UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Identificação de genes codificadores de serina/treonina fosfatases em *Dictyostelium discoideum* e caracterização funcional da proteína fosfatase do tipo 4 (PP4).

Leonardo Costa Fiorini

Tese de Doutorado
apresentada ao Departamento de
Bioquímica do Instituto de Química da
Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a Dr^a Aline Maria da Silva

São Paulo, maio de 2003

"Pois qual de vós, (...) não se assenta primeiro a fazer as contas (...) para ver se tem com que acabar?"

Lc 14: 28-30

"O intelecto tem um olho aguçado para os métodos e ferramentas, mas é cego quanto aos fins e valores."

Albert Einstein

"Não há equívoco maior do que confundir homens inteligentes com sábios."

Francis Bacon

"Aprendemos a voar como pássaros, e a nadar como peixes, mas não aprendemos a conviver como irmãos."

Martin Luther King

"Buscai primeiro o reino de Deus e a sua justiça, e tudo o mais vos será dado por acréscimo."

Lc 12:31

*à memória de João Batista Fiorini,
meu primeiro e mais importante
professor.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Aline Maria da Silva pela oportunidade de aprendizado contínuo, exemplo da coragem de enfrentar novos desafios e rigor científico.

A Luiz Paulo Moura Andrioli, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pela participação na minha formação científica, especialmente os “mistérios” de *Dictyostelium discoideum*.

Aos colegas de inestimável ajuda na solução de problemas técnicos: Luiz Paulo, Mara Lúcia, Ana Carolina e em especial a Daniela Gonzalez, que demonstrou que a soma de esforços conjuntos supera os esforços somados individualmente.

Aos Professores Doutores Carlos Winter, Suely Gomes, Virgínia Junqueira e Gláucia Souza pela cessão de vários equipamentos e reagentes de seus laboratórios.

À minha família pela compreensão e apoio constantes apesar da distância: Minha irmã gêmea "formiga atômica" Lu (Luciana), em especial pela acolhida em São Paulo e incentivo incansável. Minha mãe, Delma, pela extrema disponibilidade, pelo ombro amigo em momentos difíceis e pelo apoio financeiro. Meu irmão Sérgio "raça ruim", pelo exemplo de responsabilidade e esforço para nos mantermos sempre unidos, e em Cristo. Meu pai João Batista Fiorini (*in memoriam*), exemplo de caráter, princípios, valores e responsabilidade; pelo ensino e exemplo de que o conhecimento, a harmonia e a paz deve ser o objetivo de todos nós; pela formação de quase tudo que sou. Minha tia e madrinha Diva, pelo apoio espiritual; minhas tias lavrenses, Tereza, Ivone e Maria José (“Zeca”), em especial tia Henriqueta, pela acolhida calorosa e pelo apoio inestimável em momentos extremamente difíceis. Miguel Ângelo, pelo aconselhamento acadêmico.

À Elaine pelo amor, carinho, dedicação e bom humor.

Aos colegas e amigos do laboratório e do Instituto de Química, pelo enriquecimento profissional e pessoal incalculáveis (que espero terem sido bem

aproveitados) com discussões e questionamentos extremamente estimulantes, além do bom humor e ótimos momentos de descontração: Ana Carolina, Apuã, Mara Lúcia, Daniela Gonzalez, Alexandre Sanchez, Rosângela, Pio Zapella, Luciana Pugliese, Humberto Perez, Luciano e Juliana Fietto, José Ribamar, Renata Rapuano, Ariel Silber, Raquel Bagattini, Fabiana de Almeida, Deodoro Camargo, Fernando "DF", Flávio Canavez, Leandro Moreira, Juliana de Sousa, Daniela Beton, Lilian Etchebehere, Prof^a Gláucia Souza, Paulo Zaini, Flávia Rizzo, Prof. Sandro, Prof. Bayardo, Denise, Luciana Terumi, Milton, Abimael e Marly.

À Yvone e ao Alexandre pelo apoio técnico e pela grande amizade.

Aos profissionais da área de saúde que tornaram possível a realização deste trabalho: Waldete Alves Batista, Humberto Campolina França Jr., Luiz Carlos Coura Gomes, Eroy Aparecida da Silva, Marcelo Fernandes e Mônica Marques Zei Grünwald.

À Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro direto e indireto.

ÍNDICE

Resumo	i
Summary	ii
Abreviaturas	iii
1. Introdução	1
1.1 Serina/treonina fosfatases (PPs)	2
1.2 Serina/treonina proteína fosfatase 4 (PP4)	7
1.3. <i>Dictyostelium discoideum</i> como modelo para o estudo da fosforilação reversível de proteínas	10
2. Objetivos	17
3. Procedimentos Experimentais	18
3.1. Condições de cultivo e manipulação de células de <i>Dictyostelium discoideum</i>	18
3.1.1. Manutenção das culturas	18
3.1.2. Transfecção de DNA em <i>Dictyostelium</i> por eletroporação	19
3.1.3. Transfecção de DNA em <i>Dictyostelium</i> pelo método de precipitados de cálcio	20
3.1.4. Minipreparação de DNA genômico de <i>D. discoideum</i>	22
3.1.5. Minipreparação de RNA total de <i>D. discoideum</i>	22
3.1.6. Preparo de extratos celulares de <i>D. discoideum</i> para análise por SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	23

3.1.7. Preparo de células de <i>D. discoideum</i> para análise por microscopia de fluorescência	23
3.2. Procedimentos para manipulação de bactérias	24
3.2.1. Preparo de bactérias competentes para transformação por eletroporação	24
3.2.2. Transformação de bactérias por eletroporação	24
3.3. Procedimentos para manipulação e análise de DNA e RNA	25
3.3.1. Métodos de preparação de plasmídeos	25
3.3.2. Digestão com enzimas de restrição	27
3.3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose	27
3.3.4. Eluição de fragmentos de DNA em papel	28
3.3.5. Varredura da biblioteca de cDNA de <i>D. discoideum</i>	29
3.3.6. Conversão de clones fagomídeos para a forma plasmidial	30
3.3.7. Preparação de sonda radioativa	31
3.3.8. Hibridização de membranas de nylon contendo os fagos adsorvidos	32
3.3.9. Transferência de DNA para membranas de náilon (<i>Southern blot</i>)	32
3.3.10. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído	33
3.3.11. Transferência de RNA para membranas de náilon (<i>Northern blot</i>)	34
3.3.12. Hibridização de DNA e RNA	34

3.3.13. PCR ou RT-PCR	35
3.3.14. Seqüenciamento manual de DNA	37
3.3.15. Seqüenciamento automatizado de DNA	37
3.3.16. Métodos de análise de seqüências de DNA e proteína	38
3.4. Procedimentos para manipulação e análise de proteínas	40
3.4.1. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	40
3.4.2. Transferência eletroforética de proteínas de géis de poliacrilamida para filtros de nitrocelulose (<i>Western blot</i>)	40
3.4.3. Detecção imunológica das proteínas (<i>immunoblot</i>)	40
3.5. Descrição das construções plasmidiais	42
4. Resultados e Discussão	46
4.1. Obtenção, clonagem e seqüenciamento de produtos de PCR correspondentes a uma região de genes para serina/treonina fosfatases de <i>D. discoideum</i>	46
4.2 Clonagem e seqüenciamento do cDNA completo da PP4 de <i>D. discoideum</i>	59
4.3. Estrutura do gene da PP4c de <i>D. discoideum</i>	60
4.4. Análise dos níveis de expressão da PP4c durante o desenvolvimento de <i>D. discoideum</i>	70
4.5. Sondagens do possível papel fisiológico da PP4c em <i>D. discoideum</i>	75

4.6. Estrutura de genes codificadores para serina/treonina fosfatases presentes no cromossomo 2 de <i>D. discoideum</i>	82
4.7. Comparação das serina-treonina fosfatases de <i>D. discoideum</i> e análises filogenéticas preliminares	88
5. Conclusão	91
6. Bibliografia	99

ABREVIATURAS

BSA: albumina de soro bovino
cAMP: 3', 5' monofosfato cíclico de adenosina
cpm: contagem por minuto
dATP: 2' - desoxirribonucleotídeo - 5' - trifosfato de adenosina
dCTP: 2' - desoxirribonucleotídeo - 5' - trifosfato de citidina
DNAse: Desoxirribonuclease I
D.O.: densidade óptica
Da: dalton
DEP: dietilpirocarbonato
DMSO: dimetilsulfóxido
DTT: ditioneitol
dNTP: 5' - trifosfato 2' - desoxirribonucleotídeo
EST: etiquetas de seqüências transcritas
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
GFP: *green fluorescent protein*
I-1: inibidor do tipo 1
I-2: inibidor do tipo 2
kb: quilobases
kDa: quilodalton
KOAc: acetato de Potássio
Mb: megabases
MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico
MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico
nt: nucleotídeos
pb: pares de bases
PBS: solução salina tamponada com fosfato
PEG: polietileno glicol
p.f.u.: unidades formadoras de placas
PK: proteína quinase
PKA: Proteína quinase dependente de cAMP
PP: serina/treonina proteína fosfatase
PP1: PP do tipo 1
PP1c: subunidade catalítica da PP do tipo 1
PP2A: PP do tipo 2A
PP2Ac: subunidade catalítica da PP do tipo 2A
PP2B: PP do tipo 2B
PP2C: PP do tipo 2C
PP4: PP do tipo 4
PP4c: subunidade catalítica da PP do tipo 4
PP5: PP do tipo 5
PP6: PP do tipo 6
PP7: PP do tipo 7
RNAse: ribonuclease A

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TCA: ácido tricloroacético

TE: tris-EDTA

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

As serina/treonina fosfatases (PPs) são enzimas responsáveis pela desfosforilação de resíduos de fosfoserina e/ou fosfotreonina e estão subdivididas em duas famílias gênicas designadas PPP e PPM. A família PPP está dividida em cinco subfamílias, que compreendem as PPs do tipo 1 (PP1), 2A (PP2A), 2B (PP2B), 5 (PP5) e 7 (PP7), de acordo com a similaridade entre as sequências de aminoácidos das subunidades ou domínios destas enzimas. Novas PPs estão sendo descobertas em diferentes organismos e classificadas nestas famílias ou subfamílias com base na análise comparada de suas sequências. Uma delas é a proteína fosfatase do tipo 4 (PP4), descoberta originalmente em coelhos e cujas funções biológicas vêm sendo progressivamente elucidadas.

Neste estudo tivemos como objetivos a identificação e caracterização de uma nova serina/treonina fosfatase de *Dictyostelium discoideum*. Para isto, rastreamos uma biblioteca de cDNA e um cDNA completo que codifica a subunidade catalítica da fosfatase do tipo 4 (PP4c) foi isolado e sequenciado. Verificamos que o gene da PP4c é essencial e está presente em cópia única localizada no cromossomo 2, originando um mRNA expresso ao longo de todo o ciclo de vida de *D. discoideum*. Imunodeteção da PP4c realizada com anticorpo específico indicou que os níveis desta proteína também são constitutivos. Observamos que a superexpressão da PP4c sob o controle de um promotor constitutivo não causa alterações fenotípicas detectáveis. A análise da localização celular da PP4c expressa em células de *D. discoideum* como proteína de fusão com GFP (*Green Fluorescent Protein*) revelou que a enzima está localizada no citossol, contrastando com outros organismos, onde ela se encontra enriquecida no centróssomo.

Por fim, descrevemos neste trabalho, além da organização genômica da PP4, a estrutura dos genes de todas as serina/treonina fosfatases da família PPP encontradas no cromossomo 2 e apresentamos dados das relações entre estas enzimas de *D. discoideum*.

ABSTRACT

The serine/threonine protein phosphatases (PPs) are enzymes responsible for dephosphorylation of phosphoserine and/or phosphothreonine residues and are divided in two gene families designated as PPP and PPM. The PPP family is divided in five subfamilies, which comprise type 1 (PP1), 2A (PP2A), 2B (PP2B), 5 (PP5) and 7 (PP7) phosphatases. This subdivision is based on aminoacid sequence similarity or enzyme domains. Novel PPs have been discovered in different organisms and classified in these families or subfamilies based on comparative sequence analysis. One of these is type 4 protein phosphatase (PP4), originally discovered in rabbit, which functions have been progressively uncovered.

In this study our goal is to identify and characterize a novel serine/threonine phosphatase in *Dictyostelium discoideum*. We first screened a cDNA library and isolated a complete cDNA encoding the catalytic subunit of protein phosphatase 4 (PP4c), confirmed by manual DNA sequencing. The PP4c is an essential, single-copy gene located in chromosome 2, which encodes a mRNA constitutively expressed throughout *D. discoideum* life cycle. Immunodetection of PP4c performed with specific antibodies indicated corresponding protein levels. Overexpression of PP4c under a strong promoter caused no detectable phenotype. Subcellular localization of PP4c expressed as a GFP-fusion protein revealed its cytosolic location, in contrast to other organisms, where it has been reported to be enriched in centrosomes.

We also describe here the genetic organization of PP4c, the genetic structure of all serine/threonine protein phosphatases belonging to the PPP family found in chromosome 2, and a phylogenetic analysis indicating relationships among these enzymes in *D. discoideum* and other selected organisms.

1. Introdução

A fosforilação reversível de proteínas é um importante mecanismo regulador nas vias de transdução de sinal que controlam processos biológicos tão diversos como o metabolismo intermediário e de substâncias de reserva, a dinâmica do citoesqueleto, a quimiotaxia, a diferenciação e o crescimento celular. Variações no estado de fosforilação de uma proteína são resultado do balanço das atividades das proteína quinases e das proteína fosfatases, responsáveis pela sua fosforilação e desfosforilação, respectivamente. A fosforilação de proteínas eucarióticas ocorre predominantemente em resíduos de serina, treonina e tirosina. Além disso, a fosforilação também ocorre em resíduos de histidina, aspartato, lisina e arginina (Cohen, 1992; Shenolikar, 1994; Swanson et al., 1994; Hunter, 1995; Denu et al., 1996; Saito & Wurgler-Murphy, 1997; Ramponi & Stefani, 1997).

As proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de resíduos de serina/treonina e tirosina apresentam uma grande diversidade, tanto em relação aos sinais aos quais respondem, como em relação à especificidade de seus substratos. Contudo, em sua maioria elas possuem um domínio catalítico extremamente conservado, ao qual somam-se segmentos que lhe conferem especificidade (Hanks et al., 1988; Hunter & Hanks, 1995; Hunter, 1995). Por outro lado, os dois grupos de fosfatases que contrapõem a ação destes dois grupos de quinases, não apresentam similaridade entre suas seqüências de aminoácidos. Assim, as proteínas fosfatases que desfosforilam fosfoserina/fosfotreonina, chamadas serina/treonina fosfatases (PPs), e as que desfosforilam resíduos de fosfotirosina, chamadas tirosina fosfatases (PTPs), exibem mecanismos catalíticos completamente distintos (Shenolikar, 1994; Barton et al., 1994; Barford, 1996).

1.1. Serina/treonina fosfatases (PPs)

Até poucos anos atrás as PPs eram classificadas com base apenas em critérios bioquímicos propostos por Philip Cohen (Cohen, 1989). Deste modo, as PPs foram divididas em serina/treonina fosfatases do tipo 1 e do tipo 2. Como será detalhado adiante, algumas das PPs são holoenzimas constituídas de subunidades catalíticas e regulatórias, sendo que as subunidades catalíticas freqüentemente recebem o mesmo nome da holoenzima correspondente.

As PPs do tipo 1 (PP1) são inibidas por concentrações nanomolares de duas proteínas termoestáveis, o inibidor do tipo-1 e o inibidor do tipo-2 e desfosforilam *in vitro* preferencialmente a subunidade β da fosforilase quinase. As PPs do tipo 2 (PP2) são refratárias aos efeitos dos inibidores do tipo-1 e do tipo-2, e desfosforilam preferencialmente a subunidade α da fosforilase quinase. As PPs do tipo 2 são subdivididas em três grupos principais: PP2A, ativa na ausência de cátions divalentes; PP2B, dependente de Ca^{2+} /calmodulina; e PP2C, dependente de Mg^{2+} . Além disso, a sensibilidade a toxinas de ocorrência natural, como ácido ocadáico, caliculina, tautomicina e microcistina, permite distinguir entre as diferentes classes destas PPs em extratos celulares ou mesmo *in vivo*. Assim, o ácido ocadáico, uma toxina produzida por dinoflagelados marinhos, inibe especificamente PP1 e PP2A, mas não PP2B e PP2C; entretanto esta substância é 100 vezes mais potente como inibidor da PP2A do que da PP1 (Cohen, 1989; Shenolikar, 1994; Sheppeck et al., 1997).

A classificação proposta por Philip Cohen está sendo gradativamente substituída pelo agrupamento das fosfatases do tipo 1, 2A e 2B numa família gênica denominada PPP e das fosfatases do tipo 2C em outra, denominada PPM. A família PPP pode ser dividida em cinco subfamílias, que compreendem as PPs do tipo 1, 2A, 2B, 5 e 7. Esta nova classificação é baseada na similaridade entre as seqüências de aminoácidos das subunidades ou domínios catalíticos destas enzimas, refletindo melhor suas relações filogenéticas (Barton et al., 1994; Barford, 1996; Cohen, 1997; Kerk et al., 2002). As novas PPs que têm sido descritas em uma variedade de organismos estão sendo, sempre que possível,

incluídas em uma destas cinco subfamílias. Contudo, algumas apresentam maiores divergências, não se agrupando nestas subfamílias. A figura 1 esquematiza a classificação das PPs e resume algumas das características bioquímicas que as distinguem.

A clonagem e o seqüenciamento dos genes ou cDNA's dos diferentes tipos de subunidades catalíticas de proteínas fosfatases de diversos organismos revelou que estas enzimas estão entre as proteínas mais conservadas evolutivamente. A análise e a comparação das seqüências de aminoácidos deduzidas indicaram que PP1, PP2A e PP2B possuem um domínio catalítico conservado de aproximadamente 280 resíduos que não possui nenhuma relação com a PP2C e com as tirosina fosfatases. As subunidades catalíticas da PP1 e da PP2A apresentam aproximadamente 50% de identidade entre si, enquanto que a PP2B tem um domínio catalítico que é 40% idêntico ao das PP1 e PP2A. As enzimas da subfamília PP5 combinam na mesma molécula o domínio catalítico conservado e um domínio regulatório. Este último corresponde a uma extensão amino-terminal que contém três ou quatro repetições de um motivo tetratricopeptídeo, que provavelmente media a interação da PP5 com outras proteínas. Por outro lado, a PP2C apresenta uma estrutura primária não similar às PP1, PP2A e PP2B. Assim, apesar da ausência de similaridade entre suas seqüências de aminoácidos, os membros da família PPP e PPM compartilham estrutura tridimensional similar, e provavelmente o mesmo mecanismo catalítico (Das et al., 1996; Barton et al., 1994; Shenolikar, 1994; Villafranca et al., 1996; Cohen, 1997; Chinkers, 2001).

Como já mencionado, algumas das serina/treonina fosfatases referidas nos parágrafos anteriores são holoenzimas constituídas de uma subunidade catalítica e de uma ou duas subunidades regulatórias variáveis. A subunidade catalítica interage com estas subunidades variáveis de um modo mutuamente exclusivo, gerando holoenzimas com diferentes especificidades em relação aos seus substratos e localizações subcelulares distintas (Hubbard & Cohen, 1993; Faux & Scott, 1996). Além disso, as subunidades regulatórias podem modular diretamente

Classificação das Serina/Treonina Fosfatases (PPs)

Família ¹	Subfamília ¹	Membros	Características Bioquímicas	
			Dependência de cátions ²	Sensibilidade ao ácido ocadáico ³
PPM	PP2C	PP2C Piruvato desidrogenase fosfatase	Mg ²⁺	Não é inibida
PPP	PP1	PP1 PPz1 PPY	Fe ⁺³ /Zn ⁺² no sítio catalítico	IC ₅₀ = 3-10 nM
	PP2A	PP2A PP4 (PPX) PP6 (PPV)	Não apresenta	IC ₅₀ = 0,2-1 nM
	PP2B	PP2B (calcineurina)	Ca ²⁺	>10 mM
	PP5	PP5	não investigado	IC ₅₀ < 3 nM
	PP7	Rgdc PPEF1 e 2	não investigado	não investigado

Figura 1. Representação esquemática das famílias e subfamílias das serina/treonina fosfatases. Os principais membros que compõem as distintas subfamílias estão listados. A dependência por cátions e a sensibilidade frente ao ácido ocadáico também está indicada. PPEF: EF-hand containing protein phosphatase; Rgdc: Retinal Degeneration C Protein Phosphatase; IC₅₀: Concentração inibitória de 50% da atividade. ¹Cohen, 1997; Kerk et al., 2002; ²Shenolikar, 1994; ³Sheppeck et al., 1997.

a atividade das PPs e ampliar a sua regulação por meio de modificações pós-traducionais em suas próprias moléculas, desencadeadas por sinais extracelulares. (Hubbard & Cohen, 1993; Faux & Scott, 1996; Aggen, et al., 2000; Bollen, 2001; Cohen, 2002; Janssens & Goris, 2001).

Este modo de regulação da atividade catalítica foi bastante estudado nas fosfatases do tipo 2A (Zolnierowicz, 2000; Sontag, 2001). Estas enzimas representam uma família de holoenzimas heterotriméricas, constituídas de uma subunidade catalítica, uma estrutural e uma regulatória denominadas C, A e B, respectivamente. A subunidade catalítica C possui massa molecular de cerca de 36 kDa, enquanto que a subunidade A possui 65 kDa. Esta última é também muito conservada evolutivamente e apresenta uma estrutura com 15 repetições imperfeitas de 38 a 40 aminoácidos, ricas em leucina, denominadas HEAT (Huntingtin-Elongation A subunit-TOR). A estrutura tridimensional desta subunidade já foi elucidada (Groves et al., 1999). Os resultados sugerem que sua função seja eminentemente estrutural, aproximando as subunidades B e C. A subunidade C interage estavelmente com a porção C-terminal da subunidade A para formar o dímero AC. Este dímero associa-se, através da região amino-terminal da subunidade A, a uma das diferentes subunidades regulatórias B, que possuem massa molecular variada (Mayer-Jaekel & Hemmings, 1994). Em mamíferos existem duas isoformas da subunidade catalítica C da PP2A, denominadas α e β , codificadas por dois genes 97% idênticos entre si. Existem também duas isoformas da subunidade A, também denominadas α e β , que são produtos de genes distintos e altamente similares (Stone et al., 1987; Hemmings et al., 1990).

Em relação às subunidades regulatórias da PP2A mencionadas acima, pelo menos quatro famílias diferentes já foram descritas, sendo que suas massas moleculares variam de 55 a 130 kDa. É notável a divergência na seqüência entre estas famílias gênicas, apesar de seus produtos proteicos reconhecerem segmentos similares da subunidade estrutural A (Mayer-Jaekel & Hemmings, 1994; Janssens & Goris, 2001). Esta variação das subunidades B é a principal responsável pela diversidade funcional das PP2As. Dados da literatura sugerem

que esta subunidade regula diretamente a especificidade ao substrato, a localização subcelular e a função da PP2A *in vivo*. Por exemplo, o sinal que dirige a PP2A para o núcleo é parte da seqüência primária de uma subunidade B de 72 kDa (PR72). Foi demonstrado que a desfosforilação da fosfohistona H1, catalisada pela PP2A, ocorre com eficiência quando o heterotrímero contém a subunidade B de 55 kDa (PR55) ou a PR72, mas não com o dímero AC ou com C livre. Além disso, uma PP2A que contenha a PR72 desfosforila preferencialmente os resíduos Ser-120 e Ser-123 no antígeno *large T* do vírus SV40, ativando a replicação do DNA viral. Por outro lado, uma PP2A que contenha a PR55 desfosforila o resíduo Thr-124, inativando a propriedade do antígeno *large T* iniciar a replicação do vírus SV40 (Hendrix et al., 1993; Cegielska et al., 1994. Kamibayashi et al., 1994; Turowski et al., 1995).

Outro exemplo muito ilustrativo do modo de regulação de algumas subfamílias de serina/treonina fosfatases está nas holoenzimas da família PP1. Hoje, já são mais de 30 as subunidades regulatórias descritas em mamíferos e em leveduras que se associam à subunidade catalítica da PP1 (PP1c) (Egloff et al., 1997; Aggen et al., 2000; Bollen, 2001). Entre estas proteínas que se associam à PP1c, muitas têm função inibitória, como os já mencionados inibidores citoplasmáticos termoestáveis I-1 e I-2, o citoplasmático DARP-32 (*dopamine and cAMP-regulated 32kDa phosphoprotein*), o inibidor nuclear NIPP-1 (*nuclear inhibitor of PP1*), a proteína associada a ribossomos RIPP-1 (*ribosomal inhibitor of PP1*), entre outras proteínas com atividade inibitória (Nimmo & Cohen, 1978; Park et al., 1994; Van Eynde et al., 1995; Beullens et al., 1996; Tamrakar & Ludlow 2000; Yamawaki et al., 2001). No caso de I-2, foi verificado que ele tem a capacidade de alterar a conformação da PP1c, atuando como uma chaperonina, sugerindo que as interações entre subunidades catalíticas e regulatórias podem ter um espectro regulador mais amplo (Alessi et al., 1993; Connor et al., 2000).

