UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

LUCIANA MANTZOURANIS

**Análise do transcriptoma regulado
pela YakA e do papel de KeaA no
desenvolvimento de *Dictyostelium*
*discoideum***

São Paulo

Data de depósito na SPG:

10/08/2009

LUCIANA MANTZOURANIS

**Análise do transcriptoma regulado
pela YakA e do papel de KeaA no
desenvolvimento de *Dictyostelium
discoideum***

Tese apresentada ao Instituto
de Química da Universidade de
São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências,
área Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Mendes Souza

São Paulo

2009

Luciana Mantzouranis

Análise do transcriptoma regulado pela YakA e do papel de KeaA no desenvolvimento de *Dictyostelium discoideum*.

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof.Dr.

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr.

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr.

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr.

Instituição: _____

Assinatura: _____

*À minha mãe e grande amiga, Aparecida, que não mediu esforços para garantir a
educação e a felicidade de seus filhos.
Sem o seu apoio e dedicação eu nunca chegaria aqui.
Devo muito a você.*

Agradecimentos

À Dra. Glaucia Mendes Souza por ter me recebido em seu laboratório, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela segura orientação a qual tornou possível o desenvolvimento deste projeto e também pelo exemplo de dedicação à pesquisa e principalmente pelo exemplo de organização.

À Dra. Raquel Bagattini por ter me recebido muito bem no laboratório, pela paciência e ajuda quando eu ainda não tinha experiência alguma em técnicas de biologia molecular e em cultivo de *Dictyostelium* e, principalmente, pela sua amizade.

Ao Rodrigo Mascarenhas pela grande ajuda quando eu entrei no laboratório e pela sua amizade.

Às Dras. Flavia Papini Terzi e Flavia Rocha as quais me ajudaram muito na construção dos microarranjos.

Ao Dr. Ricardo Vêncio e ao Milton Yutaka, pelo suporte estatístico e pelos ensinamentos relacionados à análise de dados de microarranjos.

À Dra. Aline Maria da Silva por permitir que eu utilizasse diversos equipamentos em seu laboratório e pelos conselhos.

Aos meus atuais amigos do laboratório Carolina Lembke, Maximiller, Fabio, Carlos, Paloma, Rodrigo, Milton, Érica, Alessandra, Sávio e Andréia e também àqueles que já passaram pelo laboratório: Raquel, Rodrigo, Kátia, Flavia Papini, Flavia Riso, Paulo, Sarah, José Humberto, Carolina Barco, Ricardo, Alessandro, Josélia, Fernando, Leila, Leonardo, Maurício, Talita e Aline. Obrigada pelo companheirismo, pela prontidão em ajudar e pelos momentos de descontração. Tive sorte de trabalhar com pessoas como vocês.

Aos meus grandes amigos Érica, Humberto, Josélia, Carol Barco, Milton e Alessandro que me ajudaram a superar momentos difíceis.

Aos meus queridos alunos de Iniciação Científica: Fernando, Leila, Maurício e Leonardo.

Aos meus amigos que utilizam e que já utilizaram o organismo *Dictyostelium discoideum* em seus estudos: Daniela Gonzalez, Juliana, Layla e Renato. Obrigada pela troca de experiências.

Aos meus amigos do Departamento de Bioquímica: Diorge, Max, Daniela Beton, Patrícia, Andréa e Ana Claudia.

A todos os técnicos dos diversos laboratórios onde estive, em especial ao Alexandre Sanchez que me ajudou muito, à Adriana e Denise que me auxiliaram nos experimentos no laboratório CAGE e à Luci Deise Navarro a qual possui uma competência e uma seriedade invejáveis.

A todo o pessoal do Bloco 12 e do Bloco 0.

Ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação e também da Secretaria de Bioquímica, pelo profissionalismo e pela prontidão em ajudar.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de Doutorado Direto e pelo auxílio financeiro ao projeto.

Às minhas amigas Janaína e Paola, as quais moraram comigo nesses dois últimos anos e que me proporcionaram um ambiente muito agradável e divertido. Também ao Diogo que tornava os nossos finais de semana mais divertidos.

À minha mãe e ao meu irmão, Luiz Fernando, que são meus exemplos de vida e o meu porto seguro. Aos meus queridos avós Therezinha e Santo, pelo amor, carinho e acolhida nos tempos de dificuldades. Aos meus padrinhos, José Raimundo e Cristina, e aos meus primos, Cristiane, Thatiane e Eduardo que me apoiaram de diversas formas. À minha cunhada Fernanda que chegou toda tímida mas que conquistou todo mundo.

À minha tia Ângela, por estar sempre torcendo e rezando pela minha família.

Ao meu grande amor, Rogério Miranda, pelo companheirismo, pelo incentivo, pela paciência quando eu tinha que passar o final de semana no laboratório e principalmente pelo carinho.

Muito Obrigada!!!

Resumo

(Mantzouranis, L.) **Análise do transcriptoma regulado pela YakA e do papel de KeaA no desenvolvimento de *Dictyostelium discoideum***. 2009. 134p Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A YakA é uma proteína quinase necessária para a regulação da resposta a diversos estresses em *Dictyostelium* e é uma efetora chave da transição do crescimento para desenvolvimento nesse organismo. O gene *keaA* foi isolado como um supressor do mutante *yakA*⁻ em uma busca para revelar genes envolvidos na sobrevivência a estresse nitrosoativo. O gene *keaA* codifica uma proteína com seis repetições kelch na porção C-terminal, um domínio zf-C3HC4 na porção N-terminal, também chamado *RING-finger*, e uma sequência rica em cisteínas localizada na porção mediana da proteína. Mutantes deficientes em *keaA* foram avaliados revelando-se um papel para esse gene também no processo de desenvolvimento. A expressão de mRNA de *keaA* é induzida quando células selvagens crescem e a fonte de alimento começa a esgotar. A indução do mRNA de *keaA* também ocorre durante o desenvolvimento. Essa indução não é observada em células *yakA*⁻ indicando que YakA regula KeaA. Células deficientes em *keaA* expressam baixos níveis de mRNA de *pkaC*, *acaA* e *carA* durante a agregação em baixa densidade celular, o que pode explicar porque as células deficientes em *keaA* apresentam o processo de desenvolvimento mais lento em baixa densidade celular. Células deficientes em *keaA* são mais resistentes a estresses nitrosoativo e oxidativo e *keaA* é necessário para a produção e detecção de AMPc. A análise da agregação de células deficientes em *keaA* durante o desenvolvimento multicelular indica que KeaA é necessário para que as células participem eficientemente desse processo. Células que super-expressam o domínio rico em cisteínas levam o mesmo tempo que as células selvagens para atingir o estágio de agregação. No entanto, essas células apresentam agregados, culminantes e corpos de frutificação menores. Células que super-expressam o domínio Kelch expressam altos níveis de *acaA* e *carA* depois de 8 horas de desenvolvimento, mas os níveis de *pkaC* são similares aos observados em células selvagens. Isso poderia indicar que o domínio Kelch induz a ativação da PKA. No entanto, essa interação não foi observada em experimentos de duplo híbrido. Adicionalmente, a expressão gênica em resposta a compostos que geram estresse oxidativo e nitrosoativo foi estudada utilizando-se microarranjos de cDNA. Os resultados revelaram um papel de *keaA* na resposta à pré-carência e no controle do ciclo celular.

Palavras-chave: proteínas Kelch; desenvolvimento, resposta a estresses.

Abstract

(Mantzouranis, L.) **Analysis of the YakA-regulated transcriptome and the role of KeaA in the regulation of *Dictyostelium discoideum* development.** 2009. 134p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The YakA is a protein kinase required for the regulation of several stress responses in *Dictyostelium* and is a key effector of the transition from growth to development in this microorganism. The gene *keaA* was isolated as suppressor of the *yakA*⁻ mutant in a screen targeted to reveal genes involved in the survival to nitrosoative stress. The *keaA* gene codes a protein with six kelch domain repeats at the C-terminus, a zf-C3HC4 domain at the N-terminus, also called RING-finger, and a cysteine-rich sequence located in the mid-portion of the protein. The analysis of mutants deficient in *keaA* revealed a role for this gene also in the development process. *keaA* mRNA expression is induced when wild type cells grow and the food source becomes scarce. An induction of *keaA* mRNA expression also occurs during development. This induction is not observed in *yakA*⁻ cells, indicating that YakA regulates KeaA. *keaA* deficient cells express low levels of *pkaC*, *acaA* and *carA* mRNA during aggregation in low cell densities, which may explain why the *keaA* deficient cells present a delay in development in low cell densities. *keaA* deficient cells are more resistant to nitrosoative and oxidative stress and *keaA* is necessary for the production and detection of cAMP. The analysis of aggregation of *keaA* deficient cells during multicellular development indicated that KeaA is required for the cells to efficiently participate in the process. Cells over-expressing the cysteine-rich domain took the same time as the wild-type cells to reach the aggregation stage. However, these cells present smaller aggregates, culminants and fruiting bodies. Cells over-expressing the Kelch domain express high levels of *acaA* and *carA* after 8 hours of development, but the levels of *pkaC* are kept similar to those in wild-type cells. This could indicate that the Kelch domain induces the activation of PKA. However, this interaction was not observed when we conducted tests in a two-hybrid system. Additionally, gene expression in response to compounds that generate redox stresses was studied using cDNA microarrays. The results revealed a role of *keaA* in response to pre-starvation and control of cell cycle.

Keywords: Kelch proteins; development, stress response.

Lista de Abreviaturas e siglas

ACA: adenilil ciclase
AMPc: 3', 5' adenosina monofosfato cíclico
ATP: adenosina tri-fosfato
BLAST: Ferramenta de busca de alinhamento local (*Basic Local Alignment Search Tool*)
Car: receptor de AMP cíclico
CMF: fator do meio condicionado
CRAC: regulador citosólico da adenilil ciclase
DEPC: dietilpirocarbonato
DMSO: dimetilsulfóxido
DO: densidade ótica
ERK2: quinase regulada por sinal extracelular
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico
LOWESS: Análise de regressão linear localmente ponderada (*Locally Weighted Linear Regression Analysis*)
MADS: desvios absolutos da mediana (*Median Absolute Deviations*)
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
Mb: megabase
MCS: múltiplo sítio de clonagem (*multiple cloning site*)
MNB: *Minibrain*
MOPS: Ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico
MPO: mieloperoxidase
mRNA: RNA mensageiro
ORF: fase aberta de leitura
PDE: fosfodiesterase de AMP cíclico
Pia: pianíssimo
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase
PI(3,4,5)P₃: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PSF: fator de pré-carência
PTEN: 3-fosfatidilinositol 3-fosfatase
qPCR: PCR quantitativo
REMI: mutagênese insercional mediada por enzima de restrição
ROS: espécies reativas de oxigênio

rpm: rotações por minuto

SNP: nitroprussiato de sódio

SNAP: S-nitroso-N-acetilpenicilamina

TAE: tampão Tris-acetato-EDTA

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

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista de Oligonucleotídeos.....	58
Tabela 2: Temperatura de anelamento.....	59
Tabela 3: Lista de plasmídios utilizados nos ensaios de duplo híbrido.....	59
Tabela 4: Primers utilizados no sequenciamento de <i>pkaC</i> e <i>keaA</i>	60
Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados em reações de PCR quantitativo.....	62
Tabela 6: KeaA é necessário para a síntese de AMPc em resposta a estresses oxidativo e nitrosoativo.....	77
Tabela 7: Células deficientes em <i>keaA</i> são menos responsivas a pulsos de AMPc...78	
Tabela 8: Esquema das transformações.....	91
Tabela 9: Quantidade de ESTs amplificados de cada categoria.....	97
Tabela 10: Genes diferencialmente expressos.....	100
Tabela 11: Quantidade de oligonucleotídeos separados por categorias.....	104
Tabela 12: Linhagens e fenótipos.....	107

Lista de Figuras

Figura 1: Estágios de desenvolvimento de <i>Dictyostelium discoideum</i>	19
Figura 2: Agregação.....	20
Figura 3: Árvore filogenética eucariótica baseada no proteoma.....	21
Figura 4: Sinalização durante a agregação.....	24
Figura 5: Via de transição crescimento/desenvolvimento.....	30
Figura 6: Domínios de KeaA.....	31
Figura 7: O papel de Gpa2 e Krh1/2 na via de sinalização da PKA.....	32
Figura 8: O domínio <i>RING finger</i>	33
Figura 9: O sistema de duplo híbrido.....	52
Figura 10: A expressão do mRNA de <i>keaA</i> em células do mutante 13-8 é reduzida cerca de 80% em relação à células selvagens.....	72
Figura 11: A expressão de <i>keaA</i> é regulada durante o crescimento na presença de <i>K. aerogenes</i>	73
Figura 12: A expressão de <i>keaA</i> é regulada durante o crescimento em meio axênico.....	74
Figura 13: A expressão de <i>keaA</i> é regulada durante o estresse nutricional.....	76

Figura 14: Células deficientes em <i>keaA</i> apresentam mRNA da <i>pkaC</i> , <i>pkaR</i> , <i>acaA</i> e <i>carA</i> após 8 horas de carenciamento em quantidades menores que células selvagens.....	80
Figura 15: Os níveis de mRNA de <i>pkaC</i> , <i>pkaR</i> , <i>acaA</i> e <i>carA</i> aproximam-se dos níveis normais quando as células deficientes em <i>keaA</i> começam a agregar.....	81
Figura 16: Os níveis de mRNA de <i>dscA</i> são maiores em células deficientes em <i>keaA</i> do que em células selvagens.....	83
Figura 17: Células que super-expressam o domínio Kelch não apresentam alteração no perfil de desenvolvimento, já células que super-expressam o domínio rico em cisteínas apresentam alteração no processo de desenvolvimento.....	84
Figura 18: Células que super-expressam o domínio Kelch e o domínio rico em cisteínas apresentam diferenças de expressão em relação aos genes essenciais para o desenvolvimento.....	85
Figura 19: Representação esquemática dos diferentes clones de KeaA.....	87
Figura 20: Representação esquemática dos vetores pGBKT7 <i>keaA1</i> e pGBKT7 <i>keaA2</i>	89
Figura 21: Digestão de possíveis vetores pGBKT7 <i>keaA</i> completo.....	90
Figura 22: Controle de auto-ativação e ensaio de interação entre os domínios de KeaA e as subunidades da PKA através da ativação do gene repórter HIS3.....	94
Figura 23: Controle de auto-ativação e ensaio de interação entre os domínios de KeaA e as subunidades da PKA através da ativação do gene repórter HIS3 em experimentos de diluição seriada.....	95
Figura 24: Ensaio da ativação de <i>lacZ</i>	96
Figura 25: Hibridização homotípica.....	98
Figura 26: Validação dos dados de microarranjo por qPCR.....	103
Figura 27: Regulação da transcrição do gene <i>dscA</i>	112
Figura 28: Via proposta para mediar a resposta a estresses em <i>Dictyostelium discoideum</i>	115

Sumário

1. Introdução	17
1.1. O microorganismo <i>Dictyostelium discoideum</i>	17
1.2. Vias de transdução de sinal envolvidas no processo de agregação em <i>Dictyostelium discoideum</i>	22
1.3. A técnica de mutagênese insercional mediada por enzima de restrição (REMI, em inglês) e os mutantes isolados por essa técnica	26
1.4. A proteína quinase YakA	27
1.5. Vias de transdução de sinal em resposta à estresses e o papel de KeaA no controle dessa via.	31
1.6. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e as lesões em biomoléculas....	35
1.7. Vias de sinalização envolvendo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	38
2. Objetivos	40
3. Metodologia.....	41
3.1. Procedimentos experimentais utilizando células de <i>Dictyostelium discoideum</i>.....	41
3.1.1. Condições de manutenção e cultivo das células	41
3.1.2. Indução de estresses oxidativo, nitrosoativo e nutricional	42
3.1.2.1. Tratamento de células com SNP ou H ₂ O ₂ e coleta de amostras para extração de RNA.....	42
3.1.2.2. Carenciamento em filtro e coleta de amostras para extração de RNA....	43
3.1.2.3. Carenciamento em placas agar/fosfato e coleta de amostras para extração de RNA.....	43
3.1.2.4. Crescimento e carenciamento em placas SM e coleta de amostras para extração de RNA.....	44
3.1.2.5. Carenciamento em meio líquido e adição de pulsos de AMPc	44
3.1.3. Medida dos níveis de AMPc em células tratadas ou não com SNP ou H ₂ O ₂	45
3.1.4. Curva de proliferação	45
3.1.5. Transfecção de DNA por eletroporação	45
3.1.6. Extração de RNA	46
3.1.6.1. RNA total.....	46
3.1.6.2. RNA mensageiro	46
3.1.7. Extração de DNA genômico	47
3.2. Procedimentos para manipulação de células de <i>Escherichia coli</i>.....	47
3.2.1. Preparação de bactérias competentes para transformação	47
3.2.2. Transformação de bactérias por choque térmico.....	48
3.2.3. Extração de DNA plasmidial em pequena escala	48
3.2.4. Extração de DNA plasmidial em grande escala.....	49
3.3. Procedimentos para manipulação de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>50	
3.3.1. Análise <i>in vivo</i> da interação de proteínas pelo método do duplo híbrido	50
3.3.2. Condições de manutenção e cultivo das células	53
3.3.3. Transformação de levedura pelo método do acetato de lítio	53
3.3.4. Detecção de interação utilizando diluição seriada	54
3.3.5. Teste de β-galactosidase	54

3.4. Manipulação e análise de ácidos nucleicos.....	55
3.4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	55
3.4.2. Digestão de DNA com enzimas de restrição	55
3.4.3. Eletroforese em gel de agarose	55
3.4.3.1. Para DNA.....	55
3.4.3.2. Para RNA.....	55
3.4.4. Extração de DNA de gel.....	56
3.4.5. Reações de ligação.....	56
3.4.5.1. Ligação no vetor pCR® 2.1 utilizando o <i>TA Cloning® Kit</i> (Invitrogen)	56
3.4.5.2. Ligação nos vetores pGBKT7 e pGADT7	56
3.4.6. Sequenciamento de DNA.....	56
3.5. Construção de plasmídios e descrição dos oligonucleotídeos utilizados	57
3.5.1. Plasmídios utilizados.....	59
3.6. PCR quantitativo (qPCR)	60
3.6.1. Transcrição reversa	60
3.6.2. Reação de PCR quantitativo	61
3.7. Confecção dos microarranjos.....	64
3.7.1. Seleção de genes para confecção do chip-piloto	64
3.7.2. Manutenção dos clones bacterianos	64
3.7.3. Amplificação dos insertos de DNA dos clones bacterianos	64
3.7.4. Extração de Taq polimerase.....	65
3.7.5. Purificação dos produtos de PCR	65
3.7.6. Deposição dos produtos de PCR em lâminas espelhadas	66
3.7.7. Deposição dos oligonucleotídeos em lâminas <i>CodeLink</i> (Amersham Biotech)	66
3.7.8. Síntese e marcação de alvos fluorescentes de cDNA utilizando <i>CyScribe Post-Labeling kit</i> (GE Healthcare)	67
3.7.9. Hibridização dos cDNAs marcados nas lâminas espelhadas e <i>CodeLink</i>	68
3.7.10. Lavagem das lâminas	68
3.7.10. <i>Scanning</i>	69
3.7.11. Extração e análise dos dados	69
4. Resultados	71
4.1. Análise dos níveis de mRNA de <i>keaA</i> em mutantes para <i>keaA</i>	71
4.2. Tentativa de obtenção do mutante nulo para <i>keaA</i>	73
4.3. Análise dos níveis de mRNA de <i>keaA</i> durante a fase de crescimento.....	73
4.4. Análise dos níveis de mRNA em células selvagens, <i>pkaC</i> ⁻ e <i>yakA</i> ⁻ submetidas à estresse nutricional	75
4.5. Análise da função de KeaA na regulação do metabolismo de AMPc	76
4.6. Análise da expressão de genes essenciais para o desenvolvimento em células deficientes para <i>keaA</i>	78
4.7. Análise de mutantes que super-expressam a região rica em cisteínas e o domínio Kelch	83
4.7.1. Análise do perfil de desenvolvimento	83
4.7.2. Análise da expressão de genes essenciais para o desenvolvimento.....	85
4.8. Análise da interação entre KeaA e PKA	86

4.9. Análise de expressão usando microarranjos de cDNA	97
4.9.1. Experimentos de microarranjos	99
4.9.2. Validação dos dados de microarranjo por qPCR	102
4.10. Microarranjos de oligonucleotídeos	104
5. Discussão.....	106
5.1. Estudo da função de KeaA no controle do crescimento, desenvolvimento e da resposta à estresses em <i>Dictyostelium discoideum</i>	106
5.2. Análise por microarranjos.....	115
6. Conclusões	123
7. Bibliografia.....	124

Anexos

Anexo 1 – Artigo: “KeaA, a *Dictyostelium* kelch-domain protein that regulates the response to stress and development. Submetido na revista BMC Developmental Biology.

Anexo 2 – Súmula curricular

1. Introdução

1.1. O microorganismo *Dictyostelium discoideum*

A ameba social *Dictyostelium discoideum* tem sido largamente utilizada há mais de 60 anos no estudo de uma variedade de processos biológicos fundamentais tais como migração celular (Parent 2004; Van Haastert e Devreotes 2004), transdução de sinal (Manahan *et al.* 2004), fagocitose (Titus 2000; Maniak 2002), a sinalização durante a morfogênese e a diferenciação celular (Williams e Harwood 2003; Chisholm *et al.* 2006).

Esse organismo possui algumas características que facilitam o seu estudo destacando-se o genoma haplóide, a facilidade de cultivo em laboratório, o ciclo de vida relativamente curto, a sincronia do desenvolvimento e a possibilidade de manipulação genética. Essas características justificam a sua vasta utilização como organismo modelo.

Algumas das técnicas de genética molecular como recombinação homóloga (Gaudet *et al.* 2007), RNA de interferência (Martens *et al.* 2002) e mutagênese insercional (Adachi *et al.* 1994) são disponíveis em *Dictyostelium*. Outras ainda não foram implementadas com sucesso como a supressão de mutantes através da transformação de bibliotecas de cDNA.

Dictyostelium discoideum é um organismo eucariótico unicelular de vida livre que pertence à classe dos micetozoários, a qual agrupa os protistas que formam corpo de frutificação e esporos. Na natureza, habita superfícies úmidas do solo alimentando-se de bactérias e outros microorganismos por fagocitose. Cerca de uma centena de bactérias podem ser digeridas simultaneamente por esse fagocitário profissional que as degrada através de um eficiente sistema endo-lisossomal similar ao de leucócitos e macrófagos e com diferentes compartimentos que funcionam coordenadamente para a degradação, disponibilização e eliminação dos componentes ingeridos (Neuhaus *et al.* 2002).

O ciclo de vida de *Dictyostelium discoideum* é composto de duas fases independentes: o crescimento vegetativo e o desenvolvimento. Durante o crescimento vegetativo, as células são idênticas e crescem isoladas até que a fonte de nutrientes seja esgotada. Quando crescidas na presença de bactérias, as células de *Dictyostelium* possuem um tempo de duplicação de aproximadamente 4 horas. Linhagens que podem crescer em meio livre de microorganismos (axênicas) foram obtidas a partir da linhagem selvagem NC-4 e foram denominadas como culturas AX (Sussman e Sussman 1967; Watts e Ashworth 1970). Células crescendo em meio

axênico tem menor velocidade de crescimento com um tempo de duplicação de aproximadamente 8-12h dependendo da temperatura, do meio e da presença de drogas de seleção (Ashworth e Watts 1970). Crescimento ótimo de *Dictyostelium* é observado nas temperaturas entre 21 e 23°C e é significativamente inibido acima de 25°C. A sua reprodução normalmente ocorre assexuadamente por fissão binária como nos demais organismos unicelulares.

Na ausência de nutrientes inicia-se a fase de desenvolvimento (figura 1). A exaustão de nutrientes induz a síntese e secreção de AMPc por algumas amebas da população que se tornarão os centros de agregação (figura 2). Quando estimuladas por AMPc, as células vizinhas respondem com a produção e secreção de mais AMPc, aumentando o sinal. Em resposta ao AMPc secretado para o meio, as células adquirem uma forma alongada, tornam-se mutuamente adesivas e formam pontos de contato célula-célula entre suas extremidades polares, em formato que lembra correntezas (*streams*) se movendo coordenadamente no gradiente de concentração de AMPc para formar o agregado celular de aproximadamente 10^5 células. Após cerca de 8-10 horas do início da carência, o agregado assume a forma de um monte compacto (*tight mound*) onde 80% das células começam a se diferenciar em células pré-esporos e 20% em células pré-talo. Nessa fase os sub-tipos celulares estão posicionados aleatoriamente na estrutura. O cume do agregado compacto coordena a distribuição correta das células e as mudanças morfogênicas que ocorrem no organismo multicelular (Soderbom e Loomis 1998; Aubry e Firtel 1999).

No estágio seguinte do desenvolvimento, o organismo multicelular assume uma forma mais alongada, e então duas alternativas se apresentam: a culminação ou, em determinadas condições, o estabelecimento de uma forma intermediária denominada pseudoplasmodio (*slug*). O pseudoplasmodio pode se deslocar em resposta a gradientes de luz e de temperatura. Em condições favoráveis (luz e temperatura apropriadas), a migração das células cessa na região anterior, enquanto as células da região posterior continuam em movimento até se disporem em torno e embaixo da região anterior, originando uma estrutura que se assemelha a um chapéu mexicano. No topo dessa estrutura estão posicionadas as células pré-talo e na base as células pré-esporo. Nesse momento inicia-se a culminação, as células pré-talo invaginam por dentro da massa de células pré-esporos, diferenciando-se em talo e elevando a massa de células pré-esporos; essas se diferenciam em esporos e forma-se assim o corpo de frutificação maduro. O talo, de aproximadamente 1 mm, consiste de células mortas vacuolizadas correspondendo a 20% do agregado. O talo fica preso a um disco basal que fixa o corpo de frutificação ao substrato. Os esporos, os quais correspondem a 80% do agregado, situam-se no topo do talo e podem germinar se forem expostos a

condições favoráveis dando origem a novas amebas e garantindo assim a sobrevivência em situações de estresses. O processo inteiro se completa em 24 horas.

A função do corpo de frutificação é erguer a massa de esporos o mais alto possível para uma ótima dispersão dos esporos. Existe uma forte pressão para se ter um grande número de células no corpo de frutificação. Porém existe um limite para o tamanho do talo e para a massa de esporos, para evitar que o peso da massa de esporos não faça o talo colapsar, ou cause um dobramento no talo direcionando a massa de esporos para baixo.

M.S. Grimson and R.L. Blanton

Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University

Figura 1: Estágios de desenvolvimento de *Dictyostelium discoideum*. Inicia-se com a formação de um agregado de aproximadamente 10^5 células e culmina com a formação de um corpo de frutificação de aproximadamente 1 mm. Os nomes das principais estruturas celulares e os tempos em horas necessários para atingir tais estruturas estão indicados.

Figura 2: Agregação. As células adquirem uma forma alongada, em resposta ao AMPc secretado no meio, tornam-se mutuamente adesivas e formam pontos de contato célula-célula entre suas extremidades polares, apresentando uma forma semelhante a correntezas (*streams*) e um centro de agregação, o qual está indicado na figura. A barra representa 1 mm.

A capacidade das células de empregar mecanismos de sobrevivência em resposta a estresses ambientais é comum a todos os reinos, sendo que o mais comum estresse encontrado é o estresse nutricional. Um dos mecanismos utilizados para a mobilização de moléculas em resposta à carência é a reciclagem de componentes celulares não essenciais pelo processo de macroautofagia que degrada o citoplasma e reduz o número de organelas. A mobilização de biomoléculas requer a maquinaria de ubiquitinação que sinaliza para a degradação das proteínas não essenciais. Mutantes de *Dictyostelium* para algumas enzimas necessárias para esse processo, como E1 e E2, não apresentam anomalias durante o crescimento, mas possuem o processo de desenvolvimento alterado, indicando que a macroautofagia é essencial para a formação de esporos (Otto *et al.* 2003). Outro mecanismo utilizado pela célula no momento da detecção da carência nutricional é a secreção em larga escala das enzimas lisossomais para o meio, o que deve contribuir para a degradação e absorção de nutrientes ainda presentes no solo (Dimond *et al.* 1981; Dimond *et al.* 1983).

A sequência completa do genoma de *Dictyostelium* foi recentemente elucidada e existe um banco de dados público (dictyBase, <http://dictybase.org>) o qual compreende informações genômicas e biológicas. Culturas de *Dictyostelium* também podem ser obtidas através desse sítio.

O sequenciamento do genoma possibilitou uma compreensão mais abrangente da sua biologia e o fortalecimento de 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 (**Figura 3**) (Baldauf e Doolittle 1997; Glockner *et al.* 2002; Eichinger *et al.* 2005; Kuspa e Loomis 2006).

Adaptado de (Eichinger *et al.* 2005)

Figura 3: Árvore filogenética eucariótica baseada no proteoma. Posicionamento de *Dictyostelium* posterior à divergência entre plantas e animais e anterior à divergência entre fungos e animais. As espécies não especificadas são *Plasmodium falciparum* (malaria parasite), *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga), *Oryza sativa* (rice), *Zea mays* (maize), *Takifugu rubripes* (fish) e *Anopheles gambiae* (mosquito).

Os 34 Mb do genoma de *Dictyostelium* estão distribuídos em 6 cromossomos de 3,5 - 8,5 Mb e de um conteúdo previsto de 12.500 genes. A porcentagem média de A+T em éxons é de 73%, em íntrons é de 88% e nas regiões intergênicas é de 85%. Os genes de *Dictyostelium* são proporcionalmente pequenos quando comparados aos de mamíferos, devido ao fato dos íntrons possuírem tamanho pequeno. A média do tamanho de íntrons é 146 pb e a média do tamanho dos genes é 1756 pb. A porcentagem média de genes que possuem íntrons é 69% (Eichinger *et al.* 2005).

Dictyostelium contém aproximadamente 90Kb de elementos extracromossomais que estão presentes em aproximadamente 100 cópias por núcleo (Firtel *et al.* 1976; Frankel *et al.* 1977; Cockburn *et al.* 1978) e 55 Kb de genoma

mitocondrial. Entre os elementos extracromossomais encontramos plasmídios e o DNA ribossomal.

1.2. Vias de transdução de sinal envolvidas no processo de agregação em *Dictyostelium discoideum*

Em *Dictyostelium*, a ausência de nutrientes induz uma mudança drástica no padrão de expressão gênica, onde genes específicos da fase de crescimento (genes vegetativos) são desligados e genes responsáveis pela produção dos sinais que levam à agregação são induzidos. As respostas observadas nas primeiras horas que seguem à detecção da exaustão do suprimento alimentar incluem a parada do crescimento, a macroautofagia, a indução da síntese de AMPc e a sua secreção e a migração das células através de gradientes de AMPc que guiam à formação dos organismos multicelulares (Firtel 1996; Loomis 1996). A via de transdução de sinal que regula a formação do organismo multicelular é induzida pelo quimioatrativo extracelular AMPc durante as primeiras horas de carência nutricional (Reymond *et al.* 1995). Nessa situação algumas células da população produzem e secretam pulsos nanomolares de AMPc que é percebido pelas células vizinhas às quais migram em direção a um gradiente de concentração crescente.

Além de agir como um quimioatraente, AMPc também é responsável pela ativação da transcrição de vários genes que codificam as proteínas responsáveis pela coordenação de sua síntese e detecção. AMPc liga-se ao receptor de AMPc CAR1 que ativa o complexo heterotrimérico da proteína G, composta pelas subunidades α , β e γ , induzindo a troca de GDP por GTP. O receptor que tem um papel fundamental nos estágios iniciais do desenvolvimento é o CAR1, porém mutantes nulos para CAR1 são capazes de responder a pulsos de AMPc, o que sugere que essa resposta possa também ser mediada por um segundo receptor, CAR3. Mutantes nulos para CAR1 e CAR3 não agregam (Insall *et al.* 1994). A deleção de CAR2 resulta na parada do desenvolvimento no estágio de *mound* (Saxe *et al.* 1993) e a deleção de CAR4 afeta a culminação (Louis *et al.* 1994).

