UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Caracterização molecular de INc-1, um inibidor da proteína
fosfatase do tipo 1 de *Neurospora crassa*

Daniela Beton

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva

São Paulo, 16 de agosto de 2004

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

Beton, Daniela
B564c Caracterização molecular de INc-1, um inibidor da
proteína fosfatase do tipo I de *Neurospora crassa* / Daniela
Beton. -- São Paulo, 2004.
96p.

Dissertação (mestrado) -- Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Silva, Aline Maria da

I. Proteína : Bioquímica 2. Biologia molecular
I. T. II. Silva, Aline Maria da, orientador.

574.19245 CDD

“Caracterização molecular de INc-1, um inibidor da proteína fosfatase do tipo 1 de neurospora crassa”

DANIELA BETON

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. ALINE MARIA DA SILVA
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. SANDRO ROBERTO MARANA
IQ – USP

Profa. Dra. MARIA CÉLIA BERTOLINI
IQ – UNESP – ARARAQUARA

SÃO PAULO
01 de OUTUBRO 2004

Dedico...

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

ÍNDICE

Agradecimentos.....	4
Resumo.....	6
Abstract	7
Abreviaturas.....	8
1. Introdução	10
1.1. Características principais das serina/treonina fosfatases.....	12
1.2. Estrutura e regulação da serina/treonina fosfatase do tipo-1 (PP1).....	13
1.3. Proteínas que interagem com PP1c.....	15
1.4. Inibidores termoestáveis da PP1c.....	18
1.4.1. Inibidor-1 e DARPP-32.....	18
1.4.2. Inibidor-2.....	20
1.4.3. Outros inibidores.....	24
1.5. Papel fisiológico da PP1.....	26
1.6. Fosforilação reversível de proteínas em <i>Neurospora crassa</i>	29
1.6.1. Características do INc-1 de <i>N.crassa</i>	32
2. Objetivos	33
3. Procedimentos Experimentais.....	37
3.1. Manutenção, cultivo e obtenção de células de <i>N.crassa</i>	37
3.2. Procedimentos para manipulação de bactérias	38
3.2.1. Manutenção e cultivo de bactérias.....	38
3.2.2. Preparo de bactérias competentes para transformação por eletroporação.....	39
3.2.3. Transformação de bactérias por eletroporação e seleção dos clones transformantes.....	39
3.3. Procedimentos de manipulação e análise de DNA e RNA.....	40
3.3.1. Minipreparação de RNA total de <i>N. crassa</i>	40
3.3.2. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído.....	41
3.3.3. Descrição dos oligonucleotídeos.....	41
3.3.4. PCR e RT-PCR.....	42
3.3.5. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	43
3.3.6. Eluição de fragmentos de DNA transferidos para papel <i>Whatman DE81</i> ..	43
3.3.7. Clonagem de INc-1L e INc-1 em vetor de expressão.....	44
3.3.8. Métodos de preparação de plasmídeos	45
3.3.8.1. Minipreparação pelo método de lise alcalina.....	45
3.3.8.2. Preparação em larga escala.....	46
3.3.9. Sequenciamento automatizado de DNA.....	47
3.3.10. Hibridização de DNA e RNA com sonda radioativa.....	48
3.3.10.1. Preparação de sonda radioativa.....	48
3.3.10.2. Transferência de DNA para membranas de náilon (<i>Southern blot</i>).....	48
3.3.10.3. Transferência de RNA para membranas de náilon (<i>Northern blot</i>).....	49
3.3.10.4. Hibridização de <i>Southern blots</i> e <i>Northern blots</i>	49
3.4. Procedimentos para manipulação e análise de proteínas.....	50
3.4.1.1. Avaliação da solubilidade de INc-1L e INc-1 recombinantes	51
3.4.1.2. Purificação do INc-1L e INc-1 a partir da fração solúvel.....	52
3.4.2. Expressão da subunidade catalítica da PP1 (PP1c) de <i>N. crassa</i>	52

3.4.3. Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	53
3.4.4. Dosagem de proteínas.....	54
3.4.5. Ensaio enzimáticos para medida da atividade de fosforilase fosfatase....	54
3.4.5.1. Marcação de fosforilase a	54
3.4.5.2. Ensaio das atividades de PP1c e INc-1 recombinantes.....	55
4. Resultados e Discussão	56
4.1. Clonagem da sequência codificadora de INc-1L a partir de um clone genômico de <i>N.crassa</i>	56
4.2. Expressão de INc-1L em bactérias	56
4.3. Purificação do INc-1L recombinante	63
4.4. Verificação da atividade inibidora de INc-1L recombinante sobre a PP1c recombinante de <i>N. crassa</i>	63
4.5. Identificação de um íntron no gene do INc-1.....	68
4.6. Clonagem da sequência codificadora de INc-1 a partir de uma biblioteca de cDNA de <i>N.crassa</i> e obtenção de INc-1 recombinante.....	70
4.7. Purificação do INc-1 recombinante e verificação de sua atividade inibidora sobre a PP1c recombinante de <i>N. crassa</i>	71
4.8. Análise da expressão do gene de INc-1 de <i>N. crassa</i>	78
4.9. Discussão final	81
5. Bibliografia	83
<i>Curriculum vitae</i>	96

Agradecimentos

Agradeço,

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

Ao Prof. Dr. Héctor Francisco Terenzi, que gentilmente nos forneceu células de *N. crassa* nas diferentes fases de crescimento e pelas valiosas sugestões.

À Profa. Dra. Maria Célia Bertolini, que gentilmente nos cedeu a biblioteca de cDNA micelial de *N. crassa* e amostras de RNA das diferentes fases de crescimento de *N. crassa*.

Ao Prof. Dr. Paulo Lee Ho, pelo fornecimento da cepa bacteriana BL21(DE3)PLysS e pelo vetor de expressão pAE.

Aos Profs. Drs. Suely Lopes Gomes, Gláucia Mendes Souza e Sergio Verjovski-Almeida pela cessão de aparelhos em seus respectivos laboratórios.

Ao Prof. Dr. Bayardo Batista Torres, a quem muito admiro, pelo incentivo.

A querida amiga Dra. Fabiana Maria de Almeida pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

Às amigas Daniela Gonzalez e Juliana Sousa pelo convívio, opiniões, discussões e amizade.

Às amigas Michelle (e Eduardo) e Raquel pela ajuda, carinho e amizade.

Ao amigo Luiz Fernando pelo apoio e convívio divertido.

À Marly pelo apoio técnico, dedicação e alegrias compartilhadas neste período.

Ao Alexandre e à Yvone pelo apoio técnico e, principalmente, pela amizade.

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

Aos companheiros e amigos do Bloco 12, Cristina, Humberto, Karina, Rafaela, Rita, Silvia, Luciano, Tie, Luci, Sandra, Regina, Alessandra, Flávia R., Flávia T., Luciana, Rodrigo, Profa. Dra. Clélia Terra, Prof. Dr. Walter Terra, Adriana, Alcides, Alexandre, Ana, Ciça, Cakes, Plínio, Prof. Dr. Sandro Marana, Paloma, Lucas, Fernando, Luiza, Flávio, Abimael, Juliana, Ana Cláudia, Ana

Paula, Apuã, Camille, Ricardo, Karen, Denise, Helder, Eduardo, Jefferson, Milton, Renato, Rodrigo, Júlio, Daniela e Lídia.

Aos demais amigos do Instituto de Química, André, Leonardo (B9), Alexandre, Fernando, Renata, Luiz, Elaine, Mike, Leonardo (B3), Juliana, Celso, Camila, Cássio e Luciana.

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

A FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

A proteína serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1) é a principal serina/treonina fosfatase envolvida na regulação de diversos processos tais como metabolismo, crescimento e divisão celular, síntese protéica e processamento de RNA. A holoenzima PP1 é constituída de uma subunidade catalítica conservada (PP1c) e subunidades reguladoras variáveis. Em mamíferos já foram identificados dezenas de polipeptídeos que associam-se direta ou indiretamente a PP1c, gerando holoenzimas com localizações celulares e especificidades distintas. Entre as proteínas que se associam a PP1c, muitas têm função inibitória como o inibidor-1 (I-1) e o inibidor-2 (I-2). A partir de extratos de micélios de *Neurospora crassa* foi purificada uma proteína, denominada INc-1, que atua *in vitro* como inibidor da atividade de fosforilase fosfatase de PP1c e constitui-se no primeiro exemplo de subunidade reguladora da PP1 descrito em fungos filamentosos. INc-1 apresenta diversas características bioquímicas comuns ao I-2 de mamíferos. Seqüências parciais de aminoácidos de três fragmentos proteolíticos obtidos de INc-1 permitiram a identificação de uma ORF (fase aberta de leitura) no genoma de *N. crassa* que provavelmente codifica INc-1. A análise dessa ORF mostrou que a seqüência de aminoácidos do INc-1 é similar a do I-2, especialmente em regiões supostamente envolvidas em sua interação com a PP1c. Neste trabalho descrevemos a clonagem e a expressão em bactérias da seqüência codificadora de INc-1. A atividade inibidora de PP1c de duas isoformas recombinantes purificadas, INc-1L e INc-1, foram avaliadas e comparadas. A forma denominada INc-1L apresenta em sua região aminoterminal um segmento de 38 aminoácidos derivado da retenção de um íntron, sem alterar a fase de leitura. Ambas proteínas recombinantes exibiram efeito inibidor sobre a atividade de fosforilase fosfatase de PP1c recombinante, sendo que a IC₅₀ determinada para INc-1L foi de ~50nM e para INc-1 foi de ~11nM, sugerindo que a retenção do segmento de aminoácidos codificado pelo íntron na isoforma INc-1L diminui seu potencial inibitório. Verificamos também que o mRNA de INc-1 é expresso durante o crescimento vegetativo de *N. crassa*, apresentando níveis máximos na fase exponencial.

Abstract

Type 1 protein serine/threonine phosphatases (PP1) play important roles in the regulation of many cellular functions including metabolism, cell growth and division, protein synthesis and pre-mRNA splicing. PP1 holoenzyme consists of one highly conserved catalytic subunit (PP1c) and variable regulatory subunits. A number of proteins that interact with PP1c have been described in mammals and the respective holoenzymes present distinct substrate specificity and/or different subcellular localization. Among the proteins that interact with PP1c, there are many with inhibitory effect such as inhibitor-1 (I-1) and inhibitor-2 (I-2). It has been demonstrated that a protein denominated INc-1, purified from *Neurospora crassa* extracts, specifically inhibits PP1c and has biochemical properties that resemble those of mammalian I-2. INc-1 is the first example of a PP1c regulatory subunit in filamentous fungi. Partial amino acid sequences of INc-1 led to the identification of an ORF (open reading frame) in *Neurospora crassa* genome which appears to encode INc-1. This ORF shows similarity with mammalian I-2 mainly in regions mapped as sites for interaction with PP1c. In this work we report the cloning and bacterial expression of the coding sequence for INc-1. The PP1c inhibitory activities of two recombinant isoforms, named INc-1L and INc-1, were compared. INc-1L aminoacid sequence presents an in frame segment of 38 residues encoded by an non-processed intron. Both recombinant proteins showed inhibitory effect against phosphorylase phosphatase activity of recombinant PP1c, with IC_{50} of ~50nM for INc-1L and ~11nM for INc-1, suggesting that retention of the 38 residue segment decrease the inhibitory potential of INc-1L. We have also verified that INc-1 mRNA is expressed during *N.crassa* vegetative growth with maximum level at the exponential phase.

Abreviaturas

Abs: absorbância

BSA: albumina de soro bovino

cAMP: 3',5' monofosfato cíclico de adenosina

CDK: cyclin dependent Kinase

CKII: caseína quinase II

cpm: contagem por minuto

DARPP-32: dopamine phosphoprotein and cAMP-regulated 32KDa

DNAse: Desoxirribonuclease

dNTP: desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato

DO: densidade óptica

DTT: ditionitrito

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

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

GSK3: glicogênio sintase quinase

kb: Quilobases

kDa: Quilodalton

I-1: inibidor-1

I-2: inibidor-2

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

IPTG: isopropyl-β-D-galactopiranosídeo

MAPK: *mitogen activated protein kinase*

MOPS: ácido 3- (N-morfolino) propanosulfônico

NIPP-1: nuclear inhibitor of PP1

ORF: fase aberta de leitura

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PEG: polietileno glicol PK: proteína quinase

PKA: proteína quinase dependente de cAMP

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila

PP: serina/ treonina fosfatase

PP1: holoenzima da PP do tipo 1

PP1c, PP2Ac, PP2Bc: subunidades catalíticas das respectivas PPs

PP2A: holoenzima da PP do tipo 2A

PP2B: holoenzima da PP do tipo 2B

PP2C: PP do tipo 2C

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

PPO:2,5-difeniloxazol

PPP: subfamília das PPs (*Phosphoprotein Phosphatase*)

PTP: tirosina fosfatase

PTK: Proteína tirosina quinase

RNAse: Ribonuclease A

rpm: Rotações por minuto

RT-PCR: PCR precedido de reação com transcriptase reversa

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TCA: ácido tricloro-acético

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

1. Introdução

A fosforilação é uma das modificações covalentes pós-traducionais mais freqüentes em proteínas. Estima-se que pelo menos um terço das proteínas eucarióticas sejam fosforiladas em resíduos de serina, treonina e/ou tirosina, e em menor escala em outros resíduos como histidina e aspartato. A maioria dos eventos de fosforilação são reversíveis e resultam da ação coordenada das proteínas quinases e das proteínas fosfatases (Hunter, 1995; Ceulemans *et al.*, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004).

A ação moduladora da fosforilação reversível sobre a atividade de proteínas é crucial nas redes de sinalização intracelular que coordenam processos celulares diversos e fundamentais tais como metabolismo, transcrição, tradução, replicação do DNA, neurotransmissão, resposta a estresses, controle do ciclo celular, desenvolvimento e apoptose (Hunter, 1995; Graves & Krebs, 1999; Cohen, 2000). A importância da fosforilação reversível de proteínas pode também ser inferida com base no fato de que aproximadamente 2 a 3% dos genes eucarióticos codificam proteínas quinases e proteínas fosfatases, responsáveis pela fosforilação/desfosforilação de resíduos de serina/treonina ou tirosina, como tem sido revelado pelo seqüenciamento e anotação de diversos genomas (Hunter, 1995; Plowman *et al.*, 1999; Gribskov *et al.*, 2001; Kostich *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002a; Manning *et al.*, 2002b; Waterston *et al.*, 2002; Tchieu *et al.*, 2003; Caenepeel *et al.*, 2004).

Levando-se em conta a ocorrência majoritária de fosforilação em serina, treonina e tirosina, as proteínas quinases foram separadas em dois grandes grupos com base na capacidade de fosforilar esses resíduos. Um desses grupos é formado pelas proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de resíduos de serina e treonina (PKs) e outro grupo formado pelas enzimas que fosforilam resíduos de tirosina (PTKs). Estas proteínas quinases apresentam grande diversidade tanto em relação aos sinais aos quais respondem, como em relação aos substratos em que atuam, mas todas elas em geral, possuem um domínio catalítico extremamente conservado, ao qual somam-se regiões que lhe conferem especificidade. A conservação desse domínio catalítico entre as quinases, sejam elas serina/treonina ou tirosina quinases, sugere que elas

devem ter se originado a partir de um único gene ancestral comum (Hunter, 1987; Hanks *et al.*, 1988; Shenolikar, 1994; Hanks & Hunter, 1995; Hunter, 1995).

Por outro lado, os dois grupos de proteínas fosfatases que contrapõem a ação desses dois grupos de quinases, ou seja, as proteínas serina/treonina fosfatases (PPs) e as proteínas tirosina fosfatases (PTPs), não apresentam similaridade entre suas seqüências de aminoácidos e possuem mecanismos catalíticos distintos (Barton *et al.*, 1994; Shenolikar, 1994; Barford, 1996).