Outras subunidades regulatórias agem, *in vivo*, como subunidades localizadoras (*targeting subunits*) que dirigem a PP1c para compartimentos celulares específicos onde se localizam seus substratos fisiológicos, reduzindo assim a sua atividade contra outros potenciais substratos dispersos na célula.

Entre as subunidades localizadoras melhor caracterizadas estão as subunidades G que dirigem a PP1c para partículas de glicogênio; PNUTS (*Phosphatase 1 nuclear targeting subunit*), uma proteína que dirige a PP1c para o núcleo; várias AKAPs (*A-kinase-anchoring proteins*) que coordenam a localização da PKA e da PP1c a membranas de diferentes compartimentos celulares e as subunidades M (MYPT) que dirigem a PP1c para miosina (Hubbard & Cohen, 1989; Hubbard & Cohen, 1993; Allen et al., 1998; Schillace & Scott, 1999; Aggen et al., 2000; Bollen, 2001; Skinner & Saltiel, 2001).

1.2 Serina/treonina proteína fosfatase 4 (PP4)

A PP4 foi originalmente identificada por clonagem molecular de um cDNA parcial de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (da Cruz e Silva et al., 1988) e denominada PPX. Logo após o cDNA humano correspondente foi isolado de uma biblioteca de teratocarcinoma e o alinhamento destas seqüências mostrou grande conservação evolutiva em mamíferos (Brewis & Cohen, 1992.).

Em um estudo mais aprofundado foi isolado o cDNA completo da subunidade catalítica da PP4 de coelhos, sendo que ele codifica uma proteína de 307 aminoácidos com massa molecular deduzida de 35 kDa, que apresenta 65% de identidade com a isoforma α da subunidade catalítica da PP2A. Além disso, observou-se em coelhos a presença do transcrito em todos os tecidos estudados, com níveis pouco aumentados no fígado e testículo. A PP4 de coelhos expressa em baculovírus mostrou-se três e quatro vezes menos sensível aos inibidores ácido ocadáico e microcistina, respectivamente, quando comparada à PP2A da mesma espécie. Entretanto, a atividade de fosforilase fosfatase da PP4 e da PP2Ac foram similares, enquanto que a PP4 mostrou atividade 13 vezes menor frente à proteína HGM-1 fosforilada por cdc2 quinase. Neste mesmo estudo foi investigada a localização subcelular da PP4 em células pulmonares fetais humanas e em células de carcinoma epidérmico. Anticorpos policlonais fluorescentes específicos para a PP4 incubados com estas células revelaram fluorescência fraca e difusa no citosol, moderada e difusa em núcleos de células

interfásicas e muito intensa nos centrosomos de células mitóticas (Brewis et al., 1993).

Outro estudo investigou a sensibilidade da PP4 purificada de testículo de porco a diversos inibidores de serina/treonina fosfatases, tais como ácido ocadáico, microcistina, caliculina A, tautomicina e cantaridina, além do agente antitumoral fostriecina. Todos os valores de IC₅₀ encontrados foram similares aos observados para PP2A, indicando que a maior similaridade de sequência da PP4 em relação à PP2A do que em relação a outras fosfatases também se reflete nas suas propriedades bioquímicas (Hastie et al., 1998).

A localização subcelular da PP4 em centrosomos também foi verificada em *Drosophila melanogaster*. Demonstrou-se que em organismos nos quais a expressão da PP4 foi diminuída até 25% dos níveis normais exibem significativa redução da viabilidade. As células estudadas apresentam divisões celulares assíncronas e surgem centrosomos livres aleatoriamente, em torno dos quais a nucleação de microtúbulos é mal definida ou mesmo ausente, ou ainda com microtúbulos não conectados ao centrosomo. Nestes mutantes também é reduzida a fluorescência de γ -tubulina, que é essencial ao início do crescimento dos microtúbulos, sugerindo que esta última está alterada conformacionalmente ou (re) localizada em outras regiões celulares. Estes dados fornecem fortes evidências da participação da PP4 na nucleação, crescimento e/ou estabilização de microtúbulos (Helps et al., 1998).

A PP4 de coelho é carboximetilada, à semelhança da PP2A. Apesar do significado biológico desta modificação não estar elucidado, estudos realizados *in vitro* indicam uma considerável diminuição na atividade enzimática da PP4 quando carboximetilada em relação à enzima não-modificada (Kloeker et al., 1997; Favre et al., 1994.).

A interação da PP4 com as proteínas humanas c-Rel e NF- κ Bp50 foi observada em ensaios do sistema de duplo híbrido. Estes dois fatores de transcrição foram utilizados como iscas na varredura de uma biblioteca de cDNA de linfócitos B humanos, sendo que a interação foi confirmada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Neste estudo, foram realizadas mutações sítio-dirigidas com o objetivo de

abolir a atividade catalítica da PP4 para verificar se esta enzima é capaz de alterar de alguma forma propriedades de c-Rel. Os resultados indicaram que a PP4 aumenta quatro vezes a afinidade de c-Rel por seqüências específicas de DNA e provoca um aumento de cerca de 5 a 6 vezes na atividade do gene *reporter* sob controle de um promotor responsivo a NF- κ B. Em contraste, nenhuma mudança nestes parâmetros foi observada com a utilização de mutantes sem atividade catalítica (Hu et al., 1998).

A descrição de uma provável subunidade regulatória da PP4, à semelhança das descritas para PP2A e PP1, só foi apresentada recentemente, com a purificação da PPX de extratos solúveis de testículo bovino. Após várias etapas de cromatografia foram detectadas 2 frações, correspondendo à subunidade catalítica da PP4 e a uma proteína não identificada que migra como uma banda dupla de 120-125 kDa em SDS-PAGE, e que apresentou 105 kDa em espectrometria de massa. Sua seqüência parcial de aminoácidos foi utilizada no isolamento do cDNA humano, cuja seqüência deduzida de aminoácidos possui 13 repetições não-identicas, de alta similaridade com o mesmo motivo encontrado na subunidade do tipo A da PP2A (Kloeker & Wadzinski, 1999).

Uma provável subunidade regulatória (equivalente à subunidade do tipo B da PP2A) da PP4 foi também identificada em ratos. Esta subunidade exibe massa molecular aparente entre 53 e 67 kDa em SDS-PAGE, localizada nos centrosomos por imunofluorescência. A caracterização bioquímica posterior demonstrou uma estreita associação da proteína purificada com a PP4_C (subunidade catalítica da PP4) e a presença de complexos holoenzimáticos de 600 e 450 kDa em diferentes tecidos. Nestes complexos foram encontradas as subunidades regulatória e catalítica, porém a subunidade do tipo A, descrita acima, não foi detectada. Os autores sugerem que esta nova subunidade associa-se com a PP4_C na forma de dímeros/multímeros B₂C₂ ou B_nC_n, explicando assim a alta massa molecular da holoenzima quando detectada por filtração em gel. Este modelo proposto contrasta com a clássica organização das fosfatases da família PPP em dímeros BC ou trímeros ABC (Hastie et al., 2000).

1.3. *Dictyostelium discoideum* como modelo para o estudo da fosforilação reversível de proteínas

Dictyostelium discoideum é um microorganismo eucariótico que apresenta muitas vantagens experimentais similares às das leveduras, mas, ao contrário das mesmas, é um protozoário e não um fungo (Baldauf & Doolittle, 1997). O seu ciclo de vida curto, a facilidade para seu cultivo e as amplas possibilidades para sua manipulação genética fazem deste microorganismo um modelo experimental favorável para o estudo de vários fenômenos biológicos como: adesão celular, motilidade celular, dinâmica do citoesqueleto, quimiotaxia e mecanismos de transdução de sinal (Mutzel, 1995; Maeda et al., 1997; Kay & Williams, 1999).

A classificação taxonômica de *D. discoideum* tem sido controversa, e dependendo do aspecto biológico avaliado este organismo parece estar mais próximo dos fungos, dos protozoários ou até mesmo das plantas (Bonner, 1967; Loomis & Smith, 1995; Baldauf & Doolittle, 1997). Atualmente, a classificação mais aceita está baseada no resultado da comparação de seqüências do fator de alongamento EF-1a de diversos membros do grupo dos *Mycetozoa*, posicionando *D. discoideum* em um ramo que divergiu imediatamente antes da separação do ramo dos fungos e metazoários, porém após o ramo que divergiu para plantas. Estes dados são consistentes com as características bioquímicas exibidas por *D. discoideum* e com análises filogenéticas mais recentes de seqüências de proteínas conservadas codificadas em seu genoma (Loomis & Smith, 1995; Baldauf et al., 1996; Baldauf & Doolittle, 1997; Baldauf et al., 2000; Glöckner et al., 2002).

O microorganismo *D. discoideum* habita lugares úmidos na superfície do solo. No seu ciclo de vida, o crescimento e o desenvolvimento se apresentam em fases distintas. Durante a fase de crescimento vegetativo, as amebas de *Dictyostelium discoideum* são células não especializadas, haplóides que atingem alta densidade celular (10^7 células/mL) cultivadas em suspensão de bactérias ou em meio axênico, com tempos de duplicação variando entre 3 e 8 horas, dependendo das condições de cultivo e da linhagem. As células se dividem por

fissão binária e durante o crescimento são quimiotaticamente sensíveis ao ácido fólico. Como esquematizado na figura 2, durante o desenvolvimento, que é disparado pela ausência de nutrientes, as células se agregam e se diferenciam em pelo menos dois tipos distintos: cerca de 70 - 80% das células formam esporos, que estão contidos em uma cápsula sustentada através de um talo de celulose formado pelas demais células (vacuolizadas), em uma estrutura denominada corpo de frutificação (Loomis, 1982; Devreotes, 1989; Kessin & Campagne, 1992; Gross, 1994; Mutzel, 1995; Baldauf et al., 1997; Maeda, 1997; Loomis & Kuspa, 1997; Loomis & Söderborn, 1998; Kay & Williams, 1999).

O sinal para a agregação é iniciado por algumas células da população que liberam no meio quantidades nanomolares de cAMP, que é a molécula responsável pela quimiotaxia durante o início do desenvolvimento de *D. discoideum*. O cAMP liberado no meio se liga a receptores específicos presentes na superfície das células, que se associam a proteínas G heterotriméricas e dessa forma provocam respostas coordenadas nas células sensibilizadas: deslocamento em direção às células que iniciaram a secreção de cAMP, produção, síntese e liberação de cAMP na forma de pulsos, atraindo por sua vez outras células mais afastadas. Na migração, as células se tornam adesivas e se encadeiam, formando correntes que se reúnem até constituir um organismo contendo cerca de 10^5 células. Em seguida, o agregado assume então a forma de um monte (agregado compacto, *tight mound*), e as células do cume desta estrutura passam a exibir um padrão de expressão gênica distinto das demais células. As células do cume (aproximadamente 25% do organismo) correspondem às células pré-talo, que se diferenciam posteriormente em células do talo. A maior parte das células restantes corresponde às células pré-esporo, que posteriormente se diferenciarão em esporos. O cume do agregado compacto coordena a distribuição correta das células e as mudanças morfogenéticas que ocorrem no organismo multicelular (Loomis & Söderborn, 1998; Aubry & Firtel, 1999).

No estágio seguinte do desenvolvimento, o organismo multicelular assume forma mais alongada, e então duas alternativas se apresentam: a culminação ou, em determinadas condições, o estabelecimento de uma forma intermediária

denominada pseudoplasmodio (*slug*). O pseudoplasmodio pode se deslocar contra ou a favor 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 (figura 2). Nesse momento inicia-se a culminação, que envolve um processo de alongamento das células pré-talo por vacuolização e deposição de celulose na sua superfície externa, formando o talo. No decorrer desse processo, a massa de células pré-esporo progressivamente ascende em direção à extremidade do talo e origina um capsídeo globular terminal contendo esporos no seu interior. Os esporos são liberados no meio e após a germinação reiniciam um novo ciclo assexuado. (Loomis, 1982; Devreotes, 1989; Kessin & Campagne, 1992; Gross, 1994; Mutzel, 1995; Baldauf et al., 1997; Maeda, 1997; Loomis & Kuspa, 1997; Loomis & Söderborn, 1998; Kay & Williams, 1999).

Após a formação do agregado, as vias de sinalização ativadas pelos pulsos de cAMP sofrem um processo de adaptação e/ou desligamento em resposta ao aumento nos níveis extracelulares de cAMP no interior do agregado. Paralelamente, a transcrição de um conjunto de genes é ativada neste estágio pós-agregação. Entre estes genes está o que codifica o fator de transcrição GBF (*G-box-binding factor*), que desempenha um papel essencial na regulação da expressão gênica pós-agregação e na diferenciação celular que se segue. Simultaneamente à ativação de GBF, ocorre a fosforilação em resíduos de tirosina e ativação da proteína STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), que atua como regulador da distribuição espacial das células no organismo multicelular e da diferenciação das células do talo. Durante o desenvolvimento multicelular, após a fase de agregação, o cAMP atua em conjunto com outro morfógeno, denominado DIF-1 (*Differentiation-inducing factor-1*), na regulação da diferenciação celular. A diferenciação terminal em células do talo e esporos para formação do corpo de frutificação maduro requer ainda uma reorganização das distintas populações celulares no pseudoplasmodio (*slug*). Esta etapa final do

Figura 2. Ciclo de vida de *Dictyostelium discoideum*. Adaptado de Darnell et al., 1990. O tempo de desenvolvimento, induzido após a carência nutricional, está indicado em horas. O inserto mostra a migração de células que ocorre após a culminação. Os nomes dos tipos celulares principais estão indicados.

desenvolvimento envolve sinalização mediada por histidina quinases, típicas do sistema de dois componentes, e é disparada pela proteína quinase dependente de cAMP (PKA). Além disso, peptídeos (SDF1 e SDF2, *spore differentiation factor*) secretados por células pré-talo controlam a maturação dos esporos (Loomis & Söderborn, 1998; Kay et al., 1999; Aubry & Firtel, 1999).

A informação genética para o crescimento e desenvolvimento de *D. discoideum* está contida em 6 cromossomos lineares com 4 a 7 Mb, perfazendo o total de aproximadamente 34 Mb com um alto conteúdo de bases AT (73-77%). *Dictyostelium* contém também múltiplas cópias de elementos extracromossomais nucleares com 90 Kb cada, que codificam genes de RNA ribossômico, e possui também aproximadamente 200 cópias de um genoma mitocondrial com 55,5 Kb (Firtel & Bonner, 1972; Kuspa & Loomis, 1996; Loomis & Kuspa, 1997; Kay & Williams, 1999).

Dados recentes obtidos a partir da análise da seqüência completa do cromossomo 2 de *D. discoideum* indicam que o seu genoma apresenta uma alta densidade gênica, com regiões codificadoras enriquecidas em bases CG. Essa densidade de genes - aproximadamente um gene a cada 2,6 Kb - é ligeiramente menor que a verificada para *Saccharomyces cerevisiae* (1 gene/2 Kb) e é similar à de *Schizosaccharomyces pombe* (1 gene/2,5 Kb). Introns são relativamente raros e possuem tamanho médio de 100 pb. Em contraste, as regiões promotoras identificadas no cromossomo 2 possuem entre 1 e 2 Kb, e, assim como os introns, possuem conteúdo de bases AT freqüentemente superior a 90%. O número de genes atualmente estimado para o genoma de *Dictyostelium* está em torno de 11000 (Goffeau et al., 1996; Wood et al., 2002; Glöckner et al., 2002).

Assim como nos demais organismos, em *D. discoideum* a rede regulatória que coordena as diversas funções celulares tem a participação preponderante da fosforilação reversível de proteínas. Além disso, os aparatos de transdução de sinal se mostram marcadamente conservados, principalmente em relação aos vertebrados, consolidando este organismo como um modelo ideal para se estudar os mecanismos das vias de sinalização integradas para controlar a morfogênese e a regulação gênica. Os estudos realizados em *D. discoideum* para identificação e

análise funcional dos componentes desta rede regulatória tais como proteínas G, receptores acoplados a proteínas G, fatores de transcrição, MAP quinases (MAPK), PKA, Glicogênio sintase quinase (GSK3) e outras moléculas sinalizadoras comuns a outras células eucarióticas tem gerado conhecimentos originais que podem ser aplicados e/ou comparados a outros organismos, principalmente os metazoários (Van Haastert & Devreotes, 1993; Firtel, 1995; Harwood et al., 1995; Chen et al., 1996; Kay, 1997; Loomis, 1998; Plyte et al., 1999; Weeks, 2000; Taminato et al., 2002).

Os mecanismos de fosforilação reversível já identificados em *D. discoideum* incluem tanto a fosforilação em resíduos de serina/treonina como em tirosina, além do sistema de dois componentes que envolve a fosforilação de resíduos de histidina e aspartato. Diversas proteínas quinases e fosfatases envolvidas nestes processos foram caracterizadas em maior ou menor detalhe e, algumas destas enzimas foram diretamente implicadas no controle do crescimento e/ou desenvolvimento como no caso da PKA, das MAP quinases e da GSK3, mencionadas acima.

É interessante também ressaltar que a fosforilação em resíduos de tirosina ocorre em proteínas de *D. discoideum*, assim como em animais multicelulares, contrastando com a ausência deste mecanismo em leveduras e plantas (Darnell, 1997; Kay, 1997; McCarty & Chory, 2000; Souza et al., 2001). Em *D. discoideum*, a fosforilação em tirosina é regulada por pelo menos oito tirosina quinases e três tirosina fosfatases, sendo que as primeiras são distintas das tirosina quinases de mamíferos (Tan & Spudich, 1990; Howard et al., 1992, 1994; Ramalingam et al., 1993; Adler et al., 1996; Gamper et al., 1996; Nuckolls et al., 1996; Kim et al., 1999; Early et al., 2001). Além disso, *Dictyostelium*, como os metazoários, utiliza fatores de transcrição da família STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) no controle do desenvolvimento multicelular e da diferenciação de tipos celulares específicos (Kawata et al., 1997; Darnell, 1997; Weeks, 2000; Fukuzawa et al., 2001). Os STATs são ativados pela fosforilação de um resíduo de tirosina conservado, em resposta a associação de ligantes a receptores da superfície celular (Ihle, 1996).

Apesar dos diversos estudos já realizados sobre os mecanismos e o papel da fosforilação reversível no desenvolvimento e no crescimento de *D. discoideum*, alguns dos quais aqui exemplificados, muito pouco se conhece sobre as serina/treonina proteínas fosfatases deste microorganismo.

Os primeiros estudos realizados relatam a caracterização bioquímica preliminar e purificação parcial dessas fosfatases a partir de extratos celulares (van Driel et al., 1985; Ferris & Rutherford, 1986; Kuczmarski & Pagone, 1986; Pamula & Wheldrake, 1988). Estes estudos, devido às diversas metodologias empregadas, não permitiram uma comparação das PPs de *D. discoideum* entre si e com as de outros organismos. Contudo, empregando-se a metodologia usada para caracterizar as PPs de tecidos animais (Cohen et al., 1989a), vegetais (MacKintosh & Cohen, 1989) e de eucariotos unicelulares (Cohen et al. 1989b), foi demonstrado que *Dictyostelium* possui fosfatases do tipo 2A e 2C, com propriedades muito semelhantes às encontradas na maioria das células estudadas até o presente, tais como sensibilidade ao inibidor ácido ocadáico, preferência por diferentes substratos e dependência de íons divalentes (Simon et al., 1992).

A subunidade catalítica da PP2A de *D. discoideum* foi purificada e suas propriedades bioquímicas são muito similares às descritas para PP2Ac de outros organismos (Barroso, 1996), e uma holoenzima da PP2A parece ser a principal responsável pela desfosforilação da cadeia pesada da miosina (Murphy & Egelhoff, 1999; Murphy et al., 1999). Dammann et al. (1996) isolaram o cDNA para PP2Bc de *D. discoideum* a partir de uma varredura funcional de uma biblioteca de cDNA utilizando-se calmodulina radioativa. Esse cDNA foi expresso e a proteína recombinante foi utilizada para gerar anticorpos que reconheceram um polipeptídeo de 80kDa presente em extratos celulares de *Dictyostelium*. Posteriormente, esta enzima foi implicada na diferenciação celular durante o desenvolvimento (Horn & Gross, 1996), embora a superexpressão induzida em *Dictyostelium* não resulte em alterações fenotípicas perceptíveis (Hellstern et al., 1997).

O gene da PP2C foi posteriormente clonado e o seu seqüenciamento revelou que ele codifica uma proteína composta por um domínio catalítico (PP2C) e um domínio similar a subunidade α da proteína G ligante de GTP, com provável

papel regulatório (Aubry & Firtel, 1998). Os autores verificaram ainda que esta enzima é essencial para o desenvolvimento logo após a agregação das células de *D. discoideum*.

Por outro lado, dados da literatura sugeriam que extratos de células de *Dictyostelium* não exibiam uma atividade típica de PP1 (Simon et al., 1992). Entretanto, foi isolado um cDNA completo (DdPP1c) cuja sequência deduzida de aminoácidos possui ~80% de similaridade com as PP1c de outros organismos e que codifica para uma enzima com características bioquímicas semelhantes a PP1 descritas em outros organismos. Este cDNA tem origem a partir de um gene essencial em cópia única, que expressa uma proteína ao longo de todo o ciclo de vida desse organismo (Andrioli, 1999; da Silva et al., 1999; Andrioli et al., 2003).

2. Objetivos

Neste trabalho tivemos como objetivos a identificação e caracterização de uma nova serina/treonina fosfatase de *Dictyostelium discoideum*. Para isto, rastreamos uma biblioteca de cDNA com o intuito de isolar o cDNA completo que codifica a subunidade catalítica da fosfatase do tipo 4 (PP4c). O cDNA isolado foi seqüenciado e a sequência de aminoácidos deduzida foi comparada com a de outras enzimas da mesma família, com o intuito de estabelecermos suas relações filogenéticas. Tivemos também como objetivo avaliar a expressão da PP4c ao longo do ciclo de vida de *D. discoideum* e também sua localização subcelular, na tentativa de investigar sua provável função neste microorganismo. Por fim, elucidamos parcialmente a estrutura do gene da PP4c.

3. Procedimentos Experimentais

3.1. Condições de cultivo e manipulação de células de *Dictyostelium discoideum*

Em nossos experimentos utilizamos as linhagens axênicas *D. discoideum* denominadas AX4 e AX2, gentilmente cedidas pelo Dr. William F. Loomis (University of California, San Diego), além de linhagens obtidas neste trabalho.

3.1.1. Manutenção das culturas

Estoques das linhagens axênicas de *Dictyostelium discoideum* foram cultivados em placas de meio SM [peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,1% (p/v), MgSO₄ 0,1% (p/v), dextrose 0,2% (p/v), agar 2% (p/v), KH₂PO₄ 20 mM, pH 6,8] como descrito por Sussman (1987). Para iniciar uma cultura, 0,2 mL de uma suspensão de bactérias *Klebsiella aerogenes* dissolvidas em SM líquido (sem agar) foram misturados com uma pequena porção de corpos de frutificação maduros de *Dictyostelium*. Os corpos de frutificação de *Dictyostelium* foram espalhados com a alça de vidro. As placas foram mantidas a 22°C até a formação de novos corpos de frutificação e guardadas a 4°C por 15 dias, quando um novo estoque era feito.

Estoques de células também foram mantidos a -80°C. Para tal, o sedimento de 5x10⁷ células em crescimento foi ressuspenso em 2 mL de uma solução contendo HL-5 [proteose peptona nº2 1% (p/v), glicose 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), KH₂PO₄ 20 mM, pH 6,8] 90% (v/v) e DMSO 10% (v/v) e em seguida congelado em gelo seco e imediatamente armazenado a -80°C.

Para iniciar uma cultura a partir de células congeladas, células de *Dictyostelium* foram descongeladas na presença de 500 µL de uma suspensão de bactérias *K. aerogenes*. 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.

As células plaqueadas dessa forma foram monitoradas quanto ao início do período de desenvolvimento. Nesta ocasião, foram transferidas para um frasco contendo meio de cultura HL-5 sob agitação de 200 rpm a 22°C. Essas culturas foram mantidas com uma densidade celular entre 2 e 6×10^6 células/mL (crescimento exponencial).