O complexo $\beta\gamma$ ativa a enzima adenilil ciclase (ACA), a qual é responsável pela produção de AMPc a partir de ATP. A ativação da enzima adenilil ciclase requer vários outros componentes, incluindo a MAPK ERK2, componentes da via do Ras e reguladores citoplasmáticos como a CRAC (Wang *et al.* 1999) e o Pianíssimo (Pia) (Chen *et al.* 1997). A ERK2 é codificado pelo homólogo em *Dictyostelium* da proteína MAP quinase *erkB*, e a CRAC é um fator citoplasmático que se associa com a

subunidade β através de um domínio de homologia a plequistrina PH (*plekstrin homology*) e é codificado pelo gene *dagA*.

Os níveis de AMPc extracelular são controlados pela fosfodiesterase PDE (Sucgang *et al.* 1997) e seu inibidor PDI, uma glicoproteína que é secretada pelas células durante as primeiras 8 horas de desenvolvimento (Franke e Kessin 1981). A expressão do gene que codifica PDI é inibida quando os níveis de AMPc estão altos (Wu e Franke 1990). Os níveis de AMPc intracelular são controlados pela fosfodiesterase RegA (Shaulsky *et al.* 1998; Thomason *et al.* 1998). A RegA é inibida pela MAPK ERK2. A ERK2 é ativada pela estimulação do receptor de AMPc (Maeda *et al.* 1996). Assim, o AMPc é acumulado intracelularmente, quando a atividade da adenilil ciclase é estimulada e a atividade de RegA está inibida.

Todo o processo se repete a cada 6 minutos gerando pulsos de AMPc no meio com a concomitante migração das células, seguido de momentos de diminuição do sinal, parada da migração e re-orientação.

AMPc intracelular também ativa a proteína quinase dependente de AMPc, PKA. Em *Dictyostelium* essa quinase é composta de uma subunidade catalítica (C) e uma subunidade regulatória (R). A subunidade catalítica está inibida quando associada com sua subunidade regulatória, mas é ativada quando AMPc liga-se a subunidade regulatória. A PKA modula a expressão de genes necessários para o desenvolvimento (figura 4).

A regulação apropriada da atividade da PKA-C é essencial para quase todos os aspectos do desenvolvimento de *Dictyostelium*. Existem evidências substanciais de que um aumento da síntese da proteína PKA-C é essencial para a iniciação do desenvolvimento (Loomis 1998). O mRNA, a proteína e a atividade para essa enzima aumentam cerca de 5 vezes nas primeiras 4 a 6 h de desenvolvimento (Leichtling *et al.* 1984; Mann e Firtel 1991; Anjard *et al.* 1993) e numerosas manipulações genéticas sugerem que esses são eventos necessários (Firtel e Chapman 1990; Mann e Firtel 1991; Harwood *et al.* 1992; Anjard *et al.* 1993; Mann *et al.* 1997; Souza *et al.* 1998).

A enzima ACA não é necessária para a quimiotaxia, mas é essencial para que as células se alinhem de uma maneira polarizada e formem correntezas. ACA é altamente enriquecida na região posterior de células migrando, criando sítios onde AMPc é secretado para atuar localmente como quimioatraente e amplificar o sinal. Essa localização de ACA é dependente da aquisição de polaridade e do citoesqueleto de actina e é independente do regulador CRAC e da PKA (Kriebel *et al.* 2003).

A ativação da guanilil ciclase induzida por AMPc resulta no acúmulo de cGMP que dispara a polimerização de actina e miosina (Liu *et al.* 1993; Liu e Newell 1994). Actina é predominantemente polimerizada na parte anterior da célula para propulsão

de um pseudópodo em direção ao quimioatraente e miosina II é polimerizada nas laterais e na parte posterior das células para suprimir a formação de pseudópodos laterais e para retração do pólo posterior da célula, respectivamente (Kimmel e Parent 2003).

Em células em quimiotaxia, os receptores e as proteínas G heterotriméricas estão distribuídos uniformemente na superfície celular, uma localização assimétrica é observada nas proteínas que regulam a síntese e a degradação de $PI(3,4,5)P_3$, PI3K e PTEN. Ras é importante para a ativação de PI3K (Funamoto et al. 2002). PI3K se localiza nas regiões da membrana plasmática onde a concentração de AMPc é maior, ou seja, na parte anterior da célula e PTEN, a fosfatase que remove o fosfato da posição 3 do anel de inositol, se restringe às partes laterais e posterior (Funamoto *et al.* 2002; Iijima *et al.* 2002; Meili e Firtel 2003). Essa localização de PI3K e PTEN leva ao acúmulo de $PI(3,4,5)P_3$ na região dianteira e subsequente ativação da polimerização de actina.

Adaptado de (Aubry e Firtel 1999).

Figura 4: Sinalização durante a agregação. Durante a agregação, células de *Dictyostelium* respondem a pulsos nanomolares de AMPc detectados por receptores acoplados à proteína G, CAR1 e CAR3. A ligação de AMPc aos receptores leva a ativação da adenilil ciclase, envolvida na síntese de AMPc e a ativação da guanilil

ciclase, envolvida na quimiotaxia. A produção de AMPc envolve diversas proteínas em adição à ACA e as subunidades G β γ , incluindo a MAP quinase ERK2, componentes da via do Ras e reguladores citosólicos como a CRAC e o Pianíssimo (Pia). A ativação de guanilil ciclase requer a MAP quinase quinase MEK1, o fator Aimless e a proteína de interação com Ras, RIP3. O aumento na concentração intracelular de AMPc leva à ativação da proteína quinase PKA. As fosfodiesterases que degradam o AMPc intracelular e extracelular são, respectivamente, RegA e PDE.

A via de transdução de sinal delineada acima explica o fenômeno de desenvolvimento a partir do momento que as células começam a secretar AMPc. Horas antes desse evento, no entanto, essas células são capazes de detectar a quantidade de nutrientes disponíveis e escolher entre a continuação do crescimento ou o início do programa de desenvolvimento. A detecção da quantidade de nutrientes presentes é mediada pelo fator autócrino PSF, secretado para o meio durante o crescimento e cujo acúmulo é inversamente proporcional à quantidade de bactérias do meio. PSF permite a discriminação das condições nutricionais, induzindo a expressão de genes de desenvolvimento gerações antes da carência total e preparando as células para um eventual processo de desenvolvimento (Clarke e Gomer 1995). O mRNA para os genes da adenilil ciclase, *acaA* e para o receptor de AMPc, *car1*, acumulam por várias horas antes da depleção dos nutrientes (Soderbom e Loomis 1998). Outros componentes que possivelmente modulam a transição crescimento/desenvolvimento incluem CMF (Conditioned-Medium Factor, (Clarke e Gomer 1995)) e o fator de contagem celular (*cell-counting factor*, (Gao et al. 2002)).

O fator de contagem celular foi isolado por ser super-secretado em células nulas para *smlA* (*small aggregates*) as quais inicialmente formam um agregado de tamanho normal mas depois quebram em agregados menores de aproximadamente 5×10^3 células gerando assim corpos de frutificação pequenos. Portanto, existe um fator que é secretado e que regula o tamanho do agregado e que tem sua secreção regulada por SmlA. Esse fator é um grande complexo que possui no mínimo 6 polipeptídeos e que possui uma massa molecular de 450kD. Um dos polipeptídeos é uma proteína hidrofílica de 40kD cujo gene que a codifica foi nomeado *countin*. Em células nulas para *countin* não é observado a secreção do fator de contagem celular e observa-se a formação de corpos de frutificação enormes (Brock e Gomer 1999; Brown e Firtel 2000).

1.3. A técnica de mutagênese insercional mediada por enzima de restrição (REMI, em inglês) e os mutantes isolados por essa técnica

Na técnica de REMI utiliza-se um plasmídio que contém uma marca de seleção para células de *Dictyostelium* e para bactérias. Esse plasmídio é linearizado por uma enzima de restrição que reconhece 6 pares de bases. O plasmídio linearizado juntamente com uma enzima de restrição que reconhece 4 pares de bases em sítios compatíveis com a enzima utilizada para linearizar o plasmídio são eletroporados com células de *Dictyostelium* o que permite que tanto o plasmídio quanto a enzima de restrição permeiem as células. A enzima irá digerir parcialmente o DNA genômico gerando extremidades coesivas onde o plasmídio poderá se ligar. Após a eletroporação as células são plaqueadas em placas contendo o antibiótico adequado sendo que apenas as células que contiverem o plasmídio inserido no DNA genômico serão selecionadas. Sendo assim, REMI é um processo utilizado para inserir aleatoriamente um plasmídio linearizado no genoma do organismo e gerar mutações por interrupção gênica.

A segunda etapa consiste no isolamento de mutantes, o qual depende do aspecto biológico que se deseja estudar. Por exemplo, se a intenção é estudar genes envolvidos no processo de citocinese, são selecionados mutantes com defeito na citocinese. Para isso cada colônia é cultivada de duas maneiras diferentes: em suspensão e em placas. Células com defeito no processo de citocinese são capazes apenas de se multiplicar na cultura em placa. Já em meio líquido as células não conseguem se dividir e tornam-se grandes e multinucleadas. Pode-se também selecionar mutantes com defeito no processo de agregação plaqueando-se as células em meio contendo bactérias.

Para confirmação da inserção do plasmídio no DNA genômico e também para verificar se o plasmídio foi inserido apenas uma vez no DNA genômico do mutante é utilizada a técnica de *Southern Blot*. O DNA genômico do mutante é digerido com algumas enzimas, que não cortam o DNA plasmidial, submetido à eletroforese, transferido para uma membrana e hibridizado contra a sonda obtida a partir do DNA plasmidial.

A enzima de restrição que gerar o maior fragmento é utilizada para a obtenção do fragmento de DNA flanqueado pelo plasmídio. Esse fragmento é re-ligado, transformado em bactéria e sequenciado utilizando os oligonucleotídeos que anelam no plasmídio. Além disso, para confirmação que o fenótipo observado é devido à inserção do plasmídio, o fragmento obtido pode ser utilizado para transformação de células de *Dictyostelium* e reconstrução do mutante.

Com a intenção de isolar genes envolvidos nos primeiros eventos de sinalização da transição crescimento/desenvolvimento, a técnica de REMI foi utilizada e clones de *Dictyostelium* deficientes no processo de agregação foram isolados. Um mutante foi selecionado devido a sua total incapacidade de desenvolvimento quando carenciado (Souza *et al.* 1998). A sequência do DNA do clone genômico revelou uma ORF (fase aberta de leitura) longa, com 4 íntrons. A ORF predita de 1458 aminoácidos corresponde a uma proteína com alta similaridade a Yak1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Garrett e Broach 1989). Devido a essa similaridade, e as similaridades funcionais, a proteína foi denominada YakA e o gene *yakA*.

Com o objetivo de identificar possíveis membros da via da YakA foi realizada uma busca por supressores dos fenótipos associados com a mutação nula para *yakA*. Para tal, mutantes em um segundo sítio foram gerados pela técnica de REMI. *pufA* foi isolado como supressor da deficiência de agregação (Souza *et al.* 1999) e *pkaC* (Taminato *et al.* 2002) e *keaA* foram isolados como supressores da morte induzida por SNP (nitroprussiato de sódio) (Mantzouranis 2009).

1.4. A proteína quinase YakA

YakA é uma serina/treonina quinase que pertence a uma família que inclui Yak1 de levedura, as quinases similares a MNB/Dyrk e várias outras quinases identificadas em camundongo, *C. elegans*, *Arabidopsis*, humanos e *Drosophila*.

O tema associado a essas quinases é o controle do ciclo celular. Em *Saccharomyces cerevisiae*, Yak1 é induzida em condições que levam à parada do ciclo celular, atuando como um atenuador do crescimento e agindo em oposição à atividade promotora de crescimento desempenhada pela PKA (Garrett e Broach 1989; Garrett *et al.* 1991). A via da PKA em levedura é necessária para a transição da fase do ciclo celular de G0 para G1 nas células. Mutações sensíveis à temperatura (ts) nos genes que codificam para componentes dessa via como CDC25, Ras, adenilil ciclase e a subunidade catalítica da PKA, são todas letais na temperatura restritiva. Mutantes nulos para Yak1 foram isolados como supressores da letalidade do mutante Ras(ts) (Garrett e Broach 1989). A super-expressão de Yak1 em mutantes Ras(ts) leva à parada do crescimento e em células selvagens a termo-tolerância (Garrett *et al.* 1991; Hartley *et al.* 1994).

MNB está localizada na região crítica da Síndrome de Down no cromossomo 21 (Smith *et al.* 1997), sendo expressa nas regiões do cérebro que são afetadas por essa doença (Guimera *et al.* 1996). Uma cópia extra do gene Mnb/Dyrk1A é

considerada um crítico contribuidor de defeitos no desenvolvimento associado a essa doença (Shindoh *et al.* 1996).

O gene humano Mnb/Dyrk1A é homólogo ao mnb de *Drosophila* e Dyrk1A de rato. Altos níveis de expressão de Dyrk1A são encontrados em células epiteliais de ratos que são linhagens em constante mitose (Rahmani *et al.* 1998). Em *Drosophila*, o gene mnb codifica para uma proteína serina/treonina quinase que é necessária para a proliferação dos neuroblastos durante a neurogênese pós-embrionária. Mutações no gene mnb provocam a redução do tamanho do cérebro e a diminuição da produção da progênie neuronal (Tejedor *et al.* 1995). Há altos níveis de expressão desse gene durante o início do desenvolvimento do cérebro e do coração de ratos, mas baixos níveis de expressão em adultos, o que indica um possível papel de MNB no desenvolvimento desses órgãos (Okui *et al.* 1999).

Em *Dictyostelium*, YakA inibe o crescimento e acelera o desenvolvimento quando super-expressa em células selvagens e mutantes nulos para essa quinase perdem o controle do intervalo entre as divisões celulares, apresentando crescimento acelerado e pequeno tamanho celular (Souza *et al.* 1998)

A mudança complexa do padrão de expressão gênica na transição crescimento/desenvolvimento também é modulada pela proteína quinase YakA (Souza *et al.* 1998). A expressão de *yakA* é induzida pela glicoproteína PSF. A YakA é necessária para a diminuição da expressão de genes vegetativos, em particular para a diminuição dos níveis de mRNA do gene *pufA*. PufA inibe a tradução do mRNA da *pkaC* e portanto a inibição do gene *pufA* é fundamental para que ocorra um aumento nos níveis da PKA-C, o que leva a um subsequente aumento de adenilil ciclase e receptor de AMPc, os quais se inserem na membrana celular tornando as células capazes de responder a AMPc (Souza *et al.* 1999) (figura 5).

A quinase YakA também está envolvida na resposta a estresse oxidativo/nitrosoativo e térmico. Tratamento de células selvagens com concentração sub-letal de SNP ou H₂O₂ causa inibição do crescimento e não é observada lise celular em níveis significativos depois de uma semana de tratamento. Em células *yakA*⁻ também ocorre a parada do crescimento porém lise celular é observada depois de dois dias de tratamento. Além disso, remoção do meio contendo SNP depois de 12, 24 e 48 horas de tratamento e substituição por meio livre de tratamento restabelece o crescimento de células selvagens, mostrando que o SNP não produz danos irreversíveis em células selvagens. Essa retomada de crescimento não ocorre em células *yakA*⁻ (Taminato *et al.* 2002).

Para identificar componentes da via que modulam a resposta a estresse nitrosoativo/oxidativo foram isolados supressores do fenótipo de hipersensibilidade de

células *yakA*⁻ ao tratamento com SNP. Para tal, foi utilizada a técnica de REMI tendo como linhagem parental o mutante *yakA*⁻. Dez clones que cresceram na presença de SNP foram coletados e o DNA genômico foi analisado para a obtenção do gene flanqueado pelo plasmídio. Um dos genes mutados foi a subunidade catalítica da PKA, possuindo a inserção entres os códons 284 e 285 (Taminato *et al.* 2002).

Essa quinase é essencial para a agregação, diferenciação de células pré-esporo e pré-talo e germinação dos esporos (Loomis 1998). Tanto a subunidade catalítica quanto a subunidade regulatória estão presentes em baixos níveis durante o crescimento, porém, como os mutantes para ambos os genes crescem normalmente, um papel para essa quinase durante a fase de crescimento não é óbvia. Além disso, nenhuma mudança na atividade é observada durante o crescimento em diferentes densidades celulares (Taminato *et al.* 2002).

Um aumento na produção de AMPc e na atividade da PKA é observado quando células selvagens são tratadas com SNP ou H₂O₂. SNP e H₂O₂ devem induzir diretamente a ativação de YakA e PKA, pois não é observado aumento nos níveis de mRNA para ambas as enzimas e também não é observado aumento na quantidade da PKA-C (Taminato *et al.* 2002).

Células *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ tratadas com SNP ou H₂O₂ apresentam inibição menos severa em relação a células selvagens submetidas ao mesmo tratamento. Linhagens com deleção de *pkaC* (*pkaC*⁻ ou *yakA*⁻/*pkaC*⁻) tratadas com SNP apresentam maior taxa de crescimento quando comparadas a células selvagens. Já linhagens com alta atividade de PKA (*yakA*[*pkaC/pkaC*] e *yakA*⁻/*pufA*⁻) são mais sensíveis quando tratadas com SNP, elevada lise celular é observada, em uma maneira similar, porém mais pronunciada, que a lise celular observada em células *yakA*⁻ (Taminato *et al.* 2002).

Sinalização de AMPc através de AcaA e ativação da PKA parecem mediar à inibição do crescimento protegendo as células sob condições de estresses.

Foi visto também que células *yakA*⁻, *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ são mais resistentes ao choque térmico do que células selvagens indicando a participação de YakA, PKAC e ACA na resposta também ao estresse térmico (Taminato *et al.* 2002).

A via esquematizada na figura 5 mostra que a regulação do ciclo celular é mediada de maneira dependente da PKA, como no caso de estresse oxidativo/nitrosoativo e térmico e de maneira independente da PKA já que a super-expressão da *yakA* em células *pkaC*⁻ induz a parada do crescimento e a super-expressão da *pkaC* não leva a fenótipo relacionado ao ciclo celular. A exata contribuição dessa via ainda deve ser estudada já que células *yakA*⁻ e *pkaC*⁻, as quais

não possuem atividade da PKA, apresentam respostas distintas ao tratamento com SNP, células *yakA*⁻ morrem e em células *pkaC*⁻ isso não acontece.

Adaptado de (Taminato *et al.* 2002)

Figura 5: Via da transição crescimento/desenvolvimento. As setas indicam indução e as barras indicam inibição. YakA é responsável pela inibição do ciclo celular, em estresses nutricional, nitrosoativo, oxidativo e térmico, a qual ocorre de maneira independente de PKA e PufA, e também pela inibição de PufA. Essa inibição de PufA permite que os níveis da PKA-C aumentem e consequentemente que os níveis de ACA também aumentem.

1.5. Vias de transdução de sinal em resposta a estresses e o papel de KeaA no controle dessa via.

Um outro membro dessa via que regula a resposta a estresses é o gene identificado pelo nosso grupo e denominado de *keaA*. Utilizando-se a técnica de REMI na mesma busca por supressores descrita anteriormente e que levou a identificação da PKA-C como um supressor do fenótipo de células *yakA*⁻ foi determinado que uma mutação em *keaA* suprime a hipersensibilidade a estresse nitrosoativo do mutante *yakA*⁻.

O gene *keaA* codifica para uma proteína de 1207 aminoácidos contendo 6 repetições do domínio Kelch na região C-terminal, um domínio zf-C3HC4 (RING) na região N-terminal e uma região rica em cisteínas na porção mediana da proteína (figura 6).

Figura 6: Domínios de KeaA. O esquema representa uma distribuição esquemática dos domínios presentes na proteína KeaA. Os números indicam os aminoácidos do início e do término de cada região. A sequência da região rica em cisteínas está destacada na figura.

KeaA é um membro da superfamília de proteínas que contém o domínio Kelch que inclui mais de 30 proteínas encontradas em humanos, camundongos, *Drosophila*, *C.elegans*, *Arabidopsis*, arroz, levedura, vírus e outros.

O domínio Kelch é um motivo de 44 a 56 aminoácidos comumente repetido de 5 a 7 vezes. Cada motivo forma uma folha β -pregueada distribuída ao redor de um eixo central como uma hélice (Ito *et al.* 1994), o qual assemelha-se a configuração tridimensional de repetições WD-40, encontrada em proteínas G β . Suas funções celulares são diversas. Membros tem sido encontrados por se ligar à actina, regular a

morfologia celular, modular a expressão gênica e mediar interações proteína-proteína (Adams *et al.* 2000).

A proteína Gpa2p foi identificada como parte da via de sinalização de AMPc induzida por açúcar em *S. cerevisiae* (Colombo *et al.* 1998). No entanto, o genoma de *S. cerevisiae* codifica uma única proteína G β , Ste4p, a qual interage com a proteína G α Gpa1p mas não interage com a Gpa2p (Dohlman 2002). Com essa descoberta iniciou-se uma busca por proteínas que interagem com Gpa2p. Duas proteínas de levedura com repetições Kelch, Krh1 e Krh2 (*kelch repeat homologue*) foram identificadas como proteínas que se associam a Gpa2. Inicialmente, devido à similaridade estrutural, foi sugerido que Krh1p/2p funcionassem como substitutos da proteína G β (Harashima e Heitman 2005). Um estudo recente mostrou que Krh1p/2p não funcionam como uma subunidade β alternativa, e sim como efetores de Gpa2 e formam uma via que independe da atividade de adenilil ciclase, ligando diretamente a proteína G α a ativação da PKA (Batlle *et al.* 2003; Peeters *et al.* 2006; Niranjan *et al.* 2007). Mutantes que não possuem Krh1/2 mostram um exacerbado fenótipo de PKA, sugerindo que essas proteínas funcionam antagonicamente a Gpa2. Krh1 e Krh2 regulam negativamente alvos da PKA de maneira independente de Gpa2, mas de maneira estritamente dependente de ambas as subunidades catalíticas e regulatórias. Krh1 interage diretamente com PKA por meio da subunidade catalítica e Krh1/2 estimula a associação entre a subunidade catalítica (Tpk) e a subunidade regulatória (Bcy1) da PKA *in vivo*. Gpa2 regula a atividade da PKA através de duas vias diferentes: através da estimulação de adenilil ciclase e através da inibição de proteínas Krh (figura 7) (Peeters *et al.* 2006). Foi proposto também que Krh1 regula negativamente a associação de Gpa2 ao seu receptor cognato por se ligar a região N-terminal de Gpa2 (Harashima e Heitman 2005).

Adaptado de Peeters, T. *et al*, 2005.

Figura 7: O papel de Gpa2 e Krh1/2 na via de sinalização da PKA. Gpa2 ativa a PKA através de duas vias: através da estimulação da adenilil ciclase (Cyr1), a qual produz AMPc ativando assim a PKA ou através da inibição de proteínas Kelch, as quais estimulam a associação entre a subunidade catalítica (Tpk) e a subunidade regulatória (Bcy1) da PKA. Foi proposto também que Krh1 regula negativamente a associação de Gpa2 ao seu receptor cognato.

O motivo *zinc-finger* tipo C3HC4, ou mais precisamente, Cys-X₂-Cys-X₍₉₋₃₉₎-Cys-X₍₁₋₃₎-His₍₂₋₃₎-Cys-X₂-Cys-X₍₄₋₄₈₎-Cys-X₂-Cys, denominado também de *RING finger* é um motivo rico em cisteínas de 40 a 60 resíduos no qual estão coordenados dois átomos de zinco. Cada átomo de zinco está ligado tetraedricamente por quatro cisteínas ou por quatro cisteínas e uma histidina (Borden e Freemont 1996). Existem duas variantes desse motivo: o tipo C3HC4 e o tipo C3H2C3 os quais representam os diferentes padrões de cisteína e histidina. Esse motivo foi originalmente descrito por análise de sequência de um gene denominado *Really Interesting New Gene 1*, *RING1* (Lovering *et al.* 1993). A primeira estrutura tridimensional do domínio RING foi obtida através de ressonância magnética nuclear (¹H) da proteína IEEHV (*immediate early equine herpes virus*) (Barlow *et al.* 1994). Em seguida, foi resolvida a estrutura do domínio *RING* de PML (*promyelocytic leukaemia*) (Borden *et al.* 1995) revelando a presença de uma estrutura *cross-brace* característica (figura 8). Apesar de cada molécula *RING finger* ligar dois átomos de zinco, não são formados dois mini-domínios separados, mas uma estrutura integrada.

Figura 8: O domínio *RING finger*. O domínio *RING finger* possui dois átomos de zinco ligados tetraedricamente por quatro cisteínas ou três cisteínas e uma histidina. Nesse sistema, as cisteínas C1, C2, C4 e C5 ligam um átomo de zinco e as cisteínas C3, C6 e C7 e uma histidina ligam o outro átomo de zinco, formando a estrutura de *cross-brace*.

A família de *RING finger* é uma grande família com membros encontrados em animais, plantas e vírus, incluindo proto-oncoproteínas como T8 (fator de transformação) (Le Douarin *et al.* 1995), RFP (*ret proto-oncoprotein finger protein*) (Tagawa *et al.* 1990) e BRCA1 (Miki *et al.* 1994), bem como proteínas envolvidas no desenvolvimento e na replicação viral (Freemont 1993; Saurin *et al.* 1996).

O domínio *RING finger* tem sido relacionado a eventos de ubiquitinação (Joazeiro e Weissman 2000).

A ubiquitinação envolve três tipos de enzimas, conhecidas como E1 (enzima ativadora da ubiquitina), E2 (enzima de conjugação da ubiquitina) e E3 (proteína de ligação da ubiquitina). E1 e E2 catalisam a formação de ligações tiol-éster entre o C-terminal da ubiquitina e a cisteína de suas próprias cadeias. A ubiquitina é então transferida para a enzima E2, que, por sua vez, a transfere para a proteína alvo. A enzima E3 é responsável pelo reconhecimento do substrato e por promover a poliubiquitinação do substrato, marcando assim a proteína para degradação.

Estudos recentes têm mostrado que o domínio *RING finger* pode interagir especificamente com enzimas E2 e que proteínas contendo esse domínio podem atuar com enzimas E3 (Freemont 2000).

1.6. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e as lesões em biomoléculas

Um dos paradoxos da vida é que apesar do oxigênio molecular ser essencial para a obtenção de energia pelos organismos aeróbicos, a ele também está associada à geração de espécies oxidantes, também conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ROS, em inglês), as quais são tóxicas para os organismos vivos. O estresse oxidativo é definido como a situação na qual o balanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa antioxidante é perdido, tendo como consequência o acúmulo de danos a biomoléculas (DNA, lipídios e proteínas). ROS são mediadoras da morte celular, sendo que altos níveis de estresse oxidativo causam necrose e baixos níveis desencadeiam a apoptose (Lennon *et al.* 1991; Dypbukt *et al.* 1994).

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

ROS são produzidas naturalmente durante a síntese de ATP nas mitocôndrias a partir de oxigênio molecular (Halliwell e Gutteridge 1999). A cadeia de transporte de elétrons é considerada o maior sítio celular aeróbico de produção de ROS (Boveris e Chance 1973; Lenaz 1998; Staniek e Nohl 1999; Han *et al.* 2001). Embora a redução do O_2 para H_2O por quatro elétrons seja executada com grande eficiência pela citocromo c oxidase, cerca de 2% do O_2 acaba sendo reduzido parcialmente gerando ROS. Alternativamente, ROS pode resultar da exposição de agentes exógenos como a luz ultravioleta e uma variedade de oxidantes químicos (Halliwell e Gutteridge 1999).

A reatividade dessas espécies varia muito, mas algumas são reativas o suficiente para provocar lesões em biomoléculas como o DNA, lipídios e proteínas. Entre as ROS estão, o íon radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), o radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$), os compostos carbonílicos tripletes, o oxigênio eletronicamente excitado ao estado singlete (1O_2), o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) (Halliwell e Gutteridge 1999).

O $O_2^{\bullet-}$, além de ser formado durante a síntese de ATP nas mitocôndrias, também pode ser formado pela enzima NADPH oxidase, usando o NADPH como doador de elétrons, durante a atividade de células do sistema imune (equação 1) (Pryor 1986). A produção de $O_2^{\bullet-}$, leva a geração de H_2O_2 através da dismutação espontânea (um radical $O_2^{\bullet-}$ é oxidado a O_2 e o outro radical $O_2^{\bullet-}$ é reduzido a H_2O_2) ou catalisada pela superóxido dismutase (equação 2). Sob condições fisiológicas

ocorre primeiramente a protonação de $O_2^{\bullet-}$ seguida da reação de $HO_2^{\bullet}$ com $O_2^{\bullet-}$ (equação 3). $O_2^{\bullet-}$ também leva a geração de $ONOO^-$ através da reação do $O_2^{\bullet-}$ com $NO^{\bullet}$ (equação 4) (Koppenol *et al.* 1992).

Na presença de CO_2 , o $ONOO^-$ se decompõe formando 35% de $NO_2^{\bullet}$ e $CO_3^{\bullet-}$. A reação de $HO^{\bullet}$ com nitrito ou bicarbonato também pode gerar $NO_2^{\bullet}$ e $CO_3^{\bullet-}$, respectivamente (Augusto *et al.* 2002).

Neutrófilos também aumentam a toxicidade de H_2O_2 através das mieloperoxidasas (MPO) produzindo $HOCl$ (equação 5) (Harrison e Schultz 1976). $HOCl$ facilmente se decompõe liberando gás cloro (Cl_2) (equação 6). $HOCl$ tem atraído muita atenção por causa da sua alta reatividade e da sua habilidade em causar danos em biomoléculas, tanto diretamente quanto pela formação de Cl_2 (Halliwell e Gutteridge 1999).

Níveis elevados de H_2O_2 podem liberar íons ferro de heme proteínas, como hemoglobina e citocromos. Ferro (III) e cobre (II) podem ser reduzidos pelo $O_2^{\bullet-}$ a Fe (II) e Cu (I), os quais reduzem H_2O_2 a $HO^{\bullet}$ (reação de Fenton e reação de Haber-Weiss, respectivamente) (equações 7 e 8). UV induz a fissão homolítica de H_2O_2 em $HO^{\bullet}$ (equação 9) (Halliwell e Gutteridge 1999). O $HOCl$ também pode gerar $HO^{\bullet}$ através da reação com $O_2^{\bullet-}$ (equação 10). O $HO^{\bullet}$ é um dos radicais mais reativos

encontrados *in vivo*. Ele é capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA (Pryor 1986).

Assim, a formação do íon radical superóxido produz uma cascata de ROS. Alguns destes ROS, especialmente a H_2O_2 , são moléculas de sinalização.

O óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) é um radical pouco reativo, formado de forma endógena através das enzimas NO sintases (NOS), que converte o aminoácido L-arginina em $\text{NO}^\bullet$ e L-citrulina (Knowles 1997). H_2O_2 é um potente indutor da produção de $\text{NO}^\bullet$ através das células endoteliais e parece estar envolvido na ativação da NOS pela fosforilação de serina 1179 e desfosforilação da treonina 495 (Thomas *et al.* 2002). Em excesso, $\text{NO}^\bullet$ pode inibir a citocromo oxidase, levando ao aumento do vazamento de elétrons e formação de superóxido. Excesso de $\text{NO}^\bullet$ leva a diversas patologias como epilepsia, inflamações crônicas como reumatismo e artrite e aumento do risco de câncer.