Os genomas humano e murino codificam aproximadamente 100 proteínas PTKs e PTPs, específicas para fosforilação/desfosforilação de resíduos de tirosina. Por outro lado, os números de proteínas serina/treonina quinases (~400) e de proteínas serina/treonina fosfatases (~25), específicas para fosforilação/desfosforilação de resíduos de serina e treonina, são significativamente diferentes. Esta observação revela que, enquanto o número de proteínas quinases aumentou muito durante a evolução eucariótica, o mesmo não ocorreu com as serina/treonina fosfatases. Este aparente paradoxo pode ser explicado pela observação de que as subunidades catalíticas das PPs são capazes de interagir com uma variedade de subunidades reguladoras e, deste modo a diversidade das PPs só é percebida ao nível de suas holoenzimas. As subunidades reguladoras (também denominadas subunidades moduladoras ou localizadoras), interferem na atividade das subunidades catalíticas das PPs conferindo-lhes especificidade, direcionando-as a certos compartimentos subcelulares ou substratos, ou ainda, modulando suas atividades, seja ativando ou inibindo frente a determinados substratos. Em muitos casos, um único tipo de subunidade catalítica pode interagir com subunidades reguladoras diferentes gerando holoenzimas com especificidade e localização subcelular singulares, garantindo assim a diversidade desta importante família de enzimas (Hubbard & Cohen, 1993; Faux & Scott, 1996; Goldberg, 1999; Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Ceulemans *et al.*, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004).

1.1. Características principais das serina/treonina fosfatases

Como já mencionamos, as serina/treonina fosfatases são enzimas que catalisam a desfosforilação específica de resíduos de fosfoserina e fosfotreonina. Critérios bioquímicos propostos por Philip Cohen (Cohen, 1989; Cohen *et al.*, 1989; Shenolikar & Nairn, 1991) foram utilizados para classificar as PPs em dois grupos: PPs do tipo 1 e PPs do tipo 2. De acordo com estes critérios, as fosfatases do tipo-1 (PP1) são inibidas por concentrações nanomolares de duas proteínas termoestáveis, o inibidor-1 (I-1) e o inibidor-2 (I-2), e desfosforilam, *in vitro*, preferencialmente a subunidade β da fosforilase quinase. As fosfatases do tipo-2 são refratárias aos efeitos desses dois inibidores e desfosforilam preferencialmente a subunidade α da fosforilase quinase.

As fosfatases do tipo-2 são subdivididas em três grupos principais: PP2A, que é ativa na ausência de cátions divalentes, PP2B, dependente de Ca^{2+} e calmodulina e PP2C, dependente de Mg^{2+} . Além disso, estes diferentes grupos de PPs apresentam sensibilidade distinta a toxinas de ocorrência natural como o ácido ocadáico, que é produzido por dinoflagelados marinhos e microcistinas, que são produzidas por cianobactérias. Por exemplo, o ácido ocadáico inibe a PP2A na faixa (IC_{50}) de 0,1-1nM, uma concentração de 10 a 100 vezes mais baixa daquela necessária para inibir a PP1 ($\text{IC}_{50} \approx 10\text{nM}$). A PP2B é inibida apenas na presença de concentrações micromolares desta toxina e a PP2C não é afetada (Cohen, 1989; Cohen *et al.*, 1989; Shenolikar & Nairn, 1991; MacKintosh *et al.*, 1995; Wera & Hemmings, 1995; Sheppeck *et al.*, 1997). Ainda que a classificação baseada em parâmetros bioquímicos seja muito utilizada, ela não reflete a relação filogenética entre as diferentes PPs, ou seja, não reflete a similaridade entre as seqüências de aminoácidos das subunidades ou domínios catalíticos destas enzimas.

Algumas subfamílias de PPs compreendem holoenzimas onde uma subunidade catalítica interage com uma ou mais subunidades reguladoras ou moduladoras variáveis. Portanto, utilizaremos a nomenclatura PP1c, PP2Ac e PP2Bc para nos referirmos às respectivas subunidades catalíticas destas

holoenzimas. Outras proteínas serina/treonina fosfatases possuem domínio catalítico e regulador organizados na mesma cadeia polipeptídica.

Uma nova classificação para as PPs foi proposta, considerando-se especialmente a identidade entre as seqüências de aminoácidos de suas subunidades ou domínios catalíticos. As PP1c, PP2Ac e PP2Bc foram agrupadas na família PPP (*PhosPhoprotein Phosphatase*) e a PP2C em uma outra família, denominada de PPM (*Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent*). A família PPP compreende, além das já mencionadas PP1, PP2A, e PP2B, novas fosfatases e consiste, atualmente, em cinco subfamílias denominadas: PP1, PP2A, PP2B, PP5 e PP7 (Barton *et al.*, 1994; Wera & Hemmings, 1995; Barford, 1996; Cohen, 1997; Kerk *et al.*, 2002).

A comparação das seqüências primárias de diversos membros das famílias PPP e PPM revelou que as enzimas da família PPP possuem um domínio catalítico conservado de aproximadamente 280 resíduos não existente na PP2C e nas proteínas tirosina fosfatases (Barton *et al.*, 1994; Shenolikar, 1994; Villafranca *et al.*, 1996; Cohen, 1997). Esta característica reflete-se na estrutura espacial conservada das PP1c e PP2Bc e no mecanismo catalítico semelhante que é utilizado por essas enzimas (Egloff *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995; Barford, 1996). Por outro lado, apesar da ausência de similaridade entre suas seqüências de aminoácidos, as enzimas das famílias PPP e PPM compartilham mesma arquitetura tridimensional, e provavelmente o mesmo mecanismo catalítico (Das *et al.*, 1996).

1.2. Estrutura e regulação da serina/treonina fosfatase do tipo-1 (PP1)

A PP1, assim como a PP2A, é uma enzima ubíqua das células e dos tecidos das várias espécies em que foram pesquisadas e várias holoenzimas foram purificadas e extensivamente caracterizadas. As holoenzimas da PP1 e da PP2A são constituídas por uma subunidade catalítica e uma ou duas subunidades reguladoras variáveis. Em mamíferos, já foram identificados mais de 100 polipeptídeos que associam-se direta ou indiretamente a PP1c ou PP2Ac, gerando holoenzimas com localizações celulares e especificidades distintas (Bollen, 2001; Janssens & Goris, 2001).

Os genomas eucarióticos contêm entre um (*Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*) e oito (*Arabidopsis thaliana*) genes que codificam

isoformas da PP1c. Em mamíferos foram clonados três genes e foram caracterizadas quatro isoformas da PP1c, sendo que duas dessas isoformas diferem por *splicing* alternativo (Sasaki *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 1991; Dombradi *et al.*, 1993; Barker *et al.*, 1994; Andrioli *et al.*, 2003). A massa molecular das PP1c eucarióticas varia entre 35-38kDa e suas seqüências primárias consistem de ~330 resíduos, com elevado grau (70-90%) de similaridade (Barton *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1999; Ceulemans *et al.*, 2002).

Assim como as demais proteínas serina/treonina fosfatases da família PPP, a PP1 é uma metaloenzima que contém dois íons metálicos divalentes no sítio catalítico (Mn^{+2} e Fe^{+2} , na enzima recombinante e provavelmente Zn^{+2} e Fe^{+2} , na enzima nativa), os quais facilitam a reação de desfosforilação (Barford, 1996). Dados estruturais indicam que essa desfosforilação é catalisada numa única etapa ao contrário de outras fosfatases, como tirosina fosfatases e fosfatases alcalinas, que envolvem a formação de intermediários. Os dois íons metálicos ativam a molécula de água que age como um nucleófilo no ataque do átomo de fósforo do grupo fosfato. O sítio ativo está situado no centro de uma região com formato de Y, em que o braço central corresponde ao sulco hidrofóbico e os laterais correspondem ao sulco ácido e a região carboxi-terminal (Goldberg *et al.*, 1995; Egloff *et al.*, 1997). Estudos cristalográficos da PP1 complexada com algumas toxinas, tais como microcistina, ácido ocadáico e caliculina A, têm auxiliado a compreensão dos mecanismos catalíticos e de inibição (Maynes *et al.*, 2001; Kita *et al.*, 2002).

A distinção entre isoformas de PP1c com base em suas especificidades de substrato ou pelas suas habilidades de interagir, *in vitro*, com subunidades reguladoras diferentes, ainda não é possível. Contudo, elas aparentemente desempenham papéis fisiológicos distintos, uma vez que o fenótipo de mutantes com perda funcional da PP1c é típico para cada isoforma. Além disso, foi demonstrado que as diferentes isoformas da PP1c podem apresentar localização subcelular distinta (Andreassen *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 1998; Berndt, 1999; Cheng *et al.*, 2000; Raghavan *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Fresu *et al.*, 2001).

Alguns poucos relatos na literatura sugerem que a atividade da PP1 possa ser controlada por fosforilação da própria subunidade catalítica. Foi demonstrada a fosforilação *in vitro* de algumas formas de PP1 de mamíferos,

por uma tirosina quinase viral que parece afetar não sua atividade, mas sua associação com o inibidor-2 (Villa-Moruzzi *et al.*, 1991). Também foi descrito que a PP1 em mamíferos (Dohadwala *et al.*, 1994; Kwon *et al.*, 1997) e sua homóloga em *S. pombe*, codificada pelo gene *dis2* (Yamano *et al.*, 1994), sofrem regulação por fosforilação catalisada por uma proteína quinase dependente de ciclinas (*cdc2* quinase), sugerindo que essa modificação na fosfatase possa estar associada ao controle do ciclo celular. Recentemente, foi descrita a associação da PP1c com Nek2, uma quinase regulada pelo ciclo celular (Helps *et al.*, 2000). Outra possível regulação por fosforilação foi descrita em dinoflagelados (Dawson *et al.*, 1996). Nesses organismos a ação combinada da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) e da PP2B parecem controlar a atividade da PP1.

Mas certamente, o mecanismo de regulação principal e mais importante da PP1c ocorre pela sua associação com as diversas proteínas que funcionam como subunidades reguladoras, moduladoras ou localizadoras, ou ainda como substratos. Dezenas de proteínas que interagem com a PP1c de uma maneira mutuamente exclusiva já foram contabilizadas em diferentes organismos. Algumas destas proteínas possuem ortólogas em fungos, insetos e mamíferos enquanto outras são específicas de diferentes organismos (Egloff *et al.*, 1997; Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Ceulemans *et al.*, 2002; Cohen, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004).

1.3. Proteínas que interagem com PP1c

As subunidades catalíticas da PP1c não existem livremente nas células, e *in vivo* compõem uma variedade de holoenzimas diméricas ou multiméricas. Entre as proteínas que se associam diretamente a PP1c, muitas exibem função inibitória, pelo menos *in vitro*, tais como os inibidores I-1 e I-2, DARPP-32 (*dopamine and cAMP-regulated 32kDa phosphoprotein*), o inibidor nuclear NIPP-1 (*nuclear inhibitor of PP1*) e a proteína associada a ribossomos RIPP-1 (*ribosomal inhibitor of PP1*) (Nimmo & Cohen, 1978; Hemmings *et al.*, 1990; Park *et al.*, 1994; Van Eynde *et al.*, 1995; Beullens *et al.*, 1996; Yamawaki *et al.*, 2001).

Algumas proteínas que interagem com a PP1c atuam, *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). Eventualmente, estas subunidades localizadoras atuam *in vitro* como subunidades inibitórias. O significado desta inibição ainda é pouco claro, mas há que se considerar o fato de que o substrato normalmente utilizado nos ensaios enzimáticos é a fosforilase a, um substrato não fisiológico para a maioria das holoenzimas da PP1 (Aggen *et al.*, 2000; Tamrakar & Ludlow, 2000; Bollen, 2001; Schillace *et al.*, 2001).

É interessante notar também que, além da interação com proteínas que têm a função única de modular a atividade de PP1c, existem relatos da interação da PP1c com um subconjunto de seus substratos, que em alguns casos parecem também atuar como subunidades localizadoras. A PP1c interage com a enzima fosfofrutoquinase (PFK) sugerindo um papel da direto da fosfatase na via glicolítica (Zhao & Lee, 1997). Também já foi descrita a interação física da PP1c tanto com Nek2 como com Aurora-A, quinases envolvidas na separação de centrôssomos e que são aparentemente desfosforiladas pela PP1c (Helps *et al.*, 2000; Katayama *et al.*, 2001). O produto do gene *Reg1* de levedura é um substrato da PP1c, mas também pode ser encontrado transitoriamente associado com a quinase Snf1 e com a hexoquinase II, direcionando a PP1c para desfosforilação destas enzimas (Alms *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000).

É surpreendente que, exceto pelas isoformas, a maioria das subunidades reguladoras da PP1c não apresentem similaridade entre suas seqüências de aminoácidos, a não ser pela presença de certos módulos também conservados

em proteínas não-relacionadas. Este fato exclui a possibilidade da descoberta de subunidade reguladoras da PP1c através de buscas por domínios característicos nas bases de dados disponíveis. Portanto, a identificação de proteínas que interagem com PP1c ainda depende de metodologias bioquímicas tais como, purificação das holoenzimas, co-imunoprecipitação com anti-PP1c, ensaios de duplo-híbrido em leveduras e varreduras de bibliotecas de expressão utilizando-se a proteína PP1c recombinante como isca ou sonda (Moorhead *et al.*, 1994; Beullens *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; MacMillan *et al.*, 1999; Ajuh *et al.*, 2000; Terry-Lorenzo *et al.*, 2000; Bettoun *et al.*, 2002; Ceulemans *et al.*, 2002; Cohen, 2002; Colbran *et al.*, 2003).

Contudo, ainda que não exista uma conservação explícita entre as seqüências de aminoácidos das diversas subunidades reguladoras, estudos bioquímicos e cristalográficos identificaram um pequeno motivo consenso, chamado de motivo **RVXF**, em muitas destas subunidades. Ainda que este seja um motivo muito comum, existindo em mais do que 10% das proteínas já conhecidas, a sua importância no reconhecimento e na interação com a PP1c foi claramente demonstrada para diversas subunidades reguladoras. A seqüência **RVXF** associa-se fortemente a um canal hidrofóbico formado na interface das duas folhas beta e diagonalmente oposto ao sítio catalítico. A combinação de alinhamento de seqüências e experimentos de mutagênese sítio dirigida permitiram definir o motivo consenso degenerado como **(R/K)X₁(V/I)X₂(F/W)** em que X₁ pode estar ausente ou ser qualquer resíduo de aminoácido e X₂ pode ser qualquer resíduo, exceto prolina. A interação do motivo **RVXF** com a PP1c não causa importantes mudanças na sua conformação e não tem efeito significativo na atividade de fosfatase. Estes dados sugerem que o motivo **RVXF** fornece um sítio de ligação ou ancoramento inicial para as subunidades reguladoras e, portanto, promove a ligação de sítios secundários que geralmente apresentam baixa afinidade, mas afetam a atividade e especificidade de substrato da PP1 (Egloff *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1997; Beullens *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Wu & Tatchell, 2001; Wakula *et al.*, 2003).

Mais recentemente outros sítios de associação foram sugeridos ampliando a noção que a interação com a subunidade catalítica da PP1 envolve múltiplos contatos (Beullens *et al.*, 1999; Connor *et al.*, 2000; Yang *et*

al., 2000; Bollen, 2001; Schillace *et al.*, 2001). Análises genéticas e estudos de mutagênese implicaram a alça $\beta 12$ - $\beta 13$ da estrutura tridimensional da PP1c como essencial na associação da PP1c tanto com as toxinas como com os inibidores protéicos (Connor *et al.*, 1999).

Muitas das subunidades reguladoras da PP1c já conhecidas têm suas atividades moduladas por fosforilação reversível. Os inibidores protéicos I-1 e DARPP-32 são substratos da PKA e quando desfosforilados não exibem atividade inibidora (Nimmo & Cohen, 1978; Desdouits *et al.*, 1995). As subunidades localizadoras G, que dirigem a PP1c para a partícula do glicogênio, também têm suas atividades moduladas por fosforilação. Por exemplo, em resposta a adrenalina, a subunidade G_M (presente em músculo esquelético) sofre uma série de fosforilações que resultam na liberação da subunidade catalítica da PP1 da partícula do glicogênio, possibilitando sua associação com o inibidor-1 e conseqüente inibição de sua atividade enzimática (Hubbard & Cohen, 1989; Aggen *et al.*, 2000).