Para obtenção de células em diferentes fases de desenvolvimento, células provenientes de culturas em meio axênico HL-5 foram submetidas a carência nutricional sobre filtros de nitrocelulose Millipore® de cor preta na porosidade de 0.45 μ m e com 47 mm de diâmetro, como descrito por Sussman (1987). Estes filtros foram fervidos em água destilada por 10 minutos, por três vezes, e colocados sobre pré-filtros (Schleicher & Schuel® nº 8 - 47 mm) embebidos em tampão Sorensen (KH_2PO_4 20 mM, pH 6,4). Alíquotas contendo 10^8 células suspensas em 1,0 mL de tampão Sorensen foram espalhadas uniformemente sobre os filtros e incubadas em câmara úmida a 22°C. Nestas condições, obtínhamos o desenvolvimento sincrônico e completo, até a formação do corpo de frutificação maduro, após período médio de 24 horas, a 22°C. Os estágios de desenvolvimento foram monitorados por observação na lupa e células de diversas fases do ciclo de vida foram ressuspensas em 1,0 mL de tampão Sorensen e imediatamente processadas de acordo com o experimento planejado.

3.1.2. Transfecção de DNA em *Dictyostelium* por eletroporação

Para obtenção de mutantes de *D. discoideum* que tivessem o gene da PP4c inativado, utilizamos a técnica de substituição do gene por recombinação homóloga (Egelhoff et al., 1991). Neste método, o gene ou cDNA de interesse é previamente modificado pela inserção de um cassete contendo o gene de resistência ao antibiótico blasticidina e utilizado na transfecção das células. Os clones transfectantes resistentes ao antibiótico são analisados para verificação da eventual ocorrência de recombinação homóloga e inativação do gene (Sutoh, 1993). Para detalhes desta construção plasmidial (pBS_DdPP4c-KO) ver item 3.5.

10^7 células da linhagem AX4 em fase de crescimento exponencial mantidas previamente por 15 minutos no gelo foram concentradas por centrifugação e ressuspensas em 1 mL de tampão de eletroporação (NaH_2PO_4 10 mM, pH 6,1 e sucrose 1,5 mM). 800 μL desta suspensão foram transferidos para uma cubeta gelada (gene pulser™ cuvette 0,4 cm, BIO-RAD®) e foram adicionados aproximadamente 40 μg do cDNA de interesse interrompido pelo cassete de resistência à blasticidina. Em seguida, as células foram submetidas a eletroporação no aparelho Electro Cell Manipulator™ (BTX®) nas seguintes condições: 1,1 kV, 300 Ω e 3 μF . Após a descarga elétrica, foram acrescentados imediatamente 10 μL de uma solução de MgCl_2 100 mM e CaCl_2 100 mM, mantendo-se a cubeta no gelo por 5 minutos. 2×10^6 células foram transferidas para placas de cultura de tecidos e após 10 minutos foram adicionados 10 mL de meio nutriente HL-5 contendo sulfato de estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram incubadas a 22°C e no dia seguinte foi adicionado o antibiótico blasticidina na concentração final de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após o crescimento na placa, os clones resistentes à droga foram recuperados pipetando-se repetidamente o meio de cultura, e submetidos a plaqueamento em diluições apropriadas para isolamento de clones em meio sólido SM.

3.1.3. Transfecção de DNA em *Dictyostelium* pelo método de precipitados de cálcio

Com o objetivo de obter a expressão constitutiva da PP4c em *D. discoideum* subclonamos o cDNA da PP4c no vetor de expressão pDNeo.67 (da Silva & Klein, 1990) gerando a construção plasmidial pDNeo_DdPP4c (para detalhes desta construção plasmidial ver item 3.5.).

2×10^7 células da linhagem selvagem AX4 em fase de crescimento exponencial em meio líquido foram depositadas em uma placa de cultura de tecidos e mantidas em repouso por duas horas. O meio de cultura foi removido e substituído por 10 mL de HL-5 contendo MES (10 mM, pH 7,0) como tampão. Esta solução foi removida após 25 minutos e um precipitado de DNA- CaCl_2 foi gotejado no centro da placa, espalhando-se delicadamente. Este precipitado foi obtido

adicionando-se 50 µg da construção plasmidial pDNeo_DdPP4c a 600 µL de uma solução HBS 1X (NaCl 136 mM, KCl 5 mM, NaHPO₄ 700 µM, dextrose 5 mM) e 36 µl de CaCl₂ (2 M). Após 20 minutos foram acrescentados 10 mL de MES-HL-5 e as placas permaneceram a 22°C por 3 horas. Após a remoção do meio foram adicionados 2 mL de glicerol 18% (v/v) em HBS 1X (v/v), e após 5 minutos esta solução foi removida. Imediatamente foram adicionados 10 mL de HL-5 contendo 250 µg/mL de piperacilina. As células permaneceram a 22°C por uma noite. No dia seguinte o meio de cultura foi substituído por 10 mL de HL-5 contendo o antibiótico geneticina na concentração de 20 µg/mL e foram adicionados também 100 µL de uma suspensão de bactérias mortas *Klebsiella aerogenes* (método de obtenção descrito a seguir). O meio de cultura contendo antibiótico (HL-5 + geneticina 20 µg/mL) foi trocado após 24, 48 e 96 horas. Após a última troca a concentração de geneticina foi reduzida para 5 µg/mL durante 24 horas, e posteriormente aumentada para 10 µg/mL por mais 24 horas. A última troca foi feita com HL-5-geneticina 20 µg/mL. Nesta fase vários clones seriam visualizados a olho nu. Quando atingissem um tamanho considerado adequado, os clones seriam recolhidos pipetando-se repetidamente o meio de cultura e utilizando diluições desta suspensão para obtenção de clones isolados no plaqueamento em meio sólido.

A preparação de suspensão de bactérias mortas *Klebsiella aerogenes* foi obtida a partir de cultivo em meio líquido (SM líquido). Após crescimento as bactérias foram coletadas por centrifugação e lavadas no mesmo volume com tampão Sorensen (20 mM, pH 6,4) a 4°C. Em seguida elas foram concentradas no mesmo tampão para uma densidade de 10¹¹ células/mL e mortas por aquecimento a 100°C por 10 minutos sob agitação suave. Alíquotas (100 µL) foram armazenadas no freezer a -20°C.

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

Após crescimento em meio líquido HL-5, 5×10^7 células foram resfriadas e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C. O meio de cultura foi desprezado e 75 µL de EDTA gelado (150 mM, pH 8,0) foram adicionados para ressuspensão das células em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 100 µL de Sarcosil 10 % (p/v), o tubo foi agitado moderadamente e incubado a 55°C por 30 minutos. Foram adicionados 250 µL de acetato de amônio (4 M) e o tubo foi agitado e centrifugado a 14000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v). O tubo foi agitado e centrifugado a 14000 rpm por 4 minutos. Esta extração foi repetida por mais duas vezes. A fase aquosa foi extraída com clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v) e centrifugada nas mesmas condições acima. A fase aquosa foi precipitada com 2,2 volumes de etanol 100% e 0,1 volume de KOAc (3 M, pH 5,5). O tubo foi centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos e o precipitado foi lavado em etanol 75% (v/v) e centrifugado nas mesmas condições. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco no *speed vac* (Eppendorf concentrator 5301™) por 5 minutos e ressuspensão em 100 µL de TE contendo 10 µg/mL de RNase. Para a análise por eletroforese em gel de agarose, foi utilizada uma alíquota de 10 µL.

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

Cultura de células de *D. discoideum* em meio líquido foi centrifugada para obtenção de precipitados de 2×10^7 células. Os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de Trizol™ (Invitrogen Life Technologies®) e agitados para ressuspensão total. Foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foram adicionados a 0,2 volumes de CHCl₃. O tubo foi agitado vigorosamente e incubado por mais 3 minutos à temperatura ambiente.

O tubo foi centrifugado por 15 minutos a 4°C a 14000 rpm. A fase aquosa foi retirada e transferida para outro tubo. A esta fase foi adicionado meio volume de isopropanol seguido de incubação por 10 minutos. O tubo foi centrifugado por

10 minutos a 4°C a 14000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com igual volume de etanol 75% (v/v) por centrifugação nas mesmas condições acima. O etanol foi desprezado e o precipitado, seco em *speed vac* (Eppendorf concentrator 5301™) por 5 minutos. O precipitado de RNA foi ressuspensão em 50 µL de H₂O livre de RNase e a amostra foi aquecida por 10 minutos a 65°C. Após a ressuspensão a concentração final do RNA total foi estimada pela medida da absorbância a 260 nm, onde D.O._{260nm} = 1 equivale a 40 µg de RNA/mL, e a sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

3.1.6. Preparo de extratos celulares de *D. discoideum* para análise por SDS-PAGE e Western blot

Os extratos protéicos de células de *D. discoideum* da fase de crescimento foram preparados pela lise do precipitado de células diretamente em tampão de eletroforese para SDS-PAGE concentrado 1X [Tris-HCl (50 mM, pH 6,8), DTT (25 mM), glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v) e azul de bromofenol (80 µg/ml)], seguida de fervura por 5 minutos e adição de 1 µL de DTT 1M.

3.1.7. Preparo de células de *D. discoideum* para análise por microscopia de fluorescência

Culturas de células de *D. discoideum* em meio líquido foram centrifugadas para eliminação do meio de cultura. Os precipitados foram ressuspensos em 100 µL de PBS pH 8,5 e glicerol na proporção de 1:1 (v/v). Após nova centrifugação e lavagem, as células foram ressuspensas em 40 µL da mesma solução e observadas em microscópio de fluorescência (Zeiss®).

3.2. Procedimentos para manipulação de bactérias

3.2.1. Preparo de bactérias competentes para transformação por eletroporação

Bactérias *Escherichia coli* linhagem XL1 Blue {*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac*⁻ F'[*proAB⁺ lac^q lacZΔM15 Tn10 (tet^r)*]} ou linhagem Sure {*e14⁻(McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB rscJ sbcC umuC.Tn5 (Kan^r) uvrC [F'*proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)*]^c*} foram estriadas em placas de meio LB sólido [triptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v) e agar 1,5% (p/v), pH 7,5] seguindo-se incubação a 37°C por uma noite. Posteriormente, uma colônia foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido e crescida a 37°C por uma noite a 225 rpm. Aproximadamente 5,0 mL desta cultura (pré-inóculo) foram transferidos para 500 mL de meio LB líquido fresco seguindo-se crescimento por 2 a 3 horas nas mesmas condições anteriores, até que a D.O._{600nm} atingisse aproximadamente 0,5. As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis, incubadas em gelo/água por 15 minutos e posteriormente coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos, a 4°C (Rotor SS-34, SORVALL®). O sedimento foi ressuspensão em 250 mL de água destilada estéril e gelada e centrifugado nas condições anteriores. A etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes, as células ressuspensas em 50 mL de glicerol 10% (v/v) gelado e submetidas a centrifugação novamente. Por fim, as bactérias foram ressuspensas em 1000 µL de glicerol 10% (v/v), distribuídas em pequenos volumes de 45 µL em tubos estéreis, imediatamente congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a -80°C.

3.2.2. Transformação de bactérias por eletroporação

Aproximadamente 0,2 µg do DNA plasmidial foram adicionados a 45 µL de bactérias competentes e a mistura foi transferida para uma cubeta (gene pulser cuvette™ 0,2 cm, BIO-RAD®) previamente resfriada. Em seguida as células foram submetidas a eletroporação (Electro Cell Manipulator™, BTX®) nas seguintes

condições: 2500 V, 50 μ F e 129 Ω . Imediatamente, foi adicionado 1 mL de meio LB sendo a suspensão bacteriana transferida para tubo de cultura e incubada a 37°C por 1 hora a 200 rpm. Após essa recuperação, 100 μ L, 200 μ L e 300 μ L de cultura foram semeados em placas de meio LB sólido contendo carbenicilina 100 μ g/mL. Algumas colônias transformantes foram inoculadas em meio LB líquido contendo carbenicilina 100 μ g/mL para minipreparação de plasmídeos e posterior análise quanto à presença das construções plasmidiais de interesse.

3.3. Procedimentos para manipulação e análise de DNA e RNA

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

3.3.1. Métodos de preparação de plasmídeos

Minipreparação pelo método de lise alcalina

As bactérias foram crescidas em 1,5 mL de LB contendo carbenicilina 100 μ g/mL a 37°C por uma noite a 225 rpm e então submetidas a centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 100 μ L de solução GET/RNase [TrisHCl (25 mM, pH 8,0); glicose (0,5 M); EDTA (10 mM) e ribonuclease A 150 μ g/mL] foram adicionados para ressuspensão do sedimento de bactérias. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de solução de lise [SDS 1% (p/v) e NaOH (0,2 M)] recém preparada misturando-se delicadamente por inversão até completa homogeneização. A suspensão foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se adição de 200 μ L de solução de neutralização [acetato de potássio (5 M, pH 4,8)]. Após mistura da suspensão por inversão suave do tubo, seguiu-se incubação por 20 a 30 minutos a 4°C e centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. Do sobrenadante obtido foram tomados 400 μ L e adicionados a 300 μ L de

isopropanol em um novo tubo. Após centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 μ L de etanol 70% (v/v) nas mesmas condições de centrifugação anteriores. O precipitado foi seco em *speed vac* (Eppendorf concentrator 5301™), ressuspensão em 25 μ L de Tris 10 mM, pH 8,0 e mantido a -20°C .

Preparação em larga escala

Para obtenção de plasmídeos em grande quantidade foram utilizados 500 mL de cultura de clones transformantes de *E. coli* XL1 Blue ou Sure. Para 500 mL de meio LB fresco contendo antibiótico carbenicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ foram adicionados 500 μ L de pré-inóculo (3 mL de cultura em meio LB por uma noite), seguindo-se incubação a 37°C a 225 rpm por uma noite. A cultura foi submetida a centrifugação a 6500 rpm por 10 minutos a 4°C em rotor GSA (SORVALL®). O sobrenadante foi completamente removido e o sedimento ressuspensão em 15 mL de solução I [Tris (20 mM, pH 8,0), glicose (50 mM) e EDTA (10 mM)] acrescida de 75 mg de lisozima. Foram adicionados 30 mL de solução II [NaOH 0,2 M, SDS 1% (p/v)] recém preparada e a suspensão foi misturada delicadamente por inversão. Por fim, foram adicionados 15 mL de solução III [acetato de potássio (5 M, pH 4,8)] e após mistura a suspensão foi submetida a centrifugação a 6500 rpm por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi recolhido em uma nova garrafa por filtração em gaze, acrescido de 36 mL de isopropanol e submetido a centrifugação a 6500 rpm por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado em estufa a 37°C para completa evaporação de isopropanol. O DNA foi ressuspensão em 2,5 mL de TE (Tris 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM) e transferido para um tubo de vidro de 15 mL. As proteínas foram precipitadas pela adição de acetato de amônio 2,5 M e incubação em gelo por 20 minutos. A mistura foi submetida a centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C , em rotor SS34 (SORVALL®) e o sobrenadante transferido para outro tubo de vidro. O DNA foi precipitado com 2 vezes o volume de etanol 100% e incubado em gelo por 20 minutos. O etanol foi removido por centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C em rotor SS34 e o precipitado incubado a 37°C , até secagem. Posteriormente, o precipitado foi

dissolvido em TE contendo RNase (10 µg/mL) e incubado a 37°C por 15 minutos. Após adição de NaCl para 1,5 mM e ¼ do volume de PEG/NaCl [PEG 6000-8000 30% (p/v) e NaCl (1,5M)] a mistura foi incubada a 4°C por uma noite. O DNA precipitado foi coletado por centrifugação a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C (rotor SS34, SORVALL®) e em seguida ressuspenso em 50 µL de água. 50 µL de tampão PK 2X [Tris (20 mM, pH 8,0), EDTA (10 mM, pH 8,0) e SDS 1% (p/v)] e proteinase K para concentração final 500 µg/mL foram adicionados e a mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Uma extração com igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) foi realizada seguida por uma extração com igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v). O DNA foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de acetato de potássio (3 M, pH 5,5) juntamente com 2,2 volumes de etanol 100% seguindo-se centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) por centrifugação nas condições anteriores e, após aspiração do etanol, o DNA foi seco em *speed vac* (Eppendorf concentrator 5301™), e finalmente ressuspenso em 50 µL de TE. A determinação da quantidade de DNA foi feita pela medida da absorbância a 260nm, onde D.O._{260nm} = 1 equivale a 50 µg de DNA fita dupla/mL.

3.3.2. Digestão com enzimas de restrição

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

3.3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A amostra de DNA a ser analisada foi misturada com 0,1 volume de tampão de amostra [azul de bromofenol 0,25% (p/v) e sacarose 40% (p/v)] e a eletroforese foi realizada em gel de agarose [0,7% ou 0,8% (p/v)] contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, a 80-90 Volts em TBE [Tris-HCl (89 mM), ácido bórico (89 mM) e EDTA (2 mM, pH 8,0)]. A corrida foi interrompida após o corante percorrer

aproximadamente 4/5 da distância entre o local da aplicação e o limite inferior do gel. O gel foi fotografado sob luz ultravioleta e os tamanhos dos fragmentos foram estimados mediante comparação com a mobilidade de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos.

3.3.4. Eluição de fragmentos de DNA em papel

Foi realizada eletroforese em gel de agarose até a separação dos fragmentos de DNA. O gel foi fotografado e um pequeno corte foi feito entre as bandas de DNA de modo a permitir a introdução de um pedaço de 2,5 cm de papel Whatman® DE81 à frente do fragmento de interesse. A eletroforese foi reiniciada para permitir a transferência do fragmento de DNA para o papel. O papel contendo o DNA foi então transferido para um tubo contendo uma solução de 500 µL de NaCl 1 M em TE pH 8,0. Após eluição 1 hora de incubação em temperatura ambiente o sobrenadante contendo o DNA eluído foi coletado centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos e transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) e a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 6 min em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, seguindo-se adição de mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v) e centrifugação a 14000 rpm por 6 min, à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida novamente e a esta foi adicionado o dobro do volume de etanol 100%. O tubo foi centrifugado a 14000 rpm por 15 min, em temperatura ambiente e o etanol foi aspirado. O DNA precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v) por centrifugação nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi seco em *speed vac* (Eppendorf concentrator 5301™) por 5 minutos e ressuspenso em 20 µL de TE. Uma alíquota foi analisada por eletroforese em gel de agarose e quantidade de DNA obtida foi estimada por comparação com fragmento de DNA de tamanho similar e quantidade conhecida.

3.3.5. Varredura da biblioteca de cDNA de *D. discoideum*

Utilizamos uma biblioteca de cDNA em vetor Uni-Zap-XR (Stratagene®) de *D. discoideum* obtida a partir de mRNA da fase vegetativa gentilmente cedida pelo Dr. Hudson Freeze (The Burnham Institute, San Diego, California). Seu título era de $1,6 \times 10^{10}$ p.f.u./mL. As bactérias (XL-1 Blue) a serem infectadas com os bacteriófagos (fagomídeos) foram cultivadas em placas contendo meio LB sólido e 15 µg/mL de tetraciclina a 37°C por uma noite. Bactérias de colônias isoladas foram removidas e utilizadas em um novo inóculo em 50 mL de meio contendo 10% (v/v) de MgSO₄ 100 mM e 10% (v/v) de maltose 2% (p/v). Estas culturas foram mantidas sob agitação a 37°C até atingirem D.O._{600nm} = 0,9. As bactérias foram então recolhidas por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos, a 4°C e ressuspensas em 25 mL de uma solução de MgSO₄ 10 mM. Desta suspensão foram retiradas alíquotas de 200 µL, que foram misturadas a uma diluição apropriada da solução contendo os bacteriófagos recombinantes (a varredura inicial foi realizada em duas placas contendo $1,0 \times 10^5$ p.f.u. cada). As misturas assim obtidas foram incubadas a 37°C por 20 minutos para a adsorção dos bacteriófagos às bactérias e a seguir foram misturadas a 3,0 mL de meio NZY λ-top agarose {NZY líquido [extrato de levedura 0,5% (p/v), NZ amina (caseína hidrolizada), NaCl 0,5% (p/v), MgSO₄.7H₂O 0,2% (p/v), agar 1,5% (p/v)] e agarose 0,7% (p/v)} fundido e mantido a 45°C. O meio NZY λ-top agarose contendo as bactérias com bacteriófagos adsorvidos foi imediatamente espalhado sobre placas de Petri contendo meio NZY sólido (NZY líquido com 2% de agar). Estas placas foram mantidas em estufa a 37°C por aproximadamente 8 horas para obtenção de placas de lise não confluentes.

Em seguida ao aparecimento das placas de lise, membranas de náilon (Hybond™, Amersham-Pharmacia Biosciences®) de tamanho exato foram colocadas sobre a superfície do meio sólido e o DNA dos fagos foi transferido por adsorção direta por 2 minutos. Réplicas das membranas foram obtidas após transferência dos fagos por 5 minutos. As membranas foram deixadas para secar à temperatura ambiente e em seguida foram colocadas sucessivamente, com a

face contendo bacteriófagos adsorvidos voltada para cima, sobre papéis de filtro Whatman® 3MM levemente embebidos nas soluções de desnaturação [NaOH 0,5M; NaCl 1,5M] e neutralização [Tris-HCl 0,5M pH 8,0; NaCl 1,5M] por 3-6 minutos, em cada um dos tratamentos. Em seguida, as membranas foram tratadas da mesma forma por duas vezes de 2 minutos cada em papéis embebidos em SSC 2X [SSC 10X corresponde a NaCl 3M; citrato trissódico 0,3 M]. As membranas foram secas e expostas por 7 min à luz UV para fixação covalente do DNA e armazenadas para posterior hibridização com sonda de DNA radioativa como descrito no item 3.3.8.

Após a varredura com sonda radioativa, e de acordo com o resultado dos autorradiogramas, as regiões da placa contendo os clones de bacteriófagos de interesse foram removidas e transferidas para tubos contendo tampão SM [NaCl, 10 mM; MgSO₄ 15 mM; Tris.HCl 25 mM, gelatina 0,005% (p/v)], seguindo-se armazenagem a 4°C. Os bacteriófagos assim isolados foram novamente plaqueados transferidos para membranas de náilon e hibridizados nas mesmas condições para realização de varreduras secundária e terciária, até completa purificação dos clones de bacteriófagos (fagomídeos) de interesse.

3.3.6. Conversão de clones fagomídeos para a forma plasmidial

Os fagos recombinantes selecionados após a varredura da biblioteca foram convertidos de sua forma de fagomídeos (Uni-Zap-XR™) para a forma plasmidial (pBluescriptS/K™) pela infecção de *E.coli* linhagem XL-1 blue MRF' de acordo com o protocolo de excisão *in vivo* fornecido pelo fabricante (Stratagene®).

Para excisão, o sedimento obtido a partir de 50 mL de uma cultura de XL-1 blue MRF' obtida após crescimento por 16 horas em meio LB com 0,2% maltose foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, ressuspenso em 200 µL de MgSO₄ 10mM e incubado com 200 µL da mistura de bacteriófagos (contendo acima de 10⁵ p.f.u.) e com 1µL de um bacteriófago auxiliador (contendo acima de 10⁶ p.f.u.). Esta mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos e em seguida foram adicionados 3,0 mL de LB. Os tubos foram incubados a 37°C sob agitação por 3 horas. A seguir a mistura foi aquecida a 68°C por 20 minutos e centrifugada a 2000 rpm por

15 minutos. O sobrenadante foi decantado e mantido a 4°C. 1 µL desta suspensão foi adicionado a 200 µL de uma suspensão de bactérias SOLR™ (sedimento obtido a partir de 50 mL de uma cultura de SOLR™ obtida após crescimento por 16 horas em meio LB com 0,2% maltose e centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos, ressuspensão em 200 µL de MgSO₄ 10mM). A mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos e plaqueada em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de carbenicilina. As colônias assim obtidas contêm o plasmídeo pBluescriptS/K contendo o cDNA correspondente ao clone isolado após as varreduras da biblioteca de cDNA construída no vetor Uni-Zap-XR.™

3.3.7. Preparação de sonda radioativa

A marcação da sonda de DNA foi feita com o *kit* Random Primers DNA Labeling System™ (Invitrogen Life Sciences®) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, utilizando 50 µCi de [α^{32} P] dATP e/ou [α^{32} P] dCTP. Utilizamos 25 µL de uma solução contendo de 50ng a 100ng de DNA diluído em água (em geral fragmento de DNA purificado por eletroforese em gel de agarose) e sempre previamente desnaturado por fervura durante 5 min de resfriamento rápido em gelo, antes da reação de marcação.

Para purificação da sonda radioativa, um pouco de lã de vidro foi empacotado no fundo de uma seringa de 1 mL sem agulha, que foi em seguida apoiada num tubo cônico de 15 mL e preenchida com 0,9 mL de resina Sephadex G-50 previamente equilibrada em TE. A resina foi lavada com 5 a 10 mL de STE [Tris - HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 10 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0] por centrifugação a 2500 rpm por 3 minutos, à temperatura ambiente. Foram então adicionados 50 µL da reação contendo a sonda radioativa, seguindo-se eluição da sonda por centrifugação nas mesmas condições diretamente no tubo acoplado à seringa.

