UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

Caracterização molecular da proteína Ddl-2 e mapeamento de
seus domínios de interação com a proteína fosfatase do tipo-1
de *Dictyostelium discoideum*

JULIANA MOREIRA DE SOUSA CANAVEZ

Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva

São Paulo, 15 de dezembro de 2004

Dedico...

.... A meus pais e irmãos que sempre me incentivaram para realização deste trabalho.

... Ao Flávio que me acompanhou com muito amor e dedicação durante todo este período.

Agradeço...

...À Profa. Dra. Aline Maria da Silva, pela confiança, amizade e orientação que tornaram possível a execução deste trabalho.

...Aos Profs. Drs. Suely Lopes Gomes, Gláucia Mendes Souza e Sergio Verjovski-Almeida pelo empréstimo de equipamentos localizados em seus respectivos laboratórios.

...A Profa. Dra. Maria Christina Manhães Bonato pelo incentivo e apoio na minha vinda para São Paulo.

...Aos amigos Fabiana, Juliana e Luciano por me receberem em sua casa no início do doutorado.

...Às amigas Daniela Beton, Daniela Gonzalez, Michelle e Raquel pelo convívio, opiniões, discussões e amizade.

...Ao Alexandre, à Yvone e à Marly pelo apoio técnico, dedicação e alegrias compartilhadas neste período.

...Aos amigos do laboratório, Ana Carolina, Andréa, Fernanda, Leonardo, Paulinho, Paulo Paiva, e Patrícia, pelo apoio e convivência.

...Aos companheiros e amigos do Bloco 12, Cristina, Humberto, Karina, Rafaela, Rita, Silvia, Tie, Luci, Sandra, Regina, Alessandra, Flávia R., Flávia T., Luciana, Sarah, Josélia, Érica, Rodrigo, Alcides, Alexandre, Prof. Dr. Sandro Marana, Lucas, Fernando, Luiza, Abimael, Ana Cláudia, Milton, Ana Paula, Apuã, Camila, Camille, Ricardo, Karen, Denise, Adriana, Helder, Eduardo, Jefferson, Milton, Renato, Rodrigo, Júlio, Daniela e Lídia.

...Aos demais amigos do Instituto de Química, Max, Leandro, Luiz, Camila e Cássio.

...Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP pela excelente infraestrutura para realização deste trabalho.

...A FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

Resumo	6
Abstract	7
Abreviaturas	8
1. Introdução	10
1.1. Serina-treonina fosfatases: critérios de classificação	12
1.2. Serina/treonina fosfatase do tipo-1 (PP1): distribuição e estrutura	13
1.3. PP1c e sua interação com outras proteínas	15
1.4. Inibidores da PP1	18
1.4.1. Inibidor 1 e DARPP-32	18
1.4.2. Inibidor-2	21
1.4.3. Outros inibidores	25
1.5. Papel fisiológico da PP1	26
1.5.1. Metabolismo do glicogênio	27
1.5.2. Reorganização do citoesqueleto	28
1.5.3. Divisão celular	29
1.5.4. Interrupção de ciclo celular e apoptose	30
1.5.5. Outros papéis fisiológicos	31
1.6. Fosforilação reversível de proteínas em <i>Dictyostelium discoideum</i>	31
1.6.1. A PP1 de <i>Dictyostelium discoideum</i>	37
2. Objetivos	38
3. Procedimentos Experimentais	39
3.1. Procedimentos para manipulação de <i>Dictyostelium discoideum</i>	39
3.1.1. Manutenção e cultivo das células	39
3.1.2. Desenvolvimento em filtros	40
3.1.3. Transfecção de DNA em <i>Dictyostelium</i> por eletroporação	40
3.2. Procedimentos para manipulação de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.2.1. Manutenção e cultivo das células	41
3.2.2. Transformação de levedura	42
3.2.3. Detecção de interação utilizando diluição seriada	43
3.2.4. Teste de atividade de β -galactosidase com substrato X- β -Gal	43
3.2.5. Ensaio de atividade de β -galactosidase com substrato ONPG	44
3.3. Procedimentos para manipulação de bactérias	44
3.3.1. Manutenção e cultivo de bactérias	44
3.3.2. Preparo de bactérias competentes	45
3.3.3. Transformação de bactérias por eletroporação	46
3.4. Manipulação e análise de DNA e RNA	46
3.4.1. Descrição dos oligonucleotídeos	46
3.4.2. PCR e RT-PCR	48
3.4.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose	49
3.4.4. Eluição de fragmentos de DNA em papel	49
3.4.5. Métodos de preparação de plasmídeos	50
3.4.5.1. Minipreparação pelo método da lise alcalina	50
3.4.5.2. Preparação em larga escala	50
3.4.6. Digestão com enzimas de restrição	52
3.4.7. Sequenciamento automatizado de DNA	52

3.4.8. Minipreparação de RNA de total de <i>D. discoideum</i>	52
3.4.9. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído.....	53
3.4.10. Transferência de RNA para membranas de náilon (<i>Northern blot</i>).....	53
3.4.11. Minipreparação de DNA genômico de <i>D. discoideum</i>	54
3.4.12. Transferência de DNA para membranas de náilon (<i>Southern blot</i>)	54
3.4.13. Preparação de sonda radioativa	55
3.4.14. Hibridização de DNA e RNA com sonda radioativa	55
3.5. Manipulação e análise de proteínas	56
3.5.1. Procedimentos gerais	56
3.5.2. Preparo de extratos celulares de levedura para análises por SDS-PAGE e por <i>immunoblot</i>	57
3.5.2.1. Preparação da cultura de células de levedura.....	57
3.5.2.2. Preparação dos extratos de proteína.....	57
3.5.3. Detecção imunológica de proteínas.....	58
3.5.4. Expressão de Ddl-2 recombinante	58
3.5.5. Avaliação da solubilidade de Ddl-2 recombinante	60
3.5.6. Purificação da proteína Ddl-2 recombinante a partir da fração solúvel	60
3.5.7. Expressão da subunidade catalítica da PP1 (PP1c) de <i>D. discoideum</i> e de <i>N.crassa</i>	61
3.5.8. Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	62
3.5.9. Dosagem de proteínas	62
3.5.10. Ensaio enzimáticos para medida de atividades de proteínas fosfatases	62
3.5.10.1. Marcação de fosforilase a.....	62
3.5.10.2. Ensaio das atividades das proteínas fosfatases do tipo 1 e inibidores do tipo 2 recombinantes	63
3.6. Métodos de análise de seqüências de DNA e proteínas	64
3.7. Construções Plasmidiais	65
3.7.1. Construção do pCR-Ddl-2	65
3.7.2. Construção do pCR-Ddl-2_ko	65
3.7.3. Construção do pAE-Ddl-2.....	66
3.7.4. Construção das iscas pGBKT7-DdPP1c, pGBKT7-DdPP1cF269C e pGBKT7-NcPP1c para ensaios de duplo-híbrido em leveduras	66
3.7.5. Construção das presas pGADT7-Ddl-2, pGADT7-INc-1L e pGADT7-INc-1	67
4. Resultados e Discussão	70
4.1. Identificação de um possível inibidor de PP1 em <i>D. discoideum</i>	70
4.2. Amplificação do possível inibidor de DdPP1c (Ddl-2).....	72
4.3. Determinação do número de cópias do gene <i>Ddl-2</i> de <i>D. discoideum</i>	77
4.4. Análise dos níveis de expressão do mRNA de Ddl-2 durante o ciclo de vida de <i>D. discoideum</i>	79
4.5. Sondagem do possível papel biológico de Ddl-2 em <i>D. discoideum</i>	81
4.6. Análise da atividade inibidora de Ddl-2 frente a PP1c.....	83
4.6.1. Expressão do Ddl-2 em bactérias	83
4.6.2. Purificação de Ddl-2 recombinante.....	84
4.6.3. Análise da atividade inibidora de Ddl-2 recombinante sobre as PP1c recombinantes de <i>D. discoideum</i> e <i>N. crassa</i>	85
4.6.4. Análise da atividade inibidora de INc-1L e INc-1 recombinante sobre as PP1c recombinantes de <i>D. discoideum</i>	87

4.7. Análise da interação da PP1c com os ortólogos de I-2 em ensaios de duplo-híbrido em levedura.....	93
4.7.1. Expressão das PP1c de <i>D. discoideum</i> e <i>N. crassa</i> para ensaio de duplo-híbrido.....	93
4.7.2. Expressão do inibidor Ddl-2 em levedura.....	95
4.7.3. Análise da interação entre as PP1c de <i>D. discoideum</i> e <i>N. crassa</i> com Ddl-2	95
4.7.4. Expressão dos inibidores INc-1L e INc-1 em levedura.....	104
4.7.5. Análise da interação entre as PP1c de <i>D. discoideum</i> e INc-1L e INc-1de <i>N. crassa</i>	104
4.8. Mapeamento das regiões de Ddl-2 responsáveis pela interação física com a DdPP1c	112
4.8.1. Obtenção e expressão dos mutantes Ddl-2 em fusão com o domínio de ativação de GAL4	113
4.8.2. Análise da interação da DdPP1c com os mutantes de Ddl-2 em ensaios de duplo-híbrido.....	114
4.8.3. Investigação da importância da região 2 do Ddl-2 na interação com a DdPP1c	115
5. Discussão final.....	122
6. Bibliografia	129

Resumo

A serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1) é uma enzima ubíqua nas células e nos tecidos das várias espécies em que foi pesquisada e regula vários processos como metabolismo intermediário, processamento de mRNA, transcrição e apoptose. Geralmente a holoenzima PP1 é encontrada como um dímero constituído por uma subunidade catalítica conservada (PP1c) e uma ou mais subunidades reguladoras variáveis. Em mamíferos, já foram identificados mais de 50 polipeptídeos que se associam direta ou indiretamente a PP1c, gerando holoenzimas com localizações celulares e especificidades distintas. Entre estas proteínas estão inibidores citosólicos de PP1c, tais como o inibidor-1 (I-1), o inibidor-2 (I-2) e o inibidor nuclear da PP1 (NIPP-1). Ortólogos do I-2 foram descritos em microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa*. Neste trabalho nós demonstramos que o genoma da ameba social *Dictyostelium discoideum* possui uma única cópia do gene que codifica um ortólogo do I-2 (Ddl-2). Análise através de *Northern blot* mostrou que o mRNA de Ddl-2 é expresso durante o crescimento e ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento, com níveis variáveis. Também demonstramos que o gene Ddl-2 codifica uma verdadeira proteína inibidora da PP1c uma vez que seu produto recombinante em bactéria é capaz de inibir, com eficácia equivalente, as atividades de fosforilase fosfatase das PP1c recombinantes selvagem (DdPP1c) e mutante (DdPP1cF269C) de *D. discoideum* e NcPP1c de *N. crassa* *in vitro*. A proteína DdPP1cF269C apresenta características distintas da DdPP1c incluindo maior estabilidade, maior atividade de fosforilase fosfatase e maior sensibilidade frente ao inibidor caliculina A. Estas diferenças devem-se a substituição da cisteína conservada da posição 269 por uma fenilalanina, que é verificada na enzima selvagem. DdPP1c e DdPP1cF269C foram também ensaiadas na presença de INc-1L e INc-1 que são ortólogos de I-2 em *N. crassa*. Ambas as proteínas recombinantes purificadas exibiram efeito inibidor sobre a atividade de fosforilase fosfatase das DdPP1c recombinantes selvagem e mutante, sendo que INc-1 foi um inibidor duas vezes mais eficiente que INc-1L. Este efeito pode ser devido a um segmento de 38 aminoácidos codificado por um íntron em fase que é retido na isoforma INc-1L. Nossos dados indicam ainda que a mutação F269C não afetou a sensibilidade da DdPP1c recombinante a nenhum dos ortólogos de I-2 testados *in vitro*. Ensaios de duplo-híbrido utilizando a PP1c selvagem e mutante de *D. discoideum* (DdPP1c e DdPP1cF269C) e de *N. crassa* (NcPP1c) como iscas e Ddl-2 como presa mostraram que estas proteínas interagiram *in vivo*. Quando a presa era o INc-1L ou INc-1 a interação ocorreu apenas com a NcPP1c, sendo mais forte no caso de INc-1. As regiões de Ddl-2 envolvidas na interação física com a DdPP1c foram mapeadas através da expressão de proteínas truncadas no ensaio de duplo híbrido. Os experimentos apontaram que o carboxi-terminal de ~100 aminoácidos não é essencial para a interação, mas que o somatório das diversas regiões responde pela integridade da interação.

Abstract

The serine/threonine phosphatase of type-1 (PP1) is a ubiquitous enzyme in the cells and tissues from several species studied and regulates numerous processes such as intermediate metabolism, mRNA splicing, transcription, and apoptosis. PP1 holoenzymes consist of a well-conserved catalytic subunit (PP1c) and one or more variable regulatory subunits. In mammals, more than fifty polypeptides that bind PP1c have been identified, originating holoenzymes with distinct cell locations and specificities. These proteins include cytosolic PP1c inhibitors such as inhibitor-1 (I-1), inhibitor-2 (I-2) and nuclear inhibitor of PP1 (NIPP-1). I-2 orthologs have also been described in *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa*. In the present work, we demonstrate that the genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum* has a single gene encoding for an I-2 ortholog (Ddl-2). Northern blot analyses have shown that Ddl-2 mRNA is expressed throughout *Dictyostelium* developmental cycle at variable levels. We also demonstrated that Ddl-2 is a true PP1c inhibitor as its recombinant product is capable of inhibiting the phosphorylase phosphatase activity of wild-type PP1c (DdPP1c) and mutant (DdPP1cF269C) of *D. discoideum* and NcPP1c of *N. crassa* *in vitro*. DdPP1cF269C protein presents distinct traits including higher stability, phosphorylase phosphatase activity and sensibility to calyculin A than the wild-type. These differences are originated from the replacement of a well conserved cysteine residue by a phenylalanine found in the wild-type. The wild-type and mutant DdPP1c have also been assayed in the presence of INc-1L and INc-1 which are orthologues to I-2 in *N. crassa*. Both purified recombinant proteins have shown inhibitory effects over phosphorylase phosphatase activities, with INc-1 being twice more potent than INc-1L. This might be due to the presence of an intron retention event in the latter that results in an insertion of 38 aminoacids. Our data also indicate that F269C mutation did not affect DdPP1c sensitivity to inhibition by all the three recombinant I-2 orthologues *in vitro*. Yeast two-hybrid assays using wild type (DdPP1c) and mutant (DdPP1cF269C) *D. discoideum* and *N. crassa* (NcPP1c) PP1c as preys and the putative inhibitor Ddl-2 as a bait showed unequivocally that these proteins interacted *in vivo*. When the prey was INc-1 or INc-1L the interaction occurred only with NcPP1c and was stronger with INc-1. The domains of Ddl-2 involved in the interaction with DdPP1c were mapped by two-hybrid interaction assays with Ddl-2 deleted mutants. These experiments have pointed out that the Ddl-2 carboxi-terminus of ~100 aminoacids is not essential for the interaction but that the sum of all regions is responsible for the integrity of the interaction.

Abreviaturas

3-AT: 3- aminotriazol

BSA: albumina de soro bovino

cAMP: 3',5' monofosfato cíclico de adenosina

cfu: unidades formadoras de colônia

CDK: cyclin dependent Kinase

CDS: seqüência codificadora

CKII: caseína quinase II

CPI-17: *C-kinase activated Phosphatase Inhibitor of PP1*

cpm: contagem por minuto

DARPP-32: *Dopamine and cAMP-regulated 32kD phosphoprotein*

Ddl-2: inibidor-2 de PP1 de *Dictyostelium discoideum*

DEPC: dietilpirocarbonato

DNase: Desoxirribonuclease

dNTP: desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato

DO: densidade óptica

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EGTA: ácido etilenoglicol-bis-(beta-aminoetiléter)N,N'-tetracético

GSK3: glicogênio sintase quinase-3

kb: Quilobases

kD: Quilodalton

I-1: inibidor-1

I-2: inibidor-2

I-3: inibidor-3

I-4: inibidor-4

INc-1: inibidor 1 de PP1 de *Neurospora crassa*

INc-1L: inibidor 1 de PP1 de *Neurospora crassa* (com intron)

IPTG: isopropyl-β-D-galactopiranosídeo

MAPK: *mitogen activated protein kinase*

MOPS: ácido 3- (N-morfolino) propanosulfônico

MYPT: *myosin phosphatase targetting subunit*

NcPP1c: proteína fosfatase 1 de *Neurospora crassa*

NIPP-1: inibidor nuclear da PP1
NLS: seqüência de localização nuclear
ONPG: o-nitrofenol β -D-galactopyranosídeo
pb: pares de base
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PEG: polietileno glicol
PK: proteína quinase
PKA: proteína quinase dependente de cAMP
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila
PP: serina/ treonina fosfatase
PP1: holoenzima da PP do tipo 1
PP1c, PP2Ac, PP2Bc: subunidades catalíticas das respectivas PPs
PP2A: holoenzima da PP do tipo 2A
PP2B: holoenzima da PP do tipo 2B
PP2C: PP do tipo 2C
PPM: subfamília das PPs (*Phosphoprotein Phosphatase Magnesium dependent*)
PPO: 2,5-difeniloxazol
PPP: subfamília das PPs (*Phosphoprotein Phosphatase*)
PTP: tirosina fosfatase
PTK: proteína tirosina quinase
RMN: ressonância magnética nuclear
RNase: Ribonuclease A
rpm: rotações por minuto
RT-PCR: PCR precedido de reação com transcriptase reversa
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TCA: ácido tricloro-acético
TE: Tris.HCl-EDTA
Tm: temperatura de fusão
Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano
X- β -Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

1. Introdução

As células apresentam diferentes mecanismos para modificar, de modo reversível, as funções de suas proteínas. Um destes é a adição ou remoção de um grupamento fosfato dos resíduos serina, treonina ou tirosina, encontrados na proteína alvo. Estas adições ou remoções são catalisadas por quinases e fosfatases, respectivamente, e provocam alterações conformacionais nas proteínas, as quais são importantes na modulação de uma grande variedade de funções celulares. Isto inclui aumento ou diminuição da atividade proteica, estabilização ou marcação para destruição da proteína, facilitação ou inibição do deslocamento no interior da célula e estabelecimento ou rompimento de interações proteicas. A reversibilidade do processo acoplada à disponibilidade de ATP como doador de fosfato explica porque a fosforilação/desfosforilação de proteínas foi selecionada, ao longo da evolução das espécies, para se tornar um dos mecanismos mais comuns no direcionamento de transições alostéricas, particularmente em células eucarióticas.

O primeiro trabalho demonstrando a atividade de uma proteína quinase foi publicado por Burnett & Kennedy (Burnett & Kennedy, 1954) que descreveram a presença de uma enzima na mitocôndria do fígado de rato capaz de catalisar a fosforilação da caseína, mas não de outras sete proteínas testadas. Nos anos seguintes, os trabalhos publicados sobre mecanismos de fosforilação/desfosforilação, ainda que limitados a análises envolvendo a enzima glicogênio fosforilase, definiram a importância da fosforilação reversível de proteínas (Fischer & Krebs, 1955; Sutherland & Wosilait, 1956; Fischer *et al.*, 1959). Assim, ao final da década de 1960, o pensamento dominante era de que este mecanismo de controle fosse restrito a regulação da via metabólica do glicogênio. Trabalhos posteriores contribuíram de forma decisiva para a mudança deste conceito, incluindo os que demonstraram a inativação do complexo piruvato desidrogenase mitocondrial através da fosforilação e os referentes às funções da proteína quinase dependente de cAMP (PKA) (Langan, 1969; Linn *et al.*, 1969; Corbin *et al.*, 1970; Ljungstrom *et al.*, 1974; England, 1975; Tada *et al.*, 1975). Hoje em dia, postula-se que as diversas quinases e fosfatases existentes sejam responsáveis pela fosforilação/desfosforilação dos resíduos de serina, treonina e tirosina de cerca de um terço das proteínas eucarióticas (Ceulemans *et al.*, 2002; Ceulemans & Bollen,

2004). Além destes, outros resíduos de aminoácidos são fosforilados com menor frequência, tais como histidina e aspartato (Mizuno, 1998; Santos & Shiozaki, 2001).

As proteínas quinases são geralmente agrupadas com base no aminoácido ao qual o grupamento fosfato é ligado covalentemente. Um grupo compreende as proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de resíduos de serina e treonina (PKs) enquanto em outro grupo, estão agrupadas as enzimas que fosforilam resíduos de tirosina (PTKs). Um aspecto interessante é que, apesar das proteínas quinases apresentarem mecanismos regulatórios distintos respondendo a sinais particulares e atuando em substratos específicos, todas elas possuem um domínio catalítico extremamente conservado. A conservação desse domínio catalítico entre as quinases, sejam elas serina/treonina ou tirosina quinases, sugere uma ancestralidade comum (Hunter, 1987; Hanks *et al.*, 1988; Shenolikar, 1994; Hanks & Hunter, 1995; Hunter, 1995). Da mesma forma, as proteínas fosfatases estão agrupadas em proteínas serina/treonina fosfatases (PPs) e proteínas tirosina fosfatases (PTPs). Não se observa, entretanto, nenhuma conservação entre os domínios catalíticos destes dois grupos (Barton *et al.*, 1994; Shenolikar, 1994; Barford, 1996).

As quinases e fosfatases constituem duas das maiores famílias de proteínas codificadas no genoma dos eucariotos. Em humanos, já foram identificados aproximadamente 500 genes codificantes de quinases e 140 codificantes de fosfatases (Alonso *et al.*, 2004; Ceulemans & Bollen, 2004). O somatório dos genes destas famílias corresponde a aproximadamente 2% do total de genes do genoma humano. Isto é proporcionalmente semelhante ao observado no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, levedura que exibe uma complexidade genética intermediária entre eucariotos e procariotos (Hanks & Quinn, 1991; Hunter & Plowman, 1997; Kostich *et al.*, 2002). Há, no entanto, diferenças importantes não mostradas por este tipo de análise. A primeira é a ausência de genes codificantes de quinases e fosfatases que modulam a fosforilação de tirosina no genoma de *S. cerevisiae* (Tomaska, 2000). A segunda é a presença no genoma humano de quatro vezes mais genes codificantes de serina/treonina quinases do que no genoma de *S. cerevisiae*, comparado ao número semelhante de genes codificantes de serina/treonina fosfatases em ambas as espécies. Logo, fica bastante evidente que, a diversidade das serina/treonina quinases cresceu com o aumento da complexidade dos organismos enquanto que a das serina/treonina fosfatases se

manteve similar. Esta discrepância pode ser explicada pelo fato da diversidade das serina/treonina fosfatases ser conferida pelas subunidades reguladoras que se associam às subunidades catalíticas (Hubbard & Cohen, 1993; Faux & Scott, 1996; Goldberg, 1999; Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Ceulemans *et al.*, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004).

1.1. Serina-treonina fosfatases: critérios de classificação

Ingebritsen & Cohen (Ingebritsen & Cohen, 1983) sugeriram o agrupamento das serina/treonina proteínas fosfatases em tipo 1 e tipo 2. As proteínas incluídas no tipo 1 são aquelas capazes de desfosforilar a subunidade β da fosforilase quinase e são inibidas por concentrações nanomolares de duas proteínas termoestáveis denominadas inibidor-1 (I-1) e inibidor-2 (I-2). As fosfatases pertencentes ao tipo 2 desfosforilam a subunidade α da fosforilase quinase e não são inibidas por I-1 e I-2. Proteínas deste último grupo foram ainda subdivididas em 2A, 2B e 2C (PP2A, PP2B e PP2C), de acordo com suas necessidades por cátions divalentes. PP2B e PP2C somente tornam-se ativas na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} , respectivamente, enquanto PP2A e também a PP1 independem de cátions divalentes para sua atividade (Cohen, 1989; Cohen *et al.*, 1989; Shenolikar & Nairn, 1991).

Outra característica utilizada para diferenciar as enzimas dos tipos 1 e 2 é a inibição por toxinas de ocorrência natural. PP1 e PP2A são inibidas por diferentes concentrações de ácido ocadáico e de microcistina. O primeiro é o agente causal do envenenamento por alimentos oriundos do mar e potente agente tumoral, enquanto o segundo é uma hepatotoxina produzida pela alga verde-azul que contamina reservatórios de água potável (Cohen *et al.*, 1989; Shenolikar & Nairn, 1991; MacKintosh & MacKintosh, 1994; Mackintosh *et al.*, 1995; Wera & Hemmings, 1995; Sheppeck *et al.*, 1997). A microcistina foi listada como substância perigosa, juntamente com o antrax, no Tratado de anti-terrorismo de 2001 (Cohen, 2002).

A partir da década de 90, com a popularização de técnicas de biologia molecular, foi possível determinar as seqüências nucleotídicas de uma grande quantidade de cDNA codificadores dos diferentes tipos de PPs. Isto permitiu que as estruturas primárias das proteínas fossem obtidas, comparadas e utilizadas para o desenvolvimento de uma nova classificação. Nesta, as PPs foram agrupadas em duas famílias denominadas PPP (*PhosphoProtein Phosphatase*) e PPM

(*Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent*). As proteínas da família PPP apresentam um domínio catalítico conservado de 280 resíduos, ausente nos componentes da família PPM, e são subdivididas em PP1, PP2A, PP2B, PP5 e PP7, estas duas últimas apenas recentemente identificadas. A família PPM compreende as PP2C, a piruvato desidrogenase-fosfatase mitocondrial e algumas enzimas de procariotos (Barton *et al.*, 1994; Shenolikar, 1994; Wera & Hemmings, 1995; Barford, 1996; Villafranca *et al.*, 1996; Cohen, 1997; Beullens & Bollen, 2002; Kerk *et al.*, 2002). As proteínas desta segunda família (PPM) apresentam seqüências proteicas conservadas entre si, porém distintas das enzimas da família PPP. Contudo, observa-se similaridade entre a estrutura terciária de enzimas das famílias PPP e PPM, refletindo a conservação de seus mecanismos de catálise (Egloff *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995; Barford, 1996).

1.2. Serina/treonina fosfatase do tipo-1 (PP1): distribuição e estrutura

A PP1 é uma das principais proteínas serina/treonina fosfatase encontradas nas células eucarióticas e participa da regulação de uma série de eventos fisiológicos. Nas células, a subunidade catalítica da PP1 (PP1c) não existe livremente, mas sim em associação com uma ou mais subunidades não-catalíticas que modulam sua localização subcelular, especificidade de substrato e atividade enzimática (Hubbard & Cohen, 1993). Em mamíferos, já foram identificados mais de 50 polipeptídeos que se associam com a PP1c (Bollen, 2001; Janssens & Goris, 2001).

A seqüência primária da PP1c é muito conservada ao longo da evolução, especialmente nos resíduos da região central que apresentam identidade superior a 70%. Há, todavia, diferenças entre as espécies quanto ao número de genes codificantes das isoformas da PP1c. Estes variam de apenas um gene, encontrado em *Dictyostelium discoideum* (Andrioli *et al.*, 2003) e *Neurospora crassa* (Zapella *et al.*, 1996; Szoor *et al.*, 1997; Zapella, 2001), até oito genes, encontrados em *Arabidopsis thaliana* (Smith & Walker, 1993). Em mamíferos, foram clonados três genes codificantes de quatro isoformas de PP1c (Sasaki *et al.*, 1990; Barker *et al.*, 1994). As participações destas diferentes isoformas de PP1c nos distintos complexos holoenzimáticos ainda não foram completamente elucidadas, embora a associação preferencial de isoformas por certas subunidades reguladoras tenha sido constatada em alguns estudos (Rubin *et al.*, 1998; Berndt, 1999).

A estrutura tridimensional da PP1c de mamíferos vem sendo detalhada através de estudos cristalográficos desta enzima complexada com toxinas de ocorrência natural. Até o momento, a PP1c já foi cristalizada em complexo com as toxinas caliculina A, microcistina e ácido ocadáico. Estes estudos mostraram que a PP1c apresenta uma estrutura elipsoidal consistindo de um sanduíche composto por onze folhas- β , rodeadas por sete α -hélices de um lado e um subdomínio composto de três α -hélices e três folhas- β do outro. Na região central do sanduíche, três folhas- β e duas α -hélices estão conectadas formando um motivo β - α - β - α - β onde se localiza o provável centro ativo da enzima e os íons metálicos coordenados pelos resíduos Asp64, His66 e Asp92 da PP1. Este centro ativo conecta os sulcos hidrofóbicos, ácido e carboxi-terminal (forma de Y) na superfície da PP1. Em geral, as toxinas localizam-se no sítio ativo da PP1, juntamente com os metais, as moléculas de água e os átomos ligantes, além de interagirem com os sulcos hidrofóbicos e ácido (Barford & Keller, 1994; Egloff *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995; Gauss *et al.*, 1997; Sheppeck *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1999; Kita *et al.*, 2002).

Os íons metálicos Fe^{2+} e Mn^{2+} estão presentes no sítio ativo da PP1c quando expressa em bactérias, mas provavelmente Fe^{2+} e Zn^{2+} estejam presentes na enzima nativa. O Mn^{2+} parece estimular a PP1c recombinante porque mantém a estrutura terciária da enzima numa conformação similar a da enzima nativa. Sua estrutura cristalina juntamente com estudos cinéticos e de mutagênese sítio dirigida indica que a desfosforilação dos substratos é catalisada numa única etapa ao contrário de outras fosfatases (fosfatases alcalinas e tirosinas fosfatases), que envolvem a formação de intermediários. Os dois íons metálicos ativam a molécula de água que age como um nucleófilo no ataque do átomo de fósforo do grupo fosfato (Zhang *et al.*, 1992c; Barton *et al.*, 1994; Egloff *et al.*, 1995; Barford, 1996; Chu *et al.*, 1996; Cohen, 1997).

Diversos estudos estruturais indicam que a alça que conecta as folhas β 12- β 13 da PP1 é essencial para sua inibição por toxinas. Mutações ao longo desta alça aumentaram ou diminuíram a sensibilidade da PP1, sugerindo que elementos críticos para inibição da PP1 estão localizados entre os resíduos 269-301. Mais especificamente os resíduos Cys273 e Tyr272 foram determinantes para a sensibilidade da PP1 às várias toxinas e inibidores (Goldberg *et al.*, 1995;

Mackintosh *et al.*, 1995; Barford, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Bagu *et al.*, 1997; Connor *et al.*, 1999; Maynes *et al.*, 2001).

1.3. PP1c e sua interação com outras proteínas

Conforme previamente mencionado, a PP1c está sempre complexada a subunidades reguladoras (geralmente compondo um dímero) e forma uma variedade de holoenzimas multiméricas distintas. Estas subunidades, no entanto, não são necessariamente relacionadas entre si, exceto pela presença na maioria delas de uma pequena seqüência canônica de ligação à PP1c, geralmente referida como motivo RVXF, identificada através de estudos bioquímicos e cristalográficos. A seqüência completa deste motivo consenso foi definida através alinhamentos de seqüências e mutagênese sítio dirigida como (R/K)X₁(V/I)X₂(F/W), onde X₁ pode ser qualquer aminoácido e X₂ qualquer aminoácido exceto Prolina (Egloff *et al.*, 1997; Zhao & Lee, 1997; Aggen *et al.*, 2000; Cohen, 2002; Wakula *et al.*, 2003). A função deste motivo parece ser a de aproximar as moléculas e promover a ligação de sítios secundários, estes sim capazes de alterar a atividade de PP1c e sua especificidade pelo substrato. Esta noção de que a interação com a subunidade catalítica da PP1 envolve múltiplos contatos foi verificada inicialmente para subunidades inibidoras. Atualmente, contudo, acredita-se que as subunidades reguladoras possuam múltiplos sítios de interação com a PP1c e que há compartilhamento de alguns destes sítios entre elas. Logo, a competição entre os diferentes reguladores por uma combinação de sítios de interação define a atividade da holoenzima (Beullens *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Ceulemans & Bollen, 2004).

Entre as proteínas que se associam à PP1c, muitas são moduladoras de atividade e agem como inibidores desta fosfatase. Neste grupo se incluem os inibidores citoplasmáticos termoestáveis I-1 e I-2, o citoplasmático DARPP-32 (*Dopamine and cAMP-Regulated 32kD PhosphoProtein*), o inibidor nuclear NIPP-1 (*Nuclear Inhibitor of PP1*), a proteína associada a ribossomos RIPP-1 (*Ribosomal Inhibitor of PP1*), e o inibidor da miosina fosfatase CPI-17 (*C-kinase activated Phosphatase Inhibitor of PP1*), entre outros (Nimmo & Cohen, 1978; Hemmings *et al.*, 1990; Park & DePaoli-Roach, 1994; Eto *et al.*, 1995; Van Eynde *et al.*, 1995; Beullens *et al.*, 1996).

Outras subunidades reguladoras agem como proteínas direcionadoras, interagindo com a PP1c e com o substrato. Este é o caso da proteína MYPT1/2 que se liga à PP1c e ao substrato miosina. Em alguns casos, a proteína reguladora não se liga diretamente ao substrato, mas associa-se com uma estrutura celular que contém o substrato. Isto é o que acontece com a subunidade G, que direciona a PP1c para partículas de glicogênio, nas quais o substrato glicogênio sintase se encontra ligado (Chen *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1994). Outros exemplos de subunidades direcionadoras são: MYPT3 que também direciona a PP1 para o substrato miosina, mas apresenta propriedades bioquímicas únicas (Skinner & Saltiel, 2001). Dentro deste grupo está também a p53BP2, uma proteína que interage com a proteína supressora tumoral p53 (Helps *et al.*, 1995); GADD34 (*Growth-Arrest and DNA-Damage-inducible protein 34*) uma proteína induzida por estresse que direciona a PP1 para o substrato SNF5 (*Sucrose NonFermenting 5*) facilitando a interrupção do ciclo celular (Wu *et al.*, 2002) e PNUTS (*Phosphatase Nuclear Targeting Subunit*) envolvida na regulação da PP1 sobre a pRB (*RetinoBlastoma protein*; Udho *et al.*, 2002). Além destas, existem as proteínas que ancoram PKA (AKAPs) que possuem domínios de direcionamento subcelular únicos. Por exemplo, a AKAP149 direciona a PP1c para a lamina da membrana nuclear, AKAP220 direciona a PP1c para os peroxissomos e AKAP450 direciona a PP1c para os centríolos (Steen *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004). Neurabinas, proteínas ligantes de actina, direcionam isoformas específicas da PP1 para o citoesqueleto de actina neural (Terry-Lorenzo *et al.*, 2002) e Sds22 é a provável proteína responsável pelo direcionamento da PP1 para o substrato Aurora-quinase (MacKelvie *et al.*, 1995; Peggie *et al.*, 2002).

Existem também as proteínas que são substratos da PP1 como ocorre com as proteínas quinases Aurora e Nek2. A proteína quinase Aurora, bem como a PP1, estão envolvidas na progressão da mitose, citocinese e meiose (Ceulemans & Bollen, 2004). Nek2 é uma proteína quinase centríolômica regulada pelo ciclo celular, que age como substrato e subunidade direcionadora. Ela interage com a PP1 e com C-Nap1 formando um complexo trimérico. C-Nap1, por sua vez, é um substrato para PP1 e Nek2 (Helps *et al.*, 2000). Outro substrato seria a proteína Bcl-2, que quando desfosforilada pela PP1, é direcionada para o proteassomo (Ayllon *et al.*, 2000; Brichese & Valette, 2002). Entretanto, outro estudo sugere que Bcl-2

também direcionaria a PP1 para o substrato Bad, formando um complexo trimérico (Garcia *et al.*, 2003).

Outros substratos de PP1 já conhecidos são as lamínas nucleares, em especial a lamina B que contribui para o rearranjo do envelope nuclear (Fields & Thompson, 1995; Thompson *et al.*, 1997); a FAK (*Focal Adesion Kinase*) que é desfosforilada pela PP1 no ciclo celular (Fresu *et al.*, 2001); o fator de transcrição CREB, responsável pela expressão de genes induzidos por cAMP (Hagiwara *et al.*, 1992); as proteínas Sla2, Sla1 e Pan1 que participam da via de sinalização de transporte vesicular e distribuição polarizada de actina na célula (Tu *et al.*, 1996; Uetz *et al.*, 2000); fosfolamban que quando desfosforilada inibe a atividade da SERCA (Ca²⁺-ATPases do retículo endoplasmático), responsável pelo estoque intracelular de Ca²⁺ (Carr *et al.*, 2002); a proteína do retinoblastoma (pRB) que estimula a apoptose quando ativada pela desfosforilação promovida pela PP1 (Wang *et al.*, 2001).

Agrupar funcionalmente as subunidades reguladoras não é uma tarefa simples, uma vez que em muitos casos estas proteínas podem desempenhar mais de um papel regulador. Nesta linha, existem proteínas que são ao mesmo tempo substrato e subunidade direcionadora. Outras subunidades reguladoras agem, *in vivo*, como direcionadoras da subunidade catalítica para compartimentos celulares específicos enquanto, *in vitro*, atuam como inibidores. Deve-se ser levar em conta, entretanto, que o substrato normalmente utilizado nos ensaios enzimáticos é a fosforilase α , um substrato não fisiológico para a maioria das holoenzimas da PP1. Ademais, no caso de I-2, foi verificado que ele tem a capacidade de alterar a conformação da PP1, atuando como uma chaperonina, sugerindo que as interações entre subunidades catalíticas e regulatórias podem ter um espectro regulador mais amplo. Há ainda os casos em que a função exata de algumas subunidades reguladoras é desconhecida (Alessi *et al.*, 1993; Aggen *et al.*, 2000; Tamrakar & Ludlow, 2000; Bollen, 2001; Ceulemans *et al.*, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004).

Outro aspecto comum é a modulação da atividade das subunidades reguladoras da PP1 por fosforilação reversível. Os inibidores protéicos I-1 e DARPP-32 são substratos da PKA e quando desfosforilados não exibem atividade inibitória (Nimmo & Cohen, 1978; Desdouits *et al.*, 1995). As subunidades localizadoras G (que dirigem a PP1 para a partícula do glicogênio) também têm suas atividades moduladas por fosforilação. Em resposta a adrenalina, por exemplo, a subunidade

G_M (presente em músculo esquelético) sofre uma série de fosforilações que resultam na dissociação da subunidade catalítica da PP1. A liberação da PP1 possibilita a sua associação com o I-1 e como consequência a atividade da enzima é inibida (Hubbard & Cohen, 1989; Aggen *et al.*, 2000).

Enfim, para dezenas de proteínas têm sido conferida a propriedade de subunidade moduladora ou reguladora da PP1c, com base em interações detectadas em experimentos de duplo-híbrido em levedura. Abordagens convencionais, como purificação do complexo holoenzimático e de co-imunoprecipitação com anti-PP1 também são empregadas para identificar proteínas candidatas a reguladoras desta fosfatase. Abordagens mais recentes, consistem na varredura de uma biblioteca de expressão de cDNAs com uma sonda preparada a partir da PP1 recombinante conjugada com digoxigenina ou separação de extratos celulares em cromatografia de afinidade em resina de microcistina-agarose conjugada a PP1. Contudo, a identificação é apenas o primeiro passo na busca pelo papel fisiológico desses complexos holoenzimáticos *in vivo* (Durfee *et al.*, 1993; Moorhead *et al.*, 1994; Helps *et al.*, 1995; Hirano *et al.*, 1995; Campos *et al.*, 1996; Hirano *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; MacMillan *et al.*, 1999; Ajuh *et al.*, 2000).