1.4. Inibidores termoestáveis da PP1c

1.4.1. Inibidor-1 e DARPP-32

Durante as purificações de fosfatases a partir de extratos celulares foi observado que havia uma forma que podia ser ativada pela adição de ATP/ Mg^{2+} ou ainda, através de tratamento com tripsina na presença de Mn^{2+} (Merlevede & Riley, 1966; Merlevede *et al.*, 1969; Tellez-Inon & Torres, 1970). Em estudos posteriores essa atividade mascarada foi separada em dois componentes distintos e a atividade de fosfatase denominada Fc ou fosfatase dependente de ATP-Mg (Goris *et al.*, 1979). Posteriormente, verificou-se que a Fc correspondia a PP1 (Stewart *et al.*, 1981) associada a um fator termoestável, que inibia a atividade da PP1 contra a fosforilase α do glicogênio, denominado inibidor-2 (I-2) (Hemmings *et al.*, 1982). O I-2, juntamente com outro inibidor denominado 1 (I-1), já haviam sido purificados, entre outras fontes, de músculo esquelético de coelho e caracterizados bioquimicamente (Huang & Glinsmann, 1976). Posteriormente, outras proteínas com características inibitórias foram isoladas de outros tecidos e organismos (Aggen *et al.*, 2000; Zolnierowicz & Bollen, 2000; Bollen, 2001). A característica

bioquímica principal utilizada para detecção dos inibidores termoeestáveis é a inibição da atividade de fosforilase fosfatase da PP1c. No entanto, em muitos casos, não há demonstração experimental de que o papel fisiológico destas proteínas termoeestáveis seja realmente o de inibidores.

O I-1 caracteriza-se por ser estável a tratamentos drásticos, como precipitação por TCA, altas temperaturas (fervura) e tratamento com detergentes. É constituído por 166 ou 171 aminoácidos, em coelho e homem ou rato respectivamente, e sua massa molecular varia de 18,7 a 19,2kDa (Aitken *et al.*, 1982; Endo *et al.*, 1996). No entanto, estimativas de 60 e 26/28kDa são obtidas através da cromatografia de filtração em gel e SDS-PAGE, respectivamente (Nimmo & Cohen, 1978; Endo *et al.*, 1996). Já foram identificadas duas isoformas do I-1 em cérebro e fígado de humano, as quais são derivadas de *splicing* alternativo (Liu *et al.*, 2002).

Para ser ativado, I-1 precisa ser fosforilado no resíduo de treonina na posição 35 (Thr35) pela PKA. A fosforilação do resíduo de serina na posição 67 também parece ser importante na regulação do I-1 (Aitken *et al.*, 1982; Huang & Paudel, 2000; Bibb *et al.*, 2001). Inicialmente, foi demonstrado que o I-1 fosforilado na Ser67 pela NCLK (*neuronal cdc-like protein kinase*), um dímero formado pela proteína quinase 5 dependente de ciclina (Cdk5) e a subunidade regulatória neuronal específica p25, apresenta as mesmas propriedades inibitórias que o fosforilado pela PKA em Thr35 (Huang & Paudel, 2000). Em contraste, outros estudos mostraram que a fosforilação do I-1 na Ser67 pela Cdk5 não o torna um potente inibidor da PP1, mas sim um substrato menos eficiente para a PKA, reduzindo a fração de PP1 inibida pelo I-1 (Bibb *et al.*, 2001).

Muito embora seja largamente conhecido que a fosforilação do I-1 *in vitro* leve a uma eficiente inibição da PP1c, seu papel fisiológico ainda não está totalmente elucidado. Já foi postulado que sua função seria a de sequestrar a PP1c, mantendo um estoque citossólico de fosfatase inativa (Aggen *et al.*, 2000). Também já foi proposto o envolvimento de I-1 no metabolismo de glicogênio e que a ativação da glicogênio sintase, estimulada por insulina, seria reflexo de uma diminuição da inibição da PP1c. Contudo, camundongos que tiveram os genes de I-1 e de DARPP-32 (uma isoforma de I-1) nocauteados não apresentaram qualquer alteração no metabolismo de glicogênio, indicando

que os efeitos estimulatórios da insulina sobre a glicogênio sintase não envolvem a participação destes inibidores na atividade de PP1, ao menos em músculo esquelético (Scrimgeour *et al.*, 1999). Por outro lado, camundongos com o gene de I-1 nocauteados apresentam moderado aumento da atividade de PP1c e bloqueio da resposta β -adrenérgica, refletindo em alterações da função cardíaca (Carr *et al.*, 2002). Ainda que controverso, um outro papel fisiológico sugerido para I-1 seria nos processos de aprendizagem e memória (Mulkey *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 2000; Genoux *et al.*, 2002; Waddell, 2003).

Entre as funções propostas para I-1, pode ser ainda citado seu papel como inibidor da PP1c associada a proteína GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein*). Esta proteína se associa a PP1c e ao I-1 em diferentes domínios formando o complexo PP1/GADD34/I-1. Estudos bioquímicos e celulares sugerem que este complexo regule a desfosforilação do fator de iniciação eucariótico eIF-2 α e possa estar envolvido no controle da tradução no cérebro de mamíferos em resposta ao estresse celular (Connor *et al.*, 2001).

DARPP-32 é um inibidor homólogo ao I-1, e assim como este é tipicamente citossólico e regulado por fosforilação mediada sobretudo pela PKA, em sua treonina da posição 34 (Williams *et al.*, 1986; Kwon *et al.*, 1997). DARPP-32 é expresso predominantemente no tecido nervoso e até o momento tanto I-1 como DARPP-32 estão descritos apenas em vertebrados (Hemmings *et al.*, 1984; Ceulemans *et al.*, 2002). Além disso, diversos dados da literatura indicam, de modo inequívoco, que DARPP-32 atua como inibidor da PP1c, desempenhando um papel integrador das cascatas de sinalização celular que ocorrem no cérebro em resposta ao estímulo de neurotransmissores, tais como dopamina, serotonina e glutamato, e de drogas tais como cocaína e anfetaminas, entre outras (Hemmings *et al.*, 1984; Cohen, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004).

1.4.2. Inibidor-2

Entre os inibidores de PP1c já identificados, está o I-2 que apresenta as mesmas características de resistência a tratamentos drásticos exibidas pelo I-1 (Huang & Glinsmann, 1976). Entretanto, a determinação da estrutura primária de ambos inibidores revelou que são proteínas completamente distintas (Aitken

et al., 1982; Holmes *et al.*, 1986). Além disso, a regulação do I-2 não parece envolver fosforilação por PKA. O I-2 de mamíferos apresenta massa molecular calculada de 22,8kDa (Holmes *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1992b; Helps *et al.*, 1994), contudo, em SDS-PAGE, migra como um polipeptídeo de 30,5kDa (Nimmo & Cohen, 1978; Foulkes & Cohen, 1980).

O I-2 interage com a PP1 e bloqueia sua atividade. O complexo formado pela PP1 e I-2 (PP1I) pode ser reativado *in vitro* pela fosforilação do resíduo de treonina localizado na posição 72 do I-2, catalisada pela glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) (Hemmings *et al.*, 1982; Vandenheede *et al.*, 1985). Essa fosforilação é extremamente facilitada se três sítios para caseína quinase II (CKII, também chamada GSK5) presentes no I-2, forem previamente fosforilados, sugerindo que a CKII e a GSK3 atuem em conjunto para modular a atividade do I-2 (DePaoli-Roach, 1984). O papel desempenhado pelas quinases não pode ser mimetizado pela inserção de resíduos ácidos nas posições que são fosforiladas, e apesar desta fosforilação ter sido demonstrada *in vivo*, seu papel biológico ainda não está claro (Holmes *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1994; Sakashita *et al.*, 2003).

A fosforilação do I-2 por GSK3 não promove a liberação da subunidade catalítica da PP1 do complexo PP1I. O mecanismo de desinibição parece envolver um rápido rearranjo estrutural dentro do complexo, seguido por uma desfosforilação catalisada pela própria PP1, restaurando a atividade de fosfatase ao complexo PP1I (DePaoli-Roach, 1984; Jurgensen *et al.*, 1984; Price *et al.*, 1986; Picking *et al.*, 1991). Após a desfosforilação, aparentemente, um novo rearranjo estrutural, agora lento, tornaria o complexo novamente inativo (Tung & Cohen, 1984). Foi verificado por dicróismo circular e ressonância magnética nuclear que a fosforilação do I-2 livre pela GSK3 não altera sua estrutura, indicando que as alterações conformacionais sugeridas requerem sua interação com a PP1c (Lin *et al.*, 2003). Além da GSK3, pelo menos mais uma outra quinase está envolvida na reativação do complexo PP1I. Em extratos de cérebro, a NCLK (*Neuronal Cdc2-like protein kinase*) encontra-se ligada ao complexo formado pela PP1 e o I-2 e fosforila o I-2 na Thr72, reativando o complexo PP1I (Agarwal-Mawal & Paudel, 2001).

Os dados discutidos acima, demonstram que, apesar ter sido inicialmente caracterizado como um regulador negativo de PP1c devido sua

incontestável atividade inibitória *in vitro*, I-2 também apresenta efeito positivo na atividade da PP1c (Alessi *et al.*, 1993; Bollen *et al.*, 1994). Já foi demonstrado que I-2 tem a capacidade de alterar a conformação de isoformas da PP1c recombinantes expressas em bactéria, tornando-as mais semelhantes às enzimas nativas quanto a especificidade de substrato e sensibilidade a inibidores (Alessi *et al.*, 1993; MacKintosh *et al.*, 1996). Efeitos negativo e positivo sobre a PP1 também já foram observados *in vivo*, dependendo da concentração em que I-2 é expresso (Egloff *et al.*, 1995 ; Nigavekar *et al.*, 2002). Além disso, assim como observado *in vitro*, a reativação da PP1 por I-2 *in vivo* também é dependente de mecanismos de fosforilação (Tan *et al.*, 2003). Em conjunto, estas observações sustentam a proposta de que a função primária de I-2 seja auxiliar o dobramento correto da PP1c até sua conformação nativa e funcional, atuando como uma chaperonina (MacKintosh *et al.*, 1996; Ceulemans & Bollen, 2004).

I-2, foi inicialmente caracterizado em tecidos de mamíferos, mas ao contrário de I-1 e DARPP-32, esta proteína tem uma distribuição evolutiva mais ampla. Ortólogos de I-2 já foram descritos em *S. cerevisiae*, *Neurospora crassa* e *Drosophila melanogaster* (Cannon *et al.*, 1994; Tung *et al.*, 1995; Helps & Cohen, 1999; Zapella, 2001). O ortólogo descrito em levedura corresponde ao produto do gene *GLC8*, o qual é 28% similar a I-2 de mamíferos. Embora esta similaridade esteja restrita ao sítio de fosforilação pela GSK3, aparentemente *glc8p* não é fosforilada por essa quinase, como observado para I-2 (Sakashita *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2003). Por outro lado, tanto I-2 de mamíferos como *glc8p* de levedura são fosforilados *in vivo* por quinases da família das CDKs (Agarwal-Mawal & Paudel, 2001; Leach *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2003). Estudos recentes de bioquímica e genética apontam Pho85, uma proteína quinase dependente de ciclina, ortóloga da Cdk5 de mamíferos, como a única quinase que fosforila *glc8p* no resíduo de treonina na posição 118 que é equivalente ao resíduo de treonina na posição 72 do I-2 de mamíferos (Tan *et al.*, 2003).

A primeira evidência consistente de um papel fisiológico para I-2 resulta de demonstrações do seu envolvimento na regulação do ciclo celular. Através de análise imunocitoquímica e da expressão de I-2 em fusão com proteína fluorescente verde (GFP) foi verificado que a expressão e localização

subcelular do I-2 em fibroblastos é alterada durante o ciclo celular. A expressão de I-2 é máxima na fase S e na mitose. Durante a fase G1, I-2 localiza-se no citoplasma, enquanto durante a fase S, o inibidor acumula-se no núcleo. Ademais, a redistribuição celular de I-2 no decorrer do ciclo celular depende de sua fosforilação e de uma seqüência de localização nuclear. (Brautigan *et al.*, 1990; Kakinoki *et al.*, 1997). Mais recentemente, foi mostrado que I-2 concentra-se no núcleo de células cultivadas em baixa densidade, enquanto que em culturas mantidas em alta densidade é excluído do núcleo. A importação para o núcleo é ativa e requer um domínio protéico de I-2 distinto daquele requerido para exportação, que é passiva (Leach *et al.*, 2002).

Varreduras de bibliotecas de cDNA utilizando-se I-2 como isca, identificaram interações entre esta proteína e a quinase Nek2, que é encontrada em centrossomos complexada a PP1c. Foi demonstrado que I-2 associa-se ao complexo PP1/Nek2 aumentando a atividade de quinase da Nek2 através de sua ação inibitória na PP1, o que induz a separação dos centrossomos. Estas observações coincidem com o efeito observado com a superexpressão de I-2 que leva a separação prematura dos centrossomos (Eto *et al.*, 2002). Ademais, em células vivas I-2 é fosforilado na Thr72 durante a mitose por uma CDK. Esta forma fosforilada foi localizada no centrossomo, sugerindo que a fosforilação reversível de I-2 controla a atividade de PP1 associada ao centrossomo (Leach *et al.*, 2003). Estes resultados são consistentes com estudos anteriores que mostraram que a atividade da PP1 é suprimida na entrada da mitose, mas é requerida na transição metáfase-anáfase (Fernandez *et al.*, 1992). Assim, a fosforilação e a desfosforilação do I-2 parece ter papel importante nas flutuações da atividade da PP1 durante a divisão celular.

Entretanto, o complexo Nek2/PP1 não é o único alvo do I-2 nas células. I-2 também se associa com neurabina I/neurabina II, que são proteínas ligantes de actina, e com uma nova quinase transmembrana chamada KPI-2, expressa predominantemente em músculo esquelético. A associação de I-2, em ambos casos, ocorre em conjunto com a PP1 (Terry-Lorenzo *et al.*, 2002; Wang & Brautigan, 2002).

Como discutido anteriormente (ver item 1.3) a interação de subunidade reguladoras com PP1c envolve múltiplos contatos, além do pequeno motivo

consenso denominado **RVXF** existente em muitas destas subunidades. No caso de I-2, várias regiões de interação entre I-2 e a subunidade catalítica da PP1c foram caracterizadas (Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). No modelo proposto, são sugeridas cinco regiões na sequência primária de I-2 que estabelecem contato com a PP1c. A região 1 localizada na extremidade amino-terminal do I-2 de mamíferos contém a sequência **IKGI** proposta como essencial para associação, mas não para inibição. A região 2 (resíduos 64 a 114) contém o resíduo fosforilado pela GSK3 que é fundamental no processo de reativação da PP1c quando complexada a I-2. Esta região, além de ancorar I-2 na PP1c, também formaria uma alça, que não estabelece contato físico com a PP1c no complexo PP1I, mas que bloquearia o acesso de substratos ao sítio catalítico da PP1c. A região 3 contém a sequência **KLHY** que aproxima-se do motivo consenso **RVXF** que é fundamental para interação de outras subunidades reguladoras com a PP1c. A região 4 contém os resíduos carboxi-terminais ácidos e contribui claramente para atividade de I-2. A região 5 inclui o resíduo Trp46, o qual quando mutado provoca um drástico aumento da IC₅₀ de I-2 (Helps & Cohen, 1999; Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000).

Cabe ressaltar que outra sequência, **GILKN**, contendo parte do domínio caracterizado na região 1 de I-2 (**IKGI**), encontra-se presente nos ortólogos de I-2, existentes em levedura e *N.crassa* e também na maioria dos I-2 já descritos, indicando que esta sequência seria a real responsável pela interação na região 1. Dados recentes indicaram que o motivo **KGILK** (região 1) do I-2 pode ser funcionalmente substituído pelo motivo consenso **RVXF** ao contrário do motivo **KLHY** da região 3, descartando este motivo como sendo equivalente ao **RVXF**, como proposto no modelo descrito acima (Wakula *et al.*, 2003). Estes autores propõem que o motivo **KGILK** desempenharia a função de ancorar a interação de I-2 com PP1 promovendo a interação de sítios secundários.