Para verificação da eficiência da incorporação radioativa, alíquotas de 1 µL da sonda purificada e não purificada foram adsorvidas em pedaços de 1 x 1 cm papel de filtro (em cada). Um pedaço contendo a sonda não purificada e outro contendo a sonda purificada foram tratados com 25 mL de TCA 10% (v/v), a 4°C por 10 min, por duas vezes. Em seguida os papéis foram lavados com etanol e

depois de secos, a radioatividade foi medida em contador de cintilação líquida e comparada com os papéis contendo as mesmas amostras mas não submetidos ao tratamento com TCA. Em geral, a atividade específica das sondas preparadas estava na faixa de 5×10^8 a 10^9 cpm/ μ g de DNA.

3.3.8. Hibridização de membranas de náilon contendo o DNA dos fagos adsorvidos

A membrana (*blot* para varredura da biblioteca de cDNA) foi apoiada sobre uma tela de náilon e então colocada na garrafa de hibridização contendo solução de hibridização [Denhardts 5X; SSPE 6X; SDS 0,1% (p/v); DNA de timo de bezerro 125 μ g/mL]. A solução de Denhardts corresponde a: Ficoll 1% (p/v), polivinilpirrolidona 1% (p/v), BSA fração V 1% (p/v). A solução de SSPE 20X corresponde a: NaCl 3 M, NaH_2PO_4 0,2 M pH 7,4 e EDTA 20 mM. Esta pré-hibridização foi realizada a 68°C por pelo menos 2 horas. Após este tempo a sonda radioativa foi acrescida à solução de hibridização, seguindo-se incubação por no mínimo 12-16 horas a 68°C. Após hibridização foram realizadas lavagens sucessivas da membrana com SSC 6X, 4X, 2X e 2X, nesta ordem, por 20 minutos cada, à temperatura ambiente e sob agitação branda. Após secagem ao ar a membrana foi envolvida em filme plástico para exposição a filme de raios-X a - 80°C, por períodos variados.

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

O DNA genômico de *D. discoideum* digerido ou não com enzimas de restrição foi separado em eletroforese em gel de agarose como descrito 3.3.3. O gel foi incubado em solução desnaturante [NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M] por duas vezes, durante trinta minutos cada, e em seguida foi incubado em solução de neutralização [Tris-base 1 M; NaCl 1,5 M] por duas vezes por 30 minutos cada. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação branda.

A etapa seguinte consistiu na montagem de uma pilha sobre uma placa de sustentação de acrílico contendo na ordem: uma tira de papel Whatman® 3MM

sobre a placa, dobrado de modo a tocar a superfície interna da cuba; o gel com a face superior voltada para este papel; a membrana de nylon (Hybond-N™, Amersham-Pharmacia Biosciences®); papel Whatman® 3MM previamente umedecido em SSC 2X; três papéis Whatman® secos; pilha de jornal cortado; placa de vidro; peso de 500 g. Esta pilha foi colocada dentro de uma cuba contendo SSC 10X [NaCl 3 M; citrato trissódico 0,3 M]. A transferência foi realizada por 16 horas, em temperatura ambiente.

Alternativamente, a transferência para membrana de náilon foi realizada por 1 hora no sistema de transferência por pressão (Posi Blot 30 Pressure Blotter and Pressure Control Station™, Stratagene®) seguindo as instruções do fabricante.

Após a transferência, a membrana foi marcada com caneta na região de aplicação das amostras, e a fixação do DNA à membrana foi feita por exposição à luz ultravioleta por 7 minutos diretamente no transiluminador ou no aparelho UV Stratalinker 1800™ (Stratagene®), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram imediatamente utilizadas para hibridização ou embaladas em filme plástico e armazenadas.

3.3.10. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído

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

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

Após a eletroforese do RNA total como descrito no item anterior , o gel foi cuidadosamente transferido para uma cuba contendo 200 mL de SSC 10X. Os procedimentos para transferência de RNA para membranas de náilon (*Northern blot*) foram realizados de modo similar ao descrito no item 3.3.9., exceto que o tempo da transferência por pressão no sistema Posi Blot 30-30 Pressure Blotter and Pressure Control Station™ (Stratagene®) foi de 2 horas.

3.3.12.Hibridização de DNA e RNA

Usamos duas condições principais de hibridização de *Southern*, *Northern-blots*, e de DNA de fagos adsorvidos em membranas de náilon (*blots*); uma sem formamida (procedimento 1) e outra utilizando formamida (procedimento 2).

Procedimento 1

Os *blots* foram previamente colocados sobre telas de náilon e ambos transferidos para garrafas de hibridização. Nas garrafas acrescentávamos a solução de hibridização composta por Denhardt's 5X (Denhardt's 50x: Ficoll tipo 400- 5g; polivinilpirrolidona 5g; BSA 5g), SSC 6x (SSC 20x: NaCl 3M; citrato trisódico 0,3M), SDS 0,1%, DNA de timo de bezerro 150µg/ml e H₂O em quantidade suficiente para 25ml por garrafa de hibridização. A solução estoque de DNA de timo foi previamente submetida a sonicação e passagem por agulha de seringa. As alíquotas a serem utilizadas foram fervidas por 3 min e deixadas no gelo antes de serem acrescentadas às soluções de hibridização. As garrafas foram então levadas para forno de hibridização e as membranas deixadas nessas condições (de pré-hibridização) por pelo menos 3 horas a 68°C. Após este tempo, a solução foi trocada por uma nova solução de hibridização e a sonda radioativa (previamente desnaturada por fervura) foi acrescentada. As membranas foram deixadas nessa temperatura por aproximadamente 18 horas. No dia seguinte foram feitas lavagens sucessivas por 20 min cada a temperatura ambiente, em concentrações salinas decrescentes: SSC 6x, 4x, 2x. As membranas de náilon foram envolvidas em filme de plástico e colocados em cassetes na presença de filmes Raios X por tempos diferentes de exposição a -70°C.

Procedimento 2

Esse protocolo foi realizado de modo similar ao descrito para o procedimento 1. Como alterações modificamos a composição da solução de hibridização, as temperaturas de hibridização e de lavagens. A solução de hibridização foi composta por formamida 50%, SDS 0,1%, SSPE 6x (SSPE 20x: NaCl 3M, NaH₂PO₄ 0,2M pH 7,4; EDTA 20mM), Denhardts 5x, DNA de timo de bezerro 150ug/ml e H₂O em quantidade suficiente para 25ml por garrafa de hibridização. A temperatura de pré-hibridização e de hibridização foi 37°C para essas condições. As lavagens foram realizadas com: SSC 0,1x SDS 0,5% por 2 horas de incubação a 52°C (com pelo menos 2 trocas).

3.3.13.PCR ou RT-PCR

A composição básica das nossas reações de PCR foram: oligonucleotídeos para a concentração final de 1μM, dNTPs 0,2mM (para cada nucleotídeo), tampão da respectiva polimerase, polimerase (geralmente 1U da enzima para 50μl de reação), DNA (normalmente em torno de 100ng), água para um volume final de 50μl e íons Mg⁺² em concentrações variáveis conforme a reação e enzima usada. Para a maioria das reações utilizamos reagentes da Invitrogen Life Sciences®.

A condição usual de programação dos ciclos do termociclador da Perkin-Elmer® foi: desnaturação inicial por 3 minutos a 94°C, sendo a enzima adicionada diretamente no coquetel da reação. Depois foram realizados 25 a 30 ciclos de 49°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 94°C por 30 segundos. De acordo com os objetivos do experimento e a seqüência de DNA a ser amplificada, variamos ligeiramente a temperatura de anelamento, citada acima como 49°C.

Os oligonucleotídeos PPP01/PPP02 utilizados em reações de PCR para a amplificação de regiões do DNA genômico de *D. discoideum* foram selecionados a partir de regiões conservadas do domínio catalítico das seqüências de aminoácidos deduzidas de cDNAs de fosfatases já isoladas, sendo o motivo GD(V/I)HGQ representado pelo oligonucleotídeo PPP01 e o motivo RGNHE(S/C) representado pelo oligonucleotídeo PPP02. O grau de degeneração destes oligonucleotídeos é de 256 para PPP01 e 512 para PPP02, e suas seqüências

estão representadas abaixo, com os respectivos aminoácidos dos motivos selecionados:

G D V/I H G Q
PPP01- 5' AGTACTGCAG GGN GWC RTI CAY GGN CRA 3'

C/S E H N G R
PPP02- 5' GTAGGATCC ISW YTC RTG RTT NCC NC 3'

Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e os fragmentos do tamanho desejado foram isolados do gel e clonados no vetor plasmidial pMOS*Blue* T-vector kit™ (Invitrogen Life Sciences®).

Nos experimentos de RT-PCR procedíamos conforme o protocolo anterior, tendo como única alteração desse protocolo a fonte de substrato para as reações. Para esses experimentos partíamos de preparações de RNA total tratado com DNase (para eliminar eventual contaminação de DNA genômico da preparação) e então procedíamos a síntese do cDNA utilizando oligonucleotídeos específicos da sequência da PP4c e a enzima transcriptase reversa. Todas essas etapas foram realizadas com reagentes do *kit* Superscript One-Step RT-PCR System™ (Invitrogen Life Sciences®) e de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR ou RT-PCR foram sintetizados sob encomenda na empresa Biosynthesis Incorporated®. Os oligonucleotídeos pRTF e pRTR utilizados na amplificação de fragmentos da PP4c foram selecionados a partir de regiões de baixa identidade com outras fosfatases da família PPP, e suas seqüências estão representadas abaixo:

pRTF: 5' GAA GAA GGA AAT GTT CAA AGA GTA GAT TCA C 3'
pRTR: 5' GAA ACC TGC ACC TCT TGG ACT ACC 3'

3.3.14 Seqüenciamento manual de DNA

Para o seqüenciamento manual de DNA utilizamos o *kit DNA Sequenase versão 2.0™* (Amersham-Pharmacia Biosciences®) de acordo com as especificações do fabricante e utilizando $[\alpha^{35}\text{S}]\text{dATP}$. Antecedendo a reação de seqüenciamento, o DNA plasmidial (3 a 5 μg) foi submetido a desnaturação por incubação a temperatura ambiente por 5 minutos com NaOH 0,2M e EDTA 0,2mM. Em seguida adicionou-se 0,15 volumes de acetato de amônio 3M pH 4,8 e 2,5 volumes de etanol gelado e incubou-se 15min em gelo seco. A suspensão foi centrifugada a 14000 xg por 10 minutos a 4°C, o precipitado lavado com etanol 70% gelado e seco a vácuo. A reação de seqüenciamento foi então realizada de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

Em alguns casos realizamos o seqüenciamento com o *kit Thermo Sequenase Cycle Sequencing™* (Amersham-Pharmacia Biosciences®), utilizando-se de 1 a 4 μg de DNA plasmidial. Os oligonucleotídeos foram previamente marcados pela incorporação de $[\text{P}^{32}]$ às suas extremidades 5', catalisada pela enzima T4 polinucleotídeo quinase. A reação de seqüenciamento foi realizada em termociclador Perkin-Elmer® ajustado nas seguintes condições: 1 ciclo de 95° C por 5 minutos e 30 ciclos de 95° C por 30 s, 58° C por 30 s e 72° C por 1 minuto.

As reações de seqüenciamento foram então submetidas a eletroforese em géis (19X50cm) de poliacrilamida 5% contendo uréia 48%. Imediatamente antes da aplicação das amostras foram realizadas pré-corridas para pré-aquecimento do gel a 50°C. As corridas foram realizadas em potência constante (40W) por período de 2 a 6 horas. Os géis foram secos por 2 horas sob vácuo a 80° C e expostos a filme de Raios X, em temperatura ambiente.

3.3.15. Seqüenciamento automatizado de DNA

O seqüenciamento foi realizado no aparelho ABI 377 DNA Sequencer™ da Applied Biosystems® de acordo com as instruções do fabricante. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se 4 μL da mistura de reação Big Dye Terminator mix™ (Perkin Elmer®), 200-500 ng de DNA, 20 pM de oligonucleotídeo,

Tris base 40 mM, pH 9,0 e MgCl₂ 1 mM em um volume final de 20 µL. A reação foi incubada por 5 min a 95°C e em seguida submetida a 30 ciclos (95°C, por 30 segundos/ 50°C, por 10 segundos/ 60°C, por 4 minutos). Em seguida, o DNA foi purificado por precipitação com etanol, de acordo com as instruções do fabricante do *kit*, e ressuspensão em tampão para aplicação no gel do seqüenciador automático.

Para determinação da seqüência completa do cDNA da PP4c foram utilizados oligonucleotídeos derivados do vetor de clonagem pBluescriptS/KTM e que flanqueiam o sítio de clonagem além de três oligonucleotídeos derivados de seqüências internas do cDNA da PP4c e que foram sintetizados sob encomenda na empresa BioSynthesis Incorporated[®]. As seqüências destes quatro oligonucleotídeos são:

PP4.1	5' AAA GTT GGA GGA GAT TGT 3'
PP4.2	5' AGA TAA ACC ACC ATG AAC 3'
PP4.3	5' TCA GAT CCA GAG G 3'
PP4.4	5' GGT TAC CAC GAA TCA ATC T 3'

3.3.16. Métodos de análise de seqüências de DNA e proteína

Para análise das seqüências de DNA e de proteína foram utilizados os programas e banco de dados do Wisconsin PackageTM Versão 9.1 do Genetics Computer Group[®] (GCG) instalado no servidor do Departamento de Bioquímica/IQ-USP, para usuários registrados.

Foram também utilizados os programas e bancos de dados disponíveis, via Internet, nos seguintes endereços:

<i>Biobase Biological Databases</i>	http://transfac.gbf.decgi-bin/matSearch/matsearch.pl
-------------------------------------	---

<i>Biomedical Computing Facility</i>	http://bcf.bcm.tmc.edu/genomic.html
--------------------------------------	---

(Baylor College of Medicine)

<i>Dictyostelium discoideum</i>	http://genome-imb-jena.de/dictyostelium
---------------------------------	---

genome project

EMBL (<i>European Molecular Biology Laboratory</i>)	http://www.embl-heidelberg.de/Services/index.html
<i>Expasy Molecular Biology Server</i>	http://www.expasy.ch/
<i>European Bioinformatics Institute</i>	http://www.ebi.ac.uk/ ; http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html

Para pesquisa de similaridade de seqüências de DNA ou de proteínas utilizamos a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1990) em bancos de dados públicos como o GenBank do NCBI (ver acima). Para o alinhamento de seqüências de aminoácidos utilizamos o programa ClustalX ou ClustalW (Higgins et al., 1996; Jeanmougin et al., 1998).

Para o planejamento de oligonucleotídeos utilizamos o programa PRIMER3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Para a realização das análises filogenéticas, as seqüências foram previamente alinhadas com o programa ClustalX com os parâmetros padrão e o alinhamento obtido foi utilizado para posteriores análises com o programa PAUPTM Versão 4.0 (Swofford, 1999).

Para a geração de figuras ilustrativas das construções plasmidiais e gráficos comparativos de seqüências apresentadas utilizamos um software comercial (SimVectorTM).

3.4. Procedimentos para manipulação e análise de proteínas

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

A eletroforese de proteínas foi realizada como descrito por Laemmli (1970), com gel de separação de 10% de poliacrilamida e gel de empilhamento de 4,5%. As amostras foram misturadas com tampão de amostra para SDS-PAGE, fervidas por 5 min e 1 µL de DTT 1 M foi adicionado. Após aplicação das amostras, a corrida foi realizada a 35 mA ou 175 V até a saída do corante.

O gel foi corado e fixado por coloração com *Stain* [Coomassie blue R 0,2% (p/v), metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v)], por pelo menos 30 minutos e descorado em *Destain* [metanol 30% (v/v), ácido acético 7% (v/v)].

3.4.2. Transferência eletroforética de proteínas de géis de poliacrilamida para filtros de nitrocelulose (*Western blot*)

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

3.4.3. Detecção imunológica das proteínas (*immunoblot*)

A membrana de nitrocelulose obtida após a transferência das proteínas do gel foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação lenta, em *Blotto A* [TBS 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; azida 0,02% (v/v)), leite em pó desnatado 5%(v/v), Tween-20 0,05% (v/v)]. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo comercial policlonal (200 µg/mL) contra um peptídeo sintético correspondente à porção carboxi-terminal da PP4c humana, preparado em cabras (Santa Cruz Biotechnology®) e diluído 1:200 em *Blotto A*, sob agitação

suave, à temperatura ambiente, por uma noite. A membrana foi lavada 6 vezes por 10 minutos cada com TBS 1X contendo 0,05% Tween-20 (v/v) e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase 1:5000 em *Blotto B* [TBS1X (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; NaCl 150 mM), leite em pó desnatado 5% (v/v) e Tween-20 0,05% (v/v)].

O filtro foi lavado novamente 6 vezes por 10 minutos com TBS 1X contendo Tween-20 0,05% (v/v) e revelado segundo as instruções do *kit ECL Plus Western blotting detection system™* (Amersham-Pharmacia Biosciences®), com tempo de exposição a filme de Raios-X de 30 segundos, 1 min, e 5 min.

3.5. Descrição das construções plasmidiais

Os esquemas das construções plasmidiais estão apresentados na figura 3, com a indicação das principais características de cada um dos vetores utilizados como descrito a seguir.

pBS_DdPP4c

A construção pBS_DdPP4c (figura 3A), que contém o cDNA completo da PP4c clonado no vetor pBluescriptS/KTM, foi obtida após varredura da biblioteca de cDNA e excisão do plasmídeo como descrito no item 3.3.6. A figura 11 (item 4.1) mostra que a digestão com *KpnI* e *SmaI* libera um inserto que contém todo o cDNA da PP4c com ~1,2 kbp da PP4c (na canaleta 3).

pDNeo_PP4c

O cDNA da PP4c foi excisado do plasmídeo pBS_DdPP4c com as enzimas de restrição *KpnI* e *SacI*. Após a sua purificação de um gel de agarose, foi ligado ao vetor pDNeo.67 (da Silva & Klein, 1990) previamente digerido com estas mesmas enzimas.

Como mostrado na figura 3C, o cDNA de interesse, quando clonado neste vetor, é expresso sob o controle do promotor da actina 6 (Act6). Este promotor dirige transcrição constitutiva. O vetor possui uma marca de resistência para o antibiótico geneticina (G418), possibilitando a seleção de células de *D. discoideum* transfectadas com esse vetor. Além disso, o vetor pDNeo.67 pode ser replicado em bactérias e as células transformadas podem ser selecionadas com o antibiótico ampicilina (amp^r), que é outra marca de resistência conferida pelo plasmídeo.

Os clones positivos tiveram seu DNA plasmidial analisado por digestão com *KpnI* e *SacI* para verificar o sucesso e a orientação da clonagem. Aqueles que continham o gene da PP4c clonado foram escolhidos e utilizados para transfecção de DNA em *Dictyostelium* pelo método de precipitados de cálcio, como descrito no item 3.1.3.

pYlplac128_PP4c-KO

O cDNA da PP4c da construção pBS_DdPP4c foi interrompido com a inserção de um cassete de expressão para a resistência ao antibiótico blasticidina (BsR). Essa marca de resistência possibilita selecionar clones de *D. discoideum* resistentes a esse antibiótico, ou seja, que têm a cópia do cDNA alterada integrada no genoma após a transfecção. Para obtenção da construção pYlplac128_PP4c-KO (figura 3B) excisamos o cDNA com as enzimas de restrição *KpnI* e *XhoI* do plasmídeo pBS_DdPP4c e subclonamos este fragmento no plasmídeo Ylplac128 (Gietz & Sugino, 1988), que não apresenta sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *XbaI*. Este sítio está presente no cDNA da PP4c na posição 645. O cassete contendo o gene de resistência à blasticidina (BsR) foi excisado do vetor pBSr519 (Putz & Zeng, 1998) também pela enzima *XbaI*, liberando um fragmento de ~1,4 kbp.

A construção assim obtida foi linearizada com *XbaI* e logo a seguir desfosforilada com a enzima fosfatase alcalina antes da ligação com o cassete BsR. Após a reação com DNA ligase e transformação de bactérias competentes SURE, os clones positivos tiveram seu DNA plasmidial analisado para verificar o sucesso da clonagem. Um dos clones contendo a inserção do cassete BsR foi escolhido (clone 16). O cDNA modificado pôde ser liberado do clone 16 com as enzimas *PstI* e *KpnI* originando um fragmento de pouco menos de 3 kbp. Este inserto foi utilizado para transfecção de *D. discoideum* como descrito no item 3.1.2 para tentativa de inativação do gene da PP4c e geração de linhagens resistentes ao antibiótico blasticidina.

pTX-GFP-PP4c

Para esta clonagem encomendamos a síntese de oligonucleotídeos contendo sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI*. Denominamos os oligonucleotídeos utilizados para esta clonagem como pGFPF e pGFPR, e suas seqüências estão descritas a seguir. Conforme indicado, o sítio para a enzima de restrição *BamHI* está no primer pGFPF, enquanto que o sítio para a enzima *XhoI* está no oligonucleotídeo pGFPR.

pGFPF: 5' CGGATCC ATG TCA TCC GAT TTA GAT AGA C 3'

pGFPR: 5' TTTTCTCGAGT TTA TAA AAA GTA TTC AGG TGC AGG 3'

Após a amplificação da PP4c por PCR a partir de pBS_DdPP4c com a enzima *Elongase Enzyme Mix™* (Invitrogen Life Sciences®) utilizamos um *kit* comercial para clonagem de produtos de PCR (pGEM T-Easy Vector System™, Promega®). Clones brancos positivos pelo teste de complementação funcional da atividade enzimática da β -galactosidase foram isolados e o DNA plasmidial foi preparado como descrito no item 3.3.1. O DNA plasmidial foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. O fragmento de pouco menos de 1kbp, correspondente à porção codificadora para a PP4c, foi purificado em gel de agarose e ligado ao vetor pTX-GFP (Levi et al., 2000) previamente digerido com as mesmas enzimas. A clonagem correta da PP4c como proteína de fusão com GFP (*Green Fluorescent Protein*) foi confirmada por seqüenciamento automatizado de DNA, conforme descrito no item 3.3.14. A construção resultante pTX-GFP-PP4c foi utilizado para transfecção de DNA em *Dictyostelium* pelo método de precipitados de cálcio, como descrito no item 3.1.3.

Figura 3: Esquema das construções plasmidiais

A) pBS_DdPP4c: cDNA da PP4c de *Dictyostelium discoideum* clonado nos sítios das enzimas *SmaI* e *KpnI* do vetor pBluescriptS/K (pBS). Estão indicados sítios para algumas enzimas de restrição que clivam o plasmídeo.

B) Ylplac128_PP4c-KO: O cDNA da PP4c de *Dictyostelium discoideum* clonado em vetor Ylplac128 foi interrompido pela inserção do cassete de resistência (BsR) ao antibiótico blasticidina no sítio para *XbaI*.

C) pDNeo_DdPP4c. cDNA da PP4c de *Dictyostelium discoideum* clonado em vetor pDNeo.67, construção para expressão constitutiva da PP4c. O vetor pDNeo.67 permite a expressão do cDNA da PP4c sob o controle do promotor constitutivo da actina 6 (Act6). A resistência à geneticina é conferida pelo cassete G418. Os sítios para clonagem do cDNA são os sítios de *KpnI* e *SacI*.

D) pTX-GFP-PP4c: Porção codificadora da PP4c de *Dictyostelium discoideum* clonada em vetor pTX-GFP, como proteína de fusão em GFP (*Green Fluorescent Protein*). O vetor pTX-GFP permite a expressão da proteína de fusão sob o controle do promotor constitutivo da actina 15. A resistência à geneticina é conferida pelo cassete G418. Os sítios para clonagem da porção codificadora para a PP4c são os sítios de *BamHI* e *XhoI*.

4. Resultados e Discussão

4.1. Obtenção, clonagem e seqüenciamento de produtos de PCR correspondentes a uma região de genes para serina/treonina fosfatases de *D. discoideum*

Em um trabalho iniciado juntamente com Luiz Paulo Moura Andrioli, (ex-estudante de Doutorado em nosso grupo de pesquisa), delineamos como estratégia para a futura clonagem de cDNAs de serina/treonina fosfatases de *D. discoideum*, a amplificação de fragmentos de DNA genômico obtidos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores derivados de regiões conservadas nas fosfatases da família PPP. Os fragmentos de DNA obtidos seriam então usados como sondas na varredura de bibliotecas de cDNA de *D. discoideum*.

