema comum associado a estas quinases é o seu envolvimento no controle do ciclo celular. MNB está localizada na região crítica da Síndrome de Down no cromossomo 21 (Smith et al., 1997), sendo expressa nas regiões do cérebro que são afetadas por esta doença (Guimera et al., 1996). Uma cópia extra do gene *Mnb/Dyrk1A* é considerada um fator crítico para a contribuição de defeitos no desenvolvimento associado a esta doença (Shindoh et al., 1996).

O gene humano *Mnb/Dyrk1A* é homólogo ao *mnb* (minibrain) de *Drosophila* e *Dyrk1A* de rato. Altos níveis de expressão deste gene são

encontrados em células epiteliais que são linhagens em constante mitose (Rahmani et al., 1998). Em *Drosophila*, o gene Dyrk1A codifica para uma proteína quinase serina/treonina que é requerida para a proliferação dos neuroblastos durante a neurogênese pós-embriônica. Mutações no gene *mnb* provocam a redução do tamanho do cérebro e a diminuição da produção da progênie neuronal (Tejedor et al., 1995). Há altos níveis de expressão desse gene durante o início do desenvolvimento do cérebro e coração, mas baixos níveis de expressão em adultos, o que indica um possível papel de MNB no desenvolvimento desses órgãos (Okui et al., 1999). Essa quinase pode estar envolvida no controle da expressão gênica da transmissão do sinal sináptico (Wegiel et al., 2004). Em embriões de vertebrados, a Mnb/Dyrk1A é transientemente expressa nas células progenitoras neurais durante a transição das divisões neurogênicas (Hammerle et al., 2002), sugerindo que MNB possa ter um papel na neurogênese de cérebro de vertebrados. Foi proposto que a MNB regule a diferenciação dos dendritos (Hammerle et al., 2003), e a sua distribuição no sistema nervoso indica um papel para Dyrk1A na função motora e olfatória (Marti et al., 2003).

O papel dessas quinases no desenvolvimento das neuropatologias relacionadas à Síndrome de Down, ainda não é conclusivo. Camundongos transgênicos que contêm o gene humano MNB/Dyrk1A mostraram defeitos de aprendizado e memória (Smith et al., 1997), a indução de multi-nucleação em células HeLa, a super-duplicação do centrôssomo durante a interfase, a produção de fusos aberrantes e a segregação errada dos cromossomos durante a mitose (Funakoshi et al., 2003) no crescimento e desenvolvimento, indicando um papel para este gene no controle de vários tipos celulares.

Em levedura, a Yak1 é induzida em condições que levam à parada do ciclo celular, atuando como um atenuador do crescimento (Garrett et al., 1991; Garrett e Broach, 1989). A via da PKA em levedura é necessária para a transição da fase do ciclo celular de G0 para G1 nas células. Mutações sensíveis a temperatura (ts) nos genes que codificam para componentes nesta via como CDC25 (um fator trocador de nucleotídeo de guanina, [GEF]), Ras adenilil ciclase e a subunidade catalítica da PKA, são todas letais na temperatura restritiva. Mutantes nulos para YAK1 foram isolados como supressores da letalidade do mutante Ras(ts) (Garret e Broak, 1989) A super-expressão de Yak1 em mutantes Ras (ts) leva à parada do crescimento e em células selvagens à termo-tolerância (Garret et al., 1991; Hartley et al., 1994). Na fase G1, a expressão da Yak1P é induzida; a YAK1 parece não ser essencial para o crescimento de leveduras, mas trabalhos sugerem que ela esteja envolvida na inibição do crescimento em G1 e na mediação da resposta a estresses. Yak1, em resposta à falta de glicose, é transportada para o núcleo e fosforila um regulador POP2 (Moriya et al., 2001). Uma mutação em POP2 por uma substituição da Treonina 97 por Alanina, torna as células incapazes de pararem em G1 em resposta à carência.

YakA inibe o crescimento quando super-expressa em *Dictyostelium* e mutantes nulos para esta quinase perdem o controle do intervalo entre as divisões celulares, apresentando crescimento acelerado (Souza et al., 1998). A similaridade das Dyrk/MNB/Yaks com as quinases da família CDK sugere um papel destas no controle do ciclo celular.

Uma mudança complexa do padrão de expressão gênica na transição crescimento/desenvolvimento é modulada pela YakA durante esse período

onde genes da fase de crescimento são desligados e genes da fase de desenvolvimento são induzidos (Souza et al., 1998). A YakA é necessária para a diminuição da expressão de genes vegetativos que ocorre quando as células são carenciadas e, em particular, para a diminuição dos níveis de mRNA do gene *pufA*. PufA inibe a tradução do mRNA da *pkaC* (subunidade catalítica da PKA); a inibição da sua expressão é essencial para que o aumento da PKA-C ocorra, levando a um subsequente aumento de adenilato ciclase e receptor de cAMP que orquestram o processo de agregação (Souza et al., 1999).

2- Objetivos

Este projeto teve como objetivo principal a analisar a da via regulada pela YakA. Pela identificação de novos componentes da via pretende-se criar um mapa das interações genéticas que guiam a transição crescimento/desenvolvimento em *Dictyostelium*. Novos componentes foram buscados que suprimem a morte induzida por SNP no mutante *yakA⁻*. Os supressores analisados neste trabalho foram o gene *keaA* e *pkaC*. Os mutantes selecionados foram analisados quanto ao padrão de crescimento, desenvolvimento, resposta a estresses e padrão de expressão gênica. A integração de todas as informações fenotípicas permite a geração de modelos das inter-relações entre os genes reguladores das alterações fisiológicas que acompanham a resposta a estresses.

3 - Procedimentos experimentais

3.1- Condições de cultivo e manipulação das células de *Dictyostelium discoideum*

3.1.1- Cultivo das células

Estoques de *Dictyostelium discoideum* foram cultivados em placas SM (peptona 1%, extrato de levedura 0,1%, MgSO_4 0,1%, dextrose 0,2%, agar 2%, KH_2PO_4 20mM pH 6,4) como descrito (Loomis, 1982; Loomis 1987). Para iniciar uma cultura foram adicionadas as células 400 μL de uma suspensão de bactérias *Klebsiella aerogenes* espalhando-se com a alça de vidro. As placas foram mantidas a 22°C e a cada 10 dias um novo estoque foi feito. Estoques de células foram mantidos a -80°C. Para o congelamento, foi utilizado um precipitado com 5×10^7 células ressuspensas em 3 mL de HL-5 10% DMSO, congelado em gelo seco e imediatamente armazenado a -80°C. Para reiniciar a cultura, estoques congelados foram descongelados na presença de uma suspensão de bactérias em placas SM como descrito acima.

3.1.2- Cultivo em meio Líquido

As células de *D. discoideum* foram crescidas em meio axênio HL-5 (proteose peptona nº2 1%, glicose 1%, extrato de levedura 0,5%, KH_2PO_4 20 mM pH 6,4) sob agitação de 200 rpm a 22°C.

3.2 - Tratamento das células

3.2.1 - Curva de crescimento

As células foram diluídas numa densidade inicial de 5×10^5 células/mL em 10 mL de meio HL-5 contendo ou não 500 μ M de SNP ou 500 μ M de H_2O_2 . A partir do tempo 0 hora, as células foram contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer em intervalos regulares, 3 vezes ao dia durante 5 dias.

3.2.2 - Tratamento das células em crescimento e coleta de amostras para extração de RNA

As células foram diluídas para 1×10^6 /mL em 250 mL de HL-5 e tratadas com SNP 500 μ M ou H_2O_2 500 μ M a 22°C, 200 rpm, por 24 horas. Alíquotas de 4×10^7 células/mL foram coletadas em períodos regulares de 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, transferidas para um tubo cônico de 50 mL e centrifugadas a 490xg por 5 minutos. O precipitado de células foi ressuspenso em 2 mL de Sorensen (KH_2PO_4 20 mM pH 6.4), dividido em 2 tubos e centrifugado por 5 segundos a 16110xg. O sobrenadante foi aspirado, congelado em gelo seco e estocado a -80°C até o seu processamento.

3.2.3 - Carenciamento de *Dictyostelium* em placas SM, na presença de *Klebsiella aerogenes* e coleta de amostras para extração de RNA

Um total de 5×10^5 células de *Dictyostelium discoideum* foi cultivado em placas SM (peptona 1%, extrato de levedura 0,1%, $MgSO_4$ 0,1%, dextrose 0,2%, agar 2%, KH_2PO_4 20mM pH 6,4) como descrito (Loomis,1982; Loomis 1987) na presença de 400 μ L de uma suspensão de bactérias *Klebsiella aerogenes*, espalhando-se com a alça de vidro. As placas foram mantidas a

22°C e as células nas fases de crescimento, agregação e culminação correspondendo respectivamente a 61 horas, 66 horas e 73 horas do momento do plaqueamento; para a linhagem selvagem e 73 horas, 88 horas e 97 horas para o mutante nulo para *keaA*, foram coletadas e ressuspensas em 1 mL de Sorensen, centrifugadas alguns segundos e seu sobrenadante foi aspirado. O precipitado foi congelado em gelo seco e imediatamente armazenado a -80°C.

3.2.4- Carenciamento de *Dictyostelium* em filtro e coleta de amostras para extração de RNA

Para obtenção de amostras de células em diferentes fases de desenvolvimento, células provenientes de uma cultura em meio axênico HL-5 foram submetidas a carência nutricional sobre filtros de nitrocelulose Millipore pretos de poros de 0,45 µm e com 47 mm de diâmetro, como descrito por (Sussmann, 1987). Esses filtros foram previamente fervidos três vezes em água destilada por 10 minutos, e colocados sobre pré-filtros (Schleicher & Schuel nº 8 47 mm), ambos embebidos em tampão Sorensen (KH₂PO₄ 20 mM pH 6.4). As células foram ressuspensas em 40 mL de Sorensen, centrifugadas por 5 minutos a 490xg e lavadas neste tampão por três vezes para a retirada completa do meio. Por fim, uma alíquota de 5x10⁵ células ressuspensa em 1 mL de Sorensen foi espalhada uniformemente sobre o filtro e incubada em câmara úmida a 22°C. Nessas condições, o desenvolvimento sincrônico foi obtido até a formação do corpo de frutificação maduro, com duração em média de 24 horas a 22°C. Os estágios de desenvolvimento foram monitorados por observação em lupa e as células nas diferentes fases do ciclo foram coletadas após 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas, ressuspensas em 1 mL de Sorensen,

centrifugadas alguns segundos e seu sobrenadante aspirado. O precipitado foi congelado em gelo seco e imediatamente armazenado a -80°C.

3.2.5- Carenciamento de *Dictyostelium* em ágar-fosfato

Para o desenvolvimento em placas de ágar-fosfato, as células foram ressuspensas em 40 mL de tampão Sorensen (KH_2PO_4 20 mM pH 6.4), centrifugadas por 5 minutos a 490xg e lavadas neste tampão por três vezes para a retirada completa do meio. Um total de $2,5 \times 10^7$ células foi ressuspenso em 5 mL de Sorensen e colocadas em placa de ágar-fosfato contendo 0,5 g de PHYTAGAR (Life Technologies), 0,5 g de Bacto-agar (DIFCO) em 100 mL de tampão Sorensen. Após 15 minutos, o excesso de tampão foi retirado da placa e esta colocada em uma câmara úmida escura. As células foram observadas e fotografadas ao longo de todo o desenvolvimento.

3.2.6- Teste de viabilidade

As células foram diluídas a 1×10^6 /mL em 10 mL de HL-5 e tratadas com SNP 500 μM ou H_2O_2 500 μM . Após 12 e 24 horas, as células foram contadas; 200 células foram plaqueadas em placa SM em presença de 400 μL de *Klebsiella aerogenes*. As colônias que sobreviveram ao tratamento foram contadas. A porcentagem de sobrevivência foi calculada utilizando-se a relação do número de colônias de células não tratadas como controle.

3.2.7- Transfecção de DNA em *Dictyostelium* por eletroporação

Para obtenção da inativação do gene *keaA* em *Dictyostelium*, um vetor excisado do mutante 13-8 ou DG1106 contendo o cassete de resistência para o antibiótico blasticidina (BSR) foi inserido na da região codificadora do gene. Foi

utilizado para a linearização do plasmídeo, 40 µg do DNA foram digeridas com a enzima de restrição EcoRI por 2 horas a 37°C. Para a precipitação do DNA digerido foram adicionados 20 µL de acetato de potássio 3 M pH 4,8 e 2 volumes de etanol, centrifugando-se por 15 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a 37°C e ressuspensão em Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8,0 estéril.

Foram utilizadas para a transformação 10^7 células, da linhagem selvagem (AX4) ou *yakA*⁻. As células foram mantidas em gelo por 15 minutos e centrifugadas 5 minutos a 490xg. O sobrenadante foi removido com uma bomba à vácuo e as células ressuspensas em tampão de eletroporação (fosfato de sódio 10 mM pH 6,1, sacarose 50 mM). 800 µL desta solução foram transferidos para uma cubeta gelada, adicionando-se a ela, 40 µg do DNA digerido. Em seguida, as células foram submetidas a eletroporação a 1,1 KV, 50 µF e 24 Ω. Após a eletroporação, a cubeta foi deixada no fluxo laminar por 10 minutos e o conteúdo foi dividido em 4 placas contendo 10 mL de HL-5, seguindo-se incubação a 22°C. No dia seguinte, foram adicionados a cada placa 40 µg de blasticidina seguindo incubação a 22°C por 7 dias. O meio foi retirado e as colônias que se encontravam na placa foram ressuspensas em 10 mL de HL-5 e submetidas a plaqueamento em meio SM sólido para obtenção de colônias isoladas.

3.2.8- Mutagênese insercional mediada por enzima de restrição (REMI).