1.4. Inibidores da PP1

1.4.1. Inibidor 1 e DARPP-32

I-1 e DARPP-32 são inibidores termoeestáveis, ativados pela PKA e estão entre os reguladores da PP1 mais bem caracterizados. Ambos se ligam a PP1c independentemente do seu estado de fosforilação, mas somente causam sua inibição quando fosforilados. O I-1 foi inicialmente detectado a partir de frações de extratos celulares ativados por ATP/Mg²⁺ e purificado a partir de músculo esquelético de coelho (Merlevede & Riley, 1966; Merlevede *et al.*, 1969; Tellez-Inon & Torres, 1970). Hoje, sabe-se que o I-1 está presente em diversos tecidos dos vertebrados (Huang & Glinzmann, 1976; Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001).

O I-1 é uma proteína de 166 aminoácidos e 18,7kD que mostra-se extremamente resistente a tratamentos com detergentes e precipitação por TCA. Os seus dois sítios de fosforilação descritos encontram-se nas posições Thr35 e Ser67. O primeiro resíduo (Thr35) é fosforilado pela PKA, enquanto o segundo resíduo

(Ser67) é fosforilado pela quinase NCLK (*Neuronal Cdc-Like protein Kinase*), um dímero formado pela proteína quinase 5 dependente de ciclina (Cdk5) e a subunidade reguladora neural específica p25. O I-1 converte-se em um potente inibidor da PP1 ($K_i=1,6\text{nM}$) somente após a fosforilação da Thr35 e independe da Ser67. A fosforilação deste último, todavia, aumenta a afinidade da PKA pelo substrato I-1. Logo, especula-se que a fosforilação da Ser67 tenha a função reguladora de facilitar a localização subcelular quando existe um complexo protéico ou estaria envolvida na regulação de alguma função desconhecida do I-1 (Huang & Glinsmann, 1976; Aitken *et al.*, 1982; Foulkes *et al.*, 1983; Egloff *et al.*, 1997; Huang & Paudel, 2000; Bibb *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002).

DARPP-32 é uma proteína de 204 aminoácidos presente principalmente no cérebro. Esta proteína é bem conservada entre os mamíferos, especialmente em sua porção amino-terminal onde está contida sua porção ativa. Assim como I-1, DARPP-32 apresenta dois sítios de fosforilação e converte-se num potente inibidor de PP1 após a fosforilação de apenas um deles (Thr34) pela PKA (Greengard *et al.*, 1999). Isto pode ocorrer em resposta a neurotransmissores como dopamina, serotonina e glutamato, além de drogas como cocaína e anfetaminas. A fosforilação da Thr34, entretanto, depende da desfosforilação do resíduo Thr75 pela PP2A (Bibb *et al.*, 1999; Nishi *et al.*, 2002). DARPP-32 tem sido um alvo importante para estudos terapêuticos e de uso de drogas devido a sua atuação em um dos centros neurais envolvidos no controle da atividade motora voluntária (Hemmings *et al.*, 1992; Oliver & Shenolikar, 1998; Hiroi *et al.*, 1999; Zachariou *et al.*, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004).

Além de inibidores de PP1c, I-1 e DARPP-32 compartilham características como mobilidade eletroforética anormal e alto conteúdo de ácido glutâmico e prolina. O baixo conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos indica que estes inibidores não devem ser proteínas globulares típicas (Nimmo & Cohen, 1978). Experimentos de dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear mostraram que tanto I-1 quanto DARPP-32 são formados por quatro hélices curtas e que seus domínios funcionais apresentam estruturas altamente desordenadas. Além disso, nenhuma mudança significativa em suas estruturas foi observada após fosforilação pela PKA (Endo *et al.*, 1996; Chyan *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004).

A comparação entre as seqüências primárias de I-1 e DARPP-32 mostram uma identidade maior na região amino-terminal, especialmente entre os resíduos 6 e

38. Nesta região, encontra-se o motivo conservado RKIQF, uma degeneração do motivo RVXF, que é característico de proteínas ligantes de PP1c. Um modelo propõe que quatro resíduos de arginina que precedem o sítio de fosforilação Thr35 do I-1 interajam com resíduos do sulco ácido da PP1c. Os resíduos hidrofóbicos posteriores a fosfotreonina, interagiriam com o sulco hidrofóbico da subunidade catalítica desta fosfatase (Aitken *et al.*, 1982; Hemmings *et al.*, 1990; Goldberg *et al.*, 1995; Endo *et al.*, 1996; Egloff *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1999).

O I-1 está envolvido em diversos processos celulares como na sinapse controlada por neurotransmissores, o controle de células tumorais, o controle da contração muscular e o controle hormonal do metabolismo de glicogênio (Oliver & Shenolikar, 1998). Este último é o papel mais bem estudado de I-1. Hormônios, como adrenalina, inativam a PKA resultando no aumento da fosforilação e inativação da glicogênio sintase no músculo esquelético de mamíferos. O mecanismo que permite a fosforilação da glicogênio sintase é mediado pela ativação de I-1 pela PKA que pode então inibir a atividade de fosfatase da PP1. Contudo, a fosforilação de resíduos de serina da glicogênio sintase se dá pela ação da proteína quinase GSK3, que não é ativada pela PKA (Poulter *et al.*, 1988; Nakielnny *et al.*, 1991; Oliver & Shenolikar, 1998). Mais recentemente, o real papel de I-1 no metabolismo de glicogênio tem sido discutido. Apesar do conhecido envolvimento do I-1 no metabolismo de glicogênio em levedura, a complementação de mutantes deste fungo com I-1 humano resultou apenas numa diminuição modesta do acúmulo de glicogênio. E ainda, camundongos que tiveram o gene do I-1 nocauteado não apresentaram alterações no metabolismo de glicogênio. Estes fatos sugerem que, em eucariotos superiores, I-1 deve estar principalmente envolvido em outros processos como transcrição e mitose (Scrimgeour *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2000).

Outro papel desempenhado por I-1 é a inibição da proteína GADD34 através da formação de um complexo trimérico PP1/GADD34/I-1. Este complexo, por sua vez, é responsável pela regulação da desfosforilação do fator de iniciação eIF2 α que controla a tradução de proteínas no cérebro de mamíferos em resposta ao estresse (Connor *et al.*, 2001). Também se postula o envolvimento de I-1 e PP1 nos processos de aprendizado e memória. Quando a PP1 é geneticamente inibida durante o aprendizado, intervalos curtos entre os treinamentos são suficientes para melhorar o desempenho. Acredita-se que durante os curtos intervalos de

treinamento a PKA seja ativada, e em contrapartida fosforile e ative o I-1 que inibe a PP1 (Mayford & Kandel, 1999; Genoux *et al.*, 2002; Waddell, 2003).

1.4.2. Inibidor-2

O I-2 foi isolado a partir de uma preparação homogênea de músculo esquelético de coelho (Huang & Glinsmann, 1976) e compartilha com I-1 algumas propriedades como a resistência a altas temperaturas, migração anômala em SDS-PAGE, baixo conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos e baixo coeficiente de sedimentação (Nimmo & Cohen, 1978; Foulkes & Cohen, 1980). A comparação de suas estruturas primárias, todavia, revelou que estes inibidores são proteínas muito diferentes (Aitken *et al.*, 1982; Holmes *et al.*, 1986). O alto conteúdo de aminoácidos hidrofílicos e a termoestabilidade apontava para a ausência de uma conformação tridimensional definida. Mais tarde foi mostrado, através de estudos de RMN e dicroísmo circular, que I-2 apresenta uma conformação desordenada exceto pela presença de uma α -hélice curta (Huang *et al.*, 2000).

Estudos mostraram que o I-2 é um inibidor específico da PP1 e independe de fosforilação para inibi-la, sendo capaz de formar um complexo estável e inativo com esta fosfatase. Este complexo foi inicialmente isolado como uma fosfatase que dependia de ATP-Mg⁺² para ser ativada (Huang & Glinsmann, 1976; Vandenheede *et al.*, 1982). Atualmente sabe-se que a ativação do complexo é decorrente da fosforilação da Thr72 do I-2 pela proteína quinase GSK3 (Hemmings *et al.*, 1982; Vandenheede *et al.*, 1985; Sakashita *et al.*, 2003). Esta fosforilação é facilitada pela ação da quinase CKII que fosforila I-2 em três resíduos de serina, sugerindo que estas duas proteínas atuem em conjunto para modular a atividade do I-2 (DePaoli-Roach, 1984; Holmes *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1994). O aspecto fundamental deste ciclo é que a fosforilação de I-2 por GSK3 promove uma mudança conformacional no complexo PP1/I-2. Em seguida, a própria PP1 desfosforila o I-2 restaurando a atividade de fosfatase deste complexo (DePaoli-Roach, 1984; Jurgensen *et al.*, 1984; Price *et al.*, 1986; Holmes *et al.*, 1987; Picking *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1994). Estudos envolvendo dicroísmo circular e RMN mostraram que a fosforilação não exerce nenhum efeito significativo na conformação de I-2 livre. Portanto, as mudanças conformacionais da fosfatase induzidas pela fosforilação do I-2 por GSK3 devem depender das interações entre fosfatase e inibidor (Lin *et al.*, 2003).

Apesar do conhecido papel de GSK3 na fosforilação de I-2, outras proteínas estão sendo descritas como mediadoras da fosforilação deste inibidor. Dentre elas, a proteína quinase NCLK que ativa o complexo PP1/I-2 no cérebro de mamífero. Esta fosforilação funcionaria como um estímulo diferente sobre I-2 e PP1, em relação ao produzido pela CKII e GSK3 (Agarwal-Mawal & Paudel, 2001). Como já mencionado, NCLK também fosforila I-1. Pho85, uma proteína quinase da levedura *S. cerevisiae* ortóloga de Cdk5 seria a quinase que fosforila Glc8 *in vivo*, o qual é proposto como ortólogo de I-2 neste fungo (Tan *et al.*, 2003).

O primeiro papel fisiológico sugerido para I-2 foi sua ação como chaperonina. Inicialmente, foi verificado que I-2 poderia interagir com a PP1 desnaturada e promover um rápido enovelamento, tornando a enzima ativa. Esta hipótese foi baseada no fato de que a PP1 recombinante formava um complexo inativo com I-2 que podia ser reativado pela proteína quinase GSK3 através da fosforilação do inibidor. A fosforilação possibilitou que a PP1 recombinante apresentasse as mesmas propriedades da enzima nativa, inclusive a independência de Mn^{2+} (Alessi *et al.*, 1993; Bennett *et al.*, 1999). Outro fato que corrobora esta hipótese é que a superexpressão de I-2 em células de mamíferos não inibe a atividade celular da PP1, e sim eleva o conteúdo celular desta enzima. Estudos com Glc8 também sugerem que dependendo da situação o I-2 pode atuar como inibidor ou ativador da PP1c. Foi proposto que a PP1 precisa do I-2 para estar na sua conformação nativa e que seu enovelamento correto deve ser crítico para prevenir a desfosforilação descontrolada de resíduos fosforilados na célula (MacKintosh *et al.*, 1996).

O I-2 foi sempre descrito como subunidade reguladora da PP1, agindo como seu inibidor e/ou chaperonina. No entanto, um novo papel para I-2 começou a ser postulado com base em trabalhos que mostraram variações no nível e localização da proteína I-2 ao longo do ciclo celular. Observou-se que a expressão de I-2 é maior durante a fase S e mitose e que I-2 está localizado no citossol durante a fase G1 e no núcleo na fase S. Os resultados indicavam que as mudanças na fosforilação de I-2 estariam envolvidas na redistribuição intracelular da proteína durante o ciclo celular e que esta redistribuição dependia também de uma sequência de localização nuclear (NLS) (Brautigan *et al.*, 1990; Kakinoki *et al.*, 1997).

Mais recentemente, foi proposto que a localização subcelular de I-2 humano seja dependente da densidade celular e independente do ciclo celular. Acredita-se que a baixa densidade celular direciona o inibidor para o núcleo e a alta densidade

para o citoplasma. O I-2 possui dois domínios separados que controlam sua localização no núcleo ou no citoplasma. Alguns resíduos da porção C-terminal mantêm a proteína no citoplasma enquanto a importação para o núcleo requer a sequência NLS responsável pelo seu transporte ativo. O fato de I-2 ser uma proteína pequena que poderia entrar no núcleo por difusão passiva, sugere que I-2 exista na célula como parte de um complexo protéico e que a NLS seja responsável por mediar a translocação nuclear do complexo inteiro. Logo, I-2 poderia controlar a localização de uma ou mais holoenzimas PP1 em resposta a mudanças na densidade celular. Supostamente, o I-2 transportaria a PP1 para o núcleo de células com baixa densidade, permitindo assim que a fosfatase alterasse a transcrição gênica através da desfosforilação de alguns fatores de transcrição (Leach *et al.*, 2002).

Outro suposto papel de I-2 é o controle da separação dos centrôssomos durante a mitose e possível participação em outros eventos neste estágio da divisão celular de mamíferos (Leach *et al.*, 2003). Esta idéia se baseia no fato de que I-2 interage com Nek2, uma proteína que se encontra complexada com a PP1 nos centrôssomos. Assim, uma vez formado o complexo I-2/Nek2/PP1, ocorre um aumento da atividade da quinase Nek2 decorrente da inibição da PP1. Nek2 ativa pode então mediar a separação dos centrôssomos. A separação prematura dos centrôssomos induzida pela superexpressão do I-2 confirma estes achados (Eto *et al.*, 2002). Ademais, em células vivas, I-2 é fosforilado na Thr72 por uma proteína quinase dependente de ciclina durante a mitose. Esta forma fosforilada de I-2 foi localizada nos centrôssomos, sugerindo que a fosforilação reversível de I-2 também esteja controlando a atividade da PP1 nos centrôssomos (Leach *et al.*, 2003).

Ortólogos do I-2 já foram encontrados em diversos organismos eucarióticos, indicando uma distribuição mais ampla se comparado ao I-1, restrito aos vertebrados (Ceulemans *et al.*, 2002). Atualmente, inibidores do tipo 2 já foram isolados e caracterizados desde fungos até o homem, sendo que a potência inibitória destas proteínas varia na escala evolutiva. Assim, os I-2 de homem, coelho, rato e drosófila são inibidores potentes, com IC₅₀ em torno de 1-2nM. Estes inibidores apresentam similaridade em torno de 90%, exceto em drosófila (58%) (Helps *et al.*, 1994; Osawa *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 1999; Helps & Cohen, 1999). Em contraste, os I-2 de *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* e *C. elegans* são inibidores mais fracos com IC₅₀ variando de 11-200nM e apresentam apenas 20-30% de

similaridade de seqüência em relação às seqüências de I-2 de mamíferos (Tung *et al.*, 1995; Bennett *et al.*, 1999; Helps & Cohen, 1999; Zapella, 2001). Na verdade, o agrupamento de todas estas proteínas como I-2 somente é possível pela existência de motivos ou regiões conservadas nas mesmas que são descritas como importantes para a interação entre a PP1 e o I-2.

Estudos envolvendo mutagênese foram cruciais para a melhor caracterização de cinco regiões na seqüência de primária de I-2 que fazem contato com a PP1 (Park & DePaoli-Roach, 1994; Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). A região 1 é representada pela seqüência N-terminal IKGI e foi proposta como importante para a ligação e interação com a fosfatase. A região 2 deve formar uma alça que bloqueia o acesso dos substratos ao sítio catalítico da PP1, sem estabelecer contato com este sítio. Nesta região se encontra também o resíduo fosforilado pela GSK3, fundamental na reativação do complexo PP1/I-2. A região 3 possui uma seqüência KLHY que seria uma degeneração do motivo consenso RVXF, já mencionado anteriormente (item 1.3) como presente na maioria das proteínas que interagem com a PP1. A região 4 contém os resíduos carbóxi-terminais ácidos que contribuem para a atividade de I-2. Por fim, a região 5 quando mutada aumentou 30 vezes o IC₅₀ do inibidor. Estas regiões podem ser visualizadas na Figura 4 apresentada no item 4.1.

Diversos trabalhos têm colocado em dúvida alguns aspectos do modelo de interação PP1/I-2 descrito acima. Estes incluem os estudos que mostraram que a deleção ou mutação da região N-terminal, onde está contida a seqüência IKGI, acarretava num aumento do IC₅₀ do inibidor. Em drosófila e em coelho este aumento chegou a ser de 400 vezes. Todavia, este motivo sozinho não respondia pela potência do inibidor. Foi proposto então que IKGI, um motivo específico de I-2, seria importante para promover a interação com a PP1, permitindo assim que ocorresse inibição (Holmes *et al.*, 1986; Park & DePaoli-Roach, 1994; Bennett *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000). Dados mais recentes, entretanto, propõem que a seqüência representativa da região 1 seja na verdade o motivo KGILK. Estes dados sugerem também que este motivo seria funcionalmente equivalente ao motivo consenso RVXF, contradizendo dados que atribuíam este papel ao motivo KLHY. Enfim, foi proposto que KGILK ancoraria o I-2 na PP1, permitindo assim a ligação de sítios secundários de menor afinidade. Estes sítios secundários por sua vez,

determinariam à atividade e especificidade de substrato da fosfatase (Wakula *et al.*, 2003).

1.4.3. Outros inibidores

A busca por novas proteínas capazes de inibir PP1 levaram ao isolamento e caracterização de novos inibidores, entre eles o inibidor 3 (I-3), o inibidor 4 (I-4) e inibidores com ação mais específica como NIPP1 e CPI17. O I-3 foi inicialmente isolado a partir de uma biblioteca de cDNA humanos, mas também está presente em microorganismos eucarióticos. Curiosamente, este novo inibidor apresentou semelhanças ao I-1 e I-2 com respeito à resistência a tratamentos drásticos e comportamento anômalo em SDS-PAGE (Zhang *et al.*, 1998). O I-4 foi isolado a partir de células tumorais humanas como um inibidor da PP1 dez vezes mais potente que o I-2 (Shirato *et al.*, 2000).

O inibidor NIPP1 foi isolado pela primeira vez a partir do núcleo do timo de bovino. Estudos posteriores mostraram que o gene *NIPP1* codifica uma proteína de 38,5kD, extremamente sensível a proteólise. NIPP1 é o mais potente inibidor da PP1 (K_i na faixa de picomolar) e está presente no núcleo das células dos vários tecidos de mamíferos (Van Eynde *et al.*, 1995; Beullens *et al.*, 1996). Ortólogos de NIPP1 foram identificados em drosófila e humanos. O gene *NIPP1* humano possui sete exons e codifica quatro transcritos diferentes gerados por processamento ou poliadenilação alternativa (Van Eynde *et al.*, 1999; Parker *et al.*, 2002).

NIPP1 não necessita de fosforilação para inibir a PP1, assim como observado para I-2. Após formação de um complexo que inativa a PP1c, NIPP1 é fosforilado em sua Ser178 e Ser179 pela PKA e/ou Thr161 e Ser204 pela CKII. A fosforilação de NIPP1 resulta na redução drástica da sua atividade como inibidor (Beullens *et al.*, 1996; Vulsteke *et al.*, 1997; Beullens *et al.*, 1999). Ambas as quinases reduzem a afinidade de NIPP1 pela PP1, aumentando a atividade da fosfatase sem, entretanto, causar a dissociação do complexo NIPP1/PP1. Especula-se ainda que a fosforilação de NIPP1 previna sua associação com a PP1 (Van Eynde *et al.*, 1995).

Estudos iniciais verificaram que NIPP1 recombinante se liga ao RNA e que sua região C-terminal apresenta atividade de endonuclease. Sua ligação ao RNA não é impedida na presença da PP1, mas a degradação do RNA é afetada (Jagiello *et al.*, 1997). Atualmente postula-se que NIPP-1 seja necessário para a última etapa

do arranjo do *spliceosome*. Sua função no processamento do RNA depende de um domínio FHA (*ForkHead-Associated*) localizado na porção N-terminal da proteína, bem como de alguns resíduos da porção carboxi-terminal. O domínio FHA de NIPP1 interage com os fatores de *splicing* SAP155 e CDC5L, contribuindo para o rearranjo do *spliceosome* (Boudrez *et al.*, 2000; Beullens & Bollen, 2002; Boudrez *et al.*, 2002). O carboxi-terminal parece não estar envolvido na formação do *spliceosome*, mas possui sítios para ligação da PP1 e de ácidos nucleicos ricos em A/U. O potencial inibitório do carboxi-terminal é diminuído pela ligação do RNA e pela fosforilação da Tyr-335 (Jin *et al.*, 1999; Beullens *et al.*, 2000). Propõe-se que NIPP1 poderia ser uma proteína bifuncional, ou seja, possuir funções independentes de arranjo do *spliceosome* e de regulação da PP1. Após o *splicing*, é provável que sua função seja direcionar a PP1 para a desfosforilação e regeneração dos fatores de *splicing* (Beullens & Bollen, 2002).

CPI-17 (*C*-kinase dependent *P*hosphatase *I*nhibitor) foi isolado a partir da musculatura lisa de aorta humana como um potente inibidor da PP1 (Eto *et al.*, 1995). Quando fosforilado pela PKC, CPI-17 inibe a PP1 com um K_i de 0,18nM e quando desfosforilado o K_i aumenta para 1,3nM. CPI-17 é um inibidor do complexo PP1c/MYPT1/M21 (Miosina fosfatase) bem como da PP1c livre (Eto *et al.*, 1997; Yamawaki *et al.*, 2001), sendo expressa principalmente em tecido muscular liso (Erdodi *et al.*, 2003). Foi proposto que CPI-17 liga no sítio ativo da PP1c onde ele é desfosforilado. Aparentemente esta hidrólise é retardada pela associação de MYPT1 com a PP1c e resulta na formação de um complexo (MYPT1/PP1c/P-CPI-17) responsável pelo aumento da contração da musculatura lisa (Eto *et al.*, 2004).

1.5. Papel fisiológico da PP1

Os dados da literatura apresentados nos itens anteriores mencionaram superficialmente a participação da PP1 na regulação de diversos eventos celulares através da desfosforilação de uma enorme variedade de substratos. A seguir detalhamos o envolvimento da PP1 em alguns destes eventos tais como o metabolismo do glicogênio, a reorganização do citoesqueleto, a divisão celular, o ciclo celular e a apoptose.

1.5.1. Metabolismo do glicogênio

O metabolismo do glicogênio é uma das vias metabólicas mais bem estudadas e permitiu o entendimento de parte das funções da PP1. Os estudos desta via levaram ao conhecimento de que o direcionamento e especificidade da PP1 são conferidos pela subunidade reguladora, responsável também pela atividade de PP1 na modulação de enzimas envolvidas na síntese e degradação do glicogênio. A grande quantidade de dados acumulados ao longo dos anos explica porque, até hoje em dia, utiliza-se a glicogênio fosforilase como principal substrato de PP1 em ensaios *in vitro*.

A síntese e a degradação das partículas de glicogênio são realizadas por duas enzimas que são moduladas através de fosforilação/desfosforilação. Estas enzimas são a glicogênio sintase e a glicogênio fosforilase, respectivamente. A glicogênio sintase é fosforilada por várias quinases em resíduos distribuídos nas duas extremidades da enzima, causando sua inativação. Já a glicogênio fosforilase é fosforilada somente pela fosforilase quinase em uma única serina, ocasionando sua ativação. A própria fosforilase quinase somente está ativa quando suas subunidades regulatórias α e β estão fosforiladas. Estas três enzimas encontram-se unidas às partículas de glicogênio e são parcialmente desfosforiladas pela PP1 que também se encontra ligada às partículas de glicogênio via subunidade G. Isto leva a desfosforilação das enzimas do metabolismo do glicogênio resultando na síntese e armazenamento do mesmo (Bollen & Stalmans, 1992; Hubbard & Cohen, 1993; Bollen *et al.*, 1998).

Estudos realizados em organismos evolutivamente distantes como levedura e mamíferos forneceram evidências da participação da PP1, através da subunidade G, na ativação da glicogênio sintase *in vivo*. O genoma da levedura apresenta quatro genes codificadores das subunidades G. Analisando-se os mutantes da PP1 que apresentaram baixa afinidade por Gac1, uma das suas subunidades G, ou os mutantes com perda total da função de Gac1 observou-se que estes se mostravam deficientes em glicogênio e com baixa atividade de glicogênio sintase (Stuart *et al.*, 1994; Ramaswamy *et al.*, 1998). A deleção adicional de Pig1, outra subunidade G, na linhagem sem Gac1 aumentou ainda mais a deficiência em glicogênio (Cheng *et al.*, 1997). Genomas de mamíferos, por outro lado, contém pelo menos sete genes codificadores das subunidades G. Comparações das estruturas primárias indicaram

a existência em todas as subunidades G do motivo canônico RVXF para interação com a PP1, além de um módulo de direcionamento com motivos para ligação ao glicogênio e aos substratos desta fosfatase (Wu *et al.*, 2001). A ligação da subunidade G tanto à PP1 quanto ao seu substrato mostrou-se fundamental para a ativação da glicogênio sintase, visto que o rompimento de quaisquer destas interações bloqueia esta ativação e conseqüente síntese de glicogênio. E ainda, nocaute de uma destas subunidades G em camundongos levou ao desenvolvimento de resistência a insulina, sugerindo que a ausência desta subunidade reguladora da PP1c pode contribuir para o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 em humanos (Delibegovic *et al.*, 2003).

1.5.2. Reorganização do citoesqueleto

A habilidade das células eucarióticas em adotar diferentes formatos e produzir movimentos coordenados e direcionados é dependente do citoesqueleto, uma estrutura altamente dinâmica que precisa se reorganizar continuamente na medida em que as células modificam suas formas, dividem-se ou respondem ao ambiente que as circunda. A organização e dinâmica do citoesqueleto são controladas por fosforilação reversível e sua regulação envolve a PP1c e pelo menos duas famílias de subunidades reguladoras, Neurabinas e Mypts.

A Neurabina é uma subunidade reguladora grande e complexa da PP1 e apresenta múltiplos sítios de ligação a outras proteínas. A região central da Neurabina contém um motivo RVXF de ligação com PP1c e um domínio PDZ que recruta a extremidade carboxila da quinase p70S6 (Burnett *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2000). Estas enzimas, no entanto, não se ligam a Neurabina simultaneamente devido à provável superposição dos seus sítios de ligação (Oliver *et al.*, 2002). Quando complexada com Neurabina, a PP1 causa o desarranjo das fibras de estresse, enquanto a quinase p70S6 promove o arranjo destas fibras (Crouch, 1997). Como a ligação entre Neurabina e p70S6 ocorre somente se esta quinase estiver fosforilada, o complexo Neurabina/PP1c poderia prevenir o recrutamento da quinase mantendo-a desfosforilada. A dissociação de PP1 é, portanto, um evento fundamental para a formação das fibras de estresse. Foi descrito que a fosforilação *in vivo* e *in vitro* do resíduo Ser461 da Neurabina pela PKA causa redução drástica de afinidade da PP1c pela Neurabina (McAvoy *et al.*, 1999; Oliver *et al.*, 2002).

Porém, como a PKA funciona como um regulador negativo da formação das fibras de estresse (Liu *et al.*, 2001), é pouco provável que esta quinase seja a responsável pela dissociação PP1c/Neurabina.

As Mypts são subunidades reguladoras de PP1c e estão agrupadas em Mypts menores e maiores. As miosinas fosfatases conhecidas são formadas pela associação da PP1 β com uma Mypt menor e uma Mypt maior (Alessi *et al.*, 1992; Moorhead *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2001). A função da Mypt menor ainda não foi elucidada, apesar da sua conhecida interação com a miosina e a extremidade carboxila da Mypt maior (Johnson *et al.*, 1997). A função da Mypt maior é direcionar a PP1c para a miosina e determinar a especificidade da fosfatase (Johnson *et al.*, 1996). Isto é feito através de três regiões conservadas encontradas em todas as Mypts. A primeira região conservada está mapeada na extremidade amino e contém o sítio RVXF. A associação de PP1 neste sítio permite a interação da fosfatase com dois outros motivos conservados (Toth *et al.*, 2000) que promovem a desfosforilação da cadeia leve regulatória da miosina e suprime a desfosforilação de outros substratos (Johnson *et al.*, 1996). A segunda região conservada está na parte central e contém um motivo inibitório de fosforilação que, quando fosforilado, inibe a miosina fosfatase (Feng *et al.*, 1999; MacDonald *et al.*, 2001; Muranyi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2001; Muranyi *et al.*, 2002). A terceira região conservada está mapeada na extremidade carboxila e contém dois sítios, um de ligação de miosina (Johnson *et al.*, 1996) e um provável sítio de dimerização da Mypt (Langsetmo *et al.*, 2001). Recentemente, a estrutura cristalina da PP1c em complexo com o domínio amino-terminal de MYPT1 foi elucidada, suportando a importância desta subunidade na especificidade da PP1c. A formação do complexo PP1c/MYPT1 produziu uma distensão do sítio catalítico da PP1 tornando-o mais adaptado para o substrato miosina e menos compatível com outros substratos (Terrak *et al.*, 2004).

1.5.3. Divisão celular

A segregação dos cromossomos e posterior divisão celular mobilizam uma extensa maquinaria proteica, parte desta modulada via fosforilação/desfosforilação. A PP1 parece desempenhar um importante papel na mitose, citocinese e meiose. Mutação condicional da PP1 em diferentes organismos resultou na má formação do aparelho mitótico e até mesmo na interrupção deste evento (Doonan & Morris, 1989;

Ohkura *et al.*, 1989; Axton *et al.*, 1990). Ademais, a heterogeneidade fenotípica dos mutantes de PP1 em levedura que param na fase M do ciclo sugere que a fosfatase possui múltiplos substratos nesta fase (Stark, 1996; Baker *et al.*, 1997), incluindo a lamina B e a quinase Nek2, além dos substratos da quinase Aurora. As quinases da família Aurora possuem múltiplos substratos mitóticos e meióticos, entre eles a histona H3 (Nigg, 2001). A condensação cromossômica observada em G₂ parece estar relacionada a fosforilação da Ser10 da histona H3 e seria revertida na telófase pela sua desfosforilação mediada por PP1 (Tournebize *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 2000; Giet & Glover, 2001). Esta hipótese é contestada por estudos realizados em levedura onde a Ser10 foi mutada sem provocar alterações no crescimento do organismo (Hsu *et al.*, 2000). Resultados semelhantes foram observados em *Xenopus*. Uma hipótese alternativa é que a fosforilação de H3 seria um mecanismo de controle para determinar o momento de iniciar a anáfase e telófase na célula (de la Barre *et al.*, 2001).

1.5.4. Interrupção de ciclo celular e apoptose.

As estratégias básicas para a divisão celular são altamente conservadas entre os organismos eucarióticos e envolve uma série de proteínas reguladoras. Estas são mantidas inativadas através da ligação com a proteína do retinoblastoma (pRb), um fator de transcrição regulado por fosforilação reversível (Rubin *et al.*, 1998). A pRb está sempre presente no núcleo da célula em qualquer fase do ciclo celular e constitui um substrato para PP1. No final da fase G₁, pRB é inativada através de fosforilação pelas Cdk's permitindo a progressão do ciclo celular (Liu *et al.*, 2001). Para que esta inativação aconteça sugere-se que a PP1 que se encontra em complexo com a pRB, seja também inativada através da fosforilação da Thr-320 por Cdk's presentes na transição G₁-S do ciclo celular (Berndt *et al.*, 1997). Foi mostrado ainda que a própria ligação da região carboxi-terminal da pRB na PP1c atua como inibidor da atividade catalítica desta fosfatase (Tamrakar & Ludlow, 2000). Assim, ao final da mitose, a PP1c ativa novamente a pRb através de sua desfosforilação o que impede a célula de iniciar uma nova divisão. A entrada da célula em G₀ ou em apoptose induzida por genotoxinas também está correlacionada a desfosforilação da pRb (N'Cho & Brahmi, 1999; Esposito *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Outros alvos da PP1 envolvidos nas decisões de vida ou morte da célula são as proteínas Bcl-2 e

Bad. Foi sugerido que Bcl-2 direciona a PP1 para desfosforilar a proteína Bad que, por sua vez, induz apoptose através da ativação de proteases da família das caspases (Ayllon *et al.*, 2001; Ayllon *et al.*, 2002). Postula-se que quando ambas as proteínas Bcl-2 e PP1c estão fosforiladas não ocorre a desfosforilação de Bad e a célula sobrevive. Já quando as mesmas são desfosforiladas pela fosfatase PP2A, a proteína Bad é desfosforilada induzindo a apoptose (Garcia *et al.*, 2003). Recentemente foi mostrado que a quinase JNK (*c-Jun N-terminal protein Kinase*) fosforila Bcl-2 em células cujo ciclo celular está interrompido na fase mitótica, apontando para um papel do complexo JNK/Bcl-2/PP1c no controle da apoptose (Brichese *et al.*, 2004).

1.5.5. Outros papéis fisiológicos

Processos como tradução de proteínas e regulação de bombas e canais de íons também contam com a participação da PP1. A desfosforilação do fator de tradução eucariótico eIF2 α promovida pelo complexo PP1c/GADD34 é crucial para a recuperação de situações de estresse (Connor *et al.*, 2001). O acúmulo de Ca²⁺ nos estoques intracelulares é mediada pela Ca²⁺-ATPase (SERCA) do retículo endoplasmático. Em alguns tecidos como músculo liso, músculo esquelético e coração, a atividade da SERCA é controlada por fosforilação reversível da proteína de membrana fosfolamban. A PP1 desfosforila fosfolamban causando a redução da atividade da bomba SERCA (MacDougall *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 2002).

Além do já mencionado envolvimento da PP1 em processos como aprendizado e memória em mamíferos (Genoux *et al.*, 2002), podemos citar a participação da PP1 na desfosforilação da proteína FRQ que controla o relógio circadiano em *Neurospora crassa* (Yang *et al.*, 2004).

1.6. Fosforilação reversível de proteínas em *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum, também conhecido como ameba social, é um microorganismo eucariótico encontrado em superfícies úmidas do solo (Loomis, 1996). *D. discoideum* tem sido utilizado como um sistema experimental em estudos de diversos processos celulares tais como citocinese, mobilidade celular, fagocitose, quimiotaxia, transdução de sinal e desenvolvimento. Estes estudos são facilitados

devido a características de *D. discoideum* como genoma haplóide, facilidade de cultivo e possibilidade de manipulação genética (Kuspa *et al.*, 1995; Eichinger *et al.*, 1999). Além disso, seu genoma foi totalmente seqüenciado e a anotação completa deverá estar disponível em breve, possibilitando uma compreensão mais abrangente da genética deste organismo.

O genoma de *D. discoideum* possui $3,4 \times 10^7$ pb divididos em seis cromossomos, um elemento extra-cromossômico contendo os genes de RNA ribossômico e 55kb de genoma mitocondrial. Os cromossomos variam de 4 a 8Mb e contém cerca de 11.000 genes com características peculiares como alto conteúdo de A/T (78%) e introns raros e pequenos (50-200pb) (Firtel & Bonner, 1972; Kuspa & Loomis, 1996; Kay & Williams, 1999). A seqüência do cromossomo 2, o maior deles, foi recentemente publicada e corresponde a ~25% do genoma com 2.799 genes preditos. Análises destas seqüências mostraram uma densidade gênica menor em *D. discoideum* (1 gene/2,6kb) que a observada na levedura *S. cerevisiae* (1 gene/2kb) (Glockner *et al.*, 2002). O tamanho do genoma de *D. discoideum* fortalece a visão do seu posicionamento filogenético próximo à base da evolução dos metazoários, anterior à separação dos fungos e metazoários, porém posterior à divergência do reino das plantas (Baldauf *et al.*, 2000; Glockner *et al.*, 2002). Assim, por ser um eucarioto com um programa de desenvolvimento multicelular simplificado, pode ser útil no estudo da evolução dos metazoários (Aubry & Firtel, 1999).

O ciclo de vida de *D. discoideum* (Figura 1) compreende duas fases distintas denominadas crescimento e desenvolvimento. Durante a fase de crescimento, as amebas são células não especializadas, haplóides idênticas que atingem alta densidade celular (10^7 células/mL) em cultivo, contendo ou não bactérias como fonte de alimento. Os tempos de duplicação das linhagens variam de 3 a 8 horas dependendo das condições de cultivo. Durante o desenvolvimento, que é disparado pela ausência de nutrientes, as amebas agregam-se em resposta a um sinal dado por alguns indivíduos da população (Loomis *et al.*, 1982; Devreotes, 1989; Kessin & Campagne, 1992; Gross, 1994; Kimmel & Parent, 2003). Este sinal consiste na liberação de cAMP no meio, a molécula responsável pela quimiotaxia nessa espécie. O cAMP se liga a receptores celulares associados a proteínas G heterotriméricas e desencadeia respostas coordenadas nas células sensibilizadas. Estas respostas incluem o deslocamento em direção às células que iniciaram a secreção de cAMP, e

a síntese e liberação de cAMP na forma de pulsos que atraem outras amebas mais afastadas. Durante a migração, as células tornam-se adesivas e formam correntes que se reúnem até constituir um organismo com $\sim 10^5$ células. Em seguida, o agregado assume a forma de um monte (agregado compacto) e as células do cume desta estrutura passam a exibir um padrão de expressão gênica distinto das demais. As células do cume correspondem às células pré-talo que se diferenciarão em células do talo. A maior parte das células restantes corresponde às células pré-esporo que posteriormente se diferenciarão em esporos. Os esporos ficam contidos numa estrutura denominada corpo de frutificação composto por uma cápsula sustentada por um talo de celulose constituído de células vacuolizadas. A liberação e germinação destes esporos reiniciarão um novo ciclo assexuado (Soderbom & Loomis, 1998; Aubry & Firtel, 1999).

Assim como nos demais organismos, os processos de crescimento e desenvolvimento de *D. discoideum* são regulados através de vias de transdução de sinal e fosforilação reversível de proteínas. Os estudos realizados em *D. discoideum* têm levado a identificação e análise funcional de diversos componentes desta rede regulatória tais como proteínas G, receptores acoplados a proteínas G, fatores de transcrição, MAP quinases (MAPK), PKA, glicogênio sintase quinase, GskA (ortóloga de GSK3) e outras moléculas sinalizadoras comuns a outras células eucarióticas. Estes estudos geram conhecimentos, inéditos ou não, que permitem uma melhor compreensão de processos semelhantes em outros organismos (Firtel, 1995; Plyte *et al.*, 1999; Ginger *et al.*, 2000; Weeks, 2000; Taminato *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2004).

Os mecanismos de fosforilação reversível já identificados em *D. discoideum* incluem a fosforilação em resíduos de serina/treonina e tirosina, além do sistema de dois componentes que envolvem a fosforilação de resíduos de histidina e aspartato. Algumas das proteínas quinases já identificadas como a PKA, as MAP quinases e a GskA mencionadas acima foram diretamente implicadas no controle do crescimento e/ou desenvolvimento (Nuckolls *et al.*, 1996; Loomis *et al.*, 1997; Singleton *et al.*, 1998; Thomason *et al.*, 1998; Widmann *et al.*, 1999). Ao menos oito tirosinas quinases e três tirosinas fosfatases já foram identificadas, sendo que as primeiras são distintas das tirosina quinases de mamíferos (Tan & Spudich, 1990; Howard *et al.*, 1992; Ramalingam *et al.*, 1993; Howard *et al.*, 1994; Adler *et al.*, 1996; Gamper *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1999). E ainda, por volta de 15 histidina quinases estão

presentes em *D. discoideum*, quatro delas, DhkA, DhkB, DhkC e DokA têm sido estudadas com mais detalhes e estão implicadas no desenvolvimento. Vale a pena ressaltar que a proteína DokA tem um papel importante na osmorregulação em *D. discoideum* (Thomason & Kay, 2000; Oehme & Schuster, 2001).