A seqüência de bases do par de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR foi planejada a partir da análise comparativa das seqüências de aminoácidos de 45 serina/treonina fosfatases da família PPP deduzidas de cDNAs clonados de várias espécies. Essas seqüências, alinhadas por Barton et al. (1994), revelaram elevado grau de conservação para uma região contendo aproximadamente 280 resíduos, que corresponde ao domínio catalítico dessas enzimas. Essa característica nos permitiu planejar oligonucleotídeos de seqüência degenerada que permitissem a amplificação simultânea de fragmentos de DNA de genes para as enzimas da família PPP. O grau de degeneração das seqüências dos oligonucleotídeos que utilizamos é de 256 para o oligonucleotídeo PPP01 e de 512 para o oligonucleotídeo PPP02, conforme mostrado no item 3.3.13.

Após algumas tentativas de amplificação por PCR destes segmentos com os oligonucleotídeos em questão, foram obtidos fragmentos de vários tamanhos. A figura 4 mostra o perfil tipicamente obtido nesta reações de PCR, onde foi variada apenas a concentração de Mg^{+2} . Ainda que vários fragmentos tivessem sido amplificados nestas condições, foi possível identificar uma banda no gel de agarose, correspondente a fragmentos de menor tamanho e posicionada entre os

fragmentos de 194 e 234bp do marcador, que era do tamanho esperado para fragmentos correspondentes a regiões de um ou mais genes de fosfatases amplificadas com os oligonucleotídeos que utilizamos. Esses fragmentos teriam aproximadamente 200 pb (Andrioli, 1999).

Assim, algumas reações de amplificação através de PCR foram realizadas, para reunirmos quantidade de material suficiente para a clonagem de fragmentos de DNA do tamanho de interesse. Os produtos de PCR na faixa de 200 pb foram purificados a partir de um gel de agarose e diretamente utilizados para a clonagem no vetor pMOSBlue-T™ (Amersham-Pharmacia Biosciences®). Esse método de clonagem explora a capacidade de algumas polimerases termoestáveis (como a *Taq*-polimerase que utilizamos) adicionarem uma adenina nas extremidades 3' do fragmento de DNA dupla fita que foi amplificado. A presença de uma timina nas extremidades 3' da sequência do vetor, facilita a clonagem dos produtos de PCR. Após transformação de bactérias da linhagem XL1-Blue, foram isoladas 125 colônias brancas pelo teste de complementação funcional da atividade enzimática da β -galactosidase. Os plasmídeos desses clones foram analisados em reações de PCR com os oligonucleotídeos PPP01 e PPP02 para determinação do tamanho dos insertos.

A figura 5 mostra o resultado destas reações para 17 dos clones obtidos e que continham insertos. Eletroforeses em géis de agarose realizadas mais lentamente (como mostrado na figura 5), possibilitaram observar uma variação na migração eletroforética dos fragmentos na faixa de tamanho que era esperada na região do gel assinalada, provavelmente devido à diferença na natureza dos insertos dos clones. Dos 125 clones isolados, 69 apresentaram inquestionavelmente fragmentos na faixa de tamanho esperado.

Seis dos 69 clones selecionados foram escolhidos ao acaso para seqüenciamento dos seus insertos. Verificou-se que a seqüência de aminoácidos deduzidas a partir da seqüência de nucleotídeos determinada para dois desses clones, o clone 4 e o clone 20 (figura 6), correspondem respectivamente a seqüências internas de subunidades catalíticas de fosfatases do tipo 2A (PP2Ac) e do tipo 1 (PP1c) (Andrioli, 1999). O alinhamento das seqüências de cada um dos

insertos desses clones com as regiões equivalentes de fosfatases correspondentes em outros organismos confirmou a conservação entre estas enzimas. Apesar do alto grau de conservação entre as seqüências de PPs, existem resíduos conservados entre as PP2Ac e entre as PP1c na região amplificada pelos par de oligonucleotídeos que utilizamos, que permitiram distinguir a natureza desses clones. A seguir, o clone 20 foi utilizado como sonda no rastreamento de uma biblioteca de cDNA de *D. discoideum*, e um cDNA completo codificador de PP1c foi então isolado (Andrioli, 1999; Andrioli, et al., 2003).

A identificação dos clones 4 e 20 geraram a expectativa de que poderíamos ter outros clones de PCR carregando insertos correspondentes a fosfatases ainda não descobertas em *Dictyostelium discoideum*. Portanto, nos propusemos a caracterizar todos os demais clones resultantes da clonagem por PCR descrita acima.

Com esta finalidade, todos os 69 clones bacterianos isolados e armazenados em freezer a -80°C foram plaqueados em meio LB sólido contendo ampicilina e cultivados em meio LB líquido, de onde foram retiradas alíquotas para a preparação de DNA plasmidial em pequena escala, conforme descrito no item 3.3.1. Quatro clones não cresceram, reduzindo a população de clones a serem analisados a 65.

Os plasmídeos isolados foram então analisados pela digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Pst*II, presentes no sítio de clonagem múltipla do plasmídeo utilizado. Conforme esperado, a maioria dos clones liberou fragmentos na região de 200 bp, mas alguns clones não possuíam inserto (clones 1, 21, 22, 24, 35, 36, 43, 83, 85 e 118).

Com o objetivo de excluir desta população de clones aqueles que seriam idênticos aos clones 4 e 20, de seqüência de DNA já conhecida, digerimos o DNA plasmidial de todos os clones com as mesmas enzimas de restrição citadas acima. Após a eletroforese em gel de agarose, os géis foram transferidos para membranas de náilon. Prosseguimos com a hibridização das membranas com a sonda preparada a partir do cDNA completo da PP1c de *D. discoideum* isolado

como descrito anteriormente. A hibridização foi realizada em condições de alta estrringência para evitar hibridizações inespecíficas e cruzadas entre genes provavelmente similares.

Os autorradiogramas apresentados na figura 7 mostram a hibridização dos seguintes clones com a sonda de PP1c preparada a partir do clone 20: 20, 26, 37, 45, 52, 80, 88, 104, 115 e 116.

Novas membranas, preparadas de forma idêntica à descrita anteriormente, foram hibridizadas com a sonda preparada a partir do plasmídeo inteiro do clone 4, que corresponde ao gene da PP2Ac. A figura 8 mostra que os clones 4 (controle positivo), 6, 15, 32, 41, 44, 46, 47, 56, 73, 74, 85, 90, 105, e 110 hibridizaram com a sonda.

Prosseguimos a análise, por seqüenciamento, dos clones negativos nas hibridizações com sondas correspondentes a PP1c e PP2Ac. Encontramos clones relativos a amplificação, na reação de PCR, de fragmentos de genes não relacionados às serina/treonina fosfatases, resultado esperado tendo em vista a degeneração dos oligonucleotídeos utilizados. Entre estes estão os clones 23 e 30 que apresentaram 97% e 89% de identidade, respectivamente, com rRNA 26S de *Dictyostelium* (dados não apresentados). Quatro dos clones seqüenciados (27, 29, 33 e 42) apresentaram 95% de identidade com uma ribonucleoproteína de *D. discoideum*, chamada 'Major Vault Protein A' (MVPA). Encontramos uma seqüência equivalente ao oligonucleotídeo PPP01 em uma das extremidades do inserto, o que explica a amplificação de um fragmento deste gene (dados não apresentados).

Por outro lado, a seqüência dos clones 49 e 58 apresentou 97% de identidade com a PP2B ou calcineurina de *D. discoideum*. A pequena diferença de 3% se concentra nas extremidades do inserto e acreditamos que seja apenas um artefato de clonagem e/ou da reação de PCR (dados não apresentados).

O inserto dos clones 29 (MVPA) e 58 (PP2B) foram utilizados como sondas na hibridização de *southern blots* do produto da digestão com *Bam*HI e *Pst*I de minipreparações plasmidiais de cada um dos clones não identificados. Como mostra a figura 9, vários clones puderam ser excluídos da análise, reduzindo a 13

a população a ser analisada. O seqüenciamento de sete destes clones revelou que cinco correspondem a clones falso-negativos nas hibridizações anteriores, exceto o número 62, que apresentou seqüência deduzida de aminoácidos 60% idêntica a uma GTPase de *Bacillus subtilis* (dados não apresentados). Os outros 2 clones seqüenciados (28 e 57) apresentaram alta identidade com PP4 (originalmente denominada PPX) de diversas espécies (fig. 10 A e B). Os seis clones não seqüenciados foram considerados idênticos após apresentarem hibridização forte e específica em *southern blots* realizados em condições de alta estringência utilizando o inserto do clone 57 (PP4) como sonda (fig. 10C).

O alinhamento múltiplo da seqüência deduzida de aminoácidos do clone 57 com regiões correspondentes de enzimas ortólogas de outros organismos (fig. 10B), demonstra que o clone 57 codifica um segmento da PP4c de *D. discoideum*. Além disso, trata-se de uma enzima distinta da do tipo 2A, já identificada em *Dictyostelium* (Murphy et al., 1999), ainda que ambas pertençam à mesma subfamília de PPPs.

A tabela 1 resume a identificação final de um dos clones de PCR mencionados acima. Como pode ser observado, alguns produtos de PCR estão representados em maior número, indicando o predomínio de amplificação de determinadas seqüências a partir do par de oligonucleotídeos utilizados.

Figura 4. PCR para amplificação de fragmentos de genes de PPPs de *D. discoideum*. Os géis de agarose 1,5% corados com brometo de etídio mostram a separação dos produtos de PCR obtidos a partir de DNA genômico de *D. discoideum* e com os oligonucleotídeos PPP01 e PPP02 para genes de fosfatases em reações realizadas em diferentes concentrações de $MgCl_2$. (A) Canaletas (1) 1mM; (2) 2mM; (3) 3mM; (4) 4mM; (5) 1,5mM de $MgCl_2$. (B) Canaletas (1) e (2) 3mM; (3) e (4) 4mM de $MgCl_2$. As setas apontam para fragmentos de DNA amplificados na faixa de tamanho esperado (≈ 200 pb). As bandas do marcador de tamanho ϕ X174 clivado com *Hae*III correspondem de baixo para cima a: 194, 234, 271/281, 310, 603, 872, 1078 e 1353pb, canaletas 7 em (A) e 5 em (B). (Retirado de Andrioli, 1999.)

Figura 5. Análise dos clones dos produtos de PCR. O gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostra a separação dos produtos de PCR obtidos a partir de DNA plasmidial de 17 dos clones de PCR com os oligonucleotídeos PPP01 e PPP02 em reações realizadas com 4mM de $MgCl_2$. A seta aponta para fragmentos de DNA amplificados na faixa de tamanho esperado (≈ 200 pb), entre as bandas que correspondem a 194 e 234pb do marcador de tamanho ϕ X174 clivado com *Hae*III aplicado na última canaleta à direita (Retirado de Andrioli, 1999).

CLONE 04

<u>GGT GAT GTG CAT GGA CAA</u> TTT CAC GAT TTA ATG GAA TTA TTC AAA ATT GGA GGT	54
G D V H G Q F H D L M E L F K I G G	18
AAT TGT CCA GAT ACA AAT TAC CTT TTC ATG GGT GAT T AC GTA GAT AGA GGT TTC	108
N C P D T N Y L F M G D Y V D R G F	36
TAC TCT GTA GAG ACT GTA ACT TTA TTA GTT GCC TTA AAA GTA CGT TAT AAG GAT	162
Y S V E T V T L L V A L K V R Y K D	54
CGT GTT ACC ATT TTA <u>AGA GGT AAC CAT</u>	189
R V T I L R G N H	63

CLONE 20

<u>GGT GAT GTG AAT GGC CAG</u> TAC TAC GAT TTA CTT CGT CTC TTT GAG TAC GGA GGA	54
G D V N G Q Y Y D L L R L F E Y G G	18
TTC CCA CCA CAA AGT AAT TAT CTT TTT TTA GGT GAT TAT GTC GAT CGT GGT AAG	108
F P P Q S N Y L F L G D Y V D R G K	36
CAA TCC TTA GAG ACC ATT TGT TTA TTG TTG GCC TAT AAA ATC AAA TAT CCA GAG	162
Q S L E T I C L L L A Y K I K Y P E	54
AAC TTT TTC ATT CTT <u>CGA GGA AAA CAC CAG</u>	192
N F F I L R G K H Q	64

Figura 6. Sequência de DNA dos insertos dos clones 4 (relativo a PP2Ac) e 20 (relativo a PP1c) e respectivas seqüências de aminoácidos deduzidas. As seqüências correspondentes aos oligonucleotídeos PPP01 (no início da seqüência) e PPP02 (no final da seqüência) estão sublinhadas.

FIGURA 7: Análise dos clones dos produtos de PCR por hibridização com sonda preparada a partir do cDNA da PP1 de *D. discoideum*. Os produtos resultantes da digestão dos clones plasmidiais indicados, com as enzimas *Bam*HI e *Pst*II, foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e submetidos a *southern blot*. As membranas foram hibridizadas contra sonda preparada a partir do cDNA da PP1c de *D. discoideum*. O clone número 20 corresponde ao produto de PCR já seqüenciado e identificado com sendo relativo ao gene da PP1 (Controle positivo). As setas apontam a região do gel na faixa de 200 pb. O número correspondente a cada clone encontra-se indicado logo acima do respectivo autorradiograma. Devido a superexposição do filme não é possível na foto apresentada verificar com exatidão que os clones 36, 41, 79, 82, 90, 93 e 105 não apresentaram hibridização e são portanto negativos para esta sonda.

FIGURA 8: Análise dos clones dos produtos de PCR por hibridização com sonda preparada a partir do clone 4. Os produtos resultantes da digestão dos clones plasmidiais indicados, com as enzimas *Bam*HI e *Pst*II, foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e submetidos a *southern blot*. As membranas foram hibridizadas contra sonda preparada a partir do clone 4. Este clone corresponde ao produto de PCR já seqüenciado e identificado com sendo relativo ao gene da PP2Ac (Controle positivo). As setas apontam a região do gel na faixa de 200 pb. O número correspondente a cada clone encontra-se indicado logo acima do respectivo autorradiograma. Devido a superexposição do filme não é possível na foto apresentada verificar com exatidão que o clone 45 não apresentou hibridização e é portanto negativo para esta sonda.

A)

29 59 60 61 62 65 69 70 71 75 79 82 83 85 93 107 108 113 114 117 118

B)

4 59 61 62 65 69 70 71 75 82 83 85 93 107 108 114 118

Figura 9: A) Autorradiograma do *Southern Blot* hibridizado com a sonda preparada a partir do inserto do clone 29. Os produtos resultantes da digestão dos clones plasmidiais indicados, com as enzimas *Bam*HI e *Pst*I, foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % e submetidos a *southern blot*. As membranas foram hibridizadas contra sonda preparada a partir do clone 29. Este clone corresponde ao produto de PCR já seqüenciado e identificado com sendo relativo ao gene da MVPA (Controle positivo). A seta aponta a região do gel na faixa de 200 pb. O número correspondente a cada clone encontra-se indicado logo acima do respectivo autorradiograma. Devido a superexposição do filme não é possível na foto apresentada verificar com exatidão que os clones 108 e 114 não apresentaram hibridização e são portanto negativos para esta sonda.

B) Autorradiograma do *Southern Blot* hibridizado com a sonda preparada a partir do Inserto do clone 58 Este clone foi completamente seqüenciado e corresponde à Calcineurina ou PP2B, GenBank número de acesso U22397. A seta aponta a região de 195 pb.

Clone	Resultado	Clone	Resultado
1	Sem inserto	59	PPX
4	PP2A	60	MVPA
6	PP2A	61	PPX
9	MVPA	62	GTPase
10	Não cresceu	64	PP1
15	PP2A	65	Calcineurina
20	PP1	69	PPX
21	Sem inserto	70	PPX
22	Sem inserto	71	Sem inserto
23	rRNA	73	PP2A
24	Sem inserto	74	PP2A
26	PP1	75	Calcineurina
27	MVPA	79	MVPA
28	PPX	80	PP1
29	MVPA	82	PPX
30	rRNA	83	Sem inserto
32	PP2A	85	Sem inserto
33	MVPA	88	PP1
35	Sem inserto	90	PP2A
36	Sem inserto	91	PP1
37	PP1	93	Calcineurina
41	PP2A	104	PP1
42	MVPA	105	PP2A
43	Sem inserto	107	PPX
44	PP2A	108	MVPA
45	PP1	109	Não cresceu
46	PP2A	110	PP2A
47	PP2A	111	Não cresceu
49	Calcineurina	113	MVPA
51	MVPA	114	PPX
52	PP1	115	PP1
54	Não cresceu	116	PP1
56	PP2A	117	MVPA
57	PPX	118	Sem inserto
58	Calcineurina		

Identidade	Clones
Sem crescimento	10,54,109,111.
Sem inserto	1,21,22,24,35,36,43,71,83,85,118.
PP1	20,26,37,45,52,64,80,88,91,104,115,116.
PP2A	4,6,15,32,41,44,46,47,56,73,74,90,105,110.
PP2B (Calcineurina)	49,58,65,75,93.
PP4 (PPX)	28, 57,59,61,69,70,82,107,114.
MVPA	9,27,29,33,42,51,60,79,108,113,117.
RRNA	23,30.
GTPase	62

Tabela 1: Identificação final dos clones resultantes da clonagem por PCR. Os grupos de clones repetidos estão apresentados na parte inferior da tabela.

4.2 Clonagem e seqüenciamento do cDNA completo da PP4c de *D. discoideum*

Para o isolamento do cDNA completo correspondente ao gene da subunidade catalítica da PP4 (PP4c), varremos $2,0 \times 10^5$ p.f.u. de uma biblioteca de cDNA de células da fase de crescimento de *D. discoideum* construída no vetor λ ZAP (Stratagene), gentilmente cedida pelo Dr. Hudson Freeze (The Burnham Institute, La Jolla, USA.). Como sonda utilizamos o fragmento de DNA de 200 bp correspondente ao inserto do clone 57 (figura 10). Após varredura terciária da biblioteca, isolamos 3 clones comprovadamente positivos e puros (dados não apresentados). Os cDNAs clonados foram então recuperados no vetor pBluescriptS/K™ após conversão dos bacteriófagos para a forma plasmidial e as seqüências das suas extremidades 5' e 3' foram determinadas, revelando que todos eram relativos à PP4c de *D. discoideum*. Na figura 11 apresentamos o tamanho aproximado do inserto de cDNA destes três clones após digestão com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*. Escolhemos o clone contendo o cDNA de maior tamanho para determinação completa da sua seqüência em ambas as fitas, denominando-o pBS_DdPP4.

A figura 12 mostra a seqüência de bases do cDNA DdPP4c de 1230 pb que possui uma fase aberta de leitura completa codificando uma proteína de 305 aminoácidos, além de uma seqüência 5' não traduzida de 300 nucleotídeos. A massa molecular calculada para a proteína codificada pelo cDNA Dd_PP4 é 34,9 kDa enquanto o pl teórico corresponde a 5,20. O códon de terminação utilizado é TAA, que é o códon de terminação preferencial em *D. discoideum*. (Kimmel & Firtel, 1983). Na porção 3' não codificadora estão presentes apenas 11 adeninas. A seqüência do cDNA Dd_PP4c foi registrada no GenBank sob o número de acesso AF161253.

A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida do cDNA DdPP4 com seqüências depositadas no GenBank confirmou que ele codifica uma proteína com 83% de identidade e 93% de similaridade com a PP4c humana. A figura 13 mostra o alinhamento da seqüência da aminoácidos da PP4c de *D. discoideum*

com PP4c de outros organismos, demonstrando a alta conservação evolutiva desta enzima. Salientamos que a região carboxiterminal da PP4c apresenta o motivo conservado -YFL, que também está presente na PP4c de *D. discoideum* (resíduos 303 a 305). Esta é uma seqüência sinal para a carboximetilação desta enzima, conforme demonstrado por Kloeker & Wadzinski (1999).

4.3. Estrutura do gene da PP4c de *D. discoideum*

Para investigarmos o número de cópias do gene da PP4c no genoma de *Dictyostelium*, o DNA total de células vegetativas foi purificado e submetido a digestão com diferentes enzimas de restrição para subsequente hibridização, através da técnica de transferência de *Southern*, com uma sonda derivada do cDNA completo da DdPP4c (figura 14). Foram utilizadas apenas enzimas que supostamente não clivam o cDNA DdPP4 (*AvaI*, *BamHI*, *BglII*, *Clal*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *NcoI*, e *XhoI*). O resultado obtido sugere fortemente a presença de um único gene codificador para a PP4c no genoma de *D. discoideum*. Além disso, também pesquisamos por cópias adicionais ou parálogos do gene da PP4c em bases de dados públicas, que armazenam seqüências de genômicas geradas por um consórcio internacional de laboratórios envolvidos na elucidação do genoma de *D. discoideum*, além de ESTs. Até o momento, apenas a seqüência do cromossomo 2 foi completamente decifrada (Glöckner et al., 2002), sendo que o seqüenciamento dos demais cromossomos está em andamento (<http://genome.imb-jena.de/dictyostelium/>). Nestas buscas localizamos apenas um segmento de DNA no cromossomo 2 que contém a seqüência completa do cDNA DdPP4c e várias seqüências parciais de cDNAs que são equivalentes. Desta forma, a hipótese da existência de um único gene codificador da PP4c no genoma de *D. discoideum* parece ser a mais provável.

O alinhamento do cDNA DdPP4c com o gene da PP4c presente no cromossomo 2 revelou que o gene está dividido em três exons de 114pb, 378pb e 396pb separados por introns de 189pb e 115pb entre os exons 1 e 2 e exons 2 e 3 respectivamente, como esquematizado na figura 15. A figura 16 mostra a

seqüência do exons e introns do gene da PP4c, demonstrando nas extremidades dos introns, as seqüências canônicas GTN_xAG.

Como indicado na figura 16, análises informáticas subseqüentes da provável região promotora do gene da PP4c apontaram para um possível TATA *box* localizado a -326 nucleotídeos da primeira base do códon ATG. Encontramos também dois prováveis CAAT *boxes* localizados a -248 e -235 nucleotídeos da primeira base do códon ATG. Embora estes elementos apresentem significativa identidade com os consensos descritos, sua funcionalidade teria que ser demonstrada experimentalmente.

Figura 11. Análise dos clones de cDNA isolados. Nos géis de agarose 0,8% corados com brometo de etídio foram aplicadas amostras dos clones de cDNA A, B e C clivados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. O clone C foi denominado pBS_DdPP4. A chave à esquerda aponta a região dos fragmentos correspondentes aos insertos liberados com a clivagem dupla e que migram entre as bandas de 1636 e 1018pb do marcador de tamanho indicado à direita, em pb.

```

1      tttttttttttttttgtgccaattgtataaaccaatcaatttttaaaaaaagaataataaagaaaaa
68     taaagaaaaaatcaaaatatataaataataataataaaaaacaatcaacaaacaaaaaaaaaaaaa
135    aaaataagattttgaaaatttaataatattactataaaaagggttttgtttgtaatctctcaatcag
202    ctaatcaacaaataaattaaaaattcctgtgtgtattatatagtccttttttagaaaaaaaaaacta
269    tataatacacacaagaaattttaattaataaag
302    ATG TCA TCC GAT TTA GAT AGA CAA ATT GAA CAA CTC AAA AGA TGT GAA
      M  S  S  D  L  D  R  Q  I  E  Q  L  K  R  C  E
350    ATC ATC AAA GAG AGT GAA GTT AGA GCA TTA TGT TCA AAA GCA AGA GAA
      I  I  K  E  S  E  V  R  A  L  C  S  K  A  R  E
398    ATC CTT TTA GAA GAA GGA AAT GTT CAA AGA GTA GAT TCA CCA GTA ACT
      I  L  L  E  E  G  N  V  Q  R  V  D  S  P  V  T
446    ATT TGT GGT GAT ATT CAT GGT CAA TTC TAT GAT TTA AAA GAA CTT TTT
      I  C  G  D  I  H  G  Q  F  Y  D  L  K  E  L  F
494    AAA GTT GGA GGA GAT TGT CCA CAA ACC AAT TAT CTT TTT ATG GGA GAT
      K  V  G  G  D  C  P  Q  T  N  Y  L  F  M  G  D
542    TTT GTA GAT AGA GGA TTT TAT TCA GTA GAG ACA TTT TTA TTA TTG TTG
      F  V  D  R  G  F  Y  S  V  E  T  F  L  L  L  L
590    GCA TTA AAA GTT AGA TAC CCA GAT AGA ATT ACA TTG ATT CGT GGT AAC
      A  L  K  V  R  Y  P  D  R  I  T  L  I  R  G  N
638    CAT GAA TCT AGA CAA ATC ACT CAA GTC TAT GGT TTC TAT GAA GAA TGC
      H  E  S  R  Q  I  T  Q  V  Y  G  F  Y  E  E  C
686    GTT AGA AAG TAT GGT AGT GTT ACA GTT TGG AAA TAT TGT ACA GAG ATT
      V  R  K  Y  G  S  V  T  V  W  K  Y  C  T  E  I
734    TTC GAT TAT CTC TCA CTT TCT GCT TTA GTT GAT GGT AAA ATA TTT TGT
      F  D  Y  L  S  L  S  A  L  V  D  G  K  I  F  C
782    GTT CAT GGT GGT TTA TCT CCA TCA ATT AAT ACT TTA GAT CAA ATT AGG
      V  H  G  G  L  S  P  S  I  N  T  L  D  Q  I  R
830    GCA ATT GAT AGA AAA CAA GAA GTA CCA CAT GAA GGA CCA ATG TGT GAT
      A  I  D  R  K  Q  E  V  P  H  E  G  P  M  C  D
878    TTA ATG TGG TCA GAT CCA GAG GAT ATA CCA GGA TGG AAT GGT AGT CCA
      L  M  W  S  D  P  E  D  I  P  G  W  N  G  S  P
926    AGA GGT GCA GGT TTC TTA TTT GGT GAA GAT GTC GTT CAA AAG TTT AAT
      R  G  A  G  F  L  F  G  E  D  V  V  Q  K  F  N
974    CAC GAT AAC AAT TTA GAA TTT ATA TGT AGA GCG CAT CAA TTA GTA ATG
      H  D  N  N  L  E  F  I  C  R  A  H  Q  L  V  M
1022   GAA GGT TTC AAA TAT ATG TTT AAT GAA ACA TTA GTC ACC GTT TGG TCT
      E  G  F  K  Y  M  F  N  E  T  L  V  T  V  W  S
1070   GCT CCA AAC TAT TGT TAT AGA TGT GGT AAT GTT GCT GCA ATT TTA CAA
      A  P  N  Y  C  Y  R  C  G  N  V  A  A  I  L  Q
1118   CTC GAC GAA AAT CTT AAA AAG AAC TTT GCA ATC TTT GAA GCT GCT CCT
      L  D  E  N  L  K  K  N  F  A  I  F  E  A  A  P
1166   CAA GAA TCA AGA GGT GCA CCA GCT AAA AAA CCT GCA CCT GAA TAC TTT
      Q  A  S  R  G  A  P  A  K  K  P  A  P  E  Y  F
1214   TTA TAA aaaaaaaaaa
      L  *

```

Figura 12: Sequência de nucleotídeos do cDNA da PP4c de *D. discoideum* (pBS_DdPP4). As regiões não-codificadoras estão representadas em letras minúsculas. Abaixo de cada códon encontra-se indicado o aminoácido correspondente. As setas indicam os oligonucleotídeos internos utilizados para o seqüenciamento manual do cDNA. A seqüência deste cDNA foi registrada no GenBank sob o número de acesso AF161253.