Para a obtenção da inativação do gene, foi utilizado para a linearização do plasmídeo pBsr1 linearizado, 40 µg do DNA digerido com a enzima de restrição *Bam*HI e *Dpn*II (Adachi, et al., 1994) por 1 hora a 37°C. Esse plasmídeo contendo o cassete de resistência para o antibiótico blasticidina (BSR) foi

eletroporado no mutante *yakA*⁻ inserindo-se aleatoriamente no genoma do mutante. Foram obtidos cerca de 70.000 clones divididos em 24 grupos de 2000 a 3000 mutantes. Cada grupo foi diluído para 5×10^5 /mL em HL-5 contendo SNP 500 μ M, sendo essas células mantidas a 22 °C por dez dias e seu crescimento observado. As células que sobreviveram ao tratamento foram plaqueadas em associação com a bactéria *Klebsiella aerogenes*. As placas foram mantidas a 22°C e seus clones foram isolados. Noventa e seis clones de cada conjunto foram recolocados em placas de 96 pocinhos e duplicados em duas placas. Os clones de cada uma das replicas das placas foram tratados com SNP por uma semana e seu crescimento foi observado. Dez clones cresceram na presença de SNP, sua cultura foi replicada e seu DNA genômico foi isolado, digerido com a enzima *HindIII* liberando um fragmento de 5 Kb que foi clonado para gerar plasmídeos. Estes plasmídeos foram seqüenciados e sua inserção foi determinada. Essa técnica foi realizada pela aluna de iniciação científica Renata Gorjão em nosso laboratório.

3.3 - Procedimentos para manipulação e análise de RNA

3.3.1 - Extração de RNA.

As células armazenadas a -80°C foram descongeladas na presença de 400 μ L de DEPC 0,01%, SDS 1% Tris 0,05 M pH 8.0 e 400 μ L de fenol/clorofórmio equilibrado em água e mantido sob agitação vigorosa até a total ressuspensão. Esta mistura foi centrifugada por 4 minutos a temperatura ambiente e 16110xg; a fase aquosa foi transferida para outro tubo já contendo 400 μ L de fenol/clorofórmio equilibrado em água, misturando-se bem e centrifugando-se por mais 4 minutos a temperatura ambiente e a 16110xg. Essa etapa foi repetida até o sobrenadante apresentar-se completamente

limpo. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo e foram adicionados 0,3 volumes de solução NaOAc 3 M pH 4,7 e 400 μ L de fenol/clorofórmio equilibrado em água. A mistura foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e a fase aquosa transferida para um outro tubo já contendo 2 volumes de etanol 100%, incubada em gelo seco por uma hora e em seguida centrifugada por 15 minutos a 4°C e 14645xg. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi seco. Este precipitado foi ressuspensão em 40 μ L de H₂O MilliQ contendo DEPC e incubado por 15 minutos a 65°C. A concentração final de RNA foi determinada pela medida da absorbância a 260 nm.

3.3.2 - Eletroforese de RNA em gel de agarose

Amostras de RNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,25%, MOPS 20 mM pH 7,0 contendo formaldeído 16%. A eletroforese foi mantida tampão de corrida MOPS 20mM a 80 V. Às amostras de 10 μ g de RNA foram adicionados 2 volumes de tampão formamida 64,4%, MOPS 20 mM pH 7,0, formaldeído 2.8%, azul de bromofenol 0.35%, 50 μ g/mL de brometo de etídeo em água tratada com DEPC. O gel foi observado com transiluminador ultravioleta. Após a eletroforese, o gel de agarose foi lavado por 30 minutos com SSC 10x (NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M pH 7,0). A transferência do gel para a membrana de náilon (Osmonic) foi realizada por capilaridade. O gel foi apoiado sobre papel 3 MM umedecido com SSC 10x, seguido da membrana de náilon e folhas de papel 3MM previamente umedecidas com SSC 2x e uma pilha de jornal seco. A transferência ocorreu por 20 horas.

3.3.3 - Northern blot e hibridização RNA-DNA

Após a transferência, o RNA da membrana foi covalentemente ligado a esta por exposição à luz ultravioleta por 5 minutos (150 joules/min) no aparelho Stratalinker 1800 (Stratagene). As membranas foram pré-hibridizadas durante a noite, a 37°C em 10 mL de 50% formamida, NaCl 0,3 M, NaH₂PO₄ 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, Ficoll 0,5%, polyvinylpyrrolidone 0,5%, BSA 0,5% e 0,1 mg/mL de DNA desnaturado de esperma de peixe.

No dia seguinte, a sonda preparada foi precipitada, fervida durante 5 minutos e adicionada à solução de hibridização fresca. A hibridização foi feita por 24 horas a 37°C em forno de hibridização da Stratagene.

As membranas foram lavadas por 30 minutos a 65°C sob agitação em SDS 0,1%, NaCl 0,3 M, NaH₂PO₄ 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM e exposta a filme de Raio-X Hiperfilm^{TM} MP (Armstrong Pharmacia Biotech) a -80°C.

3.4- Preparação de sondas de DNA radioativas

As sondas de cDNA radioativas foram sintetizadas utilizando o sistema "Random Primers DNA Labeling System" (Life Technologies Inc.) com aproximadamente 100 ng de DNA, desnaturado e colocado em seguida no gelo. Foram adicionados dATP, dGTP e dTTP para uma concentração final de 5 µM cada, 15 µL de Random Primer Buffer (HEPES 0,67 mM, Tris-HCL 0,17 mM, MgCl₂ 17mM, 2-mercaptoethanol 33 mM, BSA 1,33 mg/mL e de α ³²P-dCTP 50 µCi, DNA polimerase 3 U (Klenow), seguindo-se de incubação a temperatura ambiente durante a noite.

Para a precipitação da sonda foram adicionados 3 µL de NaCl 5 N, 10 µg de tRNA e 120 µL de EtOH, misturando-se vigorosamente. Após centrifugação

por 6 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 50 μ L de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM.

3.5 - Procedimentos para manipulação de bactérias

3.5.1 - Preparação de bactéria competente para transformação

Uma colônia de bactérias SURE, DH5 α ou STAB2 foi crescida a 37°C em LB (Bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,17 M) sob agitação até atingir O.D._{600 nm} igual a 0,45. A cultura foi transferida para um banho de gelo por 15 minutos e em seguida centrifugada por 10 minutos a 4°C a 1970xg. O precipitado de bactéria mantido em gelo foi ressuspenso em H₂O MilliQ estéril e centrifugado por 10 minutos a 4°C a 1970xg. O novo precipitado formado foi ressuspenso em 40 mL de glicerol 10% e novamente centrifugado nas condições anteriores. O precipitado foi ressuspenso em 0,8 mL de glicerol 10%, aliqotado em tubos, previamente colocado em gelo seco contendo metanol e imediatamente armazenados a -80°C.

3.5.2- Transformação de bactérias

Aproximadamente 200 ng do DNA plasmidial foram adicionados a 50 μ L de bactérias competentes e a mistura foi transferida para uma cubeta previamente resfriada. Em seguida, as bactérias foram submetidas a eletroporação a 2,55 KV, 50 μ F e 129 Ω . Imediatamente foram adicionados 160 μ L de meio LB gelado (Bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,17 M) e a suspensão bacteriana foi transferida para placas LBC (LB contendo

1,5% ágar e 100 µg/mL de carbenicilina) ou inoculadas em meio LB líquido contendo 100 µg/mL de carbenicilina e incubadas a 37°C por 18 horas.

3.6 - Preparação de plasmídeos

3.6.1- Mini-preparação pelo método de lise alcalina

As bactérias foram crescidas em 3 mL de LB contendo 100 µg/mL de carbenicilina e incubadas a 37°C durante uma noite a 200 rpm. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi centrifugada por 1 minuto a 16110xg à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 100 µL de Tris 20 mM, pH 8,0, glicose 50 mM, EDTA 10 mM. A seguir, foram adicionados 200 µL de NaOH 0,2 N, SDS 1% homogenizando-se por inversão e 150 µL de acetato de potássio 3 M pH 4,8. Após centrifugação de 6 minutos a 16110xg, o sobrenadante foi transferido para outro tubo completando-se para 1,5 mL com etanol 100% e misturando-se vigorosamente. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70%, seco a 37°C e ressuspensão em 50 µL de Tris 10 mM, EDTA 1mM contendo RNase para 20 µg/mL.

3.6.2- Preparação em larga escala

Bactérias transformadas com o plasmídeo de interesse foram crescidas em 400 mL de meio LBC a 200 rpm a 37°C durante a noite. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 2700xg por 10 minutos a 4°C e o precipitado ressuspensão em 24 mL de glicose 50 mM, Tris 20 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, adicionando-se o dobro do volume da solução NaOH 0,2 N, SDS 1%,

invertendo-se o tubo gentilmente. Adicionou-se, então, 24 mL de acetato de potássio 5 M pH 4,8 misturando-se bem. A mistura foi incubada no gelo por 20 minutos e centrifugada por 10 minutos 7130xg a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em gase para um novo tubo e em seguida foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol centrifugando-se a 7130xg a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e seco.

O precipitado foi ressuspenso em 4 mL de TE e 0,8 mL de acetato de amônia 2,5 M, misturando-se bem e incubando-se no gelo por 20 minutos. A solução foi centrifugada a 10800xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para outro tubo. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 2 volumes de etanol 100%, misturando-se e incubando-se no gelo por 20 minutos. Após centrifugação a 10800xg por 15 minutos a 4°C, o etanol foi aspirado e o precipitado foi seco e dissolvido em 4 mL de TE contendo 4 µL de RNase 10 µg/mL. A preparação foi incubada a 37°C por 15 minutos e foram adicionados NaCl para 1,5 M final e 1/4 do volume de PEG 6000 30%, NaCl 1,5 M. Após uma noite a 4°C, o DNA foi centrifugado por 15 minutos a 10125xg. O precipitado foi ressuspenso em 80 µL de água e 80 µL de tampão Tris 0,1 M pH 8,0, EDTA 0,25 M pH 8,0, SDS 10% e 16 µL de proteinase K para 5 mg/mL foram adicionados e incubados a 37°C por 30 minutos. Seguiu-se extração com fenol saturado em Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e uma extração com fenol clorofórmio em iguais proporções. O DNA foi precipitado em etanol 100% na presença de 0,3 M de acetato de potássio pH 5,5 e centrifugado por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 100 µL de TE. A sua quantificação foi determinada pela medida da absorbância em 260 nm.

3.7 - Procedimentos para manipulação e análise de DNA

3.7.1 - Isolamento de núcleos

Aproximadamente 5×10^7 células foram transferidas para um tubo cônico de 50 mL e centrifugadas por 5 minutos a 4°C a 15255xg e imediatamente colocadas no gelo. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 1,2 mL de tampão Tris 40 mM pH 7,8, sacarose 1,5%, EDTA 0,1 mM, $MgCl_2$ 6 mM, KCl 40 mM, DTT 5 mM, NP-40 0,4% gelado. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 16110xg. O sobrenadante foi aspirado, e o precipitado congelado em gelo seco e imediatamente armazenado a -80°C.

3.7.2 - Isolamento de DNA genômico de *Dictyostelium*

Os núcleos congelados a -80°C foram descongelados no gelo e ressuspenso em 75 µL de EDTA 150 mM pH 8,0. Foram adicionados 100 µL de Sarcosil 10%, agitando-se manualmente. O tubo foi incubado a 55°C por 20 minutos e 250 µL de acetato de amônia 4 M foram adicionados, misturando-se vigorosamente e centrifugando-se por 15 minutos a 16110xg. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo, completando-se o volume com etanol 100% para 1,5 mL e misturando-se vigorosamente. O DNA foi precipitado centrifugando-se por 10 minutos a 16110xg. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. O precipitado foi seco a 37°C, ressuspenso em 100 µL de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e armazenado a -20°C.

3.7.3 - Digestão de DNA com enzimas de restrição

Para a obtenção do fragmento de *keaA* utilizado na preparação das sondas radioativas, alíquotas de 5 µg do DNA dos plasmídeos foram digeridos por 1 hora a 37°C com 10 U da enzima *ClaI* no respectivo tampão de reação (Tris-HCl 50 mM pH 7,4), KCl 200 mM, EDTA 0.1 mM, 2- mercaptoetanol 5 mM, BSA 0.5 mg/mL, glicerol 50% (v/v), Triton X-100 0.1% (w/v)) em um volume final de 15 µL.

Na preparação de *southern blots*, o DNA genômico das células foi digerido com 30 U da enzima *EcoRV* em tampão de reação (Tris – HCl 10 mM pH 7,4, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, BSA 0,2 mg/ml, glicerol 50% (v/v), Triton X-100 0,1% (w/v)) por 3 horas a 37°C em um volume final de 50 µL.

3.7.4 - Eletroforese de DNA

Ao plasmídeo digerido adicionou-se 20% do volume final de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, sacarose 40%), seguindo-se eletroforese em gel de agarose 0,7% em TAE 1x (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1mM pH 8,0). O peso molecular dos fragmentos foi estimado comparando-se com o marcador de peso molecular "1 kb DNA ladder" (Life Technologies). A eletroforese foi mantida a 80V em tampão de corrida TAE 1x. O gel foi visualizado em transiluminador ultravioleta.

3.7.5 - Eluição de fragmentos de DNA do papel

Após eletroforese em gel até a separação do fragmento de DNA, o gel foi cortado abaixo da banda de interesse de modo a permitir a introdução de

um pedaço de papel Whatman DE81. A eletroforese foi continuada até que o DNA estivesse adsorvido ao papel.

O fragmento de DNA transferido para o papel foi colocado em um tubo com 500 µL de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, 1 N NaCl, contendo 10 µg de tRNA, e incubado a temperatura ambiente por 1 hora. Após decorrido este período, o DNA foi centrifugado por 10 minutos a 16110xg e o sobrenadante transferido para outro tubo onde adicionou-se 500 µL de fenol-CHCl₃. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada por 4 minutos a 16110xg. O sobrenadante foi transferido para outro tubo adicionando-se 500 µl de CHCl₃. O tubo foi centrifugado por 4 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e a ela foram adicionados 2 volumes de EtOH 100%, misturando-se e centrifugando-se por 15 minutos a 16110xg. O precipitado foi então lavado com EtOH 70%, seco a 37°C, ressuspenso em 20 µL de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, e armazenado a -20°C.