A proteína quinase dependente de cAMP (PKA) é uma das quinases mais estudadas em *D. discoideum*, ainda que seus substratos não tenham sido identificados até o momento. Essa enzima parece desempenhar múltiplos papéis no desenvolvimento de *D. discoideum* atuando durante a agregação quimiotática, a diferenciação das células pré-talo e pré-esporo e nas fases finais do desenvolvimento (Veron *et al.*, 1988; Wang & Kuspa, 1997; Loomis, 1998). Outra quinase bastante estudada é a YakA cuja ausência ou super-expressão resulta no descontrole da divisão celular e crescimento acelerado de *D. discoideum*. Além disso, a YakA diminui a expressão de genes envolvidos no crescimento vegetativo e induz genes de desenvolvimento em células submetidas à carência nutricional (Souza *et al.*, 1998). Um dos genes cuja expressão é diminuída é o *pufA* que inibe a tradução da subunidade catalítica da PKA, e como consequência a agregação (Souza *et al.*, 1999).

É interessante mencionar que *Dictyostelium* utiliza fatores de transcrição da família STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) como acontece nos metazoários. STAT funciona como um ativador transcricional em vias de resposta ao estresse e está envolvido no controle do desenvolvimento multicelular e da diferenciação de tipos celulares específicos (Weeks, 2000; Fukuzawa *et al.*, 2001; Araki *et al.*, 2003). Foi sugerida uma regulação bifásica da proteína STAT via fosforilação de dois resíduos (tirosina e serina) promovida pelo cAMP. Assim, quando a tirosina encontra-se fosforilada, a proteína STAT é importada para o núcleo. Isto é revertido após a fosforilação da serina pela GskA que promove a exportação nuclear desta proteína (Ginger *et al.*, 2000).

Apesar do conhecido envolvimento de fosforilação em resíduos de serina e treonina no crescimento e na diferenciação celular de *Dictyostelium discoideum*, há poucos estudos sobre as proteínas fosfatases que modulam estes processos. Simon e colaboradores (Simon *et al.*, 1992) encontraram as fosfatases do tipo 2A e 2C em *D. discoideum*. Estas apresentam propriedades muito semelhantes às encontradas na maioria dos organismos estudados até o presente, tais como sensibilidade ao inibidor ácido ocadáico, preferência por certos substratos e dependência de íons

divalentes. Além destas, PP1 (será discutida no item seguinte), PP4, PP5 e PP6 estão presentes em *D. discoideum*.

A subunidade catalítica da PP2A de *D. discoideum* foi purificada em nosso laboratório e apresentou propriedades bioquímicas similares as PP2Ac de outros organismos (Barroso, 1996). Acredita-se que uma holoenzima PP2A seja a principal responsável pela desfosforilação da cadeia pesada de miosina promovendo o rearranjo dos filamentos em *D. discoideum* (Murphy & Egelhoff, 1999; Murphy *et al.*, 1999). O cDNA para PP2Bc foi isolado a partir de uma varredura funcional de uma biblioteca de cDNA utilizando-se calmodulina marcada radioativamente (Dammann *et al.*, 1996). Esse cDNA foi expresso e a proteína recombinante foi utilizada para gerar anticorpos que reconheceram um polipeptídeo de 80kD presente em extratos celulares de *D. discoideum*. Essa enzima foi implicada na diferenciação celular durante o desenvolvimento (Horn & Gross, 1996), embora a superexpressão induzida em *D. discoideum* não resulte em alterações fenotípicas perceptíveis (Hellstern *et al.*, 1997). O gene da PP2C também foi clonado e o seu seqüenciamento revelou que a proteína por ele codificada é composta por um domínio catalítico e um domínio regulador similar à subunidade α da proteína G ligante de GTP. Foi verificado ainda que essa enzima é essencial para o desenvolvimento logo após a agregação das células de *D. discoideum* (Aubry & Firtel, 1998).

O cDNA relativo a PP4c de *D. discoideum* foi isolado em nosso laboratório a partir da varredura de uma biblioteca de cDNA. Foi verificado que seu gene está no cromossomo 2 e representado apenas uma vez no genoma. Foi mostrado também que os níveis de mRNA e proteína são constantes ao longo de todo ciclo de vida de *Dictyostelium* e que esta proteína se localiza predominantemente no citossol, em contraste com seu conhecido acúmulo nos centríolos, em outros organismos. Os cDNAs codificadores da DdPP5 e DdPP6 cedidos pelo grupo japonês que realizou o projeto de seqüenciamento de ESTs de *D. discoideum* (Morio *et al.*, 1998) foram seqüenciados e tiveram sua identidade confirmada pelo nosso grupo. Foi mostrado através da análise do genoma que a PP6 está localizada no cromossomo 2, assim como acontece com a PP1, PP2B e PP4. Contudo, o gene da PP5 não foi localizado neste cromossomo (Fiorini, 2003).

Figura 1. Ciclo de vida de *D. discoideum* (Adaptado de Darnell *et al.*, 1990). O tempo de desenvolvimento, induzido após carência nutricional, está indicado em horas. O inserto mostra a migração de células que ocorre após a culminação. Os nomes dos tipos celulares principais estão indicados.

1.6.1. A PP1 de *Dictyostelium discoideum*

Dados da literatura sugeriam que extratos de células de *D. discoideum* não exibiam uma atividade típica de PP1 (Simon *et al.*, 1992). Entretanto, um cDNA completo que codifica para PP1c de *D. discoideum* (DdPP1c) foi isolado em nosso laboratório. O gene que codifica DdPP1c está presente como cópia única no genoma de *D. discoideum* e é expresso ao longo de todo o ciclo de vida desse organismo. Experimentos com o objetivo de inativar ou superexpressar o gene da DdPP1c não resultaram em células viáveis, sugerindo que esta fosfatase teria um possível papel no crescimento ou na divisão celular em *D. discoideum*, a exemplo do que ocorre em outras espécies estudadas (Andrioli *et al.*, 2003).

A sequência de aminoácidos da DdPP1c apresentou uma identidade de 80% com PP1c de outros organismos. Todavia era intrigante a presença de uma substituição de um resíduo de cisteína altamente conservado em outros organismos por uma fenilalanina na posição 269. Este resíduo correspondente a Cys273 da PP1c de coelho tem sido descrito como importante na interação desta fosfatase com toxinas e inibidores. Deste modo, foi inferido que a substituição na posição 269, correspondente a um resíduo tão conservado, pudesse acarretar alterações nas propriedades bioquímicas da PP1c de *D. discoideum*. Um mutante foi construído a partir da substituição da Phe269 por um resíduo de cisteína e nomeado DdPP1cF269C. Os níveis de expressão das proteínas recombinantes (selvagem e mutante) foram semelhantes, enquanto a atividade de fosforilase fosfatase da enzima DdPP1c foi 6-18 vezes mais baixa que da DdPP1cF269C. A sensibilidade destas fosfatases frente a toxinas como ácido ocadáico, tautomicina, caliculina A e microcistina-LR também foi testada. Tautomicina e ácido ocadáico inibiram ambas as formas recombinantes de maneira semelhante, contudo a caliculina A foi mais eficiente na inibição da DdPP1cF269C ($IC_{50} = 0,13nM$) em relação a selvagem DdPP1c ($IC_{50} = 2,07nM$). As PP1c de outros organismos também são inibidas por caliculina A com um IC_{50} na faixa de 0,3-0,7nM como acontece com a DdPP1cF269C. Os resultados sugeriram, portanto, que a DdPP1c além de exibir menor atividade era menos sensível à caliculina A (Andrioli *et al.*, 2003).

Foi inferido que as propriedades bioquímicas não usuais exibidas pela DdPP1c recombinante poderiam estar relacionadas com alterações na estrutura tridimensional da enzima. Para investigar está hipótese foi realizada uma

modelagem molecular da DdPP1c selvagem e mutada utilizando-se a estrutura tridimensional da PP1c de coelho complexada com microcistina-LR como modelo (Goldberg *et al.*, 1995). Foi observado que em ambos os casos os esqueletos de carbono das proteínas de *Dictyostelium* e coelho foram adequadamente superpostos. A presença da Phe269 na alça β 12- β 13, de maneira geral, não afetou a conformação da DdPP1c. Todavia, mudanças locais no sítio catalítico foram evidenciadas pela comparação da acessibilidade do solvente nos modelos de DdPP1c e DdPP1cF269C ligadas a caliculina A ou ácido ocadáico. As mudanças conformacionais observadas atingiram, sobretudo, a alça β 12- β 13 e o sulco hidrofóbico, estruturas envolvidas na inibição da PP1 por toxinas. As aparentes causas destas deformações devem-se não somente a presença da Phe 269, mas também a conseqüente reorientação do resíduo Tyr268 (Tyr272 na PP1c de coelho) que faz parte da alça e é apontado como importante para ligação das toxinas (Goldberg *et al.*, 1995; Maynes *et al.*, 2001; Kita *et al.*, 2002). Com base nestas observações Andrioli e colaboradores (Andrioli *et al.*, 2003) sugeriram que estas alterações locais promovidas pela presença da Phe269 na DdPP1c são responsáveis por produzir uma PP1c com propriedades bioquímicas não usuais.

A disponibilidade do cDNA da DdPP1c abriu possibilidades para a investigação do papel biológico desta fosfatase em *Dictyostelium discoideum*. Até o momento nenhuma subunidade reguladora havia sido descrita neste organismo e a identificação das mesmas contribuirá para uma melhor caracterização funcional da DdPP1.

2. Objetivos

Neste trabalho tivemos como objetivo a identificação de subunidades reguladoras da PP1c em *D. discoideum*. Mais especificamente buscamos por um ortólogo do inibidor-2 neste organismo. O inibidor DdI-2 foi identificado, caracterizado funcionalmente e suas regiões de interação com a DdPP1c foram mapeadas através de ensaios no sistema de duplo-híbrido em leveduras.

3. Procedimentos Experimentais

3.1. Procedimentos para manipulação de *Dictyostelium discoideum*

3.1.1. Manutenção e cultivo das células

Para realização dos experimentos descritos a seguir utilizamos a linhagem AX4 de *Dictyostelium discoideum*. Esta linhagem vem sendo mantida em nosso laboratório a partir de estoques gentilmente cedidos pelo Dr. William Loomis (University of California, San Diego, EUA).

O cultivo das linhagens de *D. discoideum* foi realizado em placas de meio SM sólido [peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,1% (p/v), MgSO_4 0,1% (p/v), dextrose 0,2% (p/v), agar 2% (p/v) e KH_2PO_4 20 mM, pH 6,8] conforme descrito por (Sussman, 1987). Inicialmente, corpos de frutificação maduros de *D. discoideum* são adicionados a uma suspensão da bactéria *Klebsiella aerogenes* preparada em meio SM líquido (200 μL). Esta suspensão é espalhada em placas contendo o meio SM sólido com auxílio da alça de vidro. As placas foram mantidas a 22°C até a formação de novos corpos de frutificação, quando foram guardadas a 4°C por até 15 dias.

Estoques de células também foram mantidos a -80°C. Para tal, o sedimento de 5×10^7 células em crescimento foi ressuspenso em 2mL de uma solução contendo HL-5 [proteose peptona nº2 1% (p/v), glicose 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e KH_2PO_4 20 mM, pH 6,8] 90% (v/v) e DMSO 10% (v/v), aliquoteado em frações de 500 μL e imediatamente congelado em gelo seco. As alíquotas congeladas foram armazenadas a -80°C

Quando necessário todo o conteúdo de um frasco de *D. discoideum* foi descongelado e adicionado a 500 μL de uma suspensão de bactérias *K. aerogenes* dissolvidas em meio SM líquido. Esta suspensão foi semeada em meio SM sólido, como descrito anteriormente. Esses estoques de células congeladas foram utilizados periodicamente como fonte de material para dar início a novas culturas em meio de crescimento sólido. As células semeadas dessa forma foram monitoradas quanto ao aparecimento dos corpos de frutificação. Nesta ocasião, foram transferidas para um frasco contendo 10mL de meio de cultura HL-5 e mantidas sob agitação de 200rpm a 22°C. Após dois dias, o volume era aumentado para 50mL com meio HL-5. Os

experimentos descritos neste trabalho foram realizados com células destas culturas em crescimento exponencial, isto é, com densidade celular entre 2 e 6×10^6 células/mL.

3.1.2. Desenvolvimento em filtros

As culturas de *D. discoideum* em meio axênico HL-5 foram submetidas a carência nutricional para obtenção de células em diferentes fases de desenvolvimento. Estes experimentos foram realizados sobre filtros de nitrocelulose *Millipore* de cor preta na porosidade de $0.45\mu\text{m}$ e com 47mm de diâmetro, como descrito por (Sussman, 1987). Inicialmente, os filtros foram fervidos 3 vezes em água destilada por 10 minutos cada e colocados sobre pré-filtros (*Schleicher & Schuel* nº 8 47mm) embebidos em tampão Sorensen (KH_2PO_4 20mM, pH 6,4). Aliquotas contendo 10^8 células suspensas em 1,0mL de tampão Sorensen foram espalhadas uniformemente sobre os filtros e incubadas em câmara úmida a 22°C . Nessas condições, obtínhamos o desenvolvimento sincrônico e completo, até formação do corpo de frutificação maduro, após período médio de 24 horas. Os estágios de desenvolvimento foram monitorados por observações na lupa e as células das diversas fases do ciclo de vida foram ressuspensas em 1,0mL de tampão Sorensen e imediatamente processadas de acordo com o experimento planejado.

3.1.3. Transfecção de DNA em *Dictyostelium* por eletroporação

Experimentos de nocaute gênico foram realizados para obtenção de mutantes de *D. discoideum* com o gene do Ddl-2 inativado. A técnica utilizada foi a de substituição do gene por recombinação homóloga (Egelhoff *et al.*, 1991). Neste método, o gene ou cDNA de interesse é previamente modificado pela inserção de um cassete contendo o gene de resistência ao antibiótico blasticidina e utilizado na transfecção das células. Os clones transfectantes resistentes ao antibiótico são analisados para verificação da eventual ocorrência de recombinação homóloga e inativação do gene (Sutoh, 1993). Detalhes da construção plasmidial utilizada (pCR2.1-Ddl-2_ko) estão mostrados no item 3.7.2.

Aproximadamente 10^7 células da linhagem AX4 em fase de crescimento exponencial foram mantidas por 15 minutos no gelo e depois concentradas por centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1mL de tampão de eletroporação (NaH_2PO_4 10mM, pH 6,1 e sucrose 1,5mM). 800 μL desta suspensão foram transferidos para uma cubeta gelada (*gene pulser cuvette 0,4cm, BioRad laboratories*) onde foram adicionados aproximadamente 40 μg do cDNA de interesse interrompido pelo cassete de resistência à blasticidina. As células foram submetidas a eletroporação no aparelho *Electro Cell Manipulator (BTX)* nas seguintes condições: 1,1kV, 300 Ω e 3 μF . Após a descarga elétrica, foram acrescentados imediatamente 10 μL de uma solução de MgCl_2 100mM e CaCl_2 100mM, mantendo-se a cubeta à temperatura ambiente por 10 minutos. O conteúdo da cubeta foi então dividido em 4 placas de cultura de tecidos ($\sim 2 \times 10^6$ células por placa) contendo 10mL de meio nutriente HL-5 acrescido de sulfato de estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram incubadas a 22°C e, no dia seguinte, foi adicionado o antibiótico blasticidina na concentração final de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seguindo-se incubação na mesma temperatura por mais 7 dias. Os clones resistentes à droga foram recuperados pipetando-se repetidamente o meio de cultura sobre os mesmos e em seguida semeados em meio SM sólido em diluições apropriadas para isolamento de clones.

3.2. Procedimentos para manipulação de células de *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1. Manutenção e cultivo das células

Células da levedura *S. cerevisiae*, estocadas a -80°C em meio YPD [Extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glicose 2% (p/v)] com 25% de glicerol, foram semeadas em meio YPD sólido [YPD contendo agar 2% (p/v)]. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas ou até que as colônias atingissem aproximadamente 2mm de diâmetro. Em seguida, elas foram seladas com *Parafilm* e estocadas a 4°C por 1-2 meses. Para preparar culturas líquidas, inoculamos colônias do estoque mantido a 4°C em meio YPD, seguindo-se incubação a 30°C por 16-18 horas com agitação a 200-250rpm. Para a maioria das linhagens, este procedimento fornece uma cultura com $\text{DO}_{600\text{nm}} > 1,5$. Para obtermos uma cultura em fase exponencial,

uma alíquota desta cultura foi diluída em meio fresco para DO_{600nm} entre 0,2–0,3. A cultura foi incubada a 30°C com agitação (200-250rpm) até atingir a densidade desejada.

As linhagens transformadas com plasmídeos carregam pelo menos uma marca nutricional que permite seleção de transformantes através de seu crescimento em meio SD [YNB w/a 0,67% (p/v), glicose 2% (p/v), 10% de solução de aminoácido 10X (v/v)]. Assim, estas linhagens foram cultivadas em meio SD acrescido dos aminoácidos necessários. Foram preparadas soluções 10X concentradas contendo os aminoácidos apropriados (L-isoleucina 300mg/L, L-valina 1500mg/L, L-adenina hemissulfato 200mg/L, L-arginina 200mg/L, L-histidina 200mg/L, L-leucina 1000mg/L, L-lisina 300mg/L, L-metionina 200mg/L, L-fenilalanina 500mg/L, L-treonina 2000mg/L, L-triptofano 200mg/L, L-tirosina 300mg/mL, L-uracil 200mg/L). Para preparação das diferentes soluções, não adicionamos os aminoácidos utilizados para a seleção, por exemplo, leucina, triptofano e/ou histidina.

3.2.2. Transformação de levedura

A linhagem AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2* :: *GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3*::*MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*), obtida da *Clontech*, foi inoculada em 10mL de YPD ou meio SD complementado com os aminoácidos necessários. A cultura foi incubada a 30°C até atingir DO_{600nm} entre 0,8-1,0. 6mL da cultura foram transferidos para tubos estéreis e centrifugados a 3.220xg por 5 minutos. As células foram suspensas em 2mL de água estéril e centrifugadas novamente. Em seguida, adicionou-se ao sedimento 200μL de uma solução TE/LiOAc preparada na hora [1X TE (Tris.HCl 10mM pH7,5; EDTA1mM); LiOAc 0,1M, pH 7,5]. 5μg do DNA a ser utilizado na transformação, foram transferidos para um tubo juntamente com 200μg de DNA de esperma de salmão (20μg/μL). 100μL de células foram então adicionados ao DNA e misturados com ajuda da micropipeta. Em seguida, adicionamos 600μL de solução estéril PEG/LiOAc [PEG 4000 40% (p/v); LiOAc 0,1M, pH 7,5; 1X TE pH 7,5]. A mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos com agitação ocasional dos tubos e então submetida a choque térmico a 42°C por 15 minutos em banho-maria. Posteriormente, o preparado foi centrifugado 3.220xg por 2 minutos e o

sobrenadante removido com auxílio da micropipeta. Por fim, as células foram suspensas em 0,4mL de TE pH 7,5 e semeadas em meio seletivo. As placas foram incubadas a 30°C por no mínimo 48 horas ou até o aparecimento de colônias. A eficiência de transformação variou entre 10^3 e 10^5 cfu/ μ g DNA em todos os experimentos.

3.2.3. Detecção de interação utilizando diluição seriada

As leveduras transformadas foram crescidas durante 16 horas em meio SD contendo a mistura de aminoácidos sem triptofano e leucina (meio seletivo duplo). As culturas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as suspensões de células normalizadas para uma DO_{600nm} de $\sim 0,5$, de acordo com a absorbância das culturas iniciais. 100 μ L de cada suspensão foram transferidos para poços da microplaca e diluídos (5x a partir da suspensão inicial) em meio SD líquido. Utilizando-se uma pipeta multicanal, foram aplicados 5 μ L de cada suspensão (diluídas ou não) em meio seletivo contendo histidina (meio seletivo duplo) ou não (meio seletivo triplo). A suspensão também foi aplicada em meio seletivo triplo com 1mM de 3-AT (3-aminotriazol). Este reagente funciona como um competidor de uma das enzimas que participam da biosíntese de histidina, por isso apenas as células que forem capazes de ativar fortemente a transcrição dos genes de biosíntese de histidina poderão crescer em meio suplementado com esta droga. As placas foram incubadas a 30°C por 2-3 dias e em seguida fotografadas para comparação do crescimento entre elas. Paralelamente, colônias crescidas em meio seletivo duplo foram transferidas para filtro de nitrocelulose e submetidas ao ensaio de atividade de β -Galactosidase.

3.2.4. Teste de atividade de β -galactosidase com substrato X- β -Gal

As colônias foram crescidas sobre filtro de nitrocelulose (82,5mm de diâmetro, *BioRad Laboratories*) em meio SD sem Trp/Leu/His a 30°C por 48 horas. Em seguida, foram testadas quanto a ativação do gene repórter *lacZ*. Os filtros de nitrocelulose contendo as colônias foram submetidos a um rápido congelamento em nitrogênio líquido. Após alguns segundos de descongelamento, o filtro foi depositado

em uma placa de petri contendo papel de filtro cortado em círculo, embebido em 5mL de Tampão Z ($\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60mM, Na_2HPO_4 40mM, KCl 10mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1mM), X- β -Gal 1mg/mL e β -mercaptoetanol 4mM. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas a 37°C. O aparecimento de colônias azuis foi verificado periodicamente por um período mínimo de 1 hora e máximo de 4 horas.

3.2.5. Ensaio de atividade de β -galactosidase com substrato ONPG

O nível de expressão de *lacZ* em células de levedura foi quantificado através do ensaio colorimétrico que utiliza ONPG (o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo) como substrato, conforme descrito por Miller (1972). Células de levedura foram crescidas a 30°C sob agitação de 200rpm até $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 0,5-0,8. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 16.000xg por 30 segundos e o precipitado ressuspenso em 1,5mL de Tampão Z. As células foram centrifugadas novamente e ressuspenso em 300 μ L do mesmo tampão (fator de concentração é 1,5mL/0,3mL = 5 vezes). Posteriormente, uma alíquota de 100 μ L de cada amostra foi transferida para um novo tubo, seguindo-se 3 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho-maria a 37°C), de 1 minuto cada. A estas células foram adicionados 0,7mL de tampão Z contendo β -mercaptoetanol seguido de 160 μ L de ONPG (4mg/mL em tampão Z sem KCl e MgSO_4). As reações foram incubadas a 30°C até aparecimento de cor amarela quando então 0,4mL de Na_2CO_3 1M foi adicionado. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 16.000xg por 10 minutos e as $\text{DO}_{420\text{nm}}$ dos sobrenadantes medidas.

A atividade da β -Galactosidase foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-Galactosidase} = 1.000 \times \text{DO}_{420\text{nm}} / (t \times V \times \text{DO}_{600\text{nm}})$$

[t = tempo de incubação com ONPG (minutos) e V = 0,1mL x fator de concentração]

3.3. Procedimentos para manipulação de bactérias

3.3.1. Manutenção e cultivo de bactérias

Repiques, estoques e culturas de bactérias foram realizados seguindo protocolos padrões (Sambrook *et al.*, 1989). As bactérias utilizadas para as

transformações foram as cepas Sure e DH10B de *Escherichia coli*. Para os experimentos de expressão das PP1c recombinantes utilizamos a cepa BL21(DE3) e para expressão de Ddl-2, INc-1L e INc-1 recombinante utilizamos a cepa BL21(DE3)pLysS. Todas as cepas usadas foram obtidas da *Stratagene*, e apresentam os seguintes genótipos:

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

DH10B: F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlac Z Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 ara Δ 139 Δ (ara,leu) 7697 galU galKl-rpsL nupG

BL21(DE3): F⁻ ompT hsd S_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)

BL21(DE3)pLys: BF⁻ dcm ompT hsd S (r_B⁻ m_B⁻) gal λ (DE3) [pLysS Cam^r]

Culturas das bactérias foram estocadas a -80°C em meio LB ou 2x TY contendo glicerol 20% (v/v). Quando necessário, alíquotas destes estoques foram semeadas em placas de meio LB sólido [Tryptona 1% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), agar 2%, pH 7,5] ou, no caso da BL21(DE3)PLysS, em placas 2x TY sólido [Tryptona 1,6% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v), NaCl 8,5mM e agar 1,5%, pH 7,4] contendo cloranfenicol 34 μ g/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 16-18 horas. Para obtenção de culturas em meio líquido, uma colônia foi inoculada em 3mL de meio LB ou 2x TY líquido, e crescidas a 37°C por 16-18 horas sob agitação a 225rpm.

3.3.2. Preparo de bactérias competentes

Inicialmente as bactérias foram estriadas em placas de meio LB ou SM sólido e incubadas a 37°C por 16-18 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi inoculada em 3mL de meio LB ou 2x TY líquido e crescida a 37°C, por 16-18 horas a 225rpm. Cerca de 1,0mL de pré-inóculo foram transferidos para 500mL de meio LB ou 2x TY líquido fresco e crescido por 2-3 horas nas mesmas condições anteriores, até atingir DO_{600nm} = 0,5. As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis, incubadas a 0°C por 15 minutos e em seguida coletadas por centrifugação (8.461xg por 15 minutos a 4°C). O sedimento foi suspenso em 250mL de água destilada estéril gelada e centrifugado nas condições anteriores. A etapa de

lavagem foi repetida por mais duas vezes, as células suspensas em 50mL de glicerol 10% (v/v) gelado e submetidas a centrifugação novamente. Por fim, as bactérias foram suspensas em 1mL de glicerol 10% (v/v), distribuídas em alíquotas de 45µL, congeladas em banho de gelo seco/etanol e estocadas a –80 °C.

3.3.3. Transformação de bactérias por eletroporação

Aproximadamente 0,2µg de DNA (plasmídeos ou produtos de reações de ligação de DNA) foram adicionados a 45µL de células competentes e a mistura foi transferida para uma cubeta (*gene pulser cuvette 0,2cm, BioRad laboratories*) previamente resfriada. As células foram submetidas à eletroporação no aparelho *Electro Cell Manipulator (BTX)* nas seguintes condições: 2500V, 50µF e 129Ω. Imediatamente após, foi adicionado 1mL de meio LB ou 2x TY, sendo a suspensão bacteriana transferida para tubo de cultura e incubada a 37 °C por 1 hora a 200rpm. Após essa recuperação, 100µL, 200µL e 300µL de cultura foram semeados em placas de meio LB sólido contendo carbenicilina 100µg/mL ou canamicina 30µg/mL, ou meio 2x TY contendo carbenicilina 100µg/mL e cloranfenicol 34µg/mL. Colônias transformantes isoladas foram inoculadas em meio LB líquido contendo o mesmo antibiótico, para posterior análise.

3.4. Manipulação e análise de DNA e RNA

Os protocolos experimentais relativos às técnicas de DNA recombinante são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de protocolos descritos nos manuais dos fabricantes de reativos e *kits* bem como de protocolos descritos por (Sambrook *et al.*, 1989) e (Ausubel *et al.*, 1995).

3.4.1. Descrição dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram utilizados como iniciadores (*primers*) de reações em cadeia da polimerase de DNA (PCR) ou de seqüenciamento de nucleotídeos de DNA. Os oligonucleotídeos sintéticos foram encomendados a *Invitrogen Life Technologies* ou adquiridos da *Clontech* e estão descritos a seguir:

a) Oligonucleotídeos específicos da sequência do cDNA da PP1 de *D. discoideum* (Andrioli *et al.*, 2003):

PLP05: 5'- CTTGATCGACATAATCACCT - 3'

PLP06: 5'- ATCTGGTGAGAGACCACC - 3'

b) Oligonucleotídeos (*Clontech*) que flanqueiam o sítio de clonagem dos vetores de duplo-híbrido:

T7: 5' - TAATACGACTCACTATAGGGCGA - 3' (ambos)

3'BD: 5' - TAAGAGTCACTTTAAAATTTGTA - 3' (pGBKT7)

3'AD: 5' - CTGTGCATCGTGCACCATCT - 3' (pGADT7)

c) Oligonucleotídeos que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor pCR2.1 (*Invitrogen Life Technologies*):

M13R : 5' - GAGGAAACAGCTATGACC - 3'

M13F(-20): 5' - GTAAAACGACGGCCAG - 3'

d) Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA de Ddl-2. Os sítios existentes para enzimas de restrição estão sublinhados:

Ddl01: 5' - CATCGATACATGAATAAAGATGAAGAATTTTTAGAAGAACATC - 3'
Clal

Ddl02: 5'- GCAAATTTATCAGATGACGAACAATAA - 3'

e) Oligonucleotídeos utilizados na geração de mutantes de Ddl-2 por PCR a partir de seu cDNA. Os sítios existentes para enzimas de restrição estão sublinhados:

Ddl03: 5' - CCATCGATACATGAATAAAGATGAAGAATTTTTAGAAGAACATC - 3'
Clal

Ddl04: 5' - CCATCGATACCAACAAGAAAAGAGTGAATGGG - 3'
Clal

Ddl05: 5' - CGGGATCCTTGGTGGTGGTTGTGATTTAT - 3'
BamHI

Ddl06: 5' - CGGGATCCTCTTCATCCCAAACATCCTAT - 3'
BamHI

Ddl07: 5' - CGGGATCCTTTTCGTCTGTTTCTTCTTCAG - 3'
BamHI

Ddl08: 5' - CGGGATCCTTATTGTTTCGTCATCTGATAAATTTGC - 3'
*Bam*HI

f) Oligonucleotídeos utilizados na geração do mutante Ddl-2^{134Δ143}:

Ddl09: 5' - GATTCATAATAATGTGTTGAAGATTATTC - 3'

Ddl10: 5' - GAATAAATCTTCAACACATTATTATGAATC - 3'

3.4.2. PCR e RT-PCR

As PCRs foram geralmente realizadas em soluções contendo 0,2-1μM de cada oligonucleotídeo, 0,2mM de cada dNTP (*Stratagene*), 1X tampão da *Taq* DNA polimerase, 1U de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*), 1,5mM de MgCl₂ e 50-100ng de DNA em um volume final de 50μL. A condição usual de programação dos ciclos do termociclador (*Perkin Elmer*) foi desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, seguida de 30-35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50-55°C (variável de acordo com a T_m do oligonucleotídeo) por 60 segundos e 72°C por 1 minuto. Por fim, armazenagem a 4°C do produto da reação.

A amplificação da seqüência codificadora de Ddl-2 foi realizada por RT-PCR. O RNA total de *D. discoideum* foi transcrito reversamente utilizando-se oligo (dT)₁₂₋₁₈ fornecido no *kit* de síntese de cDNA (*Invitrogen Life Technologies*). Em seguida, procedeu-se a PCR com os oligonucleotídeos Dd01 e Dd02 (item 3.4.1).

No caso do mutante Ddl-2^{134Δ143} onde 30 nucleotídeos foram deletados, a composição da reação foi diferente. Utilizamos 0,125μM de cada oligonucleotídeo, 0,2mM de cada dNTP (*Stratagene*); 1X tampão da *PfuTurbo* DNA polimerase (*Stratagene*); 2,5U de *PfuTurbo* DNA polimerase (*Stratagene*), 50ng de DNA num volume final de 50μL. A condição de programação dos ciclos do termociclador (*Perkin Elmer*) foi desnaturação inicial por 30 segundos a 95°C, seguida de 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 45°C por 1 minuto e 68°C por 21 minutos. Por fim, armazenagem a 4°C. Após 15 ciclos foram adicionadas mais 2,5U da enzima *PfuTurbo* DNA polimerase à reação. Após amplificação, o produto obtido foi digerido com a enzima *DpnI* (*Stratagene*) que digere especificamente o DNA metilado parental que não possui a mutação, seguindo recomendações do fabricante.

3.4.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

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

3.4.4. Eluição de fragmentos de DNA em papel

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose. O gel foi fotografado e cortado entre as bandas de DNA de modo a permitir a introdução de um pedaço de 2,5cm de papel de filtro (*Whatman DE81*) adiante do fragmento. A eletroforese continuou até que o DNA tivesse passado para o papel. O papel com o DNA foi transferido para um tubo contendo uma solução de 500µL de NaCl 1M e TE pH 8,0. A solução foi misturada e deixada à temperatura ambiente por 1 hora. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 16.000xg e o sobrenadante foi transferido para outro tubo ao qual foi adicionado um volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v). A solução foi centrifugada por 6 minutos à temperatura ambiente a 16.000xg. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol 100% gelado. O tubo foi centrifugado por 15 minutos a 16.000xg à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 500µL de etanol 70% (v/v), seguindo-se centrifugação nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi seco a vácuo (*Eppendorf concentrator 5301*) por 5 minutos, suspenso em 20µL de TE e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota foi quantificada em gel de agarose por comparação com fragmento de DNA de tamanho similar e quantidade conhecida.

3.4.5. Métodos de preparação de plasmídeos

3.4.5.1. Minipreparação pelo método da lise alcalina

As bactérias foram crescidas em 1,5mL de LB contendo carbenicilina 100µg/mL ou canamicina 30µg/mL a 37°C por 16-18 horas, 225rpm, e então submetidas a centrifugação a 16.000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 100µL de solução GET/Rnase (Tris.HCl 25mM, pH 8,0; glicose 0,5M; EDTA 10mM e ribonuclease A 150µg/mL) foram adicionados para suspensão do sedimento de bactérias. Em seguida, foram adicionados 200µL de solução de lise [SDS 1% (p/v) e NaOH 0,2M] recém preparada misturando-se delicadamente por inversão até completa homogeneização. A suspensão foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se a adição de 200µL de solução de neutralização (acetato de potássio 5M, pH 4,8). Após mistura da suspensão por inversão suave do tubo, seguiu-se incubação por 20-30 minutos a 4°C e centrifugação a 16.000xg por 15 minutos à temperatura ambiente. Do sobrenadante obtido, foram tomados 400µL e adicionados a 300µL de isopropanol, em um novo tubo. Após centrifugação a 16.000xg por 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500µL de etanol 70% (v/v) nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi seco a vácuo (*Eppendorf concentrator 5301*), suspenso em 25µL de Tris.HCl 10mM, pH 8,0 e mantido a -20°C.

3.4.5.2. Preparação em larga escala

Para obtenção de plasmídeos em maior quantidade, clones transformantes de *E. coli* Sure ou DH10B foram crescidos em 3mL de LB contendo carbenicilina 100µg/mL ou canamicina 30µg/mL. Para cada 250mL de meio LB fresco com antibiótico nas mesmas proporções anteriores, foram adicionados 250µL de pré-inóculo, seguindo-se incubação a 37°C por 16-18 horas a 225rpm. A cultura foi submetida a centrifugação 13.750xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi completamente removido e o sedimento ressuspenso em 15mL de solução I (Tris.HCl 20mM, pH 8,0; glicose 50mM e EDTA 10mM) acrescida de 75mg de

lisozima. Foram adicionados 30mL de solução II [NaOH 0,2M, SDS 1% (p/v)] recém preparada e a suspensão foi misturada delicadamente por inversão. Por fim, foram adicionados 15mL de solução III (acetato de potássio 5M, pH 4,8), misturados e submetidos a centrifugação a 13.750xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido em uma nova garrafa por filtração em gaze, acrescido de 36mL de isopropanol e submetido a centrifugação a 13.750xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado em estufa a 37°C para completa evaporação do isopropanol. O DNA foi ressuspense em 2,5mL de TE e transferido para um tubo de vidro de 15mL. A proteína foi precipitada pela adição de acetato de amônio 2,5M e incubação em gelo por 20 minutos. A mistura foi submetida à centrifugação 19.120xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para outro tubo de vidro. O DNA foi precipitado com 2 vezes o volume de etanol 100% e incubado em gelo por 20 minutos. O etanol foi removido por centrifugação a 19.120xg por 15 minutos a 4°C e o precipitado incubado a 37°C, até secar completamente. Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em TE adicionado de RNase (10µg/mL) e incubado a 37°C por 15 minutos. Após adição de NaCl para 1,5mM e ¼ do volume de PEG/NaCl [PEG 6000-8000 30% (p/v) e NaCl 1,5M] a mistura foi incubada a 4°C por 16-18 horas. O DNA precipitado foi centrifugado a 23.900xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspense em 50µL de água estéril e então adicionado de 50µL de tampão PK 2X [Tris.HCl 20mM, pH 8,0; EDTA 10mM, pH 8,0 e SDS 1% (p/v)] e proteinase K para concentração final 500µg/mL, seguindo-se incubação por 30 minutos a 37°C. Uma extração com igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) foi realizada seguida por uma extração com igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v). O DNA foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de acetato de potássio 3M, pH 5,5 juntamente com 2,2 volumes de etanol 100%, seguindo-se centrifugação a 16000xg por 15 minutos à temperatura ambiente. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) por centrifugação nas condições anteriores e, após aspiração de etanol, o DNA foi seco em concentrador a vácuo (*Eppendorf Concentrator 5301*) e finalmente ressuspense em 50µL de TE. A determinação da quantidade de DNA foi feita pela medida da absorbância a 260nm, onde $Abs_{260nm}=1$ equivale a 50µg de DNA fita dupla/mL.

3.4.6. Digestão com enzimas de restrição

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

3.4.7. Seqüenciamento automatizado de DNA

O seqüenciamento de DNA foi realizado no aparelho ABI PRISM™ 3100 (*Applied Biosystems*), conforme recomendações do fabricante. Em cada reação de seqüenciamento, foi utilizado 2,0µL de *Big dye terminator mix* (*Perkin Elmer*), 100-200ng de DNA, 9,6pmol de cada oligonucleotídeo, Tris.HCl 200mM pH 9,0 e MgCl₂ 5mM em um volume final de 15µL. A reação foi incubada 2 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Terminada a reação, as amostras foram precipitadas com etanol 100% e glicogênio 1mg/mL, lavadas com etanol 70%, suspensas em 20µL de formamida, desnaturadas a 94 °C por 5 minutos e submetidas ao seqüenciamento automatizado.

3.4.8. Minipreparação de RNA de total de *D. discoideum*

Cultura de células de *D. discoideum* em meio líquido foi centrifugada para obtenção de precipitados de 2×10^7 células. Os precipitados foram ressuspensos em 1mL de Trizol (*Invitrogen Life Technologies*) e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 0,2 volumes de CHCl₃, seguindo-se de agitação vigorosa e incubação por mais 3 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 16.000xg por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa transferida para outro tubo. A esta fase foi adicionado 1 volume de isopropanol e incubado por 10 minutos. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 4°C a 16.000xg, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75% (v/v) por centrifugação nas mesmas condições anteriores. O etanol foi desprezado e o precipitado seco por 10 minutos à temperatura ambiente. O precipitado de RNA foi ressuspenso em 50µL de H₂O livre de RNase e a amostra foi aquecida por 10 minutos a 65°C. Após a ressuspensão, a concentração e pureza do

RNA foram estimadas pela medida da absorbância a 260nm e 280nm. A integridade do RNA foi avaliada por comparação entre as bandas do rRNA após eletroforese em gel de agarose. Em alguns experimentos a qualidade e quantidade do RNA total foi avaliada no aparelho *BioAnalyser* (Agilent).

3.4.9. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído

Uma quantidade determinada de RNA (15-20µg) foi misturada com 3 vezes o volume de tampão de amostra [formamida 65% (v/v), MOPS10X 12% (v/v), formaldeído 8% (v/v), azul de bromofenol 3% (p/v), brometo de etídeo 0,5mg/mL em H₂O-DEPC] imediatamente antes da aplicação em gel de agarose contendo formaldeído [agarose 1,25% (p/v), MOPS 1X contendo 16% (v/v) de formaldeído, adicionado após a fusão da agarose]. A solução de MOPS 10X corresponde a MOPS Free Acid 4,1% (p/v), acetato de sódio 0,4% (p/v) e EDTA 0,028% (p/v). A H₂O-DEPC corresponde a H₂O previamente tratada com dietilpirocarbonato como descrito por (Ausubel *et al.*, 1995). A eletroforese foi realizada em baixa voltagem (40-60V) em aparato mantido livre de contaminação com RNAses.