1.4.3. Outros inibidores

Em adição aos inibidores descritos anteriormente, destacamos um inibidor denominado I-3 por apresentar várias características químicas semelhantes a I-1 e I-2 tais como resistência a tratamentos drásticos e

comportamento anômalo em cromatografia de gel filtração e SDS-PAGE (Zhang *et al.*, 1998). Outro inibidor, denominado I-4 com base na similaridade de sua seqüência com I-2, foi isolado a partir de uma biblioteca de cDNA humanos (Shirato *et al.*, 2000). Ambos são específicos para a inibição da PP1c, sendo que I-4 possui atividade superior ao I-2 se comparados seus respectivos IC₅₀ para inibição da PP1c. O I-3 apresenta 21% de identidade com uma ORF de *S. cerevisiae*. Foi demonstrado através do sistema duplo híbrido que a proteína codificada por esta ORF interage com o Glc7p, ortólogo da PP1c em *S. cerevisiae* (Tu *et al.*, 1996). Esta proteína foi denominada Ypi1 e caracteriza-se por ser termoestável, apresentar migração anômala em SDS-PAGE e inibir a Glc7p (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).

Ainda na família dos inibidores da PP1c, pode ser incluído o inibidor nuclear de PP1 (NIPP-1) que foi primeiramente isolado de núcleo de timo de bezerro como duas isoformas *a* e *b* que tinham em comum a termoestabilidade e a capacidade de inibir a defosforilação da fosforilase do glicogênio por PP1. Estas duas isoformas correspondem na verdade a fragmentos gerados durante a purificação pela ação de proteases endógenas. O NIPP-1 não proteolísado possui massa molecular de 41kDa, estimada por migração em géis de SDS/PAGE. A proteína integra apresenta características diferentes daquelas apresentadas pelas formas proteolisadas, pois surpreendentemente, o NIPP-1 não é termoestável, embora ainda seja capaz de inibir a atividade de PP1 quando fosforilase *a* e caseína são utilizados (Jagiello *et al.*, 1995).

NIPP-1 apresenta capacidade de ligação a RNA e acredita-se que tenha a função de direcionar a PP1c para substratos ligados a RNA (Jagiello *et al.*, 1997). Este inibidor nuclear parece desempenhar um papel bifuncional, uma vez que ele apresenta uma função independente de PP1 na formação do *spliceossomo*, funcionando como um fator de *splicing*, e após a reação de *splicing* NIPP-1 estaria envolvido na desfosforilação de fatores de *splicing* através da sua associação com a PP1c (Beullens *et al.*, 1999; Parker *et al.*, 2002).

Análises bioquímicas indicam que o NIPP-1 é composto por vários domínios funcionais. A porção amino terminal do NIPP-1 contém um domínio FHA (*forkhead-associated*) que está presente em uma grande variedade de proteínas nucleares e liga preferencialmente fosfoproteínas. Foi demonstrado

que o domínio FHA do NIPP-1 interage com as formas fosforiladas dos fatores de *splicing* CDC5L e SAP155 (Boudrez *et al.*, 2000; Boudrez *et al.*, 2002). Como CDC5L e SAP155 são substratos da PP1 *in vitro*, especula-se que esses fatores de *splicing* possam ser desfosforilados pela PP1 associada com o NIPP-1. Uma região central de NIPP-1 (resíduos 147 a 217) contém além do motivo consenso **RVXF** de ligação a PP1c, sítios de fosforilação para PKA e CKII e um sítio envolvido na inibição da PP1, o qual é rico em resíduos básicos (Beullens *et al.*, 1999). A porção carboxi-terminal do NIPP-1 apresenta também uma região envolvida na interação e inibição da PP1. Foi demonstrado que o potencial inibitório desta região é reduzido com a ligação de RNA, o que facilita a fosforilação de seu resíduo de tirosina 335 (Beullens *et al.*, 2000). A região central e carboxi-terminal de NIPP1 também estão envolvidas em sua função de direcionar proteínas que interagem com a cromatina, incluindo a proteína EED (*embryonic ectoderm development*), um membro do grupo de proteínas Polycomb que funciona como um repressor da transcrição (Jin *et al.*, 2003).

1.5. Papel fisiológico da PP1

A participação da PP1 na regulação do metabolismo do glicogênio e seus mecanismos de regulação envolvidos neste processo têm sido extensivamente investigados (Printen *et al.*, 1997; Berman *et al.*, 1998; Fong *et al.*, 2000; Gasa *et al.*, 2000). Vários estudos demonstraram que a atividade da PP1 sobre as enzimas do metabolismo de glicogênio (glicogênio sintase, glicogênio fosforilase e fosforilase quinase) é facilitada e estimulada através da ligação da subunidade catalítica da fosfatase a quatro subunidades moduladoras distintas, entre elas a G_M (R_{GL} ou PPP1R3), presente no músculo esquelético e a G_L (PPP1R4) que é expressa exclusivamente em fígado.

Sob determinadas condições metabólicas a G_M liga a subunidade catalítica da PP1 formando um complexo denominado PP1G. Após formação do complexo, a PP1G apresenta atividade bastante aumentada contra a fosforilase a e a sintase b do glicogênio. A formação do complexo PP1G é modulada pela PKA e provavelmente pela GSK3. A PKA fosforila dois sítios na subunidade G, denominados 1 e 2. A fosforilação do sítio 1 (Ser 48) aumenta a afinidade da PP1 pela subunidade G, enquanto que a fosforilação do sítio 2

(Ser 67) que ocupa posição X no motivo **RVXF** abole a interação, permitindo assim que a fosfatase vá para o citossol (Hubbard & Cohen, 1989; Liu & Brautigan, 2000). Esse modelo é corroborado pela observação que certos hormônios e drogas que aumentam a concentração intracelular de cAMP, e consequentemente ativam a PKA, reduzem muito a quantidade de PP1 associada a partículas de glicogênio, que agora pode ser encontrada na fração solúvel (Hiraga & Cohen, 1986; Hubbard & Cohen, 1989). Por outro lado, o complexo PP1/G_L parece não ter sua atividade regulada por fosforilação como ocorre com a subunidade G_M, mas parece sofrer regulação alostérica pela fosforilase α do glicogênio (Doherty *et al.*, 1996). A fosforilase ao ligar-se a uma porção carboxi-terminal da G_L causa uma inibição da atividade de PP1c contra as enzimas do metabolismo do glicogênio (Armstrong *et al.*, 1998).

Outras holoenzimas formadas pela PP1c, denominadas PP1M, são responsáveis pela desfosforilação da cadeia leve de miosina do músculo liso e do músculo esquelético. No músculo liso, a PP1c está complexada às proteínas M130 e M20 que a direcionam para miofibrilas e estimulam sua atividade catalítica frente à miosina (Alessi *et al.*, 1992).

Recentemente foi demonstrado que a PP1 juntamente com a FCP1 (fosfatase que desfosforila CTD) são conjuntamente responsáveis pela desfosforilação do CTD (*carboxi terminal domain*) da RNA-polimerase II. O inibidor nuclear da PP1 (NIPP-1) inibe a desfosforilação do domínio CTD pela PP1 e encontra-se associado com a CTD-quinase (Nekhai *et al.*, 2002; Washington *et al.*, 2002). A PP1 e o NIPP-1 foram identificados como componentes do complexo formado pelo ativador transcricional (Tat) associado com a RNA polimerase II que regula a transcrição do HIV-1. Estudos indicam que a PP1 é necessária para a transcrição do HIV-1. Assim, a PP1 nuclear poderia ser considerada um fator da célula hospedeira que é requerido para a transcrição do HIV-1, representando, portanto, um novo alvo para drogas anti-HIV-1 (Ammosova *et al.*, 2003).

Como já mencionado nos itens anteriores, a PP1 desempenha um papel importante na mitose em vários organismos. A análise de mutantes condicionais para a PP1 revelaram a interrupção da anáfase em *Aspergillus nidulans*, o bloqueio da separação dos cromossomos em *S. pombe*, defeitos como a má formação do aparelho mitótico em *D. melanogaster* e *S. cerevisiae*

(Doonan & Morris, 1989; Ohkura *et al.*, 1989; Axton *et al.*, 1990; Sassoon *et al.*, 1999). Ademais, a PP1 atua em conjunto com a quinase Aurora para manutenção dos níveis de fosforilação da histona H3 durante a mitose em *S.cerevisiae* e *C.elegans* (Hsu *et al.*, 2000).

Em células de vertebrados, a microinjeção de anticorpos anti-PP1c no início da mitose causa a manutenção das células em metáfase (Fernandez *et al.*, 1992) e inativação específica da PP1c γ 1 interfere com a citocinese (Cheng *et al.*, 2000). A PP1 e a quinase Nek2 formam um complexo que está envolvido na separação dos centrôssomos e que conta com a participação importante de I-2, como detalhado no item 1.4.2 (Helps *et al.*, 2000; Eto *et al.*, 2002; Leach *et al.*, 2003).

Entre os prováveis substratos nucleares da PP1 estão a CDK1 (cyclin dependent kinase 1), a lamina e a pRb, proteína do retinoblastoma, descrito como um importante supressor tumoral (Rubin *et al.*, 1998; Berndt, 1999). Em mamíferos, isoformas distintas da PP1 atuam na desfosforilação de pRb na saída da mitose (Rubin *et al.*, 2001).

A PP1 também está envolvida na meiose. Em *S.cerevisiae*, alguns mutantes do gene *glc7*, que codifica para PP1c, apresentam problemas na esporulação e foi demonstrado que a PP1c é a provável responsável pela desfosforilação de Red1, uma proteína que quando fosforilada pela quinase Mek1 garante o término da recombinação meiótica (Bailis & Roeder, 1998; Ramaswamy *et al.*, 1998).

Entre diversos processos fisiológicos que têm a participação da PP1, vale ressaltar a desfosforilação de proteínas que participam no processo de apoptose, tais como Bad (Ayllon *et al.*, 2002). Em leveduras, também já é conhecido o envolvimento da PP1 na desfosforilação da quinase Snf-1 com conseqüente inativação desta quinase e restabelecimento da utilização de glicose como fonte de energia e retomada de vias anabólicas após estresse nutricional (Tu & Carlson, 1995). Outros processos que contam com a participação da PP1, incluem a desfosforilação do fator de tradução eIF2 α durante a recuperação de situações de estresse e a regulação da atividade de receptores envolvidos na liberação intracelular de cálcio (Ceulemans & Bollen, 2004).

1.6. Fosforilação reversível de proteínas em *Neurospora crassa*.

O fungo filamentoso *Neurospora crassa* é um microorganismo encontrado em áreas tropicais e subtropicais, crescendo em árvores e restos de celulose. É conhecido pelo nome vulgar de “bolor rosa de pão” por ser um contaminante comum de padarias. *N. crassa* é aeróbio restrito, não patogênico para o homem, animais ou plantas, crescendo em meios sólidos ou líquidos quase exclusivamente como um micélio composto de hifas tubulares, ramificadas, polinucleadas e septadas (Schmit & Brody, 1976; Metzenberg, 1979; Perkins, 1992).

No ciclo de vida de *N. crassa* a reprodução pode ser tanto assexual (fase vegetativa) como sexual, apresentando dois tipos sexuais compatíveis. O micélio de fase vegetativa é composto por hifas contendo núcleo haplóide com sete cromossomos. Durante a fase assexuada, a reprodução ocorre sobre duas formas de conídios: macro e microconídios. Os macroconídios são originados das hifas aéreas por constrição de sua parede celular. Tais hifas são obtidas de culturas maduras, que podem ser originadas da transferência periódica de macroconídios para meio de cultura fresco. Os microconídios, por outro lado, são formados pela liberação direta de células miceliais de fase estacionária, sendo uninucleadas, menores e produzidas em menor número e com germinação esporádica (Prakash, 1972; Metzenberg, 1979; Springer, 1993). Os requerimentos nutricionais simples, facilidade de cultivo e o desenvolvimento de estudos pioneiros, tanto em bioquímica como em genética, tornaram *N. crassa* um excelente modelo experimental (Perkins, 1992; Davis & Perkins, 2002). Estas qualidades foram agora reforçadas com a elucidação da sequência do genoma de *N. crassa*, que permitiu a anotação de 10000 genes que codificam proteínas, sendo que uma larga proporção não possui ortólogos em leveduras e são alvos potenciais para novas drogas anti-fúngicas (Galagan *et al.*, 2003; Borkovich *et al.*, 2004).

Entre as primeiras evidências sobre interconversão de enzimas por fosforilação/desfosforilação em eucariotos primitivos estão os estudos sobre metabolismo de glicogênio em *Neurospora crassa*, realizados nos anos 70, que sugeriam a participação da via de sinalização controlada por AMP cíclico (Tellez-Inon & Torres, 1970; Gold *et al.*, 1974; Pall *et al.*, 1981). A proteína

quinase melhor caracterizada em *N. crassa* é a PKA (Gold & Segel, 1974; Trevillyan & Pall, 1982; Bruno *et al.*, 1996), contudo nenhum substrato para esta quinase foi ainda claramente identificado neste fungo. Análise do mutante *mcb* (deficiente na subunidade regulatória da PKA) sugere que esta enzima participa na via que controla crescimento polarizado em *N. crassa* (Bruno *et al.*, 1996). Também foram identificados em *N. crassa*, genes para PKC e, aparentemente esta enzima está envolvida na resposta deste fungo a sinais luminosos que influenciam o seu desenvolvimento, a produção de carotenóides e o ritmo circadiano (Arpaia *et al.*, 1999).

Nove genes que codificam quinases da cascata das MAPKs foram identificados no genoma de *N. crassa*, cujos produtos poderiam compor três cascatas (três módulos de três quinases, MAPKKK, MAPKK, MAPK) que possivelmente participam de respostas a estresses, a feromonios/filamentação e de manutenção da integridade celular (Borkovich *et al.*, 2004). A inativação de genes da cascata das MAPK tem efeitos pleiotrópicos, afetando por exemplo a formação de hifas normais (Kothe & Free, 1998b; Pandey *et al.*, 2004). O produto do gene *cot1*, cuja função está associada a morfologia micelial, codifica uma serina/treonina quinase que possui ortólogos tanto em *Drosophila* como no homem (Yarden *et al.*, 1992; Justice *et al.*, 1995; Dickman & Yarden, 1999).

Contudo, ainda que uma atividade de tirosina quinase tenha sido detectada em membranas de células de *N. crassa*, não há genes codificadores desta classe de enzimas em seu genoma, assim como verificado para outros fungos filamentosos (Fawell & Lenard, 1988; Dickman & Yarden, 1999; Borkovich *et al.*, 2004). Por outro lado, representantes da família das histidina quinases, típicas do sistema de dois componentes encontrado em procariotos, foram identificadas em fungos filamentosos, incluindo *N. crassa* (Swanson *et al.*, 1994; Alex *et al.*, 1998; Dickman & Yarden, 1999). O genoma de *N. crassa* codifica para 11 histidina quinases putativas, sendo que duas delas são aparentemente sensores de luz e outras duas estão envolvidas no desenvolvimento de hifas (Alex *et al.*, 1998; Mannhaupt *et al.*, 2003).

As atividades de proteínas fosfatases de *N. crassa* foram inicialmente medidas em extratos brutos pela reação de inativação da glicogênio-fosforilase (Tellez-Inon & Torres, 1970). Nestes ensaios foi verificado que a atividade de

fosforilase fosfatase é estimulada na presença de ATP/Mg²⁺ e inativada na presença de Mg²⁺ (Tellez-Inon & Torres, 1973). Os autores consideraram esse fato uma evidência de controle por fosforilação/desfosforilação na atividade de fosforilase fosfatase em *N. crassa*. Entretanto, à luz dos conceitos atuais de modulação da atividade de subunidades catalíticas de fosfatase, a ativação verificada provavelmente reflete a fosforilação de alguma subunidade reguladora da fosforilase fosfatase, cuja atividade estava sendo medida.

Além da participação no controle do metabolismo de glicogênio, existe evidência, em *N. crassa*, do envolvimento de proteínas fosfatases nas vias de transdução que controlam a síntese de pigmentos carotenóides, as respostas fototrópicas, a conidiogênese, o crescimento de hifas, entre outros importantes processos fisiológicos (Lauter & Russo, 1990; Dickman & Yarden, 1999; Yang *et al.*, 2004).