3.7.6 - Hibridização DNA/DNA (Southern blot)

Amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel 0,7% em TAE 1x (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1mM pH 8,0). A eletroforese foi mantida a 80 V. O gel foi observado com transiluminador ultravioleta. Após a eletroforese, o gel de agarose foi lavado por 40 minutos com solução desnaturante (NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M) e após este período com acetato de amônia 1 M, hidróxido de sódio 100 mM pH 8,9 por mais 40 minutos.

A transferência do gel para a membrana de nylon (Osmonic) foi realizada com acetato de amônia 1 M, hidróxido de sódio 100 mM pH 8,9, transferido para a membrana por capilaridade.

Após a transferência, o DNA da membrana foi ligado covalentemente a esta por exposição a luz ultravioleta (150 joules/min) no aparelho Stratalinker 1800 (Stratagene). As membranas foram pre-hibridizadas, durante a noite a 37°C, em 10 mL de formamida 50%, NaCl 0,6 M, NaPO₄ 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, Ficoll 0,5%, polivinilpirrolidona 0,5%, BSA 0,5%, 0,1 mg/mL de DNA desnaturado de esperma de peixe.

No dia seguinte, a sonda de DNA purificada foi fervida durante 5 minutos. A solução de hibridização foi trocada e a esta foi adicionada a sonda, seguindo hibridização por 24 horas a 37°C em forno de hibridização. As membranas foram lavadas por 30 minutos a 65°C sob agitação em SDS 0,1%, NaCl 0,6 M, NaPO₄ 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, e expostas a filme de Raio-X Hiperfilm^{TM} MP (Amersham Pharmacia Biotech) a -80°C.

3.8 - Seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o Sistema Big Dye Terminador (Perkin Elmer) com 2 µL do Big Dye, 200 a 500 ng de DNA, 3,2 pmoles de primer T7 e SP6 em tampão Tris 20 mM pH 9,0, MgCl₂ 0,5 mM num volume final de 20 µL. Os ciclos de PCR foram 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 3 minutos a 68°C seguidos de uma incubação final de 5 minutos a 72°C.

Para a precipitação do DNA, foram acrescentados à reação 16 µL de água MilliQ estéril e 64 µL de EtOH 95%. A reação foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugada em seguida por 20 minutos a 16110xg. O etanol foi aspirado e o precipitado lavado com 500 µL de EtOH

70%, centrifugando-se o tubo por 5 minutos a 16110xg e seguindo-se secagem a vácuo.

4- Resultados

4.1- Análise do papel de *yakA* na resposta a estresses

Com o objetivo de investigar as vias que regulam a inibição do crescimento em resposta a estresses, células de *Dictyostelium* foram submetidas a tratamentos com compostos que geram espécies reativas de nitrogênio, oxigênio e choque térmico (Taminato et al., 2002; anexo I). Curvas de crescimento foram realizadas com a linhagem selvagem na presença de 500 μ M de SNP, 500 μ M de espermina NONOato (ambos geradores de NO), 500 μ M de SNP adicionado após 30 minutos de pré-incubação das células com 40 μ M de oxi-hemoglobina, 500 μ M de H₂O₂ ou em alta temperatura (30 °C). Uma inibição do crescimento foi observada após 24 horas em resposta a estes tratamentos (Figura 4). A inibição do crescimento das células tratadas com SNP foi abolida nas células pré-tratadas com oxi-hemoglobina, um sequestrador de óxido nítrico.

As células *yakA*⁻ são deficientes na resposta a estresse nutricional, não apresentam desenvolvimento e possuem o ciclo celular acelerado quando comparado ao de células da linhagem selvagem (Souza et al., 1998). Com o objetivo de verificar se este mutante teria uma resposta alterada aos tratamentos delineados acima, as células selvagens e *yakA*⁻ foram tratadas com 500 μ M de SNP (Figura 5A) ou 500 μ M de H₂O₂ (Figura 6) e curvas de crescimento foram realizadas. Como esperado, observou-se um crescimento acelerado do mutante *yakA*⁻ em comparação às células da linhagem selvagem (Figura 5). Quando as células selvagens foram submetidas ao tratamento com SNP, houve uma inibição do crescimento após 20-24 horas. No mutante *yakA*⁻ foi observada lise celular após 24 horas de tratamento, enquanto as células

selvagens apresentaram uma inibição do crescimento, mas não a lise celular. As células *yakA*⁻, quando submetidas ao tratamento com H₂O₂ (Figura 6), apresentaram uma inibição do crescimento seguida por lise celular após 12 horas de tratamento, enquanto as células selvagens apresentaram inibição do crescimento sem lise celular.

Para verificarmos se as células apresentariam recuperação do crescimento após a remoção do SNP, o meio contendo SNP foi trocado por meio fresco após 12, 24 e 48 horas de tratamento, e as células foram observadas por 96 horas. A Figura 5B mostra que o tratamento com SNP não produz dano irreversível em células selvagens, pois quando este foi removido após 12, 24 e 48 horas as células recuperaram o crescimento. As células *yakA*⁻ apresentaram uma breve recuperação do crescimento quando o SNP foi retirado após 12 horas, mas, após aproximadamente 36 horas, essas células apresentaram lise (Figura 5C). Quando o SNP dos mutantes *yakA*⁻ foi retirado após 24 e 48 horas, não foi observada a recuperação do crescimento do mutante.

Figura 4 – SNP, H₂O₂, espermina NONOato e temperatura elevadas inibem o crescimento de células selvagens. As células selvagens (WT) foram diluídas numa densidade inicial de 5×10^5 células/mL em meio HL-5 contendo SNP 500 μ M, H₂O₂ 500 μ M, espermina NONOato 500 μ M, oxi-hemoglobina 40 μ M por 30 min seguida a adição de SNP 500 μ M. Todas as incubações foram feitas a 22°C exceto onde indicado. As células foram contadas em intervalos regulares de 3 vezes ao dia durante 5 dias. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 5- SNP induz a morte das células *yakA*⁻. A) As células selvagens (WT) e *yakA*⁻ foram diluídas numa densidade inicial de 5×10^5 células/mL em meio HL-5 contendo SNP 500 μ M e contadas em intervalos regulares de 3 vezes ao dia durante 5 dias. Após 12, 24 e 48 h as células selvagens (B) ou *yakA*⁻ (C) foram lavadas para remoção do SNP, colocadas em meio HL-5 e contadas em intervalos regulares de 3 vezes ao dia. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 6 – H₂O₂ induz a morte das células *yakA*⁻. As células selvagens (WT) e *yakA*⁻ foram diluídas numa densidade inicial de 5x10⁵ células/mL em meio HL-5 contendo H₂O₂ 500 µM e contadas em intervalos regulares de 3 vezes ao dia durante 5 dias. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

4.2- Isolamento de supressores da morte induzida por estresses no mutante *yakA*⁻

Para identificarmos componentes das vias que modulam a resposta a estresses nitrosoativos e oxidativos, supressores da morte induzida por SNP e H₂O₂ no mutante *yakA*⁻ foram isolados e identificados através da técnica de mutagênese insercional mediada por enzima de restrição (REMI) (Kuspa e Loomis, 1994). Um dos supressores obtidos foi denominado de mutante 13-8. Para identificação do gene mutado, o DNA genômico do mutante 13-8 foi digerido com a enzima *Clal* e ligado para a circularização do plasmídeo de inserção e das seqüências genômicas flanqueadoras. A análise do DNA após a transformação de *E.coli* revelou 4,9 Kb de DNA flanqueando o plasmídeo de inserção.

Para confirmar que a mutação de *keaA* era responsável pela proteção do mutante *yakA*⁻ contra a morte induzida por SNP, a interrupção do gene *keaA* foi refeita na linhagem selvagem e no nulo *yakA*⁻ com a construção isolada do mutante. Após seleção com blasticidina, as células foram plaqueadas na presença de *Klebsiella*. Vinte colônias com fenótipo de deficiência na agregação foram obtidas de um total de 40 clones plaqueados. Um número similar de clones *yakA*⁻ foi analisado. A interrupção do gene por recombinação homóloga foi confirmada por *southern blot* (Figura 7), usando como controle células das colônias que apresentavam, durante seu desenvolvimento, agregação e formação de corpo de frutificação normal. O DNA genômico de células selvagens digerido com *EcoRI* foi hibridizado contra um fragmento do gene *keaA* correspondente aos nucleotídeos 1879 a 3220, o que gera um tamanho esperado de 6 Kb para a banda hibridizada (canaletas 2 e 3). A

inserção do plasmídeo no gene aumenta o seu tamanho em 4 Kb. A inserção por recombinação homóloga no genoma aumenta o tamanho de *keaA* para 10 Kb, o que é observado em todos os clones que não agregaram analisados (Figura 7A) e na linhagem *yakA⁻/keaA⁻* obtida (Figura 7B).

Figura 7- Análise da interrupção do gene *keaA* na linhagem selvagem AX4 e no mutante *yakA*⁻. A) Southern blot de células selvagens para a confirmação da recombinação homóloga no sítio genômico *keaA*. A canaleta 1 contém o marcador de peso molecular. As demais canaletas contém o DNA genômico de clones digeridos com a enzima *EcoRI*. As canaletas 2 e 3 correspondem a DNA das colônias onde se observou agregação normal durante o desenvolvimento. As demais canaletas contém DNA de células selvagens AX4 transformadas que não apresentaram agregados. As flechas indicam as bandas correspondentes ao gene não interrompido e aos genes que apresentam um aumento de 4Kb que correspondem ao cassete de interrupção. B) Southern blot para a confirmação da recombinação homóloga no sítio genômico *keaA* em mutante *yakA*⁻. A canaleta 1 contém o marcador de peso molecular. A canaleta 2 contém o DNA genômico do DNA de *yakA*⁻ e *yakA*⁻/*keaA*⁻ digeridos com a enzima *ClaI*. As flechas indicam as bandas correspondentes ao gene não interrompido e aos genes que apresentam um aumento de 4Kb que correspondem ao cassete de interrupção.

4.3. Análise da seqüência do gene *keaA*

O gene isolado como o gene interrompido no mutante 13-8 foi seqüenciado com os primers T7 e SP6 e a seqüência de nucleotídeos determinada como idêntica à do gene DG1106 identificado pelo grupo do Dr. William Loomis como um gene necessário para a agregação (<http://glamdring.ucsd.edu/others/dsmith/dictydb.html>). O alinhamento das seqüências entre os clones 13-8 e DG1106 utilizando a ferramenta Clustal W DNA Sequence Alignment Analysis (Thompson et al., 1994) indicou 100% de identidade entre os dois genes. O clone DG1106 foi cedido pelo Dr. William Loomis da University of California em San Diego e utilizado para refazer o nocaute, já que possuía a inserção entre os aminoácidos 1041 e 1042, enquanto a inserção 13-8 ocorria entre os aminoácidos 1198 e 1199, ou seja, muito próxima do final da região codificadora de 1208 aminoácidos (Figura 8). O fenótipo de desenvolvimento e crescimento dos dois mutantes se mostrou o mesmo. O algoritmo BLAST indicou proteínas de grande similaridade a DG1106, tais como: Keap1 de camundongo (acesso BAA34639), a proteína Kelch-8 de rato e camundongo (XP_213995, NP_848856) e a proteína Diablo de *Drosophila* (AAF43447). Uma característica comum a essas proteínas é a presença de domínios Kelch e do domínio BTB/POZ. Pela similaridade aos genes da família Kelch, o isolado 13-8 foi denominado *keaA*⁻.

O gene *keaA* codifica para uma proteína de 1208 aminoácidos contendo domínios Kelch na região C-terminal, um domínio zf-C3CH4 (domínio RING) na região N-terminal e uma região rica em cisteínas central (Figura 8). O domínio BTB/POZ não é evidente. Um alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas Kelch de *Drosophila*, Keap1 de camundongo e *KeaA* de

Dictyostelium, indicou a presença de seis domínios Kelch, como indicado na Figura 9.