$\text{NO}^\bullet$ desempenha vários papéis fisiológicos. Como exemplo, temos o controle da pressão sanguínea. $\text{NO}^\bullet$ liga-se a Fe^{2+} da enzima guanilil ciclase fazendo com que esta se torne ativa e resultando em altos níveis de GMP cíclico, o qual diminui os níveis de Ca^{2+} intracelular e relaxa os músculos, dilatando os vasos e diminuindo a pressão sanguínea. $\text{NO}^\bullet$ também está envolvido na inibição da agregação plaquetária, na morte de organismos estranhos, nas funções gastrointestinais, entre outras funções (Halliwell e Gutteridge 1999).

São exemplos de doadores de $\text{NO}^\bullet$: o nitroprussiato de sódio (SNP), S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), espermina NONOato, entre outros. A liberação de $\text{NO}^\bullet$ por SNP está representada na equação 11 (Halliwell e Gutteridge 1999).

ROS atacam ligações peptídicas, resultando na fragmentação da proteína e formação de carbonilas protéicas. Além disso, oxidam resíduos de aminoácidos, podendo resultar em modificações estruturais e funcionais da proteína. O radical hidroxila pode atacar resíduos de tirosina, triptofano, fenilalanina e histidina, gerando uma série de produtos oxidados (Halliwell e Gutteridge 1999). Proteínas modificadas podem ser reconhecidas como “estranhas” pelo sistema imune, disparando a formação de anticorpos.

A exposição de DNA a oxidantes leva à formação de diversos tipos de lesões, como ataque às bases nitrogenadas, aos resíduos de ribose ou à ligação fosfodiéster. O radical hidroxila pode abstrair o hidrogênio do C1, C4 e C5 da 2'-desoxiribose, levando à formação de quebras (Cadet *et al.* 2008). Quebras de fita também podem ser induzidas por H_2O_2 , via formação de radical $HO^\bullet$ *in situ* catalisada por metais de transição ligados ao DNA (Mello Filho e Meneghini 1984). Quebras de fita simples ou dupla no DNA são as lesões mais tóxicas para a célula pois elas impedem a síntese do DNA e bloqueiam o ciclo celular, recrutando mecanismos de reparo ou desencadeando a apoptose (Rich *et al.* 2000).

1.7. Vias de sinalização envolvendo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

A indução da expressão gênica pode ser regulada por peróxido de hidrogênio (Allen e Tresini 2000). O H_2O_2 atua como segundo mensageiro na ativação do fator de transcrição NF- κ B. Esse fator de transcrição localiza-se no citoplasma das células em associação com seu inibidor I κ -B. A adição de H_2O_2 nas células resulta na dissociação do NF- κ B do seu inibidor, e na translocação de NF- κ B para o núcleo (Schreck *et al.* 1991).

As ROS podem também estar envolvidas com eventos de fosforilação de proteínas, como a MAP-quinase que é ativada por H_2O_2 em animais (Fialkow *et al.* 1994; Guyton *et al.* 1996) e plantas (Desikan *et al.* 1999; Kovtun *et al.* 2000). H_2O_2 pode também inibir as fosfatases, provavelmente por oxidar as cisteínas no sítio ativo destas enzimas (Sullivan *et al.* 1994; Wu *et al.* 1998).

Em *Dictyostelium* foi mostrado um papel para superóxido como uma molécula sinalizadora necessária para o início do desenvolvimento. Quando uma molécula que sequestra superóxido foi utilizada ou quando a enzima superóxido dismutase foi super-expressa, observou-se a inibição da formação de agregados (Bloomfield e Pears 2003).

As células de *Dictyostelium* produzem NO• durante todo o crescimento e aumentam a produção de NO• durante a fase de pré-agregação, na transição de crescimento para desenvolvimento (Tao *et al.* 1997). A adição de compostos geradores de NO• inibem a agregação sem alterar a produção de GMP cíclico, sugerindo que a inibição da agregação através de NO• é independente de um efeito na atividade de guanilil ciclase (Tao *et al.* 1992). Posteriormente foi visto que a inibição da agregação em resposta à adição de NO• está relacionada com o impedimento da iniciação dos pulsos de AMPc, porém o efeito inibitório de NO• foi revertido através da adição de pulsos de AMPc, indicando que a atividade receptor/adenilil ciclase não foi inibida (Tao *et al.* 1996). O mecanismo pelo qual NO• inibe a sinalização de AMPc não está claro. Em outros sistemas, NO• pode inibir enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GADPH) e a cis-aconitase (Halliwell e Gutteridge 1999). Em *Dictyostelium*, a enzima GADPH é inibida, mas essa inibição é revertida em 10 minutos o que não poderia explicar os efeitos de NO• na diferenciação celular (Tao *et al.* 1992; Tao *et al.* 1994).

2. Objetivos

Dando continuidade aos estudos realizados em nosso laboratório para analisar a via regulada pela proteína quinase YakA, este projeto teve os seguintes objetivos:

1. Dar continuidade aos estudos da função de KeaA no controle do crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses

1.1. Obter um mutante nulo para *keaA*

1.2. Analisar os níveis de mRNA de *keaA* no crescimento e no desenvolvimento

1.3. Analisar se KeaA está envolvido na síntese de AMPc em resposta a estresses oxidativo e nitrosoativo

1.4. Buscar explicações para a deficiência no processo de agregação em baixa densidade celular observado em células deficientes em *keaA*

1.5. Analisar os mutantes que super-expressam a região rica em cisteínas e o domínio Kelch

1.6. Analisar se ocorre interação entre PKA e KeaA

2. Identificar através da técnica de microarranjo novos componentes envolvidos na via modulada por YakA/PufA/KeaA/PkaC

2.1. Seleção de genes e implementação da tecnologia de microarranjos de cDNA

2.2. Padronização do modo de normalização dos dados de expressão gerados, bem como de detecção de genes diferencialmente expressos.

2.3. Hibridização de amostras provenientes de células selvagens e células deficientes em *keaA* submetidas a diferentes tratamentos.

2.4. Detecção de genes diferencialmente expressos e validação pela técnica de qPCR.

3. Metodologia

3.1. Procedimentos experimentais utilizando células de *Dictyostelium discoideum*

Os protocolos experimentais utilizando *D. discoideum* a seguir são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de protocolos descritos na literatura e no banco de dados de *D. discoideum* (Sussman e Sussman 1967; Sussman 1987; Fey *et al.* 2007; Gaudet *et al.* 2007).

3.1.1. Condições de manutenção e cultivo das células

Estoques de *Dictyostelium discoideum* foram cultivados em placas de meio SM (bacto-peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,1% (p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v), glicose 1% (p/v), agar 2% (p/v), K_2HPO_4 3,4 mM, KH_2PO_4 14 mM, pH 6,4). Para iniciar uma cultura em meio sólido, a partir de células cultivadas em placas, uma pequena quantidade de corpos de frutificação foi coletada com o auxílio de uma alça de platina e transferida para uma placa de meio SM. A essa placa foram adicionados 250 μL de uma suspensão de bactérias *Klebsiella aerogenes* preparada em meio LB (Tryptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 0,17 M, pH 7,5). Os esporos de *Dictyostelium* juntamente com as bactérias foram espalhados com o auxílio de uma alça de vidro. As placas foram mantidas a 22°C e a cada 10 dias um novo estoque foi feito.

Estoques de células foram mantidos a - 80°C. Para o congelamento foi utilizado um sedimento com aproximadamente 6×10^7 células obtido a partir de células em crescimento exponencial. O sedimento foi ressuspense em 2 mL de HL-5 (proteose peptona nº 2 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), glicose 1%, KH_2PO_4 2,5 mM, Na_2HPO_4 1,3 mM, pH 6,5) contendo 10% de DMSO. Alíquotas de 500 μL da solução de células foram colocadas em tubos criogênicos e esses foram transferidos para o gelo seco e posteriormente armazenados a - 80°C. Alternativamente, as células foram congeladas a partir de células cultivadas em placas SM. Para tal, foram adicionados 2 mL de solução de HL-5 contendo 10% de DMSO em uma placa contendo células na fase de crescimento, a solução foi espalhada com o auxílio da alça de vidro e foram feitas alíquotas como descrito anteriormente.

Para iniciar uma cultura em meio sólido, a partir dos estoques mantidos a - 80°C, as células foram descongeladas na presença de 500 μL de uma suspensão de bactérias *K. aerogenes* e a suspensão obtida foi semeada em meio SM, 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.

O cultivo em meio líquido foi iniciado a partir de células no início da fase de desenvolvimento obtidas em placas de meio SM. Uma pequena fração dessas células foi transferida para um frasco contendo 10 mL de meio HL-5_{P/S} (HL-5 contendo 1% (v/v) de Penicilina/Streptomicina) e mantida sob agitação de 200 rpm a 22°C por 2 dias. Após esse período, o volume da cultura foi aumentado para 50 mL. A densidade dessas culturas foi sempre mantida entre 2 e 6x10⁶ células/mL, faixa na qual o crescimento está na fase exponencial.

3.1.2. Indução de estresses oxidativo, nitrosoativo e nutricional

3.1.2.1. Tratamento de células com SNP ou H₂O₂ e coleta de amostras para extração de RNA

As células foram diluídas para 0,5x10⁶ células/mL em 250 mL de HL-5_{P/S} e o tratamento com SNP ou H₂O₂ foi realizado quando as células atingiram 1,0x10⁶ células/mL. Essas células foram tratadas com 500 µM de SNP ou 500 µM de H₂O₂ durante 12 horas a 22°C. Os experimentos de tratamento com SNP e H₂O₂ foram feitos em um mesmo dia e paralelamente um frasco onde as células não foram tratadas também foi feito. Com o auxílio da câmara de Neubauer, as células foram contadas e alíquotas contendo 2x10⁷ células para extração de RNA total ou 1x10⁷ para extração de RNA mensageiro foram coletadas após 2 e 12 horas tanto dos frascos que foram submetidos ao tratamento quanto do frasco em que não houve adição de droga. Células também foram coletadas minutos antes da adição das drogas, ou seja na densidade de 1x10⁶ células/mL, e esse ponto foi considerado o ponto 0h. O volume necessário para a obtenção de 1x10⁷ ou 2x10⁷ células/mL foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, o qual foi submetido à centrifugação a 970xg por 5 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de tampão Sorensen (gelado) e transferido para um tubo de 1,5 mL, o qual foi submetido a uma breve centrifugação para a coleta das células. O sedimento foi congelado imediatamente e armazenado a - 80°C até o momento da extração.

3.1.2.2. Carenciamento em filtro e coleta de amostras para extração de RNA

Para obtenção de amostras de células em diferentes fases do desenvolvimento, células provenientes de culturas em meio líquido e no início da fase exponencial de crescimento foram submetidas à carência nutricional sobre filtros de nitrocelulose Millipore pretos de poros de 0,45 μm e com 47 mm de diâmetro. Esses filtros foram fervidos em água destilada por 10 minutos por três vezes e colocados sobre pré-filtros (Schleicher & Schuel n° 8 47 mm), previamente colocados em placas de Petri e embebidos em 0,5 μL de tampão Sorensen (KH_2PO_4 20 mM pH 6.4). As células foram coletadas através de centrifugação a 970xg por 5 minutos a 4°C e lavadas em tampão Sorensen por três vezes para a retirada completa do meio. Uma alíquota de 5×10^7 células suspensas em 1 mL de Sorensen foi espalhada uniformemente sobre um filtro de 47 mm de diâmetro (densidade celular $\approx 29 \times 10^5$ células/ cm^2) e incubada em câmara úmida e escura a 22°C. Nessas condições obtínhamos o desenvolvimento sincrônico e completo até a formação do corpo de frutificação maduro, com duração em média de 24 horas. Os estágios de desenvolvimento foram monitorados por observação em lupa e as células foram coletadas ou fotografadas de acordo com o experimento planejado. Para a coleta das células dos filtros, foi utilizado um tubo cônico de 50 mL contendo aproximadamente 40 mL de tampão Sorensen (gelado) onde foi colocado o filtro com a face contendo as células voltadas para dentro. O tubo foi vortexado brevemente para as células soltarem do filtro e depois centrifugado nas mesmas condições descritas acima. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de tampão Sorensen (gelado), dividido em dois tubos os quais foram submetidos a uma breve centrifugação para a coleta das células. O sedimento foi congelado imediatamente e armazenado a - 80°C até o momento da extração. Para a coleta de amostras até 12 horas de desenvolvimento foi utilizado um filtro para cada ponto coletado, para estágios mais avançados do desenvolvimento foram utilizados de 2 a 3 filtros.

3.1.2.3. Carenciamento em placas agar/fosfato e coleta de amostras para extração de RNA

Para o desenvolvimento em placas agar/fosfato (PHYTAGAR 0,5% (p/v), bacto-agar 0,5% (p/v) em tampão Sorensen) as células, em fase exponencial de crescimento, foram coletadas através de centrifugação a 970xg por 5 minutos a 4°C e

lavadas em tampão Sorensen (gelado) por três vezes para a retirada completa do meio. Uma alíquota de $2,5 \times 10^7$ células ressuspensa em 5 mL de Sorensen (gelado) foi colocada sobre uma placa de 8,5 cm de diâmetro (densidade celular $\approx 4,4 \times 10^5$ células/cm²) e esperou-se 15 minutos para as células decantarem. Após esse tempo, o excesso de tampão foi retirado da placa e essa foi incubada em câmara úmida e escura a 22°C. Nessas condições obtínhamos o desenvolvimento sincrônico e completo até a formação do corpo de frutificação maduro, com duração em média de 24 horas. Os estágios de desenvolvimento foram monitorados por observação em lupa e as células foram coletadas ou fotografadas de acordo com o experimento planejado. Para a coleta das células, 2,5 mL de tampão Sorensen (gelado) foram adicionados a cada placa e as células foram soltas da placa com o auxílio de uma alça de vidro. A solução coletada foi dividida em dois tubos os quais foram submetidos a uma breve centrifugação para a coleta das células. O sedimento foi congelado imediatamente e armazenado a - 80°C até o momento da extração. Para a coleta de amostras até 12 horas de desenvolvimento foram utilizadas duas placas para cada ponto coletado, para estágios mais avançados de desenvolvimento foram utilizadas 3 placas.

3.1.2.4. Crescimento e carenciamento em placas SM e coleta de amostras para extração de RNA

Para crescimento em placas de meio SM na presença de bactéria, 5×10^5 células foram plaqueadas com 0,2 mL de uma cultura de *K.aerogenes* crescida durante a noite. Para a coleta das células, 2,5 mL de tampão Sorensen (gelado) foram adicionados a cada placa e as células foram soltas da placa com o auxílio de uma alça de vidro. A solução coletada foi dividida em dois tubos os quais foram submetidos a uma breve centrifugação para a coleta das células. O sedimento foi congelado imediatamente e armazenado a -80°C até o momento da extração.

3.1.2.5. Carenciamento em meio líquido e adição de pulsos de AMPc

Células crescendo exponencialmente em meio HL-5_{P/S} foram coletadas através de centrifugação a 970xg por 5 minutos a 4°C e foram lavadas em tampão Sorensen. As células foram ressuspensas para 1×10^6 células/mL em 10 mL do mesmo tampão e submetidas à carência por 2 horas. Após esse período, pulsos de AMPc de 80 nM foram adicionados em intervalos de 6 em 6 minutos durante 4 horas. Depois de 6

horas de carenciamento em meio líquido as células foram coletadas e o número de células isoladas foi contada com o auxílio da câmara de Neubauer. Nessas seis horas as células foram mantidas a uma rotação de 100 rpm e a 22°C.

3.1.3. Medida dos níveis de AMPc em células tratadas ou não com SNP ou H₂O₂

Células tratadas ou não com 500 µM de SNP por 24 horas ou 500 µM de H₂O₂ por 12 horas segundo o item 4.1.2.1 foram contadas e alíquotas de 5x10⁶ células foram coletadas e congeladas a - 80°C para medidas dos níveis de AMPc. Os níveis de AMPc foram medidos utilizando o *BIOTRAK cAMP* ¹²⁵I Assay System (Amersham Pharmacia Biotech) segundo o manual do fabricante.

3.1.4. Curva de proliferação

Células foram diluídas para 0,5x10⁶ células/mL ou para 1x10⁶ células/mL, dependendo da linhagem, em 10 mL de meio HL-5_{P/S}. As células foram contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer por três vezes ao dia durante 5 dias.

3.1.5. Transfecção de DNA por eletroporação

Aproximadamente, 5x10⁶ células em fase exponencial de crescimento foram coletadas por centrifugação a 350xg durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas por duas vezes com tampão H-50 (Hepes 20 mM, KCl 50 mM, NaCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, NaHCO₃ 5 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, pH 7,0) gelado utilizando as condições de centrifugação descritas acima. O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão H-50 gelado, seguido por adição de 10 µg de DNA sendo que o volume da solução de DNA foi mantido menor que 10% do volume total. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 1 mm e a cubeta foi mantida no gelo por 5 minutos. As células foram eletroporadas no aparelho Electro Cell Manipulator (BTX) nas seguintes condições: 0,85 kV/25 µF e resistência de 13 Ω por duas vezes com intervalo de 5 segundos entre os pulsos. Em seguida, a cubeta foi incubada no gelo por 5 minutos. Após esse período, as células foram transferidas para uma placa de Petri contendo 10 mL de meio HL-5_{P/S}. A placa foi incubada por 24 horas a 22°C e após esse período a droga de seleção foi adicionada e a placa foi mantida por um período de 5 dias a 22 °C. Tipicamente os clones demoraram cerca de 5 dias para aparecer, surgindo como aglomerados aderidos à placa. As células suspensas correspondem à células mortas. Paralelamente, foi feito um controle negativo, onde

não foi adicionado o DNA e um controle positivo, onde foi adicionado o plasmídeo vazio. Após os 5 dias, o meio foi retirado cuidadosamente para não remover os clones aderidos na placa e os clones foram ressuspensos em 3 ou 5 mL (dependendo da quantidade de clones) de meio contendo a droga de seleção apropriada. A suspensão foi incubada a 22°C por 24 horas e após esse período, diluições foram plaqueadas em placas de meio SM para o isolamento dos clones. Clones foram coletados e crescidos em meio HL-5_{P/S} contendo a droga apropriada.

3.1.6. Extração de RNA

3.1.6.1. RNA total

Amostras de 2×10^7 células armazenadas a - 80°C foram descongeladas pela adição de 400 µL de solução Tris 50 mM pH 8,0, SDS 1% (p/v), DEPC 1,25% (v/v), preparada na hora do uso e 400 µL de fenol/clorofórmio equilibrado em água e a suspensão foi submetida à vigorosa agitação até a dissolução completa do sedimento de células. Após centrifugação a 16000xg por 5 minutos à temperatura ambiente, a fase aquosa (fase de cima) foi transferida para outro tubo já contendo 400 µL de fenol/clorofórmio equilibrado em água. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente. Essa etapa foi repetida até que o sobrenadante se apresentasse límpido. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo e foram adicionados 0,3 volumes de solução de acetato de sódio 3 M pH 4,7 e 400 µL de fenol/clorofórmio equilibrado em água. Essa mistura foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e a fase aquosa foi transferida para um outro tubo já contendo 2 volumes de etanol 100% seguida de incubação em gelo seco por uma hora e centrifugação a 13400xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a 30°C por centrifugação a vácuo durante aproximadamente 5 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 40 µL de H₂O MilliQ contendo 0,1% de DEPC e incubado por 15 minutos a 65°C. A concentração final de RNA foi determinada pela medida da absorbância a 260 nm.

3.1.6.2. RNA mensageiro

Para extração de RNA mensageiro foi utilizado o *µMACS mRNA Isolation kit* (Miltenyi Biotec), segundo as instruções do fabricante.

O mRNA foi quantificado utilizando-se o aparelho NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer).

3.1.7. Extração de DNA genômico

Aproximadamente 5×10^7 células foram coletadas por centrifugação a 970xg por 5 minutos a 4°C a partir de uma cultura crescendo em meio líquido. O meio de cultura foi desprezado, as células foram colocadas em gelo e 75 µL de EDTA gelado 150 mM, pH 8,0, foram adicionados. Em seguida, foram adicionados 100 µL de Sarcosil 10% (p/v) e o tubo foi agitado moderadamente e incubado a 55°C por 20 minutos. Após esse período, foram adicionados 250 µL de acetato de amônio 4 M e, após agitação, o tubo foi centrifugado a 16000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio equilibrado em TE. O tubo foi agitado e centrifugado a 16000xg por 4 minutos à temperatura ambiente. Essa extração foi repetida por mais uma vez, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado igual volume de clorofórmio seguido por centrifugação nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado pela adição de 2,2 volumes de etanol 100% e 0,1 volume de acetato de potássio 3M pH 5,5. Após agitação o tubo foi centrifugado a 16000xg por 15 minutos à temperatura ambiente e o precipitado foi lavado em etanol 75% (v/v) e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco por centrifugação a vácuo por 5 minutos e ressuspenso em 100µL de TE/RNase (Tris 10mM pH 8,0, EDTA 1mM, 0,02 µg/µL RNase). A concentração do DNA foi estimada pela medida da absorbância a 260 nm.

3.2. Procedimentos para manipulação de células de *Escherichia coli*

Os protocolos experimentais relativos à manipulação de bactérias e preparação de plasmídios são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de protocolos descritos na literatura (Sambrook J. et al. 1989; Ausubel et al. 1995).

3.2.1. Preparação de bactérias competentes para transformação

Células de *E.coli* da cepa DH5α foram estriadas em placas de meio LB e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas. Uma colônia foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido e incubada a 37°C por aproximadamente 16 horas a 200 rpm. Posteriormente, 2 mL do pré-inóculo foram transferidos para 250 mL de meio SOB

(extrato de levedura 0,5% (p/v), triptona 2% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM) e essa suspensão foi incubada a 19°C a 200 rpm até que a OD₆₀₀ atingisse aproximadamente 0,5. A seguir a cultura foi mantida no gelo por 10 minutos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 1780xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 80 mL de tampão TB gelado (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM). A suspensão foi incubada no gelo por 10 minutos e posteriormente centrifugada nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi ressuspensionado em 20 mL de tampão TB gelado contendo 7% de DMSO. Foram feitas alíquotas de 100 µL as quais foram estocadas a - 80°C por um período máximo de três meses.

3.2.2. Transformação de bactérias por choque térmico

Metade do volume da reação de ligação foi adicionada a 100 µL de bactérias competentes, descongeladas previamente em gelo. Os tubos foram deixados em repouso no gelo por 30 minutos e após esse período, as bactérias foram submetidas a choque térmico, a 42°C por 1 minuto e imediatamente recolocadas no gelo. Para permitir que se recuperassem do estresse resultante do choque térmico adicionou-se 1 mL de meio LB seguido por incubação a 37°C por 1 hora a 200 rpm. Após esse período, as células foram concentradas por centrifugação e ressuspensas em 200 µL de meio LB. Cada uma das suspensões bacterianas foi então transferida para placas de meio LB contendo o antibiótico adequado (carbenicilina 100 µg/mL ou kanamicina 50 µg/mL) na presença ou não de X-gal (80 µg/mL) dependendo do plasmídeo utilizado. As placas foram incubadas a 37 °C por 16-18 horas.

3.2.3. Extração de DNA plasmidial em pequena escala

Plasmídios foram extraídos segundo o método da lise alcalina, descrito abaixo, ou através do *QIAprep® Spin Miniprep Kit*, segundo instruções do fabricante.

Bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram incubadas a 37°C, por 16 -18 horas a 200 rpm em 2 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado. Foram transferidos 1,5 mL da cultura para um tubo e submetidas à centrifugação por 1 minuto a 16000xg à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspensionado em 100 µL da solução GTE (Tris 20 mM pH 8,0, glicose 50 mM, EDTA 10 mM). A seguir foram adicionados 200 µL de solução NaOH/SDS, preparada na hora do uso (NaOH 0,2N, SDS 1% (p/v)), homogeneizando-se por inversão, e 150 µL de

acetato de potássio 5 M pH 4,8. Após centrifugação por 6 minutos a 16000xg, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo completando-se para 1,0 mL com etanol 100% e misturando vigorosamente. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado, o precipitado lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em 50 µL de TE/RNase. A quantificação foi determinada pela medida da absorbância em 260 nm.

3.2.4. Extração de DNA plasmidial em grande escala

Bactérias contendo o plasmídio de interesse foram inoculadas em 2 mL de meio LB contendo o antibiótico adequado e incubadas a 37°C, por 16-18 horas a 200 rpm. Após esse período, 2 mL do pré-inóculo foram transferidos para 250 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado. A cultura foi centrifugada a 13750xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi completamente removido e o sedimento ressuspenso em 15 mL de GTE. Foi adicionado o dobro do volume de solução NaOH/SDS e inverteu-se o frasco delicadamente por cerca de 5 vezes. Por fim, foram adicionados 15 mL de acetato de potássio 5 M pH 4,8 seguido de agitação vigorosa. A mistura foi incubada no gelo por 20 minutos e centrifugada a 13750xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em gaze para um novo tubo, seguido por adição de 0,6 volume de isopropanol e centrifugação a 13750xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi deixado em estufa a 37°C para a completa evaporação do isopropanol.

O precipitado foi ressuspenso em 2,5 mL de TE. Proteínas foram precipitadas pela adição de acetato de amônia 2,5 M, seguida por agitação vigorosa e incubação no gelo por 20 minutos. A solução foi centrifugada a 19129xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 2,2 volumes de etanol 100%, seguida por agitação vigorosa e incubação no gelo por 20 minutos. Após centrifugação a 19129xg por 15 minutos a 4°C, o etanol foi descartado e o precipitado foi seco e dissolvido em 2,5 mL de TE contendo 2,5 µL de RNase 10 µg/mL. A preparação foi incubada a 37°C por 15 minutos e foram adicionados NaCl para 1,5 M final e 1/4 do volume de solução PEG/NaCl (PEG 6000 30% (p/v), NaCl 1,5 M). Após cerca de 16 horas a 4°C o DNA foi centrifugado a 23900xg por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 50 µL de água, 50 µL de tampão PK (Tris 0,1 M pH 8,0, EDTA 0,25 M pH 8,0, SDS 10% (p/v)) e 10 µL de proteinase K (5 mg/mL) seguido por incubação a 37°C por 30 minutos. Seguiu-se com extração com fenol saturado em Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e uma extração com fenol

clorofórmio 1:1. O DNA foi precipitado em etanol 100% na presença de 0,3 M de acetato de potássio pH 5,5 e centrifugado por 16000xg por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 100 µL de TE. A quantificação foi determinada pela medida da absorbância em 260 nm.

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

Os protocolos experimentais utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* descritos a seguir foram adaptados de protocolos descritos nos manuais dos fabricantes dos reagentes utilizados bem como de protocolos descritos na literatura. (Sherman *et al.* 1986; Sambrook J. *et al.* 1989; Vojtek e Hollenberg 1995; Bai e Elledge 1997; Woods e Gietz 2001; Gietz e Woods 2002).

3.3.1. Análise *in vivo* da interação de proteínas pelo método do duplo híbrido

No sistema utilizado neste trabalho genes das proteínas de interesse foram clonados nos plasmídios pGBKT7 e pGADT7 (*MATCHMAKER Two-Hybrid System* - Clontech). O vetor pGBKT7 confere a expressão, sob controle do promotor ADH1, de proteínas em fusão ao domínio de ligação do fator de transcrição GAL4 e possui como marca nutricional o triptofano. Esse vetor também confere resistência à kanamicina. O plasmídio pGADT7 confere a expressão, também sob o controle do promotor ADH1, de proteínas em fusão ao domínio de ativação do fator de transcrição GAL4 e possui como marca nutricional a leucina. Esse vetor também confere resistência à ampicilina. GAL4 é um fator de transcrição de leveduras que permite a expressão de genes relacionados ao metabolismo de galactose.

A cepa utilizada foi a AH109 de *S.cerevisiae* a qual possui integrado em seu genoma os genes repórteres *HIS3* e *lacZ*, cujas expressões são controladas por dois diferentes promotores, GAL1 e MEL1, respectivamente. O gene *HIS3* de levedura codifica a enzima imidazol-glicerol-fosfato desidratase, que catalisa o sexto passo da síntese da histidina e o *lacZ* de bactéria codifica a enzima β-galactosidase, a qual é uma hidrolase que catalisa a hidrólise de β-galactosídeos em monossacarídeos. A cepa AH109 é auxotrófica para adenina, histidina, leucina e triptofano.

Os plasmídios foram co-transformados na cepa AH109 e os clones contendo os dois plasmídios foram selecionados através do crescimento em placas privadas de triptofano e leucina. A técnica de duplo híbrido explora o fato de que o domínio de

ligação ao DNA de GAL4 é incapaz de ativar a transcrição sozinho, mas para que a transcrição ocorra não é necessário estar associado covalentemente ao domínio de ativação de GAL4, apenas a proximidade entre os dois domínios já é suficiente. Como a interação entre a isca e a presa aproxima o domínio de ativação e o domínio de ligação de GAL4 ocorre à ativação da transcrição dos genes repórteres (Figura 9).

Figura 9: O Sistema de duplo híbrido. O gene da proteína isca é clonado no vetor pGBKT7, o qual confere expressão de proteínas em fusão ao domínio de ligação ao DNA, sob o controle do promotor constitutivo ADH1; possui resistência à kanamicina e triptofano como marca auxotrófica. O gene da proteína alvo é clonado no vetor pGADT7, o qual confere expressão de proteínas em fusão ao domínio de ativação; possui resistência à ampicilina e leucina como marca auxotrófica. Os dois plasmídios são transformados na cepa AH109 e a seleção é feita através de meio seletivo privado

de triptofano e leucina. A interação isca-alvo aproxima o domínio de ligação e de ativação de GAL4 ativando assim a transcrição dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*.

3.3.2. Condições de 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%). As placas foram incubadas a 30°C por aproximadamente 48 horas. Para preparar culturas líquidas, inoculamos colônias das placas de YPD por 16-18 horas a 30°C com agitação a 200 rpm. Para a maioria das linhagens, esse procedimento fornece uma cultura com $DO_{600nm} > 1,5$.

As linhagens transformadas com plasmídios carregam pelo menos uma marca nutricional que permite seleção de transformantes através de seu crescimento em meio SD contendo os aminoácidos apropriados para permitir a seleção de transformantes (*Minimal SD Base* (Clontech) 2,67%, *Dropout supplement* -His / -Leu / -Trp / -Ura (Clontech) 0,06%). Como, para os ensaios de duplo híbrido, foram utilizados os plasmídios pGBKT7, o qual possui como marca nutricional o triptofano, e o pGADT7, o qual possui como marca nutricional a leucina e como a interação entre as proteínas permite que as células cresçam em meio sem histidina, foram preparadas soluções estoques de 4 mg/mL dos aminoácidos leucina, triptofano, uracila e histina, já que estávamos utilizando *Dropout supplement* -His/-Leu /-Trp /-Ura. Para preparação das diferentes soluções, não adicionamos os aminoácidos utilizados para a seleção, por exemplo, para a seleção de células transformadas com pGBKT7 foi utilizado *Dropout supplement* -His/-Leu /-Trp/-Ura e adicionado histidina, leucina e uracila. A concentração final para os aminoácidos adicionados foi de 100 mg/L para leucina, 20 mg/L para histidina, 20 mg/L para uracila e 20 mg/L para triptofano.