As subunidades catalíticas das fosfatases do tipo 1, 2A de *N. crassa* foram isoladas e caracterizadas bioquímica e funcionalmente (Szoor *et al.*, 1995; Zapella *et al.*, 1996; Szoor *et al.*, 1997; Zapella, 2001) sendo que os genes e/ou cDNAs que codificam estas enzimas também já foram caracterizados (Yatzkan & Yarden, 1995; Zapella, 2001; Zeke *et al.*, 2003). A PP2A está envolvida no processo de crescimento das hifas, na microconidiação e no desenvolvimento de *N. crassa*. Além disso a inativação do gene de sua subunidade catalítica é letal (Yatzkan & Yarden, 1995; Yatzkan *et al.*, 1998; Yatzkan & Yarden, 1999). Dados da literatura sugerem que os níveis do mRNA da PP1c e de atividade da enzima variam durante a germinação e nos estágios iniciais de formação de micélios (Zeke *et al.*, 2003). Estas observações contrastam com dados de nosso grupo que não indicaram variações significativas nos níveis de mRNA da PP1c ao longo da fase de crescimento deste fungo (Zapella, 2001).

Tanto a PP1 como a PP2A estão envolvidas na regulação do ritmo circadiano em *N. crassa*, atuando coordenadamente com quinases, como a CKII, para determinar o estado de fosforilação da proteína FRQ (FREQUENCY) que é um dos componentes chave nesta resposta (Yang *et al.*, 2004).

A PP2Bc (calcineurina) também foi clonada (Higuchi *et al.*, 1991) e caracterizada em *N. crassa* como sendo essencial para o crescimento e morfologia das hifas (Prokisch *et al.*, 1997; Kothe & Free, 1998a). Além disso,

cDNAs de *N.crassa* que codificam para uma PP do tipo 5 (PP5) (Yatzkan & Yarden, 1997) e uma fosfatase do tipo PPZ (Szoor *et al.*, 1998) já foram isolados, mas suas funções neste fungo ainda são desconhecidas.

A anotação do genoma de *N.crassa* confirmou a existência de genes codificadores de subunidades catalíticas das fosfatases mencionadas acima e revelou a existência de ORFs que codificam outras serina/treonina fosfatases, totalizando 8 genes codificadores de proteínas fosfatases da família PPP e dois genes de fosfatases da família PPM (Borkovich *et al.*, 2004). Contudo, ainda são muito poucas as subunidades reguladoras de proteínas fosfatases identificadas em *N.crassa* (Borkovich *et al.*, 2004). Até o momento, além da subunidade reguladora da calcineurina, apenas duas subunidades reguladoras da fosfatase 2A (Yatzkan & Yarden, 1999; Borkovich *et al.*, 2004) e uma proteína denominada INc-1 e que é ortóloga de I-2 (Zapella *et al.*, 1996; Zapella, 2001) foram identificadas neste fungo.

1.6.1. Características do INc-1 de *N.crassa*

Simultaneamente ao trabalho de caracterização bioquímica de proteínas fosfatases em extratos de *Neurospora crassa*, foi identificada uma fração inibitória específica para PP1c, a qual foi purificada até homogeneidade e denominada INc-1. O INc-1 apresenta diversas características bioquímicas comuns as subunidades reguladoras de PP1c de outros mamíferos e leveduras e, resultados preliminares sugerem que esta proteína estabeleça interação direta com a PP1c. *In vitro*, INc-1 purificado atua como inibidor da atividade de fosforilase fosfatase de PP1 e constitui-se no primeiro exemplo de subunidade reguladora da PP1 descrito em fungos filamentosos (Zapella *et al.*, 1996; da-Silva *et al.*, 1999; Zapella, 2001).

A partir do INc-1 purificado de micélios de *N.crassa* foram obtidas seqüências parciais de aminoácidos de três fragmentos proteolíticos, as quais foram utilizadas em buscas na base de dados do projeto de seqüenciamento do genoma de *N.crassa* (<http://mips.gsf.de/proj/neurospora/>), que disponibilizava, naquele momento, seqüências parciais dos insertos dos clones de BAC (Bacterial Artificial Chromossomes). Assim, foi identificada uma ORF hipotética que codificaria para uma proteína contendo seqüências de

aminoácidos idênticas as seqüências dos peptídeos derivados de INC-1, o qual está localizada no clone de BAC c13D20 (figura 1). A proteína codificada por esta ORF seria constituída por 348 resíduos, com uma massa molecular estimada de aproximadamente 38kDa e um pI teórico de 4.99, refletindo os quase 20% de resíduos com grupamentos ácidos nas cadeias laterais presentes em sua seqüência. Esses aminoácidos ácidos somados aos básicos perfazem quase 34% dos resíduos totais da seqüência e se somados aos aminoácidos não carregados, mas polares, equivalem a 59% dos resíduos (Zapella, 2001). Relação semelhante a essa é observada também para o I-1 e I-2 de mamíferos que possuem apenas ~20% de aminoácidos hidrofóbicos (Holmes *et al.*, 1986).

A análise dessa ORF demonstrou existirem sítios teóricos para diversas alterações pós-traducionais incluindo fosforilação por GSK3 e PKA. *In vitro*, INC-1 purificado de micélios é fosforilado por essas duas quinases, sugerindo assim que possam participar da regulação do inibidor *in vivo*. Resultados iniciais demonstraram, ainda, que a fosforilação do INC-1 por PKA parece não afetar sua atividade inibitória de INC-1 contra PP1c (Zapella, 2001). Além disso, a análise comparativa da seqüência desta ORF que teoricamente codificaria para INC-1 com suas ortólogas (figura 2), mostrou que esse inibidor contém os cinco domínios equivalentes identificados no I-2 de mamíferos e que comprovadamente são importantes para a interação com PP1 (Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Zapella, 2001). Além destes domínios, o INC-1 possui domínios adicionais que poderiam lhe conferir outras propriedades na regulação da PP1c em *N.crassa*. Estudos adicionais sobre INC-1 serão facilitados com a clonagem de seu gene e obtenção da proteína recombinante, objetivos que foram propostos e realizados no presente trabalho.

2. Objetivos

Neste trabalho tivemos como objetivos a clonagem e o seqüenciamento da seqüência codificadora de INC-1, um inibidor da PP1c de *N. crassa*, para obtenção da proteína recombinante expressa em bactérias. A funcionalidade de INC-1 recombinante foi testada quanto a sua capacidade de inibição da PP1c recombinante de *N.crassa*. A estrutura do gene de INC-1 foi parcialmente

investigada, bem como os níveis de sua expressão ao longo do crescimento do fungo.

```

1  MSTIMASSET HTPPPSTVPR PKGMLSQ LPS QSSDAVAQFL ALACTYTVVD IRLLTDALPP

61  GILKNSYRNS PPAGPTSPLD THHHDAAHPP PLIHMPSSAK EAKEITIMNT QINAGPRRSS
                                           KEITIMNT QINAGPRRRS
                                           ***** ***** *

121 SVAGSRPGLS GSRRSTTPSH HGDEDSTEQG QRLKWDEANL YLTEQERSST MKIDEPKTPY
    SVAG
    *****

181 AKHYDEAEDP SDDDEEVPEA IDPNKIDMDR VDGLSPLPRQ NKRRHGNIDD EIPGLSLGEP
                                           KRRHGNIDD EIPGLSLGEP
                                           ***** *****

241 EEAVEEGGF P FGKGATAHSE DGGSPKRPRA VHVDSNGSGH DPDDELVGLS AEEREKHRKF
    xEAVPI                                KRPRA VHVDSNGgGH xPPdd
    ***** ***** ** * *

301 EEMRKKHYEM KSVASLLGHP ENLEDEDEDE DEEIPVLPAL PTRSNGSS*

```

Figura 1. ORF hipotética de INC-1 identificada na sequência do clone BAC c13D20 do projeto genoma de *N. crassa*. As seqüências dos fragmentos proteolíticos derivados de INC-1 nativo são apresentadas em negrito abaixo da seqüência teórica da ORF. Resíduos idênticos entre a seqüência obtida no microsequenciamento dos fragmentos de INC-1 e a ORF teórica deduzida da seqüência do clone BAC c13D20 estão indicados por um asterisco na terceira linha de cada bloco(*). As regiões da ORF que apresentam similaridade ao fragmentos proteolíticos de INC-1 estão coloridas. O início da seqüência utilizada no alinhamento mostrado na figura 2 está sublinhado (retirado de Zapella, 2001).

RAT	1	MAASTASHRPIKGILKNK	-----
RABBIT	1	MAASTASHRPIKGILKNK	-----
HUMAN	1	MAASTASHRPIKGILKNK	-----
DROSOPHILA	1	MONNPSPQLCKGILKTS	-----
GLC8	1	-----MGGILKN-----PLA-----LSPEQLAQOD-----PETLEEFRRQVYE	
INC-1	1	-----GILKNSYRNSPPAGPTSPLDTHHHDAHPPLIHMFPSSAKEAKEITIM	
1			
RAT	19	-----TSTTSSVVASAEQPRRTVEEELSKKS	
RABBIT	19	-----TSSTSSRVASAEQPRGSVDEELSKKS	
HUMAN	19	-----TSTTSSMVASAEQPRGNVDEELSKKS	
DROSOPHILA	19	-----RSFDKSGAIF-----RKS	
GLC8	34	NTQKNA---KLTSHKRNPGLDNTKEEGEIIIGTSSTFLPKDTLSLKHEQDMIAKMTPEER	
INC-1	49	NTQINAGPRRSSSVAGSRPGLSGSRRST---TPSHHGDEDST---EQC-----QR	
RAT	45	QKWDEMNILATYHPADKDYGLMKIDEEDTPYHNMIGDDEDVCS---DSEGNVMTPEILA	
RABBIT	45	QKWDEMNILATYHPADKDYGLMKIDEESTPYHSMIGDDDDAYS---DTETTEAMTPDTLA	
HUMAN	45	QKWDEMNILATYHPADKDYGLMKIDEFSTPYHSMIGDDEDACS---DTETTEAMADILA	
DROSOPHILA	32	AKEDENLVKQTHHPADKDYGHMKIDEPKTPYNYTEGFI-----ENRDELDTETLV	
GLC8	91	VQWNRNLAENEITKNGQDIHIDEPKTPYQGAIDPHGEYYRVDDDE-----D	
INC-1	93	LKWDEANLYLTE---QERSSTMKIDEPKTPYAKHYDPAEDP-S-DDDEEVPEAIDUNKID	
		5	2
RAT	102	KKLAAAEGSEPKERTREQESSGFENPLS-----	
RABBIT	102	KKLAAAEGSEPKYRIREQESSGFENSDLS-----	
HUMAN	102	KKLAAAEGLEPKYRIQREQESSGFENSDLS-----	
DROSOPHILA	82	EKLRIANQCHSTESIQEGSSGDDQPLS-----	
GLC8	139	EDNSD-----KQPCVANDDIDLSLGEPEFEIKENKQPDFETNDENED--SPE-	
INC-1	148	MDRVDGLSPLEFQNKPRHGNIDDEIPGLSLGEPEEAVPEGGFPPGKGATAHSEDGGSPKR	
RAT	131	-----PEEREKKRQFEMKRKLHYNEGLNIKLARQLISK-ELH	
RABBIT	131	-----PEEREKKRQFEMKRKLHYNEGLNIKLARQLISK-ELH	
HUMAN	131	-----PEEREKKRQFEMKRKLHYNEGLNIKLARQLISK-ELH	
DROSOPHILA	111	-----EEERQRRREFEERKKAHYREFEAVKLARKLIQEEDD	
GLC8	187	-----ARHKKFEEMRKHY-IVRAIFNKISR-EALKDE	
INC-1	208	PRAVHVDSNGSGHDPDELVLGLSAEEREKKRKFEMRKHY-EMKSVASLLGHPENLEDE	
		3	
RAT	167	DDDEDEEMSETADADSMNIEESNQGSTAGCHLQHRKQSS-----	
RABBIT	167	DDDEDEEMSETADGESMNTESNQGSTPSDQRCNKSSQSS-----	
HUMAN	167	DDDEDEEMLETAADGESMNTESNQGSTPSDQRCNKLRSS-----	
DROSOPHILA	148	DDDEPKGADSRPSSSQGASSSGRFASSSTKRSSSQADSTTSPSTSAGQNMDLEPSNN	
GLC8	218	DEDELESTIKEP-----	
INC-1	267	DEDEDEETPEVPALPDRSNGSS-----	
		4	

Figura 2. Comparação entre as seqüências de I-2 de rato (rat), coelho (rabbit), humano (human), *Drosophila melanogaster* (drosophila), *glc8* (*S. cerevisiae*) e a ORF teórica de INC-1. Os resíduos aminoterminais de INC-1 anteriores a GILKN foram suprimidos para facilitar o alinhamento entre as seqüências. Posições sombreadas em preto representam resíduos idênticos entre as duas seqüências. Posições sombreadas em cinza representam substituições conservativas do resíduo. As regiões numeradas indicadas pelas caixas estão discutidas no texto (retirado de Zapella, 2001).

3. Procedimentos Experimentais

3.1. Manutenção, cultivo e obtenção de células de *N.crassa*

Em nossos experimento utilizamos a linhagem selvagem FGSC-424 obtida no *Fungal Genetics Stock Center*, Kansas City, Kansas, EUA, a qual foi mantida e cultivada no laboratório do Prof. Héctor Franscisco Terenzi, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto.

Para o cultivo de *N. crassa* foi utilizado o meio salino de (Vogel, 1956) que é preparado pela diluição 1:50 de uma solução de sais [citrato de sódio.H₂O 15%; KH₂PO₄ 25%; NH₄NO₃ 10%; MgSO₄.7H₂O 1%; CaCl₂.2H₂O 0,5%; clorofórmio 0,03% (v/v) como agente conservante]; solução de biotina 0,5% (v/v); solução de sais 0,5% (v/v) e suplementado com a fonte de carbono desejada. A solução de biotina foi preparada pela dissolução de 50mg de biotina em álcool etílico 50% (v/v). A solução de traços de elementos foi preparada pela diluição em água destilada de MgSO₄.7H₂O 5%; ácido cítrico.H₂O 5%; ZnSO₄.7H₂O 5%; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O 1%; CuSO₄.5H₂O 0,25%; MnSO₄.H₂O 0,05%; H₃BO₃ 0,05%; NaMoO₃. 2H₂O 0,05%. Para a preparação do meio de Vogel mínimo sólido acrescentou-se 1,5% de ágar.

A linhagem foi cultivada em tubo de ensaio contendo meio Vogel mínimo sólido e os repiques foram realizados utilizando-se alça de platina, transferindo-se pequenas quantidades de micélio para tubos de ensaio contendo meio de cultivo. Após cultivo a 30°C por dois dias ao abrigo da luz, as células foram transferidas para temperatura ambiente, em presença de luz para estimular conidiação. As células foram coletadas após de cultivo mínimo de 7 dias e máximo de 15 dias.

Para a produção de conídios em maior escala, o cultivos foram realizados em frascos de 250mL contendo 40mL de meio Vogel mínimo sólido nas condições descritas acima. Os conídios foram coletados por ressuspensão em meio de Vogel líquido estéril com sacarose 2%, seguindo-se filtração através de gaze com o objetivo de reter fragmentos de micélio. A concentração de conídios usada foi de 1 a 3 x 10⁷ conídios/mL, calculada através da contagem realizada em câmara de Neubauer.

A suspensão de conídios foi germinada a 30°C sob agitação a 120rpm e as amostras (massa conidial ou micelial) foram coletadas nos tempos

desejados no intervalo de 0h a 72 horas por filtração em funil de Buchner. Em seguida foram lavadas com água destilada, rapidamente prensadas em papel de filtro, embrulhadas em papel alumínio e congeladas em gelo seco. Os conídios germinados e os micélios assim obtidos foram mantidos a -80°C e transportados, quando necessário, em gelo seco.

3.2. Procedimentos para manipulação de bactérias

3.2.1. Manutenção e cultivo de bactérias

Para a clonagem e preparação das construções plasmidiais utilizamos *Escherichia coli*, cepa Sure {e14⁻(McrA⁻)Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB rscJ sbcC umuC.Tn5 (Kan^r) uvrC [F⁺proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]^c} da Stratagene. Para a expressão de proteínas recombinantes foram utilizadas as cepas BL21(DE3) [F⁺ ompT hsd S_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)] e BL21(DE3)PLysS {BF⁻dcm ompT hsdS (r_B⁻m_B⁻) galλ (DE3) [pLysS Cam^r]} da Stratagene.