Figura 13. Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas para algumas PP4c. Alinhamento das seqüências de cDNA para PP4 com seus respectivos números de acesso no GenBank. *Dictyostelium discoideum* (Dd, 5410609); *Homo s. sapiens* (Hs, 4506027); *Oryctolagus cuniculus* (Oc, 130788); *Takifugu rubripes* (Fugu, 4101701); *Drosophila melanogaster* (Dm, 3326930); *Caenorhabditis elegans* (Celegans, BAB63947); *Arabidopsis thaliana* (Ath, 1346782); *Paramecium tetraurelia* (Paramecium, 1346781). As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTALW. (*) indica resíduos idênticos, (:) indica substituição conservativa e (.) indica substituição semi-conservativa.

Figura 14: Southern blot do DNA total de *D. discoideum* hibridizado contra sonda do cDNA Dd_PP4c. O DNA total de *D. discoideum* clivado com diferentes enzimas de restrição foi separado em gel de agarose 0,7% e submetido a *southern blot*. O *blot* foi hibridizado com a sonda do cDNA Dd_PP4c. À direita estão assinaladas as posições de alguns marcadores de tamanho em Kb. As enzimas da esquerda para a direita utilizadas na digestão são: *Ava*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Cl*aI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I e *Nco*I.

Figura 15. Estrutura do gene da PP4c de *D. discoideum*. O segmento superior representa a porção do cromossomo 2 responsável pela codificação da PP4c. O segmento inferior representa a sequência correspondente do cDNA Dd_PP4c. Os traços escuros no segmento superior representam as fases abertas de leitura correspondentes aos respectivos exons e os traços mais claros indicam os introns. No segmento inferior esquematizamos a fase aberta de leitura correspondente ao cDNA da PP4c. As regiões flangeadoras estão representadas por traços finos e indicam extremidades 5' e 3' não traduzidas. As linhas verticais indicam a coalescência das porções codificadas pelos exons na fase aberta de leitura única encontrada no cDNA.

1 aaaaagaaaaataattatagacagatacacaaattcattcaaaagtatttttttttttttt
61 attttttttgaaaaaagtgggcacaaaacacaaatttggtgggtttttaagttaatttttttt
121 ttttttttttggtttttttttttggggattaaaaaataccatattttcacctaacaaaac
181 ctaacacagttttttactttttttaagaaatgggttaaatatcttatttttagaaaaagaaaa
241 ataataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagattttaccatttaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
301 aaaaaaaaaaaaaaaaaaccccaaaccttgaaaaaaaattaagggtatgattcaatttcgtat
361 aaaaaaatattggattttacttttatctttcaactattattattatctttattaaatcaaga
421 acatttttttattattattattattattattattttttattattattattattattattatt
481 attattattattattattattattattattattatttggtaaatgcctttttttttttccac
541 tatgtttttgatttccaaaaaaataaaaaataaataattttttgggcatgatatt
601 ttaatgttggtgcgatttccacatgagtcacacttttttttaattttaattttaatt
661 tttttatttcaatttttttttttttttttttttaaaatttttttaatttttttttttt
721 taaatt
781 tttattattactttttttattttttattttttata**T**attttttttatttttgtgccaatgtga
841 taaaccaatcaattttaaaaaaagaataataaagaaaaataaagaaaaatcaaaatata
901 taaataataataataataaaaaacaatcaacaaacaaaaaaaaaaaaaaaaataagattttg
961 aaaatttaataataattactataaaaaggttttggttttgtaatctctcaatcagctaataca
1021 acaataaatttaaaaattcttggtgtgtatttatatagtccttttttagaaaaaa
1081 aaaaatcaagaaattttaattaaataag**ATGTCATCCGATT**TAGATAGACAAATTGAACA
M S S D L D R Q I E Q
1141 ACTCAAAAGATGTGAAATCATCAAAGAGAGTGAAGTTAGAGCATTATGTTCAAAAGCAAG
L K R C E I I K E S E V R A L C S K A R
1501 AGAAATCCTTTTAGAAGAAGGAAATGTTCAAAGAGTAGATTACACAGTAACT**gt**aggtca
E I L L E E G N V Q R V D S P V T
1561 tttaaaatcattttatacattt
1621 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaatttcaaccacacacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
1681 ccactaccttaaatttttaactaattcatttggtttttttattttttttttttttttttttatc**a**
1741 **g**ATTTGTGGTGATATTCATGGTCAATTCTATGATTTAAAAGAAGTAAAGTTGGAGG
I C G D I H G Q F Y D L K E L F K V G G
1801 AGATTGTCCACAAACCAATTATCTTTTTTATGGGAGATTTTGTAGATAGAGGATTTTATTC
D C P Q T N Y L F M G D F V D R G F Y S
1861 AGTAGAGACATTTTATTATTGTTGGCATTAAAAGTTAGATACCCAGATAGAATTACATT
V E T F L L L L A L K V R Y P D R I T L
1921 GATTTCGTGGTAACCATGAATCTAGACAAATCACTCAAGTCTATGGTTTCTATGAAGAATG
I R G N H E S R Q I T Q V Y G F Y E E C
1981 CGTTAGAAAGTATGGTAGTGTACAGTTTGGAAATATTGTACAGAGATTTTCGATTATCT
V R K Y G S V T V W K Y C T E I F D Y L
2041 CTCACCTTTCTGCTTTAGTTGATGGTAAATATTTTGTGTTTCATGGTGGTTTATCTCCATC
S L S A L V D G K I F C V H G G L S P S
2101 AATTAATACTTTTAGATCA**Ag**ttaatgtatcattcatcaaattacaatacaattttataaata
I N T L D Q
2161 ttaaagtgatatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataat

Figura 16 (continua)

```

2221 ttttttattattagATTAGGGCAATTGATAGAAAACAAGAAGTACCACATGAAGGACCAA
      I R A I D R K Q E V P H E G P
2281 TGTGTGATTTAATGTGGTCAGATCCAGAGGATATACCAGGATGGAATGGTAGTCCAAGAG
      M C D L M W S D P E D I P G W N G S P R
2341 GTGCAGGTTTCTTATTTGGTGAAGATGTCGTTCAAAAGTTTAATCACGATAACAATTTAG
      G A G F L F G E D V V Q K F N H D N N L
2401 AATTTATATGTAGAGCGCATCAATTAGTAATGGAAGGTTTCAAATATATGTTTAATGAAA
      E F I C R A H Q L V M E G F K Y M F N E
2461 CATTAGTCACCGTTTGGTCTGCTCCAAACTATTGTTATAGATGTGGTAATGTTGCTGCAA
      T L V T V W S A P N Y C Y R C G N V A A
2521 TTTTACAACCTCGACGAAAATCTTAAAAAGAAGCTTTGCAATCTTTGAAGCTGCTCCTCAAG
      I L Q L D E N L K K N F A I F E A A P Q
2581 AATCAAGAGGTGCACCAGCTAAAAAACCTGCACCTGAATACTTTTTATTAAaaaaaaaaa
      E S R G A P A K K P A P E Y F L *
2641 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagaaaacaaatcaaaaatatatatatttat
2701 atataaaatataaaaaaaaaataatacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
2761 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaccagtttttttaattaatcaacaaaaacttttttttaataaa
2821 ataattgtaatattttaataattaataaaaactttttttattgatttagaaatatacttttct
2881 ttaacatcaatcatatttgagttaattttataattattattattttaaaatgaaaacttta
2941 ctattgttaaccatagattcccttttttaataattaatttcttgaatattaaatgatattgt
3001 ttaacaaaactatgtagtgcaaatagtggtgcatttaattgatgttttctaatgttggt
3061 atattataatttgaaatttgatgaattaacatggtcaattaattgattcattaaatcaatc
3121 ccgttatcccttttttgagaaatgtaaggtaatgatgaacttctaatactctacctaaa
3181 ttatcccttttccctcctgaatgtggcataataaagtggatgatagttccaattcatcaaat
3241 aatcgtctagcttgtattctggtttcttttccaatcatttctaatatgagtttcatgtgat

```

Figura 16: Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do gene da PP4c de *D. discoideum*. As regiões não-codificadoras 5' e 3' e também os introns estão representadas em letras minúsculas. Abaixo de cada códon dos exons encontra-se indicado o aminoácido correspondente. Os códons de iniciação e de terminação e as junções exon-intron estão em negrito. O sítio de poliadenilação e os possíveis elementos reguladores identificados na região promotora do gene estão sublinhados. O provável sítio de início de transcrição está representado por uma letra maiúscula em negrito.

4.4. Análise dos níveis de expressão da PP4c durante o desenvolvimento de *D. discoideum*

Iniciamos nossas análises para avaliarmos os níveis de expressão do mRNA da PP4c durante o ciclo de vida de *D. discoideum* através da hibridização de *Northern blots* contendo RNA total com o cDNA da DdPP4c como sonda. Esta abordagem não foi bem sucedida, uma vez que os sinais do mRNA que hibridizava com a sonda radioativa eram extremamente fracos e não reproduzíveis (dados não apresentados). Este insucesso provavelmente reflete a pouca abundância do mRNA da PP4c (ver adiante a fig. 20).

Decidimos assim, pesquisar a presença de transcritos relativos a PP4c em experimentos de RT-PCR semi-quantitativo que, em princípio, apresenta maior sensibilidade do que a técnica de hibridização de *Northern blots*. Após o alinhamento múltiplo da sequência de nucleotídeos das fosfatases da família gênica PPP já identificadas em *D. discoideum* planejamos um par de oligonucleotídeos sintéticos altamente específicos para a amplificação exclusiva do transcrito da PP4c (item 3.3.13). Seguindo as instruções e protocolos fornecidos pelo fabricante do *kit* comercial de RT-PCR descrito no item 3.3.13, calibramos a linearidade da reação e determinamos 28 ciclos como a faixa ideal de linearidade de amplificação (dados não apresentados). A figura 17 revela que os níveis de mRNA da PP4c permanecem aproximadamente constantes durante a fase de desenvolvimento, até 16 horas (culminação), ocorrendo um decaimento após 20 e 24 horas de careciamento, quando ocorre a formação dos corpos de frutificação. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes que mostraram o mesmo perfil de expressão do mRNA da PP4c. Desta forma, concluímos que os níveis de mRNA para a PP4c não apresentam variação significativa ao longo do desenvolvimento, a não ser por um ligeiro decaimento em sua fase final e que, provavelmente, reflete um silenciamento generalizado da transcrição, característico do final da diferenciação celular. Por outro lado, a expressão diferencial do gene da PP4c já foi relatada em outros organismos. Por

exemplo, em células humanas o gene da PP4c apresenta expressão aumentada em testículos (Hu et al., 1998).

A seguir, investigamos se os níveis proteicos da PP4c acompanham os níveis de seu mRNA observado ao longo do ciclo de vida de *D. discoideum*. Para tal, um *immunoblot* preparado com extratos dos mesmos tipos celulares avaliados no experimento descrito acima (figura 17) foi incubado com um anticorpo comercial policlonal anti-PP4c (*Santa Cruz Biotechnology*[®]). A figura 18A mostra que a quantidade relativa de PP4c detectada como um polipeptídeo de massa molecular aparente de cerca de 35 kDa, está presente nas células da fase de crescimento e permanece razoavelmente constante durante o desenvolvimento, desaparecendo no último ponto coletado, que corresponde aos corpos de frutificação. Um gel SDS-PAGE idêntico foi preparado com as mesmas amostras e corado com Coomassie blue para demonstrar que a mesma quantidade de proteína foi aplicada nas canaletas (Figura 18B).

Como já mencionado, a sequência de aminoácidos das subunidades catalíticas da proteínas fosfatases da família PPP são muito conservadas, portanto tínhamos que considerar a possibilidade do anticorpo anti-PP4 apresentar reação cruzada com outras fosfatases, em particular a PP2Ac que é da mesma subfamília que a PP4. A disponibilidade em nosso laboratório da subunidade catalítica da PP2A (DdPP2Ac) purificada a partir de extratos de *D. discoideum* (Barroso, 1996) possibilitou a verificação da especificidade do anticorpo comercial utilizado. Assim, submetemos a SDS-PAGE, em triplicata, amostras de extrato total de células vegetativas, DdPP2Ac purificada e marcadores de massa molecular. Após a eletroforese um terço do gel foi recortado e corado pelo método da prata para a visualização da quantidade das amostras aplicadas. Os dois terços restantes foram transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados separadamente com o anti-PP4c comercial e com um anticorpo policlonal anti-PP2Ac gentilmente cedido por R. Dottin (Hunter College, New York, USA). Conforme mostrado na figura 19, verificamos que o anti-PP4c não reconhece a PP2Ac purificada. Este resultado portanto confirma a especificidade da detecção da PP4c mostrada na figura 18A.

Figura 17. Análise dos níveis de mRNA da PP4c ao longo do ciclo de vida de *D. discoideum* através de RT-PCR. Nos géis de agarose 1% submetidos a *Southern blot*, foram aplicadas amostras dos produtos de RT-PCR obtidos a partir de 1 μ g de RNA total extraído de células de *D. discoideum* coletadas durante o crescimento exponencial (V) e nos tempos indicados após iniciada a carência nutricional (fase de desenvolvimento). Após 8 horas as células estavam completamente agregadas (*tight mound*), após 16 horas estavam na fase culminação e após 24 horas estavam como corpos de frutificação. *Southern blot* dos géis foram hibridizados contra sonda do cDNA PP4c. A seta aponta a posição de migração dos fragmentos de tamanho esperado (500pb) relativos a um segmento interno da PP4c amplificado pelos oligonucleotídeos específicos pRTF e pRTR.

Figura 18. Análise dos níveis da expressão da PP4c com anticorpo comercial anti-PP4. Extratos celulares equivalentes a 2×10^6 células de *D. discoideum* coletadas durante o crescimento exponencial (V) e nos tempos indicados após iniciada a carência nutricional (fase de desenvolvimento) foram separados em SDS-PAGE 10%. Foram preparados géis idênticos, sendo que um foi transferido para membrana de nitrocelulose **(A)** e o outro foi corado com Comassie blue **(B)**. A membrana foi em seguida incubada com anticorpo comercial anti-PP4c obtido em cabra, e em seguida com anticorpo secundário conjugado a peroxidase. A detecção dos complexos antígeno-anticorpo foi realizada com o *kit* ECL (Amersham-Pharmacia Biosciences®). A mobilidade eletroforética dos padrões de massa molecular (PM) está indicada à esquerda em kDa. A seta aponta o polipeptídeo de massa molecular aparente ~35kDa reconhecido pelo anticorpo anti-PP4c.

Figura 19. Determinação da especificidade do anticorpo anti-PP4. *Western blots* idênticos foram incubados com anti-PP4 comercial (Santa Cruz Biotechnology®) ou com anti-PP2Ac gentilmente cedido por R. Dottin. Canaleta 1: Extrato total de células de fase de crescimento de *Dictyostelium discoideum*; canaleta 2: Alíquota de 10 μ L de PP2Ac purificada (Barroso, 1996). As setas indicam a posição da PP4c (seta) e a posição da PP2Ac (cabeça de seta). Marcadores de massa molecular encontram-se indicados à esquerda, em kDa.

4.5. Sondagens do possível papel fisiológico da PP4c em *D. discoideum*

Com o objetivo de investigar se a alteração nos níveis da PP4c levariam a algum fenótipo que nos desse pistas do seu papel biológico em *D. discoideum*, planejamos a obtenção de linhagens que expressassem este gene em quantidades aumentadas e de linhagens com o gene da PP4c nocauteado.

Para geração de linhagens superexpressando PP4c, o cDNA DdPP4c foi subclonado no vetor pDNeo.67. Este vetor permite expressão constitutiva, em *D. discoideum*, de genes sob o controle do promotor da actina, hipoteticamente em níveis elevados, sendo que a seleção das linhagens recombinantes é feita por seleção ao antibiótico geneticina, cuja resistência é codificada pelo vetor (da Silva & Klein, 1990). A construção obtida (pDNeo67_PP4c) foi utilizada na transfecção da linhagem AX2 de *D. discoideum* e apenas sete clones resistentes à geneticina foram selecionados.

A taxa de expressão do mRNA da PP4c nos clones selecionados foi avaliada através de *Northern blot* hibridizados contra a sonda radioativa do cDNA da PP4c (figura 20). Observa-se nitidamente a presença de um mRNA na faixa de 1,1 a 1,3 kb que é um tamanho compatível com o mRNA codificador para a PP4c e que está expresso, sobretudo nos clones 3, 5 e 7, em quantidades bem maiores que a linhagem selvagem AX2. Os demais clones apresentam graus variáveis de superexpressão, sendo que a linhagem transfectada com vetor vazio e linhagem AX2 não transfectada, apresentaram níveis equivalentes aos do clone 1. A quantidade de RNA total aplicada no gel é equivalente, como mostrado pelos RNA ribossômicos visualizados na fotografia do gel corado com brometo de etídio imediatamente antes da realização do *Northern blot* (figura 20A).

Para verificarmos se os níveis maiores de expressão do mRNA PP4c observados em alguns dos clones obtidos eram acompanhados de um maior acúmulo da proteína, procedemos a detecção da proteína com anticorpo anti-PP4c comercial através de *immunoblotting*. Como pode ser observado na figura 21, a PP4c está presente em níveis maiores nos clones transfectados com a construção pDNeo67_PP4c em relação aos clones/linhagem controles. Podemos

assim inferir que a maior abundância do mRNA da PP4c foi acompanhada de um aumento na quantidade da proteína correspondente.

Embora tenhamos obtido clones de *D. discoideum* expressando a subunidade catalítica da PP4c em níveis elevados, nenhuma alteração evidente foi observada em seu crescimento em meio líquido e tampouco no desenvolvimento destas células quando realizado em placas contendo *Klebsiella aerogenes*. Contudo, é provável que nesta última condição a expressão aumentada de genes clonados sob o controle do promotor constitutivo de actina 6 no vetor pDNeo.67 seja radicalmente diminuída ou mesmo desligada (Knecht & Loomis 1987). Infelizmente não foi possível analisar o progresso do desenvolvimento destes clones após carenciamento em filtros.

Paralelamente, tentamos realizar a inativação do gene da PP4c por recombinação homóloga. Assim, células AX2 foram transfectadas com o cDNA DdPP4c que teve sua seqüência da região codificadora alterada pela inserção de um cassete codificador para resistência ao antibiótico blastidicina no sítio de restrição da enzima *Xba*I (construção pYlplac128_PP4c-KO). Após três experimentos de transfecção da linhagem AX2, selecionamos um total aproximado de 40 clones resistentes à blastidicina. Embora nenhum deles tenha apresentado qualquer alteração de desenvolvimento detectável, selecionamos 20 clones para análise da ocorrência da recombinação homóloga através de *Southern blot*. Amostras de DNA genômico dos clones resistentes a blastidicina foram digeridas com a enzima de restrição *Cla*I, que nas linhagens AX2 e AX4 libera um fragmento de DNA cromossomal contendo o gene da PP4c com tamanho aproximado de 3kb. No caso da ocorrência da recombinação homóloga esperaríamos aumento do tamanho em 1,4 kb e o fragmento do gene da PP4c passaria a exibir cerca de 4,5 kb. Contudo, em nenhum dos clones avaliados verificamos a ocorrência de recombinação homóloga, ou seja, o fragmento de DNA introduzido inseriu-se em um ou mais pontos do genoma aleatoriamente, em detrimento da recombinação homóloga (dados não apresentados).

A hipótese mais provável para explicar a não detecção de células que tivessem sofrido recombinação homóloga para a PP4c, é que estas células não

viabilizaram a seleção de clones, ou seja, o nocaute desta enzima em *Dictyostelium discoideum* seria letal. Nossa hipótese coincide com os resultados descritos por Helps et al. (1998), que verificaram que, em *Drosophila*, a diminuição dos níveis de PP4 para 25% do original provoca acentuada queda na viabilidade deste organismos. Os mutantes analisados apresentaram divisões celulares assíncronas com o aparecimento de centrossomos livres aleatoriamente, em torno dos quais a nucleação de microtúbulos é mal definida ou mesmo ausente, ou ainda com microtúbulos não conectados ao centrossomo. Nestes mutantes também é reduzida a fluorescência de γ -tubulina, que é essencial ao início do crescimento dos microtúbulos, sugerindo que esta proteína está alterada conformacionalmente ou (re) localizada em outras regiões celulares. Estes dados fornecem fortes evidências da participação da PP4c na nucleação, crescimento e/ou estabilização de microtúbulos. Estes autores também demonstraram que, em *Drosophila*, a PP4c está localizada nos centrossomos.

Nos interessamos por investigar a localização subcelular da PP4c em *D. discoideum*. Uma vez que não dispúnhamos de anticorpos anti-PP4c com sensibilidade adequada para utilização em imunofluorescência, optamos por investigar a localização da PP4c expressa em fusão com proteína GFP (*green fluorescent protein*). Para tal a porção codificadora do cDNA da PP4c foi subclonada no vetor pTX-GFP (gentilmente cedido pelo Dr. Thomas T. Egelhoff, Case Western Reserve University). A construção resultante pTX-GFP_PP4c foi utilizada para transfecção de células de *D. discoideum* da linhagem AX2 e clones resistentes ao antibiótico geneticina foram selecionados e avaliados quanto a expressão da GFP por microscopia ótica de fluorescência.

Como mostrado na figura 22, encontramos a proteína de fusão PP4c-GFP dispersa por todo o citoplasma de células em cultivo em meio líquido na fase de crescimento logarítmico. As células foram observadas após rápida incubação com o corante Hoescht 33258, que cora núcleos. Programas de computador de captura e manipulação de imagens substituíram a fluorescência original de cor azulada pela cor vermelha, permitindo a superposição artificial das imagens observadas na figura 22.

A fluorescência observada nas células transfectadas com a construção contendo a proteína de fusão PP4c-GFP é cerca de 40 vezes mais fraca quando comparada com as células transfectadas apenas com o vetor pTX-GFP (Figura 22). Não sabemos se a menor fluorescência deve-se a um baixo nível de expressão da PP4c-GFP. Deste modo, experimentos adicionais utilizando anticorpo anti-PP4 em *immunoblots* irão esclarecer esta questão. Descartamos a possibilidade de autofluorescência artefactual após a observação de células da linhagem axênica AX2 livre de manipulações genéticas (dados não apresentados).