Figura 8 - Domínios presentes na proteína KeaA. O esquema representa uma distribuição esquemática dos domínios encontrados. Os números indicam o aminoácido do início e término de cada região. A seta I 1041 indica a posição da inserção do vetor no gene DG1106 e a seta I 1198 indica a posição da inserção no clone 13-8.

```

{eap1 -----
{ech -----
{eaA MMFVDSNGYQFYPQCFICKKLFTHPKTLRCNHSEFCSDCLELNSFSRSKQMLYHCRICGDK 60

{eap1 -----
{ech -----
{eaA TSSHEAWWNEQLTRYANEFKNYQLNGSIGGIVVNVNGNGHYNNNNNNNNNNININKNNNG 120

{eap1 -----
{ech -----
{eaA GINNINNNNNNGIINGNGSGNGNGNGNGSSGGNTAPIGSPNMGMKPPPLNLSLNGI 180

{eap1 -----
{ech -----
{eaA TNLNLNLGNINNNNNPSSPRGNAGGTVHQSPLLHHTSPSPIGSPAPSPYLLSSQLSPRS 240

{eap1 -----
{ech -----
{eaA ALPPQNGSGQFSPRIHPSSNSGGGSSQFSPLMVPPLPLNPLSSPSMMQLLTDETTSVS 300

{eap1 -----
{ech -----
{eaA TIGIMSNLSNGNSNNNNQQQQQQQGNPQPAQNEGGAG-----AEFVAPPPGLGAA 64
TLNKYNNINNNNSHHQHLLHHQPPQPPQVQPSQPQPQSTFQTQSPIQPPPIQQY 360
: * * :

{eap1 P-----RSSQFLPLWSKCPEG----- 26
{ech VGVAAMQQRNRLQQQQQQHHHQNPAEAG----- 94
{eaA YSKNNNEQHPSFSNHSPIFGGFSPLVNGPTNVYVNVVQSPHIRPTNSSTSSSVPSPP 420
: . : . : *

{eap1 -----AGD-----AVMYASTECKAEVTP----- 44
{ech -----SGLERGSCLLRYASQNSLDESSQKHVQRPN 124
{eaA VIMGSNNFNHINNNNNNNINSNNNNNNNNENINNNHNQFLYSCNNNNNNNTNNNNNN 480
. . * . : :

{eap1 SQDGN-----RTFSYTLEDHTKQAFGVMNEL 70
{ech GKERG-----TVGQYSNEQHTARSFDAMNEM 150
{eaA NNNNNNIGSNNNNNNNINNSHHIYKSNSNNNIFINNSLINNSNNNNNNITNNNNLI 540
.: . . : : . . * :

{eap1 RLSQQLCDVTLQVKYEDIPAAQFMAHKVVLASSSPVFKAMFTNGLREQGMEVVSIEGIH- 129
{ech RKQQLCDVILVADDVEI-----HAHRMVLASCSPYFYAMFTS-FEESRQARITLQSVD- 203
{eaA ISQTYINDNIFFITNNECLLHNSEIQYYCFECCSGVCAKCIYIDNQHYGHALKSLNDILN 600
. : * : : : : ..* : .. : : :

{eap1 -----
{ech -----
{eaA ETKQDYKATKQYLNQVRNKLHIQREISEQAIQCQPDLTQKQIKMKINTITQQLLNQVD 660

{eap1 -----PKVMERLIEFAYTASISVGEKCVLHVMNGAVMYQIDSVVRACSDFLVQQLDPSN 183
{ech -----ARALELLIDYVYTATVEVNEDNVQVLLTAANLLQLTDVRDACCDFLQTLQDASN 257
{eaA QDFNEFKNSLEIKRNLINQLLSDIEFEHKQNKKNQKQIQNKRGHYSNNIIINSNNNSN 720
. : * : : . . * . . : : *

{eap1 AIGIANFAEQIGCTELHQRAREYIYMHFGEVAKQEEFFNLSHCQLATLIS----- 233
{ech CLGIREFADIHACVELLNIAETIEQHFNEVIQFDEFNLNSHEQVISLIG----- 307
{eaA NHQQQIINDQMEYLELGNSNPTSPALHSSSSSSSITSTSSSTSSSTSSISSSSSSSSSSK 780
: : ** : * .. . * . : *

{eap1 -----RDDLNVRCESEVFHACIDWVKYDCPQ----- 259
{ech -----NDRISVPNEERVYECVIAWLRYDVPM----- 333
{eaA TSSPNSKGLIQINSLMNKKKPLLQSIQNSIQVSNIERSTWCLDLVENKLNLSSSSSSS 840
.: :.* .. : : .

```

```

(εap1      -----RRFYVQALLRAVRCHALTPrFLQTQLQKCEILQADARCKDYLVQIFQELTL-- 310
(εch      -----REQFTSLLMEHVRLPFLSKEYITQRVDKEILLEGNIVCKNLIIEALTYHLLPT 386
(εaA      SSQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQNNNNNNNISAPNSPIQNKLIENNEEIIINI 900
          :. . . : . . : : : : : : : : : :

(εap1      -HKPTQAVPCRA-PKVGRLIYTAGGYFRQSLSYLEAYNPSSNGSWLRLADLQVPRSGLAGC 368
(εch      ETKSARTVPRKP-VGMPKILLVIGGQAPKAIRSVEWYDLREEKQYQAAEMPNNRRCSRGLS 445
(εaA      INSTSLNLIRKSNLTIKFTIRFIYAIGGQLKQSVCEYSIQQNKWNVSEPMNFHRNRISAV 960
          ..: : :. : : . : : : * *. : .* : : * .

(εap1      VVG-GLLYAVGGRNNSPDGNTDSSALDCYNPMTNQWSPCASMSPVRNRIGVGVIDG-HIY 426
(εch      VLG-DKVVAVGGFN---GSLRVRTVDVYDPATDQWANCNMEARRSTLGVAALNG-CIY 499
(εaA      FDGKQYIYVFGGECF---GGFEKSVERYCIHDNKWVMGKEMPRERSRHATVFDGQRYIY 1016
          . * :*.** . : : * : : * . * * . . **

(εap1      AVGGSHGCIHSSVERYEPERDEWHLVAPMLTRRIGVGVAVLNRLLYAVGGFDGTNR--L 484
(εch      AVGGFDGTGLSSAEMYDPKTDIWRFIASMSTRSSVGVGVVHGLLYAVGGYDGFTRQCL 559
(εaA      IVGGKQDTWFSNQIDRFDILTQEYQSLKKMKVPRSDLIAIYDPRNGGSIYAIGGFNGKAL 1076
          *** . . : : : : : : * . * . . . : : . * . *

(εap1      NSAECYYPERNWRMITPMNTIRSGAGVCVLHN-CIYAAGG-YDGGDQLNSVERYDVETE 542
(εch      SSVERYNPDTDTWVNVAEMSSRRSGAGVGLNN-ILYRVGG-HDGPVRRSVEAYDCETN 617
(εaA      DIIEQYDIQSDKWVKVGKMRKQRDGPGAVYDGNN 1136
          . * * : : * : * . *.** . * : * ** ..* ..* : **

(εap1      TWTFVAPMRH--HRSALGITVHQKIIYVLGGYDGHFTLDSVECYDPDSDTWSEVTR-MTS 599
(εch      SWRSVADMSY--CRRNAGVVAHDGLLYVVGDDGTSNLASVEVYCPDSDSWRILPALMTI 675
(εaA      NIYVIGG-YFSEVLAEHQCTNIEKNEWNYLEP-MIE 1194
          * : : * . : * :*:** * . : * : : * : *

(εap1      GRSGVGVAVTMEPCRKQIDQQNCTC 624
(εch      GRSYAGVCMIDKPM----- 689
(εaA      PRGNALTYVEFQV----- 1208

```

Figura 9 – Alinhamento das seqüências da família Kelch. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas Kelch de *Drosophila*, Keap1 de camundongo e KeaA de *Dictyostelium*. (*) Identities. (:) Similaridades entre 3 seqüências. (.) Similaridades entre 2 seqüências. Os seis motivos kelch encontrados estão evidenciados em colorido. O domínio ring está evidenciado em vermelho e a região rica em cisteínas em rosa.

4.4- Análise do padrão de crescimento das células *keaA*⁻

Com o objetivo de investigar o padrão de crescimento do mutante *keaA*⁻, determinar se o duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻ teria a capacidade de suprimir o crescimento acelerado do mutante *yakA*⁻ e investigar a sensibilidade a SNP, H₂O₂ e temperatura do mutante *keaA*⁻, curvas de crescimento foram realizadas na presença ou não de 500μM de SNP, de 500μM de H₂O₂ e a 27°C.

Células selvagens duplicam a cada 8-10 horas. O tempo de duplicação das células *keaA*⁻ durante o crescimento exponencial foi de 20 a 24 horas (Figura 10). O duplo mutante apresentou um tempo de duplicação de 6-7 horas, similar ao mutante *yakA*⁻, o que indica que uma mutação em *keaA* não suprime o fenótipo de crescimento acelerado do mutante *yakA*⁻.

Quando as células foram crescidas na presença de SNP e H₂O₂, observou-se uma inibição do crescimento do duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻, mas ausência de lise como o observado para o mutante *yakA*⁻. O mutante *keaA*⁻, quando tratado com SNP ou H₂O₂, teve seu crescimento inibido mas não foi observada lise celular como para *yakA*⁻ (Figura 11 e 12).

O mutante *keaA*⁻ apresentou uma taxa de crescimento maior a 27°C do que a 22°C, enquanto as células selvagens apresentaram uma taxa de crescimento menor em altas temperaturas (Figura 13). O duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻ tem uma taxa de crescimento similar nas duas temperaturas, indicando uma menor sensibilidade ao choque térmico, enquanto o mutante *yakA*⁻ tem uma menor taxa de crescimento em altas temperaturas.

Para determinar o papel de *keaA* na proteção ao estresse oxidativo e nitrosoativo, a viabilidade das células *keaA*⁻ e do duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻ foi investigada e comparada à de células selvagens (WT) e *yakA*⁻. Para tanto, as

células foram submetidas a tratamento com 500 μ M de SNP e 500 μ M de H₂O₂ por 24 horas e plaqueadas em associação com bactérias *Klebsiella aerogenes*. As colônias formadas foram contadas e o percentual de sobrevivência em comparação às células não tratadas foi determinado (Tabela I). O mutante *keaA*⁻ e o duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻ apresentaram uma taxa de sobrevivência de 80,4 e 88,1% respectivamente após 24 h de tratamento com SNP em comparação a 83,6% das células selvagens e 35,6% do mutante *yakA*⁻. Com o tratamento com H₂O₂, a taxa de sobrevivência do mutante *keaA*⁻ e o duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻ foi de 100 e 88,1% respectivamente após 24 horas de tratamento, em comparação a 67,3% das células selvagens e 15,3 % do mutante *yakA*⁻. Esses resultados indicam que uma mutação no gene *keaA* confere resistência a tratamento prolongado com SNP e H₂O₂, suprimindo a morte induzida por estes compostos no nulo da *yakA*⁻. Tratamento por 12 horas não indicou resistência, mas isso pode ser reflexo do maior tempo de duplicação apresentado pelo mutante *keaA*⁻.

Figura 10 - Padrão de crescimento de *keaA*⁻. As células selvagens (WT), *yakA*⁻, *keaA*⁻ e *yakA*⁻/*keaA*⁻ foram diluídas numa densidade inicial de 5×10^5 células/mL em meio HL-5 e contadas em intervalos regulares de 3 vezes ao dia durante 5 dias. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 11 – Uma mutação em *keaA* suprime a morte induzida por SNP no mutante *yakA*⁻. As células selvagens (WT), *yakA*⁻, *keaA*⁻ e *yakA*⁻/*keaA*⁻ foram diluídas numa densidade inicial de 5×10^5 células/mL em meio HL-5 contendo ou não SNP 500 μ M e contadas em intervalos regulares de 3 vezes ao dia durante 5 dias. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 12 – Uma mutação em *keaA* suprime a morte induzida por H₂O₂ no mutante *yakA*⁻. As células foram diluídas numa densidade inicial de 5×10^5 células/mL em meio HL-5 contendo ou não H₂O₂ 500 μ M e contadas em intervalos regulares de 3 vezes ao dia durante 5 dias. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 13 – *keaA*⁻ cresce melhor em temperatura elevada. As células foram diluídas numa densidade inicial de 5×10^5 células/mL em meio HL-5, mantidas a 22°C ou a 27°C e contadas em intervalos regulares de 3 vezes ao dia durante 5 dias. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tratamento	% de sobrevivência			
	WT	<i>yakA</i> ⁻	<i>keaA</i> ⁻	<i>yakA</i> ⁻ / <i>keaA</i> ⁻
SNP 12h	93.5 ± 4,2	85.2 ± 6,6	86.0 ± 4,0	90.0 ± 2,3
SNP 24h	83,6 ± 3,2	35.6 ± 5,1	80.4 ± 3,8	88.1 ± 3,6
H ₂ O ₂ 12h	87.3 ± 3,0	75.3 ± 4,5	68.7 ± 4,7	94.5 ± 3,1
H ₂ O ₂ 24h	67,3 ± 2,0	15.3 ± 2,5	100.0 ± 4,3	88.1 ± 3,7

Tabela I – O mutante *keaA*⁻ é resistente a estresse nitrosoativo e oxidativo prolongado. A linhagem selvagem e o mutantes nulo para *keaA*, nulo para *yakA* e nulo para *yakA/keaA* foram tratados com 500µM SNP ou 500µM de H₂O₂ e cerca de 200 células foram plaqueadas em placa SM na presença de 400µl de *klebsiella aerogenes* após 12 e 24 hs as colônias que sobreviveram ao tratamento foram contadas.

4.5. Análise do padrão de expressão do mRNA para *keaA*

Para determinar se a expressão de *keaA* seria modulada em resposta à estresses, a expressão do mRNA de *keaA* foi analisada por *northern blots* durante o crescimento de células submetidas a tratamento com SNP e H₂O₂ por 24 horas. Alíquotas de células foram coletadas após 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas de tratamento. O RNA total dessas células foi submetido a eletroforese em gel de agarose/formaldeído e transferido para uma membrana de náilon. Os *northern blots* foram hibridizados contra um fragmento do gene *keaA*, correspondente aos nucleotídeos 1879 a 3220, marcado radioativamente com α -³²P-dCTP. Como *keaA*⁻ foi isolado como um supressor do mutante *yakA*⁻ e a YakA é um regulador da atividade da PKA, os níveis de mRNA de *keaA* foram analisados na linhagem selvagem (WT), *yakA*⁻ e *pkaC*⁻. A Figura 14 apresenta os níveis de expressão de *keaA* durante o tratamento com SNP (A) e H₂O₂ (B). Observa-se que há uma indução transiente da expressão de *keaA* após 2 horas de tratamento em células selvagens. A indução por SNP foi menos transiente em células *yakA*⁻ e *pkaC*⁻, onde o retorno aos níveis basais foi observado em 24 horas. O tratamento com H₂O₂ levou a um efeito oposto nos mutantes *yakA*⁻ e *pkaC*⁻, onde foi observada uma diminuição de níveis de mRNA de *keaA* seguida de oscilações nos níveis de expressão.

Os níveis de expressão de mRNA para *keaA* ao longo do desenvolvimento de *Dictyostelium* foram determinados. As células selvagens (WT), *yakA*⁻ e *pkaC*⁻ foram submetidas a carenciamento nutricional em filtro de nitrocelulose. Alíquotas de células foram retiradas após 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas de carência, quando se observou a formação completa do corpo de frutificação. A Figura 15A mostra que os níveis de expressão de *keaA* foram

diminuídos em resposta à carência nutricional, mantidos baixos durante a agregação e culminação (12 e 20 horas) e aumentados durante a formação do corpo de frutificação (24 horas). Como a diminuição dos níveis de transcrito foi aparente já com 4 horas de carência, pontos anteriores foram tomados. Um novo experimento de carenciamento nutricional em filtro foi realizado e alíquotas de células foram retiradas após 0, 1, 2 e 3 horas de carência. A diminuição ocorre já a partir de 1 hora, em resposta à carência nutricional (Figura 15B). No mutante *yakA*⁻ não se observa a mesma redução nos níveis do transcrito. Não é observada diminuição dos níveis de mRNA no mutante *pkaC*⁻.