3.4.10. Transferência de RNA para membranas de náilon (*Northern blot*)

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

3.4.11. Minipreparação de DNA genômico de *D. discoideum*

Após crescimento em meio líquido HL-5, 5×10^7 células foram resfriadas e centrifugadas a 800xg por 5 minutos a 4°C. O meio de cultura foi desprezado e 75µL de EDTA gelado (150mM e pH 8,0) foram adicionados para ressuspensão das células em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 100µL de Sarcosil 10 % (p/v), o tubo foi agitado moderadamente e incubado a 55°C por 30 minutos. Foram adicionados 250µL de acetato de amônio 4M e o tubo foi agitado e centrifugado a 16.000xg a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v). O tubo foi agitado e centrifugado a 16.000xg por 4 minutos. Esta extração foi repetida por mais duas vezes. A fase aquosa foi extraída com clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v) e centrifugada nas mesmas condições acima. A fase aquosa foi precipitada com 2,2 volumes de etanol 100% e 0,1 volume de KOAc 3M, pH 5,5. O tubo foi centrifugado a 16.000xg por 15 minutos e o precipitado foi lavado em etanol 75% (v/v) e centrifugado nas mesmas condições. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco no concentrador a vácuo (*Eppendorf concentrator 5301*) por 5 minutos e ressuspensão em 100µL de TE contendo 10µg/mL de RNase. Para a análise por eletroforese em gel de agarose, foi utilizada uma alíquota de 10µL.

3.4.12. Transferência de DNA para membranas de náilon (*Southern blot*)

O DNA genômico de *D. discoideum* digerido ou não com enzimas de restrição foi separado por eletroforese em gel de agarose. O gel foi incubado em solução de despurinação (HCl 0,25M), em seguida em solução de desnaturação (NaCl 1,5M e NaOH 0,5M) e por último em solução de neutralização (Tris.base 1M e NaCl 1,5M, pH 7,4) durante 30 minutos cada. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação branda. O procedimento para transferência de DNA para membranas de náilon (*Southern blot*) foi similar ao descrito no item 3.4.10, exceto que o tempo da transferência por pressão no sistema *Posi Blot® 30-30 Pressure Blotter and Pressure Control Station* (*Stratagene*) foi de 1 hora.

3.4.13. Preparação de sonda radioativa

A marcação da sonda de DNA foi feita com o *kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen Life Technologies)*, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, utilizando 50 μ Ci de [α^{32} P] dATP e/ou [α^{32} P] dCTP. Utilizamos 25 μ L de uma solução contendo de 50-100ng de DNA diluído em água (em geral fragmento de DNA purificado por eletroforese em gel de agarose) e que foi previamente desnaturado por fervura durante 5 minutos e resfriado rapidamente em gelo, antes da reação de marcação. Para purificação da sonda radioativa, um pouco de lã de vidro foi empacotado no fundo de uma seringa de 1mL sem agulha que foi em seguida apoiada num tubo cônico de 15mL e preenchida com 0,9mL de resina Sephadex G-50 previamente equilibrada em TE. A resina foi lavada com 5 a 10mL de STE (Tris.HCl 10mM, pH 7,5, NaCl 10mM e EDTA 10mM, pH 8,0) por centrifugação a 1258xg por 3 minutos, à temperatura ambiente. Foram adicionados 50 μ L da reação contendo a sonda radioativa seguindo-se eluição da sonda por centrifugação, nas mesmas condições diretamente no tubo acoplado à seringa. Para verificação da eficiência da incorporação radioativa, alíquotas de 1 μ L da sonda purificada e não purificada foram adsorvidas em pedaços de 1 x 1 cm papel de filtro (em cada). Um pedaço contendo a sonda não purificada e outro contendo a sonda purificada foram tratados com 25mL de TCA 10% (v/v), a 4°C por 10 minutos, por duas vezes. Em seguida os papéis foram lavados com etanol e depois de secos, a radioatividade foi medida em espectrofotômetro de cintilação (*Beckman*) e comparada com os papéis contendo as mesmas amostras que não tinham sido submetidas ao tratamento com TCA. Em geral, a atividade específica das sondas preparadas estava na faixa de 5x10⁸ a 10⁹ cpm/ μ g de DNA.

3.4.14. Hibridização de DNA e RNA com sonda radioativa

A membrana (*Southern ou Northern blot*) foi apoiada sobre uma tela de náilon e então colocada na garrafa de hibridização contendo solução de hibridização [Formamida 50% (v/v), Denhardtts 5X, SSPE 6X, SDS 0,1% (p/v) e DNA de esperma de salmão 100 μ g/mL]. A solução de Denhardtts corresponde a: Ficoll 1% (p/v), polivinilpirrolidona 1% (p/v), BSA fração V 1% (p/v). A solução SSPE 20X

corresponde a: NaCl 3M, NaH₂PO₄ 0,2M pH 7,4 e EDTA 20mM. Esta pré-hibridização foi realizada a 37°C por pelo menos 2 horas. Após este tempo, a sonda radioativa foi acrescida à solução de hibridização seguindo-se incubação por no mínimo 12-16 horas a 37°C. Após hibridização, foram realizadas duas lavagens da membrana com solução de lavagem [SSPE 0,5X; NaCl 3M; NaH₂PO₄ 0,2M, pH 7,4; EDTA 20 mM e SDS 0,1% (p/v)] por 30 minutos a 65°C, sob agitação branda. Após secagem ao ar, a membrana foi envolvida em filme plástico para exposição a filme de raios-X a -80°C, por períodos variados. Nos casos em que foi necessária a re-hibridização da membrana com outra sonda radioativa, a primeira sonda foi removida pelo tratamento da membrana com solução de retirada [Tris.HCl 0,2 M, pH 7,5; SSC 0,1X e SDS 0,1% (p/v)] a 80°C por 5 minutos por três vezes. A remoção completa da sonda era confirmada pela exposição da membrana a filmes de Raios-X por tempos prolongados antes da sua re-hibridização com uma nova sonda.

3.5. Manipulação e análise de proteínas

3.5.1. Procedimentos gerais

Os protocolos experimentais relativos à purificação e análise de proteínas são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de manuais dos fabricantes de reativos e *kits* bem como de protocolos descritos por (Coligan *et al.*, 1995). Separação eletroforética unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS (SDS-PAGE), transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e coloração de géis de poliacrilamida com *Coomassie Blue R* foram realizados conforme protocolos descritos em (Sambrook *et al.*, 1989) e (Harlow & Lane, 1988).

3.5.2. Preparo de extratos celulares de levedura para análises por SDS-PAGE e por *immunoblot*

3.5.2.1. Preparação da cultura de células de levedura

Colônias de levedura isoladas foram inoculadas em 5mL de meio YPD ou SD líquido suplementado com os aminoácidos requeridos pela linhagem e crescidas a 30°C por 16-18 horas com agitação. Após incubação, foi realizada a leitura da densidade óptica das culturas a 600nm para estimativa da concentração de células. A cultura foi então resfriada imediatamente em gelo e centrifugada a 7.000xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 50mL de água gelada. Procedeu-se outra centrifugação a 7.000xg por 5 minutos, a 4°C. O sedimento foi imediatamente congelado em gelo seco e estocado a -80°C até o uso.

3.5.2.2. Preparação dos extratos de proteína

A cultura preparada conforme descrito acima, foi mantida em gelo até completo descongelamento e então lavada com NaN_3 10mM. O sedimento lavado foi suspenso em tampão de lise [MOPS 50mM, pH 7,5; sacarose 0,3M; CaCl_2 1mM; β -mercaptoetanol 10mM e PMSF 1mM; sendo que os dois últimos componentes foram adicionados na hora do uso juntamente com a solução de inibidores de protease 1X (aprotinina 10mg/mL, leupeptina 10mg/mL, pepstatina 10mg/mL, chimostatina 25mg/mL)] na proporção de 1mL de tampão para quantidade de células equivalentes a 50 unidades de $\text{DO}_{600\text{nm}}$. O mesmo volume de pérolas de vidro (*Glass beads* 425-600 μm) foi utilizado para lise das células de levedura através de agitação vigorosa por seis vezes em períodos de 30 segundos cada, com intervalo de 30 segundos no gelo. Após incubação por 30 segundos a 4°C para deposição das pérolas, o sobrenadante foi recolhido, dividido em alíquotas de 20 μL e congelado a -80°C. No momento do uso, a cada 20 μL do sobrenadante foi adicionado 1mL de TCA 10% (v/v), seguindo-se centrifugação a 16.000xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 200 μL de MOPS 50mM, pH 7,5. A amostra foi submetida a centrifugação nas mesmas condições anteriores e o sedimento suspenso em 100 μL de tampão da amostra 1X [Tris.HCl 50mM pH 6,8; DTT 25mM;

glicerol 10% (v/v); SDS 1% (p/v) e Azul de bromofenol 1% (p/v)]. Por fim, as amostras foram fervidas a 100 °C por 3-5 minutos e submetidas a SDS-PAGE (item 3.5.8).

3.5.3. Detecção imunológica de proteínas

As membranas de nitrocelulose obtidas após transferência eletroforética de proteínas (item 3.5.8) foram coradas com Ponceau-S 0,1% (p/v) dissolvido em ácido acético 10% (v/v). Em seguida, as membranas foram lavadas brevemente com água para remoção do excesso de corante e checagem da eficiência da transferência realizada. Estas membranas foram então incubadas em TBS 1X [Tris.HCl 10mM pH 7,4; NaCl 150mM; NaN₃ 0,02% (p/v)] contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após esta etapa de bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpos específicos diluídos em TBS1X contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado, por uma noite. No dia seguinte, as membranas foram submetidas a seis lavagens de 10 minutos cada, com TBS 1X contendo 0,05% Tween-20 (v/v). Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação, com anticorpos secundários diluídos em TBS 1X contendo Tween-20 0,05% (v/v) sem NaN₃. As membranas foram novamente submetidas a seis lavagens com TBS 1X acrescido de Tween-20 0,05% (v/v) sem NaN₃, pelo período de 1 hora. Finalmente, as proteínas que reagiram com os anticorpos foram reveladas segundo as instruções do *kit ECL Plus Western blotting detection system (Amersham-Pharmacia Biosciences)*, com tempos de exposição a filme de Raios-X de 1, 5 e 30 minutos. Utilizamos os anticorpos anti-c-Myc na diluição 1:500, anti-GAL4 AD na diluição 1:2500 (ambos da *Clontech*) e anti-PP1 na diluição 1:100 (*Upstate*), seguindo-se incubação com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou coelho na diluição 1:5000 que fazem parte do *kit ECL Plus Western blotting detection system (Amersham-Pharmacia Biosciences)*.

3.5.4. Expressão de Ddl-2 recombinante

Para expressão do Ddl-2 foi utilizada a cepa BL21(DE3)pLysS, transformada por eletroporação com a construção pAE-Ddl-2 descrita no item 3.7. Após a transformação, 10 clones foram inoculados em 3mL de meio 2x TY acrescido de

carbenicilina 100µg/ml e cloranfenicol 34µg/mL e crescidos a 37°C, 200rpm, por 14-16 horas. As culturas crescidas durante a noite foram diluídas para DO_{600nm}= 0,1 em 10mL de meio 2x TY fresco contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo incubadas a 37°C. Quando a cultura atingiu DO_{600nm}= 0,4, uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida), submetida a centrifugação a 16000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias ressuspenso em 100µL de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE (descrito no item 3.5.8). Ao restante da cultura foi adicionado IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 1mM e alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 3 horas de incubação a 37°C. As amostras coletadas da cultura induzida (1mL) foram processadas como descrito acima, exceto que o sedimento de bactérias foi ressuspenso em 200µL de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE. As amostras das culturas não induzida e induzida foram armazenadas a -20°C até utilização.

Em alguns experimentos, a indução com IPTG foi realizada em diferentes temperaturas. Para tal, o clone que apresentou melhor indução a 37°C foi crescido em meio 2x TY sólido com os antibióticos necessários e pré-inoculado em 10mL de meio 2x TY contendo carbenicilina 100µg/mL e cloranfenicol 34µg/mL, a 37°C, por uma noite a 225rpm. Em seguida, esta cultura foi diluída para DO_{600nm}=0,1 em 50mL de meio 2x TY contendo antibiótico na mesma concentração anterior, prosseguindo-se a incubação em diferentes temperaturas (25, 30 e 37°C). Quando a cultura atingiu uma DO_{600nm}=0,4, uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida), o IPTG foi adicionado para concentração final de 1mM e alíquotas de suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 3 horas de incubação. Amostras das culturas induzidas e não induzidas foram processadas como já descrito. O restante da cultura foi submetido a centrifugação 4000xg por 20 minutos a 4°C e armazenado a -80°C por no máximo uma semana. A expressão de INc-1L foi realizada a 37°C segundo informações obtidas em estudos anteriores (Beton, 2004) utilizando os mesmos procedimentos descritos para Ddl-2.

O perfil de indução das proteínas recombinantes foi avaliado pela eletroforese dos extratos bacterianos em SDS-PAGE e coloração com Coomassie Blue (item 3.5.8).

3.5.5. Avaliação da solubilidade de Ddl-2 recombinante

Após indução da expressão de Ddl-2 recombinante com IPTG 1mM em diferentes temperaturas (25, 30 e 37°C), o sedimento bacteriano correspondente a 1mL de cultura foi coletado e ressuspenso em 1mL de tampão de lise [Tris.HCl 10mM, pH7,0; NaCl 100mM; imidazol 10mM; PMSF 1mM e glicerol 10% (v/v)]. A suspensão foi submetida a sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, posição 3 (*Branson Sonifier 450*) com intervalos de incubação por 1 minuto em gelo entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 9.880xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento ressuspenso em 1mL do tampão de lise. Alíquotas do sobrenadante e do sedimento foram analisados em SDS-PAGE como descrito no item anterior.

3.5.6. Purificação da proteína Ddl-2 recombinante a partir da fração solúvel

O sedimento correspondente a 45mL de culturas bacterianas induzidas com IPTG foi submetido a sonicação e processado conforme descrito no item anterior. Aproximadamente 1mL do sobrenadante (fração solúvel) foi então incubado com 100µl da resina de Ni⁺²-NTA agarose (*Qiagen*) previamente equilibrada com 2,5mL tampão de lise (item 3.5.5) a 4°C por 1 hora em homogenizador (*Heavy dutyrotator, Cole Parmer*) em baixa velocidade. Foram realizadas cinco lavagens com 750µl tampão de lise por centrifugação a 16000xg por 1 minuto. A proteína foi eluída com 150µl de tampão de lise acrescido de 25, 50, 75, 100, 150 e 300mM de imidazol, seguindo-se incubação por 15 minutos em gelo, centrifugação nas condições anteriores e coleta do sobrenadante.

Como a atividade da proteína recombinante se mostrou estável, purificamos uma maior quantidade da proteína recombinante, a qual foi armazenada a -80 °C em glicerol 10%(v/v). Assim, 6 sedimentos correspondentes a 45mL de culturas bacterianas induzidas foram lisados e centrifugados separadamente, como descrito anteriormente. 600µL de resina equilibrada com 15mL de tampão de lise foram incubadas com a fração solúvel do extrato bruto nas mesmas condições anteriores. Após essa incubação, a resina foi transferida para uma coluna (*Poly-Prep*

Chromatography Column, Bio-Rad Laboratories), onde foi feita a eluição da proteína recombinante a 4°C, como anteriormente descrito.

A concentração proteica do inibidor recombinante purificado foi estimada pelo método de Bradford (item 3.5.9). A molaridade da solução de Ddl-2 purificado foi estimada a partir da massa molecular, calculada com base na sequência de aminoácidos predita para esta proteína recombinante. A purificação de INc-1L também foi realizada conforme descrito para Ddl-2. No caso de INc-1, obtivemos amostras já purificadas cedidas pela aluna Daniela Beton (Beton, 2004).

3.5.7. Expressão da subunidade catalítica da PP1 (PP1c) de *D. discoideum* e de *N. crassa*

Para expressão das PP1c recombinantes de *Dictyostelium* e *Neurospora* utilizamos construções disponíveis no laboratório onde a porção codificadora destas fosfatases estão clonadas no vetor pTrcHisA (*Invitrogen Life Technologies*) que confere fusão com uma sequência que codifica para seis resíduos de histidina na porção amino-terminal. As construções pTrcHisA-DdPP1c, pTrcHisA-DdPP1cF269C (Andrioli, *et al.*, 2003) e pTrcHisA-NcPP1c (Zapella, 2001) foram utilizadas para transformar as bactérias competentes BL21(DE3). A indução das PP1c recombinantes foi realizada de acordo com procedimentos já estabelecidos (Zhang *et al.*, 1992b; Zapella, 2001; Andrioli *et al.*, 2003). Após transformação, colônias isoladas foram transferidas para pré-inóculos em tubos contendo 5mL de meio LB acrescido de 100µg/mL de ampicilina ou carbenicilina e crescidos a 37°C sob agitação durante a noite. No dia seguinte 250mL de meio LB contendo antibiótico e MnCl₂ 0,5mM foram semeados com 1/20 de pré-inóculo. As células cresceram a 37°C até que a DO_{600nm} atingisse 0,3. Neste momento foi adicionado IPTG para concentração final de 0,3mM e a temperatura de crescimento foi abaixada para 26°C. As culturas foram mantidas nestas condições por ~18 horas, quando então foram submetidas à centrifugação (4000xg por 20 minutos a 4°C). O sedimento de células foi armazenado a -80°C por no máximo uma semana. Vale ressaltar que uma diferença entre a PP1c recombinante e a PP1c nativa é que a última não depende de Mn⁺² para sua atividade. Portanto, a adição de MnCl₂ à cultura e em todos os tampões utilizados é fundamental para obtenção da PP1c recombinante ativa (Zhang *et al.*, 1992a; Alessi *et al.*, 1993).

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

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS (Laemmli, 1970) em placas. As amostras a serem analisadas foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris.HCl 50mM, pH 6,8; DTT 25mM; glicerol 10% (v/v); SDS 1% (p/v) e azul de bromofenol 0,025% (p/v)], fervidas por 3 minutos antes da aplicação no gel. A eletroforese foi realizada a 200V até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. As proteínas foram visualizadas por coloração com azul de Coomassie R 0,2% (p/v), preparado em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), seguindo-se de descoloração com ácido acético 7% (v/v) em metanol 30% (v/v). Após descoloração, os géis foram mantidos em glicerol 3% (v/v), por 1 hora antes de serem secos entre folhas de papel celofane a 70°C, por 45 minutos, em secador de gel (*Bio-Rad Laboratories*).

3.5.9. Dosagem de proteínas

A determinação do conteúdo protéico nas amostras foi realizada segundo o método de Bradford (Bradford, 1976) tendo como padrão BSA (albumina de soro bovino).

3.5.10. Ensaio enzimático para medida de atividades de proteínas fosfatases

Os ensaios enzimáticos para medida da atividade de fosforilase fosfatase da PP1c foram realizados de acordo com procedimentos já estabelecidos, utilizando-se [³²P] fosforilase a como substrato (Shenolikar & Ingebritsen, 1984; Zhang *et al.*, 1992c; Zapella, 2001; Andrioli *et al.*, 2003).

3.5.10.1. Marcação de fosforilase a

O substrato mais usado para medida de atividade enzimática de PP1 é a glicogênio fosforilase a, fosforilada *in vitro*. A obtenção de fosforilase a marcada com [³²P], foi realizada conforme o protocolo descrito por (Shenolikar & Ingebritsen,

1984). A reação contendo fosforilase b 32mg/mL, fosforilase quinase 56,4U, Tris.HCl 100mM pH8,2, glicerofosfato de sódio 100mM, CaCl₂ 0,1mM, acetato de magnésio 10mM e [γ^{32} P]ATP 0,2mM (5×10^8 cpm/mmol) em volume final de 500 μ L foi mantida por 60 minutos a 30°C. Em seguida foi acrescentado um volume de sulfato de amônio 90% (p/v). Após 30 minutos em gelo, a suspensão foi centrifugada a 16000xg por 10 minutos à temperatura ambiente e o precipitado obtido foi dissolvido em 250 μ L de tampão Tris.HCl 5mM pH7,5, contendo EGTA 0,1mM, glicerol 10% (v/v) e sulfato de amônio 45% (p/v). Após 30 minutos em gelo, a solução foi submetida a centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspense em 250 μ L de Tris.HCl 50mM, pH 7,0; EGTA 0,1 mM e β -mercaptoetanol 0,1% (v/v). Esta solução foi dialisada a 4°C por 48 horas contra o tampão citado acima, sendo o tampão trocado a cada 12 horas. Durante a diálise a fosforilase a cristaliza-se. Após a diálise, a amostra foi incubada por 2 horas em gelo e os cristais foram precipitados por centrifugação a 16000xg por 5 minutos à temperatura ambiente, dissolvidos em 250 μ L de Tris.HCl 50mM, pH 7,0; EGTA 0,1 mM e β -mercaptoetanol 0,1% e mantidos a 4°C até o momento do uso.

3.5.10.2. Ensaio das atividades das proteínas fosfatases do tipo 1 e inibidores do tipo 2 recombinantes

Para o ensaio da atividade enzimática da PP1c o sedimento bacteriano foi ressuspense em 1mL de tampão Tris.HCl 20mM, pH 8,0 contendo MnCl₂ 2mM; β -mercaptoetanol 2mM; PMSF 1mM e glicerol 10% (v/v). As células em suspensão foram submetidas a sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, posição 3 (*Branson Sonifier 450*) com intervalos de incubação por 1 minuto em gelo, entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 16.000xg por 20 minutos a 4°C. A reação foi realizada a 30°C em um volume final de 100 μ L. A reação foi iniciada pela adição de 80 μ L de tampão de reação [imidazol 50mM, pH 7,2; DTT 2mM; BSA 0,5mg/mL; cafeína 5mM; MnCl₂ 0,2mM e [32 P] fosforilase a (30.000cpm)] a 20 μ L de uma preparação contendo 0,1 μ g (DdPP1c), 1 μ g (DdPP1cF269C) ou 10 μ g (NcPP1c) de proteína total (sobrenadante dos lisados bacterianos) diluída em imidazol 50mM, pH 7,2; EDTA 1mM; DTT 2mM; BSA 0,5mg/mL e MnCl₂ 0,2mM. Após incubação de 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de TCA 10% gelado e

então submetida à centrifugação (16.000xg por 4 minutos). Foram coletados 100µL de sobrenadante e adicionados a 1mL de líquido de cintilação [naftaleno 10% (p/v), PPO 0,5% (p/v) em dioxano]. A radioatividade liberada foi quantificada em espectrofotômetro de cintilação (*Beckman*). Uma unidade de fosforilase proteína fosfatase é a quantidade necessária para catalizar a liberação de 1nmol de fosfato de fosforilase a por minuto. Os ensaios foram dimensionados para que o consumo de substrato fosse no máximo 20%. Concentrações crescentes de inibidor Ddl-2, INc-1L ou INc-1 recombinantes foram pré-incubadas a 30°C, por 10 minutos, com os extratos bacterianos a saber: 1µg (DdPP1c), 0,1µg (DdPP1cF269C) ou 10µg (NcPP1c), de atividade de fosforilase fosfatase.

3.6. Métodos de análise de seqüências de DNA e proteínas

A seguir estão listados os *Websites* que foram utilizados na análise de seqüências de DNA e proteínas:

NCBI (National Center for Biotechnology information)	www.ncbi.nlm.nih.gov
Expasy Molecular Biology Server	www.expasy.ch/
EMBL (European Bioinformatics Institute)	www.ebi.ac.uk/embl
Biomedical Computing Facility (Baylor College of Medicine)	http://bcf.bcm.tmc.edu/genomic.html
PRIMER3	www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www-cgi
<i>Dictyostelium discoideum</i> genome project	http://genome-imb-jena.de/dictyostelium http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_discoideum http://dicty.sdsc.edu/cgi-bin
Pfam	http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/
NetPhos 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/Services/NetPhos

Para pesquisa de similaridade de seqüências de DNA ou de proteínas utilizamos a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; (Altschul *et al.*,

1990) em bancos de dados públicos como o GenBank do NCBI (listado acima). Para o alinhamento de seqüências de aminoácidos utilizamos o programa ClustalX ou ClustalW (Higgins, 1994; Thompson *et al.*, 1994). Para o planejamento de oligonucleotídeos utilizamos o programa PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Para análise de domínios utilizamos o Pfam (Bateman *et al.*, 2004) e para busca por sítios passíveis de fosforilação o programa NetPhos 2.0 (Blom *et al.*, 1999) cujos endereços eletrônicos estão descritos na tabela acima.

3.7. Construções Plasmidiais

Os esquemas das construções plasmidiais estão apresentados na Figura 2, com a indicação das principais características de cada um dos vetores utilizados conforme descrito a seguir. Para gerar as figuras ilustrativas das construções plasmidiais, utilizamos o programa *Simvector*.

3.7.1. Construção do pCR-Ddl-2

Para clonagem do cDNA de Ddl-2 (786pb), foram confeccionados oligonucleotídeos específicos (Ddl01 e Ddl02) para amplificação da região codificadora da seqüência do ATG ao TAA. Os oligonucleotídeos foram planejados de forma a permitir a posterior subclonagem do cDNA de Ddl-2 nos vetores pGADT7 (ensaio de duplo-híbrido) e pAE (expressão de Ddl-2 recombinante em bactérias). Como molde utilizamos cDNA total obtido a partir da transcrição reversa de 5µg de RNA total da fase vegetativa de *D. discoideum* como descrito no item 3.4.2. O fragmento de cDNA amplificado foi ligado no vetor pCR2.1, que faz parte do *TA cloning kit* (Invitrogen) gerando a construção pCR-Ddl-2 (Figura 2A). O vetor pCR2.1 possui o promotor T7 e apresenta oriC como origem de replicação em bactérias. As células transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico ampicilina.

3.7.2. Construção do pCR-Ddl-2_ko

Para construção do plasmídeo pCR-Ddl-2_ko, o cDNA do Ddl-2 foi interrompido com a inserção de um cassete de expressão para resistência ao antibiótico

blastomicina. Essa marca de resistência possibilita selecionar clones de *D. discoideum* resistentes a esse antibiótico, ou seja, que tenham a cópia do cDNA alterada integrada no genoma após transfecção. Para obtenção da construção pCR_Ddl-2KO (Figura 2B), o cDNA do Ddl-2 clonado no vetor pCR2.1 (Figura 2A) foi digerido com a enzima *MunI*, linearizando a construção. O sítio para esta enzima está localizado a ~56pb do ATG inicial do cDNA. A construção digerida foi incubada com a T4 DNA polimerase e nucleotídeos para gerar extremidades cegas. O cassete contendo o gene de resistência à blastomicina foi excisado do vetor pBsR519 (Putz & Zeng, 1998) com a enzima *EcoRV*, liberando um fragmento de ~1,4kb que foi ligado na construção previamente linearizada.

3.7.3. Construção do pAE-Ddl-2

Para testar a expressão do Ddl-2 em bactérias utilizamos o vetor pAE (Ramos *et al.*, 2004). Este vetor confere uma cauda de seis resíduos de histidina e um espaçador de 16 aminoácidos ao amino-terminal da proteína expressa. A expressão da proteína recombinante está sob controle do promotor T7 e apresenta como marca de seleção um gene que confere resistência a ampicilina. Para construção de pAE-Ddl-2 (Figura 2C), o cDNA Ddl-2 foi removido da construção pCR-Ddl-2 com as enzimas *BamHI* e *EcoRV* e ligado no vetor pAE previamente linearizado com *BamHI* e *PvuII*. Como as enzimas *EcoRV* e *PvuII* geram extremidades cegas, estes sítios foram perdidos após a ligação.

3.7.4. Construção das iscas pGBKT7-DdPP1c, pGBKT7-DdPP1cF269C e pGBKT7-NcPP1c para ensaios de duplo-híbrido em leveduras

A porção codificadora da DdPP1c e DdPP1cF269C foram removidas da construção pTrcHisDdPP1 e pTrcHisDdPP1cF269C (Andrioli *et al.*, 2003) com a enzima *NdeI*. Em seguida, subclonamos estes fragmentos no vetor pGBKT7 (*Clontech*) também digerido com *NdeI* (Figura 2D e 2E). Para subclonagem da NcPP1c, a sequência codificadora (904pb) foi extraída da construção pAS-NcPP1c (Zapella, 2001) através de digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*. Esta digestão dupla permitiu que o inserto fosse removido e ligado direcionalmente no vetor do pGBKT7, previamente digerido com as mesmas enzimas (Figura 2F). O

vetor pGBKT7 expressa proteínas em fusão com os aminoácidos 1-147 do domínio de ligação a GAL4 (DNA-BD). Em levedura, as proteínas de fusão são expressas a partir do promotor constitutivo *ADH1* (P_{ADH1}) e a transcrição terminada pelos sinais de terminação de transcrição, T7 e *ADH1* (T_{T7} & $ADH1$). A proteína de fusão é direcionada para o núcleo da levedura através de uma sequência de localização nuclear (SV40) adicionada a sequência do domínio de ligação. O vetor também contém o promotor T7 e codifica o epitopo c-Myc em fusão com a proteína heteróloga. Além disso, pode se replicar tanto em *E.coli* quanto em *S cerevisiae* a partir de oriC e ori 2 μ , respectivamente. As células transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico canamicina (kan^r), no caso de bactéria e com o marcador nutricional triptofano (*TRP1*), no caso de levedura.

3.7.5. Construção das presas pGADT7-Ddl-2, pGADT7-INc-1L e pGADT7-INc-1

Para subclonagem do Ddl-2, a construção pCR-Ddl-2 (Figura 2A) foi digerida com as enzimas *Clal* e *XhoI* para retirada do inserto e ligação no vetor pGADT7 (*Clontech*) também digerido com estas duas enzimas (Figura 2G). As sequências codificadoras de INc-1L (1044pb) e INc-1 (933pb) foram extraídas das construções pCR-INc-1L e pCR-INc-1 (Beton, 2004) através de digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*. Os insertos removidos foram subclonados no vetor pGADT7 previamente digerido com as mesmas enzimas (Figura 2H). O vetor pGADT7 expressa proteínas em fusão com os aminoácidos 768-881 do domínio de ativação de GAL4 (DNA-AD). Em levedura, as proteínas de fusão são expressas a partir do promotor constitutivo *ADH1* (P_{ADH1}) e a transcrição terminada pelos sinais de terminação de transcrição *ADH1* (T_{ADH1}). A proteína de fusão é direcionada para o núcleo da levedura através de uma sequência de localização nuclear (SV40) adicionada à sequência do domínio de ativação. O vetor também contém o promotor T7 e codifica o epitopo HA em fusão com a proteína heteróloga expressa. Além disso, pode se replicar tanto em *E.coli* quanto em *S cerevisiae* a partir de oriC e ori 2 μ , respectivamente. As células transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico ampicilina (Amp^r), no caso de bactéria e com o marcador nutricional leucina (*LEU2*), no caso de levedura.

Figura 2. Esquema das construções plasmidiais. Continua na próxima página...

Figura 2. Esquema das construções plasmidiais.

A) pCR2.1-Ddl-2: cDNA do Ddl-2 de *D. discoideum* clonado no vetor pCR2.1. **B) pCR2.1-Ddl-2_ko:** cDNA do Ddl-2 clonado no vetor pCR2.1. O cDNA foi interrompido pela inserção de um cassete que confere resistência ao antibiótico blastomicina no sítio da enzima *MunI*. **C) pAE-Ddl-2:** cDNA do Ddl-2 subclonado no vetor de expressão pAE nos sítios *BamHI* e *PvuII*, o último foi perdido após a clonagem. Este vetor confere fusão com 6 resíduos de histidina no amino-terminal da proteína expressa em bactérias. **D) pGBKT7-DdPP1c:** cDNA da DdPP1c subclonado no vetor de duplo-híbrido no sítio da enzima *NdeI*. O vetor pGBKT7 expressa proteínas em fusão com os aminoácidos 1-147 do domínio de ligação a GAL4 (DNA-BD). Apresenta o antibiótico canamicina (*kanr*) como marca de seleção em bactéria e o marcador nutricional triptofano (*TRP1*), no caso de levedura. **E) pGBKT7-DdPP1cF269C:** cDNA da DdPP1cF269C subclonado no vetor de duplo-híbrido no sítio da enzima *NdeI*. O vetor pGBKT7 expressa proteínas em fusão com os aminoácidos 1-147 do domínio de ligação a GAL4 (DNA-BD). Apresenta o antibiótico canamicina (*kanr*) como marca de seleção em bactéria e o marcador nutricional triptofano (*TRP1*), no caso de levedura. **F) pGBKT7-NcPP1c:** cDNA da NcPP1c subclonado no vetor de duplo-híbrido nos sítios *NdeI* e *EcoRI*. O vetor pGBKT7 expressa proteínas em fusão com os aminoácidos 1-147 do domínio de ligação a GAL4 (DNA-BD). Apresenta o antibiótico canamicina (*kanr*) como marca de seleção em bactéria e o marcador nutricional triptofano (*TRP1*), no caso de levedura. **G) pGADT7-Ddl-2:** cDNA do Ddl-2 subclonado no vetor de duplo-híbrido no sítio das enzimas *ClaI* e *XhoI*. O vetor pGADT7 expressa proteínas em fusão com os aminoácidos 768-881 do domínio de ativação de GAL4 (DNA-AD). Apresenta o antibiótico ampicilina (*Amp^r*) como marca de seleção em bactéria e o marcador nutricional triptofano (*LEU2*), no caso de levedura. **H) pGADT7-INc-1L ou INc-1:** cDNA do INc-1L ou INc-1 subclonado no vetor de duplo-híbrido nos sítios *NdeI* e *EcoRI*. O vetor pGADT7 expressa proteínas em fusão com os aminoácidos 768-881 do domínio de ativação de GAL4 (DNA-AD). Apresenta o antibiótico ampicilina (*Amp^r*) como marca de seleção em bactéria e o marcador nutricional leucina (*LEU2*), no caso de levedura.

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação de um possível inibidor de PP1 em *D. discoideum*

As primeiras tentativas de identificar proteínas que interagem com a DdPP1c foram realizadas a partir de varreduras de uma biblioteca de cDNA de *D. discoideum* gentilmente cedida pelo Dr. Adrian Tsang (University of Concordia). Esta biblioteca já foi utilizada em outros estudos (Dorywalska *et al.*, 2000; Myre & O'Day, 2004) e foi construída a partir de uma mistura de RNA poliadenilado de células vegetativas e de células da fase de desenvolvimento da linhagem AX2, sendo que os cDNA foram clonados nos sítios *EcoRI* e *Sall* do vetor pGAD424 (Bartel *et al.*, 1993). Como dispúnhamos de apenas 2µg de DNA plasmidial, realizamos uma amplificação da biblioteca, o que gerou quantidade suficiente de DNA (1,8mg) para experimentos posteriores.

As análises iniciais consistiram na qualificação da biblioteca através da análise do tamanho dos insertos clonados. Para isto, alíquotas do DNA da biblioteca foram digeridas com as enzimas *EcoRI/PstI* e *EcoRI/BglII* presentes no sítio múltiplo de clonagem do vetor pGAD424. Os produtos destas digestões foram submetidos a eletroforese em géis de agarose que, após corados com brometo de etídio, não mostraram a presença de insertos. Entretanto, a amplificação por PCR com oligonucleotídeos que flanqueiam o sítio de clonagem possibilitou a visualização, em gel de agarose, de insertos na faixa de 500 a 1.000pb.

Esta biblioteca amplificada foi então utilizada em duas transformações independentes de leveduras, seguindo-se varreduras com DdPP1c como isca. Não detectamos interação positiva em nenhuma das varreduras realizadas. Uma das hipóteses para explicar estes resultados seria que os vetores do sistema de duplo híbrido não permitiriam o correto enovelamento das proteínas e, conseqüentemente, impediriam as interações. Esta hipótese, no entanto, é improvável devido ao grande número de trabalhos utilizando esta metodologia para determinar subunidades reguladoras de PP1c em outros organismos (Ceulemans & Bollen, 2004). Outra hipótese seria que esta biblioteca não era representativa dos transcritos de *D. discoideum*, especialmente após a utilização de apenas 2µg de DNA na etapa de amplificação da biblioteca. Esta hipótese nos pareceu verdadeira, após observarmos

falha na amplificação por PCR de seqüências codificadoras para DdPP1c e DdPP4c com oligonucleotídeos específicos, quando a biblioteca de cDNA foi utilizada como molde. Decidimos abandonar esta biblioteca que poderia conter alta quantidade de vetores vazios (sem inserto de cDNA) ou não ser representativa.

A construção de uma nova biblioteca de cDNA para novas varreduras com a isca DdPP1c não era viável em nosso laboratório naquele momento. Optamos assim por pesquisar, em bancos de seqüências de genes de *D. discoideum*, candidatos a proteínas que interagiriam com a DdPP1c. Para tanto, consideramos que estruturas primárias de proteínas ortólogas em geral, apresentam regiões conservadas que são importantes para a realização de suas funções. Este é o caso dos inibidores do tipo-2 que, conforme relatado na introdução, apresentam motivos conservados para as interações com as PP1c nos diversos organismos eucarióticos estudados, incluindo aí o INc-1 de *N. crassa* (ortólogo de I-2) que foi isolado em nosso laboratório (Park & DePaoli-Roach, 1994; Egloff *et al.*, 1997; Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Zapella, 2001; Beton, 2004). Partindo desta premissa, bases de dados de genes de *D. discoideum* foram interrogadas com a seqüência primária de INc-1, na tentativa de identificar seu ortólogo nesta espécie.

O resultado da busca apontou para uma proteína que continha três das regiões conservadas sabidamente importantes para interação com a PP1c (Figura 3). Além disso, esta proteína apresenta 30% de identidade e 50% de similaridade na região alinhada (central e carboxi-terminal) com INc-1. Tanto a seqüência desta proteína hipotética (261aa), que passamos a designar Ddl-2, quanto a seqüência mínima do gene (889pb) estão depositadas no banco de dados *Dictyostelium* sob número DDB0167872. A seqüência codificadora completa (CDS) é formada por dois exons com 457pb e 329pb separados por um pequeno intron de 103pb. Curiosamente, este gene está mapeado no cromossomo 2 onde também estão os genes que codificam as proteínas fosfatases DdPP1c, DdPP2Bc, DdPP4c e DdPP6c (Fiorini, 2003).

A comparação da seqüência primária de Ddl-2 com inibidores do tipo-2 de outros organismos (Figura 4) mostra que apenas quatro das cinco regiões conservadas estão presentes na proteína de *D. discoideum*. A região ausente (região 4), formada por resíduos ácidos, é relacionada à atividade do inibidor e compreende 10 aminoácidos próximos a extremidade carboxila. Sua seqüência exata, no entanto, ainda é desconhecida (Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). A

ausência de uma região filogeneticamente conservada do inibidor-2 já foi relatada em *Arabidopsis thaliana* que não apresenta a sequência KGILK, correspondente a região 1 (Wakula *et al.*, 2003). Contudo, há uma sequência de resíduos acídicos com forte semelhança com a região 4 (identidade de 70%). Esta sequência é anterior e não posterior a região 3 como observado nos inibidores do tipo 2 dos demais organismos (Figura 4).

4.2. Amplificação do possível inibidor de DdPP1c (Ddl-2)

A amplificação do cDNA de Ddl-2 foi realizada com oligonucleotídeos específicos desenhados de forma a permitir sua clonagem tanto no vetor pGADT7 (para ensaio de duplo-híbrido) quanto no vetor pAE (para expressão de Ddl-2 recombinante em bactérias). Para isso, o RNA total foi extraído a partir de 2×10^7 células da linhagem AX4 em crescimento vegetativo e, em seguida, qualificado e quantificado no aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)*. Ao todo, as seis amostras extraídas apresentavam razões de intensidade de 28S/18S superiores a 1,9 (dados não mostrados) e foram utilizadas para os experimentos posteriores.