Considerando a significativa conservação evolutiva da PP4c ao longo da evolução (Brewis & Cohen, 1992), esperávamos encontrar esta enzima em fusão a GFP, localizada no centrossomo, como um pequeno ponto ao lado dos núcleos corados com Hoescht 33342. Os dados apresentados na figura 22 sugerem a presença da proteína de fusão PP4c-GFP dispersa por todo o citoplasma de células em cultivo em meio líquido na fase de crescimento logarítmico, em contraste com a localização no centrossomo observada em células humanas e de *Drosophila melanogaster* (Helps et al., 1998; Cohen, 1997).

Figura 20. Análise dos níveis do mRNA da PP4c em células de *D. discoideum* transfectadas com a construção pDNeo67_PP4c (clones de superexpressão).

20 μ g de RNA total isolado de células da fase de crescimento das linhagens ou clones de interesse foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,25% contendo formaldeído com brometo de etídio (A) que em seguida foi submetido a transferência para membrana de náilon. (B) Autorradiograma resultante da membrana hibridizada contra o cDNA da PP4c marcado radioativamente. Canaletas 1 a 7: número dos clones selecionados da transfecção da linhagem AX2 com a construção pDNeo67_PP4c; C: clone controle selecionado da transfecção da linhagem AX2 com o vetor pDNeo.67 vazio; AX2: linhagem AX2 não transfectada. A seta aponta o mRNA da PP4c.

A.

B.

Figura 21. Análise dos níveis da PP4c em células de *D. discoideum* transfectadas com a construção pDNeo67_PP4c (clones de superexpressão). Extratos celulares equivalentes a 1×10^6 células da fase de crescimento das linhagens ou clones de interesse foram separados em SDS-PAGE 10%. Foram preparados géis idênticos, sendo que um foi corado com Comassie blue **(A)** e o outro foi transferido para membrana de nitrocelulose **(B)**. A membrana foi incubada com anticorpo comercial anti-PP4c obtido em cabra e, em seguida, com anticorpo secundário conjugado a peroxidase. A detecção dos complexos antígeno-anticorpo foi realizada com o *kit* ECL (Amersham-Pharmacia Biosciences®). Canaletas 1 a 7: número dos clones selecionados da transfecção da linhagem AX2 com a construção pDNeo67_PP4c; C: clone controle selecionado da transfecção da linhagem AX2 com o vetor pDNeo.67 vazio; AX2: linhagem AX2 não transfectada. A seta aponta o polipeptídeo de massa molecular aparente ~35kDa reconhecido pelo anticorpo anti-PP4c.

Figura 22: Localização subcelular da PP4c em *Dictyostelium discoideum*.

Células da linhagem AX2 transfectadas com o vetor vazio (A) e com a construção da proteína de fusão GFP-PP4c (B) foram cultivadas em meio líquido sob pressão seletiva codificada no plasmídeo. Alíquotas em fase de crescimento exponencial foram coletadas, coradas com um corante de núcleo e observadas em microscópio de fluorescência convencional. Painéis da esquerda indicam a fluorescência observada da proteína GFP; painéis do centro indicam a fluorescência observada no núcleo; painéis da direita indicam a superposição computadorizada artificial das duas imagens à esquerda.

4.6. Estrutura de genes codificadores para serina/treonina fosfatases presentes no cromossomo 2 de *D. discoideum*

Como apresentado anteriormente, verificamos que o gene da PP4c está localizado no cromossomo 2 de *D. discoideum*, cuja sequência foi elucidada recentemente (Glöckner et al., 2002). Verificamos também a existência de genes de outras serina/treonina fosfatases da família PPP e PPM que haviam sido anotados neste cromossomo, sendo que algumas delas correspondem a enzimas em estudo em nosso grupo de pesquisa. Assim, decidimos realizar uma busca abrangente dos genes codificadores destas enzimas em *D. discoideum*, cujas seqüências estão depositadas em bases públicas de dados contendo seqüências genômicas de *D. discoideum* e ESTs. Esta análise sistemática permitirá o mapeamento do número provável de genes que codificam estas enzimas em *D. discoideum* e também uma análise comparativa entre estes genes e destes com seus ortólogos em outros organismos.

Inicialmente pesquisamos a estrutura dos genes das fosfatases DdPP1c, DdPP6, DdPP2B e DdPP2Ac e DdPP5 no cromossomo 2, utilizando seqüência completa dos respectivos cDNAs para interrogar bases de dados da seqüência do cromossomo 2 através do programa BLAST (Altschul et al., 1997). Encontramos vários segmentos de DNA potencialmente codificadores para as subunidades catalíticas de algumas destas enzimas, exceto para a PP2Ac e a PP5, que certamente localizam-se em outros cromossomos.

Ao interrogarmos bases de dados com a seqüência do cDNA DdPP1c, (GenBank, número de acesso AF020537; Andrioli et al., 2003) verificamos que o gene correspondente não apresenta introns (figura 23), ao contrário do verificado para outras as serina/treonina fosfatases presentes no cromossomo 2. Em uma análise análoga à realizada para o gene da PP4c (figura 16) identificamos um possível TATA *box* localizado 102 bases antes do códon ATG iniciador da PP1c (dados não apresentados).

A PP2B ou calcineurina já foi estudada em *D. discoideum* (Dammann et al., 1996) e seu gene apresenta o maior número de introns e exons dentre os genes de fosfatases que analisamos: 4 exons e 3 introns. Sua estrutura está

apresentada na figura 24 e a sequência do cDNA correspondente está depositada no GenBank sob o número de acesso X97280. De modo similar ao que verificamos para o gene da PP4c (figura16), encontramos em todas as extremidades dos introns as sequências canônicas GTN_xAG. Os programas utilizados para o alinhamento da sequência do cDNA e do DNA genômico e sua posterior análise localizaram um possível TATA *box* funcional distante 237 bases do provável ao códon ATG iniciador (dados não apresentados).

Os cDNAs codificadores da DdPP6 e da DdPP5 nos foram cedidos pelo grupo japonês que realiza o projeto de seqüenciamento de ESTs de *D. discoideum* (*Dictyostelium* cDNA project/University of Tsukuba, Japão; Morio et al., 1998). Estes cDNAs foram completamente seqüenciados e confirmamos a identidade destes cDNAs como codificadores para PP5 e PP6 (dados não apresentados). Ambos contêm a porção codificadora completa da subunidade catalítica desta enzimas. Depositamos a sequência do cDNA DdPP6 no GenBank, sob o número de acesso AF176121, e sua sequência deduzida de aminoácidos apresenta 86% de similaridade e 75% de identidade com a PP6 humana. Já a sequência de aminoácidos deduzida do cDNA da DdPP5 apresenta 66% de similaridade e 49% de identidade com a PP5 humana. A DdPP5 codificada por este cDNA exibe duas repetições do tetratricopeptídeo (TPR) em sua região aminoterminal, um motivo característico de enzimas desta subfamília (Cohen, 1997; Kang et al., 2001; Chinkers, 2001).

Ao alinharmos a sequência do cDNA DdPP6 com o gene correspondente existente no cromossomo 2 verificamos que este gene compreende 3 exons e 2 introns como esquematizado na figura 25. Como esperado, encontramos em todas as extremidades dos introns as sequências canônicas GTN_xAG. Além disso, identificamos dois possíveis TATA *boxes* distantes 370 e 133 bases do ATG iniciador (dados não mostrados).

Como já mencionado, o gene da PP5 não está localizado no cromossomo 2. Contudo, foi possível identificar um segmento de DNA resultante da montagem de sequências menores derivadas de bibliotecas preparadas a partir do DNA genômico de *D. discoideum*, que possui alta similaridade com a sequência do

cDNA DdPP5. Contudo, não foi possível realizar um estudo da estrutura deste gene, dada a insuficiência de dados.

Figura 23. Organização genômica da PP1c de *Dictyostelium discoideum*. O segmento superior indica a porção do cromossomo 2 que contém o gene da PP1c. O segmento inferior corresponde ao cDNA da Dd_PP1c (GenBank número de acesso AF020537). A seta escura indica a fase aberta de leitura correspondente à PP1c. As regiões flangeadoras mais claras indicam extremidades 5' e 3' não traduzidas.

Figura 24. Organização genômica da PP2B de *Dictyostelium discoideum*. O segmento superior indica a porção do cromossomo 2 que contém o gene da PP2B. O segmento inferior corresponde ao cDNA da Dd_PP2B (GenBank número de acesso X97280). A seta escura indica a fase aberta de leitura correspondente à PP2B. As regiões flangeadoras representadas por traços finos indicam extremidades 5' e 3' não traduzidas.

Figura 25. Organização genômica da PP6c de *Dictyostelium discoideum*. O segmento superior indica a porção do cromossomo 2 que contém o gene da PP6c. O segmento inferior corresponde ao cDNA da Dd_PP6c (GenBank número de acesso AF176121). A seta escura indica a fase aberta de leitura correspondente à PP6c. As regiões flangeadoras mais claras indicam extremidades 5' e 3' não traduzidas.

4.7. Comparação das serina-treonina fosfatases de *D. discoideum* e análises filogenéticas preliminares

Como mencionado no item anterior, tivemos também como objetivo nestre trabalho fazer uma análise comparativa entre as fosfatases da família PPP de *D. discoideum*, cujas seqüências estão disponíveis, e destas com suas ortólogas.

Para esta análise recuperamos do GenBank seqüências de aminoácidos de fosfatases da família PPP de organismos representativos de categorias taxonômicas de modo similar ao descrito por Kerk e colaboradores (Kerk et al., 2002). A este conjunto de seqüências adicionamos as seqüências das fosfatases da família PPP de *D. discoideum* disponíveis e citadas anteriormente nesta tese. O domínio catalítico de todas estas PPs foi definido de acordo com Barton et al. (1994), entre os 52^o e o 326^o resíduos no alinhamento de todas as seqüências feito com o programa ClustalX.

O alinhamento obtido, considerando-se apenas o domínio catalítico conservado, foi submetido a análise pelo método *Bootstrap Neighbor Joining* com o objetivo de agruparmos as fosfatases mais relacionadas entre si, e deste modo confirmar a classificação das PPs de *D. discoideum* nas distintas subfamílias. Como mostra o cladograma apresentado na figura 26, as PPs de *D. discoideum* incluídas nesta análise (PP2B, PP2A, PP1, PP4, PP5 e PP6) distribuem-se, como esperado, em suas respectivas subfamílias. Além disso, o padrão de relações entre as subfamílias de PPs que obtivemos com o método *Neighbor Joining* confirma o padrão obtido através de outros métodos de análise, como distância e parcimônia (Cohen, 1997; Kerk et al., 2002). Como mostrado na figura 26, as PP4 e PP6 estão mais relacionadas à PP2A, e estas por sua vez estão mais relacionadas à subfamília das PP1 do que à subfamília das PP2B.

Figura 26. (Continua)

Figura 26. Bootstrap Neighbor Joining das serina/treonina fosfatases derivado do alinhamento de todas as fosfatases de organismos selecionados disponíveis em bancos de dados. Sequências disponíveis no GenBank de serina/treonina fosfatases de organismos selecionados alinhadas com o programa ClustalX em seus parâmetros padrão. O alinhamento múltiplo gerado por este programa foi utilizado para a geração de um agrupamento pelo programa PAUP 4.0 utilizando-se o método de Bootstrap Neighbor Joining após 1000 repetições. Valores de reprodutibilidade acima de 50% estão mostrados junto aos nós do cladograma. A relação filogenética representada pela distância entre cada ramo e sua bifurcação não está em escala. O agrupamento das subfamílias de fosfatases encontra-se indicado à direita da figura. Só há um gene para PP2B de *D. discoideum*, apesar do registro de três transcritos completos.

5. Conclusão

Os mecanismos de fosforilação reversível de proteínas, responsáveis pela regulação de diversos processos celulares, foram inicialmente investigados através do estudo das proteínas quinases. Hipóteses iniciais supunham que para cada serina/treonina proteína quinase deveria existir uma fosfatase específica correspondente, com a função de terminação do sinal recebido e transmitido pela quinase. Nesta hipótese as fosfatases seriam apenas enzimas de atividade constitutiva sujeitas a poucos mecanismos de regulação. De acordo com esta hipótese, a descoberta de novos genes codificadores para serina/treonina fosfatases da família PPP parecia confirmar a existência de um grande número de subunidades catalíticas destas enzimas. O avanço dos estudos, porém, demonstrou que o número de subunidades catalíticas era muito reduzido quando comparado ao número e à diversidade de proteínas quinases, e a regulação da atividade, especificidade e localização subcelular das proteínas fosfatases da família PPP se explica pelo alto número de subunidades regulatórias (Zolnierowicz, 2000).

Diversos organismos têm sido utilizados no estudo das proteína fosfatases, mas devido à necessidade do emprego de técnicas de genética molecular, os microorganismos eucarióticos têm sido amplamente estudados. Neste contexto *Dictyostelium discoideum* destaca-se por apresentar redes de transdução de sinal presentes em mamíferos mas ausentes em leveduras e outros microorganismos rotineiramente utilizados nestes estudos, além de apresentar diversas características favoráveis a experimentos de genética molecular, como curto ciclo de vida, fácil cultivo e disponibilidade de variados métodos para manipulações genéticas.

Ao iniciarmos este trabalho, as proteínas serina/treonina fosfatases eram muito pouco estudadas em *D. discoideum*. Menos de uma dezena de trabalhos relacionados à purificação parcial e caracterização bioquímica destas enzimas encontrava-se disponível na literatura. Van Driel et al. (1985), usando histona e *kemptide* (um heptapeptídeo sintético derivado da enzima piruvato quinase e usado para detecção de atividade de PKA) como substratos, identificaram duas

atividades de histona fosfatase (170 kDa e 520 kDa) e uma *kemptide* fosfatase (230 kDa). Neste mesmo trabalho, os autores relatam a presença de um inibidor, supostamente proteico, capaz de inibir os dois tipos de histona fosfatase. Ferris & Rutherford (1986) identificaram duas atividades de *kemptide* fosfatase e uma de histona fosfatase, com pesos moleculares aparentes (após tratamento que dissocia a subunidade catalítica de prováveis subunidades regulatórias) de 87 kDa, 150 kDa e 55 kDa respectivamente. Posteriormente, Pamula & Wheldrake (1988) identificaram três atividades de histonas fosfatases em células vegetativas. As três atividades foram sensíveis ao inibidor tipo-2, sugerindo que elas seriam fosfatases similares às do tipo-1 de mamíferos. Kuczmarski & Pagone (1986) purificaram parcialmente duas fosfatases específicas para miosina cujas atividades são dependente de Mg^{2+} . Alguns anos depois, Simon e colaboradores demonstraram que *D. discoideum* possui PPs do tipo 2A e 2C com propriedades muito semelhantes às encontradas na maioria das células estudadas até o presente, tais como sensibilidade ao inibidor ácido ocadáico, preferência por diferentes substratos e dependência de íons divalentes (Simon et al., 1992).

A clonagem e o isolamento de segmentos de DNA codificadores para subunidades catalíticas de serina/treonina fosfatases da família PPP em *D. discoideum* foi inicialmente apresentada por Haribabu & Dottin (1991). Utilizando oligonucleotídeos correspondentes às regiões conservadas de fosfatases de mamíferos e de levedura, obtiveram por PCR clones parciais de DNA genômico de *D. discoideum* correspondentes a fragmentos de genes de fosfatases do tipo 1 e tipo 2A (Haribabu & Dottin, 1991). Posteriormente, Dammann e colaboradores clonaram e seqüenciaram completamente o primeiro cDNA codificador para esta classe de enzimas, que correspondia à subunidade catalítica da PP2B. Suas características bioquímicas foram estudadas, demonstrando-se que eram similares a enzimas ortólogas previamente caracterizadas em outros organismos (Dammann et al., 1996).

Neste contexto avaliamos que a clonagem e caracterização de genes codificadores para serina/treonina fosfatases poderia ser importante para a investigação do papel destas enzimas em *D. discoideum*. No trabalho iniciado

juntamente com Luiz Paulo Moura Andrioli, (ex-estudante de Doutorado em nosso grupo de pesquisa), nos propusemos a caracterizar os clones genômicos resultantes da amplificação por PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores derivados de regiões conservadas para fosfatases da família PPP que codificavam PPs ainda desconhecidas em *D. discoideum*.

A análise destes clones revelou o predomínio de amplificação de seqüências das fosfatases do tipo 1, 2A, 2B e 4 (Tabela 1). Seqüências não relacionadas a serina/treonina fosfatases também foram amplificadas, provavelmente devido ao grau de degeneração do par de oligonucleotídeos utilizados. Lembramos que estes não incluíram em sua degeneração seqüências capazes de amplificar fosfatases da subfamília das PP5. Por outro lado, não detectamos nenhum clone contendo a fosfatase do tipo 6, que pertence à mesma subfamília de enzimas que inclui PP2A, PP4 e PP6. Provavelmente o pequeno número de reações de PCR coletadas para a posterior clonagem não favoreceu a amplificação aleatória da PP6. O único grupo de produtos de PCR correspondentes a uma fosfatase ainda não estudada em *D. discoideum*, codificador para um trecho da subunidade catalítica da PP4, foi então utilizado no isolamento de um cDNA contendo a seqüência codificadora completa desta enzima. O gene da PP4c apresenta-se em cópia única e é expresso constitutivamente no crescimento e desenvolvimento de *D. discoideum*. Os níveis proteicos da PP4 acompanham o perfil observado para o transcrito.

Embora tenhamos seqüenciado posteriormente um cDNA que codifica a PP6 de *D. discoideum* (dados não apresentados), decidimos aprofundar nossos estudos com a Dd_PP4c. A disponibilidade do clone de cDNA completo abriu a possibilidade de investigarmos o papel fisiológico desta enzima em *D. discoideum*. Dentre as abordagens possíveis optamos pela sua superexpressão sob um promotor constitutivo e pela tentativa de inativação do seu gene por recombinação homóloga. Na primeira abordagem, embora tenhamos conseguido isolar clones em que a expressão da PP4c encontra-se bastante aumentada em relação a células controles (figuras 20 e 21), não verificamos nenhuma alteração fenotípica detectável nos clones citados. Não encontramos ainda uma explicação satisfatória

para esta ausência de alterações celulares ou do desenvolvimento, uma vez que a PP4c participa de aparatos de transdução de sinal extremamente variados e versáteis, e por conseqüência sujeitos a rígido controle.

A tentativa de superexpressão da PP2A, que pertence à mesma subfamília de enzimas, em células de mamíferos foi infrutífera, devido a um mecanismo não totalmente elucidado que controla rigidamente os níveis desta enzima na célula (Baharians & Schonthal, 1998). Descartamos que este mecanismo ou outro similar esteja impedindo a expressão da PP4c em *D. discoideum* em altas taxas devido aos resultados da figura 21, que mostram inquestionavelmente o aumento marcante dos níveis proteicos desta enzima. Entretanto, devemos considerar a hipótese de que a proteína expressa em maior quantidade não necessariamente encontra-se funcionalmente ativa.

Também não fomos bem-sucedidos na segunda abordagem para investigarmos o papel da PP4c em *D. discoideum*, que previa o nocaute deste gene. Embora tenhamos isolado alguns clones resistentes à blasticidina, eles são o resultado da integração aleatória do cDNA da PP4c, interrompido pelo cassete codificador para a resistência ao antibiótico blasticidina, no genoma de *D. discoideum*, ou seja, os eventos de recombinação não-homóloga foram favorecidos em relação aos de recombinação homóloga. Para explicar estes resultados formulamos a hipótese de que a estrutura do gene da PP4c poderia possuir introns e prejudicar o alinhamento da seqüência de DNA introduzida com a cópia nativa do gene, hipótese posteriormente confirmada com o seqüenciamento completo do cromossomo 2 de *D. discoideum* e demonstrada na figura 15.

Com o objetivo de contornar esta questão e aumentar a chance de obtenção de clones contendo a PP4c nocauteada, fizemos algumas tentativas de construir bibliotecas de DNA genômico de onde pudéssemos obter a cópia nativa do gene para posteriores tentativas adicionais de inativação gênica. Dificuldades metodológicas, entretanto, impediram a construção de bancos contendo a quantidade de clones necessária para a varredura da biblioteca. Dados adicionais da literatura (Helps et al., 1998) sugerem que a PP4 é uma enzima essencial em *Drosophila*. Dada a conservação evolutiva desta classe de enzimas, é possível

que células de *D. discoideum* portando o gene da PP4c nocauteada seriam inviáveis. Este conjunto de fatores fizeram com que abandonássemos a estratégia de inativação gênica.

A disponibilidade de linhagens expressando a PP4c em altas taxas, entretanto, abre possibilidades promissoras para o isolamento de subunidades regulatórias similares às descritas na literatura ou mesmo ainda não descritas. Por exemplo, poderíamos utilizar extratos destas células em experimentos de imunoprecipitação com o anticorpo comercial anti-PP4c com o objetivo de coprecipitar proteínas associadas à PP4c com grande afinidade. Outra alternativa para a descoberta de proteínas que interagem com a PP4c é o sistema do duplo-híbrido, que será discutido mais à frente.

Após os estudos de superexpressão e inativação gênica decidimos investigar a localização subcelular da PP4c, uma vez que em *Drosophila* e em células de mamíferos ela se encontra enriquecida em frações celulares correspondentes ao centrôssomo (Helps et al., 1998). Ao invés de utilizarmos experimentos convencionais de imunocitoquímica, optamos pela expressão da PP4c como proteína de fusão a GFP (*Green Fluorescent Protein*). Esta técnica apresenta a vantagem de possibilitar a verificação da localização subcelular de proteínas *in vivo*. Esperávamos encontrar a proteína de fusão localizada no centrôssomo, como um pequeno ponto ao lado dos núcleos corados, dada a conservação evolutiva da PP4c. Entretanto, encontramos fluorescência dispersa por todo o citoplasma de células em cultivo em meio líquido na fase de crescimento logarítmico.

Elaboramos quatro hipóteses para tentar explicar esta observação inesperada: a primeira hipótese supõe que o equipamento utilizado (microscopia convencional e de fluorescência) seria incapaz de localizar um ponto extremamente pequeno dentro da célula como o centrôssomo; a segunda hipótese supõe que a expressão da PP4c como proteína de fusão em GFP alteraria suas propriedades fisiológicas, interferindo na suposta associação e dissociação da subunidade catalítica com possíveis subunidades reguladoras e/ou localizadoras, deslocando a intensa fluorescência do centrôssomo para uma fraca fluorescência

citoplasmática difusa; a terceira hipótese supõe que os níveis da proteína de fusão são extremamente baixos, insuficientes para deslocar a subunidade catalítica nativa de sua suposta localização original no centróssomo. Nesta hipótese, haveria nas células transfectadas maior quantidade de PP4c nativa que PP4c como proteína de fusão em GFP, e a primeira não teria sido afetada competitivamente pela presença desta última; a quarta hipótese supõe que, em discrepância com outros organismos pesquisados, em *D. discoideum* a PP4c encontra-se predominantemente no citoplasma das células, ainda que apenas nas condições experimentais utilizadas no experimento.

Finalmente, analisamos as relações entre as subfamílias de fosfatases, como mostrado na figura 26. Embora não seja possível, pela limitação metodológica, estabelecer relações evolutivas entre os organismos baseadas no cladograma mostrado na figura 26, pode-se elaborar relações evolutivas entre as subfamílias de enzimas. Assim, verificamos que as fosfatases do tipo 2B divergem das demais subfamílias. Logo em seguida observa-se a divergência da subfamília PP5 das PP1 e PP2A, estas duas últimas agrupadas em um grande grupo. Encontram-se também separadas as enzimas agrupadas e denominadas genericamente como PPZ, que são encontradas apenas em plantas e leveduras, e estão envolvidas na regulação osmótica das células (Yenush et al., 2002). Devido ao fato de terem sido encontradas apenas em leveduras e plantas, acreditamos que pertençam a um ramo evolutivamente distinto, de enzimas especializadas nesta função. Lembramos que a separação da subfamília PP5 das PP1 e PP2A baseia-se no alinhamento múltiplo do domínio catalítico. Portanto, as extensões amino-terminais presentes nas PP5, PP7 e PPEF foram excluídas do alinhamento e não são responsáveis por esta separação observada. Clones parciais de cDNA de *D. discoideum* alinhados com seqüências disponíveis em bancos de dados nos permitiram propor a seqüência da PP5 deste organismo (dados não apresentados), que foi utilizada no alinhamento múltiplo que gerou a figura 26.

Encontramos algumas dificuldades na anotação de diversas fosfatases de *C. elegans*. O alto número de cópias gênicas de enzimas similares a PP1, aliado a constantes mudanças e revisões dos seus acessos no GenBank, faz com que

encaremos os dados obtidos com cautela. Embora as várias enzimas aparentemente do tipo PP1 deste organismo tenham se agrupado, conforme esperado, mais próximas à subfamília PP1, nenhuma delas foi estudada experimentalmente. Várias hipóteses podem ser levantadas, desde a existência de uma nova classe dentro da subfamília PP1 até mesmo a conclusão de que se tratam de erros de anotação, ou ainda que sejam pseudogenes. Este conjunto de dados nos faz concluir que a demonstração experimental da existência destas enzimas se faz necessária para uma classificação mais apurada e para a posterior especulação de suas funções fisiológicas.