Figura 14 – A expressão do mRNA *keaA* é induzida na presença de SNP ou H₂O₂. Análise por northern blot do padrão de expressão de mRNA do gene *keaA* em células selvagens (WT), nulas para *yakA* e nulas para *pkaC* tratadas com SNP 500 µM (A) e H₂O₂ 500 µM (B). Amostras de RNA total foram coletadas após 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas de tratamento. No painel a esquerda está o northern blot hibridizado contra um fragmento de *keaA* e a direita o mesmo northern blot hibridizado contra um fragmento correspondente ao gene constitutivo IG7 marcados radioativamente com α -³²P-dCTP.

Figura 15– A expressão de *keaA* é regulada durante o desenvolvimento. A) Análise por northern blot do padrão de expressão de mRNA do gene *keaA* em células selvagens (WT), nulas para *yakA* e nulas para *pkaC* carenciadas em filtro de nitrocelulose por 24 h. B) Análise por northern blot do padrão de expressão de mRNA do gene *keaA* em células selvagens (WT) carenciadas por 3 h. O mesmos northern blots foram hibridizados contra um fragmento correspondente ao gene *keaA* e ao gene constitutivo IG7 marcados radioativamente com α - ^{32} P-dCTP como indicado.

4.6- Análise do padrão de desenvolvimento do mutante *keaA*⁻

Com o objetivo de determinarmos a morfologia geral das fases do desenvolvimento do mutante *keaA*⁻ em comparação com a linhagem selvagem, estas foram cultivadas na presença de *Klebsiella aerogenes*. As placas foram mantidas a 22°C e observadas até a formação do corpo de frutificação. Os agregados do mutante *keaA*⁻ se apresentaram menos definidos e os soros com tamanho menor (Figura 16). As células selvagens apresentaram a borda da colônia (região onde as amebas possuem alimento) bem definida, enquanto nos mutantes essa região se mostrou heterogênea. Isto se interpreta como a difusão de amebas dentro da massa de bactérias sem utilização completa do alimento. Em adição, o mutante *keaA*⁻ apresentou uma grande região da colônia sem agregados (maior área de transição). Os agregados se formam imediatamente na borda das colônias de linhagens selvagens depletadas de alimento. O tempo necessário para a formação do corpo de frutificação também se mostrou alterado. Na linhagem selvagem, agregados celulares foram observados depois de 61 horas de carência, culminantes após 66 horas e corpo de frutificação após 73 horas; o mutante *keaA*⁻ agregou com 73 horas, culminou com 88 horas e teve o seu corpo de frutificação formado completamente com 97 horas (Figura 17).

A eficiência de agregação foi testada no mutante *keaA*⁻ em diferentes densidades celulares. Quando células selvagens foram carenciadas em placas de ágar/fosfato a uma densidade de $1,57 \times 10^5$ células/cm², foi observada a formação de ondas espirais após 8 horas do plaqueamento, sendo que o mutante *keaA*⁻ atingiu este estágio em 12 horas. Novamente, o corpo de frutificação da linhagem mutante apresentou tamanho menor quando

comparado ao da linhagem selvagem (Figura 18). Células selvagens carenciadas em filtro de nitrocelulose em uma densidade de $28,88 \times 10^5$ células/cm² agregaram após 8 horas e apresentaram o corpo de frutificação completamente formado em 24 horas. O mutante *keaA*⁻ agregou após 9 horas de carência e apresentou corpos de frutificação após 20 horas. O mutante apresentou tamanho menor quando comparado ao do selvagem, apesar de formar seu corpo de frutificação mais rápido que o selvagem. (Figura 19).

O plaqueamento em filtro de nitrocelulose se revelou o mais adequado para a indução da agregação do *keaA*⁻. O fato da dificuldade no processo de agregação se revelar mais pronunciada em células crescidas na presença de *Klebsiella* e em células carenciadas em ágar/fosfato poderia indicar uma maior sensibilidade à densidade celular no momento inicial da carência, já que, nestas condições, um menor número de células está disponível. Para investigarmos essa possibilidade, as células foram plaqueadas em diferentes densidades e o tempo de agregação foi analisado. A tabela II mostra que as células mutantes não são capazes de agregar em densidades celulares menores, indicando uma possível deficiência na comunicação celular.

Figura 16 - Colônias do mutante *keaA*⁻ possuem morfologia alterada. Comparação do desenvolvimento de células selvagens e *keaA*⁻ em placas SM contendo *Klebsiella aerogenes*. As barras mostram a zona de transição.

Figura 17 - O mutante *keaA*⁻ apresenta deficiência no desenvolvimento quando crescido na presença de *Klebsiella aerogenes*. Comparação das fases do desenvolvimento (agregação, culminação e corpo de frutificação) de células selvagens (WT) e *keaA*⁻ em placas contendo *Klebsiella aerogenes*. Ao lado das fotos está indicado o tempo necessário para que cada etapa fosse atingida.

Figura 18 - O mutante *keaA*⁻ apresenta um atraso no processo de desenvolvimento quando carenciado em baixa densidade celular. A linhagem selvagem e o mutante *keaA*⁻ foram submetidas a carência nutricional em placas de ágar-fosfato mantida em câmara úmida escura até a formação do corpo de frutificação.

Figura 19 - O mutante nulo para *keaA* não apresenta um atraso significativo no processo de desenvolvimento quando carenciado em alta densidade celular. A linhagem selvagem e o mutante *keaA*⁻ foram submetidos a carência nutricional em filtro de nitrocelulose, mantido a 22°C em uma câmara úmida. O período de formação dos agregados até a formação do corpo de frutificação está indicado.

Células/placa	Densidade Celular ($\times 10^5$ cels/cm ²)	WT	<i>keaA</i> ⁻
2.5×10^7	3.92	9 h	12 h
1.0×10^7	1.57	11 h	16 h
5.0×10^6	0.78	14 h	-
1.0×10^6	0.15	-	-

Tabela II – O mutante *keaA*⁻ é deficiente na agregação em baixas densidades.

A linhagem selvagem e o mutante *keaA*⁻ foram submetidos a carência nutricional em placas de ágar-fosfato em diferentes densidades celulares e mantidos em câmara úmida escura até a formação do agregado celular. O tempo para a formação de agregados está indicado.

4.7- Análise do padrão de expressão de genes de desenvolvimento no mutante *keaA*⁻

Os dados descritos acima indicam que o mutante *keaA*⁻ apresenta um atraso na agregação celular de 12 horas durante o processo de desenvolvimento quando plaqueado na presença de *Klebsiella aerogenes*. Para investigarmos se o gene *keaA* seria necessário para a indução da Proteína Quinase dependente de cAMP (*pkaC*) e do receptor de cAMP (*carA*) nessas condições, alíquotas de células foram retiradas durante o crescimento vegetativo na presença de *Klebsiella* e após a sua exaustão nas fases de agregação e culminação. A análise dos níveis de mRNA para *pkaC* e *carA* por *northern blots* indicou que estes não foram induzidos durante a carência nutricional no mutante *keaA*⁻ (Figura 20). Quando este mutante foi carenciado em filtro de nitrocelulose, onde as células são colocadas em uma maior densidade e menor área, e onde o processo de agregação ocorreu com apenas 1 hora de diferença, a indução da *pkaC* na ausência de *keaA* foi similar à de células selvagens (Figura 21).

Figura 20 - Não há indução da *pkaC* e *carA* na ausência do gene *keaA* durante a carência nutricional em baixa densidade. Análise do padrão de expressão de mRNA para o gene da *pkaC*, *carA* e IG7, em células selvagens (WT) e no mutante *keaA*⁻ por northern blot. Amostras de RNA total foram preparadas de células carenciadas em placas na presença de *Klebsiella aerogenes* nos estágios de crescimento, agregação e culminação.

Figura 21 – A *pkaC* é induzida na ausência do gene *keaA* durante a carência nutricional em alta densidade. Análise do padrão de expressão de mRNA para o gene da *pkaC* e IG7 de expressão constitutiva, em células selvagens (WT) e nulas para *keaA* por northern blot. Amostras de RNA total foram preparadas de células carenciadas em filtro de nitrocelulose nos estágios de crescimento, agregação e culminação.

4.8- Análise do papel da *pkaC* na resposta a estresses

Um segundo supressor da morte induzida por SNP no mutante *yakA*⁻ foi isolado pela mesma técnica de REMI, sendo identificado como um mutante do gene para a subunidade catalítica da PKA, *pkaC* (Taminato et al., 2002, anexo I).

Para investigar o papel da PKA-C na resposta ao estresse nitrosoativo, curvas de crescimento na presença de 500µM de SNP da linhagem selvagem e dos mutantes *yakA*⁻, *pkaC*⁻, *yakA*[*pkaC/pkaC*], *yakA*⁻/*pufA*⁻, *yakA*⁻/*pkaC*⁻ foram realizadas. O mutante *yakA*⁻/*pufA*⁻ foi utilizado pois havia sido determinado anteriormente que esta linhagem apresentava níveis aumentados de *pkaC* (Souza et al., 1999). Da mesma maneira, a linhagem *yakA*⁻ que super-expressa a *pkaC* sob controle de seu próprio promotor (*yakA*⁻[*pkaC/pkaC*]) também foi avaliada (Figura 22). Células com disrupção no gene da *pkaC* tratadas com SNP apresentaram uma taxa de crescimento maior do que as células selvagens e *yakA*⁻ nas mesmas condições. O oposto foi observado para as células que super-expressam a *pkaC* (*yakA*⁻[*pkaC/pkaC*]) e *yakA*⁻/*pufA*⁻ que se mostraram mais sensíveis a SNP.

Para determinar se a YakA, PKA e adenilil ciclase (*AcaA*) teriam um papel na regulação da resposta também ao choque térmico em *Dictyostelium*, curvas de crescimento foram realizadas da linhagem selvagem e dos mutantes *yakA*⁻, *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ a 27°C e 30°C (Figura 23). A 27°C, a inibição do crescimento foi mais pronunciada nas primeiras 72 horas de tratamento das células selvagens, células *pkaC*⁻ e *acaA*⁻. As células *yakA*⁻ foram menos afetadas pelo tratamento durante as primeiras 96 horas e após este período o

mutante parou de crescer. A 30°C, a inibição ocorreu em todas as linhagens, sendo que na linhagem selvagem a inibição foi mais pronunciada.

Para determinar o papel de *yakA*, *pkaC* e *acaA* na proteção ao estresse térmico, foi observada a viabilidade das células após crescimento em alta temperatura nos mutantes *yakA*⁻, *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ em comparação às células selvagens (WT). Para tanto, as células foram mantidas a 30°C ou a 22°C por 24 horas e plaqueadas em placas SM em associação com bactérias *Klebsiella aerogenes*. As colônias formadas foram contadas e o percentual de sobrevivência em comparação às células não tratadas foi determinado (Tabela III). Os mutantes *yakA*⁻, *pkaC*⁻ e *acaA*⁻, quando tratados a 30°C por 12 e 24 horas, são mais resistentes ao estresse térmico do que as células selvagens.

Para determinarmos se a hiper-sensibilidade do mutante *yakA*⁻ ao estresse estaria associada ao ciclo celular, o tratamento com SNP foi aplicado a células incubadas a 10°C, temperatura na qual não ocorre a divisão celular. A sensibilidade das células *yakA*⁻ ao tratamento com SNP a 22°C foi suprimida quando estas células foram incubadas a 10°C na presença de SNP (Tabela III). Isso indica que a divisão celular é necessária para que ocorram os danos que levam à morte do mutante em resposta a estresses.

Figura 22 – A PKA está envolvida na inibição do crescimento em resposta a SNP. As células selvagens (WT), *yakA*⁻ e *pkaC*⁻ foram diluídas numa densidade inicial de 5×10^5 células/mL em meio HL-5 contendo ou não SNP 500 μ M e contadas em intervalos regulares de 2 vezes ao dia durante 5 dias. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 23 – As células *yakA*⁻, *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ são mais resistentes a elevadas temperaturas. As células selvagens (WT), *yakA*⁻, *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ foram diluídas numa densidade inicial de 5×10^5 células/mL em meio HL-5 a 27 ou 30°C e contadas em intervalos regulares de 2 vezes ao dia durante 5 dias. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tratamento	% de sobrevivência			
	WT	<i>yakA</i> ⁻	<i>pkaC</i> ⁻	<i>acaA</i> ⁻
SNP 24h	83.6± 3.2	35.6 ± 5.1	95.0 ± 2.0	95.3 ± 1.5
SNP 24h a 10°C	96.1± 3.4	90.2 ± 2.1	99.8 ± 9.1	n.d.
30°C 12h	66.5± 5.4	71.6 ± 5.1	70.0 ± 2.4	76.3 ± 3.7
30°C 24h	58.4± 6.2	85.5 ± 4.0	69.0 ± 3.1	67.2 ± 4.3

Tabela III - Índice de sobrevivência de células submetidas ao estresse nitrosoativo e choque térmico. A linhagem selvagem e os mutantes, *yakA*⁻, *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ foram tratados com 500µM SNP a 10°C e a 30°C por 12 e 24 h e cerca de 200 células foram plaqueadas na presença de *Klebsiella aerogenes*. Após 12 e 24 hs as colônias que sobreviveram ao tratamento foram contadas.

5- Discussão

5.1- Caracterização do padrão de crescimento e sensibilidade a estresses das células selvagens e mutantes de *Dictyostelium*

O óxido nítrico tem uma variedade de efeitos em diferentes tecidos ou células (Lancaster, 1992; Stamler, 1994; Schimitdt e Walter, 1994). Baixos níveis de NO^* têm a função de mediar a comunicação celular, como por exemplo, transmissão neuronal, a inibição da agregação plaquetária e o relaxamento vascular. Altas concentrações de óxido nítrico levam à inibição da síntese de DNA, danos em mitocôndrias, perda da integridade da membrana, apoptose e mudanças no ciclo celular (Burney et al., 1997) provavelmente via produção de peroxinitrito. As células de *Dictyostelium* produzem óxido nítrico como uma molécula sinalizadora. O NO^* é produzido nessas células durante todo o crescimento e aumenta durante a fase de pré-agregação na transição do crescimento para o desenvolvimento (Tao et al., 1997).