Cuturas das bactérias *E. coli* BL21(DE3), Sure ou BL21(DE3)PLysS foram mantidas em meio LB ou 2x TY contendo glicerol 20% (v/v) a -80°C. Quando necessário, alíquotas destes estoques foram semeadas em placas de meio LB [Tryptona 1% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v) e ágar 1,5% (p/v), pH 7,5] ou, no caso da BL21(DE3)PLysS, em placas 2x TY [Tryptona 1,6% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v), NaCl 8,5mM e ágar 1,5% (p/v), pH 7,4] contendo cloranfenicol 34μg/mL, seguindo-se incubação a 37°C por uma noite.

Para obtenção de culturas em meio líquido, uma colônia foi inoculada em 3mL de meio LB líquido ou 2x TY líquido e crescida a 37°C por uma noite com agitação a 225rpm, e uma fração desta cultura foi utilizada como pré-inóculo para obtenção de culturas em maior volume para obtenção de bactérias competentes, preparação de plasmídeos ou obtenção de proteínas recombinantes.

3.2.2. Preparo de bactérias competentes para transformação por eletroporação

Cerca de 2,5mL (pré-inóculo) dos cultivos obtidos como descrito no item anterior foram transferidos para 250mL de meio LB líquido ou 2x TY líquido frescos seguindo-se crescimento a 37°C por 2 a 3 horas com agitação a 225rpm, até que a DO_{600nm} atingisse ~0,5.

As células bacterianas assim obtidas, foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis, incubadas em gelo/água por 15 minutos e posteriormente coletadas por centrifugação 4000rpm, 15 minutos a 4°C (*Rotor SS-34 SORVALL*). O sedimento foi ressuspense em 250mL de água Milli-Q estéril gelada e centrifugado nas condições anteriores. A etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes, as células ressuspensas em 25mL de glicerol 10% (v/v) gelado e submetidas a centrifugação novamente. Por fim, as bactérias foram ressuspensas em 500µL de glicerol 10% (v/v), sendo que alíquotas de 50µL foram distribuídas em microtubos estéreis, imediatamente congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a -80°C.

3.2.3. Transformação de bactérias por eletroporação e seleção dos clones transformantes

Aproximadamente, 0,1µg de DNA (plasmídeos ou produtos de reações de ligação de DNA) foi adicionado a 50µL de bactérias competentes e a mistura foi transferida para uma cubeta (*gene pulser cuvette 0,2cm, Bio-Rad Laboratories*) previamente resfriada. Em seguida as células foram submetidas a eletroporação a 2500V, 50µF e 129Ω no aparelho *Electro Cell Manipulator, (BTX Molecular Delivery Systems)*. Imediatamente, foi adicionado 1mL de meio LB ou meio 2x TY, sendo a suspensão bacteriana transferida para tubo de cultura e incubada a 37°C por 1 hora a 200rpm. Após esse período de recuperação alíquotas de 10, 30, 100 e 860µL foram semeadas em placas de meio LB contendo carbenicilina 100µg/mL ou meio 2x TY contendo carbenicilina 100µg/mL e cloranfenicol 34µg/mL. Note-se que alíquotas maiores que 300µL foram submetidas à centrifugação (16000xg por 1 minuto à temperatura ambiente) e o precipitado de células foi ressuspense em 100µL de

meio LB ou 2x TY antes da semeadura. As placas foram então incubadas a 37°C por uma noite.

As colônias resistentes ao antibiótico foram tocadas com um palito estéril, o qual foi utilizado para a inoculação de 3 mL de meio LB contendo carbenicilina 100µg/mL ou meio 2x TY contendo carbenicilina 100µg/mL e cloranfenicol 34µg/mL. As culturas líquidas foram incubadas a 37°C por uma noite a 225rpm, e diretamente utilizadas para a minipreparação de plasmídeos ou para experimentos de indução da expressão da proteína recombinante, como descrito adiante.

3.3. Procedimentos de 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 adaptadas de protocolos descritos nos manuais dos fabricantes de reativos para Biologia Molecular, bem como de protocolos descritos por Sambrook e colaboradores ou por Ausubel e Frederick (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel & Frederick, 1995).

Reações de digestões dos plasmídeos com enzimas de restrição (1U/µg DNA) foram realizadas por 1 a 2 horas a 37°C, nos tampões apropriados para cada enzima. Reações de ligação de DNA foram realizadas com T4 DNA ligase (1U/µg DNA) a 14 ou 16°C por uma noite, utilizando o tampão que acompanha a enzima.

3.3.1. Minipreparação de RNA total de *N. crassa*

RNA total foi extraído de extratos de *N. crassa* de diferentes fases de crescimento (0 a 72 horas), os quais foram obtidos a partir de 0,1g da massa de conídios ou micélios congelados triturados na presença de nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. O pó resultante da trituração foi ressuspense em 1mL de Trizol® (*Invitrogen Life Technologies*) e o microtubo foi agitado até completa ressuspensão. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 0,2 volumes de CHCl₃, seguindo-se agitação vigorosa e incubação por mais 3 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 16000xg por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi retirada e transferida para outro microtubo. A esta fase foi adicionado meio volume de isopropanol

seguindo-se incubação por 10 minutos. O microtubo foi centrifugado a 16000xg por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com igual volume de etanol 75% (v/v) por centrifugação nestas mesmas condições. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco em *concentrador a vácuo* (*Eppendorf Concentrator 5301*) por 5 minutos.

O precipitado de RNA total foi ressuspensão em 50µL de H₂O livre de RNase e a amostra foi aquecida por 10 minutos a 65°C. A concentração final do RNA total foi estimada pela medida da absorbância 260nm, onde Abs₂₆₀= 1 equivale a 40µg de RNA/mL, e a sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído.

3.3.2. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído

Cerca de 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) e 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 Ausbel et al., 1995. A eletroforese foi realizada a 40 - 60 V em aparato exclusivo para eletroforeses de RNA, mantido livre de contaminação com RNases.

3.3.3. Descrição dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e RT-PCR para amplificação da sequência codificadora do INC-1 (oligos INC-1F e INC-R), e nas reações de sequenciamento [M13 Reverse Primer e M13 Forward (-20) Primer], foram sintetizados sob encomenda na empresa *Invitrogen Life Technologies*.

As seqüências dos oligonucleotídeos INC-1F e INC-R, representadas abaixo, foram derivadas da seqüência de DNA que codifica a ORF hipotética de INC-1 anotada no genoma de *N.crassa*, descrita na Introdução (ver item

1.6.1). A seqüência do oligonucleotídeo INc-1F, inclui os códons para duas metioninas (seqüências grifadas) amino-terminais, uma vez que desconhecemos qual corresponde ao códon de iniciação utilizado na tradução do INc-1 nativo. A seqüência do oligonucleotídeo INc-1R, inclui o códon de terminação TAG (seqüência grifada).

INc-1F: 5' CATATGTCAACCATCATGGCATCGTC 3'

INc-1R: 5' CTACGACGATCCATTGGACCGTGT 3'

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento do INc-1L ou INc-1 flanqueiam o sítio de clonagem no vetor pCR2.1 e apresentam as seqüências representadas abaixo:

M13R: 5'GAGGAAACAGCTATGACC 3'

M13F(-20): 5' GTAAAACGACGGCCAG 3'

3.3.4. PCR e RT-PCR

Para amplificação da seqüência codificadora do INc-1L através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizamos a enzima *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*) em reações de 50µL contendo oligonucleotídeos 0,5µM, dNTPs 0,2mM (para cada nucleotídeo), tampão da *Taq* DNA polimerase, MgCl₂ 1,5mM e DNA molde em concentração variável (200-1000ng). As reações foram realizadas em termociclador (*Perkin Elmer*) com desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, seguindo-se 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 60 segundos e 72°C por 90 segundos. Como molde nestas reações de PCR utilizamos DNA do clone BAC C13d20 (adquirido do *Fungal Genetics Stock Center*, EUA) ou DNA de uma biblioteca de cDNA micelial de *N. crassa* (gentilmente cedida pela Prof^a. Maria Célia Bertolini, Instituto de Química, UNESP, Araraquara). Como será explicado adiante (itens 4.1. e 4.6.), a amplificação a partir do clone BAC C13d20 gerou um produto de com tamanho estimado de 1047pb, denominado INc-1L, enquanto que a amplificação a partir da biblioteca de cDNA originou um produto de 933pb, denominado INc-1.

As reações de RT-PCR (PCR precedida de transcrição reversa) foram realizadas com reagentes dos kits *SuperScript One-Step RT-PCR System™* e *SuperScript™ II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase* (Invitrogen Life Technologies) de acordo com os protocolos sugeridos pelo fabricante. A etapa de transcrição reversa foi realizada a partir de amostras de RNA total previamente tratado com DNase (*Invitrogen Life Technologies*), para eliminar eventual contaminação de DNA genômico da preparação, utilizando-se oligo dT₁₂₋₁₈ ou o oligonucleotídeo INc-1R na síntese da primeira fita. Em seguida a etapa de amplificação do cDNA foi realizada utilizando oligonucleotídeos INc-1F e INc-1R.

Os produtos de PCR ou RT-PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose, se necessário clonados em vetores apropriados e sequenciados.

3.3.5. 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 0,5µg/mL de brometo de etídio, a 80-90 Volts em TBE (Tris-HCl 89mM, ácido bórico 89mM e EDTA 2mM, pH8,0). 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.

3.3.6. Eluição de fragmentos de DNA transferidos para papel *Whatman DE81*

Após 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 2,5cm de papel *Whatman DE81* a frente do fragmento de interesse. A eletroforese foi continuada até que completa transferência dos fragmentos de DNA para o papel. Em seguida, o pedaço de papel contendo o DNA foi colocado em um microtubo contendo uma solução de 500µL de NaCl 1M em TE pH8,0. Após 1 hora de incubação, à temperatura ambiente, o sobrenadante contendo o DNA eluído foi coletado por

centrifugação a 16000xg por 10 minutos e transferido para um novo microtubo. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) e a solução foi submetida a centrifugação a 16000xg por 6 minutos, à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo, seguindo-se adição de mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v) e centrifugação (16000xg, por 6 minutos à temperatura ambiente). A fase aquosa foi transferida para novo tubo e a esta foi adicionado o dobro do volume de etanol 100%, seguindo-se centrifugação a 16000xg por 15 minutos à temperatura ambiente. O etanol foi aspirado e o DNA precipitado foi lavado com 500µL de etanol 70% (v/v) por centrifugação nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi seco em *concentrador a vácuo* (*Eppendorf Concentrator 5301*) por 5 minutos e ressuspenso em 20µL de TE [Tris 10mM, pH 8,0 e EDTA 1mM]. 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.

3.3.7. Clonagem de INc-1L e INc-1 em vetor de expressão

Os produtos de PCR, obtidos como descrito no item 3.3.4., foram ligados no vetor pCR2.1, que faz parte do *TA cloning Kit* (*Invitrogen Life Technologies*), utilizando-se as recomendações do fabricante. A ligação foi utilizada para a transformação de *E. coli* Sure seguida de seleção com carbenicilina. A orientação da clonagem do inserto foi verificada pela digestão de plasmídeos oriundos de 4 a 6 clones com a enzima *Apal* e dois clones foram selecionados para seqüenciamento do inserto correspondente a seqüência codificadora de INc-1L e de INc-1. As construções plasmidiais obtidas foram denominadas pCR2.1-INc-1L e pCR2.1-INc-1.

Os insertos destas construções foram excisados pela digestão com *Bam*HI e *Eco*RV e subclonados no vetor de expressão pAE (Junqueira de Azevedo *et al.*, 2001) previamente linearizado com *Bam*HI e *Pvu*II. Os sítios *Eco*RV e *Pvu*II, são perdidos após a ligação do inserto. A clonagem de INc-1L e INc-1 no vetor pAE está em fase na porção amino terminal com uma seqüência do vetor que codifica para seis resíduos de histidina. As construções obtidas, pAE-INc-1L e pAE-INc-1, foram eletroporadas na bactéria Sure, os plasmídeos foram isolados a partir de algumas colônias e submetidos a

digestão com *Bam*HI e *Kpn*I para verificação do sucesso da clonagem. Foram selecionados clones para preparação de plasmídeo em maior escala e transformação de bactérias visando a expressão recombinante.

No vetor pAE, a expressão da sequência de interesse está sobre o controle do promotor T7, que é reconhecido pela T7 RNA polimerase. A expressão pode ser induzida após transformação da cepa BL21(DE3)PLysS. Nestas cepas a T7 RNA polimerase está sobre o controle do promotor lacUV5, sendo sua expressão induzida pela adição de IPTG (Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo) à cultura bacteriana. Contudo, este promotor apresenta certo vazamento e alguma expressão da T7 polimerase pode ser observada mesmo em bactérias não induzidas. Na cepa BL21(DE3)PLysS, a presença do plasmídeo pLysS que codifica para a lisozima, um inibidor natural da T7 RNA polimerase, garante melhor controle na expressão da proteína recombinante, através da redução da habilidade da T7 RNA polimerase transcrever genes em células não induzidas.

3.3.8. Métodos de preparação de plasmídeos

3.3.8.1. Minipreparação pelo método de lise alcalina

As bactérias Sure foram crescidas em 1,5mL de LB contendo carbenicilina 100 μ g/mL a 37°C por uma noite a 225rpm e então submetidas a centrifugação a 16000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 100 μ L de solução GET/RNase (Tris-HCl 25mM, pH 8,0; glicose 0,5M; EDTA 10mM 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 0,2M] recém preparada misturando-se delicadamente por inversão até completa homogenização. A suspensão foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se a adição de 200 μ L de solução de neutralização (acetato de potássio 5M, pH 4,8) e misturando-se por inversão. Essa etapa foi seguida de incubação por 20-30 minutos a 4°C e centrifugação 16000xg 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 microtubo. Após

centrifugação 16000xg por 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500µL de etanol 70% (v/v) nas mesmas condições de centrifugação anteriores. O precipitado foi seco em *concentrador à vácuo* (*Eppendorf Concentrator 5301*), ressuspenso em 25µL de Tris 10mM pH 8,0 e mantido a -20°C.

3.3.8.2. Preparação em larga escala

Para obtenção de plasmídeos em maior quantidade, clones transformantes de *E. coli* Sure foram crescidos em 3mL de LB contendo carbenicilina 100µg/mL. Para 250mL de meio LB fresco com antibiótico nas mesmas proporções anteriores, foram adicionados 250µL de pré-inóculo, seguindo-se incubação a 37°C por uma noite a 225rpm. A cultura foi submetida a centrifugação 6500rpm por 10 minutos a 4°C em rotor GSA (*SORVALL*). O sobrenadante foi completamente removido e o sedimento ressuspenso em 15mL de solução I (Tris 20mM, pH 8,0; glicose 50mM e EDTA 10mM) acrescida de 75mg de lisozima. Foram adicionados 30mL de solução II [NaOH 0,2M, SDS 1% (p/v)] recém preparada e a suspensão foi misturada delicadamente por inversão. Por fim, foram adicionados 15mL de solução III (acetato de potássio 5M, pH 4,8), misturados e submetidos a centrifugação a 6500rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido em uma nova garrafa por filtração em gaze, acrescido de 36mL de isopropanol e submetido a centrifugação a 6500rpm 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 ressuspenso em 2,5mL de TE e transferido para um tubo de vidro de 15mL. A proteína foi precipitada pela adição de acetato de amônio 2,5M e incubação em gelo por 20 minutos. A mistura foi submetida a centrifugação a 8000rpm 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 8000rpm por 15 minutos a 4°C em rotor SS34 e o precipitado incubado a 37°C, até secar completamente. Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em TE adicionado de RNase (10µg/mL) e incubado a 37°C por 15 minutos. Após adição de NaCl para 1,5mM e ¼ do volume de

PEG/NaCl [PEG 6000-8000 30% (p/v) e NaCl 1,5M] a mistura foi incubada a 4°C por uma noite. O DNA precipitado foi centrifugado a 10000rpm por 15 minutos a 4°C rotor SS34 e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 50µL de água Milli-Q e então adicionado de 50µL de tampão PK 2X [Tris 20mM, pH 8,0; EDTA 10mM, pH 8,0 e SDS 1% (p/v)] e proteinaseK para concentração final 500µg/mL, seguindo-se incubação por 30 minutos a 37°C. Uma extração com igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) foi realizada seguida por uma extração com igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v). O DNA foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de acetato de potássio 3M, pH 5,5 juntamente com 2,2 volumes de etanol 100%, seguindo-se centrifugação a 16000xg por 15 minutos à temperatura ambiente. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) por centrifugação nas condições anteriores e, após aspiração de etanol, o DNA foi seco em *concentrador a vácuo* (*Eppendorf Concentrator 5301*) e finalmente ressuspenso em 50µL de TE. A determinação da quantidade de DNA foi feita pela medida da absorbância a 260nm, onde $Abs_{260}=1$ equivale a 50µg de DNA fita dupla/mL.