Conforme esperado, verifica-se nitidamente a separação da subfamília da PP2A em PP2A propriamente dita, PP4 e PP6 (Cohen, 1997; Kerk et al., 2002). Embora o alinhamento cuidadoso apenas do domínio catalítico exclua extensões amino e carboxi-terminais, estas enzimas se agruparam de forma esperada. Em geral, as enzimas do tipo 2A e 4 possuem uma seqüência mais curta, de cerca de 300 a 310 aminoácidos, e, se associam a uma subunidade estrutural denominada subunidade A. É provável que esta subunidade possa existir, também, para a PP6. Entretanto, por ser uma das fosfatases menos estudadas, esta subunidade ainda não foi descrita experimentalmente. A PP2A tem sido extensamente estudada e relacionada a diversos mecanismos de transdução de sinal, enquanto que a função da PP6 tem sido, até o momento, muito pouco investigada. A PP4 tem atraído mais atenção após o reconhecimento da sua importância na participação dos processos envolvidos na divisão celular (Helps et al., 1998).

Dentre as possibilidades de continuação do trabalho que relatamos nesta tese, destacamos a possibilidade de utilização da Dd_PP4c na varredura de uma biblioteca de cDNA em vetores apropriados para a técnica do sistema de duplo híbrido em leveduras. A utilização desta metodologia tornaria possível a busca de subunidades estruturais ou regulatórias da PP4c que modulem a atividade da PP4c em *D. discoideum*. A expressão heteróloga da Dd_PP4c também não está descartada. O cDNA já foi clonado no vetor pET21b (Novagen®) e encontra-se disponível para estes experimentos, cujos objetivos consistem na demonstração

da atividade enzimática da PP4c e sua sensibilidade a inibidores, notadamente o ácido ocadáico.

6. Bibliografia

- Adler K., Gerisch, G., von Hugo, U., Lupas, A. & Schweiger, A. (1996) Classification of tyrosine kinases from *Dictyostelium discoideum* with two distinct, complete or incomplete catalytic domains. FEBS Lett. 395 (2-3): 286-292.
- Aggen, J.B., Nairn A.C., & Chamberlin R. (2000) Regulation of protein phosphatase-1. Chem Biol. 7(1): R13-23.
- Alessi, D.R., Street, A.J., Cohen, P. & Cohen, P.T. (1993) Inhibitor-2 functions like a chaperone to fold three expressed isoforms of mammalian protein phosphatase-1 into a conformation with the specificity and regulatory properties of the native enzyme. Eur. J. Biochem. 213(3):1055-1066.
- Allen, P.B., Kwon, Y.G., Nairn, A.C., & Greengard, P. (1998) Isolation and characterization of PNUTS, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit. J. Biol. Chem. 273(7):4089-4095.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402
- Andrioli, L. P. M. (1999). Clonagem e caracterização da serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1) de *Dictyostelium discoideum*. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- Andrioli, L. P. M., Zaini, P. A., Viviani, W. & da Silva, A. M. (2003). The *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase-1 catalytic subunit exhibits distinct biochemical properties. Biochem. J., no prelo.
- Aubry, L. & Firtel, R. (1999) Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15: 469-517.
- Aubry, L. & Firtel, R.A. (1998) Spalten, a protein containing Galpha-protein-like and PP2C domains, is essential for cell-type differentiation in *Dictyostelium*. Genes Dev. 12 (10): 1525-1538.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D. & Seidman, J.G. et al.. (1995). Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.
- Baharians, Z. & Schonthal, A.H. (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. J. Biol. Chem. 273 (30): 19019-19024.
- Baldauf, S.L. & Doolittle, W.F. (1997) Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 12007- 12012.
- Baldauf, S.L., Palmer, J.D. & Doolittle, W.F. (1996) The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 7749-7754.
- Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I. & Doolittle, W.F. (2000) A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. Science 290: 972-977.
- Barford, D. (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. Trends Biochem. Sci. 21 (11): 407-412.
- Barroso, A. S. Dissertação de Mestrado. (1996). Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- Barton, G.J., Cohen, P.T. & Barford, D. (1994) Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. Eur. J. Biochem. 220 (1): 225-237.
- Beullens M., Stalmans W. & Bollen M. (1996) Characterization of a ribosomal inhibitory polypeptide of protein phosphatase-1 from rat liver. Eur. J. Biochem. 239(1):183-189.
- Bollen, M. (2001) Combinatorial control of protein phosphatase-1. Trends Biochem Sci. 26(7): 426-431.
- Bonner, J.T. (1967) The cellular slime molds. Princenton University Press, Princenton, N.J.
- Brewis, N.D. & Cohen, P.T. (1992) Protein phosphatase X has been highly conserved during mammalian evolution. Biochim. Biophys. Acta. 1171(2): 231-233.

- Brewis, N.D., Street, A.J., Prescott, A.R. & Cohen, P.T. (1993) PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J.* 12(3): 987-996.
- Cegielska, A., Shaffer, S., Derua, R., Goris, J. & Virshup, D.M. (1994) Different oligomeric forms of protein phosphatase 2A activate and inhibit simian virus 40 DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 14 (7): 4616-4623.
- Chen, M.Y., Insall, R.H. & Devreotes, P.N. (1996) Signaling through chemoattractant receptors in *Dictyostelium*. *Trends Genet.* 12 (2): 52-57.
- Chinkers M. (2001) Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol Metab.* 12(1): 28-32.
- Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 453-508.
- Cohen, P. (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem. Sci.* 17(10): 408-413.
- Cohen, P., Klumpp, S. & Schelling, D.L. (1989a) An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett.* 250 (2): 596-600.
- Cohen, P., Schelling, D.L. & Stark, M.J. (1989b) Remarkable similarities between yeast and mammalian protein phosphatases. *FEBS Lett.* 250 (2): 601-606.
- Cohen, P.T. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.* 22 (7): 245-251.
- Cohen, P.T. (2002) Protein phosphatase 1 - targeted in many directions. *J Cell Sci.* 115 (Pt 2): 241-256.
- Connor, J.H., Frederick, D., Huang, H., Yang, J., Helps, N.R., Cohen, P.T., Nairn, A.C., DePaoli-Roach, A. A., Tatchell, K. & Shenolikar, S. (2000) Cellular mechanisms regulating protein phosphatase-1. A key functional interaction between inhibitor-2 and the type 1 protein phosphatase catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 275(25): 18670-18675.

- da Cruz e Silva, O.B., da Cruz e Silva, E.F. & Cohen, P.T. (1988) Identification of a novel protein phosphatase catalytic subunit by cDNA cloning. FEBS Lett. 242 (1): 106-110.
- da Silva, A. M. & Klein, C. (1990) Cell adhesion in transformed *D. discoideum* cells: expression of gp80 and its biochemical characterization. Dev. Biol. 140 (1): 139-148.
- da Silva, A.M., Zapella, P.D., Andrioli, L.P., Campanha, R.B., Fiorini, L.C., Etchebehere, L.C., da Costa-Maia, J.C. & Terenzi, H.F. (1999) Searching for the role of protein phosphatases in eukaryotic microorganisms Braz. J. Med. Biol. Res. 32: 835-839.
- Dammann, H., Hellstern, S., Husain, Q. & Mutzel, R. (1996) Primary structure, expression and developmental regulation of a *Dictyostelium calcineurin* A homologue. Eur. J. Biochem. 238 (2): 391-399.
- Darnell, J.E, Lodish, H. & Baltimore, D. (1990) Molecular cell biology. Scientific American Books, Inc., New York.
- Darnell, J.E. Jr. (1997) STATs and gene regulation. Science. 277 (5332): 1630-1635.
- Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D. (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. EMBO J. 16; 15(24): 6798-6809.
- Denu, J.M., Stuckey, J.A., Saper, M.A. & Dixon, J.E. (1996) Form and function in protein dephosphorylation. Cell 87(3): 361-364.
- Devreotes, P. (1989) *Dictyostelium discoideum*: a model system for cell-cell interactions in development. Science 245: 1054-1058.
- Early, A., Gamper, M., Moniak, J., Kim, E., Hunter, T., Williams, J.G. & Firtel, R.A. (2001) Protein tyrosine phosphatase PTP1 negatively regulates *Dictyostelium* STATa and is required for proper cell-type proportioning. Dev. Biol. 232 (1): 233-245.
- Egelhoff, T.T., Titus, M.A., Manstein, D.J., Ruppel, K.M. & Spudich, J.A. (1991) Molecular genetic tools for study of the cytoskeleton in *Dictyostelium*. Methods Enzymol. 196: 319-334.

- Egloff M.P., Johnson D.F., Moorhead G., Cohen P.T., Cohen P., & Barford D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J.* 16(8):1876-1887.
- Faux, M.C. & Scott, J.D. (1996) More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem. Sci.* 21 (8): 312-315.
- Favre, B., Zolnierowicz, S., Turowski, P., & Hemmings, B.A. (1994) The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *J. Biol. Chem.* 269 (23): 16311-16317.
- Ferris, D.K., Rutherford, C.L. (1986) Chromatographic resolution of soluble and particulate protein phosphatases from *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 248 (1): 10-20.
- Firtel, R.A. & Bonner, J. (1972) Characterization of the genome of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* 66: 339-361.
- Firtel, R.A. (1995) Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. *Genes & Develop.* 9: 1427-1444.
- Fukuzawa, M., Araki, T., Adrian, I. & Williams, J.G. (2001) Tyrosine phosphorylation-independent nuclear translocation of a *Dictyostelium* STAT in response to DIF signaling. *Mol. Cell.* 2001 7 (4): 779-788.
- Gamper, M., Howard, P.K., Hunter, T. & Firtel, R.A. (1996) Multiple roles of the novel protein tyrosine phosphatase PTP3 during *Dictyostelium* growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 16 (5): 2431-2444.
- Gietz, R.D. & Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* 74 (2): 527-534.
- Glöckner, G., Elchinger, L., Szafrabski, K., Pachebat, J.A. & Bankler, A.T. et al. (2002) Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 418:79-85.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W. & Dujon, B. et al. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546; 563-567.
- Gross, J.D. (1994) Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiol. Rev.* 58: 330-351.

- Groves, M.R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A. & Barford, D. (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* 96 (1): 99-110.
- Hanks S.K., & Hunter T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9 (8): 576-596.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241 (4861): 42-52.
- Haribabu, B. & Dottin, R.P. (1991) Homology cloning of protein kinase and phosphoprotein phosphatase sequences of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genetics* 12, 45-49.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Harwood, A.J., Plyte, S.E., Woodgett, J., Strutt, H. & Kay, R.R. (1995) Glycogen synthase kinase 3 regulates cell fate in *Dictyostelium*. *Cell* 80 (1): 139-148.
- Hastie, C.J. & Cohen, P.T. (1998) Purification of protein phosphatase 4 catalytic subunit: inhibition by the antitumour drug fostriecin and other tumour suppressors and promoters. *FEBS Lett.* 431(3):357-361.
- Hastie, C.J., Carnegie, G.K., Morrice, N. & Cohen, P.T. (2000) A novel 50 kDa protein forms complexes with protein phosphatase 4 and is located at centrosomal microtubule organizing centres. *Biochem. J.* 347 Pt 3: 845-855.
- Hellstern, S., Dammann, H., Husain, Q. & Mutzel, R. (1997) Overexpression, purification and characterization of *Dictyostelium* calcineurin A. *Res Microbiol.* 148 (4): 335-343.
- Helps, N.R., Brewis, N.D., Lineruth, K., Davis, T., Kaiser, K. & Cohen P.T. (1998) Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 10): 1331-1340.

- Hemmings, B.A., Adams-Pearson, C., Maurer, F., Muller, P., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J., & Stone, S.R. (1990) Alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry*. 29(13):3166-3173.
- Hendrix, P., Turowski, P., Mayer-Jaekel, R.E., Goris, J., Hofsteenge, J., Merlevede, W. & Hemmings, B.A. (1993) Analysis of subunit isoforms in protein phosphatase 2A holoenzymes from rabbit and *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* 268 (10): 7330-7337.
- Higgins D.G., Thompson, J.D. & Gibson, T.J. (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* 266: 383-402.
- Horn, F. & Gross, J. (1996) A role for calcineurin in *Dictyostelium discoideum* development. *Differentiation* 60: 269-275.
- Howard, P.K., Gamper, M., Hunter, T., & Firtel, R. A. (1994) Regulation by protein-tyrosine phosphatase PTP2 is distinct from that by PTP1 during *Dictyostelium* growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5154-5164.
- Howard, P.K., Sefton, B.M. & Firtel, R.A. (1992) Analysis of a spatially regulated phosphotyrosine phosphatase identifies tyrosine phosphorylation as a key regulatory pathway in *Dictyostelium*. *Cell* 71: 637-647.
- Hu, M.C., Tang-Oxley, Q., Qiu, W.R., Wang, Y.P., Mihindukulasuriya, K.A., Afshar, R. & Tan, T.H. (1998) Protein phosphatase X interacts with c-Rel and stimulates c-Rel/nuclear factor kappaB activity. *J. Biol. Chem.* 273(50): 33561-33565.
- Hubbard, M.J. & Cohen, P. (1989) Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates. *Eur. J. Biochem.* 186(3):711-716.
- Hubbard, M.J. & Cohen, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 18 (5): 172-177.
- Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling *Cell* 80 (2): 225-236.

- Ihle, J.N. (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell*. 84(3):331-334.
- Janssens, V. & Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* 353 (Pt 3): 417-439.
- Jeanmougin F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci.* 23 (10): 403-405.
- Kamibayashi, C., Estes, R., Lickteig, R.L., Yang, S.I., Craft, C. & Mumby, M.C. (1994) Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits. *J. Biol. Chem.* 269 (31): 20139-20148.
- Kang, H., Sayner, S.L., Gross, K.L., Russell, L.C. & Chinkers, M. (2001) Identification of amino acids in the tetratricopeptide repeat and C-terminal domains of protein phosphatase 5 involved in autoinhibition and lipid activation. *Biochemistry*. 40 (35): 10485-10490.
- Kawata, T., Shevchenko, A., Fukuzawa, M., Jermyn, K.A., Totty, N.F., Zhukovskaya, N.V., Sterling, A.E., Mann, M. & Williams, J.G. (1997) SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Cell*. 89 (6): 909-916.
- Kay, R.R. & Williams, J. (1999) The *Dictyostelium* genome project: an invitation to species hopping. *Trends Genet.* 15:294-297.
- Kay, R.R. (1997) *Dictyostelium* development: lower STATs. *Curr. Biol.* 7 (11): R723-R725.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D. W., Barsam, B., Veretnik, S. & Gribskov, M. (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129 (2): 908-25.
- Kessin, R.H. & Campagne, M. van L. (1992) The development of a social amoeba. *Am. Sci.* 80: 556- 565.
- Kim, L., Liu, J. & Kimmel, A.R. (1999) The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell*. 99 (4): 399-408.

- Kimmel, A.R. & Firtel, R.A. (1983) Sequence organization in *Dictyostelium*: unique structure at the 5'-ends of protein coding genes. *Nucleic Acids Res.* 11 (2): 541-552
- Kloeker, S. & Wadzinski, B.E. (1999) Purification and identification of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase 4. *J. Biol. Chem.* 274(9): 5339-5547.
- Kloeker, S., Bryant, J.C., Strack, S., Colbran, R.J. & Wadzinski, B.E. (1997) Carboxymethylation of nuclear protein serine/threonine phosphatase X. *Biochem. J.* 327 (Pt 2): 481-486.
- Knecht, D. A. & Loomis, W. F. (1987) Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science.* 236(4805): 1081-1086.
- Kuczmarski, E.R. & Pagone, J. (1986) Myosin specific phosphatases isolated from *Dictyostelium discoideum*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 7 (6): 510-516.
- Kuspa, A. & Loomis, W.F. (1996) Ordered yeast artificial chromosome clones representing the *Dictyostelium discoideum* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5562-5566.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 226: 680-685.
- Levi, S., Polyakov, M. & Egelhoff, T.T. (2000) Green fluorescent protein and epitope tag fusion vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid.* 44: 231-238.
- Loomis, W.F. & Kuspa, A. (1997) The genome of *Dictyostelium* – A model System for cell and developmental biology. Chapter 2: 15-30. *apud Dictyostelium - A model system for cell and molecular biology.* Eds. Y.Maeda, K.Inouye & I. Takeuchi. Universal Academy Press Inc., Tóquio. 207-218.
- Loomis, W.F. & Smith, D.W. (1995) Consensus phylogeny of *Dictyostelium*. *Experientia* 51: 1110-1115.
- Loomis, W.F. & Söderbom, F. (1998) Cell-cell signaling during *Dictyostelium* development. *Trends Microb.* 6: 402-406.
- Loomis, W.F. (1982) Development in *Dictyostelium discoideum*. Academic Press. New York.

- Loomis, W.F. (1998) Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (3): 684-694.
- MacKintosh, C. & Cohen, P. (1989) Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants. Biochem. J. 262 (1): 335-339.
- Maeda, Y. (1997) Cellular and molecular mechanism of the transition from growth to differentiation in *Dictyostelium* cells. *apud Dictyostelium - A model system for cell and molecular biology*. Eds. Y.Maeda, K.Inouye & I. Takeuchi. Universal Academy Press Inc., Tóquio. 207-218.
- Mayer-Jaekel, R.E. & Hemmings, B.A. (1994) Protein phosphatase 2A - A 'Menage a trois' Trends Cell Biol. 4: 287-291.
- McCarty, D.R., & Chory, J. (2000) Conservation and innovation in plant signaling pathways. Cell 103 (2): 201-209.
- Morio, T., Urushihara, H., Saito, T., Ugawa, Y., Mizuno, H., Yoshida, M., Yoshino, R., Mitra, B.N., Pi, M., Sato, T., Takemoto, K., Yasukawa, H., Williams, J., Maeda, M., Takeuchi, I., Ochiai, H. & Tanaka, Y. (1998) The *Dictyostelium* developmental cDNA project: generation and analysis of expressed sequence tags from the first-finger stage of development. DNA Res. 5 (6): 335-340.
- Murphy, M.B. & Egelhoff, T.T. (1999) Biochemical characterization of a *Dictyostelium* myosin II heavy-chain phosphatase that promotes filament assembly. Eur. J. Biochem. 264 (2): 582-590.
- Murphy, M.B., Levi, S.K. & Egelhoff, T.T. (1999) Molecular characterization and immunolocalization of *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase 2A. FEBS Lett. 456 (1): 7-12.
- Mutzel, R. (1995) Molecular biology, growth and development of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. Experientia 51: 1103-1109.
- Nimmo G.A. & Cohen P. (1978) The regulation of glycogen metabolism. Phosphorylation of inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle, and its interaction with protein phosphatases-III and -II. Eur. J. Biochem. 87(2):353-65.
- Nuckolls, G.H., Oshero, N., Loomis, W.F. & Spudich, J.A. (1996) The *Dictyostelium* dual-specificity kinase splA is essential for spore differentiation. Development. 122 (10): 3295-3305.

- Pamula, F. & Wheldrake, J.F. (1988) Properties and developmental regulation of the protein phosphatases in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Int.* 17 (3): 535-543.
- Park I.K., Roach, P., Bondor, J., Fox, S.P. & DePaoli-Roach, A.A. (1994) Molecular mechanism of the synergistic phosphorylation of phosphatase inhibitor-2. Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of inhibitor-2. *J. Biol. Chem.* 269 (2): 944-954.
- Plyte, S.E., O'Donovan, E., Woodgett, J.R. & Harwood, A.J. (1999) Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is regulated during *Dictyostelium* development via the serpentine receptor cAR3. *Development.* 126 (2): 325-333.
- Puta, F. & Zeng, C. (1998) Blastocidin resistance cassette in symmetrical polylinkers for insertional inactivation of genes in *Dictyostelium*. *Folia Biol. (Praha)* 44: 185-188.
- Ramalingam, R., Shaw, D.R. & Ennis, H.L. (1993) Cloning and functional expression of a *Dictyostelium discoideum* protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 268 (30): 22680-22685.
- Ramponi, G. & Stefani, M. (1997) Structure and function of the low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. *Biochim. Biophys Acta*, 1341: 137-156.
- Schillace, R.V. & Scott, J.D. (1999) Association of the type 1 protein phosphatase PP1 with the A-kinase anchoring protein AKAP220. *Curr. Biol.* 9(6):321-324.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Shenolikar, S. (1994) Protein serine/threonine phosphatases - new avenues for cell regulation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 55-86.
- Sheppeck JE 2nd, Gauss CM, Chamberlin AR. (1997) Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg Med Chem.* 5(9):1739-50.
- Simon, M.N., Driscoll, D., Mutzel, R., Part, D., Williams, J. & Veron, M. (1989) Overproduction of the regulatory subunit of the cAMP-dependent protein

kinase blocks the differentiation of *Dictyostelium discoideum*. EMBO J. 8 (7): 2039-2043.

- Simon, M. N., Winckler, T., Mutzel, R., Véron, M. & Maia, J.C.C. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 1142-1151.
- Skinner J.A. & Saltiel, A.R. (2001) Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targeting subunit of protein phosphatase 1. Biochem. J. 356 (Pt 1): 257-267.
- Sontag, E. (2001) Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. Cell Signal. 13 (1): 7-16.
- Souza, G. M., Simoes, A. C. Q., Oliveira, K. C., Garay, H. M., Fiorini, L. C., Gomes, F. S., Yutaka Nishiyama-Junior, M. & da Silva, A. M. (2001) The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. Genet. Mol. Biol. 24 (1-4): 25-34.
- Stone, S.R., Hofsteenge, J., & Hemmings B.A. (1987) Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. Biochemistry. 26 (23): 7215-7220.
- Sussman, M. (1987) Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. Methods Cell Biol. 28: 9-29.
- Sutoh, K. (1993) A transformation vector for *Dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr. Plasmid. 1993 Sep;30(2):150-4
- Swanson, R.V., Alex, L.A. & Simon, M.I. (1994) Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. Trends Biochem. Sci. 19 (11): 485-490.
- Swofford, D. L. (1999) PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) V. 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Taminato, A., Bagattini, R., Gorjao, R., Chen, G., Kuspa, A. & Souza, G.M. (2002) Role for YakA, cAMP, and protein kinase A in regulation of stress responses of *Dictyostelium discoideum* cells. Mol. Biol. Cell 13 (7): 2266-2275.

- Tamrakar, S. & Ludlow, J.W. (2000) The carboxyl-terminal region of the retinoblastoma protein binds non-competitively to protein phosphatase type 1alpha and inhibits catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 275(36):27784-27789.
- Tan, J.L. & Spudich, J.A. (1990) Developmentally regulated protein-tyrosine kinase genes in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol.* 10 (7): 3578-3583.
- Turowski, P., Fernandez, A., Favre, B., Lamb, N.J. & Hemmings, B. A. (1995) Differential methylation and altered conformation of cytoplasmic and nuclear forms of protein phosphatase 2A during cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 129 (2): 397-410.
- Van Driel, R., Arents, J. C., Otte, A. P. & Bernstein, R. L. (1985) Protein phosphatases in developing *Dictyostelium discoideum* cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 847: 122-127.
- Van Eynde, A., Wera, S., Beullens, M., Torrekens, S., Van Leuven, F., Stalmans, W. & Bollen, M. (1995) Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing. *J. Biol. Chem.* 270 (47): 28068-28074.
- Van Haastert, P.J. & Devreotes, P. N. (1993) Biochemistry and genetics of sensory transduction in *Dictyostelium*. *apud* Signal Transduction prokaryotic and simple eukaryotic systems. Ed. J.Kurjan & B.L.Taylor. Academic Press.
- Villafranca, J.E., Kissinger, C.R. & Parge, H.E. (1996) Protein serine/threonine phosphatases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (4): 397-402.
- Weeks G. (2000) Signalling molecules involved in cellular differentiation during *Dictyostelium* morphogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 3 (6): 625-630.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M. & Lyne, R. et al. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415: 871-880.
- Wurgler-Murphy, S.M. & Saito, H. (1997) Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem. Sci.* 22 (5):172-176.
- Yamawaki, K., Ito, M., Machida, H., Moriki, N., Okamoto, R., Isaka, N., Shimpo, H., Kohda, A., Okumura, K., Hartshorne, D.J. & Nakano, T. (2001) Identification of human CPI-17, an inhibitory phosphoprotein for myosin phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285(4):1040-1045.

- Yenush L., Mulet, J.M., Arino, J. & Serrano, R. (2002) The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* 21(5): 920-929.
- Zolnierowicz, S. (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 60 (8): 1225-1235.