3.3.3. Transformação de levedura pelo método do acetato de lítio

A linhagem AH109 (MATa, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80 Δ*, *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*) obtida da Clontech, foi inoculada em 10 mL de YPD. A cultura foi incubada a 30°C por um período de aproximadamente 12 horas. Cerca de 8 mL da cultura foram transferidos para tubos estéreis e centrifugados por 10 minutos, 1780xg à temperatura ambiente. As células foram suspensas em 2 mL de água estéril e centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores. Em seguida, adicionou-se ao sedimento 200 µL de solução TE/LiOAc preparada na hora (1X TE (Tris.HCl 10

mM pH 7,5; EDTA 1mM); $C_2H_3LiO_2$ 0,1 M, pH 7,5). 5 μ g do DNA a ser utilizado na transformação, foram transferidos para um tubo juntamente com 200 μ g de DNA de esperma de salmão (20 μ g/ μ L). 100 μ L de células foram adicionados ao DNA e misturados com a ajuda da micropipeta. Em seguida, foram adicionados, 600 μ L de solução estéril PEG/LiOAc (PEG 4000 40%, $C_2H_3LiO_2$ 0,1 M 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. Posteriormente, o preparo foi centrifugado a 3300xg por 2 minutos e o sobrenadante removido com o auxílio da micropipeta. Por fim, as células foram ressuspensas em 0,4 mL de TE pH 7,5 e semeadas em meio seletivo apropriado. As placas foram incubadas a 30°C por no mínimo 48 horas ou até o aparecimento de colônias.

3.3.4. Detecção de interação utilizando diluição seriada

As leveduras transformadas foram crescidas durante aproximadamente 16 horas em meio SD na ausência de triptofano e leucina (meio seletivo duplo). A DO_{600nm} das culturas foram medidas e foram normalizadas para aproximadamente 0,5. Um total de 100 μ L de cada cultura foram transferidos para poços de uma microplaca e diluídos 5 vezes a partir da cultura inicial em meio SD líquido. Foram aplicados 5 μ L de cada suspensão (diluídas ou não) em meio seletivo contendo histina (meio seletivo duplo) ou não (meio seletivo triplo). As placas foram incubadas a 30°C por 2-3 dias e em seguida escanadas para a comparação do crescimento entre elas.

3.3.5. Teste de β -galactosidase

Colônias de leveduras crescidas em meio SD com os suplementos requeridos pela linhagem foram depositadas sobre filtro de nitrocelulose e testadas quanto à ativação do gene repórter *lacZ*. Para tanto, 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 e embebido em 5 mL de Tampão Z (NaH_2PO_4 40 mM, Na_2HPO_4 60 mM pH 7,0, KCl 10 mM e $MgSO_4$ 0,1 mM) contendo X- β -Gal 1 mg/mL e β -mercaptoetanol 4 mM. 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 8 horas.

3.4. Manipulação e análise de ácidos nucleicos

3.4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As PCRs foram, de um modo geral, realizadas em soluções contendo: 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTP, 1X *Advantage 2 PCR Buffer* (Clontech), 1X *Advantage 2 Polymerase Mix* (Clontech) e 50 a 100 ng DNA em um volume final de 50 µL. As condições foram: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida por 25 a 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a uma temperatura variável de acordo com a T_m dos oligonucleotídeos e 1 a 3 minutos a 68°C. A reação foi terminada por incubação a 68°C de 1 a 3 minutos.

3.4.2. Digestão de DNA com enzimas de restrição

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

3.4.3. Eletroforese em gel de agarose

3.4.3.1. Para DNA

Amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,7% em TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. A eletroforese foi mantida a aproximadamente 80 V em tampão TAE 1x por aproximadamente 1 hora. Às amostras de DNA foram adicionadas 0,5 volume de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)). O gel foi observado com transiluminador ultravioleta e fotografado utilizando o equipamento ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

3.4.3.2. Para RNA

Amostras de RNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,25% (p/v) em MOPS 10X pH 7,0 (MOPS 0,2 M, CH₃COONa 20 mM, EDTA 10 mM) contendo 19% (v/v) de formaldeído 37%. A eletroforese foi mantida a 80 V em tampão MOPS 1x por aproximadamente 1 hora. Às amostras de RNA, foram adicionadas 1 volume de

tampão de amostra (formamida 64,4% (v/v), MOPS 1,3x, formaldeído 2.8% (v/v), azul de bromofenol 0,35% (p/v), 50 µg/mL de brometo de etídeo em água tratada com DEPC). O gel foi observado com transiluminador ultravioleta e fotografado utilizando o equipamento ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

3.4.4. Extração de DNA de gel

A purificação foi executada utilizando-se o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Biosciences), seguindo as instruções do fabricante.

3.4.5. Reações de ligação

3.4.5.1. Ligação no vetor pCR® 2.1 utilizando o *TA Cloning® Kit* (Invitrogen)

Para as reações de ligação no vetor pCR®2.1 foram utilizados 1,0 µL (4 U) de T4 DNA ligase, 1,0 µL de T4 *DNA Ligase Reaction Buffer* 10x, 18,5 ng do vetor pCR®2.1 e o produto da eluição da banda proveniente da reação de PCR para uma proporção inserto:vetor de 3:1, em um volume total de 10 µL. A reação de ligação foi mantida a 14°C por aproximadamente 16 horas.

3.4.5.2. Ligação nos vetores pGBKT7 e pGADT7

Para as reações de ligação nos vetores pGBKT7 e pGADT7 foram utilizados 1,0 µL (4 U) de T4 DNA ligase (Invitrogen), 2,0 µL de T4 *DNA Ligase Reaction Buffer* 5x, o produto da eluição da banda proveniente da digestão dos vetores com as enzimas apropriadas e o produto da eluição da banda proveniente da reação de digestão do vetor pCR® 2.1 ligado a sequência de interesse para uma proporção inserto:vetor de 3:1, em um volume total de 10 µL. A reação de ligação foi mantida a 14°C por aproximadamente 16 horas.

3.4.6. Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas com o Sistema *Big Dye Terminator* versão 3.1 (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do

fabricante. Cada reação foi realizada com 100 a 200 ng de DNA e 10 pmol de oligonucleotídeo. A reação de PCR foi feita em um Termociclador DNA Engine PTC-200 (MJ Research) segundo um programa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 51°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Após a reação de PCR, os produtos obtidos foram purificados mediante precipitação com etanol. Para isso, a cada uma das reações, foram adicionados 25 µL de etanol absoluto, 1 µg de glicogênio e 1 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2. A reação foi incubada em gelo por 20 minutos seguindo-se por centrifugação a 4°C, 3220xg por 40 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e os tubos foram centrifugados, na posição invertida, a 100xg por 1 minuto, para a retirada de solução do meio. 50 µL de etanol 70% (v/v) foram adicionados a cada uma das reações, seguido por centrifugação a 4°C, 3220xg por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e os tubos foram novamente centrifugados, na posição invertida, a 100xg por 1 minuto. As amostras foram secas a 96°C por 2 minutos e enviadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA no IQ-USP (SSDNA), que utiliza o equipamento ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A análise das sequências obtidas foram feitas através do programa BioEdit, do algoritmo ClustalW (Thompson et al. 1994) e do algoritmo Blastx (Altschul et al. 1997).

3.5. Construção de plasmídios e descrição dos oligonucleotídeos utilizados

Os oligonucleotídeos utilizados nas construções plasmidiais na técnica de duplo híbrido estão relacionados na **tabela 1**, bem como os sítios de restrição utilizados para a clonagem nos vetores pGBKT7 e pGADT7 e o tamanho do produto de PCR. As temperaturas de anelamento para amplificação dessas regiões estão representadas na **tabela 2**.

Produto de PCR	Oligonucleotídeos	Sítios de restrição	Tamanho (pb)
keaA	CATATG ATGTTTGTTGATAGCAATGG CGGG ATCC TTAAACTTGAAATTCAACATAAG	<i>Nde</i> I <i>Bam</i> HI	3624
domínio zf-C3HC4 (RING)	CATATG ATGTTTGTTGATAGCAATGG CGGG ATCC TTATACCGCCATTGTTATTTT	<i>Nde</i> I <i>Bam</i> HI	351
domínio rico em cisteínas	CGGA ATTC GTAATAATGGGGTCAAATAAT CGGG ATCC TTATGATTTTAAGGCATGTCC	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI	523
domínio Kelch	CGGA ATTC AATAATAATATAAGTGCGCCA CGGG ATCC TTAAACTTGAAATTCAACATAAG	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI	1005
domínio zf - C3HC4 e rico em cisteína	CATATG ATGTTTGTTGATAGCAATGG CGGG ATCC TTATGATTTTAAGGCATGTCC	<i>Nde</i> I <i>Bam</i> HI	1780
domínio rico em cisteínas e Kelch	CGGA ATTC GTAATAATGGGGTCAAATAAT CGGG ATCC TTAAACTTGAAATTCAACATAAG	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI	2367
pkaC	CGGA ATTC ATGAGTAAC TCAAATAATAATAGC CGGG ATCC TTAAAAATCCTTGAAAAGATG	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI	1947
pkaR	CGGA ATTC ATGACAAATAATATATCACATAACC CGGG ATCC TTAAGATTTTGGAGAGTTAAA	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI	984

Tabela 1: Lista de Oligonucleotídeos. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de *keaA*, do domínio zf-C3HC4 (*RING*), do domínio rico em cisteínas, do domínio Kelch, da região que compreende o domínio *RING* e o domínio rico em cisteínas e da região que compreende o domínio rico em cisteínas e o domínio Kelch e da *pkaC* e da *pkaR*. Em negrito estão representados os sítios de reconhecimento de cada enzima. As enzimas utilizadas para a clonagem nos vetores pGBKT7 e pGADT7 também estão representadas, bem como o tamanho das regiões ou genes amplificados.

Produto de PCR	Temperatura de anelamento (°C)
<i>keaA</i>	ND
domínio zf-C3HC4 (RING)	54
domínio	59,2
rico em cisteínas	
domínio Kelch	49,9
domínio zf - C3HC4 e	54,0
rico em cisteína	
domínio rico em	54,0
cisteínas e Kelch	
<i>pkaC</i>	55,6
<i>pkaR</i>	55,6

Tabela 2: Temperatura de anelamento. Temperatura de anelamento utilizada para a amplificação de cada produto de PCR. ND = não determinado.

3.5.1. Plasmídios utilizados

Plasmídios	Características relevantes	Fonte
pGBKT7	domínio de ligação de GAL4, TRP1, Kan ^r	Clontech
pGBKT7p53	GAL4::p53, TRP1, Kan ^r	Clontech
pGBKT7Lam	GAL4::Lamina C, TRP1, Kan ^r	Clontech
pGBKT7RING	GAL4::RING, TRP1, Kan ^r	Este estudo
pGBKT7cisteína	GAL4::cisteína, TRP1, Kan ^r	Este estudo
pGBKT7Kelch	GAL4::Kelch, TRP1, Kan ^r	Este estudo
pGBKT7RING/cisteína	GAL4::RING/cisteína, TRP1, Kan ^r	Este estudo
pGBKT7cisteína/Kelch	GAL4::cisteína/Kelch, TRP1, Kan ^r	Este estudo
pGBKT7 <i>keaA</i> completo	GAL4::i>keaA, TRP1, Kan ^r	Este estudo
pGBKT7 <i>pkaC</i>	GAL4::pkaC, TRP1, Amp ^r	Este estudo
pGBKT7 <i>pkaR</i>	GAL4::pkaR, TRP1, Amp ^r	Este estudo
pGADT7	domínio de ativação de GAL4, LEU2, Amp ^r	Clontech
pGADT7antígenoT	GAL4::antígenoT, LEU2, Amp ^r	Clontech
pGADT7 <i>keaA</i> completo	GAL4::i>keaA, LEU2, Amp ^r	Este estudo
pGADT7 <i>pkaC</i>	GAL4::pkaC, LEU2, Amp ^r	Este estudo
pGADT7 <i>pkaR</i>	GAL4::pkaR, LEU2, Amp ^r	Este estudo
pCL1	fator de transcrição GAL4, LEU2, Amp ^r	Clontech

Tabela 3: Lista de plasmídios utilizados nos ensaios de duplo híbrido.

Os oligonucleotídeos utilizados para sequenciar os produtos de PCR clonados no vetor pCR®2.1 foram o T7 e o M13 *Reverse*.

Os oligonucleotídeos utilizados para sequenciar os produtos de PCR clonados no vetor pGBKT7 foram o T7 e o 3' DNA BD cuja sequência é AAAAGCAAATTTTGGATTCTCAG e os oligonucleotídeos utilizados para sequenciar os produtos de PCR clonados no vetor pGADT7 foram o T7 e o 3' AD cuja sequência é CACTTGAACGCCCCAAAAAGTCATAGATGCTAA.

Para o genes *pkaC* e *keaA*, que são maiores que 1kB, foi necessário desenhar oligonucleotídeos internos para podermos obter a sequência completa. Esses oligonucleotídeos estão representados na tabela 4.

Oligonucleotídeo	Sequência
pkaC_interno1	AAATGTTCCAGTACCAA
pkaC_interno2	CAAATCCAATAACAACAC
keaA1_cys2_interno1	GTTGAATTGGAGATTGA
keaA1_cys2_interno2	TTATCTTCACCTTCGAT
cys1_keaA2_interno1	GTTGAGATGATGATGATG
cys1_keaA2_interno2	ATCATCTTCTTCATCATCT

Tabela 4: Primers utilizados no sequenciamento de *pkaC* e *keaA*.

3.6. PCR quantitativo (qPCR)

3.6.1. Transcrição reversa

Três a cinco µg de RNA total foram tratados com a enzima *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen) em um volume final de 10 µL de acordo com as instruções do fabricante e uma alíquota de 7,5 µL do RNA tratado foi utilizado para reação de transcrição reversa utilizando-se o *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit* (Invitrogen). 7,5 µL de RNA tratado com DNase, 50 ng de hexâmeros randômicos, 1 µL de dNTPs 10 mM e 0,25 µg de oligo(dT) foram misturados, incubados a 70°C por 5 minutos e colocados em gelo. Posteriormente, foram adicionados 2 µL de 10 X RT buffer, 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de água DEPC, 2 µL de DTT 0,1 M e 40 U de *RNAseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* e a mistura foi aquecida a 25°C por 10 minutos e depois a 42°C por 2 minutos. A enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase* foi, então, adicionada a cada tubo e a reação foi incubada a 42°C por 90 minutos, seguido por 10 minutos a 72°C e imediatamente

resfriada em gelo. O produto de cDNA foi tratado com 2 U de RNaseH de *E.coli* (Invitrogen) por 30 minutos a 37°C, seguidos por 10 minutos a 72°C.

3.6.2. Reação de PCR quantitativo

As reações de PCR quantitativo foram realizadas utilizando-se o *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em um equipamento *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados utilizando o programa *Primer Express 2.0 Software* (Applied Biosystems) e os principais parâmetros utilizados foram: tamanho do produto de PCR entre 50 e 150 pb, temperatura entre 58°C e 60°C, conteúdo de CG entre 30% e 80%. Quando não foi possível desenhar os oligos utilizando o programa citado acima, foi utilizado o programa *Primer3* disponível na *web*, utilizando os parâmetros especificados acima. Os oligos utilizados em reações de PCR quantitativo estão listados na **tabela 5**.

Oligos	Sequências
keaA_F	TTGAAACTTGGGAATGGGAAA
keaA_R	CAGCTAAAACCTCAGAAAAGTAACCA
dscA_F	GGTGCTGCTGTTACTGGTGT
dscA_R	GGTGGATAGCAATTGAACGA
csbB_F	TGAAGATGGGGAATCAACAA
csbB_R	GGAAATATTTGGGGAGCTGGT
cycB_F	GTCCACAAATCAAGGATTTTCGTT
cycB_R	ATTTGTCTTTCCATGTCGATAACCT
pefA_F	CAGCGACTTCCTTGGATTATGC
pefA_R	AGCAACACCAGTTCTCATTCTATCA
cmfB_F	GCCGCCTCTTTAATCGAAAA
cmfB_R	GGACGAAGGAACCAAGTCTTTG
IG7_F	GTGGTTCGGCACCTCGAT
IG7_R	CACCCCAACCCTTGGAAGT
culD_F	GTGCAGCTTACAGAGGCACT
culD_R	CTTCTTCACCAGCCTGGATT
acaA_F	TCCTTTGGTTGCTGGTTGTA
acaA_R	TCTTGAGCATTGGATTGCAT
pkaC_F	TTTGGCACCTGAAATCATTC
pkaC_R	AAGGTGGATAACCTGCCAAC
pkaR_F	GGTGAGGTTATTGTGCGTCAAG
pkaR_R	GTGACAACAACCTTTACCTTCAACGA
carA_F	ATGTTTCCACCAGCACTCAA
carA_R	AAATGTGACAGATGCCCAA

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados em reações de PCR quantitativo. F = *foward* e R = *reverse*.

Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata utilizando 0,6 µL do cDNA diluído 1:3, oligo F (*foward*) 600 nM, oligo R (*reverse*) 600 nM, 7,5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* e água milli-Q autoclavada em quantidade suficiente para 15 µL. O ciclo para as reações de PCR em tempo real foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos seguidos de anelamento a 60°C por 1 minuto. A especificidade dos

produtos amplificados foi analisada por curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Em paralelo, amostras de RNA tratadas com *DNAse I Amplification Grade* foram submetidas à reação de PCR quantitativo para confirmar a ausência de DNA genômico. Além disso, reações onde o cDNA não foi adicionado (NTC – *no template control*) foram feitas para confirmar a ausência de qualquer contaminante no meio reacional.

O gene normalizador utilizado foi o IG7, o qual codifica a subunidade maior do RNA ribossomal da mitocôndria.

A análise dos dados foi feita pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen 2001). De acordo com este método, é definido que as amostras controles apresentam expressão igual a 1 e o valor calculado para as amostras experimentais indica o nível de indução ou repressão.

Para utilização do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene de interesse e os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene normalizador devem apresentar eficiência de amplificação próxima de 100% (entre 90% e 110% é a faixa aceitável). Isso se deve ao fato de que no cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, supõe-se que a cada ciclo de amplificação o produto seja dobrado, ou seja, a eficiência seja de 100%. Para se determinar as eficiências de amplificação de cada par de oligonucleotídeos, foram feitas curvas de diluição seriada utilizando cDNAs provenientes da fase de desenvolvimento de *D. discoideum*. A partir dos valores de Ct obtidos foi feito um gráfico de Ct versus o logaritmo das correspondentes diluições de cDNA e por regressão linear foi obtida a melhor linha de tendência e a inclinação da reta. Através da inclinação da reta foi obtida a eficiência de amplificação através da fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Para a obtenção do valor de E em porcentagem esse valor foi multiplicado por 100.

Para a determinação da significância estatística das razões de expressão obtidas uma distribuição log-normal foi assumida e foi calculada a probabilidade P da expressão do gene na amostra experimental estar induzida ($P_{\text{indução}}$) e reprimida ($P_{\text{repressão}}$) em relação à amostra controle sendo que a soma de $P_{\text{indução}}$ e $P_{\text{repressão}}$ é sempre igual a 1. Para cada amostra (experimental e controle) foram gerados 10.000 valores utilizando a média e o desvio padrão de cada amostra. Calculou-se então a quantidade de pontos da amostragem experimental que é maior e menor que a amostragem da referência e o valor obtido foi dividido por 10.000. O valor de $P_{\text{indução}} = 1$ representa que todos os pontos da amostragem experimental são maiores que os valores da amostragem referência e o valor $P_{\text{repressão}} = 1$ representa que todos os pontos da amostragem experimental são menores que os valores da amostragem

referência. Um valor de P igual ou acima de 0,95 foi utilizado para considerar um gene induzido ou reprimido em relação à referência.

3.7. Confecção dos microarranjos

3.7.1. Seleção de genes para confecção do chip-piloto

Seqüências de genes relacionados com o desenvolvimento e com a resposta a diversos tipos de estresses em *Dictyostelium discoideum* e em organismos que apresentam significativa similaridade com esse organismo como levedura e humano, foram selecionados através do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Essas seqüências foram utilizadas em buscas através do algoritmo BLAST contra o banco de dados do Projeto de cDNA de *Dictyostelium*, do Japão (<http://www.csm.biol.tsukuba.ac.jp/cDNAproject.html>). Foram selecionados 384 clones com valores de *E-value* menores que 10^{-20} .

Além disso, 600 oligonucleotídeos de 50 nucleotídeos (50-mers) cada um foram fornecidos pelo Dr. William Loomis da Universidade de San Diego, Califórnia.

3.7.2. Manutenção dos clones bacterianos

As bactérias contendo os cDNAs de interesse clonados nos vetores pME18SFL3, pSPORT ou pBluescript II KS- foram fornecidas pelo *Dictyostelium discoideum* cDNA Project de Tsukuba, no Japão. Essas bactérias foram arranjadas em placas de 96 poços contendo 100 µL de meio TB (bacto-triptona 1,2%, extrato de levedura 2,4%, glicerol 0,4%, KH_2PO_4 0,017 M, K_2HPO_4 0,072 M).

Para a amplificação dos clones por PCR, réplicas das placas foram feitas em 100 µL de meio TB e incubadas a 37°C por 14 a 16 horas. Após a coleta das amostras para a amplificação, 100 µL de glicerol 30% foi adicionado ao meio e placas em réplica foram armazenadas em freezer - 80°C.

3.7.3. Amplificação dos insertos de DNA dos clones bacterianos.

Para a amplificação dos insertos ligados ao vetor pBluescript II KS⁻, os oligonucleotídeos utilizados foram o T7 e o T3, para o vetor pSPORT1 foram utilizados o T7 e o SP6 e para o vetor pME18SFL3 os oligos foram: CTTCTGCTCTAAAAGCTGCG e CGACCTGCAGCTCGAGCACA.

As reações de PCR foram feitas em placas de 96 poços (Fisher Scientific International Inc.) em um volume total de reação de 100 µL. A mistura de reação, contendo 1,5 mM de MgCl₂, 1X *Taq Buffer* 10X (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween), 0,8 mM dNTP, 10 µL de *Taq* Polimerase (extraída em nosso laboratório), 0,4 pmol/µL de cada oligo, foi preparada e distribuída nos 96 poços das placas. Cerca de 2 µL de cada cultura foram transferidos para o meio reacional.

A reação de PCR foi feita em um Termociclador DNA Engine PTC-200 (MJ Research) com um programa de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 45°C, 50°C e 51°C para os insertos ligados nos vetores pME18SFL3, pSPORT1 e pBluescript II KS⁺, respectivamente, por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, finalizado por incubação a 72°C por 10 minutos. Após a reação de PCR, as placas foram seladas e armazenadas a -20°C até a purificação dos produtos.

3.7.4. Extração de *Taq* polimerase

Um pré-inóculo de uma colônia da linhagem que expressa a *Taq* polimerase foi preparado em 1 mL de meio LB contendo carbenicilina 50 µg/mL e mantido a 37°C, sob agitação (200 rpm) por uma noite. O pré-inóculo crescido foi adicionado em 500 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de carbenicilina e IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo) 0,4 mM e mantido a 37°C, sob agitação (200 rpm) por uma noite. Posteriormente, o volume total foi centrifugado a 440xg por 20 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 7,5 mL de tampão A (Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0, D-glicose 0,05 M). O meio foi incubado por 25 minutos em temperatura ambiente com 60 mg de lisozima. Quinze mL de tampão B (Tris-HCl 0,01 M pH 8,0, NP 40 0,5%, Tween 20 0,5%, KCl 0,05 M) foram adicionados ao meio e este foi mantido em agitação leve por 1 h a 75°C. O meio foi centrifugado a 12000xg, 4°C por 10 minutos. Por último, o sobrenadante foi ressuspensão em 12,5 mL de tampão de estocagem #1 (Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, NaCl 0,1M + Triton X-100 1%, glicerol 50%) , e depois foram adicionados 25 mL de tampão de estocagem #2 (Tris-HCl 0,05 M pH 8 , NaCl 0,1 M, Triton X-100 1%, glicerol 75%) ao meio. A solução obtida foi conservada a -20°C.

3.7.5. Purificação dos produtos de PCR

10 µL de tampão de ligação (guanidina-HCl 7 M, tampão MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico) 200 mM, pH 5,6) foram adicionados em cada poço de uma placa *Multiscreen* Milipore de 96 poços e a placa foi centrifugada a 1150xg por 1

minuto. 100 µL de *PCR Binding Buffer* foram adicionados aos produtos de PCR e os 200 µL obtidos foram transferidos para a placa de 96 poços previamente umedecida. A placa foi centrifugada a 1150xg por 1 minuto. Os poços foram lavados duas vezes utilizando 200 µL de etanol 80% em cada lavagem. Na primeira lavagem com etanol a placa foi centrifugada a 1150xg por 1 minuto e na segunda, a 1150xg por 10 minutos. Os produtos foram eluídos, em uma placa com fundo em U, em 50 µL de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, com centrifugação a 1150xg por 5 minutos. Todas as centrifugações foram feitas a 25°C.

As placas contendo os produtos de PCR purificados foram seladas e armazenadas a -20°C até o rearranjo e deposição dos produtos de PCR nas lâminas de vidro.

3.7.6. Deposição dos produtos de PCR em lâminas espelhadas

Para a confecção dos arranjos de DNA, os produtos de PCR purificados foram manualmente rearranjados das placas de 96 poços para placas de 384 poços. No processo de rearranjo, 15 µL do produto de PCR purificado foram misturados com igual volume de Reagente D (Amersham Biosciences, EUA), como controle positivo foram utilizadas as amostras do *Scorecard Universal Lucidea™* (Amersham Biosciences, EUA). O conjunto de produtos de PCR foi depositado em lâminas espelhadas tipo 7 Star, usando o equipamento *Generation III Microarrays Spotter™* (Amersham Pharmacia Biotech). Após a deposição dos fragmentos de DNA, as lâminas foram submetidas a 50 mJ de luz UV e armazenadas em dessecador até o momento do uso.

3.7.7. Deposição dos oligonucleotídeos em lâminas *CodeLink* (Amersham Biotech)

Os oligonucleotídeos 5' amino-modificados foram ressuspensos em uma solução de fosfato de sódio 50 mM pH 8,5. O conjunto de oligonucleotídeos foi depositado em lâminas *CodeLink* (Amersham Biosciences), usando o equipamento *Generation III Microarrays Spotter™* (Amersham Pharmacia Biotech). Durante a deposição a umidade relativa dentro do *Spotter* foi mantida a 45% para reter a atividade de ligação dos grupos reativos presentes na cobertura da lâmina. Após a deposição dos oligonucleotídeos as lâminas foram colocadas em uma câmara com umidade relativa de 75%, essa câmara foi construída utilizando uma solução saturada de NaCl. As lâminas foram incubadas durante a noite nesta câmara. Após este

período, foi feito o bloqueio dos grupos reativos da lâmina. Para isso, as lâminas foram lavadas com uma solução de bloqueio (50 mM etanolamina, 0,1 M Tris pH 9,0) a 50°C por 30 minutos, enxaguadas duas vezes com água deionizada, lavadas com 4 x SSC contendo 0,1% SDS a 50°C por 30 minutos e novamente enxaguadas brevemente com água deionizada. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e estocadas em dessecador até o momento do uso.

3.7.8. Síntese e marcação de alvos fluorescentes de cDNA utilizando *CyScribe Post-Labeling kit* (GE Healthcare)

A reação de anelamento dos oligos ao molde de RNA foi realizada com 10 µg de RNA total ou 1 µg de RNA mensageiro, 4 µL de oligo-dT ancorado e água mili-Q tratada com DEPC em volume de reação de 10,5 µL. Todos estes reagentes foram utilizados como fornecidos pelo fabricante. No tubo contendo a amostra que foi marcada com o fluoróforo Cy3 foi adicionado 0,5 µL do RNA Cy3 Referência, diluído 1:3 e na outra amostra foi adicionado 0,5 µL do RNA Cy5 Teste, também diluído 1:3, ambos do sistema *Scorecard* (Amersham Biosciences, EUA). O meio foi incubado a 70°C por 5 minutos, seguidos por 10 minutos à temperatura ambiente.

Para a reação de transcrição reversa, foram misturados 4 µL de tampão CyScript 5x, 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL da mistura de nucleotídeos, 1 µL de aminoalil-dUTP e 1 µL de transcriptase reversa *CyScript* (100 U/µL) em cada um dos tubos. Todos esses reagentes são fornecidos com o *CyScribe Post-Labeling kit*. As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de uma incubação a 42°C por 3 horas.

O mRNA foi hidrolisado pela adição de 2 µL de hidróxido de sódio 2,5 M e incubação a 37°C por 15min, seguido por adição de 10 µL de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico) ácido livre 2 M.

O cDNA sintetizado foi purificado adicionando-se 120 µL de tampão de ligação a cada reação e transferindo-se todo o volume para um poço da placa de purificação de 96 poços (*Millipore Multiscreen filter plate*). A placa foi centrifugada a 1000xg por 1 minuto a 25°C, utilizando-se uma placa de 96 poços com fundo em U para coletar as lavagens. Cada poço foi lavado 4 x com etanol 80%, com centrifugação a 1000xg por 1 min a 25°C, exceto a última lavagem, que foi realizada com centrifugação a 1575xg por 5 minutos. O filtrado foi descartado e a placa de coleta trocada por uma nova. As

sondas foram eluídas 2x com 45 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, com centrifugação de 1150xg por 5 minutos e totalmente seco em *speed-vac* a 30°C.

Posteriormente, foi realizada a reação de marcação com os fluoróforos Cy3 e Cy5 e, a partir deste ponto, todos os procedimentos foram realizados sem a incidência de luz direta. O cDNA amino alil purificado e seco foi ressuspensão em 15µL de água milli-Q tratada com DEPC. Uma alíquota de Cy3 (40nmol) e outra de Cy5 (40nmol) do *kit* foram ressuspensas em 15µL de bicarbonato de sódio 0,1M pH 9,0 cada uma. Os fluoróforos ressuspensos foram misturados ao cDNA respectivo e o meio incubado à temperatura ambiente por 1 hora. Foram adicionados 15 µL de hidroxilamina 4M a cada reação e o meio foi incubado à temperatura ambiente por 15 minutos.

Foram adicionados 15 µL de hidroxilamina 4 M a cada reação, as quais foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Os cDNAs marcados foram purificados com descrito anteriormente, totalmente secos em *speed-vac* a 30°C e mantidos a -20°C até o momento da hibridização nas lâminas de vidro.

3.7.9. Hibridização dos cDNAs marcados nas lâminas espelhadas e *CodeLink*

Os cDNAs marcados e secos foram ressuspensos com 6,75 µL de água milli-Q tratada com DEPC. O cDNA marcado com Cy3 foi misturado com o cDNA marcado com Cy5, totalizando um volume de 13,5µL ao qual foram adicionados 13,5 µL de tampão de hibridização (*Microarray Hybridization Buffer*[®]- GE Healthcare) e 27µL de formamida. As soluções foram incubadas a 92°C por 2 min e colocadas em gelo. Os 54 µL de solução foram aplicados em uma das extremidades da lâmina. Uma lamínula foi colocada por cima da lâmina de vidro e esta colocada dentro de um tubo Falcon de 50 mL com um filme de água, na horizontal. O sistema foi incubado em banho a 42°C por 16h e após esse período as lâminas foram lavadas.

3.7.10. Lavagem das lâminas

As lâminas do tipo 7 Star foram lavadas uma vez com 1 x SSC (NaCl 0,3 M, citrato de sódio 0,03 M, pH 7,0), 0,2% SDS por 5 minutos a 42°C, duas vezes com 0,1 x SSC, 0,2% SDS por 5 minutos a 42°C, uma vez com 0,1 x SSC por 1 minuto à temperatura ambiente, seguidos de 2 mergulhos em água mili-Q e secagem imediata com jato de nitrogênio.

As lâminas *CodeLink* foram enxaguadas com 4 x SSC, lavadas duas vezes com 2 x SSC, 0,1% SDS a 42°C por 5 minutos, uma vez com 0,2 x SSC por 1 minuto à temperatura ambiente, uma vez com 0,1 x SSC à temperatura ambiente por 1 minuto, seguidos por 2 mergulhos em água milli-Q e secagem imediata com jato de nitrogênio.