Resumidamente, 5µg de RNA total da fase vegetativa de *D. discoideum* foram reversamente transcritos utilizando oligo (dT)₁₂₋₁₈. Uma alíquota de 2µL deste cDNA foi usada na amplificação gerando um único fragmento de DNA com o tamanho esperado de ~800pb (Figura 5). A amplificação a partir do DNA genômico de *D. discoideum* gerou um fragmento ligeiramente maior devido a presença do intron (~900pb). Ausência de contaminações no cDNA foi demonstrada com a reação realizada sem adição de DNA ou pela ausência da banda de maior tamanho correspondente ao gene íntegro.

O produto da PCR de ~800pb foi ligado ao vetor pCR2.1(*TA cloning kit, Invitrogen*), seguindo-se transformação da bactéria Sure. A presença dos insertos no plasmídeo foi confirmada por digestão com *EcoRI* e alguns clones foram seqüenciados. Um clone contendo a seqüência completa de Ddl-2 na direção desejada foi selecionado. A Figura 6 mostra a seqüência completa deste clone, a qual é idêntica àquela depositada no banco de seqüências de *D. discoideum*.

```

1  MNKDEEFLEEHYKDDDAIEGEEEQGEEESDLDDDMYNIDGETNDDDDDEAEDEE

58  SSEDEKQKQKFLYKKRNLTkSSNGEFKIIPYSTLKGNTPTKGILKNKSQPPPKKN

115  RIVWDEENLTINDMNKSSTMKIDEPKTPYHYESEEETDESKKYLEKFLELQNALDK
      WDE NL          SSTMKIDEPKTPY

172  QQEKSEWSDNDEQPOEKEKEKDKKKKKKNLKIHMRSDDNDNDEDEDEDETEKK

229  ENKKKFDNLRKAHYNEFKVVRDLNANLSDDEQ 261
      RK HY

```

Figura 3. Identificação de um possível ortólogo do Inibidor-2 em *Dictyostelium discoideum*. Uma busca computacional no genoma de *Dictyostelium* utilizando a sequência primária de INc-1 de *N. crassa* identificou uma sequência de 261 aminoácidos registrada como CDS DDB0167872 (<http://dicty.sdsc.edu/cgi-bin>). As sequências de INc-1 que alinham são apresentadas em negrito, abaixo da sequência teórica da CDS. As regiões da CDS que apresentam similaridade com as sequências de INc-1 estão coloridas. Um dos motivos conservados em I-2 que não foi revelado no alinhamento está sublinhado.

Figura 4. Comparação entre as seqüências de I-2 de rato (rat), coelho (rabbit), humano (human), *Drosophila melanogaster* (drosophila), *glc8* (*S. cerevisiae*), INC-1 de *N. crassa* e a CDS teórica de Ddl-2. Os resíduos aminoterminais anteriores a RPKGILK em Inc-1 e PTKGILK em Ddl-2 foram suprimidos para facilitar o alinhamento entre as seqüências. Posições sombreadas em preto representam resíduos idênticos entre as seqüências. Posições sombreadas em cinza representam substituições conservativas do resíduo. As regiões numeradas indicadas pelas caixas indicam as regiões descritas como conservadas em I-2 (ver item 1.4.2).

Figura 5. Amplificação do cDNA de Ddl-2. O gel de agarose 0,9% corado com brometo de etídeo mostra a separação dos produtos de PCR obtidos a partir do cDNA e do DNA genômico de *D. discoideum* com os oligonucleotídeos Ddl01 e Ddl02. Na canaleta 1 está o fragmento amplificado a partir do cDNA, na canaleta 2 está o controle negativo da reação onde foi omitido o DNA e na canaleta 3 está o controle positivo onde o DNA genômico de *Dictyostelium* foi usado como molde. A canaleta 4 corresponde ao marcador de tamanho (1kpb DNA ladder).

```

1  atgaataaagatgaagaatttttagaagaacatcattataaagat
   M N K D E E F L E E H H Y K D
46 gatgatgcaattgaaggagaagaggaacaaggagaagaagaaga
   D D A I E G E E E Q G E E E E
91 tctgatttagatgatgatatgtataatatagatggtgaaactaat
   S D L D D D M Y N I D G E T N
136 gatgatgatgatgatgatgaagcagaagatgaagaaagtagtgaa
   D D D D D D E A E D E E S S E
181 gatgaaaaacaaaatcaaaagtttctttataaaaagaaacgaaat
   D E K Q N Q K F L Y K K K R N
226 ttaacaaaaagttcaagtaatggtgaattcaaaatcataccatat
   L T K S S S N G E F K I I P Y
271 agtacattaaaaggttaataactccaaccaaaggtatcttaagaat
   S T L K G N T P T K G I L K N
316 aaatcacaaccaccacaaaaaagaataggatagtttgggatgaa
   K S Q P P P K K N R I V W D E
361 gaaaatttaacaattaatgatatgaataaatcttcaacaatgaaa
   E N L T I N D M N K S S T M K
406 attgatgaacaaaaaacaccttatcattattatgaatctgaagaa
   I D E P K T P Y H Y Y E S E E
451 gaaacagacgaaagtaaaaaatatttagaaaaataaatttttagaa
   E T D E S K K Y L E N K F L E
496 cttcaaaatgctttagataaacaacaagaaaagagtgaatgggat
   L Q N A L D K Q Q E K S E W D
541 tcagataatgatgaacaacaacaagaaaaagaaaaagaaaaagat
   S D N D E Q Q Q E K E K E K D
586 aaaaagaaaaagaaaaagaatttataaaattcatatgagaagtgcac
   K K K K K K N L K I H M R S D
631 agcgatgataatgatgataatgaagatgaagatgaagatgaaact
   S D D N D D N E D E D E D E T
676 gaagaaaagaaagaaaataaaaagaaattcgataatttaagaaaa
   E E K K E N K K K F D N L R K
721 gcacattataatgaattttaaagttgtagagatttaaatgcaaat
   A H Y N E F K V V R D L N A N
766 ttatcagatgacgaacaataa 786
   L S D D E Q *

```

Figura 6. Sequência completa da CDS Ddl-2 e de sua proteína hipotética. O seqüenciamento do cDNA de Ddl-2 clonado no vetor pCR2.1 revelou uma seqüência idêntica a anotada no banco de dados como CDS DDB0167872. A região codificadora do Ddl-2, do ATG ao TAA, é composta por 786pb e a seqüência deduzida da proteína contém 261 aminoácidos. O gene que codifica Ddl-2 contém 889pb, das quais 103pb correspondem a um intron. A seta aponta o local de inserção do intron.

4.3. Determinação do número de cópias do gene *Ddl-2* de *D. discoideum*

O número de cópias do gene *Ddl-2* no genoma de *Dictyostelium* foi investigado pela técnica de *Southern Blot*. Inicialmente, o DNA genômico foi extraído de células vegetativas e submetido a digestão com sete enzimas de restrição diferentes. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose e transferidas para membrana de nylon. A membrana foi hibridizada com uma sonda derivada do cDNA de *Ddl-2*. Foram utilizadas enzimas com sítios únicos (*EcoRI* e *MunI*) e múltiplos (*DraI* e *HinI*) de clivagem, bem como enzimas que não clivam o gene *Ddl-2* (*BamHI*, *BglI* e *Clal*).

A Figura 7 apresenta o autorradiograma resultante da hibridização do DNA genômico digerido com a sonda *Ddl-2* juntamente com um esquema da posição relativa de alguns sítios de restrição existentes na região do genoma que contém o gene. A digestão com a enzima *EcoRI* e *MunI*, que possuem sítios únicos no gene *Ddl-2* resultou no aparecimento de duas bandas, sugerindo a existência de uma única cópia para o gene *Ddl-2* (Figura 7C, canaletas 1 e 4). As digestões com as enzimas *DraI* e *HinI* que apresentam múltiplos sítios no gene *Ddl-2* resultaram num padrão de restrição condizente com o esperado, sugerindo mais uma vez a existência de uma única cópia. Adicionalmente, a digestão com enzimas que supostamente não clivam *Ddl-2* resultou em bandas únicas, reforçando a existência de uma única cópia deste gene no genoma de *D. discoideum*. Este resultado está de acordo com o descrito para outros microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* e o fungo filamentoso *Neurospora crassa* que apresentam também cópia única do I-2 (Tung *et al.*, 1995; Beton, 2004).

O término do seqüenciamento e anotação do cromossomo 2 de *D. discoideum* confirmaram nossos dados sobre a existência de apenas um gene *Ddl-2* neste cromossomo (Glockner *et al.*, 2002).

Enzima	Sequência	# sítios	posição dos sítios	fragmentos em pb
EcoRI	G ^A AATC	1	637	254
DraI	TTT ^A AAA	3	33, 50, 180	17, 130, 711
HinfI	G ^A ANTC	3	247, 449, 800	202, 351, 91
MunI	C ^A AATTG	2	288, 1491	1203, 70

Figura 7. Southern blot do DNA total da linhagem selvagem AX4 hibridizado contra sonda do cDNA Ddl-2. **A)** Mapa de restrição de parte da sequência genômica que contém o gene Ddl-2 conforme dados do sequenciamento do genoma de *D. discoideum* (<http://genome.imb-jena.de/dictyostelium/>). **B)** A tabela apresenta as enzimas de restrição utilizadas bem como os fragmentos gerados. **C)** Hibridização com sonda do cDNA do Ddl-2. O DNA genômico de *D. discoideum* digerido com diferentes enzimas de restrição foi separado em gel de agarose 1% e submetido a Southern blot: MunI (canaleta 1), DraI (canaleta 2), EcoRI (canaleta 3), HinfI (canaleta 4), BamHI (canaleta 5), BglI (canaleta 6), ClaI (canaleta 7), EcoRI/DraI (canaleta 8), BamHI/EcoRI (canaleta 9) e EcoRI/ClaI (canaleta 10). A figura mostra o autorradiograma obtido após exposição da membrana ao filme de raios-X. Alguns tamanhos referentes ao marcador (1kpb DNA ladder) estão indicados à direita.

4.4. Análise dos níveis de expressão do mRNA de Ddl-2 durante o ciclo de vida de *D. discoideum*

Os níveis de expressão do mRNA de Ddl-2 durante o crescimento e o desenvolvimento de *D. discoideum* foram analisados através de *Northern blots* preparados com RNA total e hibridizados contra sondas sintetizadas a partir do cDNA de Ddl-2.

A Figura 8 mostra que o mRNA de Ddl-2 está presente durante todo o ciclo de vida de *D. discoideum* e apresenta um tamanho na faixa do esperado (786 nucleotídeos). A expressão, no entanto, parece reduzida nas células em crescimento (fase vegetativa), permanecendo assim durante as primeiras fases de carenciamento em filtro. A partir de ~8 horas de desenvolvimento os níveis de mRNA de Ddl-2 aumentam. O aparente aumento atingido por volta de 20 horas de carenciamento, fase de culminação dos corpos de frutificação, não é significativo quando resultados provenientes de três experimentos diferentes são comparados (ver gráfico da Figura 8). É importante ressaltar que os níveis do mRNA de Ddl-2 são aparentemente menores que os níveis do gene 1G7 (que servem de controle de normalização), pois o tempo de exposição dos *Northern blots* hibridizados contra sondas para Ddl-2 foram maiores (3 a 7 dias) do que aqueles hibridizados contra sondas para 1G7 (máximo 12 horas).

Nos diversos organismos estudados, o mRNA do Inibidor-2 é geralmente ubíquo em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento (Roach *et al.*, 1985; MacDougall *et al.*, 1989; Bennett *et al.*, 1999). Até o momento, apenas em rato e drosófila foram encontradas isoformas do I-2 que são *testis* específicas. Contudo, estas isoformas são inibidores menos potentes com valores de IC₅₀ de 100 e 200nM, respectivamente (Osawa *et al.*, 1996; Helps *et al.*, 1998). A caracterização desta isoforma em drosófila (I-t) foi questionada, quando uma nova proteína foi identificada através de duplo-híbrido. Esta proteína inibia fortemente a PP1 (IC₅₀ de ~1nM) e estava presente em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento, indicando que ela correspondia ao verdadeiro I-2 de drosófila (Bennett *et al.*, 1999; Helps & Cohen, 1999).

Figura 8. Níveis de expressão de mRNA de Ddl-2 ao longo do desenvolvimento da linhagem selvagem AX4 de *D. discoideum*. Aproximadamente 20µg de RNA total isolado das células nas diferentes fases do desenvolvimento foi submetido a *Northern blots* que foram hibridizados com sondas radioativas preparadas a partir do cDNA Ddl-2 ou cDNA de 1G7. Células obtidas após crescimento em meio HL5 e com concentração de 4×10^6 células/mL foram lavadas com tampão Sorensen e submetidas à carência em filtros e coletadas nos tempos indicados: início do carenciamento (0h), início da fase de agregação (2h), fase de agregação (4h), formação de agregados compactos (*mounds*) (8h), após agregação (12h), início da culminação (16h), culminação em estágio mais avançado (20h) e formação completa de corpos de frutificação (24h). As células denominadas vegetativas (veg) não foram previamente lavadas com tampão. A figura mostra o autorradiograma obtido após exposição das membranas a filmes de raios-X. As posições de migração dos rRNAs estão indicadas à direita. O gráfico representa a quantificação feita pelo programa ImageQuant 5.1 que calcula e compara o número de pixels de cada banda (média e desvios-padrão de 3 experimentos independentes).

4.5. Sondagem do possível papel biológico de Ddl-2 em *D. discoideum*

O papel biológico de Ddl-2 em *D. discoideum* foi investigado através da inativação do gene *Ddl-2* e análise do fenótipo resultante. Com o intuito de obter linhagens nocautes para o gene *Ddl-2*, utilizamos a construção pCR-Ddl-2_ko (Figura 2B) linearizada com a enzima *NotI* para eletroporação de células da linhagem selvagem AX4 de *Dictyostelium discoideum*. Nesta construção, o cassete de 1400pb que confere resistência ao antibiótico blasticidina foi inserido no início do cDNA de Ddl-2. O DNA genômico de clones resistentes a blasticidina foi analisado por *Southern blot* para verificar a eventual ocorrência de recombinação homóloga.

Aproximadamente 100 clones provenientes de três experimentos diferentes foram analisados. A Figura 9 mostra os resultados para alguns clones, como exemplo. Nesta análise os DNA genômicos da linhagem selvagem AX4 e de alguns clones foram isolados, digeridos com a enzima de restrição *DraI* e hibridizados com a sonda preparada a partir do cDNA de Ddl-2. Uma vez que *Ddl-2* supostamente apresenta três sítios para a enzima *DraI* (Figura 9A), a digestão do DNA cromossomal da linhagem selvagem com esta enzima originaria três fragmentos, sendo apenas um (~700pb) visível em gel. A recombinação homóloga seria visualizada através da existência de um fragmento de DNA de ~2,1kpb resultante da inserção do cassete na sequência do gene *Ddl-2*. A Figura 9 mostra a presença de um fragmento de ~700pb em todos os clones analisados indicando a ausência de recombinação homóloga.

Nosso insucesso na obtenção de uma linhagem nocaute no gene *Ddl-2* pode ser devido a estratégia utilizada na construção pCR-Ddl-2_ko. Nesta construção, por facilidade de clonagem, o cassete de resistência foi inserido no sítio de *MunI* localizado a ~56pb requeridos no pareamento ótimo de regiões complementares, já foi descrito que quando a região homóloga é menor que 75pb, a percentagem de recombinação é reduzida.

Uma outra hipótese que explicaria a não detecção de células com *Ddl-2* inativado por recombinação homóloga seria sua inviabilidade, isto é, o nocaute deste gene seria letal em *D. discoideum*. Contudo, em levedura, células com o gene *GLC8*, ortólogo de I-2, nocauteado são viáveis e apresentam redução moderada da atividade de proteína fosfatase 1 ensaiada diretamente nos lisados celulares deste fungo (Tung *et al.*, 1995).

Figura 9. Análise de clones transfectados resistentes a blasticidina para verificação da ocorrência de recombinação homóloga. O DNA genômico isolado de linhagens selvagem (AX4) e mutantes (1-15) foi clivado com a enzima de restrição *DraI*, separado em gel de agarose 0,9%, submetido a *Southern blot* e hibridizado contra sonda radioativa do cDNA de Ddl-2. A figura mostra o autorradiograma obtido após exposição da membrana ao filme de raios-X. As posições de migração de alguns fragmentos do marcador de tamanho (1kpb DNA *ladder*) estão indicadas à direita.

4.6. Análise da atividade inibidora de Ddl-2 frente a PP1c

4.6.1. Expressão do Ddl-2 em bactérias

Para expressão recombinante de Ddl-2 em bactérias, o cDNA de Ddl-2 clonado no vetor pCR2.1 foi excisado e subclonado no vetor pAE (Ramos *et al.*, 2004). Este vetor propicia a expressão da proteína de interesse em fusão com seis resíduos de histidina na sua extremidade amino-terminal, facilitando sua posterior purificação. A construção gerada pAE-Ddl-2 (Figura 2) foi eletroporada na bactéria Sure e os plasmídeos isolados e digeridos para verificação do sucesso da clonagem. Escolhemos um clone para preparação da construção plasmidial em larga escala e transformação da cepa bacteriana BL21(DE3)pLysS (*Stratagene*). Esta cepa é uma variante da cepa BL21(DE3) e foi escolhida por supostamente apresentar pouco ou nenhum vazamento de expressão da proteína recombinante na ausência do indutor IPTG. Após transformação, 10 colônias foram selecionadas para crescimento e indução com IPTG 1mM por 3 horas a 37°C (indução em pequena escala). Escolhemos, dentre os clones induzidos, o que expressou a proteína recombinante em maior quantidade. A partir do inóculo congelado do clone escolhido, fizemos uma nova cultura e prosseguimos com a indução em três diferentes temperaturas (25°C, 30°C e 37°C).

A Figura 10A mostra que a proteína Ddl-2 foi induzida nas 3 temperaturas testadas sendo o melhor nível observado a 37°C. A proteína Ddl-2 recombinante apresenta massa molecular estimada de 31kD mas migrou em SDS-PAGE com tamanho de ~50kD (38% maior). De forma semelhante, Glc8 de levedura também migra em SDS-PAGE com tamanho 40% maior que o predito pela sequência primária da proteína (Tung *et al.*, 1995). Este comportamento anômalo em SDS-PAGE é característico de inibidores termoestáveis como I-1 e I-2 e tem sido observado nos vários organismos estudados (Nimmo & Cohen, 1978; Foulkes & Cohen, 1980; Beton, 2004). Uma possível explicação é que estas proteínas migram com massa molecular maior devido a uma baixa ligação de moléculas de SDS (Holmes *et al.*, 1986). Além disso, I-1 e I-2 apresentam uma alta porcentagem de aminoácidos hidrofílicos e de prolina, que aliada a termoestabilidade sugere que estas proteínas não apresentam uma estrutura globular típica (Nimmo & Cohen, 1978; Foulkes & Cohen, 1980). Estudos de dicroísmo circular e RMN corroboram

com esta hipótese (Endo *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2000; Chyan *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004). Análise da sequência primária de Ddl-2 (Figura 6) indicou que trata-se de uma proteína ácida com um pI teórico de 4,26 e com composição predominante de aminoácidos hidrofílicos (~77%). O baixo número de aminoácidos hidrofóbicos (~23%) é comparável com o encontrado no I-2 isolado de músculo esquelético de coelho (18%) e corresponde a metade da proporção encontrada em proteínas globulares comuns (Holmes *et al.*, 1986). As características apresentadas suportam a idéia de que Ddl-2 também deve apresentar uma conformação tridimensional desordenada.

Para o planejamento do protocolo de purificação do Ddl-2 recombinante, avaliamos sua solubilidade no extrato bacteriano. Desta forma, os sedimentos das culturas de bactéria induzidas a 25°C, 30°C e 37°C foram suspensos em tampão, sonificados e centrifugados. O sobrenadante foi reservado e o precipitado ressuspense no mesmo tampão e então, uma alíquota de cada amostra foi aplicada em gel SDS-PAGE. O resultado apresentado na Figura 10B mostra que, em todas as temperaturas de incubação, a proteína recombinante foi recuperada na fração solúvel do extrato de bactérias. Os extratos obtidos a partir de células induzidas a 37°C foram escolhidos para purificação da proteína.

4.6.2. Purificação de Ddl-2 recombinante

Tendo em vista o sucesso na obtenção da proteína Ddl-2 recombinante solúvel, seguimos com a purificação da mesma. Em resumo, a fração solúvel do lisado bacteriano, proveniente da cultura induzida a 37°C, foi submetida à cromatografia de afinidade em Ni⁺²-NTA-agarose. Após aplicação do lisado bacteriano (Figura 11A, canaleta 1) à resina, seguiu-se coleta do material não adsorvido (Figura 11A, canaleta 2) e lavagens (Figura 11A, canaletas 3 a 7). O material adsorvido foi eluído com tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (Figura 11A, canaletas 8 a 13). A proteína Ddl-2 começou a ser eluída em 25mM, concentração mais baixa utilizada, porém o maior nível de eluição foi atingido com 150mM de imidazol. Concluímos que a purificação a partir da fração solúvel de bactérias induzidas a 37°C resultou em um grau de purificação satisfatório e que a quantidade purificada seria suficiente para avaliar seu efeito na inibição da atividade da PP1c. A Figura 11B refere-se a uma outra purificação onde a proteína foi eluída

diretamente com 300mM de imidazol (canaleta 3), concentração escolhida para as demais purificações. Nas canaletas 1 e 2, foram aplicadas alíquotas do lisado bacteriano antes da incubação com a resina e o material não adsorvido, respectivamente.

4.6.3. Análise da atividade inibidora de Ddl-2 recombinante sobre as PP1c recombinantes de *D. discoideum* e *N. crassa*

A atividade de Ddl-2 recombinante foi testada frente as proteínas DdPP1c, DdPP1cF269C e NcPP1c recombinantes expressas em bactérias. As construções no vetor pTrcHisA contendo as regiões codificadoras dos cDNAs das PP1 de *D. discoideum* e de *N. crassa* são provenientes de trabalhos anteriores de nosso laboratório e foram utilizadas na transformação da bactéria BL21(DE3) e indução das respectivas enzimas com IPTG. As enzimas recombinantes induzidas foram testadas diretamente na fração solúvel dos lisados, sem prévia purificação. Isto se faz necessário devido aos seus baixos níveis de expressão e impossibilidade de purificação destas enzimas em suas formas ativas (Zhang *et al.*, 1992c; Zapella, 2001; Andrioli *et al.*, 2003). O ensaio de atividade de fosforilase fosfatase destas enzimas recombinantes foi realizado segundo procedimentos já estabelecidos no laboratório. Estes usam a fosforilase a marcada radioativamente com [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP como substrato (Simon *et al.*, 1992; Etchebehere *et al.*, 1993; Zapella *et al.*, 1996; Andrioli *et al.*, 2003). Uma das vantagens da utilização da fosforilase a como substrato é que sua conversão para fosforilase b, catalisada pela glicogênio quinase, consiste na fosforilação de um único aminoácido (Ser14). Outros substratos, tais como glicogênio sintase e fosforilase quinase apresentam mais de um sítio de fosforilação dificultando assim, a análise quantitativa da atividade enzimática de desfosforilação (Cohen *et al.*, 1989).

DdPP1c e NcPP1c recombinante correspondem exatamente a seqüência da enzima nativa de *D. discoideum* e *N. crassa*, respectivamente. A proteína DdPP1cF269C corresponde a uma variante da DdPP1c, onde o aminoácido fenilalanina da posição 269 foi substituído por uma cisteína. Esta proteína mutante apresenta características distintas da DdPP1c selvagem incluindo maior estabilidade, maior atividade de fosforilase fosfatase e maior sensibilidade ao inibidor caliculina A. O resíduo substituído localiza-se em uma região importante da

estrutura tridimensional da PP1c, a alça β 12- β 13. Em todas as PP1c seqüenciadas esta posição é ocupada por uma cisteína, exceto na PP1c de *D. discoideum* (Andrioli *et al.*, 2003). Análises genéticas e estudos de mutagênese indicam que a alça β 12- β 13 é essencial na associação da PP1c tanto com as toxinas como com os inibidores (Connor *et al.*, 1999).

As atividades das PP1c recombinantes foram previamente determinadas para que a quantidade de fosfatase fosse ajustada previamente de forma que o consumo de substrato não ultrapassasse 20% e resultasse numa reação linear. Assim, foram utilizados 1 μ g do extrato contendo DdPP1c, 0,1 μ g do extrato contendo DdPP1cF269C e 10 μ g do extrato contendo NcPP1c em todos os ensaios. Além disso, a fração solúvel de um clone proveniente da transformação da bactéria BL21(DE3) com o vetor pTrcHisA vazio foi utilizada como controle negativo da atividade de fosforilase fosfatase. Outro controle utilizado foi a medida da atividade da PP1 na presença do tampão de eluição (tampão imidazol 300mM). Esta atividade foi considerada como 100%, uma vez que observamos que a atividade da PP1c aumenta na presença deste tampão, utilizado na eluição do Ddl-2 (dados não mostrados). A concentração de imidazol anteriormente utilizada nestes ensaios era de 50nM (Zhang *et al.*, 1992c; Zapella, 2001; Andrioli *et al.*, 2003).

A Figura 12 mostra o perfil de inibição da atividade de fosforilase fosfatase das PP1c por diferentes concentrações de Ddl-2. O resultado mostra que a DdPP1c tem 50% de sua atividade inibida por ~30nM de Ddl-2. Por outro lado, DdPP1cF269C e NcPP1c tiveram aparentemente 50% de sua atividade inibida por ~200nM e ~300nM de Ddl-2, respectivamente. Contudo estas duas últimas determinações são menos precisas, devido à ausência de medidas na faixa de 50% de inibição. Apesar disso, estes ensaios indicam que o Ddl-2 recombinante é capaz de inibir a atividade das PP1c recombinantes de *D. discoideum* e *N. crassa*. Concentrações maiores do inibidor (3 μ M) abolem a atividade destas enzimas (dados não mostrados).

A clara atividade inibidora de Ddl-2 reforça sua classificação como ortólogo do I-2 em *Dictyostelium*. Aparentemente, este novo inibidor não é tão potente quanto o I-2 de mamíferos e drosófila que apresentam IC₅₀ entre 1-1,5nM (Helps *et al.*, 1994; Osawa *et al.*, 1996; Helps & Cohen, 1999; Yang *et al.*, 2000) assemelhando-se mais aos inibidores de outros microorganismos. O IC₅₀ de Ddl-2 de aproximadamente

30nM, o posiciona entre o Glc8 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que apresenta IC₅₀ de 130nM e o INc-1 de *Neurospora crassa* com IC₅₀ de ~11nM (Tung *et al.*, 1995; Beton, 2004).

4.6.4. Análise da atividade inibidora de INc-1L e INc-1 recombinante sobre as PP1c recombinantes de *D. discoideum*

Resolvemos também verificar se o ortólogo de I-2 de *N. crassa* (INc-1) seria capaz de inibir as fosfatases selvagem e mutante de *D. discoideum* para comparar sua eficácia com Ddl-2. Utilizamos a construção pAE-INc-1L (Beton, 2004) na transformação da bactéria BL21(DE3)pLysS e indução da proteína com IPTG. O INc-1L recombinante foi purificado em coluna de Ni⁺²-NTA agarose de modo similar ao realizado para Ddl-2 (dados não mostrados) e incubado com as proteínas DdPP1c e DdPP1cF269C. Os resultados apresentados na Figura 13A mostram que ambas as fosfatases apresentaram um perfil de inibição semelhante. A concentração de 300nM de INc-1L reduziu a atividade da DdPP1c para 32% e da DdPP1cF269C para 24% com relação aos 100% de atividade destas PP1c na ausência do inibidor.

INc-1 foi originalmente purificado de extratos de micélios de *Neurospora crassa* como uma proteína que atua *in vitro* como inibidor da atividade de fosforilase fosfatase de PP1c e constitui o primeiro exemplo de subunidade reguladora da PP1 descrito em fungos filamentosos. Sequências parciais de aminoácidos de três fragmentos proteolíticos obtidos de INc-1 permitiram a identificação de uma CDS no genoma de *N. crassa*. A análise desta CDS mostrou que a sequência de aminoácidos do INc-1 é similar a do I-2, especialmente em regiões supostamente envolvidas em sua interação com a PP1c (Zapella *et al.*, 1996; da-Silva *et al.*, 1999; Zapella, 2001). A sequência codificadora de INc-1 foi amplificada por PCR a partir de um clone genômico de *N. crassa*, o fragmento amplificado (1047pb) foi clonado e denominado INc-1L. A proteína INc-1L recombinante inibe a NcPP1c com um IC₅₀ de ~50nM (Beton, 2004). Uma nova análise do gene INc-1 no genoma de *Neurospora crassa* mostrou a existência de um intron em fase na sequência gênica. Este pequeno intron (114pb) resultava em uma extensão de 38 aminoácidos ao produto deste gene. O cDNA (933pb) foi então utilizado na obtenção do inibidor sem intron (INc-1) pela expressão em bactérias. INc-1 recombinante (sem intron) foi capaz de inibir a PP1c de *N. crassa* com maior eficiência

que o inibidor contendo o intron (IC₅₀ ~11nM). Este fato nos levou a testar a inibição de INc-1 sobre as proteínas fosfatases de *D. discoideum*.

A Figura 13B apresenta o perfil de inibição de INc-1 em relação as PP1c de *Dictyostelium*. Utilizamos concentrações menores do inibidor purificado, uma vez que como mencionado acima este novo inibidor é mais potente que o INc-1L. As DdPP1c e DdPP1cF269C foram ensaiadas na presença de cinco concentrações diferentes do inibidor INc-1, de forma semelhante ao descrito para Ddl-2 e INc-1L.

Mais uma vez o perfil de inibição da DdPP1c selvagem e mutante foi semelhante. A concentração de 300nM de INc-1 reduziu a atividade da DdPP1c para 16% e da DdPP1cF269C para 10% com relação ao 100% de atividade destas fosfatases na ausência do inibidor. Comparativamente, o INc-1 foi aproximadamente duas vezes mais potente que INc-1L. Concentrações maiores que 1μM de INc-1 e INc-1L abolem completamente a atividade das duas isoformas de DdPP1c (dados não mostrados). Apesar de observado previamente que a substituição da fenilalanina na posição 269 por cisteína resulta num aumento da atividade da DdPP1c sobre a fosforilase α (Andrioli *et al.*, 2003; Wakula *et al.*, 2003), dados confirmados também nestes experimentos (Figura 13) mostram que a mutação não acarretou em diferenças significativas no perfil de inibição de ambas as formas de PP1c recombinante de *D. discoideum*.

Dados recentes propõem que o motivo KGILK seja a seqüência representativa da região 1 (Figura 4) que ancoraria o I-2 na PP1, permitindo assim a ligação de sítios secundários de menor afinidade. Estes sítios secundários por sua vez, determinariam a atividade e especificidade de substrato da fosfatase (Wakula *et al.*, 2003). Uma possível explicação para uma menor atividade do INc-1L seria porque o intron está interrompendo este motivo entre os aminoácidos glicina e isoleucina (KG - ILKN). Desta forma, a seqüência referente a região 1 em INc-1L seria PGILKN diferindo do motivo KGILKN de INc-1 devido a substituição do resíduo de Lisina por Prolina (K→P). Aparentemente, esta substituição por um aminoácido funcionalmente distinto prejudica a interação e inibição de INc-1L com a PP1c, como sugerido por Beton, (2004).

Figura 10. Expressão e Solubilidade do Ddl-2 recombinante. **A)** Para expressão, a cultura de bactérias BL21(DE3)PLysS transformada com a construção pAE-Ddl-2 crescida a 37°C, por uma noite, foi diluída 1:20 em meio fresco nas temperaturas de 25, 30 e 37°C até DO_{600nm} atingir 0,4. Neste momento, foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 3 horas nas temperaturas indicadas. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controle não induzidas (C) e de culturas induzidas com IPTG (I) foram separados em SDS-PAGE 10% e o gel foi corado com Coomassie Blue. As posições dos marcadores de massa molecular estão indicadas à esquerda. A seta indica o polipeptídeo de ~50kDa correspondente à proteína recombinante induzida. **B)** Para avaliar a solubilidade, a proteína foi induzida como descrito acima, as bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado 9.880g, 30 minutos a 4°C. A fração solúvel (S) e o precipitado (P) foram analisados em SDS-PAGE como no item A.

Figura 11. Purificação do Ddl-2 recombinante. O Ddl-2 recombinante foi purificado por cromatografia de afinidade em Ni^{+2} -NTA-agarose a partir de culturas induzidas com IPTG a 37°C por 3 horas. **A)** A fração solúvel do lisado bacteriano (canaleta 1) foi incubado com a resina Ni^{+2} -NTA agarose por 1 hora a 4°C. A canaleta 2 mostra a fração não adsorvida a resina e as canaletas 3 a 7 referem-se as lavagens desta resina com o mesmo tampão utilizado na lise das bactérias. As eluições foram feitas com 25, 50, 75, 100, 150 e 300mM de imidazol (canaletas 8 a 13). As amostras foram separadas em gel de SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue. A seta indica o polipeptídeo de ~50kDa que corresponde ao Ddl-2 recombinante. **B)** Gel proveniente de outra purificação utilizando os mesmos procedimentos descritos em (A). A canaleta 1 se refere a fração solúvel do lisado, a canaleta 2 a fração não adsorvida na resina e a canaleta 3 corresponde a eluição utilizando-se 300mM de imidazol.

Figura 12. Inibição da atividade de fosforilase fosfatase das subunidades catalíticas recombinantes da DdPP1c e DdPP1cF269C de *D. discoideum* e da NcPP1c de *N. crassa* pelo Ddl-2 recombinante. O sobrenadante do lisado bacteriano dos clones pTrcHis-DdPP1c (1µg), pTrcHis-DdPP1cF269C (0,1µg) e pTrcHis-NcPP1c (10µg) foi incubado por 10 minutos a 30°C com concentrações crescentes de Ddl-2 e em seguida ensaiado para atividade de fosforilase fosfatase durante 10 minutos a 30°C. Os valores de atividade foram transformados para porcentagem da atividade de PP1 em relação ao controle ensaiado na ausência de Ddl-2. O desvio padrão foi calculado a partir de três experimentos independentes com ensaios realizados em duplicatas.

Figura 13. Inibição da atividade de fosforilase fosfatase das subunidades catalíticas recombinantes da DdPP1c e DdPP1cF269C de *D. discoideum* pelos INc-1L e INc-1 recombinantes de *N. crassa*. O sobrenadante do lisado bacteriano dos clones pTrcHis-DdPP1c (1µg) e pTrcHis-DdPP1cF269C (0,1µg) foi incubado por 10 minutos a 30°C com concentrações crescentes de INc-1L (A) e INc-1 (B) e em seguida ensaiado para atividade de fosforilase fosfatase durante 10 minutos a 30°C. Os valores de atividade foram transformados para porcentagem da atividade de PP1 em relação ao controle ensaiado na ausência dos inibidores. O desvio padrão foi calculado a partir de três experimentos independentes com ensaios realizados em duplicatas.

4.7. Análise da interação da PP1c com os ortólogos de I-2 em ensaios de duplo-híbrido em levedura

O ensaio de duplo-híbrido é um sistema genético para detecção de interações entre proteína-proteína *in vivo*. Este sistema consiste em aproveitar as vantagens do gene *GAL4*, um ativador transcricional requerido para a expressão de genes que codificam enzimas do metabolismo da galactose na levedura. *GAL4* consiste em um domínio amino-terminal que se liga a seqüências de DNA específicas (UAS) e um domínio carboxi-terminal que contém regiões acídicas necessárias para ativar a transcrição. Em geral, o domínio de ligação de *GAL4* é fundido a uma proteína isca e o domínio de ativação é fundido a proteína presa. A ativação da transcrição de um ou mais genes repórteres ocorre apenas quando as duas proteínas híbridas interagem (Fields & Song, 1989). Este sistema permite detectar a interação entre duas proteínas conhecidas, encontrar novas proteínas através da varredura de uma biblioteca de cDNA e até mesmo mapear domínios ou resíduos críticos para a interação (Fields & Sternglanz, 1994). Uma aplicação mais robusta consiste na análise da interação de todas as proteínas de um organismo, nas mais diversas combinações possíveis. Isto já foi feito em levedura e foi chamado de Interactoma (Ito *et al.*, 2001a; Ito *et al.*, 2001b; Ito *et al.*, 2002).

4.7.1. Expressão das PP1c de *D. discoideum* e *N. crassa* para ensaio de duplo-híbrido

Até o momento havíamos mostrado que o Ddl-2 é capaz de inibir a atividade de fosforilase fosfatase das DdPP1c, DdPP1cF269C e NcPP1c *in vitro*. A etapa seguinte foi investigar se estas proteínas interagiriam *in vivo*. O sistema que escolhemos utiliza a linhagem AH109 de *S. cerevisiae* como hospedeira das proteínas híbridas. Esta cepa contém dois genes repórteres, *HIS3* e *lacZ*, cujas expressões são controladas por dois diferentes promotores, *GAL1* e *MEL1*. As duas proteínas híbridas foram expressas a partir de dois plasmídeos na levedura AH109: pGBKT7 que confere fusão com domínio de ligação de *GAL4* e pGADT7 que confere fusão com domínio de ativação de *GAL4*. A interação entre ambas as proteínas ativa a transcrição dos genes repórteres.

Antes de realizar o ensaio foi necessário verificar se as fosfatases clonadas em fusão com o domínio de ligação de GAL4 seriam de fato expressas em levedura. Utilizamos as construções pTrcHis-DdPP1c, pTrcHis-DdPP1cF269C e pAS-NcPP1c para obtenção dos cDNAs das respectivas fosfatases (Zapella, 2001; Andrioli *et al.*, 2003) a serem clonadas no vetor pGBKT7 como descrito no item 3.7.4. As construções geradas, pGBKT7-DdPP1c, pGBKT7-DdPP1cF269C e pGBKT7-NcPP1c, foram seqüenciadas para confirmação da fase correta de leitura nas respectivas fusões. Em seguida, realizamos a transformação da linhagem AH109 com estas três construções para expressão das iscas DdPP1c, DdPP1cF269C e NcPP1c, utilizando o método do acetato de lítio. Os transformantes foram selecionados em meio sem triptofano, conforme requerido pela linhagem. A mesma cepa de levedura foi transformada com a construção pGBKT7-p53 (*Clontech*) para expressão da proteína p53, também em fusão com o domínio de ligação de GAL4 e utilizada como controle na análise da expressão das iscas. O extrato protéico total da linhagem selvagem AH109 (controle negativo) e das linhagens transformadas com pGBKT7-p53 (controle positivo), pGBKT7-DdPP1c, pGBKT7-DdPP1cF269C e pGBKT7-NcPP1c, foram separados em SDS-PAGE previamente à detecção das iscas por *immunoblot*. Utilizamos o anticorpo anti-c-Myc (*Clontech*), uma vez que o vetor pGBKT7 também confere fusão com este epitopo.

A Figura 14A mostra que a proteína DdPP1c está sendo expressa na levedura AH109 com massa molecular de aproximadamente 57kD (canaleta 3). A DdPP1c possui um tamanho aproximado de 36,9kD, entretanto, a fusão com GAL4 3'-BD e com o epitopo c-Myc adicionou 20kD à proteína. O controle positivo p53 também foi detectado (canaleta 2) validando nosso experimento. Resultado positivo também foi observado com a DdPP1cF269C que foi expressa em levedura com tamanho aproximado de 57kD (Figura 14B; canaleta 3). Segundo (Zapella, 2001; Andrioli *et al.*, 2003) a NcPP1c possui um tamanho aproximado de 36kD, mas do mesmo modo, a fusão acrescentou 20kD à proteína. Na canaleta 3 da Figura 14C podemos observar que a NcPP1c foi expressa com massa molecular de aproximadamente 56kD.