3.3.9. Seqüenciamento automatizado de DNA

O seqüenciamento foi realizado no aparelho *ABI 377 DNA Sequencer* (*Applied Biosystems*) conforme recomendações do fabricante. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se 4µL da mistura de reação *Big Dye terminator mix* (*Perkin Elmer*), 200-500ng de DNA, 20pmol de oligonucleotídeo, Tris base 40mM, pH 9,0 e $MgCl_2$ 1mM em um volume final de 20µL. A reação foi incubada por 5 minutos a 95°C e em seguida submetida a 30 ciclos (95°C por 30 segundos, 50°C por 10 segundos e 60°C por 4 minutos). Em seguida, o DNA foi purificado por precipitação com etanol, de acordo com as instruções do fabricante, e ressuspenso em tampão para aplicação no gel do seqüenciador automático. Para a determinação da seqüência do gene do INC-1 foram utilizados oligonucleotídeos derivados do vetor de clonagem pCR2.1 (item 3.3.3).

3.3.10. Hibridização de DNA e RNA com sonda radioativa

3.3.10.1. Preparação de sonda radioativa

A marcação da sonda de DNA foi feita com o *kit Random Primers DNA Labeling System* (GIBCO-BRL) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, utilizando 50 μ Ci de [α^{32} P] dATP e/ou [α^{32} P] dCTP. Utilizamos 25 μ L de uma solução contendo de 50ng a 100ng de DNA diluído em água (em geral fragmento de DNA purificado por eletroforese em gel de agarose) e que foi sempre previamente desnaturado por fervura durante 5 minutos e 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 1mL sem agulha que foi em seguida apoiada num tubo cônico de 15mL e preenchida com 0,9mL de resina Sephadex G-50 previamente equilibrada em TE. A resina foi lavada com 5 a 10mL de STE (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; NaCl 10mM e EDTA 10mM, pH 8,0) por centrifugação a 2500rpm por 3 minutos, à temperatura ambiente. Foram então adicionados 50 μ L da reação contendo a sonda radioativa seguindo-se eluição da sonda por centrifugação nas mesmas condições diretamente no tubo acoplado à seringa.

Para verificação da eficiência da incorporação radioativa, alíquotas de 1 μ L da sonda purificada e não purificada foram adsorvidas em pedaços de 1x1cm papel de filtro (em cada). Um pedaço contendo a sonda não purificada e outro contendo a sonda purificada foram tratados com 25mL de TCA 10% (v/v), a 4°C por 10 minutos, por duas vezes. Em seguida os papéis foram lavados com etanol e depois de secos, a radioatividade foi medida em 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.

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

Os produtos de RT-PCR das diferentes fases de crescimento de *N. crassa* foram separados em eletroforese em gel de agarose como descrito no item 3.3.5. O gel foi incubado respectivamente em solução de depurinação

(HCl 0,25M), em seguida em solução de desnaturação (NaCl 1,5M e NaOH 0,5M) e por último em solução de neutralização (Tris-base 1M e NaCl 1,5M, pH 7,4) cada uma por 30 minutos. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação branda.

A transferência para a membrana de náilon foi realizada por 1 horas no sistema de transferência por pressão (*Posi Blot® 30-30 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 no aparelho *UV Stratalinker 1800 (Stratagene)* de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram imediatamente utilizadas para hibridização ou embaladas em plástico e armazenadas.

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

Após a eletroforese do RNA total como descrito no item 3.3.2, o gel foi cuidadosamente transferido para uma cuba contendo solução 1 (NaOH 0,05M) por 30 minutos e em seguida em solução 2 (Tris-HCl 0,1M, pH 7,5 e NaCl 0,15M) também por 30 minutos. As incubações foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação branda.

Os procedimentos para transferência de RNA para membranas de náilon (*Northern blot*) foram realizados de modo similar ao descrito no item anterior, 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.

3.3.10.4 Hibridização de *Southern blots* e *Northern blots*

A membrana (*Southern* ou *Northern blot*) foi apoiada sobre uma tela de náilon e então colocada na garrafa de hibridização contendo solução de hibridização [Formamida 50% (v/v), Denhardtts 5X, SSPE 6X, SDS 0,1% (p/v) e DNA de esperma de salmão 100µg/mL]. Esta pré-hibridização foi realizada a 37°C por pelo menos 2 horas. Após este tempo a sonda radioativa foi acrescida à solução de hibridização seguindo-se incubação por no mínimo 12-16 horas a 37°C. Após hibridização foram realizadas duas lavagens da membrana com solução de lavagem SSPE 0,5X; NaCl 3M; NaH₂PO₄ 0,2M, pH 7,4; EDTA

20mM e SDS 0,1% (p/v) por 30 minutos a 65°C, sob agitação branda. Após secagem ao ar, a membrana foi envolvida em filme plástico para exposição a filme de raios-X a -80°C ou à temperatura ambiente, por períodos variados.

Nos casos em que foi necessária a re-hibridização da membrana, sonda foi removida pelo tratamento da membrana com Tris-HCl 0,2M, pH 7,5; SSC 0,1X e SDS 0,1% (p/v) a 80°C por 5 minutos por três vezes. A remoção completa da sonda era confirmada pela exposição da membrana a filmes de Raios-X por tempos prolongados antes da sua re-hibridização com uma nova sonda.

3.4. Procedimentos para manipulação e análise de proteínas

Os protocolos experimentais relativos para purificação e análise de proteínas são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de protocolos descritos nos manuais dos fabricantes de reativos e kits bem como de protocolos descritos por Colligan e colaboradores (Colligan et al., 1995).3.4.1. Expressão de INc-1L e INc-1 recombinantes

Para a expressão de INc-1L e INc-1 recombinantes foi utilizada a cepa BL21(DE3)PLysS, respectivamente transformada com as construções pAE-INc-1L ou pAE-INc-1, obtidas como descrito no item 3.3.7.

Após a transformação, 10 clones foram pré-inoculados separadamente em 3mL de meio 2x TY contendo carbenicilina 100µg/mL e cloranfenicol 34µg/mL e crescidos a 37°C por uma noite a 225rpm. Em seguida as culturas foram diluídas para $DO_{600nm} = 0,1$ em 10mL de meio 2x TY fresco contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo incubadas a 37°C. Quando a cultura atingiu $DO_{600nm} = 0,4$, uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida), submetida à centrifugação a 16000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias ressuspenso em 100µL de tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris 50mM, pH 6,8; DTT 25mM; glicerol 10% (v/v); SDS 1% (p/v) e azul de bromofenol 0,025% (p/v)].

Em seguida, IPTG (Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) foi adicionado a cultura para concentração final de 1mM e alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 3 horas de incubação a 37°C. As

amostras coletadas da cultura induzida (1mL) foram processadas como descrito acima, exceto que o sedimento de bactérias foi ressuspenso em 200 μ L de tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras das culturas não induzida e induzida foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

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

O perfil de indução das proteínas recombinantes foi avaliada pela eletroforese dos extratos bacterianos em SDS-PAGE e coloração com Coomassie Blue (item 3.4.3.).

3.4.1.1. Avaliação da solubilidade de INc-1L e INc-1 recombinantes

Após indução da expressão de INc-1L ou INc-1 com IPTG 1mM em diferentes temperaturas (25, 30 e 37°C), o sedimento bacteriano correspondente a 1mL de cultura foi coletado e ressuspenso em 1mL de tampão de lise [Tris-HCl 10mM, pH7,0; NaCl 100mM; imidazol 10mM; PMSF 1mM e glicerol 10% (v/v)]. A suspensão foi submetida à sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, posição 3 (*Branson Sonifier 450*) com intervalos de incubação por 1 minuto em gelo entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 10000xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento ressuspenso em 1mL do tampão de lise. Alíquotas do sobrenadante e do sedimento foram analisados em SDS-PAGE como descrito no item anterior.

3.4.1.2. Purificação do INc-1L e INc-1 a partir da fração solúvel

O sedimento correspondente a 45mL de culturas bacterianas induzidas com IPTG foi submetido a sonicação e processado como descrito no item anterior. Aproximadamente 1mL de sobrenadante foi então incubado com 100µL resina de Ni²⁺-NTA agarose (*Quiagen*) previamente equilibrada com 2,5mL tampão de lise a 4°C, por 1 hora em homogenizador (*Heavy dutyrotator, Cole Parmer*) em baixa velocidade. Foram realizadas 5 lavagens com 750µL tampão de lise por centrifugação 16000xg por 1 minuto. A proteína foi eluída com 150µL de tampão de lise acrescido de 25, 50, 75, 100, 150 e 300mM de imidazol, seguindo-se incubação por 15 minutos em gelo, centrifugação nas condições anteriores e coleta do sobrenadante.

Como a atividade da proteína recombinante se mostrou estável purificamos uma maior quantidade da proteína recombinante, a qual foi armazenada a -80°C em glicerol 10%(v/v). Assim, 4 sedimentos correspondentes a 45mL de culturas bacterianas induzidas foram lisados e centrifugados separadamente, como descrito anteriormente. Cerca de 800µL de resina equilibrada com 10mL de tampão de lise foram incubadas com a fração solúvel do extrato bruto nas mesmas condições anteriores. Após essa incubação, a resina foi transferida para uma coluna (*Poly-Prep Chromatography Column, Bio-Rad Laboratories*), onde foi feita a eluição da proteína recombinante a 4°C como já descrito.

A concentração protéica do inibidor recombinante purificado foi estimada pelo método de Bradford (item 3.4.4.). A molaridade das soluções de INc-1L e INc-1 purificados foi estimada a partir das massas moleculares, calculadas com base na sequência de aminoácidos predita para cada uma destas proteínas recombinantes.

3.4.2. Expressão da subunidade catalítica da PP1 (PP1c) de *N. crassa*

Para expressão da PP1c recombinante foi utilizada a construção disponível no laboratório denominada pTrcHisA/COD-PP1 (Zapella, 2001), onde a sequência codificadora da PP1c de *N.crassa* está clonada no vetor pTrcHisA (*Invitrogen Life Technologies*) em fusão com uma sequência que

codifica para seis resíduos de histidina na porção amino-terminal. A construção foi utilizada na transformação da cepa BL21(DE3) e a indução da PP1c recombinante foi realizada de acordo com procedimentos já estabelecidos (Zhang *et al.*, 1992b; Zapella, 2001; Andrioli *et al.*, 2003).

Após a transformação, foi feito o pré-inóculo com 10mL de meio LB contendo carbenicilina 100µg/mL e MnCl₂ 0,5mM. A cultura foi incubada a 37°C por 15 horas a 200rpm. O pré-inóculo foi submetido à centrifugação 735xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspense em 10mL de meio LB contendo antibiótico e MnCl₂ nas mesmas condições anteriores e transferidos para 220mL de meio LB com antibiótico e MnCl₂ (pré-aquecido a 37°C por 30 minutos a 200rpm). A cultura foi incubada a 37°C, 200rpm até que a DO_{600nm} atingir 0,4. Neste momento foi adicionado IPTG para a concentração final de 1mM, seguindo-se incubação a 37°C por 5 horas a 130rpm. Após a indução a cultura foi submetida à centrifugação 4000xg por 20 minutos a 4°C e o sedimento de células foi armazenado a -80°C, por no máximo uma semana, até sua utilização. Vale ressaltar que a adição de MnCl₂ a cultura e em todos os tampões utilizados é fundamental para obtenção de PP1c ativa (Zhang *et al.*, 1992a; Alessi *et al.*, 1993).

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

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

3.4.4. Dosagem de proteínas

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

3.4.5. Ensaio enzimático para medida da atividade de fosforilase fosfatase

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

3.4.5.1. Marcação de fosforilase a

O substrato mais usado para medida de atividade enzimática de PP1 é a glicogênio fosforilase a, fosforilada *in vitro*. A fosforilase a marcada com [³²P], foi preparada essencialmente como descrito (Shenolikar & Ingebritsen, 1984). A reação contendo fosforilase b 32 mg/mL; fosforilase quinase 56,4U; Tris-HCl 100mM, pH8,2; glicerofosfato de sódio 100mM; CaCl₂ 0,1mM; acetato de magnésio 10mM e [³²P]ATP 0,2mM (5 x 10⁸cpm/mmol) em volume final de 500μL, foi mantida por 60 minutos a 30°C. Em seguida foi acrescentado um volume de sulfato de amônio para saturação de 90% (p/v). Após 30 minutos em gelo, a suspensão foi submetida à centrifugação a 16000xg por 10 minutos, à temperatura ambiente e o precipitado obtido foi dissolvido em 250μL tampão Tris-HCl 5mM, pH7,5; EGTA 0,1mM; glicerol 10% (v/v) e sulfato de amônio 45% (p/v). Após 30 minutos em gelo, a solução foi novamente submetida à centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 250μL de Tris-HCl 50mM, pH7,0; EGTA 0,1mM e β-mercaptoetanol 0,1% (v/v). Esta solução foi dialisada a 4°C por 48 horas contra o tampão citado acima sendo o tampão trocado a cada 12 horas. Durante a diálise a fosforilase a cristaliza-se. Após a diálise a amostra foi incubada por 2 horas em gelo e os cristais foram precipitados por centrifugação a 16000xg por 5 minutos à temperatura ambiente, dissolvidos em

250 μ L de Tris-HCl 50mM, pH 7,0; EGTA 0,1 mM e β -mercaptoetanol 0,1% (v/v) e mantidos a 4°C até o momento do uso.

3.4.5.2. Ensaio das atividades de PP1c e INc-1 recombinantes

Para o ensaio da atividade enzimática da PP1c o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 1mL de tampão Tris 20mM, pH8,0; MnCl₂ 2mM; β -mercaptoetanol 2mM; PMSF 1mM e glicerol 10%(v/v). As células em suspensão foram submetidas a sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, posição 3 (*Branson Sonifier 450*) com intervalos de incubação por 1 minuto, em gelo, entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 16000xg por 20 minutos a 4°C.

A reação foi realizada a 30°C em um volume final de 100 μ L, sendo iniciada pela adição de 80 μ L de tampão de reação [imidazol 50mM, pH 7,2; DTT 2mM; BSA 0,5mg/mL; cafeína 5mM; MnCl₂ 0,2mM e [³²P] fosforilase a (30.000cpm)] a 20 μ L de uma preparação contendo 10 μ g de proteína total (sobrenadante dos lisados bacterianos) diluída em imidazol 50mM, pH 7,2; EDTA 1mM; DTT 2mM; BSA 0,5mg/mL e MnCl₂ 0,2mM. Após incubação de 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de TCA 10% gelado e então submetida a centrifugação a 16000xg por 4 minutos. Foram coletados 100 μ L de sobrenadante e adicionados a 1mL de líquido de cintilação (naftaleno 10% (p/v), PPO 0,5% (p/v) em dioxano). A radioatividade liberada foi quantificada em espectrofotômetro de cintilação (*Beckman*).

Uma unidade de fosforilase proteína fosfatase é a quantidade necessária para catalizar a liberação de 1nmol de fosfato de fosforilase a por minuto. Os ensaios foram dimensionados para que o consumo de substrato fosse de no máximo 20%, como manutenção da linearidade da reação.

Para ensaio de atividade do INc-1L e do INc-1 recombinantes concentrações crescentes de inibidor purificado foram pré-incubadas por 10 minutos a 4°C ou a 30°C com 10 μ g de PP1, antes do ensaio descrito acima.

4. Resultados e Discussão

4.1. Clonagem da sequência codificadora de INc-1L a partir de um clone genômico de *N.crassa*

A sequência codificadora de INc-1, cuja ORF hipotética (figura 1) identificamos em um clone genômico de *N.crassa* (BAC c13D20) foi amplificada por PCR a partir do DNA deste clone com a utilização dos oligonucleotídeos INc-1F e INc-1R (itens 3.3.3 e 3.3.4). O produto de PCR obtido apresentou o tamanho esperado de 1047pb (figura 3) e foi denominado INc-1L. A obtenção de outro produto de PCR codificando uma ORF de menor tamanho (denominada INc-1) será apresentada e discutida adiante (ver item 4.6). O fragmento de DNA amplificado (INc-1L) foi purificado e clonado no vetor pCR2.1, gerando a construção pCR2.1-INc-1L, e dois clones independentes foram seqüenciados. A seqüência de bases do inserto e sua seqüência de aminoácidos deduzida está mostrada na figura 4 e corresponde fielmente a seqüência que originalmente encontramos no genoma de *N.crassa*. Na figura 4 também estão indicados os cinco domínios equivalentes áqueles identificados no I-2 de mamíferos e que comprovadamente são importantes para a interação com PP1 (Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Zapella, 2001).