3.7.10. Scanning

A leitura dos sinais foi feita utilizando-se o *scanner* confocal *Generation III Scanner™* (GE Healthcare) nas PMTs 700 para ambos os canais. Os arquivos foram nomeados de acordo com o código de barras das lâminas.

3.7.11. Extração e análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados em colaboração com Ricardo Zorzetto Nicolliello Vêncio (IME-USP) o qual desenvolveu uma série de *scripts* baseados em linguagem R e Milton Yutaka Nishiyama-Junior (IQ-USP). Os dados extraídos a partir das imagens dos microarranjos foram processados pelo programa *ArrayVision* (Imaging Research Inc.). O valor da mediana do *background* local foi subtraído da densidade MTM (*median-based trimmed mean*) para cada *spot*, para obtenção dos valores líquidos de intensidade para cada canal. Foram descartados *pixels* que estavam fora da faixa de ± 4 MADs (desvios absolutos da mediana). Os dados referente aos experimentos foram armazenados em um banco de dados local.

Estes valores foram normalizados através do algoritmo Lowess (Yang et al. 2002), corrigindo assim as diferenças de incorporação e emissão dos fluoróforos, bem como os desvios de sinal em função da intensidade. As razões de expressão das amostras experimentais em relação à amostra controle foram obtidas para cada gene, utilizando-se o valor de intensidade normalizado.

Os dados normalizados foram visualizados em gráficos do tipo M versus S, onde:

$$M = \log_2(\text{Cy3}/\text{Cy5})$$

$$S = \log_2 [(\text{Cy3} + \text{Cy5})/2]$$

sendo que Cy3 e Cy5 correspondem, respectivamente, aos valores normalizados de intensidade para os canais Cy3 e Cy5 de determinado ponto. Sempre que a amostra referência (controle) foi marcada com Cy3, o cálculo foi feito como sendo $M = \log_2(\text{Cy5}/\text{Cy3})$. Dessa forma, valores negativos de M sempre denotam expressão

maior na amostra referência e valores positivos, expressão maior na amostra experimental.

A determinação de genes diferencialmente expressos foi feita pelo método *HT-self* (Vencio e Koide 2005).

Para cada clone avaliado foi feita uma estimativa de reprodutibilidade, calculando-se a porcentagem de pontos-réplica que apontam um gene como diferencialmente expresso ou não. Os clones em que pelo menos 70% das réplicas foram concordantes foram considerados confiáveis.

4. Resultados

4.1. Análise dos níveis de mRNA de *keaA* em mutantes para *keaA*

keaA foi isolado como um supressor da morte induzida por SNP em células *yakA*⁻. Experimentos de REMI foram realizados obtendo o duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻, inicialmente denominado 13-8. O gene isolado como o gene interrompido no mutante 13-8 foi seqüenciado e a seqüência de nucleotídeos foi determinada como idêntica à do gene DG1106, identificado no *Developmental Gene Program* pelo grupo do Dr. William Loomis como um gene necessário para a agregação (<http://glamdring.ucsd.edu/others/dsmith/dictydb.html>). O alinhamento das seqüências entre os clones 13-8 e DG1106 utilizando a ferramenta *Clustal W DNA Sequence Alignment Analysis* (Thompson *et al.* 1994) indicou 100% de identidade entre os dois genes. Para confirmar que a mutação em *keaA* era a responsável pela proteção do mutante *yakA*⁻ contra a morte induzida por SNP, a interrupção do gene *keaA* foi refeita na linhagem selvagem e no nulo da *yakA* com a construção isolada do mutante 13-8 (p13-8).

O mutante obtido com o plasmídio p13-8 resultou em inserção plasmidial entre os aminoácidos 1198 e 1199 e no mutante DG1106, o qual foi gentilmente cedido pelo Dr. William Loomis, a inserção está entre os aminoácidos 1041 e 1042. Como KeaA possui 1207 aminoácidos, essas inserções estão situadas próximas a região C-terminal o que pode implicar em expressão residual de uma proteína truncada de KeaA.

Para verificarmos a ocorrência de uma expressão residual de mRNA de *keaA* nos mutantes descritos acima, células selvagens e os mutantes 13-8 e DG1106 foram crescidas em meio líquido, diluídas para uma densidade celular de $0,5 \times 10^6$ células/mL, crescidas até a densidade de 1×10^6 células/mL e, nessa densidade, 2×10^7 células foram coletadas para a extração de RNA total, subsequente síntese de cDNA e reações de qPCR. As alíquotas coletadas na densidade de 1×10^6 células/mL foram consideradas o ponto 0 hora. Amostras de 2×10^7 células de 13-8 e DG1106 também foram coletadas após 2 e 12 horas de terem atingido a densidade celular de 1×10^6 células/mL. Nos pontos de 2 e 12 horas as densidades atingidas eram de aproximadamente $1,1$ e $1,4 \times 10^6$ células/mL, respectivamente.

Quando comparamos a expressão de *keaA* nesses mutantes com a expressão de *keaA* em células selvagens observa-se que nos mutantes existe 20% de expressão remanescente do transcrito truncado. Isso não quer dizer que esse transcrito truncado dê origem a uma proteína estável, já que juntamente com o RNA do gene é traduzido

o RNA plasmidial, o que pode gerar uma conformação anormal e sinalização para a degradação dessa proteína estranha. Devido à essa expressão remanescente de *keaA*, o mutante obtido utilizando o plasmídio p13-8 e DG1106 foram denominados deficientes em *keaA*. Resultados similares foram obtidos quando o mutante DG1106 foi analisado (resultados não mostrados).

As células deficientes em *keaA* do mutante 13-8 foram utilizadas em todos os experimentos descritos nesta tese.

Figura 10: A expressão do mRNA de *keaA* em células do mutante 13-8 é reduzida cerca de 80% em relação a células selvagens. Células selvagens (WT) e o mutante 13-8 foram diluídas para uma densidade de $0,5 \times 10^6$ células/mL em meio HL5_{P/S}. Na densidade de 1×10^6 células/mL, 2×10^7 células foram coletadas de cada linhagem e congeladas para a extração de RNA total, subsequente síntese de cDNA e reações de qPCR. O ponto em que as células foram coletadas na densidade celular de 1×10^6 células/mL foi considerado o ponto 0 hora. Amostras também foram coletadas após 2 e 12 horas de terem atingido a densidade de 1×10^6 células/mL. As razões são relativas aos níveis de transcritos de *keaA* detectados em células selvagens no ponto 0 h. O gráfico é representativo de três experimentos independentes. Resultados similares foram obtidos quando células DG1106 foram analisadas.

4.2. Tentativa de obtenção do mutante nulo para *keaA*

O fato do mutante obtido pela técnica de REMI possuir uma expressão residual de 20%, a possibilidade da produção da proteína truncada e os resultados obtidos até o momento com as células deficientes em *keaA* que mostram uma menor taxa de proliferação em relação a células selvagens e atraso no processo de desenvolvimento mais pronunciado em baixa densidade celular, nos levou a tentar obter um mutante nulo para *keaA*.

A partir do DNA genômico de *D.discoideum* foram amplificadas as regiões promotora e terminadora de *keaA*, de aproximadamente 1Kb cada uma, e essas regiões foram intercaladas por um cassete de resistência à blasticidina, de 1,4Kb. A relativa facilidade de obtenção do material recombinante se contrapôs à dificuldade de se obter um transformante. Cerca de 100 clones foram analisados por PCR e nenhum deles continha a construção desejada.

4.3. Análise dos níveis de mRNA de *keaA* durante a fase de crescimento

Para determinarmos se a expressão de *keaA* é modulada durante a fase de crescimento, células selvagens plaqueadas na presença de *Klebsiella aerogenes* foram coletadas por centrifugação diferencial depois de 44, 47 e 50 horas. Depois de 50 horas as placas estavam livres de bactérias e no início da fase de desenvolvimento.

Observou-se um aumento nos níveis de mRNA de *keaA* com o aumento da carência. O aumento foi gradual chegando a quase o dobro dos níveis de expressão quando a carência se tornou mais pronunciada (50h) (figura 11).

Figura 11: A expressão de *keaA* é regulada durante o crescimento na presença de *K. aerogenes*. Células selvagens foram crescidas na presença de *K. aerogenes* e

coletadas por centrifugação diferencial depois de 44, 47 e 50 horas. O RNA total dessas amostras foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e submetidos a reações de qPCR. As razões são relativas aos níveis de transcritos de *keaA* detectados no ponto 44 horas (amostra referência). O valor de P foi calculado em relação ao ponto 44 horas. O gráfico é representativo de quatro experimentos independentes.

A expressão de *keaA* também foi analisada em células selvagens crescendo em meio axênico. Para isso, as células foram crescidas em meio HL5_{P/S}, diluídas para $0,5 \times 10^6$ células/mL e coletadas na densidade de 1×10^6 células/mL. Após 2 e 12 horas de terem atingido a densidade celular de 1×10^6 células/mL, amostras também foram coletadas. Nos tempos 2 e 12 horas as densidades celulares eram de aproximadamente $1,2$ e $2,2 \times 10^6$ células/mL.

Há um significativo aumento nos níveis de mRNA de *keaA* do ponto 0h para 2h e em 12 horas esses níveis são mantidos elevados (figura 12).

Figura 12: A expressão de *keaA* é regulada durante o crescimento em meio axênico. Células selvagens foram crescidas em meio HL5_{P/S}, diluídas para $0,5 \times 10^6$ células e coletadas na densidade de 1×10^6 células/mL. Amostras também foram coletadas após 2 e 12 horas de atingir a densidade de 1×10^6 células/mL. O RNA total dessas amostras foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e submetidos a reações de qPCR. As razões são relativas aos níveis de transcritos de *keaA* detectados nas amostras em densidade de 1×10^6 células/mL. O gráfico é representativo de quatro experimentos independentes.

4.4. Análise dos níveis de mRNA em células selvagens, *pkaC*⁻ e *yakA*⁻ submetidas a estresse nutricional

Com o objetivo de analisarmos os níveis de transcritos de *keaA* durante o processo de desenvolvimento em células selvagens, nulas para *pkaC* e nulas para *yakA*, essas células foram crescidas até a fase exponencial e submetidas à carência nutricional em filtros de nitrocelulose. Amostras foram coletadas na fase exponencial de crescimento e depois de 2 e 12 horas de desenvolvimento. O RNA total dessas amostras foi extraído e submetido à transcrição reversa. O cDNA obtido foi utilizado em experimentos de qPCR.

Em células *yakA*⁻ não ocorre aumento nos níveis de mRNA de *keaA* após 2 horas de carência nutricional. Depois de 12 horas de carenciamento ocorre um aumento nos níveis de mRNA de *keaA*, porém esses níveis são inferiores aos observados em células selvagens. Em células selvagens, após 2 horas de carenciamento os níveis de mRNA de *keaA* são aumentados cerca de 4 vezes e esses níveis são mantidos altos depois de 12 horas de desenvolvimento. Já em células *pkaC*⁻, depois de 2 horas de carenciamento é observado um aumento porém menos pronunciado do que em células selvagens, no entanto depois de 12 horas de carenciamento esses níveis se igualam ao observado para células selvagens (figura 13).

Figura 13: A expressão de *keaA* é regulada durante o estresse nutricional. Células selvagens (A), *yakA*⁻ (B) e *pkaC*⁻ (C) foram submetidas à carência nutricional em filtros de nitrocelulose e amostras de 2×10^7 células foram coletadas na densidade de 1×10^6 células/mL (0h) e após 2 e 12 horas do início da carência nutricional. O RNA total dessas amostras foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e submetidos a reações de qPCR. As razões são relativas aos níveis de transcritos de *keaA* detectados nas amostras em densidade de 1×10^6 células/mL (amostra referência). O valor de P foi calculado em relação à amostra referência. Os valores de P = 1 foram omitidos. Os gráficos são representativos de quatro experimentos independentes.

4.5. Análise da função de KeaA na regulação do metabolismo de AMPc

O tratamento com SNP ou H₂O₂ induz a produção de AMPc e mutantes que não sintetizam AMPc, como *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ são mais resistentes a estresse oxidativo e nitrosoativo (Taminato *et al.* 2002). Foi mostrado pelo nosso grupo que células deficientes em *keaA* também são mais resistentes a estresses oxidativo e nitrosoativo

(Mantzouranis 2009). Nesse ponto é importante ressaltar que consideramos resistentes a estresses oxidativo e nitrosoativo células que apresentam maior taxa de proliferação quando comparadas a células selvagens e também maior índice de sobrevivência após o estresse.

Para determinar se a resistência observada para células deficientes em *keaA* a estresses oxidativo e nitrosoativo está relacionada à deficiência na síntese de AMPc, os níveis de AMPc foram medidos em células selvagens, deficientes em *keaA*, *aca*⁻ e *yakA*⁻. As células crescendo exponencialmente foram diluídas para 0,5x10⁶ células/mL e quando a densidade atingiu 1x10⁶ células/mL as células foram incubadas com 500µM de SNP por 24 horas ou com 500µM de H₂O₂ por 12 horas. As células foram contadas e amostras contendo 5x10⁶ células foram coletadas e utilizadas para medidas dos níveis de AMPc.

Tratamento com SNP ou H₂O₂ induz o acúmulo de AMPc em células selvagens porém não houve acúmulo significativo em células *acaA*⁻, *yakA*⁻ e células deficientes em *keaA*. Esses resultados indicam que esses genes são necessários para a produção de AMPc em resposta a esses estresses (tabela 6).

Linagem	pmol AMPc/10 ⁷ células
WT	0.95 +/- 0.15
WT + SNP	2.35 +/- 0.45
WT + H ₂ O ₂	1.85 +/- 0.22
<i>acaA</i> ⁻	1.02 +/- 0.36
<i>acaA</i> ⁻ + SNP	0.70 +/- 0.02
<i>acaA</i> ⁻ + H ₂ O ₂	0.88 +/- 0.03
<i>yakA</i> ⁻	1.11 +/- 0.20
<i>yakA</i> ⁻ + SNP	1.15 +/- 0.15
<i>yakA</i> ⁻ + H ₂ O ₂	1.08 +/- 0.06
<i>keaA</i> ⁻	1.01 +/- 0.08
<i>keaA</i> ⁻ + SNP	1.32 +/- 0.27
<i>keaA</i> ⁻ + H ₂ O ₂	1.26 +/- 0.16

Tabela 6: KeaA é necessário para a síntese de AMPc em resposta a estresses oxidativo e nitrosoativo. Células selvagens, *acaA*⁻, *yakA*⁻ e deficientes em *keaA* (identificadas como *keaA*⁻) na densidade de 1x10⁶ células/mL foram tratadas com 500µM de SNP durante 24 horas ou com 500 µM de H₂O₂ durante 12 horas. Após

esses períodos as células foram contadas e amostras de 5×10^6 células foram coletadas para a análise dos níveis de AMPc. Os valores representam a média e o desvio padrão para 3 experimentos independentes.

Para aprofundar a investigação do papel de KeaA na regulação do metabolismo de AMPc, células selvagens e células deficientes em *keaA* foram carenciadas em tampão fosfato por 2 horas e então estimuladas ou não com pulsos de 80 nM de AMPc a cada 6 minutos durante 4 horas, simulando assim a sinalização que ocorre normalmente nas células durante a carência nutricional. A tabela 7 mostra a porcentagem de células isoladas para cada linhagem celular submetida ou não a pulsos de AMPc.

Cerca de 80% das células selvagens agregaram depois de 6 horas e esse número aumentou para 95% quando as células foram estimuladas com AMPc. No caso de células deficientes para *keaA*, 62% das células agregaram depois de 6 horas e a adição de AMPc aumentou a população de células agregadas para 71%. Assim, a adição de pulsos de AMPc pode estimular a agregação de células selvagens mais eficientemente que a de células deficientes em *keaA*, indicando que as células do mutante são menos responsivas a pulsos de AMPc.

Linhagem	% de células isoladas
WT	20.1 +/- 2.5
WT + AMPc	5.6 +/- 1.6
<i>keaA</i> ⁻	38.6 +/- 3.1
<i>keaA</i> ⁻ + AMPc	29.2 +/- 2.7

Tabela 7: Células deficientes em *keaA* são menos responsivas a pulsos de AMPc. Células selvagens e deficientes em *keaA* foram submetidas à carência nutricional em tampão fosfato na densidade de 1×10^6 células/mL por 2 horas e a partir desse ponto foram adicionados pulsos de 80nM de AMPc a cada 6 minutos por 4 horas. Após 6 horas de carenciamento as células isoladas foram contadas e a porcentagem de células isoladas foi calculada.

4.6. Análise da expressão de genes essenciais para o desenvolvimento em células deficientes para *keaA*.

Durante a minha iniciação científica e em colaboração com a Dra. Raquel Bagattini observamos que as células deficientes em *keaA* apresentam deficiência no processo de agregação e essa deficiência é mais acentuada quando as células estão em baixa densidade celular. (Tese defendida em 2005 por Raquel Bagattini no Departamento de Química da USP)

Quando as células foram carenciadas em placas de agar/fosfato a uma densidade de aproximadamente $4,4 \times 10^5$ células/cm², foi observada a formação de ondas espirais após 8 horas de plaqueamento, sendo que células deficientes em *keaA* atingiram esse estágio somente após 12 horas de plaqueamento. Células selvagens carenciadas em filtro de nitrocelulose em uma densidade de aproximadamente 29×10^5 células/cm² agregaram após 8 horas e apresentaram o corpo de frutificação completamente formado em 24 horas. As células deficientes em *keaA* agregaram após 9 horas de carência e apresentaram corpos de frutificação após 24 horas. Na presença de *K.aerogenes* e na densidade de $0,88 \times 10^5$ células/cm² os tempos necessários para agregação, culminação e formação do corpo de frutificação também se mostraram alterados quando comparado a células selvagens e células deficientes em *keaA*. Na linhagem selvagem, agregados celulares foram observados depois de 61 horas de carência, culminantes após 66 horas e corpos de frutificação após 73 horas; as células deficientes em *keaA* apresentaram agregados celulares após 73 horas, culminantes após 88 horas e corpos de frutificação após 97 horas (Mantzouranis 2009).

A deficiência em agregação foi descrita para mutantes contendo alterações na sinalização de AMPc. O mutante de adenilil ciclase que super-expressa *pkaC* não agrega em baixa densidade celular, mas o desenvolvimento é normal quando essas células são plaqueadas em alta densidade celular (Wang e Kuspa 1997).

Para verificar a expressão de genes envolvidos na sinalização de AMPc em células deficientes em *keaA*, células selvagens e células deficientes em *keaA* foram plaqueadas em placas agar/fosfato e coletadas após 8 horas de carenciamento (figura 14 E). Nessas condições, como mencionado anteriormente, as células selvagens apresentam a formação de ondas espirais e as células deficientes em *keaA* ainda não iniciaram o processo de agregação. O RNA total das amostras coletadas foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e submetidos a reações de qPCR (figura 14 A, B, C e D).

Células deficientes em *keaA* apresentam menores níveis de mRNA de *pkaC*, *pkaR*, *acaA* e *carA* em relação a células selvagens.

Células selvagens e deficientes em *keaA* também foram coletadas depois de 12 horas de carenciamento, já que nesse momento as células deficientes em *keaA* apresentam a formação de ondas espirais (figura 15 E). O RNA total das amostras

coletadas foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e submetidos a reações de qPCR (figura 15 A, B, C e D).

Nessa situação observa-se que os níveis de mRNA de *pkaC*, *pkaR*, *acaA* e *carA* em células deficientes em *keaA* aproximam-se dos níveis observados em células selvagens.

Figura 14: Células deficientes em *keaA* apresentam mRNA da *pkaC*, *pkaR*, *acaA* e *carA* após 8 horas de careciamento em quantidades menores que células selvagens. Células selvagens (WT) e deficientes em *keaA* foram plaqueadas em placas agar/fosfato e amostras de 2×10^7 células foram coletadas depois de 8 horas de careciamento. O RNA total foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e foram submetidos a reações de qPCR. Os níveis de mRNA de *pkaC* (A), *pkaR* (B), *acaA*

(C), *carA* (D) foram analisados. As razões foram calculadas em relação aos níveis de mRNA detectados em células selvagens (amostra referência). O valor de P foi calculado em relação à amostra referência. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes. O valor de P foi calculado em relação à amostra referência (células selvagens). Os valores de P = 1 foram omitidos. Em E a morfologia das células no momento da coleta das amostras estão representadas. A barra representa 1 mm.

Figura 15: Os níveis de mRNA de *pkaC*, *pkaR*, *acaA* e *carA* aproximam-se dos níveis normais quando as células deficientes em *keaA* começam a agregar.

Células selvagens (WT) e deficientes em *keaA* foram plaqueadas em placas agar/fosfato e amostras de 2×10^7 células foram coletadas depois de 12 horas de carenciamento. O RNA total foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e foram submetidos a reações de qPCR. Os níveis de mRNA de *pkaC* (A), *pkaR* (B), *acaA* (C), *carA* (D) foram analisados. As razões foram calculadas em relação aos níveis de mRNA detectados em células selvagens (amostra referência). Os valores de P foram calculados em relação à amostra referência. Os valores de P = 1 foram omitidos. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes. Em E a morfologia das células no momento da coleta das amostras estão representadas. A barra representa 1 mm.

Os níveis de discoidina A (*dscA*) também foram medidos em células selvagens e deficientes em *keaA* depois de 8 e 12 horas de carenciamento em placas de agar/fosfato.

Discoidina é primeiramente induzida em baixos níveis pelo fator de pré carenciamento (PSF) (Clarke *et al.* 1987) e subsequentemente um sinal de desenvolvimento, provavelmente o CMF media altos níveis de expressão (Clarke *et al.* 1992; Blusch *et al.* 1995). Diversas horas depois do início do desenvolvimento, *dscA* é inibida por AMPc via receptor de AMPc, CAR1 (Endl *et al.* 1996).

Entre o período de 8 e 12 horas de desenvolvimento observa-se, como o esperado, a diminuição dos níveis de *dscA* em células selvagens; já em células deficientes em *keaA* os níveis de *dscA* também diminuem no período em questão porém depois de 12 horas de carenciamento os níveis de *dscA* são maiores em relação a células selvagens provavelmente devido a deficiência na produção de AMPc no processo de desenvolvimento (figura 16).

Figura 16: Os níveis de mRNA de *dscA* são maiores em células deficientes em *keaA* do que em células selvagens. Células selvagens e deficientes em *keaA* foram plaqueadas em placas agar/fosfato e amostras de 2×10^7 células foram coletadas depois de 8 e 12 horas de careciamento. O RNA total foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e foram submetidos a reações de qPCR. Os níveis de mRNA de *dscA* foram analisados. As razões foram calculadas em relação aos níveis de mRNA detectados em células selvagens. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes.

4.7. Análise de mutantes que super-expressam a região rica em cisteínas e o domínio Kelch

4.7.1. Análise do perfil de desenvolvimento

Com o objetivo de confirmarmos o papel de *keaA* no controle do desenvolvimento, do crescimento e da resposta a estresses, a região rica em cisteínas e o domínio Kelch foram clonados no vetor pDXA-3H sob o controle do promotor da actina 15.

Esses mutantes foram analisados quanto a morfologia das fases de desenvolvimento em placas de agar/fosfato.

Os mutantes que super-expressam o domínio Kelch não apresentaram alteração do perfil de desenvolvimento em relação às células selvagens. Já os mutantes que super-expressam o domínio rico em cisteínas apresentaram agregados celulares, culminantes e corpos de frutificação no mesmo tempo que células selvagens, porém em tamanho reduzido (figura 17).

Figura 17: Células que super-expressam o domínio Kelch não apresentam alteração no perfil de desenvolvimento, já células que super-expressam o domínio rico em cisteínas apresentam alteração no processo de desenvolvimento. Células selvagens transformadas com o vetor pDXA3H (WT[act15]), células que super-expressam o domínio Kelch (WT[act15::Kelch]) e células que super-expressam a região rica em cisteínas (WT[act15::cys]) foram crescidas em HL5_{P/S} contendo 0,2 mg/mL de geneticina, coletadas em fase exponencial de crescimento e plaqueadas em placas agar/fosfato na densidade de $4,4 \times 10^5$ células/cm². As fases do desenvolvimento foram fotografadas com um aumento de 2 vezes e também com um aumento de 6 vezes para o mutante (WT[act15::cys]). As barras representam 1mm

Esses mutantes também foram carenciados em filtros de nitrocelulose na densidade de 29×10^5 células/cm² e observou-se um perfil de desenvolvimento similar ao observado quando esses mutantes foram carenciados em placas de agar/fosfato, ou seja, não houve alteração no perfil de desenvolvimento de células que super-expressam o domínio Kelch e para as células que super-expressam o domínio rico em cisteínas as estruturas celulares apresentaram tamanho reduzido, porém foram atingidas no tempo esperado (resultado não mostrado).

Esse resultado indica que o tamanho reduzido das estruturas celulares apresentadas pelo mutante (WT[act15::cys]) não está relacionado ao fato das células estarem em baixa densidade celular.

4.7.2. Análise da expressão de genes essenciais para o desenvolvimento

Com o objetivo de analisarmos a expressão de genes essenciais para o desenvolvimento em células que super-expressam o domínio Kelch e células que super-expressam o domínio rico em cisteínas, esses mutantes foram carenciados em placas agar/fosfato e coletados após 8 horas de desenvolvimento. Em paralelo, células selvagens também foram carenciadas em placas de agar/fosfato. O RNA total das amostras foi extraído, os cDNAs sintetizados e as amostras foram submetidas a reações de qPCR.

Células que super-expressam o domínio Kelch apresentaram o mesmo nível de expressão de *pkaC* e *pkaR*, porém elevados níveis de *acaA* e *carA* em relação a células selvagens. Já as células que super-expressam o domínio rico em cisteínas apresentaram baixos níveis de *pkaC*, *pkaR* e *carA*, porém níveis similares de *acaA* em relação a células selvagens (figura 18).

Figura 18: Células que super-expressam o domínio Kelch e o domínio rico em cisteínas apresentam diferenças de expressão em relação aos genes essenciais para o desenvolvimento. Células selvagens transformadas com o vetor pDXA3H (WT), células que super-expressam o domínio Kelch e células que super-expressam a região rica em cisteínas foram crescidas em HL5_{P/S} contendo 0,2 mg/mL de geneticina, coletadas em fase exponencial de crescimento e plaqueadas em placas agar/fosfato. Após 8 horas de carência nutricional, amostras de cada linhagem foram coletadas. O RNA total foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e submetidos a reações de qPCR. Os níveis de mRNA de *pkaC* (A), *pkaR* (B), *acaA* (C) e *carA* (D) foram analisados. As razões foram calculadas em relação aos níveis de mRNA detectados em células selvagens (amostra referência). O valor de P foi calculado em relação à amostra referência. Os valores de P = 1 foram omitidos. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes.

4.8. Análise da interação entre KeaA e PKA

Baseados na similaridade entre as vias de transdução de sinal de *D. discoideum* e *S.cerevisiae*, em recentes estudos que mostram que proteínas com repetições Kelch interagem diretamente com a subunidade catalítica da PKA em levedura (Peeters *et al.*

2006; Niranjan *et al.* 2007) e que a super-expressão do domínio Kelch, apesar de não apresentar alteração no desenvolvimento, apresentou níveis similares de mRNA de *pkaC* e *pkaR*, porém elevados níveis de mRNA de *acaA* e *carA* (o que poderia indicar a direta interação entre o domínio Kelch e PKA, ativando PKA e aumentando assim os níveis de mRNA de *acaA* e *carA*) foram realizados ensaios de duplo híbrido para verificar uma possível interação entre KeaA e PKA.

Foram clonados no plasmídeo pGBKT7 a sequência completa de *keaA*, o domínio *RING finger*, o domínio central rico em cisteínas, o domínio Kelch, a região que compreende o domínio *RING-finger* e o domínio rico em cisteínas e a região que compreende o domínio rico em cisteínas e o domínio Kelch. A figura 19 mostra uma representação esquemática dos diferentes clones de KeaA que foram testados para interação com PKAC e PKAR. No plasmídeo pGDAT7 foram clonadas as sequências dos genes que codificam a PKAC e a PKAR.

Figura 19: Representação esquemática dos diferentes clones de KeaA. As setas representam os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação. Em **A** está representado o domínio RING, em **B** a região central do gene *keaA*, a qual é rica em cisteínas, em **C** está representado o domínio Kelch, em **D** a região que compreende o domínio RING e a região rica em cisteínas, em **E** a região que compreende a região rica em cisteínas e o domínio Kelch e em **F** o gene completo. Os números acima de cada região representam os aminoácidos do início e do fim de cada região.

Os vetores pGBKT7p53, pGBKT7Lam e pGBKT7antígeno T foram utilizados como controles. A proteína p53 interage com o antígenoT no ensaio de duplo híbrido funcionando como controle positivo. Já a Lamina C que não forma complexo e não interage com a maioria das proteínas é utilizada como controle negativo juntamente com o antígenoT.

Encontramos grandes dificuldades na amplificação do gene completo de *keaA*. A princípio atribuiu-se a essa dificuldade a um possível erro na sequência depositada no banco de dados de *Dictyostelium*, visto que, várias modificações no protocolo de amplificação foram testadas, diferentes enzimas foram utilizadas e que 73-77% das bases são constituídas por adeninas e timinas, o que certamente dificultou no processo de montagem dos genes quando foi realizado o sequenciamento do genoma de *Dictyostelium*. Porém, com a amplificação de duas regiões de *keaA* (a região que compreende o domínio *RING* e o domínio rico em cisteínas e a região que compreende o domínio rico em cisteínas e o domínio Kelch), clonagem dessas regiões e sequenciamento desses clones foi possível verificar que não há erros na sequência depositada no banco de dados e também pudemos constatar que os *primers* planejados para a amplificação estavam anelando de maneira correta.

Visto que a sequência depositada no banco de dados está correta, os *primers* estavam funcionando, de que várias condições reacionais para a amplificação já haviam sido testadas e que possuíamos a região inicial e final de *keaA* planejamos enzimas que pudessem ser utilizadas para ligar esses dois fragmentos.

Para simplificar a nomenclatura, nomeamos a região que compreende o domínio *RING* e a região rica em cisteínas de *keaA1* e a região que compreende o domínio rico em cisteínas e o domínio Kelch de *keaA2*.

Para ligação dos dois fragmentos partimos dos vetores pGBKT7*keaA1* e pGBKT7*keaA2* (figura 20), os quais haviam sido construídos para utilização em ensaios de duplo híbrido e buscamos uma enzima que clivasse na região rica em cisteínas já que essa região está presente nos dois clones.

Figura 20: Representação esquemática dos vetores pGBKT7keaA1 e pGBKT7keaA2. (A) A região *keaA1* (*RING* + região rica em cisteínas) de 1780pb foi inserida nos sítios de *NdeI* e *BamHI*, os quais pertencem ao sítio múltiplo de clonagem, do vetor pGKT7 gerando o plasmídeo que denominamos pGBKT7*keaA1*, o qual possui aproximadamente 9Kb. (B) A região *keaA2* (região rica em cisteínas + o domínio Kelch) de 2367pb foi inserida nos sítio de *EcoRI* e *BamHI*, os quais pertencem ao sítio múltiplo de clonagem, do vetor pGBKT7 gerando o plasmídeo que denominamos pGBKT7*keaA2*, o qual possui aproximadamente 9,6Kb. O vetor pGBKT7 expressa proteínas fusionada ao domínio de ligação do fator de transcrição GAL4 através do promotor constitutivo P_{ADH1} . pGBKT7 replica autonomamente em ambos *E.coli* e *S. cerevisiae* das origem pUC e 2μ, respectivamente. O vetor possui a marca de resistência Kan^R para seleção em *E.coli* e a marca nutricional TRP1 para seleção em levedura. Estão indicados também, entre parênteses, a posição do gene

keaA em que a enzima *Clal* corta, além dos nucleotídeos que indicam o começo e o fim das regiões *keaA1* e *keaA2*.