Para confirmar se a proteína expressa correspondia de fato a DdPP1c, realizamos a reação com o anticorpo anti-PP1c comercial. Os resultados apresentados na Figura 14D mostram que a banda de ~57kD realmente equivale a proteína DdPP1c em fusão com GAL4 3'-BD (canaleta 3). As demais bandas

verificadas nas três canaletas são decorrentes de falha na etapa de bloqueio de ligações inespecíficas do anticorpo utilizado.

4.7.2. Expressão do inibidor Ddl-2 em levedura

A presa Ddl-2 foi construída em fusão com o domínio de ativação de GAL4 para o ensaio de duplo-híbrido. O cDNA de Ddl-2 clonado no vetor pCR2.1 foi excisado e subclonado no vetor pGADT7 (Figura 2). A autenticidade da construção obtida (pGADT7-Ddl-2) foi confirmada por seqüenciamento, e em seguida utilizada na transformação da levedura AH109 utilizando o método do acetato de lítio. Os transformantes foram selecionados em meio sem leucina, conforme requerido pela linhagem. Para detecção da proteína Ddl-2 expressa em levedura, utilizamos o anticorpo anti-GAL4 AD (*Clontech*). Na canaleta 3 da Figura 15, observamos que a proteína Ddl-2 está sendo expressa em fusão com o domínio de ativação de GAL4 com um tamanho próximo a 62kD. A proteína Ddl-2 apresenta massa molecular estimada de 31kD que somada aos 18kD conferidos pela fusão deveria resultar num fragmento de 49kD. Todavia conforme mencionado anteriormente, Ddl-2 apresenta uma migração anômala em SDS-PAGE que resulta em uma banda de tamanho maior que o esperado. O controle antígeno T em fusão com o domínio de ativação de GAL4 (canaleta 2) também foi detectado, validando assim nosso experimento.

4.7.3. Análise da interação entre as PP1c de *D. discoideum* e *N. crassa* com Ddl-2

Uma vez que as iscas e a presa estavam sendo expressas adequadamente, procedemos à análise da interação entre elas. Antes, porém se fez necessário testar se as proteínas em estudo poderiam ativar os genes repórteres, independente da ocorrência de interação. Isso foi feito pela transformação de AH109_pGBKT7-DdPP1c, AH109_pGBKT7-DdPP1cF269C e AH109_pGBKT7-NcPP1c com o vetor pGADT7 vazio. Em paralelo, AH109_pGADT7-Ddl-2 foi também transformada com pGBKT7 vazio. Após transformação seqüencial das linhagens, selecionamos os clones que continham os dois vetores pela seleção em meio sem Trp e Leu e os replicamos em placas de meio sem Trp/Leu/His que seleciona para interação positiva. Após 2-3 dias de incubação a 30°C, avaliamos o crescimento na ausência

de histidina e realizamos o teste de β -galactosidase em membrana de nitrocelulose. Como pode ser visto nas Figuras 16A e 16B, nenhum dos clones expressando apenas as fosfatases cresceu na ausência de histidina e também não apresentou colônias azuis na presença de X- β -Gal. O mesmo aconteceu quando apenas Ddl-2 foi expresso (Figura 17) mostrando que estas proteínas não são capazes de auto-ativar os repórteres *HIS3* e *lacZ*.

Confirmada a ausência de autoativação devido a expressão das iscas e da presa, analisamos a interação entre as PP1c e Ddl-2. Assim, a linhagem AH109 transformada seqüencialmente com cada uma das três fosfatases além de Ddl-2 foi submetida a crescimento em meio de cultura com ou sem histidina após quatro diluições seriadas (10 vezes a partir de $DO_{600nm} = 0,5$). Placas com meio sem Trp/Leu/His, mas contendo 1mM de 3-AT também foram usadas para eliminação de falsos positivos. 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole) é um inibidor competitivo da proteína His3p usado para inibir baixos níveis de expressão desta proteína e suprime o crescimento na ausência de histidina quando não ocorre interação (Durfee *et al.*, 1993; Fields & Sternglanz, 1994). A linhagem AH109 aparentemente não apresenta baixos níveis de expressão de His3p na ausência de histidina, porém resolvemos utilizar uma baixa concentração da droga como controle. A Figura 18 mostra que as três fosfatases interagiram com Ddl-2, uma vez que os três clones cresceram na ausência de histidina e apresentaram colônias azuis na presença de X- β -Gal. Apesar da linhagem NcPP1c/Ddl-2 ter sobrevivência reduzida na presença de 3-AT, ainda assim ativou o gene repórter *lacZ* indicando que está ocorrendo interação.

Paralelamente fizemos transformação seqüencial de AH109_pGBKT7-p53 e AH109_pGBKT7-Lam com a construção pGADT7-AntígenoT. É sabido que a proteína p53 interage com antígeno T no ensaio de duplo-híbrido funcionando como controle positivo (Iwabuchi *et al.*, 1993; Li & Fields, 1993). Já a Lamina C que não forma complexo e não interage com a maioria das proteínas é utilizada como controle negativo (Bartel *et al.*, 1993; Ye & Worman, 1995). Como esperado, AH109+p53+antígenoT, cresceu no meio seletivo para interação (SD sem Leu/Trp/His) e apresentou colônias azuis no teste de β -galactosidase. Já AH109+Lam+antígenoT, não cresceu na ausência de histidina e não produziu colônias azuis (Figura 18).

A quantificação da interação entre o inibidor Ddl-2 de *D. discoideum* e as três PP1c testadas foi feita através do ensaio da β -Galactosidase tendo ONPG como substrato. A Figura 19 mostra a atividade de β -Galactosidade produzida por cada linhagem, calculada a partir da equação descrita nos procedimentos experimentais. As interações entre as PP1c de *D. discoideum* (DdPP1c e DdPP1cF259C) e *N. crassa* (NcPP1c) com o inibidor Ddl-2 produziram atividades semelhantes de β -Galactosidade, o que indica níveis parecidos de expressão do gene repórter *lacZ*. Apesar da interação da NcPP1c e Ddl-2 ter sido aparentemente mais fraca devido ao menor crescimento na presença de 3-AT que aumentou a estringência do método, a quantificação da atividade de *lacZ* não confirmou este dado.

Figura 14. Expressão das fosfatases DdPP1c, DdPP1cF269C e NcPP1c em fusão com GAL4 3'-BD. Amostras de extratos celulares lisados da linhagem AH109 selvagem e transformadas foram submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS (SDS-PAGE). Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo. **A)** Na canaleta 3 está a linhagem AH109 transformada com pGBKT7-DdPP1c e incubada com o anticorpo monoclonal anti-c-Myc (1:500) **B)** AH109 transformada com pGBKT7-DdPP1cF269C com o anticorpo monoclonal anti-c-Myc (canaleta 3) na mesma concentração de (A). **C)** AH109 transformada com pGBKT7-NcPP1c e incubada anticorpo anti-c-Myc (canaleta 3) na mesma concentração de (A). **D)** AH109+ pGBKT7-DdPP1c incubada com o anticorpo monoclonal anti-PP1 (1:100). As canaletas 1 e 2 de todos os *blots* (A-D) referem-se a AH109 selvagem e AH109 + pGBKT7-p53, respectivamente. O reconhecimento das proteínas pelo anticorpo foi detectado por quimioluminescência através dos reagentes e instruções do *kit* de detecção ECL (Amersham-Pharmacia). Os marcadores de massa molecular em kDa estão indicados à esquerda.

Figura 15. Expressão do Ddl-2 em fusão com GAL4 3'-AD. Amostras de extratos celulares lisados das linhagens AH109 (canaleta 1), AH109 + pGBKT7-antígenoT (canaleta 2) e AH109 + pGADT7-Ddl-2 (canaleta 3) foram submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS (SDS-PAGE). Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo monoclonal anti-GAL4 AD (1:2500), por 16-18 horas a temperatura ambiente. O reconhecimento das proteínas pelo anticorpo foi detectado por quimioluminescência através dos reagentes e instruções do kit de detecção *ECL* (*Armstrong-Pharmacia*). Os marcadores de massa molecular em kDa estão indicados a esquerda.

Figura 16. Controle de auto-ativação dos genes repórteres pelas fosfatases DdPP1c, DdPP1cF269C e NcPP1c. **A)** A cepa AH109 foi transformada seqüencialmente com pGBKT7-DdPP1c (clone 1) ou pGBKT7-DdPP1cF269C (clone 2) e com o vetor pGADT7 vazio para análise da interação por duplo-híbrido. Os clones 3 e 4 representam os controles positivo (p53-AntígenoT) e negativo (Lam-AntígenoT) da interação, respectivamente. A interação foi analisada pela ativação dos repórteres *HIS3* e *lacZ*. Os transformantes contendo os dois plasmídios selecionados em meio SD sem Trp/Leu foram plaqueados em meio SD sem Trp/Leu/His para avaliação do crescimento. As placas foram incubadas a 30°C por 2-3 dias. Colônias crescidas neste meio foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas em nitrogênio líquido por 30 segundos. A membrana foi então colocada em tampão Z contendo X-β-gal (500mg/mL) e incubadas a 37°C até o aparecimento de cor, por no máximo 4 horas. **B)** A cepa AH109 foi transformada seqüencialmente com pGBKT7-NcPP1c (clone 1) e com o vetor pGADT7 vazio para análise da interação por duplo-híbrido conforme feito para (A). Os clones 2 e 3 representam os controles positivo e negativo de interação, respectivamente.

Figura 17. Controle de auto-ativação dos genes repórteres por Ddl-2. A cepa AH109 foi transformada sequencialmente com pGADT7-Ddl-2 e com pGBKT7 vazio (clone 1) para análise da interação por duplo-híbrido. Os clones 2 e 3 representam os controles positivo (p53-AntígenoT) e negativo (Lam-AntígenoT) da interação, respectivamente. A interação foi analisada pela ativação dos repórteres *HIS3* e *lacZ*. Os transformantes contendo os dois plasmídios selecionados em meio SD sem Trp/Leu foram plaqueados em meio SD sem Trp/Leu/His para avaliação do crescimento. As placas foram incubadas a 30°C por 2-3 dias. Colônias crescidas neste meio foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas em nitrogênio líquido por 30 segundos. A membrana foi então colocada em tampão Z contendo X-β-gal (500mg/mL) e incubadas a 37°C até o aparecimento de cor, por no máximo 4 horas.

Figura 18. Interação entre Ddl-2 e as isoformas de PP1 de *D. discoideum* e *N. crassa*. A cepa AH109/ pGADT7-Ddl-2 foi transformada com as construções pGBKT7-DdPP1c, pGBKT7-DdPP1cF269C e pGBKT7-NcPP1c e a interação testada pelo método do duplo-híbrido, tanto por análise de crescimento na ausência de histidina, como pela atividade de *lacZ*. **A-C)** Teste de crescimento em meio com ou sem histidina. Os transformantes contendo os dois plasmídios foram crescidos em meio SD líquido contendo uma mistura de aminoácidos menos triptofano e leucina. Posteriormente, foram feitas 4 diluições seriadas ($10\times$ a partir da D.O_{600nm} = 0,5) desta suspensão de células e aplicados 5 μ L de cada diluição em placas com o meio de cultura SD com aminoácidos apropriados suplementado ou não com histidina. As placas com meio SD contendo histidina (A; +HIS), na ausência de histidina (B; -HIS) e na ausência de histidina suplementado com 3-aminotriazol (C; -HIS+3-AT) foram incubadas a 30°C por 2-3 dias. **D)** Teste de X- β -Gal. Colônias crescidas por 2-3 dias em meio sólido (A) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas em nitrogênio líquido por 30 segundos. A membrana foi então colocada em tampão Z contendo X- β -Gal (500mg/mL) e incubadas a 37°C até o aparecimento de cor, por no máximo 4 horas. 1. DdPP1c-Ddl-2; 2. DdPP1cF269C-Ddl-2; 3. NcPP1c-Ddl-2; 4. p53-AntígenoT (controle positivo); 5. Lam-AntígenoT (controle negativo).

Interações	Atividade de β -galactosidase (U)
DdPP1c x Ddl-2	$8,2 \pm 0,4$
DdPP1cF269C x Ddl-2	$10,3 \pm 2,1$
NcPP1c x Ddl-2	$8,4 \pm 1,0$
p53 x Antígeno T (controle positivo)	$17,9 \pm 1,4$
Lam x Antígeno T (controle negativo)	$2,9 \pm 0,1$

Figura 19. Quantificação da interação entre Ddl-2 e as isoformas de PP1 de *D. discoideum* e *N. crassa*. A cepa AH109 expressando as proteínas de fusão foi analisada quanto a atividade da β -Galactosidase usando o substrato ONPG. Células de levedura crescidas a 30°C até uma DO_{600nm} entre 0,5-0,8 foram suspensas em tampão Z acrescido de ONPG após lise com nitrogênio líquido. Após ~1 hora de incubação a 30°C a reação foi parada com Na_2CO_2 1M, centrifugada e o sobrenadante medido em DO_{420nm} . A atividade de β -Galactosidase foi calculada com base na equação descrita no item 3.2.5 dos procedimentos experimentais. Segundo Miller (1972), uma unidade de β -galactosidase é capaz de hidrolisar 1 μ mol de ONPG em o-nitrofenol e D-galactose por minuto por célula. Média e desvio padrão calculado a partir de três experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata.

4.7.4. Expressão dos inibidores INc-1L e INc-1 em levedura

Como apresentado no item 4.6.4, demonstramos que os ortólogos de I-2 de *N. crassa* foram capazes de inibir as fosfatases de *D. discoideum* e esta inibição foi ligeiramente menor quando a região 1 estava interrompida pelo intron. Resolvemos investigar se ocorreria interação destas proteínas *in vivo*, através de ensaios de duplo-híbrido em levedura.

Seguindo as mesmas etapas descritas no item anterior, subclonamos INc-1L e INc-1 no vetor pGADT7 e confirmamos a autenticidade das construções pGADT7-INc-1L e pGADT7-INc-1 (item 3.7.5). Em seguida, avaliamos se a proteína INc-1L (presa) estava sendo corretamente expressa na linhagem AH109 transformada com a construção pGADT7-INc-1L e selecionada em meio sem leucina. O controle positivo deste experimento foi a linhagem AH109 transformada com pGADT7-antígenoT. Na canaleta 3 da Figura 20 observamos que a proteína INc-1L está sendo expressa em fusão com GAL4 AD apresentando um tamanho aproximado de 69kD. A proteína INc-1L possui massa molecular estimada de 38kD e a fusão com o domínio de ativação de GAL4 adicionou aproximadamente 18kD à proteína. Todavia, como já mencionado, INc-1L como os demais inibidores do tipo 2, também apresenta uma migração anômala em SDS-PAGE aparentando ter 54kD ao invés dos 38kD estimado com base na sua sequência de aminoácidos (Zapella, 2001; Beton, 2004). O controle antígeno T em fusão com o domínio de ativação de GAL4 (canaleta 2) também foi detectado validando o nosso experimento.

4.7.5. Análise da interação entre as PP1c de *D. discoideum* e INc-1L e INc-1 de *N. crassa*

Investigamos ainda se INc-1 e INc-1L seriam capazes de auto-ativar os genes repórteres. Para tal, a levedura AH109 foi transformada com cada uma das construções e em seguida, com o vetor pGBKT7 vazio. A Figura 21 mostra que as linhagens transformadas com ambos os plasmídeos não cresceram na ausência de histidina e não apresentaram atividade de β -galactosidase. Como esperado, o controle positivo cresceu no meio seletivo para interação (meio sem Leu/Trp/His) e apresentou colônias azuis no teste da β -galactosidase. Já o controle negativo não apresentou, como esperado, nenhum destes comportamentos.

Para analisar a interação entre as PP1c de *D. discoideum* e o inibidor de *N. crassa*, fizemos a transformação seqüencial da linhagem AH109 contendo a isca pGBKT7-DdPP1c ou pGBKT7-DdPP1cF269C com a presa pGADT7-INc-1L ou pGADT7-INc-1. Também avaliamos neste experimento a interação da PP1c de *N. crassa* (NcPP1c) com seu próprio inibidor (INc-1L), utilizando leveduras transformadas com a construção pGBKT7-NcPP1c. Assim, a linhagem AH109 transformada seqüencialmente com as combinações de PP1c e INc-1/INc-1L, foi submetida a crescimento em meio de cultura com ou sem histidina após quatro diluições seriadas (10 vezes a partir de $DO_{600nm} = 0,5$). Após 3-4 dias de crescimento a 30°C, escolhemos algumas colônias e estriamos em membrana de nitrocelulose juntamente com os controles positivo (AH109+p53+AntígenoT) e negativo (AH109+Lam+AntígenoT).

Como pode ser visto na Figura 22, apenas a NcPP1c de *N. crassa* apresentou interação evidente com INc-1L no ensaio de X-β-Gal. As DdPP1c e DdPP1cF269C de *D. discoideum*, no entanto, não apresentaram colônias azuis apesar de crescerem na ausência de histidina. Todavia, a presença de 3-AT comprometeu bastante o crescimento no meio sem Trp/Leu/His. Suspeitamos que a interrupção da região 1 do inibidor pelo intron poderia estar dificultando a interação destas proteínas. Contudo, INc-1 apresentou um comportamento semelhante (Figura 22), interagindo apenas com a PP1c de *Neurospora*.

Para quantificar a interação nestes duplo-transformantes, avaliamos a atividade de β-galactosidase com o substrato ONPG. A Figura 24 mostra as unidades de β-Galactosidase produzidas medidas em cada duplo-transformante. A interação entre NcPP1c e INc-1 foi mais eficiente quando comparada com INc-1L. Estes dados estão de acordo com o observado em relação à inibição da atividade da NcPP1c, onde INc-1 foi duas vezes mais potente que INc-1L. Em conjunto, os resultados indicam que o motivo KGILK também é importante para interação do inibidor de *Neurospora* com a PP1, pois sua interrupção compromete este evento como proposto para o I-2 de mamíferos (Huang *et al.*, 1999; Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Wakula *et al.*, 2003; Beton, 2004).

Em relação às fosfatases de *Dictyostelium*, observamos que praticamente não houve diferença na produção de β-Galactosidase quando elas eram testadas quanto a interação com qualquer um dos dois inibidores (INc-1 e INc-1L). E ainda, a

interação entre estas proteínas e os inibidores comparada com o controle negativo (LaminaC+ antígenoT) mostra que pode haver alguma interação mesmo que mais fraca.

Figura 20. Expressão do INc-1L em fusão com GAL4 3'-AD. Amostras de extratos celulares lisados das linhagens AH109 (canaleta 1), AH109 + pGBKT7-antígenoT (canaleta 2) e AH109 + pGADT7-INc-1L (canaleta 3) foram submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS (SDS-PAGE). Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-GAL4 AD (1:2500), por 16-18 horas à temperatura ambiente. O reconhecimento das proteínas pelo anticorpo foi detectado por quimioluminescência através dos reagentes e instruções do *kit* de detecção *ECL* (Amersham-Pharmacia). Os marcadores de massa molecular em kDa estão indicados a esquerda.

Figura 21. Controle de auto-ativação dos genes repórteres pelos inibidores INc-1L e INc-1. **A)** A cepa AH109 foi transformada sequencialmente com pGADT7-INc-1L (clone 1) e com o vetor pGBKT7 vazio para análise da interação por duplo-híbrido. Os clones 2 e 3 representam os controles positivo (p53-AntígenoT) e negativo (Lam-AntígenoT) da interação, respectivamente. A interação foi analisada pela ativação dos repórteres *HIS3* e *lacZ*. Os transformantes contendo os dois plasmídios selecionados em meio SD sem Trp/Leu foram plaqueados em meio SD sem Trp/Leu/His para avaliação do crescimento. As placas foram incubadas a 30°C por 2-3 dias. Colônias crescidas neste meio foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas em nitrogênio líquido por 30 segundos. A membrana foi então colocada em tampão Z contendo X-β-gal (500mg/mL) e incubadas a 37°C até o aparecimento de cor, por no máximo 4 horas. **B)** A cepa AH109 foi transformada sequencialmente com pGADT7-INc-1 (clone 1) e com o vetor pGBKT7 vazio para análise da interação por duplo-híbrido, conforme feito para (A). Os clones 2 e 3 representam os controles positivo e negativo da interação.

Figura 22. Interação entre INc-1L de *N. crassa* e as isoformas de PP1 de *N. crassa* e *D. discoideum*. A cepa AH109/ pGADT7-INc-1L foi transformada com as construções pGBKT7-NcPP1c, pGBKT7-DdPP1c e pGBKT7-DdPP1cF269C e a interação testada pelo método do duplo-híbrido, tanto por análise de crescimento na ausência de histidina, como pela atividade de *lacZ*. **A-C)** Teste de crescimento em meio com ou sem histidina. Os transformantes contendo os dois plasmídios foram crescidos em meio SD líquido contendo uma mistura de aminoácidos menos triptofano e leucina. Posteriormente, foram feitas 4 diluições seriadas ($10\times$ a partir da $DO_{600nm} = 0,5$) desta suspensão de células e aplicados $5\mu L$ de cada diluição em placas com o meio de cultura SD com aminoácidos apropriados suplementado ou não com histidina. As placas com meio SD contendo histidina (A; +HIS), na ausência de histidina (B; -HIS) e na ausência de histidina suplementado com 3-aminotriazol (C; -HIS+3-AT) foram incubadas a $30^{\circ}C$ por 2-3 dias. **D)** Teste de X- β -Gal. Colônias crescidas por 2-3 dias em meio sólido (A) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas em nitrogênio líquido por 30 segundos. A membrana foi então colocada em tampão Z contendo X- β -gal (500mg/mL) e incubadas a $37^{\circ}C$ até o aparecimento de cor, por no máximo 4 horas. 1. NcPP1c-INc-1L; 2. DdPP1c-INc-1L; 3. DdPP1cF269C-INc-1L; 4. p53-AntígenoT (controle positivo); 5. Lam-AntígenoT (controle negativo).

Figura 23. Interação entre INc-1 de *N. crassa* e as isoformas de PP1 de *N. crassa* e *D. discoideum*. A cepa AH109/ pGADT7-INc-1 foi transformada com as construções pGBKT7-NcPP1c, pGBKT7-DdPP1c e pGBKT7-DdPP1cF269C e a interação testada pelo método do duplo-híbrido, tanto por análise de crescimento na ausência de histidina, como pela atividade de *lacZ*. **A-C)** Teste de crescimento em meio com ou sem histidina. Os transformantes contendo os dois plasmídios foram crescidos em meio SD líquido contendo uma mistura de aminoácidos menos triptofano e leucina. Posteriormente, foram feitas 4 diluições seriadas (10x a partir da DO_{600nm} = 0,5) desta suspensão de células e aplicados 5μL de cada diluição em placas com o meio de cultura SD com aminoácidos apropriados suplementado ou não com histidina. As placas com meio SD contendo histidina (A; +HIS), na ausência de histidina (B; -HIS) e na ausência de histidina suplementado com 3-aminotriazol (C; -HIS+3-AT) foram incubadas a 30°C por 2-3 dias. **D)** Teste de X-β-Gal. Colônias crescidas por 2-3 dias em meio sólido (A) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas em nitrogênio líquido por 30 segundos. A membrana foi então colocada em tampão Z contendo X-β-gal (500mg/mL) e incubadas a 37°C até o aparecimento de cor, por no máximo 4 horas. **1.** NcPP1c-INc-1; **2.** DdPP1c-INc-1; **3.** DdPP1cF269C-INc-1; **4.** p53-AntígenoT (controle positivo); **5.** Lam-AntígenoT (controle negativo).

Interações	Atividade de β -galactosidase (U)
NcPP1c x INc-1	10,5 $\pm$ 0,4
DdPP1c x INc-1	4,7 $\pm$ 0,5
DdPP1cF269C x INc-1	5,8 $\pm$ 0,1
NcPP1c x INc-1L	7,2 $\pm$ 1,1
DdPP1c x INc-1L	4,9 $\pm$ 1,3
DdPP1cF269C x INc-1L	5,7 $\pm$ 0,5
p53 x Antígeno T (controle positivo)	14,0 $\pm$ 1,4
Lam x Antígeno T (controle negativo)	2,3 $\pm$ 0,1

Figura 24. Quantificação da interação entre os inibidores INc-1 e INc-1L e as isoformas de PP1 de *D. discoideum* e *N. crassa*. A cepa AH109 expressando as proteínas de fusão foi analisada quanto à atividade da β -Galactosidase usando o substrato ONPG. Células de levedura crescidas a 30°C até uma DO_{600nm} entre 0,5-0,8 foram suspensas em tampão Z acrescido de ONPG após lise com nitrogênio líquido. Após ~1 hora de incubação a 30°C a reação foi parada com Na_2CO_2 1M, centrifugada e o sobrenadante medido em DO_{420nm} . A atividade de β -Galactosidase foi calculada com base na equação descrita no item 3.2.5 dos procedimentos experimentais. Segundo Miller (1972), uma unidade de β -galactosidase é capaz de hidrolisar 1 μ mol de ONPG em o-nitrofenol e D-galactose por minuto por célula. Média e desvio padrão calculado a partir de três experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata.

4.8. Mapeamento das regiões de Ddl-2 responsáveis pela interação física com a DdPP1c

Tem sido proposto que a interação de subunidades reguladoras com a PP1c envolve múltiplos contatos, entre eles o pequeno motivo consenso denominado RVXF existente em muitas destas subunidades (Beullens *et al.*, 1999; Bollen, 2001; Schillace *et al.*, 2001). No caso de I-2 já foram identificadas pelo menos cinco regiões conservadas nos mais diversos organismos e definidas como importantes para a interação e inibição da PP1c. Uma provável conformação estendida da proteína embasa o modelo no qual I-2 envolve a subunidade catalítica da PP1 estabelecendo múltiplos contatos (Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). A somatória da contribuição dessas várias regiões parece ser responsável pela atividade e ligação do I-2 a PP1c.

Resumidamente, a região 1 localizada na extremidade amino-terminal do I-2 de mamíferos foi proposta como essencial para interação, mas não para inibição (ver Figura 4). Ela contém a sequência KGILK capaz de substituir funcionalmente o motivo consenso RVXF, presente em outras subunidades moduladoras apesar de não se ligar ao canal hidrofóbico existente na PP1c. A região 2 contém o resíduo fosforilado pela GSK3 que é fundamental no processo de reativação da PP1c quando complexada a I-2. Esta região, além de ancorar I-2 na PP1c, também forma uma alça, que não estabelece contato físico com a PP1c no complexo PP1I, mas bloqueia o acesso de substratos ao sítio catalítico da PP1c. A região 3 contém a sequência KLHY que se acreditava ser uma variação do motivo consenso RVXF e também seria importante para interação com a PP1c. A região 4 contém os resíduos carbóxi-terminais acídicos e contribui claramente para atividade de I-2. A região 5 inclui o resíduo Trp46 que quando mutado provocou um drástico aumento do IC₅₀ de I-2 (Helps & Cohen, 1999; Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Wakula *et al.*, 2003).

Os experimentos descritos a seguir investigam o papel de algumas destas regiões de Ddl-2 na sua interação com a DdPP1c.

4.8.1. Obtenção e expressão dos mutantes Ddl-2 em fusão com o domínio de ativação de GAL4

As regiões ou motivos responsáveis pela interação física entre a DdPP1c e Ddl-2 foram analisadas pela construção de mutantes contendo deleções nas regiões ou motivos sugeridos como importantes para interação do I-2 com a PP1c em mamíferos. Em geral, os poucos estudos descritos de caracterização das regiões conservadas do I-2 se baseiam em métodos que avaliam a inibição da atividade de fosforilase fosfatase e de interação física através ensaios de ligação entre as duas proteínas *in vitro* (Park & DePaoli-Roach, 1994; Helps & Cohen, 1999; Huang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Wakula *et al.*, 2003). Entretanto, a investigação da interação física utilizando a metodologia do duplo-híbrido não foi muito explorada na interação entre a PP1c e seu inibidor. Apenas um trabalho mostrou que dois mutantes da PP1c (Glc7 de levedura) contendo substituições de alguns aminoácidos por alanina, interagiram com I-2 humano no ensaio do duplo-híbrido (Connor *et al.*, 2000).

Assim, planejamos a construção de mutantes contendo deleções de uma ou mais regiões ditas importantes para interação e/ou inibição da PP1, conforme esquematizado na Figura 25. Os mutantes desejados foram obtidos pela amplificação por PCR de partes do cDNA de Ddl-2 com oligonucleotídeos específicos. Estes mutantes foram nomeados conforme sua composição em termos de resíduos de aminoácido como Ddl-2¹⁻¹¹¹ (oligos Ddl03/Ddl05), pGADT7-Ddl-2¹⁻¹²⁰ (oligos Ddl03/Ddl06), pGADT7-Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ (oligos Ddl03/Ddl07) e pGADT7-Ddl-2¹⁷³⁻²⁶¹ (oligos Ddl04/Ddl08). Os oligonucleotídeos utilizados continham os sítios *Cla*I e *Bam*HI adaptados para viabilizar a clonagem direcionada (item 3.4.1 dos procedimentos experimentais). Os fragmentos obtidos foram purificados, digeridos e ligados no vetor pGADT7 que propicia fusão com o domínio de ativação de GAL4. Após seqüenciamento de dois clones para cada um dos mutantes, selecionamos aqueles cujas seqüências dos insertos estavam em fase com a seqüência do vetor e não continham nenhuma mutação ocasional devido a erros da DNA polimerase utilizada na amplificação.

Antes de realizar o ensaio do duplo-híbrido, verificamos se as proteínas truncadas estavam sendo corretamente expressas em levedura. Com esta finalidade, prosseguimos com a transformação da levedura AH109 com as construções pGADT7-Ddl-2¹⁻¹¹¹, pGADT7-Ddl-2¹⁻¹²⁰, pGADT7-Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ e pGADT7-

Ddl-2¹⁷³⁻²⁶¹ utilizando o método do acetato de lítio. Os transformantes foram selecionados em meio sem leucina conforme requerido pela linhagem. Os controles positivos destes experimentos foram as linhagens AH109 transformada com Ddl-2 selvagem (íntegro).

Na Figura 25 observamos que as proteínas truncadas estão sendo expressas corretamente conforme sua detecção com anticorpo anti-GAL4 AD em *immunoblots*. As massas moleculares esperadas, já somadas aos 18kD da fusão, seriam de 30,8kD para Ddl-2¹⁻¹¹¹ (canaleta 2), 32kD para Ddl-2¹⁻¹²⁰ (canaleta 3), 36kD para Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ (canaleta 4) e 28,8kD para Ddl-2¹⁷³⁻²⁶¹ (canaleta 6), todavia os polipeptídeos migraram com um tamanho maior em SDS-PAGE. A migração anômala neste tipo de gel também foi mantida nos mutantes de Ddl-2 cujas massas estimadas em SDS-PAGE foram ~40kD, ~43kD, ~49kD e ~38kD, respectivamente. Como já mencionado anteriormente o Ddl-2 migra como um polipeptídeo de ~62kD, apesar de sua massa molecular calculada corresponder a 49kD (31kD somados aos 18kD conferidos pela fusão).

4.8.2. Análise da interação da DdPP1c com os mutantes de Ddl-2 em ensaios de duplo-híbrido

A interação entre a DdPP1c e o inibidor Ddl-2 selvagem e mutantes foi investigada utilizando os procedimentos já mencionados. A linhagem AH109 transformada seqüencialmente com DdPP1c e Ddl-2 selvagem e mutantes (Ddl-2¹⁻¹¹¹, Ddl-2¹⁻¹²⁰, Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ e Ddl-2¹⁷³⁻²⁶¹) foi submetida a crescimento em meio de cultura com ou sem histidina após quatro diluições seriadas (10 vezes a partir de DO_{600nm} = 0,5).

A Figura 26 mostra que apenas o mutante Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ cresceu na ausência de histidina. Prosseguimos com o teste da β -Galactosidase e detectamos interação apenas entre a PP1c e esta proteína truncada que contém as regiões 1,5 e 2 (Figuras 4 e 25). O controle positivo e negativo da interação validou o experimento.

Aparentemente, a presença da região 2 restaura parcialmente a capacidade do inibidor interagir com a PP1c indicando que esta região poderia ser essencial para a interação destas duas proteínas. Por outro lado, acredita-se que a soma de todas as regiões seja a responsável pela integridade total da interação entre I-2 e PP1 (Yang *et al.*, 2000). É possível que a presença da região 2, em adição as

regiões 1 e 5, tenha recuperado a capacidade do inibidor interagir com a fosfatase, mas a verificação desta hipótese requer experimentos adicionais de mutação na região 2 de Ddl-2, como será detalhado adiante.

Outro aspecto interessante foi que a porção carboxi-terminal da proteína não foi essencial para a interação contrapondo estudos que postularam que o motivo consenso (R/K)X₁(V/I)X₂(F/W) estava presente nesta porção do inibidor, funcionando como âncora para ligação na PP1c. Segundo estes estudos, o rompimento deste contato seria suficiente para enfraquecer ou até mesmo romper a interação (Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Bollen, 2001). Entretanto, nossas observações corroboram com dados recentes que descartaram a hipótese do motivo KLHY da região 3 ser equivalente ao RVXF encontrado em subunidades reguladoras da PP1c (Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Bollen, 2001). Foi sugerido que o motivo KGILK (região 1), e não KLHY (região 3), pode ser substituído funcionalmente pelo o motivo consenso RVXF (Wakula *et al.*, 2003). Deste modo, a região 1 é que teria como função ancorar o I-2 na PP1 e como consequência promover a interação de sítios secundários.

A próxima pergunta que buscamos responder foi se a interação do mutante Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ com a PP1c seria quantitativamente semelhante ao Ddl-2 em termos de ativação do repórter *lacZ*. A Figura 27 mostra a quantidade de β -Galactosidase produzida pelas diferentes linhagens utilizando o ONPG como substrato. A interação entre a DdPP1c com o inibidor Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ foi 20% mais fraca quando comparada com o Ddl-2 selvagem, indicando que a porção carboxi-terminal do inibidor é importante, apesar de não ser essencial, para interação. Já os demais clones Ddl-2¹⁻¹¹¹, Ddl-2¹⁻¹²⁰ e Ddl-2¹⁷³⁻²⁶¹ tiveram comportamento mais próximo ao controle negativo, confirmando que estas proteínas truncadas não são capazes de interagir com a DdPP1c nos ensaios de duplo-híbrido.

4.8.3. Investigação da importância da região 2 do Ddl-2 na interação com a DdPP1c

Na tentativa de definir a real contribuição da região 2 do Ddl-2 na interação com a DdPP1c, resolvemos construir um novo mutante onde apenas a sequência relativa a esta região seria deletada. Assim, planejamos oligonucleotídeos (Ddl09 e Ddl10) para amplificação da construção pGADT7-Ddl-2 com a deleção de 30 nucleotídeos

referentes a região 2 do cDNA Ddl-2. A utilização da enzima *PfuTurbo* DNA polimerase (*Stratagene*) foi essencial para uma amplificação livre de erros da construção de ~8,8kpb. Após amplificação, o produto obtido foi digerido com a enzima *DpnI* que digere especificamente o DNA metilado parental que não possui a mutação e, em seguida foi realizada a transformação da bactéria *Sure*. Os clones obtidos tiveram seus plasmídeos extraídos e digeridos com as enzimas *Clal* e *XhoI* para excisão do inserto. Seqüenciamos 4 clones cujos insertos eram menores e 1 clone com inserto ligeiramente maior. Como esperado, apenas os 4 clones de menor inserto apresentaram a deleção dos 30 nucleotídeos na seqüência do cDNA de Ddl-2. Um destes clones positivos para a deleção da região 2 foi escolhido para a preparação de plasmídeos em larga escala.

A construção denominada pGADT7-Ddl-2^{Δ134-143} (Figura 25) e pGBKT7-DdPP1c foram transformadas seqüencialmente na levedura AH109 e crescidas em meio sem Trp/Leu para seleção dos dois plasmídeos. Concomitantemente, transformamos a levedura expressando a proteína isca DdPP1c com as construções contendo o Ddl-2 selvagem e o mutante Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ (regiões 1, 5 e 2) para um estudo comparativo do efeito da presença/ausência da região 2 na interação. A Figura 28 mostra que a ausência da região 2 não impediu a interação de Ddl-2 com a DdPP1c, já que este clone foi capaz de crescer na ausência de histidina e apresentou colônias azuis oriunda da ativação de *lacZ* e consumo do substrato X-β-gal. Conforme esperado Ddl-2 e Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ também interagiram com a PP1, pois ativaram os dois genes repórteres testados.

A quantificação da atividade de *lacZ* destes mutantes (Figura 29) mostrou que o comportamento dos mutantes Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ e Ddl-2^{Δ134-143} é semelhante com uma atividade um pouco maior do último. O fato de a interação ocorrer mesmo quando a região 2 está ausente indica que esta seqüência não é essencial para a interação de Ddl-2 com a DdPP1c quando as demais (1, 5 e 3) estão presentes. Assim, o determinante para que haja interação parece ser a presença das várias regiões ou motivos conservados do Ddl-2. Por outro lado, podemos especular que a região que devolveu a capacidade do mutante Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ interagir com a DdPP1c seria uma seqüência localizada entre as regiões 5 e 2, que corresponderia a um novo sítio de interação. Em resumo, os resultados indicam que a contribuição da região 2 é relativamente importante, mas que a participação de todas as regiões conservadas é que responde pela integridade total da interação entre Ddl-2 e DdPP1c.

Figura 25. Expressão do Ddl-2 selvagem e mutantes em fusão com GAL4 3'-AD. A) Mapa das proteínas truncadas produzidas. **B)** Amostras de extratos celulares lisados das linhagens AH109 (canaleta 1); AH109_pGADT7-Ddl-2 (canaleta 2); AH109_pGADT7-Ddl-2¹⁻¹¹¹ (canaleta 3); AH109_pGADT7-Ddl-2¹⁻¹²⁰ (canaleta 4); AH109_pGADT7-Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ (canaleta 5) e AH109_pGADT7-Ddl-2¹⁷³⁻²⁶¹ (canaleta 6) foram submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS (SDS-PAGE). Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo monoclonal anti-GAL4 AD (1:2500), por 16-18 horas à temperatura ambiente. O reconhecimento das proteínas pelo anticorpo foi detectado por quimioluminescência através dos reagentes e instruções do *kit* de detecção *ECL* (Amersham-Pharmacia). Os marcadores de massa molecular em kDa estão indicados à esquerda.

Figura 26. Interação entre a DdPP1c e Ddl-2 selvagem e mutantes. A cepa AH109 pGBKT7-DdPP1c foi transformada com as construções pGADT7-Ddl-2, pGADT7-Ddl-2¹⁻¹¹¹, pGADT7-Ddl-2¹⁻¹²⁰, pGADT7-Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ e pGADT7-Ddl-2¹⁷³⁻²⁶¹ e a interação testada pelo método do duplo-híbrido, tanto por análise de crescimento na ausência de histidina, como pela atividade de *lacZ*. **A-C)** Teste de crescimento em meio com ou sem histidina. Os transformantes contendo os dois plasmídios foram crescidos em meio SD líquido contendo uma mistura de aminoácidos menos triptofano e leucina. Posteriormente, foram feitas 4 diluições seriadas (10x a partir da DO_{600nm} = 0,5) desta suspensão de células e aplicados 5µL de cada diluição em placas com o meio de cultura SD com aminoácidos apropriados suplementado ou não com histidina. As placas com meio SD contendo histidina (A), na ausência de histidina (B) e na ausência de histidina suplementado com 3-aminotriazol (C) foram incubadas a 30°C por 2-3 dias. **D)** Teste de X-β-Gal. Colônias crescidas por 2-3 dias em meio sólido (A) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas em nitrogênio líquido por 30 segundos. A membrana foi então colocada em tampão Z contendo X-β-gal (500mg/mL) e incubadas a 37°C até o aparecimento de cor, por no máximo 4 horas. 1. DdPP1c-Ddl-2; 2. DdPP1c-Ddl-2¹⁻¹¹¹; 3. DdPP1c-Ddl-2¹⁻¹²⁰; 4. DdPP1c-Ddl-2¹⁻¹⁵⁰; 5. DdPP1c-Ddl-2¹⁷³⁻²⁶¹; 6. p53-AntígenoT (controle positivo); 7. Lam-AntígenoT (controle negativo).