O estresse oxidativo pode causar danos em todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. O peróxido de hidrogênio pode ser uma molécula sinalizadora ou em altas concentrações de H_2O_2 pode ser capaz de inativar algumas enzimas diretamente, usualmente por oxidação de grupos tiois (-SH) em seu sítio ativo. Um exemplo de enzima que pode ser inativada diretamente por H_2O_2 é a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma enzima da via glicolítica. H_2O_2 pode atravessar a membrana celular e reagir com íons ferro ou cobre resultando em uma espécie altamente reativa: o radical hidroxila (OH^*), capaz de causar grandes danos às biomoléculas. Uma outra forma de conversão de H_2O_2 pode em OH^* pode ser feita por luz ultravioleta (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A resposta dos organismos ao estresse causado pela elevação da temperatura é o aumento da velocidade de síntese de um grupo específico de proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico (Hsps). Desta forma, sabe-se que as proteínas Hsp10, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp104 de eucariotos são homólogas às proteínas de *E. coli*, GroES, GroEL, DnaK, HtpG e ClpB, respectivamente (Lindquist & Craig, 1998).

A indução de Hsps em condições de estresse permite que a célula possa se recuperar da desnaturação protéica, possibilitando que formas desnaturadas possam voltar à conformação nativa, impedindo a formação de agregados, ou mesmo por degradar as proteínas que foram irreversivelmente desnaturadas. Assim, várias Hsps são chaperones moleculares e outras são proteases. As chaperonas moleculares são proteínas essenciais em condições fisiológicas normais, pois interagem com polipeptídeos recém-sintetizados, promovendo o seu correto enovelamento, evitando agregação, e se associam a proteínas a serem secretadas ou transportadas através de membranas, garantindo o seu endereçamento correto (Craig et al., 1993). Além disso, essas proteínas auxiliam na formação de complexos oligoméricos e são capazes de endereçar proteínas desnaturadas para proteólise (Ellis & Hemmingsen, 1989).

O choque térmico pode causar o estresse oxidativo nas células por ativar os fagócitos a produzirem ROS, liberando íons ferro e cobre, estimulando assim a conversão de H_2O_2 em $\cdot OH$. Os íons cálcio também podem ser liberados, estimulando a NOS dependente de calmodulina a produzir $\cdot NO$ aumentando o risco de produção de peroxinitrito ou danos na mitocôndria aumentando o vazamento de superóxido (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O tratamento com 500 μ M de SNP, espermina NONOato ou H₂O₂ levaram a uma inibição do crescimento em células selvagens (Figura 4). Essa inibição foi fortemente abolida quando o SNP foi acrescido, após a adição de oxi-hemoglobina, um seqüestrador de óxido nítrico. Nos mutantes *yakA*⁻ foi observada lise celular após 24 horas de tratamento com SNP e H₂O₂ (Figura 5A e 6). As curvas de crescimento indicaram morte das células *yakA*⁻ sob condições de estresse oxidativo e nitrosoativo. O tratamento com SNP não produz danos irreversíveis em células selvagens, já que quando o SNP foi removido e trocado por meio fresco foi observada a recuperação do crescimento dessas células, enquanto no mutante *yakA*⁻ isso não foi observado (Figura 5B e 5C). A observação do padrão de crescimento durante as primeiras horas de estresse indicaram que as células *yakA*⁻ duplicam nas primeiras horas de tratamento, mas depois morrem. As células selvagens, no entanto, mostraram uma imediata inibição do crescimento, o que pode ser a causa de proteção dessas células dos efeitos deletérios do estresse na divisão celular. Quando as células foram tratadas com SNP a 10°C (Tabela III), uma temperatura onde não há crescimento das células de *Dictyostelium*, não se observou a perda da viabilidade celular nas células *yakA*⁻, indicando que a morte celular em condições de estresse pode estar diretamente relacionada com a incapacidade de interrupção do crescimento deste mutante.

5.2- Isolamento de supressores da morte induzida por SNP no mutante *yakA*⁻

A descoberta de que cAMP estava envolvido na resposta a estresse oxidativo e nitrosoativo veio do isolamento da *pkaC* como um supressor de um

segundo sítio da morte induzida por SNP em mutantes *yakA*⁻. Da mesma maneira *keaA* foi isolado.

A quinase PKA tem sido mostrada como essencial para a agregação, diferenciação celular em células pré-esporos e pré-talo e germinação de esporos (Loomis, 1998). A subunidade catalítica e a regulatória da PKA também estão presentes em baixos níveis durante o crescimento, mas o mutante desse gene cresce normalmente durante essa fase. Os nossos dados são os primeiros a indicar um papel para esta quinase na resposta a outros estresses, que não o nutricional em *Dictyostelium*. Tratamento com SNP e H₂O₂ induzem síntese de cAMP e aumento de atividade da PKA (Taminato et al., 2002: Anexo 1) de uma maneira dependente de *keaA* (resultados não mostrados). Mutantes *acaA*⁻ apresentam viabilidade aumentada em resposta a estresse e maiores taxas de crescimento indicando que cAMP é necessário para a parada do crescimento que permite o reparo dos danos,

As células com disrupção no gene da *pkaC* tratadas com SNP apresentaram maior taxa de crescimento do que as células selvagens e *yakA*⁻ nas mesmas condições. No entanto, as células que super-expressam a *pkaC* são mais sensíveis ao mesmo tratamento (Figura 22). Esses resultados indicam que a *yakA* é essencial para a sobrevivência das células de *Dictyostelium* em condições de estresses, a menos que a *pkaC* esteja ausente. As células *yakA*⁻ têm uma alta taxa de morte quando comparadas às células selvagens, *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ sob condição de estresse (Tabela III).

A observação do crescimento das células *yakA*⁻, *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ indicam um papel da YakA, PKA-C e cAMP na regulação da tolerância térmica. A YakA parece ter um papel na resposta ao estresse térmico prolongado porque,

quando as células *yakA*⁻ foram crescidas a 27°C, foram menos afetadas pelo tratamento durante as primeiras 96 horas do que as células *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ que apresentaram inibição do crescimento mais pronunciada nas primeiras 72 horas. Quando as mesmas células foram crescidas a 30°C, ocorreu uma inibição do crescimento em todas as linhagens, sendo a linhagem selvagem a mais afetada (Figura 23). Os mutantes *yakA*⁻, *pkaC*⁻ e *acaA*⁻, quando tratados a 30°C por 12 e 24 horas, são mais resistentes ao estresse térmico do que as células selvagens (Tabela III).

Na análise das curvas de crescimento, observamos que o mutante *keaA*⁻ possui um tempo de duplicação durante o crescimento exponencial de 20-24 horas, enquanto as células selvagens foi de 8-10 horas. Em contrapartida, o duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻ tem um tempo de duplicação celular de 6-7 horas, comparável ao mutante *yakA*⁻, o que indica um fenótipo de ciclo celular alterado para ambos os genes. Esses dados mostram que o gene *keaA* é necessário para o crescimento, mas não suprime o crescimento acelerado da *yakA* (Figura 10).

Quando as células foram tratadas com SNP ou H₂O₂, tanto o mutante *keaA*⁻ quanto o duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻ tiveram seu ciclo celular inibido, em níveis comparáveis à linhagem selvagem, enquanto o mutante *yakA*⁻ apresentou lise celular após 24 horas de tratamento com SNP e 12 horas após tratamento com H₂O₂. Esses resultados indicam que uma segunda mutação no gene *keaA* suprimiu a morte induzida pelo tratamento ao estresse oxidativo e nitrosoativo (Figura 11 e 12).

Quando submetemos as células *keaA*⁻ a estresse térmico verificamos que o mutante cresce melhor a 27°C do que a 22°C. O duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻

keaA⁻ não tem alteração no seu crescimento devido ao aumento de temperatura (Figura 13). No teste de viabilidade celular, observamos que, após o tratamento com SNP e H₂O₂, tanto o mutante *keaA*⁻ quanto o duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻ apresentam um alto índice de sobrevivência em comparação ao mutante *yakA*⁻ (Tabela I). Os resultados obtidos indicam que uma mutação no gene *keaA* confere resistência ao estresse oxidativo, nitrosoativo e térmico.

Em conjunto os resultados indicam um papel para a via YakA, PKA, KeaA e cAMP na regulação do ciclo celular em resposta a estresses. O papel da YakA é similar ao observado para Yak1 de levedura que confere termotolerância às células (Garrett et al., 1991; Garrett and Broach, 1989). A *yakA* agiria como um atenuador do ciclo celular, inibindo o crescimento em resposta a estresses e ativando mecanismos de defesa via ativação da PKA. *keaA* seria um modulador desse efeito sendo necessário para a ativação de processos protetores ao estresse e regulação dos níveis da PKA. A correta regulação de todos esses elementos parece permitir a parada do crescimento em resposta ao estresse sem comprometimento da viabilidade celular. Em células selvagens, uma parcela da população morre em resposta aos estresses mas a maioria sobrevive e retoma o crescimento se o agente deletério for retirado ou se as condições nutricionais se regularizarem. Apesar de uma aparente maior capacidade de crescimento dos mutantes na presença de estresses, o crescimento persistente certamente levaria ao aparecimento de mutantes e alterações fenotípicas muitas vezes indesejáveis.

5.3- Arquitetura de KeaA

keaA apresenta similaridade com Keap1 de camundongo, a proteína Kelch de *Drosophila* e as proteínas pertencentes a família Kelch.

O gene *keaA* possui similaridade aos genes que possuem domínios Kelch, onde encontramos 6 repetições desta seqüência. A estrutura dos domínios Kelch foi determinada na oxidase galactosidase de fungo onde um grupo de sete motivos Kelch formam coletivamente uma estrutura de folha β -pregueada. As proteínas que possuem domínios Kelch têm um número variado de repetições desses motivos, bem como da posição destas repetições na suas seqüências (Adams et al., 2000).

As proteínas que possuem domínios Kelch participam de uma grande variedade de processos celulares. A proteína Kelch de *Drosophila* está envolvida na manutenção dos canais que são formados entre os oócitos em desenvolvimento e as células *nurse*. Esses canais permitem a comunicação e troca de citoplasma entre as células *nurse*, e sua formação envolve a organização de filamentos de actina em forma de anel (Xue e Cooley, 1993). A proteína Kelch se associa com o citoesqueleto de actina nos canais durante a sua formação, e aparentemente é importante para o crescimento e manutenção desses canais. (Robinson e Cooley, 1997).

A proteína Keap1 de camundongo foi identificada por interagir com o fator de transcrição Nrf2 (Itoh et al., 1999; Hayes e MacMahon, 2001). O fator de transcrição Nrf2 é um regulador geral de defesa em resposta a espécies reativas de oxigênio em camundongos. Nrf2 regula a expressão induzida de enzimas detoxificadoras como a glutathione-S-transferase, a NADPH:quinona

oxidoredutase, heme oxygenase-1, A170, peroxiredoxina MSP23 e a atividade do sistema de transporte de cistina de membrana (Ishii et al., 2000).

Keap1 regula a atividade de Nrf2 seqüestrando-o no citoplasma. Sugere-se que a região dos domínios Kelch seja responsável por ancorar o complexo Keap1-Nrf2 no citoesqueleto de actina, enquanto a integridade desse complexo no citoplasma depende da dimerização do domínio BTB/POZ de Keap1 (Zipper e Mulcahy, 2002).

keaA possui um domínio rico em cisteínas. É possível que esse domínio atue como um sensor do estado redox da célula. Experimentos preliminares indicam um papel para esse domínio na regulação da fase de culminação (não mostrado). Quando o domínio é super-expresso em células selvagens, observamos culminantes aberrantes de uma maneira similar à observada nos mutantes *pufA*⁻ e em células que super-expressam a *yakA* (Souza et al., 1998; Souza et al., 1999). Ambas têm atividade aumentada da *pkaC*, o que indicaria que o estado redox da célula poderia estar modulando a atividade da PKA. Keap1 é rico em resíduos de cisteínas. Esses resíduos são 'sensores' celulares protéicos dotados de grupos tiois que reconhecem e reagem covalentemente com as moléculas indutoras (eletrófilos e oxidantes), causando a dissociação do complexo Keap1-Nrf2, liberando Nrf2 que migra para o núcleo ligando-se aos elementos de resposta anti-oxidante (ARE) e ativando a transcrição de enzimas detoxificadoras (Dinkova-kostova et al., 2002). A PKC, proteína quinase C, que induz a translocação nuclear do fator de transcrição e ativação do ARE em resposta ao estresse oxidativo, catalisa a fosforilação de Nrf2 no resíduo de Ser-40, localizado no domínio Neh2, sob condição de estresse oxidativo, facilitando a dissociação de Nrf2 de Keap1 (Huang et al., 2002). O

motivo Glu-Thr-Gly-Glu da região C-terminal do domínio Neh2 de Nrf2 é essencial para a interação de Nrf2 com Keap1 em condições de não estresse (Kobasyashi et al., 2002). Além disso, Keap1 é essencial para aumentar a velocidade de degradação de Nrf2 em condição de não estresse. Nrf2 é degradado através da via proteossomo/ubiquitina e o domínio Neh2 é responsável em parte pela degradação por interagir diretamente com Keap1. Em condição de estresse, Nrf2 é liberado para o núcleo havendo uma diminuição na velocidade de proteólise. Nrf2 é, portanto, estabilizado no núcleo. Sugere-se que a eficiência de degradação de Nrf2 depende da presença do sinal de degradação, mas também requer uma localização específica do substrato no citoesqueleto que facilita a degradação proteossomal (MacMahon et al., 2003; Itoh et al., 2003). Acredita-se, portanto, que o complexo Keap1-Nrf2 age como detector e efetuator da resposta ao estresse por radicais. É possível que *keaA* interaja com um fator de transcrição modulando a expressão de enzimas detoxificantes. *Dictyostelium* não possui no entanto um gene similar a Nrf2.