O vetor pGBKT7*keaA1* foi digerido com as enzimas *Clal* e *BamHI* as quais estão indicadas na figura 19 A, resultando em um fragmento de aproximadamente 9Kb e outro de 35 pares de bases. O fragmento de aproximadamente 9Kb resultante da digestão com *Clal* e *BamHI* foi purificado e reservado para a reação de ligação.

O vetor pGBKT7*keaA2* foi digerido com as mesmas enzimas, porém foi feita digestão parcial já que o domínio Kelch possui outro sítio de restrição para *Clal* na posição 3087. Essa digestão resultou em 2 fragmentos, um de aproximadamente 7,8Kb e outro de aproximadamente 1,9Kb. A digestão completa resultaria em três fragmentos: 7,8Kb, 1341pb e 538pb. O fragmento de 1,8Kb foi purificado e reservado para a reação de ligação.

Foram misturados em uma reação de ligação o fragmento de aproximadamente 9Kb obtido da digestão de pGBKT7*keaA1* e o fragmento de aproximadamente 1,9Kb obtido da digestão de pGBKT7*keaA2*, com o objetivo de obter o gene completo. Metade do volume da reação de ligação (5µL) foi transformado em bactérias competentes DH5α e plaqueados em placas LB contendo kanamicina.

O DNA de 24 colônias foi submetido à digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e todos liberaram um inserto com o tamanho esperado. A figura 21 mostra o resultado para 5 colônias.

Figura 21: Digestão de possíveis vetores pGBKT7*keaA* completo. As canaletas 1, 3, 5, 7 e 9 mostram o DNA sem digestão e as canaletas 2, 4, 6, 8 e 10 mostram o DNA digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. O marcador de tamanho molecular 1KB Plus DNA Ladder (Invitrogen) está mostrado na canaleta indicada como M e o tamanho de dois fragmentos estão indicados à esquerda.

O vetor obtido com essa ligação foi denominado pGBKT7*keaA*completo ou *BDkeaA*completo, já que esse confere fusão ao domínio de ligação do fator de transcrição GAL4, esse vetor foi digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, obtendo assim o fragmento que corresponde ao gene completo o qual foi ligado também ao vetor pGADT7, obtendo assim o vetor pGADT7*keaA*completo ou *ADkeaA*completo.

Os plasmídeos construídos foram transformados pelo método do acetato de lítio em células AH109 de *S.cerevisiae* segundo as combinações representadas na tabela 8.

isca	presa
BD <i>keaA</i> completo	AD
	ADpkaC ADpkaR
AD <i>keaA</i> completo	BD
	BDpkaC BDpkaR
BDRING	AD
	ADpkaC ADpkaR
BDcisteína	AD
	ADpkaC ADpkaR
BDKelch	AD
	ADpkaC ADpkaR
BDRING/cisteína	AD
	ADpkaC ADpkaR
BDcisteína/Kelch	AD
	ADpkaC ADpkaR
BD	ADpkaC ADpkaR
AD	BDpkaC BDpkaR
BDp53	ADantígenoT
BDLam	ADantígenoT

Tabela 8: Esquema das transformações. Representação esquemática das transformações feitas em células AH109 de *S.cerevisiae*. A co-transformação do plasmídeo BDp53 com ADantT foi utilizada como controle positivo e a co-transformação de BDLam com ADantT foi utilizada como controle negativo. BD representa o domínio de ligação GAL4, o qual está presente no plasmídeo pGBKT7 e

AD representa o domínio de ativação de GAL4, o qual está presente no plasmídeo pGADT7.

Visto que o sistema de duplo híbrido é baseado na reconstrução de um fator de transcrição, é fundamental que seja testada a capacidade de auto-ativação, ou seja, ativação dos genes repórteres independente da ocorrência de interação. A capacidade de ativar a transcrição está presente em aproximadamente 5% de todas as proteínas e mais ainda em fragmentos gerados aleatoriamente (como em bibliotecas). O uso de uma biblioteca fusionada ao domínio de ligação ao DNA pode resultar em uma grande quantidade de falsos positivos, evidenciando os problemas gerados pela auto-ativação.

A seleção dos clones contendo os dois plasmídeos foi feita em meio seletivo sem triptofano e sem leucina.

Os clones foram replicados em placas de meio seletivo sem triptofano, sem leucina e sem histidina que seleciona para interação positiva. Além do teste de ativação do gene repórter *HIS3*, ou seja, a capacidade de crescimento em placas sem histidina, esses clones foram também testados quanto à ativação do gene repórter *lacZ*, que pode ser medida através do substrato X-gal.

A figura 22 mostra o experimento onde as células transformadas segundo a tabela 8 foram plaqueadas em meio seletivo duplo (-TRP/-LEU), e em meio seletivo triplo (-TRP/-LEU/-HIS). As células foram plaqueadas em meio seletivo duplo para mostrar que os dois plasmídeos estão sendo expressos na levedura e que a ausência de crescimento em meio seletivo triplo representa de fato a não interação entre as proteínas analisadas. Para testar a auto-ativação os plasmídeos BDisca foram transformados com AD e os plasmídeos ADpresa foram transformados com BD, como mostrado na tabela 8.

-TRP - LEU

-TRP - LEU - HIS

A

1. BDRING
2. BDRING + ADpkaR
3. BDRING + ADpkaC
4. BDRING + AD
5. ADpkaC + BD
6. ADpkaR + BD
7. Lam/antT
8. p53/antT

B

9. BDcisteína
10. BDcisteína + ADpkaR
11. BDcisteína + ADpkaC
12. BDcisteína + AD
13. ADpkaC + BD
14. ADpkaR + BD
15. Lam/antT
16. p53/antT

C

17. BDKelch
18. BDKelch + pkaR
19. BDKelch + pkaC
20. BDKelch + AD
21. ADpkaC + BD
22. ADpkaR + BD
23. Lam/antT
24. p53/antT

D

25. BDRING/cisteína
26. BDRING/cisteína + pkaR
27. BDRING/cisteína + pkaC
28. BDRING/cisteína + AD
29. ADpkaC + BD
30. ADpkaR + BD
31. Lam/antT
32. p53/antT

E

33. BDcisteína/Kelch
34. BDcisteína/Kelch + pkaR
35. BDcisteína/Kelch + pkaC
36. BDcisteína/Kelch + AD
37. ADpkaC + BD
38. ADpkaR + BD
39. Lam/antT
40. p53/antT

Figura 22: Controle de auto-ativação e ensaio de interação entre os domínios de KeaA e as subunidades da PKA através da ativação do gene repórter *HIS3*. A cepa AH109 foi transformada com os plasmídeos indicados na coluna à direita, os clones foram selecionados em meio seletivo -TRP/-LEU e plaqueados em meio seletivo -TRP/-LEU/-HIS para testar a capacidade de crescimento em placas sem histidina, ou seja, a ativação do gene repórter *HIS3*. A auto-ativação foi testada transformando os plasmídeos BDisca com AD e ADpresa com BD. Em **A** estão representados os ensaios referentes ao domínio *RING*, em **B** estão os ensaios referentes ao domínio rico em cisteínas, em **C** os ensaios referentes ao domínio Kelch, em **D** os ensaios referentes a região *RING*/cisteínas e em **E** os ensaios referentes a região cisteínas/Kelch. A primeira coluna mostra as células transformadas plaqueadas em meio seletivo duplo (-TRP/-LEU) e na segunda coluna em meio seletivo triplo (-TRP/-LEU/-HIS). Os números indicados nas placas da primeira coluna referem-se também à segunda coluna e indicam os plasmídeos que foram co-transformados. p53/antT representa o controle positivo e pLam/antT representa o controle negativo.

Os resultados indicam que o domínio *RING*, a região rica em cisteínas, e a região cisteína/Kelch não provocam auto-ativação e não interagem com PKAC e com PKAR. Porém, o domínio Kelch e a região *RING*/cisteína provocam auto-ativação e consequentemente mostram uma interação com a PKAC e com a PKAR, já que ocorre ativação dos genes repórteres sem que haja interação. Como esperado, as leveduras AH109 co-expressando p53 e antígeno T crescem em meio seletivo para interação (sem histidina) e as leveduras co-expressando LaminaC e antígenoT não crescem na ausência de histidina

Esses resultados são melhores visualizados em experimentos de diluição seriada. Nesse experimento parte-se de culturas em uma densidade ótica de aproximadamente 0,5 e são feitas quatro diluições seriadas. Com esse experimento é possível verificar quais os clones que realmente crescem em meio sem histina. Esse experimento confirma a atividade de ativação dos genes repórteres pelo domínio Kelch e pela região *RING*/cisteína (figura 23).

-TRP/-LEU

-TRP/-LEU/-HIS

BDKelch + AD

BDcisteína + AD

BDp53 + ADantT

BDLam + ADantT

BDcisteína/Kelch + AD

BDRING/cisteína + AD

BDp53 + ADantT

BDLam + ADantT

ADpkaC + BD

ADpkaR + BD

BDp53 + ADantT

BDLam + ADantT

BDKelch + ADpkaC

BDKelch + ADpkaR

BDp53 + ADantT

BDLam + ADantT

BDcisteína + ADpkaC

BDcisteína + ADpkaR

BDp53 + ADantT

BDLam + ADantT

BDcisteína/Kelch + ADpkaC

BDcisteína/Kelch + ADpkaR

BDp53 + ADantT

BDLam + ADantT

BDRING/cisteína + BDpkaC

BDRING/cisteína + BDpkaR

BDp53 + ADantT

BDLam + ADantT

Figura 23: Controle de auto-ativação e ensaio de interação entre os domínios de KeaA e as subunidades da PKA através da ativação do gene repórter *HIS3* em experimentos de diluição seriada. Os transformantes contendo os dois plasmídeos foram crescidos em meio líquido sem triptofano e sem leucina. Posteriormente, foram feitas quatro diluições seriadas (10X a partir da $DO_{600nm} = 0,5$) dessa suspensão de células e aplicados 5µL de cada diluição em placas de meio seletivo duplo (-TRP/-LEU) e meio seletivo triplo (-TRP/-LEU/-HIS). A primeira coluna representa as células em meio seletivo duplo, a segunda coluna em meio seletivo triplo e a terceira coluna mostra os plasmídeos que foram co-transformados. BDp53 + ADantT é o controle positivo e BDLam + AdantT é o controle negativo.

A ocorrência ou não de interação, bem como a ocorrência ou não de auto-ativação, também foi analisada pela ativação do gene repórter *lacZ*. Para tal, colônias crescidas por 2-3 dias foram transferidas para membranas de nitrocelulose 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 incubada a 37°C até o aparecimento de cor ou por um período máximo de 5 horas. Para esse teste, além do controle p53/antT foi utilizada a levedura AH109 transformada com a construção PCL1 que expressa o fator de transcrição GAL4 selvagem (figura 24).

Figura 24: Ensaio da ativação de *lacZ*. À esquerda estão as construções utilizadas nos ensaios de duplo híbrido bem com as combinações testadas. O quadro do meio é uma representação esquemática das diferentes regiões que foram testadas nos ensaios de duplo híbrido e à direita temos os resultados obtidos pelo ensaio de ativação de *lacZ*.

Os resultados mostram que ao contrário do observado no teste de crescimento em meio sem histidina, quando analisamos a expressão de *lacZ*, não é observado auto-ativação para os domínios Kelch e para a região *RING*/cisteína e também não é observado interação entre essas regiões e as subunidades da PKA.

Com esse resultado podemos concluir que a interação de KeaA com as subunidades da PKA não foi detectada.

4.9. Análise de expressão usando microarranjos de cDNA

O trabalho de microarranjos foi iniciado pela seleção de 384 clones para a construção de um chip-piloto. Esses clones continham genes relacionados com a fase de desenvolvimento, com resposta a diversos tipos de estresses e genes relacionados com diversas categorias funcionais. Esses clones nos foram enviados pelo Consórcio de sequenciamento de ESTs de *Dictyostelium* em Tsukuba, Japão. Os insertos foram amplificados por PCR, purificados e depositados em lâminas espelhadas. O rendimento das amplificações foi de 70% e os clones que constituem o microarranjo de cDNA estão representados na tabela 9.

Categoria	Número de ESTs amplificados
Proteínas Quinases	33
Desenvolvimento	61
Fatores de transcrição	1
Reparo de DNA	7
Metabolismo de inositol	4
Ciclo celular	12
ATPase	1
Ciclases	3
Resposta a estresses	40
Pequenas GTPases.	21
Proteínas G	3
Receptores	5
Proteínas fosfatases	14
Metabolismo de cálcio	5
Ubiquitinação	4
Proteínas ribossomais	2
Outros	21
Total	237

Tabela 9: Quantidade de ESTs amplificados de cada categoria

O conjunto de produtos de PCR foi depositado em lâminas espelhadas tipo 7 Star, utilizando o equipamento *Generation III Microarray Spotter™* (Amersham Pharmacia Biotech). Cada gene foi depositado 12 vezes no arranjo.

A extração dos dados foi feita através do programa *ArrayVision* utilizando-se a medida da densidade MTM (*Median-based Trimmed Mean*) e subtraindo-se do valor da intensidade de fundo. Foram descartados *pixels* que estavam fora da faixa de ± 4 MADs (*Median Absolute Deviations*). A normalização dos dados foi feita pelo método de LOWESS (Yang *et al.* 2002).

Para identificação dos genes diferencialmente expressos, foram feitas hibridizações homotípicas (Vencio e Koide 2005) para obtermos os valores de cortes e para cada gene foi calculada a porcentagem dos pontos que estavam acima ou abaixo do corte (figura 25). Genes com 60% das réplicas acima ou abaixo do corte foram considerados como diferencialmente expressos. Além disso, foram considerados como diferencialmente expressos os genes que foram identificados como diferencialmente expressos nas réplicas biológicas.

Figura 25: Hibridização homotípica. Células selvagens foram crescidas em meio HL5_{P/S} e amostras contendo 1×10^7 células foram coletadas em densidade celular de 1×10^6 células/mL. Amostras foram coletadas de três experimentos independentes e foram submetidas a hibridizações homotípicas. $M = \log_2(\text{Cy3}/\text{Cy5})$ e $S = \log_2[(\text{Cy3} + \text{Cy5})/2]$. A linha verde representa o corte estabelecido para a determinação de genes diferencialmente expressos.

4.9.1. Experimentos de microarranjos

Com o objetivo de evidenciarmos genes afetados em células deficientes em *keaA* em resposta a estresses oxidativo e nitrosoativo e estudar de forma mais aprofundada a função de *keaA* e as vias reguladas por esse gene, foram feitas hibridizações nos arranjos de amostras obtidas de células selvagens e células deficientes em *keaA* submetidas a tratamentos com H₂O₂ ou SNP.

Células selvagens e células deficientes em *keaA* foram tratadas ou não com SNP ou H₂O₂ por um período de 12 horas. Amostras de 1×10^7 células foram coletadas antes da adição da droga, o qual foi considerado o ponto 0h, e depois de 2 e 12 horas de tratamento. Para cada condição analisada foram realizados dois experimentos independentes e essas amostras foram hibridizadas com inversão do fluoróforo. A tabela 10 indica os genes diferencialmente expressos identificados. Todos os genes identificados como diferencialmente expressos foram sequenciados para confirmar sua identidade.

Experimento	Células selvagens	Células deficientes em <i>keaA</i>
0h crescimento x 2h crescimento	-	-
0h crescimento x 12 h crescimento	proteína cristal (<i>cryS</i>) discoidina I (<i>dscA</i>) putativo inibidor da proteína quinase C (<i>pkiA</i>) proteína de sítio de contato (<i>csbB</i>) subunidade alfa proteossomal (<i>prtB</i> , M3R) citocromo c oxidase - subunidade VI (<i>cxfA</i>)	proteína cristal (<i>cryS</i>) discoidina I (<i>dscA</i>) - - - -
2h - SNP x 2h + SNP	proteína de ligação a cálcio (<i>pefA</i>) proteína específica de culminação (<i>culD</i>) cisteína proteinase 4 (<i>cprD</i>) Ras GTPase DG1029 (RasGAP1) ciclina B (<i>cycB</i>) - -	- - - - - - putativa proteína de ligação a calmodulina CAM-BP15 (<i>cmbc</i>) flavohemoglobina
12h - SNP x 12h + SNP	proteína específica de culminação (<i>culD</i>) proteína de ligação a cálcio (<i>pefA</i>) proteína de ligação a cálcio 1	proteína específica de culminação (<i>culD</i>) proteína de ligação a cálcio (<i>pefA</i>)
2h - H ₂ O ₂ x 2h + H ₂ O ₂	glutatona redutase (<i>gsr</i>) major vault protein (<i>mvpB</i>) proteína específica de culminação (<i>culD</i>) - - proteína contendo repetições ricas em leucina (<i>IrrA</i>) desconhecida (<i>smlA</i>) cisteína proteinase 4 (<i>cprD</i>) putativo receptor de CMF (<i>cmfB</i>) major vault protein alpha (<i>mvpA</i>) proteína similar a aquaporina (<i>wac</i>) ciclina B (<i>cycB</i>) - -	- proteína específica de culminação (<i>culD</i>) proteína de ligação a cálcio (CBP2) proteína F-box A (<i>fbxA</i>) proteína contendo repetições ricas em leucina (<i>IrrA</i>) - - putativo receptor de CMF (<i>cmfB</i>) - - - DG1008 (<i>sfbA</i>) sulfito redutase (<i>redA</i>)
12h - H ₂ O ₂ x 12h + H ₂ O ₂	discoidina I (<i>dscA</i>) proteína de sítio de contato (<i>csbB</i>)	- -

Tabela 10: Genes diferencialmente expressos. Relação dos genes diferencialmente expressos obtidos de hibridizações de amostras de células selvagens e células deficientes em *keaA* não tratadas (identificadas como crescimento) e tratadas com SNP ou H₂O₂. Em vermelho estão representados os genes induzidos e em verde os genes reprimidos.

O gene *dscA*, que codifica para a proteína discoidina I, mostrou-se induzido durante a fase de crescimento tanto em células selvagens quanto em células deficientes em *keaA*, porém os níveis de mRNA desse gene foram reduzidos depois de 12h de tratamento com H_2O_2 em células selvagens e isso não foi observado para células deficientes em *keaA*.

Outro gene que apresentou um perfil de expressão semelhante ao perfil observado para discoidina foi *csbB*, um gene que como a discoidina está envolvido no processo de adesão celular. *csbB* é induzido em células selvagens em crescimento e reprimido depois de 12 horas de tratamento com H_2O_2 . Porém esse perfil de expressão não foi observado em células nulas para *keaA*.

Um putativo receptor de CMF (*conditioned medium factor*), CMFR1, foi detectado como inibido após 2 horas de tratamento com H_2O_2 tanto em células selvagens quanto em células deficientes em *keaA*.

cycB (também denominado *clb1*), o qual codifica a ciclina B, uma proteína que atua na transição da fase G2 para M, mostrou se reprimida depois de 2 horas de tratameto com SNP e H_2O_2 mas não em células deficientes em *keaA*.

Foi também identificada a ativação de *mvpB* e a inibição de *mvpA* em resposta ao tratamento por 2 horas com H_2O_2 .

4.9.2. Validação dos dados de microarranjo por qPCR

A validação dos dados obtidos através da técnica de microarranjos foi feita através da técnica de qPCR. Para a validação dos dados de microarranjo um terceiro experimento foi feito. Células selvagens e células deficientes em *keaA* foram tratadas ou não com 500µM de SNP ou 500µM de H₂O₂. Amostras de 2x10⁷ células foram coletadas, o RNA total foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e submetidos a reações de qPCR.

Os genes *dscA*, *csbB* e *cycB* foram selecionados para validação dos dados. Esses genes foram escolhidos pois nos resultados de microarranjos esses genes foram afetados pela deleção de *keaA*, ou seja, a expressão desses genes é diferente se compararmos células selvagens e células deficientes em *keaA*.

A expressão de *dscA* foi induzida tanto em células selvagens quanto em células deficientes em *keaA*, porém em resposta ao tratamento por 12 horas com H₂O₂ a expressão de *dscA* é reprimida em células selvagens mas em células deficientes em *keaA* a expressão de *dscA* é induzida (figura 26 A). Um perfil muito semelhante foi observado para a expressão do gene *csbB* o qual tem sua expressão aumentada durante o crescimento, tanto em células selvagens quanto em células deficientes em *keaA*, porém ocorre diminuição dos níveis desse gene em resposta ao tratamento com H₂O₂ por 12 horas o que não é observado em células deficientes em *keaA* (figura 26 B).

A expressão de *cycB* foi reprimida em resposta ao tratamento com SNP tanto em células selvagens quanto em células deficientes em *keaA*, porém a diminuição mostrou-se mais acentuada em células selvagens do que em células deficientes em *keaA*. Já o tratamento com H₂O₂ por 2 horas provocou a repressão de *cycB* e em células deficientes em *keaA* ocorreu indução de *cycB* (figura 26 C).

Figura 26: Validação dos dados de microarranjo por qPCR. Células selvagens e células deficientes em *keaA* foram tratadas ou não com SNP ou H₂O₂ e amostras de 2x10⁷ células foram coletadas antes da adição da droga, considerado o ponto 0h, e após 2 e 12 horas da adição da droga. O RNA total foi extraído, os cDNAs foram sintetizados e as amostras foram submetidas a reações de qPCR. Os níveis de expressão de *dscA* (A), *csbB* (B) e *cycB* (C) foram avaliados nas amostras especificadas nos gráficos. A amostra referência apresenta o valor de razão igual a 1. O valor de P foi calculado em relação à amostra referência. Os valores de P = 1 foram omitidos.

4.10. Microarranjos de oligonucleotídeos

Com o objetivo de ampliarmos o número de genes analisados pela técnica de microarranjos, iniciamos uma colaboração com o Dr. William F. Loomis da Universidade da Califórnia em San Diego o qual nos forneceu 1116 oligonucleotídeos de 50-mers cada, o que corresponde a 580 genes, sendo que 536 desses genes estão representados por 2 oligonucleotídeos e 44 desses genes estão representados por 1 oligonucleotídeo. A tabela 11 mostra esses genes separados por categoria.

Categoria	genes representados por oligonucleotídeos
Proteínas Quinases	23
Desenvolvimento	81
Transcrição	18
Reparo de DNA	1
Metabolismo de inositol	4
Ciclo celular	1
ATPase	9
Ciclases	4
Resposta a estresses	60
Pequenas GTPases.	13
Proteínas G	9
Receptores	5
Proteínas fosfatases	7
Metabolismo de cálcio	21
Ubiquitinação	6
Proteínas ribossomais	26
Unknown	107
Transporte	67
Metabolismo	19
Outros	99
Total	580

Tabela 11: Quantidade de oligonucleotídeos separados por categorias

A deposição dos oligonucleotídeos em lâminas CodeLink (Amersham Bioscience) foi feita seguindo as instruções do fabricante, os oligonucleotídeos foram diluídos em 50mM de fosfato de sódio pH 8,5 e a umidade relativa dentro do *spotter* foi mantida a 45% para garantir a atividade dos grupos reativos presentes na cobertura da lâmina. Após o processo de deposição as lâminas foram mantidas durante uma noite em uma câmara com umidade relativa de 75% feita com solução saturada de NaCl. É nesse passo que ocorre a reação entre o grupo modificado do

oligonucleotídeo e os grupos reativos presentes na cobertura da lâmina (éster de N-hidroxisuccinimida). Após esse período os grupos reativos foram bloqueados utilizando 50mM etanolamina, 0,1M Tris pH 9.0. Diversas modificações no protocolo de deposição foram realizadas e não foi possível padronizar a etapa de deposição dos oligonucleotídeos em lâminas *CodeLink*. Acreditamos que o problema deva estar relacionado com o processo de deposição dos oligonucleotídeos, ou seja que o equipamento *Generation III Microarrays Spotter™* (Amersham Pharmacia Biotech) não é apropriado para a deposição nesse tipo de lâmina, já que essa apresenta uma superfície irregular e portanto as agulhas do aparelho as quais transferem o DNA para a lâmina podem estar interagindo de maneira diferente com a lâmina, causando assim diferenças na quantidade de material imobilizado.

5. Discussão

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

A tabela 12 relaciona os fenótipos, de interesse para os nossos estudos, dos mutantes estudados até o momento.

Linhagens	Proliferação (tempo de dobramento)	Desenvolvimento	Tratamento com SNP ou H ₂ O ₂	Fonte
WT	9 - 10 horas	agregados, culminantes e corpos de frutificação	inibe a proliferação com pouca perda de viabilidade celular	Sussman e Sussman, 1967 Taminato <i>et al.</i> , 2002
<i>yakA</i> ⁻	acelerada 6 - 7 horas	ausente	significante morte celular ¹	Souza <i>et al.</i> , 1998
super-expressão de <i>yakA</i>	inibida	acelerado	não determinado	Souza <i>et al.</i> , 1998
<i>pufA</i> ⁻	normal	apresentam culminantes aberrantes e não formam corpo de frutificação	morte celular mais pronunciada do que em células <i>yakA</i> ⁻	Souza <i>et al.</i> , 1999 Taminato <i>et al.</i> , 2002
<i>yakA</i> ⁻ / <i>pufA</i> ⁻	acelerada	apresentam culminantes aberrantes e não formam corpo de frutificação	morte celular mais pronunciada do que em células <i>yakA</i> ⁻	Souza <i>et al.</i> , 1999 Taminato <i>et al.</i> , 2002
<i>pkaC</i> ⁻	normal	ausente	proliferação maior do que células selvagens ²	Taminato <i>et al.</i> , 2002
<i>yakA</i> ⁻ / <i>pkaC</i> ⁻	acelerada	ausente	proliferação maior do que células selvagens ²	Taminato <i>et al.</i> , 2002
super-expressão <i>pkaC</i>	normal	acelerado	morte celular mais pronunciada do que em células <i>yakA</i> ⁻	Taminato <i>et al.</i> , 2002
<i>keaA</i> ⁻	mais lenta (20-24 horas)	deficiência de agregação mais acentuada em baixa densidade celular	proliferação maior do que células selvagens ²	Mantzouranis <i>et al.</i> , submetido
<i>yakA</i> ⁻ / <i>keaA</i> ⁻	acelerada	ausente	proliferação maior do que células selvagens ²	Mantzouranis <i>et al.</i> , submetido
<i>acaA</i> ⁻	normal	ausente	proliferação maior do que células selvagens ²	Pitt <i>et al.</i> , 1992 Taminato <i>et al.</i> , 2002

¹ Se a incubação for realizada a 10°C não é observada a morte celular.

² Em relação a células selvagens submetidas a tratamento.

Tabela 12: Linhagens e fenótipos. Os fenótipos de relevância para os nossos estudos estão representados.

keaA foi isolado como um supressor da morte induzida por SNP em células *yakA*⁻. Experimentos de REMI foram realizados obtendo o duplo mutante *yakA*⁻/*keaA*⁻, inicialmente denominado 13-8. O gene isolado como o gene interrompido no mutante 13-8 foi seqüenciado e a seqüência de nucleotídeos foi determinada como idêntica à do gene DG1106 identificado no *Developmental Gene Program* pelo grupo do Dr. William Loomis como um gene necessário para a agregação (<http://glamdring.ucsd.edu/others/dsmith/dictydb.html>). O alinhamento das seqüências entre os clones 13-8 e DG1106 utilizando a ferramenta *Clustal W DNA Sequence Alignment Analysis* (Thompson *et al.* 1994) indicou 100% de identidade entre os dois genes. Para confirmar que a mutação de *keaA* era responsável pela proteção do mutante *yakA*⁻ contra a morte induzida por SNP, a interrupção do gene *keaA* foi refeita na linhagem selvagem e no nulo da *yakA* com a construção isolada do mutante 13-8.

A inserção do plasmídio utilizado pela técnica de REMI no mutante 13-8 está localizada entre os aminoácidos 1198 e 1199 e no mutante DG1106 a inserção está localizada entre os aminoácidos 1041 e 1042. Como KeaA possui 1207 aminoácidos, essas inserções estão situadas próximas à região C-terminal o que pode implicar em expressão residual de *keaA*. De fato, quando comparamos a expressão de *keaA* nesses mutantes com a expressão de *keaA* em células selvagens observa-se que nos mutantes existe 20% de expressão remanescente do transcrito truncado, o que não quer dizer que esse transcrito truncado dê origem a uma proteína estável, porém é uma hipótese que deve ser considerada (Figura 9). Devido a essa expressão remanescente de *keaA*, o mutante obtido utilizando o plasmídio p13-8 foi denominado deficiente em *keaA*. Resultados similares foram obtidos quando o mutante DG1106 foi analisado.

O fato do mutante obtido pela técnica de REMI possuir uma porção do seu gene transcrito nos levou a tentar obter um mutante nulo para *keaA*. A partir do DNA genômico de *D.discoideum* foram amplificadas as regiões promotora e terminadora de *keaA*, de aproximadamente 1Kb cada uma, e essas regiões foram intercaladas por um gene de resistência à blasticidina, de 1,4Kb. A relativa facilidade de obtenção do material recombinante se contrapôs a dificuldade de se obter um transformante. Cerca de 100 clones foram analisados por PCR e nenhum deles continha a construção desejada. Como as células deficientes em *keaA* são deficientes no processo de crescimento o que pode ter acontecido é que clones com deficiência no processo de crescimento foram sobrepujados pelo crescimento normal de células onde *keaA* não foi recombinado, dificultando assim o isolamento de mutantes nulos para *keaA*. Para verificarmos se isso poderia ser evitado, os clones foram coletados individualmente e

colocados em placas de 96 poços. Esses clones foram analisados mas também não foi observado nocaute.

Uma outra explicação para não termos conseguido obter o mutante nulo para *keaA* vem do fato de que dois experimentos independentes resultaram em inserção no final do gene e de que *keaA* é necessário para a fase de crescimento, já que células deficientes em *keaA* tem tempo de dobramento entre 20-24 horas enquanto para células selvagens esse tempo é de cerca de 8 horas. Além disso *keaA* também é necessário para o processo de desenvolvimento, sendo que sua participação é mais relevante quando as células estão em baixa densidade celular. Esses resultados nos dão fortes indícios de que *keaA* seja um gene essencial.

Apesar de não termos obtido o mutante nulo para *keaA* foi possível elucidar diversas funções de KeaA através da análise de células deficientes em *keaA*.

Como mencionado anteriormente *keaA* é necessário para a fase de crescimento, visto que essas células proliferam mais lentamente quando comparadas a células selvagens. *keaA* também é necessário para o processo de desenvolvimento, porém sua contribuição se mostra mais acentuada quando essas células estão em baixa densidade celular. Foi visto que células deficientes em *keaA* apresentam um atraso de 4 horas no processo de agregação quando essas células são plaqueadas em baixa densidade celular, como no caso de experimentos em placas de agar/fosfato ou na presença de *K.aerogenes*, porém esse atraso é diminuído para cerca de uma hora quando essas células estão em maior densidade celular, como no caso de experimentos em filtros de nitrocelulose. Isso sugere que as células deficientes em *keaA* tenham uma deficiência na quimiotaxia, já que em baixa densidade celular, onde as células estão mais afastadas, a contribuição da quimiotaxia é mais acentuada em relação à alta densidade celular. Não podemos descartar a possibilidade de que o fenótipo observado para células deficientes em *keaA* em relação ao processo de desenvolvimento ser menos severo devido à expressão residual do transcrito truncado poder gerar pequenos níveis de atividade de KeaA. Porém é possível afirmar que *keaA* está envolvido na regulação da fase de crescimento e da fase de desenvolvimento, assim como já foi mostrado para YakA, a qual coordena o tempo das divisões celulares e a transição da fase crescimento para desenvolvimento (Souza *et al.* 1998). A PKA também está envolvida na regulação do desenvolvimento, porém a função da PKA no crescimento não é óbvia já que tanto a subunidade catalítica quanto a regulatória estão presentes em baixos níveis durante o crescimento, mas mutantes nulos para esses genes apresentam crescimento normal.