Interações	Atividade de β -galactosidade (U)
DdPP1c x Ddl-2	$8,2 \pm 0,4$
DdPP1c x Ddl-2 ¹⁻¹¹¹	$3,2 \pm 0,2$
DdPP1c x Ddl-2 ¹⁻¹²⁰	$3,0 \pm 0,4$
DdPP1c x Ddl-2 ¹⁻¹⁵⁰	$6,5 \pm 0,4$
DdPP1c x Ddl-2 ¹⁷³⁻²⁶¹	$3,4 \pm 0,1$
p53 x Antígeno T (controle +)	$17,9 \pm 1,4$
Lam x Antígeno T (controle -)	$2,9 \pm 0,1$

Figura 27. Quantificação da interação entre a DdPP1c e Ddl-2 selvagem e mutantes. A cepa AH109 expressando as proteínas de fusão foi analisada quanto à atividade da β -Galactosidase usando o substrato ONPG. Células de levedura crescidas a 30°C até uma DO_{600nm} entre 0,5-0,8 foram suspensas em tampão Z acrescido de ONPG após lise com nitrogênio líquido. Após ~1 hora de incubação a 30°C a reação foi parada com Na_2CO_2 1M, centrifugada e o sobrenadante medido em DO_{420nm} . A atividade de β -Galactosidase foi calculada com base na equação descrita no item 3.2.5 dos procedimentos experimentais. Segundo Miller (1972), uma unidade de β -galactosidase é capaz de hidrolisar 1 μ mol de ONPG em o-nitrofenol e D-galactose por minuto por célula. Média e desvio padrão calculado a partir de três experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata

Figura 28. Interação entre a DdPP1c e Ddl-2 selvagem e mutantes. A cepa AH109/pGBKT7-DdPP1c foi transformada com as construções pGADT7-Ddl-2, pGADT7-Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ e pGADT7-Ddl-2^{Δ134-143} e a interação testada pelo método do duplo-híbrido, tanto por análise de crescimento na ausência de histidina, como pela atividade de *lacZ*. **A-C)** Teste de crescimento em meio com ou sem histidina. Os transformantes contendo os dois plasmídios foram crescidos em meio SD líquido contendo uma mistura de aminoácidos menos triptofano e leucina. Posteriormente, foram feitas 4 diluições seriadas (10x a partir da DO_{600nm} = 0,5) desta suspensão de células e aplicados 5μL de cada diluição em placas com o meio de cultura SD com aminoácidos apropriados suplementado ou não com histidina. As placas com meio SD contendo histidina (A; +HIS), na ausência de histidina (B; -HIS) e na ausência de histidina suplementado com 3-aminotriazol (C; -HIS+3-AT) foram incubadas a 30°C por 2-3 dias. **D)** Teste de X-β-Gal. Colônias crescidas por 2-3 dias em meio sólido (A) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas em nitrogênio líquido por 30 segundos. A membrana foi então colocada em tampão Z contendo X-β-gal (500mg/mL) e incubadas a 37°C até o aparecimento de cor, por no máximo 4 horas. **1.** DdPP1c x Ddl-2; **2.** DdPP1c x Ddl-2¹⁻¹⁵⁰; **3.** DdPP1c x Ddl-2^{Δ134-143}; **4.** p53 x AntígenoT (controle positivo); **5.** Lam x AntígenoT (controle negativo).

Interações	Atividade de β -galactosidase (U)
DdPP1c x Ddl-2	$8,8 \pm 0,1$
DdPP1c x Ddl-2 ¹⁻¹⁵⁰	$6,4 \pm 0,5$
DdPP1c x Ddl-2 ^{Δ134-143}	$7,4 \pm 0,8$
p53 x Antígeno T (Controle +)	$14,5 \pm 1,4$
Lam x Antígeno T (Controle -)	$2,5 \pm 0,1$

Figura 29. Quantificação da interação entre a DdPP1c e Ddl-2 selvagem e mutantes. A cepa AH109 expressando as proteínas de fusão foi analisada quanto à atividade da β -Galactosidase usando o substrato ONPG. Células de levedura crescidas a 30°C até uma DO_{600nm} entre 0,5-0,8 foram suspensas em tampão Z acrescido de ONPG após lise com nitrogênio líquido. Após ~1 hora de incubação a 30°C a reação foi parada com Na_2CO_3 1M, centrifugada e o sobrenadante medido em DO_{420nm} . A atividade de β -Galactosidase foi calculada com base na equação descrita no item 3.2.5 dos procedimentos experimentais. Segundo Miller (1972), uma unidade de β -galactosidase é capaz de hidrolisar 1 μ mol de ONPG em o-nitrofenol e D-galactose por minuto por célula. Média e desvio padrão calculado a partir de três experimentos independentes com ensaios realizados em triplicata.

5. Discussão final

Neste trabalho, demonstramos que o gene *Ddl-2* de *D. discoideum* é o ortólogo dos genes *I-2* encontrados em diversas outras espécies. As características que suportam esta afirmação incluem a conservação de quatro das cinco regiões sabidamente importantes para interação entre *I-2* e PP1, o comportamento anômalo da proteína *Ddl-2* em gel de SDS-PAGE e a clara atividade inibitória de *Ddl-2* recombinante sobre a atividade de PP1. Todas estas características são comuns aos inibidores deste tipo previamente descritos em outros organismos.

Análises da sequência primária de *Ddl-2* indicaram que ele é uma proteína ácida com um *pI* teórico de 4,26 e com composição predominante de aminoácidos hidrofílicos (~77%). O baixo número de aminoácidos hidrofóbicos (~23%) e ausência de cisteínas são comparáveis com o encontrado no *I-2* isolado de músculo esquelético de coelho (18%) e corresponde a metade da proporção encontrada em proteínas globulares comuns (Holmes *et al.*, 1986). A alta porcentagem de aminoácidos hidrofílicos e de prolina aliada a termoestabilidade sugere que *I-1* e *I-2* não apresentam uma estrutura globular típica (Nimmo & Cohen, 1978; Foulkes & Cohen, 1980). Estudos de dicroísmo circular e RMN corroboraram com esta hipótese (Endo *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2000; Chyan *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004). Esta coincidência entre *I-2* e *Ddl-2* sugere que *Ddl-2* também deve apresentar uma conformação tridimensional desordenada.

Em *D. discoideum*, nós encontramos apenas uma única cópia de *Ddl-2*, conforme mostrado por análises de *Southern blots*. Este gene está mapeado no cromossomo 2 da ameba e é transcrito ao longo de todo o seu ciclo de vida. Resultados semelhantes foram observados em outros microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa* que também possuem uma única cópia do *I-2*. Em rato, dois genes codificam três isoformas de *I-2* sendo que duas delas são originadas por *splicing* alternativo e em coelhos também foi sugerida a presença de dois genes (Park *et al.*, 1994; Osawa *et al.*, 1996). Nos diversos organismos estudados, o mRNA do *I-2* é ubíquo de todos os tecidos e estágios de desenvolvimento, assim como acontece com o *Ddl-2* (Roach *et al.*, 1985; MacDougall *et al.*, 1989; Bennett *et al.*, 1999).

Não tivemos sucesso em nossa tentativa de nocautear o gene *Ddl-2* por recombinação homóloga, o que pode sugerir que este gene seja essencial para viabilidade celular. Dados anteriores que sugerem que a superexpressão da DdPP1c resulta na inviabilidade das células de *D. discoideum* suportam esta proposição (Andrioli *et al.*, 2003). Contudo, experimentos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese. O nocaute do *glc8* (ortólogo de *I-2*) de levedura não afetou a viabilidade do fungo, causando apenas uma moderada redução da atividade de PP1 ensaiada diretamente em seus lisados celulares (Tung *et al.*, 1995). Outros estudos mostraram que a superexpressão de *I-2* em drosófila reduz a atividade da PP1 culminando em fenótipos que se assemelham às mutantes com deleção do gene da *PP1c*. A coexpressão da PP1 recupera o organismo de problemas na mitose e no desenvolvimento muscular e até mesmo da letalidade, indicando que o defeito se deve a perda da atividade da PP1 e não diretamente da ação de *I-2* (Bennett *et al.*, 2003). A importância da PP1c na viabilidade celular também foi verificada em *D. discoideum*, uma vez que não foi possível até o momento o isolamento de linhagens contendo este gene nocauteado (Andrioli *et al.*, 2003).

Ddl-2 recombinante foi capaz de inibir a atividade de fosforilase fosfatase das PP1c recombinantes de *D. discoideum* e *N. crassa* de modo relativamente semelhante, ainda que DdPP1cF269C e NcPP1c tenham apresentado 50% de sua atividade inibida por concentrações ligeiramente maiores de Ddl-2. O efeito inibitório de Ddl-2 parece ser mais efetivo quando o alvo é a DdPP1c do que sobre a DdPP1cF269C. Apesar de diferir em apenas um aminoácido, DdPP1cF269C apresenta maior estabilidade, maior atividade de fosforilase fosfatase e maior sensibilidade frente ao inibidor caliculina A que DdPP1c (Andrioli *et al.*, 2003). Estas diferenças são decorrentes da substituição na proteína selvagem de um resíduo conservado numa região importante da estrutura tridimensional da PP1c, a alça $\beta 12$ - $\beta 13$. Análises genéticas e estudos de mutagênese indicam que a alça $\beta 12$ - $\beta 13$ é essencial na associação da PP1c tanto com toxinas como com inibidores (Connor *et al.*, 1999). Portanto, esta substituição (Cys→Phe na proteína selvagem) poderia afetar, ainda que de forma sutil, a inibição da DdPP1c pelo Ddl-2. Entretanto, experimentos adicionais serão necessários para precisar comparativamente a sensibilidade da DdPP1c selvagem e mutante frente a inibição por Ddl-2.

Ddl-2 não apresenta um poder de inibição de DdPP1c tão forte se comparado ao I-2 de metazoários. Em mamíferos e drosófila, os respectivos I-2 apresentam IC₅₀ entre 1-1,5nM de inibição das PP1c correspondentes (Helps *et al.*, 1994; Osawa *et al.*, 1996; Helps & Cohen, 1999; Yang *et al.*, 2000). Já em relação a outros microorganismos, Ddl-2 apresenta IC₅₀ mais próximo uma vez que o IC₅₀ de INc-1 de *Neurospora crassa* equivale a ~11nM (Beton, 2004), enquanto que Glc8 de *S. cerevisiae* apresenta IC₅₀ de 130nM (Tung *et al.*, 1995).

Ddl-2 não apresenta a região 4 descrita no I-2 de mamífero (Figura 4). Esta região está localizada na extremidade carboxila do inibidor sendo formada por resíduos ácidos, apesar de sua seqüência exata ser desconhecida, e está relacionada à atividade do inibidor (Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). Uma possibilidade é que a ausência desta seqüência seja a responsável pelo comprometimento da atividade inibidora de Ddl-2. Todavia, INc-1 e Glc8 possuem a região 4 em suas seqüências protéicas e mesmo assim não são inibidores potentes como os de mamíferos e drosófila. Pode ser que, em *D. discoideum*, esta seqüência esteja localizada em outra região do inibidor. Uma forte candidata é a seqüência de resíduos acídicos localizados anteriormente a região 3 e bastante semelhante a região 4 de outros I-2 (identidade de 70%). Isto explicaria o IC₅₀ observado para Ddl-2 ser maior do que o observado para *S. cerevisiae* que contém todas as regiões conservadas.

É conhecido que inibidor-2 de coelho é capaz inibir a proteína Glc7p de levedura com a mesma potência que inibe a PP1c de coelho (Tung *et al.*, 1995). Além disso, I-2 de mamíferos também inibe a PP1c de *N. crassa* (Zapella, 2001) enquanto que o INc-1 (ortólogo de I-2) deste fungo também inibe a PP1c de mamíferos (Zapella *et al.*, 1996). Neste trabalho demonstramos que o INc-1 recombinante também inibe a atividade de PP1c de *Dictyostelium*. Nossos estudos mostraram que a concentração de 300nM de INc-1 reduziu a atividade da DdPP1c para 16% e da DdPP1cF269C para 10%. Mais uma vez o perfil de inibição da DdPP1c selvagem e mutante foi semelhante.

Além de serem inibidas *in vitro* por Ddl-2 recombinante, as três PP1c testadas (de *D. discoideum* e de *N. crassa*) interagiram com Ddl-2 de maneira semelhante *in vivo* em ensaios de duplo-híbrido em leveduras. Por outro lado, em ensaios similares o inibidor de *N. crassa* INc-1 ou INc-1L não apresentou interação consistente com as DdPP1c e DdPP1cF269C de *D. discoideum*. Esta observação contrasta com os

dados de que o inibidor de *N. crassa* recombinante inibiu com bastante eficiência a PP1c de *D. discoideum*.

Outro aspecto abordado neste trabalho foi o estudo do envolvimento das diferentes regiões conservadas de Ddl-2 na interação com a DdPP1c. Para tanto, nos baseamos em estudos que propuseram que a interação de subunidades reguladoras com a PP1c envolve múltiplos contatos. Dentre eles, o motivo consenso denominado RVXF é encontrado em muitas destas subunidades (Beullens *et al.*, 1999; Bollen, 2001; Schillace *et al.*, 2001). No I-2 de mamíferos, já foram identificadas pelo menos cinco regiões conservadas sugeridas como importantes para a interação e inibição da PP1. A conformação estendida desta proteína possibilitaria sua interação com a subunidade catalítica da PP1 através de múltiplos contatos (Helps & Cohen, 1999; Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000).

A região 1 localizada na extremidade amino-terminal do I-2 de mamíferos foi proposta como essencial para interação, mas não para inibição (Helps & Cohen, 1999; Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). Ela contém a sequência KGILK capaz de substituir funcionalmente o motivo consenso RVXF presente em outras subunidades moduladoras (Wakula *et al.*, 2003). A região 5 inclui o resíduo Trp46 que quando mutado provocou um drástico aumento do IC₅₀ de I-2. A região 2 contém o resíduo fosforilado pela GSK3 que é fundamental no processo de reativação da PP1c quando complexada a I-2. Esta região, além de ancorar I-2 na PP1c, também forma uma alça, que não estabelece contato físico com a PP1c no complexo PP1I, mas bloqueia o acesso de substratos ao sítio catalítico da PP1c (Helps & Cohen, 1999; Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000).

A interação entre a DdPP1c e o inibidor Ddl-2 selvagem e mutantes (Ddl-2¹⁻¹¹¹, Ddl-2¹⁻¹²⁰, Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ e Ddl-2¹⁷³⁻²⁶¹) foi investigada através de ensaios de duplo-híbrido e mostrou que apenas o mutante Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ que contém as regiões 1,5 e 2 exibe interação com a DdPP1c. Mutantes que contém apenas a região 1 (Ddl-2¹⁻¹¹¹) ou as regiões 1 e 5 (Ddl-2¹⁻¹²⁰) não interagiram com a DdPP1c. Aparentemente, a região 2 devolveu a capacidade do inibidor interagir com a PP1c indicando que esta sequência poderia ser essencial para a interação destas duas proteínas. Estudos anteriores mostraram que mutantes do I-2 de coelho contendo estas três regiões também formaram complexo com a PP1 (Park & DePaoli-Roach, 1994). Por outro lado, outros estudos indicaram que mutantes contendo as regiões 1, 5 e 2 perdem a capacidade de ligarem-se a PP1c (Huang *et al.*, 1999). Contudo, mutantes contendo

apenas as regiões 1 e 5 foram capazes de formar complexo com a PP1 *in vitro* diferindo do que acontece com Ddl-2 *in vivo* (Yang *et al.*, 2000). É possível que a presença da região 2 no mutante Ddl-2¹⁻¹⁵⁰, em adição as regiões 1 e 5 tenha recuperado a capacidade do inibidor interagir com a fosfatase já que postula-se que a soma de todas as regiões seja a responsável pela integridade da interação entre I-2 e PP1 (Yang *et al.*, 2000).

Outro aspecto interessante revelado em nosso trabalho, foi que a porção carbóxi-terminal de Ddl-2 não se revelou essencial para a ocorrência de interação com a DdPP1c. Estas observações coincidem com o que foi verificado para o mutante correspondente em coelhos (Huang *et al.*, 1999). Além disso, dados recentes descartam a hipótese de que o motivo KLHY da região 3 seria equivalente ao motivo RVXF (Yang *et al.*, 2000). Como já mencionado, o motivo KGILK (na região 1 de I-2) é capaz de substituir o motivo RVXF, ainda que suas seqüências não sejam similares (Wakula *et al.*, 2003). Deste modo, a região 1 é que teria como função ancorar o I-2 na PP1 e como consequência promover a interação de sítios secundários. Vale ressaltar, todavia, que a interação do mutante Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ foi um pouco mais fraca quando comparada com o Ddl-2 selvagem, indicando que sua porção carbóxi-terminal deve ter alguma contribuição na interação, ainda que não essencial.

Para investigarmos a contribuição da região 2 na interação de Ddl-2 com a DdPP1c, avaliamos o mutante (Ddl-2^{Δ134-143}) onde apenas a seqüência de 30 nucleotídeos relativa a esta região foi deletada. A interação avaliada nos ensaios de duplo-híbrido mostrou que a ausência da região 2 não impediu a interação de Ddl-2 com a PP1. Estes dados sugerem que a região 2 não é essencial na interação, quando as demais (1, 5 e 3) estão mantidas em Ddl-2. Por outro lado, podemos especular que a região que devolveu a capacidade do mutante Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ interagir com a PP1 seria uma seqüência localizada entre as regiões 5 e 2, que corresponderia a um novo sítio de interação. A quantificação da atividade de *lacZ* destes mutantes mostrou que Ddl-2^{Δ134-143} apresentou uma atividade 15% maior que Ddl-2¹⁻¹⁵⁰ porém 15% menor que Ddl-2 selvagem sugerindo que a força da interação é proporcional ao número de regiões ou motivos presentes nestas proteínas.

Dentre os possíveis papéis fisiológicos do I-2 está a associação com a PP1c de forma a prevenir a desfosforilação inapropriada de alvos não fisiológicos (Shenolikar, 1995; Bollen, 2001; Cohen, 2002). Estudos têm mostrado que I-2

também pode agir como chaperonina uma vez que a PP1c recombinante associada a este inibidor forma um complexo inativo que pode ser reativado pela fosforilação de I-2 pela quinase GSK3 no resíduo Thr72. Este evento faz com que a PP1 recombinante passe a possuir as mesmas propriedades da enzima nativa, inclusive a independência de Mn^{2+} , o que sugere que I-2 seja importante para o enovelamento correto da PP1c (Hemmings *et al.*, 1982; Alessi *et al.*, 1993; MacKintosh *et al.*, 1996). Além disso, é sabido que proteínas da família da proteína quinase dependente de ciclina, Cdk5, podem mediar a fosforilação deste inibidor (Agarwal-Mawal & Paudel, 2001; Tan *et al.*, 2003) em concordância com observações que indicam que mudanças na fosforilação de I-2 estão envolvidas na redistribuição intracelular da proteína durante o ciclo celular (Brautigan *et al.*, 1990; Kakinoki *et al.*, 1997).

A localização nuclear de I-2 que ocorre no ciclo celular, depende de uma seqüência de aminoácidos básicos localizada entre os resíduos 134-147 do I-2, que funciona como NLS. Mutações nas lisinas 143 e 145 aboliram a localização nuclear de I-2 durante a fase S (Brautigan *et al.*, 1990; Kakinoki *et al.*, 1997). Assim, I-2 teria dois domínios separados que controlam sua localização no núcleo (NLS) ou no citoplasma. O fato do tamanho de I-2 (~23kD) permitir que ele entre no núcleo por difusão passiva levou ao surgimento de uma hipótese que propõem que I-2 deve existir na célula como parte de um complexo protéico e a NLS seja responsável por mediar a translocação nuclear do complexo inteiro. E ainda, I-2 transportaria a PP1 para o núcleo de células em baixa densidade para alterar a transcrição gênica através da desfosforilação de alguns fatores de transcrição (Leach *et al.*, 2002). Um exemplo deste controle exercido por I-2 consiste na regulação do complexo Nek2-PP1 e separação dos centrôssomos na célula (Eto *et al.*, 2002). Fosforilação de I-2 na Thr72 durante a mitose tem um papel importante na separação dos centrôssomos e talvez em outros eventos deste estágio crítico da divisão celular de mamíferos (Leach *et al.*, 2003).

A pesquisa por sítios de fosforilação e motivos NLS na seqüência de Ddl-2, utilizando-se programas computacionais NetPhos 2.0 e Pfam (Blom *et al.*, 1999; Bateman *et al.*, 2004) indicou que a Thr141 que está localizada na região 2 de Ddl-2 pode corresponder a um provável sítio de fosforilação e que uma possível NLS parece estar localizada nos resíduos 230-240. Neste sentido, seria interessante que

experimentos futuros abordem se Ddl-2 também está envolvido em eventos tão importantes como ciclo e divisão celular na ameba *D. discoideum*.

6. Bibliografia

- Adler, K., Gerisch, G., von Hugo, U., Lupas, A. & Schweiger, A. (1996) Classification of tyrosine kinases from *Dictyostelium discoideum* with two distinct, complete or incomplete catalytic domains. *FEBS Lett*, **395**, 286-292.
- Agarwal-Mawal, A. & Paudel, H.K. (2001) Neuronal Cdc2-like protein kinase (Cdk5/p25) is associated with protein phosphatase 1 and phosphorylates inhibitor-2. *J Biol Chem*, **276**, 23712-23718.
- Aggen, J.B., Nairn, A.C. & Chamberlin, R. (2000) Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol*, **7**, R13-23.
- Aitken, A., Bilham, T. & Cohen, P. (1982) Complete primary structure of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **126**, 235-246.
- Ajuh, P.M., Browne, G.J., Hawkes, N.A., Cohen, P.T., Roberts, S.G. & Lamond, A.I. (2000) Association of a protein phosphatase 1 activity with the human factor C1 (HCF) complex. *Nucleic Acids Res*, **28**, 678-686.
- Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M. & Cohen, P. (1992) The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem*, **210**, 1023-1035.
- Alessi, D.R., Street, A.J., Cohen, P. & Cohen, P.T. (1993) Inhibitor-2 functions like a chaperone to fold three expressed isoforms of mammalian protein phosphatase-1 into a conformation with the specificity and regulatory properties of the native enzyme. *Eur J Biochem*, **213**, 1055-1066.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. & Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, **117**, 699-711.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Andrioli, L.P., Zaini, P.A., Viviani, W. & Da Silva, A.M. (2003) *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase-1 catalytic subunit exhibits distinct biochemical properties. *Biochem J*, **373**, 703-711.
- Araki, T., Tsujioka, M., Abe, T., Fukuzawa, M., Meima, M., Schaap, P., Morio, T., Urushihara, H., Katoh, M., Maeda, M., Tanaka, Y., Takeuchi, I. & Williams, J.G. (2003) A STAT-regulated, stress-induced signalling pathway in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*, **116**, 2907-2915.

- Aubry, L. & Firtel, R. (1999) Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 469-517.
- Aubry, L. & Firtel, R.A. (1998) Spalten, a protein containing Galpha-protein-like and PP2C domains, is essential for cell-type differentiation in *Dictyostelium*. *Genes Dev*, **12**, 1525-1538.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Axton, J.M., Dombradi, V., Cohen, P.T. & Glover, D.M. (1990) One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell*, **63**, 33-46.
- Ayllon, V., Cayla, X., Garcia, A., Fleischer, A. & Rebollo, A. (2002) The anti-apoptotic molecules Bcl-xL and Bcl-w target protein phosphatase 1alpha to Bad. *Eur J Immunol*, **32**, 1847-1855.
- Ayllon, V., Cayla, X., Garcia, A., Roncal, F., Fernandez, R., Albar, J.P., Martinez, C. & Rebollo, A. (2001) Bcl-2 targets protein phosphatase 1 alpha to Bad. *J Immunol*, **166**, 7345-7352.
- Ayllon, V., Martinez, A.C., Garcia, A., Cayla, X. & Rebollo, A. (2000) Protein phosphatase 1alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *Embo J*, **19**, 2237-2246.
- Bagu, J.R., Sykes, B.D., Craig, M.M. & Holmes, C.F. (1997) A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1. Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A. *J Biol Chem*, **272**, 5087-5097.
- Baker, S.H., Frederick, D.L., Bloecher, A. & Tatchell, K. (1997) Alanine-scanning mutagenesis of protein phosphatase type 1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **145**, 615-626.
- Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I. & Doolittle, W.F. (2000) A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, **290**, 972-977.
- Barford, D. (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci*, **21**, 407-412.
- Barford, D. & Keller, J.C. (1994) Co-crystallization of the catalytic subunit of the serine/threonine specific protein phosphatase 1 from human in complex with microcystin LR. *J Mol Biol*, **235**, 763-766.
- Barker, H.M., Brewis, N.D., Street, A.J., Spurr, N.K. & Cohen, P.T. (1994) Three genes for protein phosphatase 1 map to different human chromosomes: sequence, expression and gene localisation of protein serine/threonine phosphatase 1 beta (PPP1CB). *Biochim Biophys Acta*, **1220**, 212-218.

- Barroso, A.S. (1996) Purificação e caracterização da subunidade catalítica da proteína fosfatase 2A de *Dictyostelium discoideum*. Departamento de Bioquímica. USP, São Paulo.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. & Fields, S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, **14**, 920-924.
- Barton, G.J., Cohen, P.T. & Barford, D. (1994) Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur J Biochem*, **220**, 225-237.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., Studholme, D.J., Yeats, C. & Eddy, S.R. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, **32 Database issue**, D138-141.
- Bennett, D., Szoor, B. & Alpey, L. (1999) The chaperone-like properties of mammalian inhibitor-2 are conserved in a *Drosophila* homologue. *Biochemistry*, **38**, 16276-16282.
- Bennett, D., Szoor, B., Gross, S., Vereshchagina, N. & Alpey, L. (2003) Ectopic expression of inhibitors of protein phosphatase type 1 (PP1) can be used to analyze roles of PP1 in *Drosophila* development. *Genetics*, **164**, 235-245.
- Berndt, N. (1999) Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number. *Front Biosci*, **4**, D22-42.
- Berndt, N., Dohadwala, M. & Liu, C.W. (1997) Constitutively active protein phosphatase 1alpha causes Rb-dependent G1 arrest in human cancer cells. *Curr Biol*, **7**, 375-386.
- Beton, D. (2004) Caracterização Molecular de INc-1, um inibidor da proteína fosfatase do tipo 1 de *Neurospora crassa*. Departamento de Bioquímica. USP, São Paulo.
- Beullens, M. & Bollen, M. (2002) The protein phosphatase-1 regulator NIPP1 is also a splicing factor involved in a late step of spliceosome assembly. *J Biol Chem*, **277**, 19855-19860.
- Beullens, M., Stalmans, W. & Bollen, M. (1996) Characterization of a ribosomal inhibitory polypeptide of protein phosphatase-1 from rat liver. *Eur J Biochem*, **239**, 183-189.
- Beullens, M., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Connor, J., Shenolikar, S., Stalmans, W. & Bollen, M. (1999) Molecular determinants of nuclear protein phosphatase-1 regulation by NIPP-1. *J Biol Chem*, **274**, 14053-14061.
- Beullens, M., Vulsteke, V., Van Eynde, A., Jagiello, I., Stalmans, W. & Bollen, M. (2000) The C-terminus of NIPP1 (nuclear inhibitor of protein phosphatase-1) contains a novel binding site for protein phosphatase-1 that is controlled by tyrosine phosphorylation and RNA binding. *Biochem J*, **352 Pt 3**, 651-658.

- Bibb, J.A., Nishi, A., O'Callaghan, J.P., Ule, J., Lan, M., Snyder, G.L., Horiuchi, A., Saito, T., Hisanaga, S., Czernik, A.J., Nairn, A.C. & Greengard, P. (2001) Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by Cdk5. *J Biol Chem*, **276**, 14490-14497.
- Bibb, J.A., Snyder, G.L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A.A., Tsai, L.H., Kwon, Y.T., Girault, J.A., Czernik, A.J., Huganir, R.L., Hemmings, H.C., Jr., Nairn, A.C. & Greengard, P. (1999) Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*, **402**, 669-671.
- Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*, **294**, 1351-1362.
- Bollen, M. (2001) Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci*, **26**, 426-431.
- Bollen, M., Keppens, S. & Stalmans, W. (1998) Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J*, **336** (Pt 1), 19-31.
- Bollen, M. & Stalmans, W. (1992) The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **27**, 227-281.
- Boudrez, A., Beullens, M., Groenen, P., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Jagiello, I., Murray, M., Krainer, A.R., Stalmans, W. & Bollen, M. (2000) NIPP1-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry. *J Biol Chem*, **275**, 25411-25417.
- Boudrez, A., Beullens, M., Waelkens, E., Stalmans, W. & Bollen, M. (2002) Phosphorylation-dependent interaction between the splicing factors SAP155 and NIPP1. *J Biol Chem*, **277**, 31834-31841.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brautigan, D.L., Sunwoo, J., Labbe, J.C., Fernandez, A. & Lamb, N.J. (1990) Cell cycle oscillation of phosphatase inhibitor-2 in rat fibroblasts coincident with p34cdc2 restriction. *Nature*, **344**, 74-78.
- Brichese, L., Cazettes, G. & Valette, A. (2004) JNK is Associated with Bcl-2 and PP1 in Mitochondria: Paclitaxel Induces Its Activation and Its Association with the Phosphorylated Form of Bcl-2. *Cell Cycle*, **3**.
- Brichese, L. & Valette, A. (2002) PP1 phosphatase is involved in Bcl-2 dephosphorylation after prolonged mitotic arrest induced by paclitaxel. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 504-508.
- Burnett, G. & Kennedy, E.P. (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem*, **211**, 969-980.

- Burnett, P.E., Blackshaw, S., Lai, M.M., Qureshi, I.A., Burnett, A.F., Sabatini, D.M. & Snyder, S.H. (1998) Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8351-8356.
- Campos, M., Fadden, P., Alms, G., Qian, Z. & Haystead, T.A. (1996) Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography. *J Biol Chem*, **271**, 28478-28484.
- Carr, A.N., Schmidt, A.G., Suzuki, Y., del Monte, F., Sato, Y., Lanner, C., Breeden, K., Jing, S.L., Allen, P.B., Greengard, P., Yatani, A., Hoit, B.D., Grupp, I.L., Hajjar, R.J., DePaoli-Roach, A.A. & Kranias, E.G. (2002) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol*, **22**, 4124-4135.
- Ceulemans, H. & Bollen, M. (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev*, **84**, 1-39.
- Ceulemans, H., Stalmans, W. & Bollen, M. (2002) Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays*, **24**, 371-381.
- Chen, Y.H., Chen, M.X., Alessi, D.R., Campbell, D.G., Shanahan, C., Cohen, P. & Cohen, P.T. (1994) Molecular cloning of cDNA encoding the 110 kDa and 21 kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett*, **356**, 51-55.
- Cheng, C., Huang, D. & Roach, P.J. (1997) Yeast PIG genes: PIG1 encodes a putative type 1 phosphatase subunit that interacts with the yeast glycogen synthase Gsy2p. *Yeast*, **13**, 1-8.
- Chu, Y., Lee, E.Y. & Schlender, K.K. (1996) Activation of protein phosphatase 1. Formation of a metalloenzyme. *J Biol Chem*, **271**, 2574-2577.
- Chyan, C.L., Tang, T.C., Chen, Y., Liu, H., Lin, F.M., Liu, C.K., Hsieh, M.J., Shiao, M.S., Huang, H. & Lin, T.H. (2001) Letter to the editor: backbone 1H, 15N, and 13C resonance assignments of inhibitor-1--a protein inhibitor of protein phosphatase-1. *J Biomol NMR*, **21**, 287-288.
- Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem*, **58**, 453-508.
- Cohen, P., Klumpp, S. & Schelling, D.L. (1989) An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett*, **250**, 596-600.
- Cohen, P.T. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci*, **22**, 245-251.
- Cohen, P.T. (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci*, **115**, 241-256.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. & Wingfield, P.T. (1995) *Current protocols in protein science*. John Wiley & Sons, Inc.

- Connor, J.H., Frederick, D., Huang, H., Yang, J., Helps, N.R., Cohen, P.T., Nairn, A.C., DePaoli-Roach, A., Tatchell, K. & Shenolikar, S. (2000) Cellular mechanisms regulating protein phosphatase-1. A key functional interaction between inhibitor-2 and the type 1 protein phosphatase catalytic subunit. *J Biol Chem*, **275**, 18670-18675.
- Connor, J.H., Kleeman, T., Barik, S., Honkanen, R.E. & Shenolikar, S. (1999) Importance of the beta12-beta13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors. *J Biol Chem*, **274**, 22366-22372.
- Connor, J.H., Weiser, D.C., Li, S., Hallenbeck, J.M. & Shenolikar, S. (2001) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol*, **21**, 6841-6850.
- Corbin, J.D., Reimann, E.M., Walsh, D.A. & Krebs, E.G. (1970) Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle cyclic adenosine 3',5'- monophosphate-stimulated protein kinase. *J Biol Chem*, **245**, 4849-4851.
- Crouch, M.F. (1997) Regulation of thrombin-induced stress fibre formation in Swiss 3T3 cells by the 70-kDa S6 kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 193-199.
- Dammann, H., Hellstern, S., Husain, Q. & Mutzel, R. (1996) Primary structure, expression and developmental regulation of a *Dictyostelium* calcineurin A homologue. *Eur J Biochem*, **238**, 391-399.
- Darnell, J.E., Jr., Lodish, H. & Baltimore, D. (1990) *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Inc., New York.
- da-Silva, A.M., Zapella, P.D., Andrioli, L.P., Campanha, R.B., Fiorini, L.C., Etchebehere, L.C., da-Costa-Maia, J.C. & Terenzi, H.F. (1999) Searching for the role of protein phosphatases in eukaryotic microorganisms. *Braz J Med Biol Res*, **32**, 835-839.
- de la Barre, A.E., Angelov, D., Molla, A. & Dimitrov, S. (2001) The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *Embo J*, **20**, 6383-6393.
- Delibegovic, M., Armstrong, C.G., Dobbie, L., Watt, P.W., Smith, A.J. & Cohen, P.T. (2003) Disruption of the striated muscle glycogen targeting subunit PPP1R3A of protein phosphatase 1 leads to increased weight gain, fat deposition, and development of insulin resistance. *Diabetes*, **52**, 596-604.
- DePaoli-Roach, A.A. (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *J Biol Chem*, **259**, 12144-12152.
- Desdouits, F., Siciliano, J.C., Greengard, P. & Girault, J.A. (1995) Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein DARPP-32: phosphorylation of Ser-137 by casein kinase I inhibits dephosphorylation of Thr-34 by calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2682-2685.

- Devreotes, P. (1989) *Dictyostelium discoideum*: a model system for cell-cell interactions in development. *Science*, **245**, 1054-1058.
- Doonan, J.H. & Morris, N.R. (1989) The bimG gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell*, **57**, 987-996.
- Dorywalska, M., Coukell, B. & Dharamsi, A. (2000) Characterization and heterologous expression of cDNAs encoding two novel closely related Ca(2+)-binding proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta*, **1496**, 356-361.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. & Elledge, S.J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev*, **7**, 555-569.
- Egelhoff, T.T., Brown, S.S. & Spudich, J.A. (1991) Spatial and temporal control of nonmuscle myosin localization: identification of a domain that is necessary for myosin filament disassembly in vivo. *J Cell Biol*, **112**, 677-688.
- Egloff, M.P., Cohen, P.T., Reinemer, P. & Barford, D. (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol*, **254**, 942-959.
- Egloff, M.P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P.T., Cohen, P. & Barford, D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J*, **16**, 1876-1887.
- Eichinger, L., Lee, S.S. & Schleicher, M. (1999) *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech*, **47**, 124-134.
- Endo, S., Zhou, X., Connor, J., Wang, B. & Shenolikar, S. (1996) Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry*, **35**, 5220-5228.
- England, P.J. (1975) Correlation between contraction and phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin in perfused rat heart. *FEBS Lett*, **50**, 57-60.
- Erdodi, F., Kiss, E., Walsh, M.P., Stefansson, B., Deng, J.T., Eto, M., Brautigan, D.L. & Hartshorne, D.J. (2003) Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 382-387.
- Esposito, F., Russo, L., Russo, T. & Cimino, F. (2000) Retinoblastoma protein dephosphorylation is an early event of cellular response to prooxidant conditions. *FEBS Lett*, **470**, 211-215.
- Etchebehere, L.C., Simon, M.N., Campanha, R.B., Zapella, P.D., Veron, M. & Maia, J.C. (1993) Developmental regulation of hexosamine biosynthesis by protein phosphatases 2A and 2C in *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol*, **175**, 5022-5027.

- Eto, M., Elliott, E., Prickett, T.D. & Brautigan, D.L. (2002) Inhibitor-2 regulates protein phosphatase-1 complexed with NimA-related kinase to induce centrosome separation. *J Biol Chem*, **277**, 44013-44020.
- Eto, M., Kitazawa, T. & Brautigan, D.L. (2004) Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8888-8893.
- Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K. & Morita, F. (1995) A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem (Tokyo)*, **118**, 1104-1107.
- Eto, M., Senba, S., Morita, F. & Yazawa, M. (1997) Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Lett*, **410**, 356-360.
- Faux, M.C. & Scott, J.D. (1996) More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem Sci*, **21**, 312-315.
- Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D.J. & Nakano, T. (1999) Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **274**, 37385-37390.
- Feng, J., Yan, Z., Ferreira, A., Tomizawa, K., Liau, J.A., Zhuo, M., Allen, P.B., Ouimet, C.C. & Greengard, P. (2000) Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9287-9292.
- Fields, A.P. & Thompson, L.J. (1995) The regulation of mitotic nuclear envelope breakdown: a role for multiple lamin kinases. *Prog Cell Cycle Res*, **1**, 271-286.
- Fields, S. & Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Fields, S. & Sternglanz, R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*, **10**, 286-292.
- Fiorini, L.C. (2003) Identificação de genes codificadores de serina/treonina fosfatases em *Dictyostelium discoideum* e caracterização funcional da proteína fosfatase do tipo 4 (PP4). *Departamento de Bioquímica*. USP, São Paulo.
- Firtel, R.A. (1995) Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. *Genes Dev*, **9**, 1427-1444.
- Firtel, R.A. & Bonner, J. (1972) Characterization of the genome of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J Mol Biol*, **66**, 339-361.
- Fischer, E.H., Graves, D.J., Crittenden, E.R. & Krebs, E.G. (1959) Structure of the site phosphorylated in the phosphorylase b to a reaction. *J Biol Chem*, **234**, 1698-1704.
- Fischer, E.H. & Krebs, E.G. (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem*, **216**, 121-132.