KeaA possui os domínios Kelch associados ao domínio zf-C3HC4 (RING). Esta combinação é encontrada também na proteína 5P24 de *C. elegans*. Esta é uma proteína essencial para a fertilidade do macho, identificada em experimentos de RNAi em larga escala (Kamath et al., 2003). O domínio zf-C3HC4 (RING) foi identificado como tendo uma região conservada rica em cisteínas e parece estar envolvido na intermediação das interações proteína-proteína e, em alguns casos, na formação de complexos multi-protéicos (Saurin et al., 1996). É interessante mencionar que a proteína PUF de *C. elegans* também regula a diferenciação das células germinativas, o que

poderia indicar uma conservação de elementos de sinalização entre *Dictyostelium* e este organismo.

5.4- Análise da expressão de *keaA*

Os níveis de expressão do mRNA do gene *keaA* durante o crescimento em resposta ao estresse nitrosoativo/oxidativo são induzidos transientemente após as primeiras 2 horas de tratamento com SNP ou H₂O₂ em células selvagens (Figura 14). A indução é menos transiente em células *yakA*⁻ e *pkaC*⁻ tratadas com SNP, onde o retorno aos níveis basais foi observado após 24 horas. É possível que o aumento de *keaA* dispare o processo de inibição do ciclo celular mas que a redução da sua expressão seja necessária para a manutenção de baixas taxas de crescimento. A redução parece ser dependente de *yakA* e *pkaC*, e mutantes para estes genes continuam a crescer na presença de SNP. O crescimento continuado e a desregulação de *keaA* na ausência do atenuador de crescimento *yakA* parece ser letal para as células. No mutante *pkaC* as células continuam a crescer, e experimentos preliminares indicam um maior acúmulo de mutações, que eventualmente devem inviabilizar o crescimento. Estes efeitos ainda não são bem compreendidos já que o tratamento com H₂O₂ levou a um efeito oposto nos mutantes, onde uma diminuição de mRNA de *keaA* foi observada seguida por oscilações nos níveis de expressão. A análise dos resultados mostram que a expressão de *keaA* é induzida por SNP e H₂O₂, mas estes compostos tem efeitos distintos nos mutantes *yakA*⁻ e *pkaC*⁻. É possível que as células reajam a presença destes por mecanismos diferentes ou que a cinética da resposta seja distinta. O

estudo de células que super-expressem *keaA* devem complementar e possivelmente revelar os mecanismos regulatórios deste fenômeno.

Durante o desenvolvimento, observou-se que os níveis de expressão do mRNA *keaA* são diminuídos a partir de 1 hora de carência nutricional e mantidos baixos durante a agregação e culminação, aumentando somente durante a formação do corpo de frutificação em células selvagens. É possível que *keaA* tenha um papel na diferenciação dos esporos, um processo também dependente de cAMP. No mutante *yakA*⁻ a diminuição nos níveis do transcrito em resposta a carência nutricional é menos acentuada e no mutante *pkaC*⁻ não foi observada esta diminuição (Figura 15). Os resultados obtidos indicam que a diminuição dos níveis de expressão de *keaA* é dependente da *yakA* e *pkaC*.

5.5- O padrão de desenvolvimento do mutante *keaA*⁻

A análise morfológica do mutante *keaA*⁻ durante o desenvolvimento indicou um atraso na agregação quando as células foram cultivadas na presença de *Klebsiella aerogenes* (Figura 17), bem como em placas ágar-fosfato (Figura 18). Nesses dois experimentos o processo de agregação ocorreu com atraso em relação às células selvagens. Quando o mutante foi carenciado em filtro de nitrocelulose, condição na qual as células são carenciadas em maior densidade celular, a diferença de tempo para o processo de agregação foi de 1 hora (Figura 19). Isso sugere que o mutante *keaA*⁻ possa ter uma deficiência em quimiotaxia, visto que nos experimentos em que as células estavam em menor densidade o mutante apresentou um atraso significativo (12 horas). As células do mutante *keaA*⁻, quando plaqueadas em diferentes densidades celulares, não foram capazes de agregar em densidades

celulares baixas, confirmando uma provável deficiência na comunicação celular (Tabela II).

Em todos os experimentos, o corpo de frutificação apresentou tamanho menor quando comparado ao do selvagem. Esses resultados indicam que o gene *keaA* é necessário para o desenvolvimento apesar de não ser essencial para a agregação celular. O motivo da formação do corpo de frutificação se mostrar acelerada após o processo de agregação não está ainda claro e poderia estar relacionado a alterações nos níveis de atividade da PKA que regula o processo de culminação.

As colônias de células selvagens apresentam uma borda bem definida, com agregados e corpo de frutificação distribuídos uniformemente em direção ao centro da colônia. No mutante *keaA⁻* as colônias são difusas, os soros são de menor tamanho e as bordas não são definidas (Figura 16). Isso se interpreta como a presença de amebas difusas dentro da massa de bactéria sem que estas a depletem completamente. Em adição, o mutante *keaA⁻*, possui uma grande região da colônia sem agregados (zona de transição). É provável que a deficiência no processo de quimiotaxia leve a um atraso do início da emissão de pulsos de cAMP, o que explicaria a presença de um número de amebas em carência nutricional na colônia que não participam efetivamente da formação dos agregados formando uma maior zona de transição.

O mutante *keaA⁻* quando plaqueado na presença de *Klebsiella aerogenes* possui níveis baixos de expressão dos genes da *pkaC* e *carA* durante as fases de agregação e culminação celular (Figura 20). Quando esse mutante foi carenciado em filtro de nitrocelulose, onde as células são colocadas em uma maior densidade, foi observada a indução da *pkaC* na ausência de

keaA durante a carência nutricional de maneira similar à de células selvagens. Estes resultados sugerem que KeaA seja necessário para regular o metabolismo de cAMP durante o desenvolvimento quando as células são carenciadas em baixa densidade. KeaA não é requerido para a formação do corpo de frutificação quando as células são agregadas em alta densidade. É possível que KeaA atue como um adaptador na formação do complexo envolvido na síntese de cAMP. Mutantes nulos para o gene da adenilato ciclase (*acaA*⁻), mas que super-expressam a PKA-C, falham no processo de agregação em baixas densidades celulares, porém, quando estes mutantes são carenciadas em alta densidade celular, são capazes de agregar sem cAMP, contanto que a PKA esteja ativa (Wang e Kuspa, 1997). Em levedura, as proteínas Kelch Gpb1 e Gpb 2 funcionam como subunidades da proteína G. Experimentos estão em andamento para identificarmos parceiros de interação de *keaA* que possam esclarecer se este gene estaria diretamente envolvido no complexo que ativa a adenilato ciclase em *Dictyostelium*.

Os dados descritos neste trabalho indicam que a YakA, a PKA e KeaA podem integrar a resposta a vários estresses em *Dictyostelium*. A Figura 24 resume as interações genéticas indicadas por este trabalho, onde a inibição do crescimento em resposta a estresses nutricional, oxidativo, nitrosoativo e térmico seriam regulados via produção de cAMP.

Figura 24 - Via proposta para a regulação da resposta a estresses em *Dictyostelium*. As interações entre os genes estão representadas pelas setas que indicam indução e as barras que representam a inibição. Pressupõem-se que a carência nutricional induza o aumento da atividade da *yaka* que inibe o ciclo celular e a expressão de *pufA*. PufA inibe a tradução da PKA-C. A PKA-C controla o tempo de ocorrência dos primeiros eventos de sinalização, regulando a expressão de proteínas sinalizadoras como receptor de cAMP (*carA*) e adenilil

ciclase (ACA). Existe uma estreita relação entre *pkaC* e *keaA*. A expressão de *keaA* é induzida em resposta a estresse oxidativo e nitrosoativo de uma maneira dependente da *yakA* e *pkaC*. Segue-se uma diminuição de sua expressão também dependentes destas quinases. Nós postulamos que há uma retroinibição de *pkaC* em *keaA*. É possível que *keaA* aja como um adaptador da formação do complexo envolvido na síntese de cAMP.

6- Conclusões

A proteína kinase YAKA é necessária para regular a resposta a vários estresses em *Dictyostelium*. O mutante *yakA⁻* é hipersensível a estresses nitrosoativo e oxidativo e o isolamento de supressores de um segundo sítio da morte induzida por SNP neste mutante, os mutantes *yakA⁻/keaA⁻* e *yakA⁻/pkaC⁻*, indicaram que a via do cAMP estava envolvida na resposta a estresses. Os resultados deste trabalho indicam que o gene *yakA* é essencial para a sobrevivência das células de *Dictyostelium* em condições de estresses, a menos que *pkaC* ou *keaA* estejam ausentes. A YakA age regulando a expressão de *pkaC* em resposta a estresses nutricional, oxidativo e nitrosoativo. A PKA-C é necessária para a inibição do ciclo celular quando as células são tratadas com peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. A observação do crescimento das células *yakA⁻*, *pkaC⁻* e *acaA⁻* indicam uma papel da YakA, PKA-C e cAMP também na regulação da tolerância térmica.

Neste trabalho, nós evidenciamos que a proteína KeaA de *Dictyostelium* é um membro da família de proteínas que possuem domínios Kelch (Xu e Cooley, 1993; Adams et al., 2000). Uma mutação em *keaA* leva ao fenótipo de deficiência no processo de agregação celular, principalmente quando as células são carenciadas em baixa densidade celular. O perfil de crescimento de *keaA⁻* indica que ele é necessário para o crescimento, mas não suprime o crescimento acelerado do mutante *yakA⁻*. *keaA* é necessário para a sobrevivência a estresses prolongados.

As interações genéticas indicadas por este trabalho indicam que as vias reguladas por YakA, KeaA, PkaC e cAMP têm um papel na regulação do desenvolvimento e resposta a estresses nitrosoativo e oxidativo. Todos estes

elementos são requeridos para a expressão de genes necessários para a adaptação das células em condições de estresses. As concentrações de geradores de NO e H₂O₂ utilizadas são letais e provavelmente pouco encontradas na natureza por este organismo. Já foi notado, no entanto, que *Dictyostelium* produz NO na transição crescimento/desenvolvimento e durante o desenvolvimento, e que este participa provavelmente como uma molécula sinalizadora desses processos. A identificação de um gene que media a resposta a NO e regula o desenvolvimento é indicativa de que é possível que KeaA seja um modulador de desenvolvimento ativado pelo estado redox da célula, o que é substanciado pela presença de um domínio rico em cisteínas. Em condições de carência nutricional, mudanças do metabolismo das células poderiam estar alterando o estado redox e indicando para a célula mudanças do ambiente que exigem a adaptação com parada do crescimento e indução de genes de detoxificação e desenvolvimento.

7- Perspectivas

Em paralelo a este trabalho, o laboratório está se empenhando na identificação de genes responsivos a estresses oxidativo e nitrosoativo e à comparação dos padrões obtidos em resposta à carência nutricional utilizando a tecnologia de microarrays de cDNA. Além disso, pretende-se identificar os genes regulados diferencialmente entre os mutantes *yakA*⁻, *pkaC*⁻ e *keaA*⁻ nesses processos. Um chip piloto foi desenvolvido que contém genes de diversas categorias funcionais relacionados com o ciclo celular, desenvolvimento, detoxificação e resposta a estresses. Em uma outra abordagem, pretende-se verificar as interações entre as proteínas pertencentes a esta via e identificar parceiros de interação. Os complexos de proteínas formados em condição nativa serão purificados pela técnica de TAP-tag e analisados por espectrometria de massa para sua identificação.

Com o objetivo de confirmarmos o papel do gene *keaA* no controle do ciclo celular, desenvolvimento e resposta a estresses, o efeito da super-expressão do gene completo e de seus domínios serão analisados. Resultados preliminares indicam um papel para o domínio rico em cisteínas na regulação do processo de desenvolvimento, o que nos provê com uma excelente ferramenta de intervenção neste processo.

8 - Referências Bibliográficas

- Adams, J., Kelso, R. and Cooley, L. (2000). The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends in Cell Biol.* 10, 17-24.
- Allen ,R.G e Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 28, 463-99.
- Augusto, O., Hix, S., Morais, M.S. e Vasquez-Vivar, J. (1995). Free radical reactions: formation of adducts with biomolecules and their biological significance. *Ciência e Cultura.* 47, 280-287.
- Bloomfield, G. e Pears, C. (2003). Superoxide signalling required for multicellular development of Dictyostelium. *J. of Cell Science* 116, 3387-97
- Boveris, A. e Ghanghe, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 134, 707-716.
- Burney, S., Tamir, A., Gal, S.R. e Tannenbaum, A. (1997). A mechanistic analysis of nitric oxide-induced cellular toxicity. *Nitric oxide.* 1, 130-144.
- Cadenas, E. (1995). Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. ed.Ahmad, S., p1-61, Chapman & Hall, New York.
- Clarke, M. e Gomer, R. H. (1995). PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of Dictyostelium. *Experientia* 51, 1124-1134.
- Cockburn, A.F, Taylor W. C. e Firtel R.A. (1978). Dictyostelium rDNA consists of non-chromosomal palindromic dimers containing 5S and 36S coding regions. *Chromosoma.* 70, 19-29.
- Craig, E.A.; Gambill, B.D. e Nelson, R.J. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.*, 57:402- 414.

Crawford, D., Amstad, P., Zbinden, I. e Cerutti, P.A. (1988). *Oncogene* 3, 27-32.

Chance, B., Sies, H. e Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.

Chen, M.Y., Long, Y., e Devreotes, P.N. (1997). A novel cytosolic regulator, Pianissimo, is required for chemoattractant receptor and G protein-mediated activation of the transmembrane domain adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* 11, 3218-3231.

Chu, F.L.E., La Peyre, J.F. (1993). Effects of temperature on host defence capacity and susceptibility to *Perkinsus marinus* in eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Org.* 16, 223-234.

Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T e Neill, S.J. (1999). H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Journal of Experimental Botany* 50, 1863–1866

Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W. e Jewell, C.C. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103-1123.

Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. e Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11908-11913.