Células selvagens e deficientes em *keaA* foram submetidas à carência nutricional em meio líquido e em seguida, pulsos de AMPc foram adicionados de 6 em

6 minutos durante 4 horas, simulando a sinalização que ocorre nas células durante a carência nutricional. Após esse período, algumas células formaram agregados e algumas células permaneceram isoladas. As células isoladas foram contadas e observou-se que cerca de 80% das células selvagens agregaram após 6 horas de carenciamento e esse número aumentou para 95% quando as células foram estimuladas com AMPc, já para células deficientes em *keaA*, 62% das células agregaram após 6 horas de carenciamento e a adição de AMPc aumentou a população de células agregadas para 71%. Assim, a adição de pulsos de AMPc pode estimular a agregação de células selvagens mais eficientemente que a de células deficientes em *keaA*, indicando que as células do mutante são menos responsivas a pulsos de AMPc, o que implica KeaA na regulação da recepção do sinal, talvez via CAR1 (Mantzouranis *et al.*, submetido).

O mRNA de *keaA* está presente na fase de crescimento. Os níveis de mRNA de *keaA* foram medidos tanto em células selvagens crescendo na presença de *K. aerogenes* quanto em meio axênico. Um aumento nos níveis de mRNA de *keaA* foi observado entre os tempos de 44 horas, tempo no qual as células estão em fase de crescimento, e 50h, tempo no qual ocorre o esgotamento das bactérias (Figura 10 e 11). Esse perfil de expressão na fase de crescimento também foi observado para os níveis de mRNA de *yakA* (Souza *et al.* 1998). Esse tipo de regulação está associado à pré-carência, quando as células se preparam para um eventual esgotamento de nutrientes.

O padrão de expressão de *keaA* também foi analisado durante a fase de desenvolvimento e como *keaA* foi isolado como um supressor de *yakA* e YakA é reguladora da sinalização por AMPc e da atividade da PKA, os níveis de *keaA* também foram analisados em células *yakA*⁻ e *pkaC*⁻. Em células selvagens, após 2 horas de carenciamento os níveis de mRNA de *keaA* são aumentados cerca de 4 vezes e esses níveis são mantidos altos depois de 12 horas de desenvolvimento. Em células *yakA*⁻ não ocorre aumento nos níveis de mRNA de *keaA* depois de 2 horas de carência nutricional. Depois de 12 horas de carenciamento ocorre um aumento nos níveis de mRNA de *keaA*, porém esses níveis são inferiores aos observados em células selvagens. Já a ausência de *pkaC* parece não afetar os níveis de mRNA de *keaA*.

O fenótipo de deficiência no processo de agregação observado para células deficientes em *keaA* são consistentes com baixos níveis de *pkaC* e por consequência baixos níveis de *carA* e *acaA*. Para verificarmos se a deficiência no processo de agregação observado em células deficientes em *keaA* estava relacionado com baixos níveis de *pkaC*, *carA* e *acaA*, células selvagens e células deficientes em *keaA* foram carenciadas em placas agar/fosfato, já que nessas condições a deficiência de

agregação de células deficientes em *keaA* é mais pronunciada, e coletadas após 8 horas de carenciamento, já que nesse ponto, células selvagens apresentam ondas espirais e células deficientes em *keaA* não começaram a agregar (Figura 14 E).

Experimentos de qPCR indicaram que nessas condições células deficientes em *keaA* expressam menores níveis de mRNA de *pkaC*, *pkaR*, *carA* e *acaA* (Figura 14 A, B, C, D). Esse deve ser o motivo pelo qual células deficientes em *keaA* apresentam um atraso no início da agregação em relação a células selvagens.

A síntese de AMPc através da adenilil ciclase é necessária para a agregação das células funcionando como um quimioatraente e como segundo mensageiro. Foi também mostrado um papel de AMPc na resposta à estresse oxidativo e nitrosoativo. A descoberta de que a via do AMPc esta envolvida na resposta a estresse oxidativo/nitrosoativo veio do isolamento da *pkaC* como um supressor da morte induzida por SNP em células *yakA*⁻ (Taminato *et al.* 2002). Células *yakA*⁻/*pkaC*⁻ tem taxas de proliferação maiores do que as de células selvagens quando tratadas com SNP, o que se contrapõe ao fenótipo de morte celular observado em células *yakA*⁻ (Taminato *et al.* 2002). Tratamento de células selvagens com SNP ou H₂O₂ induz a produção de AMPc e a ativação da PKA de uma maneira similar a bem estabelecida resposta a estresse nutricional. Células selvagens respondem a esses tratamentos com a parada da proliferação, o que deve proteger as células dos efeitos deletérios da divisão celular sob condições de estresses.

Em células *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ submetidas ao mesmo tratamento a inibição do crescimento é menos severa do que em células selvagens, ou seja as células continuam crescendo mesmo sob situações de estresse, o que pode implicar em acúmulo de mutações. Além disso, em células *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ tratadas com SNP ou H₂O₂ não há acúmulo de AMPc. O crescimento de células deficientes em PKAC (*pkaC*⁻ ou *yakA*⁻/*pkaC*⁻) é mais rápido do que em células selvagens incubadas com SNP e linhagens com alta atividade de PKA (*pufA*⁻ ou *yakA*[*pkaC*/*pkaC*]) são mais sensíveis ao tratamento. Portanto a sinalização de AMPc através de AcaA e a ativação de PKA devem mediar à resposta de inibição do crescimento (Taminato *et al.* 2002). Sabendo que PKAC é necessária para a inibição do crescimento em resposta a estresses, a presença de mRNA de *pkaC* na fase de crescimento pode estar associada a uma resposta rápida nessas condições.

keaA também foi isolado como um supressor da morte induzida por SNP em células *yakA*⁻, no mesmo experimento de REMI em que foi isolado a *pkaC* (Mantzouranis *et al.*, submetido).

Células deficientes em *keaA* são mais resistentes a estresses oxidativo e nitrosoativo, como o observado para células *pkaC*⁻ e *acaA*⁻ (Taminato *et al.* 2002). Os

níveis de AMPc foram medidos em células deficientes em *keaA* mostrando que também não há acúmulo de AMPc nesse mutante (Tabela 6 e Mantzouranis *et. al.*, submetido). Esses dados mostram que KeaA também está envolvido na parada do crescimento em resposta a estresse nitrosoativo e oxidativo.

O fato de que células *yakA⁻*, as quais possuem baixos níveis de PKA, morrem em resposta ao tratamento com SNP ou H₂O₂, indica que o gene *yakA* é essencial para a sobrevivência das células de *Dictyostelium* em condições de estresses, a menos que *pkaC* ou *keaA* estejam ausentes, o que é mostrado pelo fato de células *yakA⁻/pkaC⁻* e *yakA⁻/keaA⁻* sobreviverem a condições de estresses.

Os níveis de *dscA* também foram medidos em células selvagens e células deficientes em *keaA* carenciadas em placas agar/fosfato por 8 e 12 horas e foi observado que células deficientes em *keaA* expressam maiores níveis de *dscA*. Discoidina é inibida durante o desenvolvimento por AMPc via receptor de AMPc. A via de indução e inibição de *dscA* está ilustrada na figura 27. Esse resultado evidencia a deficiência na produção de AMPc durante o desenvolvimento.

Adaptado de (Endl *et al.* 1996)

Figura 27: Regulação da transcrição do gene *dscA*. *dscA* é induzido via PSF e CMF. A indução por CMF é dependente do receptor acoplado a proteína G de CMF (CMFR),

e requer Gα2, CRAC e PKA. O modelo também inclui uma adenilil ciclase indefinida, visto que células *aca⁻* apresentam níveis normais de mRNA de *dscA*. Repressão de *dscA* é conferida via receptor de AMPc, CAR1 e de maneira independente de Gα2. Fluxo de Ca²⁺ mediado por CAR1 também reprime a expressão de *dscA*.

Com o objetivo de confirmarmos o envolvimento de *keaA* no processo de desenvolvimento foram obtidos mutantes que super-expressam a região rica em cisteínas e o domínio Kelch.

O fato de células que super-expressam o domínio Kelch apresentarem o processo de desenvolvimento normal em baixa densidade celular, e de que os níveis de *pkaC* são similares aos observados em células selvagens não contribuiu para a elucidação do papel desse domínio. Células que super-expressam o domínio Kelch, apesar de apresentarem níveis similares de *pkaC* em relação a células selvagens, apresentaram elevados níveis de *acaA* e *carA*. Uma das hipóteses seria que KeaA interagisse com PKA e essa fosse ativada aumentando assim os níveis de *carA* e *acaA*. Em levedura, proteínas com repetições Kelch inibem a atividade de PKA. Essas proteínas interagem diretamente com PKA por meio da subunidade catalítica e estimulam a associação entre a subunidade catalítica e a subunidade regulatória (Peeters, T. *et al.*, 2006). Essa hipótese foi testada através da técnica de duplo híbrido e concluiu-se que não ocorre interação entre PKA e KeaA (figuras 22, 23 e 24).

Quando o domínio rico em cisteínas foi super-expresso em células selvagens observamos a formação de agregados, culminantes e corpos de frutificação reduzidos. Com relação à expressão de genes essenciais para o desenvolvimento foi observado níveis similares de *pkaC* e *acaA*, porém níveis menores de *pkaR* e *carA*.

A proteína Keap1 de camundongo, e similar a KeaA é uma proteína rica em cisteínas. Esses resíduos funcionam como “sensores” celulares que reagem covalentemente com moléculas indutoras (eletrófilos e oxidantes) causando a dissociação do complexo Keap1-Nrf2, liberando Nrf2 que migra para o núcleo ligando-se a elementos de resposta anti-oxidante (ARE) e ativando a transcrição de enzimas detoxificadoras (Dinkova-Kostova *et al.* 2002).

É possível que KeaA interaja com um fator de transcrição modulando a expressão de enzimas detoxificantes. No entanto, *D. discoideum* não possui um gene similar a Nrf2.

Os resultados da super-expressão do domínio rico em cisteínas e a análise da expressão de genes essenciais para a resposta a estresse oxidativo, nitrosoativo e nutricional não foram conclusivos para a elucidação do papel das cisteínas presentes em KeaA. Ficou aparente, no entanto, um papel desse domínio no processo de

agregação já que a sua super-expressão alterou o perfil de desenvolvimento. Análises adicionais tais como avaliação da expressão de genes que codificam enzimas detoxificadoras em células que super-expressam o domínio rico em cisteínas devem contribuir para a elucidação desse papel.

A via postulada até o momento mostra a ativação de *yakA* em resposta a estresses nutricional, nitrosoativo, oxidativo e térmico, ou seja, os mesmos mecanismos que regulam a resposta ao estresse nutricional regulam também a resposta a estresse nitrosoativo e oxidativo. É provável que em condições de carência nutricional mudanças do metabolismo das células possam estar alterando o estado redox e indicando para as células mudanças do ambiente que exigem a adaptação com parada de crescimento e indução de genes de detoxificação e desenvolvimento.

A YakA é necessária para a diminuição da expressão de genes vegetativos, em particular para a diminuição dos níveis de mRNA do gene *pufA*. PufA inibe a tradução do mRNA da *pkaC* e portanto a inibição do gene *pufA* é fundamental para que ocorra um aumento nos níveis de PKA-C, o que leva a um subsequente aumento de adenilil ciclase e receptor de AMPc, os quais se inserem na membrana celular tornando as células capazes de responder a AMPc (Souza *et al.* 1999).

Baseados nos resultados expostos anteriormente e na via mencionada acima foram postuladas diferentes vias, uma que regula o processo de desenvolvimento quando as células estão em baixa densidade celular e uma quando estão em alta densidade celular. Em alta densidade celular, em resposta ao estresse nutricional, ocorre a ativação da *yakA*, a qual inibe os níveis de mRNA de *pufA* permitindo que haja um aumento nos níveis de PKA-C, já que em alta densidade celular células deficientes em *keaA* são capazes de aumentar os níveis de *pkaC*, ou seja, a ativação de *pkaC* é independente de *keaA*. Em baixa densidade celular, *keaA* mostrou-se importante no aumento dos níveis de *pkaC*. Em células deficientes em *keaA* não ocorre aumento dos níveis de *pkaC* no processo de desenvolvimento, mostrando que nesse caso a ativação de *pkaC* é dependente de *keaA* (figura 26).

É possível que KeaA atue como um adaptador na formação do complexo envolvido na síntese de AMPc. Na sua ausência, a sinalização deve ocorrer, mas com uma eficiência reduzida afetando assim a quimiotaxia em baixa densidade celular talvez por afetar o estabelecimento da polaridade, já que o estímulo por quimioatraente é um pré-requisito para migração (Kriebel *et al.* 2003). Porém estudos adicionais são necessários para identificar se KeaA é necessário para a polarização celular.

Figura 28: Via proposta para mediar a resposta a estresses em *Dictyostelium discoideum*. YakA é necessária para a diminuição da expressão de genes vegetativos, em particular para a diminuição dos níveis de mRNA do gene *pufA*. PufA inibe a tradução do mRNA da *pkaC* e portanto a inibição do gene *pufA* é fundamental para que ocorra um aumento nos níveis de PKA-C. Além da inibição da *pufA*, a ativação de *keaA* é necessária para que os níveis de *pkaC* aumentem em baixa densidade celular. O aumento dos níveis de *pkaC* leva a um subsequente aumento de adenilil ciclase e receptor de AMPc, os quais se inserem na membrana celular tornando as células capazes de responder a AMPc. As setas indicam ativação e as barras inibição.

5.2. Análise por microarranjos

O processo de padronização para a hibridização em lâminas espelhadas foi iniciado utilizando o *CyScribe Post-Labelling kit* (Amersham Bioscience). Optamos por esse *kit* pois vários grupos de pesquisa que também desenvolviam seus projetos no laboratório CAGE já haviam constatado que esse *kit* apresentava melhores rendimentos se comparado ao *CyScribe First Strand cDNA Labelling kit* (Amersham Bioscience). A diferença entre eles é a de que no *CyScribe First Strand cDNA Labelling kit* a transcrição reversa e a marcação do cDNA ocorrem concomitantemente e no *Post-Labelling* é realizada primeiro a síntese de cDNA e, somente depois que o

cDNA é sintetizado e purificado, ele é marcado com os fluoróforos através de reações entre estes e nucleotídeos modificados (com radical aminoalil). A princípio as hibridizações foram feitas a partir de RNA total não tratado com DNase e por isso optamos por utilizar oligo-dT para a síntese do cDNA já que este é específico para RNA mensageiro; o *kit* utilizado também nos dava a opção de utilizarmos oligonucleotídeos randômicos, apesar desses *primers* aumentarem o rendimento da reação, pois oferecem pontos adicionais de anelamento nos quais a enzima pode começar a agir. A presença de oligonucleotídeos randômicos poderia gerar cDNAs provenientes de DNA genômico ou RNA ribossomal.

Para definir as condições ideais para realização dos experimentos foram feitos inúmeros testes, dentre eles foram testados diferentes quantidades de RNA total, diferentes métodos de purificação do cDNA bem como diferentes métodos de purificação do cDNA marcado, já que essa representa uma etapa crítica pois dependendo do método utilizado a perda de produto é muito grande. Testes relacionados com as etapas de lavagem também foram realizados pois como *Dictyostelium* possui uma grande quantidade de A-T as interações entre o cDNA espotado e o hibridizado são relativamente fracas. Fizemos então lavagens menos estridentes, porém os resultados obtidos não se mostraram muito satisfatórios.

Uma das hipóteses para a fraca marcação dos arranjos foi a de que como *Dictyostelium* possui o genoma altamente rico em A-T, provavelmente a síntese de cDNA utilizando apenas oligo-dT estaria gerando além de cDNA proveniente de RNA mensageiro, cDNA proveniente de RNA ribossomal e até mesmo de DNA genômico. Optamos então por fazer a extração de RNA mensageiro, o que gerou melhores resultados.

A extração dos dados foi feita através do programa *ArrayVision* utilizando-se a medida de densidade MTM (*Median-based Trimmed Mean*) e subtraindo-se do valor da intensidade de fundo. Foram descartados *pixels* que estavam fora da faixa de ± 4 MADs (*Median Absolute Deviations*). A medida da densidade de *pixels* pelo MTM é vantajosa por se basear na medida da mediana, que é menos influenciada por valores extremos do que a média e por descartar *pixels* que estejam fora da faixa de ± 4 MADs (*Median Absolute Deviations*). O valor de 4 MADs foi estipulado como suficiente para garantir que os *pixels* indesejáveis fossem descartados sem que se perdesse muito dos sinais obtidos.

Os dados extraídos devem ser inicialmente normalizados com o objetivo de minimizar variações sistemáticas nos níveis de expressão gênica medidos entre as duas amostras de mRNA co-hibridizadas, bem como permitir a comparação dos níveis de expressão entre diferentes lâminas. Como exemplo de variações sistemáticas que

ocorrem em um experimento de microarranjo podem ser citadas as diferenças nos níveis de fluorescência entre os fluoróforos Cy3 e Cy5 (devido às propriedades intrínsecas de cada um dos fluoróforos), diferenças na eficiência de incorporação dos fluoróforos, diferenças na quantidade inicial de RNA, variabilidade experimental no procedimento de hibridização (Yang *et al.* 2002). Todos esses fatores levam a diferenças entre as intensidades para o canal de Cy3 e de Cy5 que não refletem expressão diferencial. Há diferentes formas de se proceder à normalização dos dados, como revisado em (Quackenbush 2001) e (Quackenbush 2002).

De uma forma geral, os diferentes métodos de normalização sempre assumem que a maior parte dos elementos analisados no microarranjo possui em média uma razão de expressão entre as duas amostras igual a um, ou seja, não apresentam expressão diferencial. Com isso, calcula-se um fator de normalização, usado para ajustar os dados, compensando o efeito da variabilidade experimental e equilibrando a intensidade dos sinais de fluorescência entre os dois canais. Para a normalização dos dados foi utilizado o método de Lowess. Os estudos de (Park *et al.* 2003) mostraram que métodos de normalização intensidade-dependentes possuem melhor desempenho do que os métodos baseados em normalização global.

Além da normalização dos dados extraídos, outro ponto importante para a análise dos dados de experimentos com microarranjos é a definição do critério de genes diferencialmente expressos. Comumente, opta-se pela adoção de um valor arbitrário, onde um gene é considerado diferencialmente expresso se o valor da sua razão normalizada entre os dois canais for duas vezes maior ou duas vezes menor na amostra experimental em relação a controle. Apesar dessa estratégia ser comumente empregada, sabe-se que o uso de um valor único para a determinação de padrão de expressão diferencial não é o mais adequado para diferentes faixas de valores de intensidade. Com isso, um gene pode ser considerado diferencialmente expresso quando as alterações no seu valor de razão referem-se somente a flutuações aleatórias. Essa observação fica nítida quando são realizadas hibridizações homotípicas, ou seja, hibridizações onde alvos provenientes da mesma amostra de RNA, porém marcados com diferentes fluoróforos, são hibridizados entre si. Nesse caso, teoricamente espera-se que todos os pontos apresentem $M = \text{zero}$ (o que equivale a uma razão de expressão entre as duas amostras igual a 1). Entretanto, a análise do gráfico $M \times S$ para esses tipos de experimentos mostra que, mesmo para hibridizações homotípicas, nem todos os pontos encontram-se precisamente na região de $M = \text{zero}$. O deslocamento de alguns pontos para fora da região de $M = \text{zero}$ é devido a flutuações experimentais aleatórias inerentes à metodologia de microarranjos. Observa-se, também, que os pontos se mostram mais dispersos para

valores menores de intensidade. Com isso, conclui-se que a adoção de um valor arbitrário como critério de diferencialmente expresso pode ser um valor subestimado para pontos de baixa intensidade e superestimado para pontos de intensidade alta. Sendo assim, para a determinação dos valores de razão da intensidade entre os dois canais acima ou abaixo dos quais um gene seria considerado como diferencialmente expresso, foram realizadas hibridizações homotípicas e a partir dos dados obtidos foram definidos diferentes valores limite de acordo com o nível de intensidade.

Um gene foi considerado como diferencialmente expresso quando pelo menos 60% dos pontos-réplicas mostraram valores acima ou abaixo dos valores de corte determinados para a respectiva faixa de intensidade de sinal e resultados concordantes foram obtidos para as duas amostras biológicas.

Células selvagens e células deficientes em *keaA* foram tratadas ou não com SNP ou H₂O₂ por um período de 12 horas. Amostras de 1x10⁷ células foram coletadas antes da adição da droga, o qual foi considerado o ponto 0h, e depois de 2 e 12 horas de tratamento. Para cada condição analisada foram realizados dois experimentos independentes e essas amostras foram hibridizadas com inversão do fluoróforo.

O gene *dscA*, que codifica para a proteína discoidina I, mostrou-se induzido durante a fase de crescimento tanto em células selvagens quanto em células deficientes em *keaA*. Em resposta ao tratamento com H₂O₂ por 12 horas ocorreu repressão de *dscA* e isso não foi observado em células deficientes em *keaA*. *dscA* não foi detectado como diferencialmente expresso em células deficientes em *keaA* depois de 12 horas de tratamento com H₂O₂ nos resultados de microarranjos. Pelo fato da expressão desse gene se mostrar afetada pela deleção de *keaA*, esse foi selecionado para ser validado pela técnica de qPCR. Para validação dos dados obtidos através da técnica de microarranjos foi utilizada uma terceira réplica biológica, o que nos dá uma maior confiabilidade dos dados obtidos. Os resultados de qPCR confirmam que *dscA* é induzido concomitantemente com um aumento da densidade celular tanto em células selvagens quanto em células deficientes em *keaA*. Os resultados de qPCR também confirmaram que *dscA* é reprimido depois de 12 horas de tratamento com H₂O₂ em células selvagens, porém em células deficientes em *keaA* os dados mostram que esse gene é induzido depois de 12 horas de tratamento com H₂O₂. Essa indução não foi detectada pelos experimentos de microarranjos. Essa discrepância entre as duas técnicas pode estar refletindo a maior sensibilidade da técnica de qPCR.

O fato dos níveis de *dscA* aumentarem durante a fase de crescimento das células, já era conhecido pois esse gene é regulado por PSF (Rathi *et al.* 1991), um fator que tem a sua concentração aumentada proporcionalmente a densidade celular permitindo que as células avaliem sua fonte de alimento em relação à densidade

celular permitindo assim que as células mudem gradualmente o padrão da expressão gênica se preparando para uma futura falta de nutrientes, ou seja PSF é um sensor de densidade celular (*quorum sensor*) (Clarke *et al.*, 1987). Em células crescendo em baixa densidade celular, os níveis de mRNA e da proteína discoidina são muito baixos e aumentam ao longo da fase de crescimento e na fase inicial do desenvolvimento (Clarke *et al.* 1987; Clarke *et al.* 1988; Rath *et al.* 1991).

Discoidina é uma proteína intracelular de ligação a N-acetilgalactosamina de aproximadamente 30 kDa e é essencial para organização do citoesqueleto e para a manutenção da morfologia celular durante a agregação. *DscA* também é necessário para as células se alinharem durante a agregação (Alexander *et al.* 1992).

A descoberta de que o gene *dscA* é reprimido em resposta ao tratamento com H₂O₂ deve estar relacionado ao fato de que esse tratamento inibe a proliferação celular como ocorre quando há detecção da carência nutricional. A diminuição dos níveis de *dscA* deve ser controlada por AMPc e como células deficientes em *keaA* não acumulam AMPc em resposta ao tratamento com SNP e H₂O₂, os níveis de *dscA* mantêm-se elevados em células deficientes em *keaA* tratadas com esses compostos.

Foi isolado de um meio condicionado um complexo de proteínas de aproximadamente 400 kDa que induz a expressão de discoidina durante o crescimento e o desenvolvimento. Esse complexo foi denominado DIC (*discoidin-inducing complex*). Os constituintes de DIC são *pdsA*, uma fosfodiesterase de AMPc, duas novas proteínas DicA1 e DicB1 e uma proteína desconhecida. *PdsA* e *DicB* são dispensáveis para a expressão de discoidina, no entanto *DicA1* é um forte ativador da transcrição de discoidina. *DicA1* tem uma massa molecular de 80 kDa, contém um domínio PA14 conhecido por estar envolvido na ligação de carboidratos e contém repetições de 24 aminoácidos ricos em cisteínas que são similares a repetições encontradas em proteínas de *Dictyostelium* como a proteína de matriz extracelular *ecmB/PstA*, o fator de indução de células pré-esporo PSI, e o inibidor da fosfodiesterase de AMPc, PDI (Kolbinger *et al.* 2005).

Outro gene que apresentou um perfil de expressão semelhante ao perfil observado para discoidina foi *csbB*, um gene que como a discoidina está envolvido no processo de adesão celular. Os dados de microarranjos mostraram que *csbB* é induzido em células selvagens durante o crescimento, porém em células deficientes em *keaA* esse gene não foi detectado como diferencialmente expresso. Já nos resultados de qPCR, *csbB* mostrou-se induzido com o aumento da densidade celular tanto em células selvagens quanto em células deficientes em *keaA*. Em resposta ao tratamento com H₂O₂ por 12 horas o gene *csbB* foi reprimido em células selvagens e

em células deficientes em *keaA* esse gene não foi detectado como diferencialmente expresso. Esses resultados foram confirmados por qPCR.

KeaA deve estar envolvido na regulação de proteínas envolvidas na adesão celular.

Um putativo receptor de CMF (*conditioned medium factor*), CMFR1, foi detectado como inibido após 2 horas de tratamento com H₂O₂ tanto em células selvagens quanto em células deficientes em *keaA* através dos resultados de microarranjos. CMF como PSF também é um sensor de densidade celular.

Outro fator extracelular encontrado recentemente foi uma proteína de 60 kDa secretada por células de *Dictyostelium* em fase de crescimento chamada AprA. AprA é um regulador negativo da proliferação celular e é também importante para a esporulação. A via pela qual as células de *Dictyostelium* sentem a presença de AprA ainda não é conhecida (Choe *et al.* 2009). No entanto, é conhecido que células nulas para *crlA*, *yakA* e *qkgA* tem fenótipos semelhantes a células nulas para *aprA*, elas proliferam mais rápido e a densidade celular na fase estacionária é maior do que em células selvagens (Taminato *et al.* 2002; Abe *et al.* 2003; Raisley *et al.* 2004). É possível então que essas proteínas participem da via de transdução de sinal de AprA.

Outro gene selecionado para validação foi *cycB*, o qual codifica a ciclina B, uma proteína que atua na transição da fase G2 para M. Esse gene mostrou-se reprimido depois de 2 horas de tratameto com SNP e H₂O₂ em células selvagens em experimentos de microarranjos o que corrobora com o fato desses estresses inibirem o ciclo celular (Taminato *et al.* 2002). Os dados de qPCR confirmam que *cycB* é inibida em células selvagens e em células deficientes em *keaA* em resposta ao tratamento com SNP e mostram que a expressão de *cycB* apesar de ser afetada por SNP em células *keaA*, apresenta a magnitude da inibição bem menor. Dados de qPCR mostraram que *cycB* é induzida em resposta ao tratamento com H₂O₂ em células deficientes em *keaA*.

Durante a fase de crescimento vegetativo, o ciclo celular de *Dictyostelium* é caracterizado por fases S e M curtas, pela ausência da fase G1 e por uma longa fase G2 (Weijer *et al.* 1984), sugerindo que a transição da fase G2 para M deve ser um importante sítio de controle do ciclo celular nesse organismo. O sistema de controle envolvido na transição da fase G2 para M é altamente conservado em células eucarióticas. O início da mitose requer um complexo de proteína quinase, consistindo de uma subunidade catalítica (proteína quinase *cdc2*) (Dunphy *et al.* 1988; Gautier *et al.* 1988) e uma subunidade regulatória (ciclina B) (Lohka *et al.* 1988; Draetta *et al.* 1989; Labbé *et al.* 1989; Meijer *et al.* 1989; Gautier *et al.* 1990). Ciclina B acumula durante G2, atingindo um máximo na transição da fase G2 para M (Evans *et al.* 1983;

Standart *et al.* 1987). A interação e formação do complexo é desfeita durante a mitose, o qual resulta na inativação da proteína quinase cdc2 e permite que as células saiam da fase M. A destruição de ciclina B e o final da mitose é dependente da sua ubiquitinação, a qual é marcada pela região de destruição da ciclina, uma curta sequência consenso localizada na porção N-terminal desta proteína (Glotzer *et al.* 1991).

Os níveis de mRNA e de proteína de ciclina B oscilam durante o ciclo celular com um acúmulo máximo de mRNA ocorrendo antes da divisão celular e máximos níveis de proteína ocorrendo durante a divisão celular. Em *Dictyostelium* a produção de mRNA de *cycB* e da proteína ciclina B mostram um padrão similar ao de *S. cerevisiae* e de cultura de células de tecido humano (Luo *et al.* 1994).

Os níveis de mRNA de *cycB* variam dramaticamente durante o desenvolvimento atingindo um máximo no estágio de agregado. No entanto, as quantidades da proteína ciclina B variam ligeiramente, atingindo um pico no início do desenvolvimento e diminuindo no final do estágio de agregação.

pefA foi identificado através da técnica de microarranjo como induzido depois de 2 horas de tratamento com SNP em células selvagens e depois de 12 horas com esse mesmo tratamento tanto em células selvagens quanto em células deficientes em *keaA*.

Os genes *pefA* e *pefB* foram identificados como homólogos de ALG-2 (*apoptosis-linked gene 2*) de mamífero, o qual está envolvido na morte celular programada (Ohkouchi *et al.* 2001). ALG-2 é uma pequena proteína que se liga a cálcio e cuja expressão é necessária para que a morte celular ocorra (Vito *et al.* 1999). O processo de apoptose em *Dictyostelium* é pouco conhecido.

O gene *cprD* codifica para uma cisteína proteinase que é expressa durante o crescimento e cujos níveis de mRNA de *cprD* diminuem imediatamente com a entrada no programa de desenvolvimento em células selvagens. Em células *yakA*⁻ os níveis de mRNA permanecem altos nessas mesmas condições (Souza *et al.* 1998). Esse gene mostrou se reprimido em resposta ao tratamento por 2 horas com SNP e H₂O₂ apenas em células selvagens o que corrobora com a inibição da proliferação celular mais pronunciada em células selvagens do que em células nulas para *keaA*.

CulD codifica para uma proteína que se liga a RNA e que a princípio foi anotada como uma proteína específica de culminação, porém através dos dados de microarranjos pudemos observar que essa proteína é induzida por estresse oxidativo e estresse nitrosoativo tanto em células selvagens quanto em células nulas para *keaA*. A expressão de *culD* é dependente de *srfA* e *stkA*, porém em células nulas para *srfA* a expressão de *culD* pode ser induzida pela ativação da PKA (Escalante *et al.* 2003). É

possível que *culD* esteja sendo induzido via PKA em resposta à SNP e H₂O₂ já que estes compostos já foram mostrados como ativadores de síntese de AMPc e de atividade da PKA (Taminato *et al.* 2002).

Foi também identificada a ativação de *mvpB* e a inibição de *mvpA* em resposta ao tratamento por 2 horas com H₂O₂. *mvpB* foi identificado como um supressor da *yakA* (nossos resultados não publicados) e foi determinado que a perda tanto de *mvpA* quanto de *mvpB* impede o crescimento sob condições de estresse nutricional (Vasu e Rome 1995).