- Foulkes, J.G. & Cohen, P. (1980) The regulation of glycogen metabolism. Purification and properties of protein phosphatase inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **105**, 195-203.
- Foulkes, J.G., Strada, S.J., Henderson, P.J. & Cohen, P. (1983) A kinetic analysis of the effects of inhibitor-1 and inhibitor-2 on the activity of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem*, **132**, 309-313.
- Fresu, M., Bianchi, M., Parsons, J.T. & Villa-Moruzzi, E. (2001) Cell-cycle-dependent association of protein phosphatase 1 and focal adhesion kinase. *Biochem J*, **358**, 407-414.
- Fukuzawa, M., Araki, T., Adrian, I. & Williams, J.G. (2001) Tyrosine phosphorylation-independent nuclear translocation of a dictyostelium STAT in response to DIF signaling. *Mol Cell*, **7**, 779-788.
- Gamper, M., Howard, P.K., Hunter, T. & Firtel, R.A. (1996) Multiple roles of the novel protein tyrosine phosphatase PTP3 during *Dictyostelium* growth and development. *Mol Cell Biol*, **16**, 2431-2444.
- Garcia, A., Cayla, X., Guernon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M.P., Fleischer, A. & Rebollo, A. (2003) Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie*, **85**, 721-726.
- Gauss, C.M., Sheppeck, J.E., 2nd, Nairn, A.C. & Chamberlin, R. (1997) A molecular modeling analysis of the binding interactions between the okadaic acid class of natural product inhibitors and the Ser-Thr phosphatases, PP1 and PP2A. *Bioorg Med Chem*, **5**, 1751-1773.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D. & Mansuy, I.M. (2002) Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, **418**, 970-975.
- Giet, R. & Glover, D.M. (2001) *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol*, **152**, 669-682.
- Ginger, R.S., Dalton, E.C., Ryves, W.J., Fukuzawa, M., Williams, J.G. & Harwood, A.J. (2000) Glycogen synthase kinase-3 enhances nuclear export of a *Dictyostelium* STAT protein. *Embo J*, **19**, 5483-5491.
- Glockner, G., Eichinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J.A., Bankier, A.T., Dear, P.H., Lehmann, R., Baumgart, C., Parra, G., Abril, J.F., Guigo, R., Kumpf, K., Tunggal, B., Cox, E., Quail, M.A., Platzer, M., Rosenthal, A. & Noegel, A.A. (2002) Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **418**, 79-85.

- Goldberg, J., Huang, H.B., Kwon, Y.G., Greengard, P., Nairn, A.C. & Kuriyan, J. (1995) Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*, **376**, 745-753.
- Goldberg, Y. (1999) Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem Pharmacol*, **57**, 321-328.
- Greengard, P., Allen, P.B. & Nairn, A.C. (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron*, **23**, 435-447.
- Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K. & Navia, M.A. (1995) X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, **82**, 507-522.
- Gross, J.D. (1994) Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiol Rev*, **58**, 330-351.
- Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S. & Montminy, M. (1992) Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell*, **70**, 105-113.
- Hanks, S.K. & Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J*, **9**, 576-596.
- Hanks, S.K. & Quinn, A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol*, **200**, 38-62.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Hellstern, S., Dammann, H., Husain, Q. & Mutzel, R. (1997) Overexpression, purification and characterization of *Dictyostelium* calcineurin A. *Res Microbiol*, **148**, 335-343.
- Helps, N.R., Barker, H.M., Elledge, S.J. & Cohen, P.T. (1995) Protein phosphatase 1 interacts with p53BP2, a protein which binds to the tumour suppressor p53. *FEBS Lett*, **377**, 295-300.
- Helps, N.R. & Cohen, P.T. (1999) *Drosophila melanogaster* protein phosphatase inhibitor-2: identification of a site important for PP1 inhibition. *FEBS Lett*, **463**, 72-76.
- Helps, N.R., Luo, X., Barker, H.M. & Cohen, P.T. (2000) NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J*, **349**, 509-518.

- Helps, N.R., Street, A.J., Elledge, S.J. & Cohen, P.T. (1994) Cloning of the complete coding region for human protein phosphatase inhibitor 2 using the two hybrid system and expression of inhibitor 2 in *E. coli*. *FEBS Lett*, **340**, 93-98.
- Helps, N.R., Vergidou, C., Gaskell, T. & Cohen, P.T. (1998) Characterisation of a novel *Drosophila melanogaster* testis specific PP1 inhibitor related to mammalian inhibitor-2: identification of the site of interaction with PP1. *FEBS Lett*, **438**, 131-136.
- Hemmings, B.A., Resink, T.J. & Cohen, P. (1982) Reconstitution of a Mg-ATP-dependent protein phosphatase and its activation through a phosphorylation mechanism. *FEBS Lett*, **150**, 319-324.
- Hemmings, H.C., Jr., Girault, J.A., Nairn, A.C., Bertuzzi, G. & Greengard, P. (1992) Distribution of protein phosphatase inhibitor-1 in brain and peripheral tissues of various species: comparison with DARPP-32. *J Neurochem*, **59**, 1053-1061.
- Hemmings, H.C., Jr., Nairn, A.C., Elliott, J.I. & Greengard, P. (1990) Synthetic peptide analogs of DARPP-32 (Mr 32,000 dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein), an inhibitor of protein phosphatase-1. Phosphorylation, dephosphorylation, and inhibitory activity. *J Biol Chem*, **265**, 20369-20376.
- Higgins, D.G. (1994) CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. *Methods Mol Biol*, **25**, 307-318.
- Hirano, K., Erdodi, F., Patton, J.G. & Hartshorne, D.J. (1996) Interaction of protein phosphatase type 1 with a splicing factor. *FEBS Lett*, **389**, 191-194.
- Hirano, K., Ito, M. & Hartshorne, D.J. (1995) Interaction of the ribosomal protein, L5, with protein phosphatase type 1. *J Biol Chem*, **270**, 19786-19790.
- Hiroi, N., Fienberg, A.A., Haile, C.N., Alburges, M., Hanson, G.R., Greengard, P. & Nestler, E.J. (1999) Neuronal and behavioural abnormalities in striatal function in DARPP-32-mutant mice. *Eur J Neurosci*, **11**, 1114-1118.
- Holmes, C.F., Campbell, D.G., Caudwell, F.B., Aitken, A. & Cohen, P. (1986) The protein phosphatases involved in cellular regulation. Primary structure of inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **155**, 173-182.
- Holmes, C.F., Tonks, N.K., Major, H. & Cohen, P. (1987) Analysis of the in vivo phosphorylation state of protein phosphatase inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle by fast-atom bombardment mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, **929**, 208-219.
- Horn, F. & Gross, J. (1996) A role for calcineurin in *Dictyostelium discoideum* development. *Differentiation*, **60**, 269-275.
- Howard, P.K., Gamper, M., Hunter, T. & Firtel, R.A. (1994) Regulation by protein-tyrosine phosphatase PTP2 is distinct from that by PTP1 during *Dictyostelium* growth and development. *Mol Cell Biol*, **14**, 5154-5164.

- Howard, P.K., Sefton, B.M. & Firtel, R.A. (1992) Analysis of a spatially regulated phosphotyrosine phosphatase identifies tyrosine phosphorylation as a key regulatory pathway in *Dictyostelium*. *Cell*, **71**, 637-647.
- Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. & Allis, C.D. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.
- Huang, F.L. & Glinsmann, W.H. (1976) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **70**, 419-426.
- Huang, H.B., Chen, Y.C., Tsai, L.H., Wang, H., Lin, F.M., Horiuchi, A., Greengard, P., Nairn, A.C., Shiao, M.S. & Lin, T.H. (2000) Backbone ¹H, ¹⁵N, and ¹³C resonance assignments of inhibitor-2 -- a protein inhibitor of protein phosphatase-1. *J Biomol NMR*, **17**, 359-360.
- Huang, H.B., Horiuchi, A., Watanabe, T., Shih, S.R., Tsay, H.J., Li, H.C., Greengard, P. & Nairn, A.C. (1999) Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem*, **274**, 7870-7878.
- Huang, K.X. & Paudel, H.K. (2000) Ser67-phosphorylated inhibitor 1 is a potent protein phosphatase 1 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5824-5829.
- Huang, Z., Somanath, P., Chakrabarti, R., Eddy, E.M. & Vijayaraghavan, S. (2004) Changes in Intracellular Distribution and Activity of Protein Phosphatase PP1 γ 2 and Its Regulating Proteins in Spermatozoa Lacking AKAP4. *Biol Reprod*.
- Hubbard, M.J. & Cohen, P. (1989) Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates. *Eur J Biochem*, **186**, 711-716.
- Hubbard, M.J. & Cohen, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci*, **18**, 172-177.
- Hunter, T. (1987) A thousand and one protein kinases. *Cell*, **50**, 823-829.
- Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236.
- Hunter, T. & Plowman, G.D. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci*, **22**, 18-22.
- Ingebritsen, T.S. & Cohen, P. (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem*, **132**, 255-261.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. & Sakaki, Y. (2001a) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4569-4574.

- Ito, T., Chiba, T. & Yoshida, M. (2001b) Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects. *Trends Biotechnol*, **19**, S23-27.
- Ito, T., Ota, K., Kubota, H., Yamaguchi, Y., Chiba, T., Sakuraba, K. & Yoshida, M. (2002) Roles for the two-hybrid system in exploration of the yeast protein interactome. *Mol Cell Proteomics*, **1**, 561-566.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. & Fields, S. (1993) Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, **8**, 1693-1696.
- Jagiello, I., Beullens, M., Vulsteke, V., Wera, S., Sohlberg, B., Stalmans, W., von Gabain, A. & Bollen, M. (1997) NIPP-1, a nuclear inhibitory subunit of protein phosphatase-1, has RNA-binding properties. *J Biol Chem*, **272**, 22067-22071.
- Janssens, V. & Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, **353**, 417-439.
- Jin, Q., Beullens, M., Jagiello, I., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Stalmans, W. & Bollen, M. (1999) Mapping of the RNA-binding and endoribonuclease domains of NIPP1, a nuclear targeting subunit of protein phosphatase 1. *Biochem J*, **342** (Pt 1), 13-19.
- Johnson, D., Cohen, P., Chen, M.X., Chen, Y.H. & Cohen, P.T. (1997) Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. *Eur J Biochem*, **244**, 931-939.
- Johnson, J.D., Snyder, C., Walsh, M. & Flynn, M. (1996) Effects of myosin light chain kinase and peptides on Ca²⁺ exchange with the N- and C-terminal Ca²⁺ binding sites of calmodulin. *J Biol Chem*, **271**, 761-767.
- Jurgensen, S., Shacter, E., Huang, C.Y., Chock, P.B., Yang, S.D., Vandenheede, J.R. & Merlevede, W. (1984) On the mechanism of activation of the ATP X Mg(II)-dependent phosphoprotein phosphatase by kinase FA. *J Biol Chem*, **259**, 5864-5870.
- Kakinoki, Y., Somers, J. & Brautigan, D.L. (1997) Multisite phosphorylation and the nuclear localization of phosphatase inhibitor 2-green fluorescent protein fusion protein during S phase of the cell growth cycle. *J Biol Chem*, **272**, 32308-32314.
- Kay, R.R. & Williams, J.G. (1999) The *Dictyostelium* genome project: an invitation to species hopping. *Trends Genet*, **15**, 294-297.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S. & Gribskov, M. (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **129**, 908-925.
- Kessin, R.H. & Campagne, M.v.L. (1992) The development of a social amoeba. *American Scientist*, **80**, 556-565.
- Kim, L., Liu, J. & Kimmel, A.R. (1999) The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell*, **99**, 399-408.

- Kimmel, A.R. & Parent, C.A. (2003) The signal to move: *D. discoideum* go orienteering. *Science*, **300**, 1525-1527.
- Kita, A., Matsunaga, S., Takai, A., Kataiwa, H., Wakimoto, T., Fusetani, N., Isobe, M. & Miki, K. (2002) Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Structure (Camb)*, **10**, 715-724.
- Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheys, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J. & Laz, T.M. (2002) Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0043.
- Kuspa, A., Dingeramn, T. & Nellen, W. (1995) Analysis of gene function in *Dictyostelium*. *Experientia*, **51**, 1116-1123.
- Kuspa, A. & Loomis, W.F. (1996) Ordered yeast artificial chromosome clones representing the *Dictyostelium discoideum* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5562-5566.
- Kwon, Y.G., Huang, H.B., Desdouits, F., Girault, J.A., Greengard, P. & Nairn, A.C. (1997) Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP-32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3536-3541.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Langan, T.A. (1969) Phosphorylation of liver histone following the administration of glucagon and insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **64**, 1276-1283.
- Langsetmo, K., Stafford, W.F., 3rd, Mabuchi, K. & Tao, T. (2001) Recombinant small subunit of smooth muscle myosin light chain phosphatase. Molecular properties and interactions with the targeting subunit. *J Biol Chem*, **276**, 34318-34322.
- Leach, C., Eto, M. & Brautigan, D.L. (2002) Domains of type 1 protein phosphatase inhibitor-2 required for nuclear and cytoplasmic localization in response to cell-cell contact. *J Cell Sci*, **115**, 3739-3745.
- Leach, C., Shenolikar, S. & Brautigan, D.L. (2003) Phosphorylation of phosphatase inhibitor-2 at centrosomes during mitosis. *J Biol Chem*, **278**, 26015-26020.
- Li, B. & Fields, S. (1993) Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *Faseb J*, **7**, 957-963.
- Lin, Q., Buckler, E.S.t., Muse, S.V. & Walker, J.C. (1999) Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases. *Mol Phylogenet Evol*, **12**, 57-66.
- Lin, T.H., Chen, Y.C., Chyan, C.L., Tsay, L.H., Tang, T.C., Jeng, H.H., Lin, F.M. & Huang, H.B. (2003) Phosphorylation by glycogen synthase kinase of inhibitor-2 does not change its structure in free state. *FEBS Lett*, **554**, 253-256.
- Lin, T.H., Huang, Y.C., Chin, M.L., Chen, Y.C., Jeng, H.H., Lin, F.M., Shiao, M.S., Horiuchi, A., Greengard, P., Nairn, A.C. & Huang, H.B. (2004) 1H, 15N, and 13C resonance

- assignments of DARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr. 32,000)--a protein inhibitor of protein phosphatase-1. *J Biomol NMR*, **28**, 413-414.
- Linn, T.C., Pettit, F.H. & Reed, L.J. (1969) Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **62**, 234-241.
- Liu, F., Verin, A.D., Borbiev, T. & Garcia, J.G. (2001) Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **280**, L1309-1317.
- Liu, H.T., Lin, T.H., Kuo, H.C., Chen, Y.C., Tsay, H.J., Jeng, H.H., Tsai, P.C., Shie, F.K., Chen, J.H. & Huang, H.B. (2002) Identification of the alternative splice products encoded by the human protein phosphatase inhibitor-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 1293-1296.
- Ljungstrom, O., Berglund, L., Hjelmquist, G., Humble, E. & Engstrom, L. (1974) Cyclic 3',5'-AMP-stimulated and non-stimulated phosphorylation of protein fractions from rat-liver cell sap on incubation with (gamma-32P)ATP. *Ups J Med Sci*, **79**, 129-137.
- Loomis, W.F. (1996) Genetic networks that regulate development in *Dictyostelium* cells. *Microbiol Rev*, **60**, 135-150.
- Loomis, W.F. (1998) Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 684-694.
- Loomis, W.F., Shaulsky, G. & Wang, N. (1997) Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *J Cell Sci*, **110** (Pt 10), 1141-1145.
- Loomis, W.F., Wheeler, S. & Schmidt, J.A. (1982) Phosphorylation of the major heat shock protein of *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol*, **2**, 484-489.
- MacDonald, J.A., Borman, M.A., Muranyi, A., Somlyo, A.V., Hartshorne, D.J. & Haystead, T.A. (2001) Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2419-2424.
- MacDougall, L.K., Campbell, D.G., Hubbard, M.J. & Cohen, P. (1989) Partial structure and hormonal regulation of rabbit liver inhibitor-1; distribution of inhibitor-1 and inhibitor-2 in rabbit and rat tissues. *Biochim Biophys Acta*, **1010**, 218-226.
- MacDougall, L.K., Jones, L.R. & Cohen, P. (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem*, **196**, 725-734.
- MacKelvie, S.H., Andrews, P.D. & Stark, M.J. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* gene SDS22 encodes a potential regulator of the mitotic function of yeast type 1 protein phosphatase. *Mol Cell Biol*, **15**, 3777-3785.

- Mackintosh, C., Douglas, P. & Lillo, C. (1995) Identification of a Protein That Inhibits the Phosphorylated Form of Nitrate Reductase from Spinach (*Spinacia oleracea*) Leaves. *Plant Physiol*, **107**, 451-457.
- MacKintosh, C., Garton, A.J., McDonnell, A., Barford, D., Cohen, P.T., Tonks, N.K. & Cohen, P. (1996) Further evidence that inhibitor-2 acts like a chaperone to fold PP1 into its native conformation. *FEBS Lett*, **397**, 235-238.
- MacKintosh, C. & MacKintosh, R.W. (1994) Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends Biochem Sci*, **19**, 444-448.
- MacMillan, L.B., Bass, M.A., Cheng, N., Howard, E.F., Tamura, M., Strack, S., Wadzinski, B.E. & Colbran, R.J. (1999) Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. *J Biol Chem*, **274**, 35845-35854.
- Maeda, M., Lu, S., Shaulsky, G., Miyazaki, Y., Kuwayama, H., Tanaka, Y., Kuspa, A. & Loomis, W.F. (2004) Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA. *Science*, **304**, 875-878.
- Mayford, M. & Kandel, E.R. (1999) Genetic approaches to memory storage. *Trends Genet*, **15**, 463-470.
- Maynes, J.T., Bateman, K.S., Cherney, M.M., Das, A.K., Luu, H.A., Holmes, C.F. & James, M.N. (2001) Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, **276**, 44078-44082.
- McAvoy, T., Allen, P.B., Obaishi, H., Nakanishi, H., Takai, Y., Greengard, P., Nairn, A.C. & Hemmings, H.C., Jr. (1999) Regulation of neurabin I interaction with protein phosphatase 1 by phosphorylation. *Biochemistry*, **38**, 12943-12949.
- Merlevede, W., Goris, J. & De Brandt, C. (1969) Interconversion in vitro of two forms of liver phosphorylase phosphatase. *Eur J Biochem*, **11**, 499-502.
- Merlevede, W. & Riley, G.A. (1966) The activation and inactivation of phosphorylase phosphatase from bovine adrenal cortex. *J Biol Chem*, **241**, 3517-3524.
- Mizuno, T. (1998) His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J Biochem (Tokyo)*, **123**, 555-563.
- Moorhead, G., Johnson, D., Morrice, N. & Cohen, P. (1998) The major myosin phosphatase in skeletal muscle is a complex between the beta-isoform of protein phosphatase 1 and the MYPT2 gene product. *FEBS Lett*, **438**, 141-144.
- Moorhead, G., MacKintosh, R.W., Morrice, N., Gallagher, T. & MacKintosh, C. (1994) Purification of type 1 protein (serine/threonine) phosphatases by microcystin-Sepharose affinity chromatography. *FEBS Lett*, **356**, 46-50.
- Morio, T., Urushihara, H., Saito, T., Ugawa, Y., Mizuno, H., Yoshida, M., Yoshino, R., Mitra, B.N., Pi, M., Sato, T., Takemoto, K., Yasukawa, H., Williams, J., Maeda, M.,

- Takeuchi, I., Ochiai, H. & Tanaka, Y. (1998) The *Dictyostelium* developmental cDNA project: generation and analysis of expressed sequence tags from the first-finger stage of development. *DNA Res*, **5**, 335-340.
- Muranyi, A., MacDonald, J.A., Deng, J.T., Wilson, D.P., Haystead, T.A., Walsh, M.P., Erdodi, F., Kiss, E., Wu, Y. & Hartshorne, D.J. (2002) Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J*, **366**, 211-216.
- Muranyi, A., Zhang, R., Liu, F., Hirano, K., Ito, M., Epstein, H.F. & Hartshorne, D.J. (2001) Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett*, **493**, 80-84.
- Murphy, M.B. & Egelhoff, T.T. (1999) Biochemical characterization of a *Dictyostelium* myosin II heavy-chain phosphatase that promotes filament assembly. *Eur J Biochem*, **264**, 582-590.
- Murphy, M.B., Levi, S.K. & Egelhoff, T.T. (1999) Molecular characterization and immunolocalization of *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase 2A. *FEBS Lett*, **456**, 7-12.
- Myre, M.A. & O'Day, D.H. (2004) *Dictyostelium* calcium-binding protein 4a interacts with nucleomorphin, a BRCT-domain protein that regulates nuclear number. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 665-671.
- Nakielnny, S., Campbell, D.G. & Cohen, P. (1991) The molecular mechanism by which adrenalin inhibits glycogen synthesis. *Eur J Biochem*, **199**, 713-722.
- N'Cho, M. & Brahmi, Z. (1999) Fas-mediated apoptosis in T cells involves the dephosphorylation of the retinoblastoma protein by type 1 protein phosphatases. *Hum Immunol*, **60**, 1183-1194.
- Nigg, E.A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 21-32.
- Nimmo, G.A. & Cohen, P. (1978) The regulation of glycogen metabolism. Purification and characterisation of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **87**, 341-351.
- Nishi, A., Bibb, J.A., Matsuyama, S., Hamada, M., Higashi, H., Nairn, A.C. & Greengard, P. (2002) Regulation of DARPP-32 dephosphorylation at PKA- and Cdk5-sites by NMDA and AMPA receptors: distinct roles of calcineurin and protein phosphatase-2A. *J Neurochem*, **81**, 832-841.
- Nuckolls, G.H., Osherov, N., Loomis, W.F. & Spudich, J.A. (1996) The *Dictyostelium* dual-specificity kinase splA is essential for spore differentiation. *Development*, **122**, 3295-3305.
- Oehme, F. & Schuster, S.C. (2001) Osmotic stress-dependent serine phosphorylation of the histidine kinase homologue DokA. *BMC Biochem*, **2**, 2.

- Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. & Yanagida, M. (1989) The fission yeast *dis2+* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell*, **57**, 997-1007.
- Oliver, C.J. & Shenolikar, S. (1998) Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci*, **3**, D961-972.
- Oliver, C.J., Terry-Lorenzo, R.T., Elliott, E., Bloomer, W.A., Li, S., Brautigan, D.L., Colbran, R.J. & Shenolikar, S. (2002) Targeting protein phosphatase 1 (PP1) to the actin cytoskeleton: the neurabin I/PP1 complex regulates cell morphology. *Mol Cell Biol*, **22**, 4690-4701.
- Osawa, Y., Nakagama, H., Shima, H., Sugimura, T. & Nagao, M. (1996) Identification and characterization of three isoforms of protein phosphatase inhibitor-2 and their expression profiles during testis maturation in rats. *Eur J Biochem*, **242**, 793-798.
- Park, I.K. & DePaoli-Roach, A.A. (1994) Domains of phosphatase inhibitor-2 involved in the control of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *J Biol Chem*, **269**, 28919-28928.
- Park, I.K., Roach, P., Bondor, J., Fox, S.P. & DePaoli-Roach, A.A. (1994) Molecular mechanism of the synergistic phosphorylation of phosphatase inhibitor-2. Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of inhibitor-2. *J Biol Chem*, **269**, 944-954.
- Parker, L., Gross, S., Beullens, M., Bollen, M., Bennett, D. & Alpey, L. (2002) Functional interaction between nuclear inhibitor of protein phosphatase type 1 (NIPP1) and protein phosphatase type 1 (PP1) in *Drosophila*: consequences of over-expression of NIPP1 in flies and suppression by co-expression of PP1. *Biochem J*, **368**, 789-797.
- Peggie, M.W., MacKelvie, S.H., Bloecher, A., Knatko, E.V., Tatchell, K. & Stark, M.J. (2002) Essential functions of Sds22p in chromosome stability and nuclear localization of PP1. *J Cell Sci*, **115**, 195-206.
- Picking, W.D., Kudlicki, W., Kramer, G., Hardesty, B., Vandenheede, J.R., Merlevede, W., Park, I.K. & DePaoli-Roach, A. (1991) Fluorescence studies on the interaction of inhibitor 2 and okadaic acid with the catalytic subunit of type 1 phosphoprotein phosphatases. *Biochemistry*, **30**, 10280-10287.
- Plyte, S.E., O'Donovan, E., Woodgett, J.R. & Harwood, A.J. (1999) Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is regulated during *Dictyostelium* development via the serpentine receptor cAR3. *Development*, **126**, 325-333.
- Poulter, L., Ang, S.G., Gibson, B.W., Williams, D.H., Holmes, C.F., Caudwell, F.B., Pitcher, J. & Cohen, P. (1988) Analysis of the in vivo phosphorylation state of rabbit skeletal muscle glycogen synthase by fast-atom-bombardment mass spectrometry. *Eur J Biochem*, **175**, 497-510.

- Price, D.J., Tabarini, D. & Li, H.C. (1986) Purification, subunit composition and regulatory properties of the ATP X Mg²⁺-dependent form of type I phosphoprotein phosphatase from bovine heart. *Eur J Biochem*, **158**, 635-645.
- Puta, F. & Zeng, C. (1998) Blastidicin resistance cassette in symmetrical polylinkers for insertional inactivation of genes in *Dictyostelium*. *Folia Biol (Praha)*, **44**, 185-188.
- Ramalingam, R., Shaw, D.R. & Ennis, H.L. (1993) Cloning and functional expression of a *Dictyostelium discoideum* protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem*, **268**, 22680-22685.
- Ramaswamy, N.T., Li, L., Khalil, M. & Cannon, J.F. (1998) Regulation of yeast glycogen metabolism and sporulation by Glc7p protein phosphatase. *Genetics*, **149**, 57-72.
- Ramos, C.R., Abreu, P.A., Nascimento, A.L. & Ho, P.L. (2004) A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*, **37**, 1103-1109.
- Roach, P., Roach, P.J. & DePaoli-Roach, A.A. (1985) Phosphoprotein phosphatase inhibitor-2. Identification as a species of molecular weight 31,000 in rabbit muscle, liver, and other tissues. *J Biol Chem*, **260**, 6314-6317.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, **132**, 365-386.
- Rubin, E., Tamrakar, S. & Ludlow, J.W. (1998) Protein phosphatase type 1, the product of the retinoblastoma susceptibility gene, and cell cycle control. *Front Biosci*, **3**, D1209-1219.
- Sakashita, G., Shima, H., Komatsu, M., Urano, T., Kikuchi, A. & Kikuchi, K. (2003) Regulation of type 1 protein phosphatase/inhibitor-2 complex by glycogen synthase kinase-3 β in intact cells. *J Biochem (Tokyo)*, **133**, 165-171.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Santos, J.L. & Shiozaki, K. (2001) Fungal histidine kinases. *Sci STKE*, **2001**, RE1.
- Sasaki, K., Shima, H., Kitagawa, Y., Irino, S., Sugimura, T. & Nagao, M. (1990) Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, **81**, 1272-1280.
- Schillace, R.V., Voltz, J.W., Sim, A.T., Shenolikar, S. & Scott, J.D. (2001) Multiple interactions within the AKAP220 signaling complex contribute to protein phosphatase 1 regulation. *J Biol Chem*, **276**, 12128-12134.
- Scrimgeour, A.G., Allen, P.B., Fienberg, A.A., Greengard, P. & Lawrence, J.C., Jr. (1999) Inhibitor-1 is not required for the activation of glycogen synthase by insulin in skeletal muscle. *J Biol Chem*, **274**, 20949-20952.

- Shenolikar, S. (1994) Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 55-86.
- Shenolikar, S. (1995) Protein phosphatase regulation by endogenous inhibitors. *Semin Cancer Biol*, **6**, 219-227.
- Shenolikar, S. & Ingebritsen, T.S. (1984) Protein (serine and threonine) phosphate phosphatases. *Methods Enzymol*, **107**, 102-129.
- Shenolikar, S. & Nairn, A.C. (1991) Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **23**, 1-121.
- Sheppeck, J.E., 2nd, Gauss, C.M. & Chamberlin, A.R. (1997) Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg Med Chem*, **5**, 1739-1750.
- Shimizu, H., Ito, M., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., Naka, M., Tanaka, T., Hirano, K., Hartshorne, D.J. & et al. (1994) Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **269**, 30407-30411.
- Shirato, H., Shima, H., Sakashita, G., Nakano, T., Ito, M., Lee, E.Y. & Kikuchi, K. (2000) Identification and characterization of a novel protein inhibitor of type 1 protein phosphatase. *Biochemistry*, **39**, 13848-13855.
- Simon, M.N., Winckler, T., Mutzel, R., Veron, M. & da Costa Maia, J.C. (1992) Serine/threonine protein phosphatases in *Dictyostelium discoideum*: no evidence for type I activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **184**, 1142-1151.
- Singleton, C.K., Zinda, M.J., Mykytka, B. & Yang, P. (1998) The histidine kinase dhkC regulates the choice between migrating slugs and terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol*, **203**, 345-357.
- Skinner, J.A. & Saltiel, A.R. (2001) Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targeting subunit of protein phosphatase 1. *Biochem J*, **356**, 257-267.
- Smith, R.D. & Walker, J.C. (1993) Expression of multiple type 1 phosphoprotein phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **21**, 307-316.
- Soderbom, F. & Loomis, W.F. (1998) Cell-cell signaling during *Dictyostelium* development. *Trends Microbiol*, **6**, 402-406.
- Souza, G.M., da Silva, A.M. & 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. & Kuspa, A. (1998) YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. *Development*, **125**, 2291-2302.
- Stark, M.J. (1996) Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast*, **12**, 1647-1675.

- Steen, R.L., Beullens, M., Landsverk, H.B., Bollen, M. & Collas, P. (2003) AKAP149 is a novel PP1 specifier required to maintain nuclear envelope integrity in G1 phase. *J Cell Sci*, **116**, 2237-2246.
- Stuart, J.S., Frederick, D.L., Varner, C.M. & Tatchell, K. (1994) The mutant type 1 protein phosphatase encoded by *glc7-1* from *Saccharomyces cerevisiae* fails to interact productively with the GAC1-encoded regulatory subunit. *Mol Cell Biol*, **14**, 896-905.
- Sussman, M. (1987) Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol*, **28**, 9-29.
- Sutherland, E.W. & Wosilait, W.D. (1956) The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. I. Liver phosphorylase; preparation and properties. *J Biol Chem*, **218**, 459-468.
- Sutoh, K. (1993) A transformation vector for *Dictyostelium discoideum* with a new selectable marker *bsr*. *Plasmid*, **30**, 150-154.
- Szoor, B., Dombradi, V., Gergely, P. & Feher, Z. (1997) Purification and characterization of the catalytic subunit of protein phosphatase 1 from *Neurospora crassa*. *Acta Biol Hung*, **48**, 289-302.
- Tada, M., Kirchberger, M.A. & Katz, A.M. (1975) Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **250**, 2640-2647.
- Taminato, A., Bagattini, R., Gorjao, R., Chen, G., Kuspa, A. & Souza, G.M. (2002) Role for YakA, cAMP, and protein kinase A in regulation of stress responses of *Dictyostelium discoideum* cells. *Mol Biol Cell*, **13**, 2266-2275.
- Tamrakar, S. & Ludlow, J.W. (2000) The carboxyl-terminal region of the retinoblastoma protein binds non-competitively to protein phosphatase type 1 α and inhibits catalytic activity. *J Biol Chem*, **275**, 27784-27789.
- Tan, I., Ng, C.H., Lim, L. & Leung, T. (2001) Phosphorylation of a novel myosin binding subunit of protein phosphatase 1 reveals a conserved mechanism in the regulation of actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **276**, 21209-21216.
- Tan, J.L. & Spudich, J.A. (1990) Developmentally regulated protein-tyrosine kinase genes in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol*, **10**, 3578-3583.
- Tan, Y.S., Morcos, P.A. & Cannon, J.F. (2003) Pho85 phosphorylates the Glc7 protein phosphatase regulator Glc8 in vivo. *J Biol Chem*, **278**, 147-153.
- Tellez-Inon, M.T. & Torres, H.N. (1970) Interconvertible forms of glycogen phosphorylase in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **66**, 459-463.
- Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T. & Dominguez, R. (2004) Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature*, **429**, 780-784.

- Terry-Lorenzo, R.T., Elliot, E., Weiser, D.C., Prickett, T.D., Brautigan, D.L. & Shenolikar, S. (2002) Neurabins recruit protein phosphatase-1 and inhibitor-2 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **277**, 46535-46543.
- Thomason, P. & Kay, R. (2000) Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *J Cell Sci*, **113 (Pt 18)**, 3141-3150.
- Thomason, P.A., Traynor, D., Cavet, G., Chang, W.T., Harwood, A.J. & 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. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Thompson, L.J., Bollen, M. & Fields, A.P. (1997) Identification of protein phosphatase 1 as a mitotic lamin phosphatase. *J Biol Chem*, **272**, 29693-29697.
- Tomaska, L. (2000) Mitochondrial protein phosphorylation: lessons from yeasts. *Gene*, **255**, 59-64.
- Toth, A., Kiss, E., Herberg, F.W., Gergely, P., Hartshorne, D.J. & Erdodi, F. (2000) Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance. *Eur J Biochem*, **267**, 1687-1697.
- Tournebise, R., Andersen, S.S., Verde, F., Doree, M., Karsenti, E. & Hyman, A.A. (1997) Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis. *Embo J*, **16**, 5537-5549.
- Tu, J., Song, W. & Carlson, M. (1996) Protein phosphatase type 1 interacts with proteins required for meiosis and other cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 4199-4206.
- Tung, H.Y., Wang, W. & Chan, C.S. (1995) Regulation of chromosome segregation by Glc8p, a structural homolog of mammalian inhibitor 2 that functions as both an activator and an inhibitor of yeast protein phosphatase 1. *Mol Cell Biol*, **15**, 6064-6074.
- Udho, E., Tedesco, V.C., Zygmunt, A. & Krucher, N.A. (2002) PNUTS (phosphatase nuclear targeting subunit) inhibits retinoblastoma-directed PP1 activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 463-467.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. & Rothberg, J.M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-627.

- Van Eynde, A., Perez-Callejon, E., Schoenmakers, E., Jacquemin, M., Stalmans, W. & Bollen, M. (1999) Organization and alternate splice products of the gene encoding nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP-1). *Eur J Biochem*, **261**, 291-300.
- Van Eynde, A., Wera, S., Beullens, M., Torrekens, S., Van Leuven, F., Stalmans, W. & Bollen, M. (1995) Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing. *J Biol Chem*, **270**, 28068-28074.
- Vandenheede, J.R., Yang, S.D., Goris, J. & Merlevede, W. (1982) The ATP, Mg-dependent regulation of a multisubstrate protein phosphatase from rabbit skeletal muscle. *Prog Clin Biol Res*, **102 Pt C**, 193-201.
- Vandenheede, J.R., Yang, S.D., Merlevede, W., Jurgensen, S. & Chock, P.B. (1985) Kinase FA-mediated regulation of rabbit skeletal muscle protein phosphatase. Reversible phosphorylation of the modulator subunit. *J Biol Chem*, **260**, 10512-10516.
- Veron, M., Mutzel, R., Lacombe, M.L., Simon, M.N. & Wallet, V. (1988) cAMP-dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genet*, **9**, 247-258.
- Villafranca, J.E., Kissinger, C.R. & Parge, H.E. (1996) Protein serine/threonine phosphatases. *Curr Opin Biotechnol*, **7**, 397-402.
- Vulsteke, V., Beullens, M., Waelkens, E., Stalmans, W. & Bollen, M. (1997) Properties and phosphorylation sites of baculovirus-expressed nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP-1). *J Biol Chem*, **272**, 32972-32978.
- Waddell, S. (2003) Protein phosphatase 1 and memory: practice makes PP1 imperfect? *Trends Neurosci*, **26**, 117-119.
- Wakula, P., Beullens, M., Ceulemans, H., Stalmans, W. & Bollen, M. (2003) Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, **278**, 18817-18823.
- Wang, B. & Kuspa, A. (1997) *Dictyostelium* development in the absence of cAMP. *Science*, **277**, 251-254.
- Wang, R.H., Liu, C.W., Avramis, V.I. & Berndt, N. (2001) Protein phosphatase 1 α -mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Oncogene*, **20**, 6111-6122.
- Weeks, G. (2000) Signalling molecules involved in cellular differentiation during *Dictyostelium* morphogenesis. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 625-630.
- Wera, S. & Hemmings, B.A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J*, **311 (Pt 1)**, 17-29.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. & Johnson, G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, **79**, 143-180.

- Wu, D.Y., Tkachuck, D.C., Roberson, R.S. & Schubach, W.H. (2002) The human SNF5/INI1 protein facilitates the function of the growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) and modulates GADD34-bound protein phosphatase-1 activity. *J Biol Chem*, **277**, 27706-27715.
- Wu, X., Hart, H., Cheng, C., Roach, P.J. & Tatchell, K. (2001) Characterization of Gac1p, a regulatory subunit of protein phosphatase type I involved in glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, **265**, 622-635.
- Yamawaki, K., Ito, M., Machida, H., Moriki, N., Okamoto, R., Isaka, N., Shimpo, H., Kohda, A., Okumura, K., Hartshorne, D.J. & Nakano, T. (2001) Identification of human CPI-17, an inhibitory phosphoprotein for myosin phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 1040-1045.
- Yang, J., Hurley, T.D. & DePaoli-Roach, A.A. (2000) Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif. *J Biol Chem*, **275**, 22635-22644.
- Yang, Y., He, Q., Cheng, P., Wrage, P., Yarden, O. & Liu, Y. (2004) Distinct roles for PP1 and PP2A in the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev*, **18**, 255-260.
- Ye, Q. & Worman, H.J. (1995) Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp Cell Res*, **219**, 292-298.
- Zachariou, V., Benoit-Marand, M., Allen, P.B., Ingrassia, P., Fienberg, A.A., Gonon, F., Greengard, P. & Picciotto, M.R. (2002) Reduction of cocaine place preference in mice lacking the protein phosphatase 1 inhibitors DARPP 32 or Inhibitor 1. *Biol Psychiatry*, **51**, 612-620.
- Zapella, P.D. (2001) Caracterização de algumas componentes envolvidos na desfosforilação de proteínas fosforiladas em resíduos de serina e treonina em *Neurospora crassa*. *Instituto de Química*. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 176.
- Zapella, P.D., da-Silva, A.M., da-Costa-Maia, J.C. & Terenzi, H.F. (1996) Serine/threonine protein phosphatases and a protein phosphatase 1 inhibitor from *Neurospora crassa*. *Braz J Med Biol Res*, **29**, 599-604.
- Zhang, J., Zhang, L., Zhao, S. & Lee, E.Y. (1998) Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. *Biochemistry*, **37**, 16728-16734.
- Zhang, L., Zhang, Z., Long, F. & Lee, E.Y. (1996) Tyrosine-272 is involved in the inhibition of protein phosphatase-1 by multiple toxins. *Biochemistry*, **35**, 1606-1611.
- Zhang, Z., Bai, G., Deans-Zirattu, S., Browner, M.F. & Lee, E.Y. (1992a) Expression of the catalytic subunit of phosphorylase phosphatase (protein phosphatase-1) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **267**, 1484-1490.

- Zhang, Z., Bai, G. & Lee, E.Y. (1992b) PCR cloning of the cDNA of rabbit skeletal muscle protein phosphatase inhibitor-2. *Biochem Biophys Res Commun*, **186**, 1168-1170.
- Zhao, S. & Lee, E.Y. (1997) Targeting of the catalytic subunit of protein phosphatase-1 to the glycolytic enzyme phosphofructokinase. *Biochemistry*, **36**, 8318-8324.
- Zheng, W.H., Kar, S. & Quirion, R. (2000) Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHRL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *J Biol Chem*, **275**, 39152-39158.