- Ellis, R. J e Hemmingsen ,S. M. (1989). Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci.*14, 339-42.
- Fialkow, L., Chan, C.K., Rotin, D., Grinstein, S., Downey, G.P. (1994) Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants. *J Biol Chem.* 269, 31234-42.
- Firtel, R.A., Cockburn, A., Frankel G. e Hershfield, V. (1976). Structural organization of the genome of *Dictyostelium discoideum*: analysis by EcoR1 restriction endonuclease. *J Mol Biol.* 102, 831-52.
- Fisher, P. R.,Karampetsos, P., Wilezynska, Z. e Rosenberg, L.T. (1991). Oxidative metabolism and heat-shocked chemiluminescence in *Dictyostelium discoideum*, *J. Cell. Sci.* 99, 741-750.
- Franke, J. e Kessin, R.H. (1981) The cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein of *Dictyostelium discoideum*. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 256, 7628-37.
- Frankel, G., Cockburn, A.F., Kindle K.L e Firtel R.A. (1977). Organization of the ribosomal RNA genes of *Dictyostelium discoideum*. Mapping of the transcribed region. *J Mol Biol.* 109, 539-58.
- Fridovich,I. (1997). Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J.Biol. Chem.* 272, 18515-18517
- Funakoshi, E., Hori, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Kudoh, J., Shimizu, N. e Ito, F. (2003). Overexpression of the human MNB/DYRK1A gene induces formation of multinucleate cells through overduplication of the centrosome. *BMC Cell Biol.* 4, 12.

Gamaley, I. A. e Klyubin, I.V. (1999) Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int Rev Cytol.* 188, 203-55.

Garcia, M.X., Foote, C., van Es, Devreotes, P.N., Alexander e S. Alexander, H. (2000). Differential developmental expression and cell type specificity of *Dictyostelium* catalase and their response to oxidative stress and UV-light, *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 295-310.

Garcia, M.X., Alexander, H., Mahadeo, D., Cotter, D. A. e Alexander, S.. (2003). The *Dictyostelium discoideum* prespore-specific catalase B functions to control late development and to protect spore viability. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 55-64.

Garrett, S. e Broach, J. (1989). Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes Devel.* 3, 1336-1348.

Garrett, S., Menold, M. M. e Broach, J. R. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4045-4052.

Gloeckner, G., Eichinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J., Dear, P., Lehmann, R., Baumgart, C., Parra, G., April, 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.

Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A. M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., Pritchard, M. A. (1996). A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet.* 5, 1305-1310.

Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., e Holbrook NJ. (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 271, 4138-42.

Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3^a edition.

Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 31, 261-72.

Hammerle, B., Vera-Samper, E., Speicher, S., Arencibia, R., Martinez, S. e Tejedor, F. J. (2002). Mnb/Dyrk1A is transiently expressed and asymmetrically segregated in neural progenitor cells at the transition to neurogenic divisions. *Dev. Biol.* 246, 259-273.

Hammerle, B., Carnicero, A., Elizalde, C., Ceron, J., Martinez, S. e Tejedor, F. J. (2003). Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2277-2286.

Han, D., Williams, E. e Cadenas, E. (2001). Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.* 353, 411-416.

Hancock, J.T, Desikan, R. e Neill, S.J. (2001) Role of reactive oxygen in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions.* 29, 345-50.

Hartley, A. D., Ward, M. P. e Garrett, S. (1994). The Yak1 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* moderates thermotolerance and inhibits growth by an Sch9 protein kinase-independent mechanism. *Genetics* 136, 465-474.

Hayes J.D e McMahon M.(2001). Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett.*

174,103-13

Huang, H.C., Nguyen, T.E Pickett, C.B. (2002). Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem.* 277, 42769-74.

Insall, R., Kuspa, A., Lilly, P., Shausky, G., Loomis, W. F. e Devreotes, P. (1994). CRAC, a cytosolic protein containing a pleckstrin homology domain, is required for receptor and G protein-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 126, 1537-1545.

Insall, R., Soede, R., Schaap.P.N. e Devreotes, P. (1994). Two cAMP receptor active common signaling pathways in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell* 5, 703-711.

Ito, N., Phillips, S. E., Yadav, K. D. e Knowles, P. F. (1994). Crystal structure of a free radical enzyme, galactose oxidase. *J. Mol. Biol.* 238, 794-814.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D. e Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76-86.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T. e Yamamoto, M. (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 8, 379-91.

Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., e Yamamoto, M. (2000). Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.* 275, 16023-9.

- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D. P., Zipperlen, P. e Ahringer, J. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*. 421, 231-7.
- Kay, R. R. e Williams, J. G. (1999). The *Dictyostelium* genome project: an invitation to species hopping. *Trends Genet.* 15, 294-297.
- Klaus, A. e Hirt, H. (2004). Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-99.
- Kimmel, A. R e Firtel, R. A. (1982). The organization and expression of the *Dictyostelium* genome. The development of *Dictyostelium discoideum*. *Academic Press, New York*, pp 234-324.
- Kimmel, A. R. e Parent, C. A. (2003). The signal to move: *D. discoideum* go orienteering. *Science*. 300, 1525-7.
- Knowles R.G. (1997). Nitric oxide biochemistry. *Biochem Soc Trans.* 25, 895-901.
- Koesling, D., Bohme, E. e Schultz, G. (1991). Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J.* 5, 2785-91.
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G. e Sheen J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 2940-5.
- Kuspa, A., e Loomis, W.F. (1992). Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8803-8807.
- Kuspa, A. e Loomis, W.F. (1994). REMI-RFLP mapping in the *Dictyostelium* genome. *Genetics* 138, 665-674.

- Kuspa, A., Sucgang, R. e Shaulsky, G. (2001). The promise of a protist: the Dictyostelium genome project. *Funct. Integr. Genomics* 1, 279-293.
- Lancaster, Jr., J.R. (1992). Nitric oxide in cells. *Amer. Sci.* 80, 248-259.
- Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366, 53-67.
- Lilly, P.J. e Devreotes, P.N. (1994). Identification of CRAC, a cytosolic regulator required for guanine nucleotide stimulation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 269, 14123-9.
- Lindquist, S. e Craig, E.A. (1998). The heat shock proteins. *Annual Rev. Genet.*, 22, 631-677.
- Loomis, W. F. (1982). The development of *Dictyostelium discoideum*. Academic Press, New York.
- Loomis, W. F. (1987) Genetics tools for *Dictyostelium discoideum*. Methods in cell biology. *Academic Press*, Orlando, Fla., pp 31-65.
- Loomis, W. F. (1998). Role of PKA in the timing of developmental events in Dictyostelium cells. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 684-694.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. e Hayes, J.D. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression *J. Biol Chem.* 278, 21592-600.
- Maeda, M., Aubry, L., Insall, R., Gaskins, C., Devreotes, P.N. e Firtel, R.A. (1996). Seven helix chemoattractant receptors transiently stimulate mitogen-activated protein kinase in Dictyostelium. Role of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem.* 271, 3351-4.
- Marti, E., Altafaj, X., Dierssen, M., de la Luna, S., Fotaki, V., Alvarez, M., Perez-

- Riba, M., Ferrer, I. e Estivill, X. (2003). Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res.* 964, 250-263.
- Moncada, S., Palmer, R. M. e Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 43, 109-42.
- Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M. e Sakai, A. (2001). Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes Dev.* 15, 1217-1228.
- Neuhaus, E. M., Almers, W. e Soldati, T. (2002). Morphology and dynamics of the endocytic pathway in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell.* 13, 1390-1407.
- Okui, M., Ide, T., Morita, K., Funakoshi, E., Ito, F., Ogita, K., Yoneda, Y., Kudoh, J. e Shimizu, N. (1999). High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development. *Genomics* 62, 165-171.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. e Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 17; 327524-6.
- Rahmani, Z., Lopes, C., Rachidi, M. e Delabar, J. M. (1998). Expression of the mnb (dyrk) protein in adult and embryonic mouse tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 514-518.
- Rao, G.N., Glasgow, W.C., Eling, T.E. e Runge, M.S. (1996). Role of hydroperoxyeicosatetraenoic acids in oxidative stress-induced activating protein 1 (AP-1) activity. *J Biol Chem.* 271, 27760-4.
- Reymond, C. D., Schaap, P., Véron, M. e Williams, J. G. (1995). Abstract Dual role of cAMP during *Dictyostelium* development. *Experientia* 51, 1166-1174.

- Robinson, D.N e Cooley, L. (1997). Genetic analysis of the actin cytoskeleton in the *Drosophila* ovary. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13, 147-70.
- Saurin, A. J., Borden, K. L., Boddy, M. N. e Freemont, P.S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* 21, 208-214.
- Schmidt, H. H. e Water, U. (1994). NO at work. *Cell* 78, 919-925.
- Schreck, R., Rieber, P. e Baeuerle, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247-58.
- Shaulsky, G., Fuller, D., Loomis, W. F. (1998). A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. *Development.* 125, 691-699.
- Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minoshima, S., Svhimizu, Y. e Schimizu, N. (1996). Cloning of a human homolog of the *Drosophila* minibrain/rat DyrK gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochem. Biophys. Res. Commum.* 225, 92-99.
- Smith, D. J., Stevens, M. E., Sudanagunta, S. P., Bronson, R. T., Makhinson, M., Watanabe, A. M., O'Dell, T. J., Fung, J., Weier, H.-U. G., Cheng, J.-F. and Rubin, E. M. (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat. Genetics* 16, 28-36.
- Söderbom, F., e Loomis, W.F. (1998) Cell-cell signaling during Dictyostelium development. *Trends in Microbiology* 6, 402-406.
- Souza, G. M., da Silva, A. M. e Kuspa, A. (1999). Starvation promotes Dictyostelium development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway. *Development* 126, 3263-3274.

- 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, 2291-2302.
- Stamler, J. S. (1994). Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931-936.
- Staniek, K. e Nohl, H. (1999). H₂O₂ detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system. *Biochim. Biophys. Acta* 1413, 70-80.
- Storey, K.B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715-1733.
- Sucgang, R., Weijer, C. J., Siegert, F., Franke, J. e Kessin, R. H. (1997). Null mutations of the Dictyostelium cyclic nucleotide phosphodiesterase gene block chemotactic cell movement in developing aggregates. *Dev. Biol.* 192, 181-192.
- Sullivan, S. G., Chiu, D. T., Errasfa, M., Wang, J.M., Qi, J. S. e Stern, A. (1994) Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells. *Free Radical Biol. Med.* 16, 399-403.
- Sussman, M. (1987). Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions, *Methods Cell Biol.* 28, 9-29
- Taminato, A., Bagattini, R., Gorjão, R., Chen, G., Kuspa, A. e Souza, G. M. (2002). A role for YakA, cAMP and PKA in the regulation of stress responses of *Dictyostelium discoideum* cells. *Molecular Biology of the Cell* 13, 2266-2275.
- Tao, Y., Howlett, A. e Klein, C. (1992a) Nitric oxide-releasing compounds inhibit *Dictyostelium discoideum* aggregation without altering cGMP production. *FEBS Lett.* 314, 49-52.

- Tao, Y., Howlett, A. e Klein, C. (1992b) Nitric oxide stimulates the ADP-ribosylation of a 41-kDa cytosolic protein in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5902-5906.
- Tao, Y., Howlett, A. e Klein, C. (1994). Nitric oxide regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in *Dictyostelium discoideum* cells and lysates. *Eur. J. Biochem.* 224, 447-454.
- Tao, Y., Howlett, A. e Klein, C. (1996). Nitric oxide inhibits the initiation of cAMP pulsing in *D. discoideum* without altering receptor-activated adenylate cyclase. *Cell. Signal.* 8, 37-43
- Tao, Y.P., Misko, T.P., Howlett, A.C. e Klein, C. (1997). Nitric oxide, an endogenous regulator of *Dictyostelium discoideum* differentiation. *Development* 124, 3587-3595
- Tejedor, F., Zhu, X. R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F. e Pongs, O. (1995). Minibrain-a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14, 287-301.
- Thomas, S.R., Chen, K. e Keaney, J.F.Jr. (2002). Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* 277, 6017-24.
- Thomason, P., Kay, R. (2000). Eucaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *J. Cell Sci.* 113, 3141-3150.
- Thomason, P. A., Traynor, D., Cavet, G., Chang, W.T., Harwood, A. J. e Kay, R. R. (1998). An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*. *EMBO J.* 17, 2838-2845.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G. e Gibson, T. G. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuclei Acids Research* 22, 4673-4680.
- Walling, C., Partch, R.E. e Weil, T. (1975) Kinetics of decomposition of H₂O₂ catalyzed by ferric EDTA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 72, 140-142.
- Wang, B. e Kuspa A. (1997). Dictyostelium development in the absence of cAMP. *Science* 277, 251-4.
- Wegiel, J., Kuchuna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Dowjat, K., Silverman, W.P., Reisberg, B., deLeon, M., Wisniewski, T., Adayev, T., Chen-Hwang, M. e Hwang, Y. (2004). Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Research* 1010, 69-80.
- Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P. D. e Hall, T. M. (2002). Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* 110, 501-512.
- Winston, G.W., Moore, M.N., Kirchin, M.A. e Soverchia, C. (1996). Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effects of xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.* 113, 221-229.
- Wreden, C., Verrotti, A. C., Schisa, J. A., Lieberfarb, M. E. e Strickland, S. (1997). Nanos and pumilio establish embryonic polarity in Drosophila by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Development.* 124, 3015-23.
- Wu, L., Hansen, D., Franke, J., Kessin, R. H. e Podgorski, G.J. (1995). Regulation of Dictyostelium early development genes in signal transduction mutants. *Dev. Biol.* 171, 149-158.

Wu, Y., Kwon, K. S. e Rhee, S.G. (1998). Probing cellular protein targets of H₂O₂ with fluorescein-conjugated iodoacetamide and antibodies to fluorescein. *FEBS Lett.* 440, 111-5.

Wu, L. e Franke J. (1990). A developmentally regulated and cAMP-repressible gene of *Dictyostelium discoideum*: cloning and expression of the gene encoding cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor. *Gene.* 91, 51-6.

Xue, F. e Cooley, L. (1993). kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell* 72, 681-93.

Zipper, L.M e Mulcahy R.T. (2002). The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem.* 277, 36544-52.