6. Conclusões

Este projeto de doutorado teve desde o início duas frentes de interesse: a caracterização de KeaA, um membro da via YakA/PKA o qual foi isolado pela Dra Raquel Bagattini como supressor da morte induzida por SNP em células nulas para *yakA* através da técnica de mutagênese insercional mediada por enzima de restrição (REMI); e a caracterização de genes regulados pela via YakA/PKA em resposta a diversos estresses através da técnica de microarranjo.

Em conclusão, este trabalho mostra que as vias reguladas por YakA, KeaA, PkaC e AMPc tem um papel na regulação do desenvolvimento e do ciclo celular em resposta à mudanças ambientais. Todos esses elementos são necessários para a expressão de genes necessários para a adaptação das células em condições de estresses. A identificação de um gene que media a resposta ao desenvolvimento e a estresse redox é indicativa de que é possível que KeaA seja um modulador de desenvolvimento ativado pelo estado redox da célula, o que é substanciado pela presença de um domínio rico em cisteínas. Pode-se postular que a carência nutricional pode levar a alterações do estado redox da célula e sensores, possivelmente KeaA, poderiam ativar uma cascata de sinalização culminando com a produção de AMPc, alteração do padrão de expressão gênica associado ao crescimento, inibição do ciclo celular e disparo dos processos que mediam a agregação com a expressão de proteínas de adesão.

7. Bibliografia

- Abe, T., J. Langenick and J. G. Williams (2003). "Rapid generation of gene disruption constructs by in vitro transposition and identification of a Dictyostelium protein kinase that regulates its rate of growth and development." Nucleic Acids Res **31**(18): e107.
- Adachi, H., T. Hasebe, K. Yoshinaga, T. Ohta and K. Sutoh (1994). "Isolation of Dictyostelium discoideum cytokinesis mutants by restriction enzyme-mediated integration of the blasticidin S resistance marker." Biochem Biophys Res Commun **205**(3): 1808-14.
- Adams, J., R. Kelso and L. Cooley (2000). "The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function." Trends Cell Biol **10**(1): 17-24.
- Alexander, S., L. M. Sydow, D. Wessels and D. R. Soll (1992). "Discoidin proteins of Dictyostelium are necessary for normal cytoskeletal organization and cellular morphology during aggregation." Differentiation **51**(3): 149-61.
- Allen, R. G. and M. Tresini (2000). "Oxidative stress and gene regulation." Free Radic Biol Med **28**(3): 463-99.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-402.
- Anjard, C., L. Etchebehere, S. Pinaud, M. Veron and C. D. Reymond (1993). "An unusual catalytic subunit for the cAMP-dependent protein kinase of Dictyostelium discoideum." Biochemistry **32**(37): 9532-8.
- Ashworth, J. M. and D. J. Watts (1970). "Metabolism of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum grown in axenic culture." Biochem J **119**(2): 175-82.
- Aubry, L. and R. Firtel (1999). "Integration of signaling networks that regulate Dictyostelium differentiation." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 469-517.
- Augusto, O., M. G. Bonini, A. M. Amanso, E. Linares, C. C. Santos and S. L. De Menezes (2002). "Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology." Free Radic Biol Med **32**(9): 841-59.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (1995). "Current Protocols in Molecular Biology."
- Bai, C. and S. J. Elledge (1997). "Gene identification using the yeast two-hybrid system." Methods Enzymol **283**: 141-56.
- Baldauf, S. L. and W. F. Doolittle (1997). "Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa)." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12007-12.
- Barlow, P. N., B. Luisi, A. Milner, M. Elliott and R. Everett (1994). "Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger." J Mol Biol **237**(2): 201-11.
- Batlle, M., A. Lu, D. A. Green, Y. Xue and J. P. Hirsch (2003). "Krh1p and Krh2p act downstream of the Gpa2p G(alpha) subunit to negatively regulate haploid invasive growth." J Cell Sci **116**(Pt 4): 701-10.
- Bloomfield, G. and C. Pears (2003). "Superoxide signalling required for multicellular development of Dictyostelium." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3387-97.

- Blusch, J., S. Alexander and W. Nellen (1995). "Multiple signal transduction pathways regulate discoidin I gene expression in Dictyostelium discoideum." Differentiation **58**(4): 253-60.
- Borden, K. L., M. N. Boddy, J. Lally, N. J. O'Reilly, S. Martin, K. Howe, E. Solomon and P. S. Freemont (1995). "The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML." Embo J **14**(7): 1532-41.
- Borden, K. L. and P. S. Freemont (1996). "The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family." Curr Opin Struct Biol **6**(3): 395-401.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-16.
- Brock, D. A. and R. H. Gomer (1999). "A cell-counting factor regulating structure size in Dictyostelium." Genes Dev **13**(15): 1960-9.
- Brown, J. M. and R. A. Firtel (2000). "Just the right size: cell counting in Dictyostelium." Trends Genet **16**(5): 191-3.
- Cadet, J., T. Douki and J. L. Ravanat (2008). "Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells." Acc Chem Res **41**(8): 1075-83.
- Chen, M. Y., Y. Long and P. N. Devreotes (1997). "A novel cytosolic regulator, Pianissimo, is required for chemoattractant receptor and G protein-mediated activation of the 12 transmembrane domain adenylyl cyclase in Dictyostelium." Genes Dev **11**(23): 3218-31.
- Chisholm, R. L., P. Gaudet, E. M. Just, K. E. Pilcher, P. Fey, S. N. Merchant and W. A. Kibbe (2006). "dictyBase, the model organism database for Dictyostelium discoideum." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D423-7.
- Choe, J. M., D. Bakthavatsalam, J. E. Phillips and R. H. Gomer (2009). "Dictyostelium cells bind a secreted autocrine factor that represses cell proliferation." BMC Biochem **10**: 4.
- Clarke, M., N. Dominguez, I. S. Yuen and R. H. Gomer (1992). "Growing and starving Dictyostelium cells produce distinct density-sensing factors." Dev Biol **152**(2): 403-6.
- Clarke, M. and R. H. Gomer (1995). "PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of Dictyostelium." Experientia **51**(12): 1124-34.
- Clarke, M., S. C. Kayman and K. Riley (1987). "Density-dependent induction of discoidin-I synthesis in exponentially growing cells of Dictyostelium discoideum." Differentiation **34**(2): 79-87.
- Clarke, M., J. Yang and S. C. Kayman (1988). "Analysis of the prestarvation response in growing cells of Dictyostelium discoideum." Dev Genet **9**(4-5): 315-26.
- Cockburn, A. F., W. C. Taylor and R. A. Firtel (1978). "Dictyostelium rDNA consists of non-chromosomal palindromic dimers containing 5S and 36S coding regions." Chromosoma **70**(1): 19-29.
- Colombo, S., P. Ma, L. Cauwenberg, J. Winderickx, M. Crauwels, A. Teunissen, D. Nauwelaers, J. H. de Winde, M. F. Gorwa, D. Colavizza and J. M. Thevelein (1998). "Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in

- glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J **17**(12): 3326-41.
- Desikan, R., A. Clarke, J. T. Hancock and S. J. Neilli (1999). "H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures." Journal of Experimental Botany **50**: 1863-1866.
- Dimond, R. L., R. A. Burns and K. B. Jordan (1981). "Secretion of Lysosomal enzymes in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*." J Biol Chem **256**(13): 6565-72.
- Dimond, R. L., D. A. Knecht, K. B. Jordan, R. A. Burns and G. P. Livi (1983). "Secretory mutants in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*." Methods Enzymol **96**: 815-28.
- Dinkova-Kostova, A. T., W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto and P. Talalay (2002). "Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11908-13.
- Dohlman, H. G. (2002). "G proteins and pheromone signaling." Annu Rev Physiol **64**: 129-52.
- Draetta, G., F. Luca, J. Westendorf, L. Brizuela, J. Ruderman and D. Beach (1989). "Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF." Cell **56**(5): 829-38.
- Dunphy, W. G., L. Brizuela, D. Beach and J. Newport (1988). "The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis." Cell **54**(3): 423-31.
- Dypbukt, J. M., M. Ankarcrona, M. Burkitt, A. Sjöholm, K. Strom, S. Orrenius and P. Nicotera (1994). "Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines." J Biol Chem **269**(48): 30553-60.
- Eichinger, L., J. A. Pachebat, G. Glockner, M. A. Rajandream, R. Sucgang, M. Berriman, J. Song, R. Olsen, K. Szafranski, Q. Xu, B. Tunggal, S. Kummerfeld, M. Madera, B. A. Konfortov, F. Rivero, A. T. Bankier, R. Lehmann, N. Hamlin, R. Davies, P. Gaudet, P. Fey, K. Pilcher, G. Chen, D. Saunders, E. Sodergren, P. Davis, A. Kerhornou, X. Nie, N. Hall, C. Anjard, L. Hemphill, N. Bason, P. Farbrother, B. Desany, E. Just, T. Morio, R. Rost, C. Churcher, J. Cooper, S. Haydock, N. van Driessche, A. Cronin, I. Goodhead, D. Muzny, T. Mourier, A. Pain, M. Lu, D. Harper, R. Lindsay, H. Hauser, K. James, M. Quiles, M. Madan Babu, T. Saito, C. Buchrieser, A. Wardroper, M. Felder, M. Thangavelu, D. Johnson, A. Knights, H. Loulseged, K. Mungall, K. Oliver, C. Price, M. A. Quail, H. Urushihara, J. Hernandez, E. Rabinowitsch, D. Steffen, M. Sanders, J. Ma, Y. Kohara, S. Sharp, M. Simmonds, S. Spiegler, A. Tivey, S. Sugano, B. White, D. Walker, J. Woodward, T. Winckler, Y. Tanaka, G. Shaulsky, M. Schleicher, G. Weinstock, A. Rosenthal, E. C. Cox, R. L. Chisholm, R. Gibbs, W. F. Loomis, M. Platzer, R. R. Kay, J. Williams, P. H. Dear, A. A. Noegel, B. Barrell and A. Kuspa (2005). "The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*." Nature **435**(7038): 43-57.
- Endl, I., A. Konzok and W. Nellen (1996). "Antagonistic effects of signal transduction by intracellular and extracellular cAMP on gene regulation in *Dictyostelium*." Mol Biol Cell **7**(1): 17-24.

- Escalante, R., N. Moreno and L. Sastre (2003). "Dictyostelium discoideum developmentally regulated genes whose expression is dependent on MADS box transcription factor SrfA." Eukaryot Cell **2**(6): 1327-35.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." Cell **33**(2): 389-96.
- Fey, P., A. S. Kowal, P. Gaudet, K. E. Pilcher and R. L. Chisholm (2007). "Protocols for growth and development of Dictyostelium discoideum." Nat Protoc **2**(6): 1307-16.
- Fialkow, L., C. K. Chan, D. Rotin, S. Grinstein and G. P. Downey (1994). "Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants." J Biol Chem **269**(49): 31234-42.
- Firtel, R. A. (1996). "Interacting signaling pathways controlling multicellular development in Dictyostelium." Curr Opin Genet Dev **6**(5): 545-54.
- Firtel, R. A. and A. L. Chapman (1990). "A role for cAMP-dependent protein kinase A in early Dictyostelium development." Genes Dev **4**(1): 18-28.
- Firtel, R. A., A. Cockburn, G. Frankel and V. Hershfield (1976). "Structural organization of the genome of Dictyostelium discoideum: analysis by EcoR1 restriction endonuclease." J Mol Biol **102**(4): 831-52.
- Franke, J. and R. H. Kessin (1981). "The cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein of Dictyostelium discoideum. Purification and characterization." J Biol Chem **256**(14): 7628-37.
- Frankel, G., A. F. Cockburn, K. L. Kindle and R. A. Firtel (1977). "Organization of the ribosomal RNA genes of Dictyostelium discoideum. Mapping of the transcribed region." J Mol Biol **109**(4): 539-58.
- Freemont, P. S. (1993). "The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger." Ann N Y Acad Sci **684**: 174-92.
- Freemont, P. S. (2000). "RING for destruction?" Curr Biol **10**(2): R84-7.
- Funamoto, S., R. Meili, S. Lee, L. Parry and R. A. Firtel (2002). "Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis." Cell **109**(5): 611-23.
- Gao, T., K. Ehrenman, L. Tang, M. Leippe, D. A. Brock and R. H. Gomer (2002). "Cells respond to and bind countin, a component of a multisubunit cell number counting factor." J Biol Chem **277**(36): 32596-605.
- Garrett, S. and J. Broach (1989). "Loss of Ras activity in Saccharomyces cerevisiae is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase." Genes Dev **3**(9): 1336-48.
- Garrett, S., M. M. Menold and J. R. Broach (1991). "The Saccharomyces cerevisiae YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle." Mol Cell Biol **11**(8): 4045-52.
- Gaudet, P., K. E. Pilcher, P. Fey and R. L. Chisholm (2007). "Transformation of Dictyostelium discoideum with plasmid DNA." Nat Protoc **2**(6): 1317-24.
- Gautier, J., J. Minshull, M. Lohka, M. Glotzer, T. Hunt and J. L. Maller (1990). "Cyclin is a component of maturation-promoting factor from Xenopus." Cell **60**(3): 487-94.
- Gautier, J., C. Norbury, M. Lohka, P. Nurse and J. Maller (1988). "Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+." Cell **54**(3): 433-9.

- Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." Methods Enzymol **350**: 87-96.
- Glockner, G., L. Eichinger, K. Szafranski, J. A. Pachebat, A. T. Bankier, P. H. Dear, R. Lehmann, C. Baumgart, G. Parra, J. F. Abril, R. Guigo, K. Kumpf, B. Tunggal, E. Cox, M. A. Quail, M. Platzer, A. Rosenthal and A. A. Noegel (2002). "Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*." Nature **418**(6893): 79-85.
- Glotzer, M., A. W. Murray and M. W. Kirschner (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." Nature **349**(6305): 132-8.
- Guimera, J., C. Casas, C. Pucharcos, A. Solans, A. Domenech, A. M. Planas, J. Ashley, M. Lovett, X. Estivill and M. A. Pritchard (1996). "A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region." Hum Mol Genet **5**(9): 1305-10.
- Guyton, K. Z., Y. Liu, M. Gorospe, Q. Xu and N. J. Holbrook (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury." J Biol Chem **271**(8): 4138-42.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1999). Free radicals in biology and medicine.
- Han, D., E. Williams and E. Cadenas (2001). "Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space." Biochem J **353**(Pt 2): 411-6.
- Harashima, T. and J. Heitman (2005). "Galpha subunit Gpa2 recruits kelch repeat subunits that inhibit receptor-G protein coupling during cAMP-induced dimorphic transitions in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **16**(10): 4557-71.
- Harrison, J. E. and J. Schultz (1976). "Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase." J Biol Chem **251**(5): 1371-4.
- Hartley, A. D., M. P. Ward and S. Garrett (1994). "The Yak1 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* moderates thermotolerance and inhibits growth by an Sch9 protein kinase-independent mechanism." Genetics **136**(2): 465-74.
- Harwood, A. J., N. A. Hopper, M. N. Simon, D. M. Driscoll, M. Veron and J. G. Williams (1992). "Culmination in *Dictyostelium* is regulated by the cAMP-dependent protein kinase." Cell **69**(4): 615-24.
- Iijima, M., Y. E. Huang and P. Devreotes (2002). "Temporal and spatial regulation of chemotaxis." Dev Cell **3**(4): 469-78.
- Insall, R. H., R. D. Soede, P. Schaap and P. N. Devreotes (1994). "Two cAMP receptors activate common signaling pathways in *Dictyostelium*." Mol Biol Cell **5**(6): 703-11.
- Ito, N., S. E. Phillips, K. D. Yadav and P. F. Knowles (1994). "Crystal structure of a free radical enzyme, galactose oxidase." J Mol Biol **238**(5): 794-814.
- Joazeiro, C. A. and A. M. Weissman (2000). "RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity." Cell **102**(5): 549-52.
- Kimmel, A. R. and C. A. Parent (2003). "The signal to move: *D. discoideum* go orienteering." Science **300**(5625): 1525-7.
- Knowles, R. G. (1997). "Nitric oxide biochemistry." Biochem Soc Trans **25**(3): 895-901.
- Kolbinger, A., T. Gao, D. Brock, R. Ammann, A. Kisters, J. Kellermann, D. Hatton, R. H. Gomer and B. Wetterauer (2005). "A cysteine-rich

- extracellular protein containing a PA14 domain mediates quorum sensing in *Dictyostelium discoideum*." Eukaryot Cell **4**(6): 991-8.
- Koppenol, W. H., J. J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos and J. S. Beckman (1992). "Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide." Chem Res Toxicol **5**(6): 834-42.
- Kovtun, Y., W. L. Chiu, G. Tena and J. Sheen (2000). "Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2940-5.
- Kriebel, P. W., V. A. Barr and C. A. Parent (2003). "Adenylyl cyclase localization regulates streaming during chemotaxis." Cell **112**(4): 549-60.
- Kuspa, A. and W. F. Loomis (2006). "The Genome of *Dictyostelium discoideum*." Methods Mol Biol **346**: 15-30.
- Labbé, J. C., J. P. Capony, D. Caput, J. C. Cavadore, J. Derancourt, M. Kaghad, J. M. Lelias, A. Picard and M. Dorée (1989). "MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B." EMBO J **8**: 3053-3058.
- Le Douarin, B., C. Zechel, J. M. Garnier, Y. Lutz, L. Tora, P. Pierrat, D. Heery, H. Gronemeyer, P. Chambon and R. Losson (1995). "The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18." Embo J **14**(9): 2020-33.
- Leichtling, B. H., I. H. Majerfeld, E. Spitz, K. L. Schaller, C. Woffendin, S. Kakinuma and H. V. Rickenberg (1984). "A cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. II. Developmental regulation." J Biol Chem **259**(1): 662-8.
- Lenaz, G. (1998). "Role of mitochondria in oxidative stress and ageing." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 53-67.
- Lennon, S. V., S. J. Martin and T. G. Cotter (1991). "Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli." Cell Prolif **24**(2): 203-14.
- Liu, G., H. Kuwayama, S. Ishida and P. C. Newell (1993). "The role of cyclic GMP in regulating myosin during chemotaxis of *Dictyostelium*: evidence from a mutant lacking the normal cyclic GMP response to cyclic AMP." J Cell Sci **106** (Pt 2): 591-5.
- Liu, G. and P. C. Newell (1994). "Regulation of myosin regulatory light chain phosphorylation via cyclic GMP during chemotaxis of *Dictyostelium*." J Cell Sci **107** (Pt 7): 1737-43.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lohka, M. J., M. K. Hayes and J. L. Maller (1988). "Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(9): 3009-13.
- Loomis, W. F. (1996). "Genetic networks that regulate development in *Dictyostelium* cells." Microbiol Rev **60**(1): 135-50.
- Loomis, W. F. (1998). "Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 684-94.
- Louis, J. M., G. T. Ginsburg and A. R. Kimmel (1994). "The cAMP receptor CAR4 regulates axial patterning and cellular differentiation during late development of *Dictyostelium*." Genes Dev **8**(17): 2086-96.

- Lovering, R., I. M. Hanson, K. L. Borden, S. Martin, N. J. O'Reilly, G. I. Evan, D. Rahman, D. J. Pappin, J. Trowsdale and P. S. Freemont (1993). "Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2112-6.
- Luo, Q., C. Michaelis and G. Weeks (1994). "Overexpression of a truncated cyclin B gene arrests Dictyostelium cell division during mitosis." J Cell Sci **107 (Pt 11)**: 3105-14.
- Maeda, M., L. Aubry, R. Insall, C. Gaskins, P. N. Devreotes and R. A. Firtel (1996). "Seven helix chemoattractant receptors transiently stimulate mitogen-activated protein kinase in Dictyostelium. Role of heterotrimeric G proteins." J Biol Chem **271**(7): 3351-4.
- Manahan, C. L., P. A. Iglesias, Y. Long and P. N. Devreotes (2004). "Chemoattractant signaling in dictyostelium discoideum." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 223-53.
- Maniak, M. (2002). "Conserved features of endocytosis in Dictyostelium." Int Rev Cytol **221**: 257-87.
- Mann, S. K., J. M. Brown, C. Briscoe, C. Parent, G. Pitt, P. N. Devreotes and R. A. Firtel (1997). "Role of cAMP-dependent protein kinase in controlling aggregation and postaggregative development in Dictyostelium." Dev Biol **183**(2): 208-21.
- Mann, S. K. and R. A. Firtel (1991). "A developmentally regulated, putative serine/threonine protein kinase is essential for development in Dictyostelium." Mech Dev **35**(2): 89-101.
- Martens, H., J. Novotny, J. Oberstrass, T. L. Steck, P. Postlethwait and W. Nellen (2002). "RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase." Mol Biol Cell **13**(2): 445-53.
- Meijer, L., D. Arion, R. Golsteyn, J. Pines, L. Brizuela, T. Hunt and D. Beach (1989). "Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase." Embo J **8**(8): 2275-82.
- Meili, R. and R. A. Firtel (2003). "Follow the leader." Dev Cell **4**(3): 291-3.
- Mello Filho, A. C. and R. Meneghini (1984). "In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction." Biochim Biophys Acta **781**(1-2): 56-63.
- Miki, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P. A. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L. M. Bennett, W. Ding and et al. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science **266**(5182): 66-71.
- Neuhaus, E. M., W. Almers and T. Soldati (2002). "Morphology and dynamics of the endocytic pathway in Dictyostelium discoideum." Mol Biol Cell **13**(4): 1390-407.
- Niranjan, T., X. Guo, J. Victor, A. Lu and J. P. Hirsch (2007). "Kelch repeat protein interacts with the yeast Galpha subunit Gpa2p at a site that couples receptor binding to guanine nucleotide exchange." J Biol Chem **282**(33): 24231-8.
- Ohkouchi, S., K. Nishio, M. Maeda, K. Hitomi, H. Adachi and M. Maki (2001). "Identification and characterization of two penta-EF-hand Ca(2+)-binding proteins in Dictyostelium discoideum." J Biochem **130**(2): 207-15.
- Okui, M., T. Ide, K. Morita, E. Funakoshi, F. Ito, K. Ogita, Y. Yoneda, J. Kudoh and N. Shimizu (1999). "High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene

- in brain and heart during rat early development." Genomics **62**(2): 165-71.
- Otto, G. P., M. Y. Wu, N. Kazgan, O. R. Anderson and R. H. Kessin (2003). "Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*." J Biol Chem **278**(20): 17636-45.
- Parent, C. A. (2004). "Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 4-13.
- Park, T., S. G. Yi, S. H. Kang, S. Lee, Y. S. Lee and R. Simon (2003). "Evaluation of normalization methods for microarray data." BMC Bioinformatics **4**: 33.
- Peeters, T., W. Louwet, R. Gelade, D. Nauwelaers, J. M. Thevelein and M. Versele (2006). "Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13034-9.
- Pryor, W. A. (1986). "Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions." Annu Rev Physiol **48**: 657-67.
- Quackenbush, J. (2001). "Computational analysis of microarray data." Nat Rev Genet **2**(6): 418-27.
- Quackenbush, J. (2002). "Microarray data normalization and transformation." Nat Genet **32 Suppl**: 496-501.
- Rahmani, Z., C. Lopes, M. Rachidi and J. M. Delabar (1998). "Expression of the *mnf* (*dyrk*) protein in adult and embryonic mouse tissues." Biochem Biophys Res Commun **253**(2): 514-8.
- Raisley, B., M. Zhang, D. Hereld and J. A. Hadwiger (2004). "A cAMP receptor-like G protein-coupled receptor with roles in growth regulation and development." Dev Biol **265**(2): 433-45.
- Rathi, A., S. C. Kayman and M. Clarke (1991). "Induction of gene expression in *Dictyostelium* by prestarvation factor, a factor secreted by growing cells." Dev Genet **12**(1-2): 82-7.
- Reymond, C. D., P. Schaap, M. Veron and J. G. Williams (1995). "Dual role of cAMP during *Dictyostelium* development." Experientia **51**(12): 1166-74.
- Rich, T., R. L. Allen and A. H. Wyllie (2000). "Defying death after DNA damage." Nature **407**(6805): 777-83.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory."
- Saurin, A. J., K. L. Borden, M. N. Boddy and P. S. Freemont (1996). "Does this have a familiar RING?" Trends Biochem Sci **21**(6): 208-14.
- Saxe, C. L., 3rd, G. T. Ginsburg, J. M. Louis, R. Johnson, P. N. Devreotes and A. R. Kimmel (1993). "CAR2, a prestalk cAMP receptor required for normal tip formation and late development of *Dictyostelium discoideum*." Genes Dev **7**(2): 262-72.
- Schreck, R., P. Rieber and P. A. Baeuerle (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." Embo J **10**(8): 2247-58.
- Shaulsky, G., D. Fuller and W. F. Loomis (1998). "A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation." Development **125**(4): 691-9.
- Sherman, F., G. R. Fink and J. B. Hicks (1986). "Methods in Yeast Genetics." Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Shindoh, N., J. Kudoh, H. Maeda, A. Yamaki, S. Minoshima, Y. Shimizu and N. Shimizu (1996). "Cloning of a human homolog of the *Drosophila* minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21." Biochem Biophys Res Commun **225**(1): 92-9.
- Smith, D. J., M. E. Stevens, S. P. Sudanagunta, R. T. Bronson, M. Makhinson, A. M. Watabe, T. J. O'Dell, J. Fung, H. U. Weier, J. F. Cheng and E. M. Rubin (1997). "Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome." Nat Genet **16**(1): 28-36.
- Soderbom, F. and W. F. Loomis (1998). "Cell-cell signaling during Dictyostelium development." Trends Microbiol **6**(10): 402-6.
- Souza, G. M., A. M. da Silva and A. Kuspa (1999). "Starvation promotes Dictyostelium development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway." Development **126**(14): 3263-74.
- Souza, G. M., S. Lu and A. Kuspa (1998). "YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in Dictyostelium." Development **125**(12): 2291-302.
- Standart, N., J. Minshull, J. Pines and T. Hunt (1987). "Cyclin synthesis, modification and destruction during meiotic maturation of the starfish oocyte." Dev Biol **124**(1): 248-58.
- Staniek, K. and H. Nohl (1999). "H(2)O(2) detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system." Biochim Biophys Acta **1413**(2): 70-80.
- Sucgang, R., C. J. Weijer, F. Siegert, J. Franke and R. H. Kessin (1997). "Null mutations of the Dictyostelium cyclic nucleotide phosphodiesterase gene block chemotactic cell movement in developing aggregates." Dev Biol **192**(1): 181-92.
- Sullivan, S. G., D. T. Chiu, M. Errasfa, J. M. Wang, J. S. Qi and A. Stern (1994). "Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells." Free Radic Biol Med **16**(3): 399-403.
- Sussman, M. (1987). "Cultivation and synchronous morphogenesis of Dictyostelium under controlled experimental conditions." Methods Cell Biol **28**: 9-29.
- Sussman, R. and M. Sussman (1967). "Cultivation of Dictyostelium discoideum in axenic medium." Biochem Biophys Res Commun **29**(1): 53-5.
- Tagawa, M., T. Sakamoto, K. Shigemoto, H. Matsubara, Y. Tamura, T. Ito, I. Nakamura, A. Okitsu, K. Imai and M. Taniguchi (1990). "Expression of novel DNA-binding protein with zinc finger structure in various tumor cells." J Biol Chem **265**(32): 20021-6.
- Taminato, A., R. Bagattini, R. Gorjao, G. Chen, A. Kuspa and G. M. Souza (2002). "Role for YakA, cAMP, and protein kinase A in regulation of stress responses of Dictyostelium discoideum cells." Mol Biol Cell **13**(7): 2266-75.
- Tao, Y., A. Howlett and C. Klein (1992). "Nitric oxide-releasing compounds inhibit Dictyostelium discoideum aggregation without altering cGMP production." FEBS Lett **314**(1): 49-52.
- Tao, Y., A. Howlett and C. Klein (1992). "Nitric oxide stimulates the ADP-ribosylation of a 41-kDa cytosolic protein in Dictyostelium discoideum." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5902-6.

- Tao, Y., A. Howlett and C. Klein (1994). "Nitric oxide regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Dictyostelium discoideum cells and lysates." Eur J Biochem **224**(2): 447-54.
- Tao, Y., A. Howlett and C. Klein (1996). "Nitric oxide inhibits the initiation of cAMP pulsing in D. discoideum without altering receptor-activated adenylate cyclase." Cell Signal **8**(1): 26-34.
- Tao, Y. P., T. P. Misko, A. C. Howlett and C. Klein (1997). "Nitric oxide, an endogenous regulator of Dictyostelium discoideum differentiation." Development **124**(18): 3587-95.
- Tejedor, F., X. R. Zhu, E. Kaltenbach, A. Ackermann, A. Baumann, I. Canal, M. Heisenberg, K. F. Fischbach and O. Pongs (1995). "minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila." Neuron **14**(2): 287-301.
- Thomas, S. R., K. Chen and J. F. Keaney, Jr. (2002). "Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway." J Biol Chem **277**(8): 6017-24.
- Thomason, P. A., D. Traynor, G. Cavet, W. T. Chang, A. J. Harwood and R. R. Kay (1998). "An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in Dictyostelium." Embo J **17**(10): 2838-45.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (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**(22): 4673-80.
- Titus, M. A. (2000). "The role of unconventional myosins in Dictyostelium endocytosis." J Eukaryot Microbiol **47**(3): 191-6.
- Van Haastert, P. J. and P. N. Devreotes (2004). "Chemotaxis: signalling the way forward." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(8): 626-34.
- Vasu, S. K. and L. H. Rome (1995). "Dictyostelium vaults: disruption of the major proteins reveals growth and morphological defects and uncovers a new associated protein." J Biol Chem **270**(28): 16588-94.
- Vencio, R. Z. and T. Koide (2005). "HTself: self-self based statistical test for low replication microarray studies." DNA Res **12**(3): 211-4.
- Vito, P., L. Pellegrini, C. Guet and L. D'Adamio (1999). "Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a Ca²⁺-dependent reaction." J Biol Chem **274**(3): 1533-40.
- Vojtek, A. B. and S. M. Hollenberg (1995). "Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis." Methods Enzymol **255**: 331-42.
- Wang, B. and A. Kuspa (1997). "Dictyostelium development in the absence of cAMP." Science **277**(5323): 251-4.
- Wang, B., G. Shaulsky and A. Kuspa (1999). "Multiple developmental roles for CRAC, a cytosolic regulator of adenylyl cyclase." Dev Biol **208**(1): 1-13.
- Watts, D. J. and J. M. Ashworth (1970). "Growth of myxameobae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture." Biochem J **119**(2): 171-4.
- Weijer, C. J., G. Duschl and C. N. David (1984). "A revision of the Dictyostelium discoideum cell cycle." J Cell Sci **70**: 111-31.
- Williams, H. P. and A. J. Harwood (2003). "Cell polarity and Dictyostelium development." Curr Opin Microbiol **6**(6): 621-7.

- Woods, R. A. and R. D. Gietz (2001). "High-efficiency transformation of plasmid DNA into yeast." Methods Mol Biol **177**: 85-97.
- Wu, L. and J. Franke (1990). "A developmentally regulated and cAMP-repressible gene of Dictyostelium discoideum: cloning and expression of the gene encoding cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor." Gene **91**(1): 51-6.
- Wu, Y., K. S. Kwon and S. G. Rhee (1998). "Probing cellular protein targets of H₂O₂ with fluorescein-conjugated iodoacetamide and antibodies to fluorescein." FEBS Lett **440**(1-2): 111-5.
- Yang, Y. H., S. Dudoit, P. Luu, D. M. Lin, V. Peng, J. Ngai and T. P. Speed (2002). "Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation." Nucleic Acids Res **30**(4): e15.