4.2. Expressão de INc-1L em bactérias

Para demonstrar se a seqüência que havíamos clonado codifica uma proteína funcional, nos propusemos a expressá-la em bactérias para posterior verificação de suas propriedades bioquímicas e da sua interação com a PP1c. Assim, o inserto da construção plasmidial pCR2.1-INc-1L foi excisado e subclonado no vetor de expressão pAE (Junqueira de Azevedo *et al.*, 2001). A construção gerada foi denominada pAE-INc-1L e seu esquema e análise com enzimas de restrição estão apresentados na figura 5. A clonagem de INc-1L neste vetor está em fase com uma seqüência do vetor que codifica para seis resíduos de histidina e para um espaçador de 16 aminoácidos. Portanto, INc-1L recombinante conterà em sua extremidade amino-terminal uma cauda de seis resíduos de histidina, a qual facilitará sua purificação por cromatografia de afinidade em uma coluna de Ni⁺²-NTA agarose.

Para obtenção da proteína recombinante optamos por utilizar a cepa BL21(DE3)PLysS (*Stratagene*), que apresenta pouco ou nenhum vazamento de expressão da proteína recombinante na ausência do indutor IPTG quando comparada a outras hospedeiras como a própria BL21(DE3). Assim, a construção pAE-INc-1L foi utilizada na transformação de BL21(DE3)PLysS, 10 colônias transformantes foram selecionadas e o nível de expressão de INc-1L recombinante foi avaliado após indução com IPTG 1mM, a 37°C por 3 horas (indução em pequena escala). Verificamos que INc-1L foi expresso em todas as colônias analisadas e que existe uma variação no nível de expressão entre as colônias (dados não mostrados). A proteína recombinante que foi induzida corresponde a um polipeptídeo que migra com massa molecular de ~56kDa em SDS-PAGE, como mostrado na figura 6A.

O clone que apresentou maior nível de expressão da proteína recombinante foi selecionado e utilizado para indução de INc-1L com IPTG 1mM a 25, 30 e 37°C por 3 horas. Como controle negativo das induções foi utilizada bactéria BL21(DE3)PLysS transformada com o vetor pAE sem o inserto (dados não mostrados). Na figura 6A verificamos que o polipeptídeo de ~56kDa é induzido em todas as temperaturas, sendo que níveis maiores de indução são observados acima de 30°C.

A massa molecular de INc-1L recombinante que observamos em SDS-PAGE é semelhante aquela observada para INc-1 purificado a partir de micélios de *N. crassa* (~54kDa) (Zapella, 2001). Estes dados mostram que INc-1L recombinante, assim como o INc-1 nativo, apresenta comportamento anômalo na eletroforese em SDS-PAGE, pois sua massa molecular calculada a partir da sequência de aminoácidos da ORF correspondente é de aproximadamente 38kDa. A migração anômala em SDS-PAGE já foi descrita para outras proteínas desta família como o I-1 (Nimmo & Cohen, 1978) e o I-2 (Foulkes & Cohen, 1980). Uma baixa ligação de moléculas do detergente SDS na cadeia polipeptídica poderia explicar porque todas essas proteínas migram como polipeptídeos de massa molecular maior em SDS-PAGE.

Assim como I-1 e o I-2 de mamíferos, INc-1L também possui uma alta porcentagem de aminoácidos hidrofílicos (59%) e de prolina (11,2%), sugerindo que INc-1L pode também não apresentar uma estrutura globular como

proposto para proteínas desta classe (Foulkes & Cohen, 1980; Yang *et al.*, 2000).

Para o planejamento do protocolo de purificação do INc-1L recombinante, avaliamos primeiramente a sua solubilidade no extrato bacteriano. Assim, os sedimentos de bactéria obtidos após a indução em diferentes temperaturas foram lisados por sonicação e submetidos a centrifugação. Os sobrenadantes foram recolhidos e os precipitados ressuspensos no mesmo tampão de lise. A figura 6B mostra a distribuição da proteína recombinante entre o sobrenadante (proteína solúvel) e precipitado (proteína em corpos de inclusão) nas diferentes temperaturas de indução. A maior quantidade da proteína recombinante foi recuperada na fração solúvel em todas as temperaturas testadas, sendo que a apenas na indução a 37°C se verificou uma pequena fração insolúvel. Tendo em vista estes resultados optamos por proceder a purificação de INc-1L recombinante a partir da fração solúvel de lisados preparados de culturas induzidas com IPTG 1mM, a 37°C por 3 horas.

Figura 3. Amplificação por PCR da sequência codificadora de INC-1L de *N. crassa*. O DNA do clone de BAC C13d20 foi submetido a PCR utilizando-se os oligonucleotídeos (INc-1F e INc-1R) e a enzima Taq Polimerase na presença de 200, 400 e 1000ng de BAC (canaletas 3 a 5). Foi feita uma reação controle sem o DNA molde (canaleta 2). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A seta aponta o fragmento de ~1047pb. Na canaleta 1 foi aplicado marcador de tamanho 1kpb DNA ladder. O tamanho aproximado de alguns marcadores está indicado à esquerda

```

1 atgtcaaccatcatggcatcgtcacccacacacactccgcccgc
M S T I M A S S P T H T P P P
46 tccacgggtcccgcggccaaagggatgttgagccagctcccatcc
S T V P R P K G M L S Q L P S
91 caatccagcgaatgctgctgcccagttcctggcttttagcatgtacc
Q S S D A V A Q F L A L A C T
136 tacactgtcgtcgatattcgattgctaacggatgctttacctcca
Y T V V D I R L L T D A L P P
181 ggtattctcaagaactcgtaccgtaactctccgcccgcgggccc
G I L K N S Y R N S P P A G P
226 acttccccctcgacacccaccaccatgacgcggctcaccccccg
T S P L D T H H H D A A H P P
271 ccactcatccacatgccctcctccgccaaggaggccaaagaaatt
P L I H M P S S A K E A K E I
316 accatcatgaacactcagatcaacgcgggacccccgcgctcctcg
T I M N T Q I N A G P R R S S
361 tctgctgcccggatcgcggcctggcctcagtggttctcgccgttca
S V A G S R P G L S G S R R S
406 acgacgcccagccaccacggcgacgaagactcgacggagcaaggc
T T P S H H G D E D S T E Q G
451 cagcgctcaaattgggacgagggcgaacctctacctcacggagcaa
Q R L K W D E A N L Y L T E Q
496 gagcgggtccagcaccatgaagattgacgagcccaagacgcccctat
E R S S T M K I D E P K T P Y
541 gccaaagcactacgacccccgcggaggacccatcgagcagcagcag
A K H Y D P A E D P S D D D E
586 gaagtcccagaagccatcgaccccaacaagatcgacatggatcgc
E V P E A I D P N K I D M D R
631 gtggatggcctgctgcctcttctcctaggcagaacaagcgagggcac
V D G L S P L P R Q N K R R H
676 ggcaacattgacgacgagatccctggcctctcgctcgggcagccg
G N I D D E I P G L S L G E P
721 gaggagggcgggtgcctgagggcggttccccctttggcaagggcgct
E E A V P E G G F P F G K G A
766 actgcccattccgaagacggcggtcccccaagcgctcctagagct
T A H S E D G G S P K R P R A
811 gtgcacgttgatagcaacggcagcggccatgatcccgatgatgaa
V H V D S N G S G H D P D D E
856 ctggctcggcctcagcgcgcaagagagggagaagcatcgcaagttt
L V G L S A E E R E K H R K F
901 gaggagatgcgcaagaagcactacgagatgaagagcgtggcgtcg
E E M R K K H Y E M K S V A S
946 ctacttggtcaccctgagaatctggaagatgaggacgaagatgag
L L G H P E N L E D E D E D E
991 gatgaggagatccctgaggtgccggctctcccgacacgggtccaat
D E E I P E V P A L P T R S N
1036 ggatcgctcgtag 1047
G S S *

```

Figura 4. Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos de INC-1L de *N. crassa*. O produto de PCR amplificado a partir do clone de BAC C13d20 mostrado na figura 3 foi clonado no vetor pCR2.1, gerando a construção pCR2.1-INC-1L. Os insertos de dois clones independentes foram completamente sequenciados. As regiões sombreadas em cinza correspondem as regiões 1 a 5 mostradas na figura 1 e que são similares as regiões de interação do inibidor 2 com a PP1c em mamíferos.

Esquema da construção pAE-INC-1L.

Figura 5. Análise da construção pAE-INC-1L. Para verificação do sucesso da subclonagem de INC-1L, a construção pAE-INC-1L mostrada no esquema (canaleta 2) foi digerida com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*l. A seta aponta para o fragmento de ~1047pb correspondente ao inserto liberado da construção (canaleta 3). A digestão foi analisada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A canaleta 1 corresponde ao marcador de tamanho 1kpb DNA ladder. O tamanho de alguns fragmentos em kpb está indicado à esquerda.

Figura 6. (A) Expressão do INc-1L recombinante. A cultura de bactérias BL21(DE3)PLYsS transformada com a construção pAE-INc-1L crescida a 37°C, por uma noite, foi diluída 1:20 em meio fresco nas temperaturas de 25, 30 e 37°C até DO_{600nm} atingir 0,4. Neste momento, foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 3 horas nas temperaturas indicadas. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controle-não induzidas (C) e de culturas induzidas com IPTG (I) foram separados em SDS-PAGE 10% e o gel foi corado com Coomassie Blue. As posições dos marcadores de massa molecular estão indicadas à esquerda. A seta indica o polipeptídeo de ~56kDa correspondente à proteína recombinante que é induzida. **(B) Solubilidade do INc-1L recombinante.** As induções foram realizadas como (A), as bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado 10000xg, 30 minutos a 4°C. A fração solúvel (S) e o precipitado (P) foram analisados em SDS-PAGE como em (A).

4.3. Purificação do INc-1L recombinante

A purificação de INc-1L recombinante foi realizada através de cromatografia de afinidade em resina Ni^{+2} -NTA agarose, uma vez que a proteína recombinante possui uma cauda amino-terminal de seis histidinas. Como mostrado na figura 7, a fração solúvel de lisados bacterianos (canaleta 1) obtidos de culturas induzidas com IPTG 1mM a 37°C por 3 horas foi adsorvida à resina, seguindo-se lavagem (canaletas 3 a 7) e eluição do material adsorvido com tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (canaletas 8 a 13). A figura também mostra que uma fração significativa da proteína recombinante não se ligou à resina (canaleta 2), enquanto que uma pequena fração da proteína foi eluída com tampão contendo 150 e 300mM de imidazol (canaletas 12 e 13). Ainda que em pequena quantidade, o INc-1L eluído com imidazol apresentou um grau de pureza satisfatório e avaliamos que a quantidade purificada seria suficiente para a avaliação de seu efeito na atividade de PP1c.

4.4. Verificação da atividade inibidora de INc-1L recombinante sobre a PP1c recombinante de *N. crassa*

Para avaliar a atividade de INc-1L recombinante, utilizamos a PP1c de *N. crassa* expressa em bactérias. Para expressão da PP1c recombinante utilizamos a construção disponível no laboratório denominada pTrcHisA/COD-PP1 (Zapella, 2001) na transformação de bactérias da cepa BL21(DE3). Após a indução com IPTG, a atividade de fosforilase fosfatase da PP1c recombinante é ensaiada diretamente na fração solúvel dos lisados bacterianos uma vez que, geralmente, os níveis de expressão obtidos são muito baixos para detecção do polipeptídeo através de SDS-PAGE (Zhang *et al.*, 1992a; Zapella, 2001; Andrioli *et al.*, 2003). Como controle negativo da atividade de fosforilase fosfatase utilizamos a fração solúvel de um clone de BL21(DE3) transformado com o vetor pTrcHisA sem o inserto (dados não mostrados).

A glicogênio fosforilase a marcada radioativamente com $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ é um substrato amplamente utilizado nos ensaios da PP1 *in vitro*. A conversão da fosforilase b em a é catalisada pela glicogênio fosforilase quinase, resultando na fosforilação de um único resíduo de serina (Ser-14). Essa é uma das

vantagens na utilização da fosforilase α como substrato nos ensaios, pois outros substratos da PP1c, como a glicogênio sintase e a fosforilase quinase, apresentam mais de um sítio de fosforilação, complicando a correlação da extensão da desfosforilação com a determinação da atividade enzimática (Cohen *et al.*, 1989).

Apesar da PP1c recombinante de *N.crassa* possuir a cauda de seis histidinas, sua purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺²-NTA agarose resulta na inativação da atividade enzimática (Zapella, 2001), o que inviabilizou a utilização de PP1c recombinante purificada em nossos ensaios. Assim, para os ensaios de atividade de INc-1L, utilizamos a fração solúvel dos extratos bacterianos contendo PP1c recombinante ativa. A figura 8 mostra a curva de inibição da atividade de fosforilase fosfatase pelo INc-1L recombinante, após pré-incubação de diferentes concentrações de INc-1L com 10 μ g de proteína total da fração solúvel dos extratos bacterianos contendo PP1c recombinante a 4°C (figura 8A) e a 30°C (figura 8B).

Os resultados apresentados na figura 8 são claros quanto ao efeito inibidor de INc-1L sobre a atividade de PP1c, que tem 50% de sua atividade inibida por ~50nM de INc-1L, independente da temperatura utilizada na etapa de pré-incubação. Concentrações maiores de INc-1L abolem completamente a atividade da enzima. A potência inibitória do INc-1L é menor se comparada aos valores de IC₅₀ dos I-2 de humano (Helps *et al.*, 1994), *Drosophila* (Helps & Cohen, 1999), coelho (Yang *et al.*, 2000) e isoformas α 1 e α 2 de rato (Osawa *et al.*, 1996) que são respectivamente 1, 1, 1,5 e 10nM. Contudo, INc-1L pode ser considerado um potente inibidor da PP1c quando analisamos valores de IC₅₀ do GLC8 (Tung *et al.*, 1995) e da isoforma β de rato (Osawa *et al.*, 1996) que são respectivamente 130 e 100nM.

É importante ressaltar que a atividade de PP1c recombinante na fração solúvel foi determinada previamente aos ensaios de atividade de INc-1L e a quantidade de enzima nos ensaios foi ajustada para que o consumo do substrato não ultrapassasse 20% para que a reação de desfosforilação da [³²P]-fosforilase α fosse linear. Além disso para os ensaios de atividade do INc-1L sobre a PP1c, utilizamos INc-1L recombinante eluído com 300mM de imidazol. Como controle, a medida da atividade da PP1c na ausência de INc-1L

foi medida na presença do tampão de eluição de INc-1L, e esta atividade foi considerada como 100%. Observamos, que a atividade da PP1c dobra (dados não mostrados) quando medida na presença do tampão utilizado na eluição do INc-1L (contendo imidazol 300mM) em comparação com o tampão (contendo imidazol 50mM) que é freqüentemente utilizado nos ensaios de PP1c recombinante (Zhang *et al.*, 1992a; Zapella, 2001; Andrioli *et al.*, 2003).

Figura 7. Purificação do INc-1L recombinante por cromatografia de afinidade. A purificação foi realizada a partir de culturas induzidas com IPTG a 37°C por 3 horas. A fração solúvel do lisado bacteriano (canaleta 1) foi incubada com a resina Ni⁺²-NTA agarose por 1 hora a 4°C. A canaleta 2 mostra a fração não adsorvida a resina. A resina foi lavada com o mesmo tampão utilizado na lise das bactérias (canaletas 3 a 7). As eluições foram feitas com 25, 50, 75, 100, 150 e 300mM de imidazol (canaletas 8 a 13). A seta indica o polipeptídeo de ~56kDa correspondente ao INc-1L recombinante. As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 10%. O gel foi corado com Coomassie Blue. As posições dos marcadores de massa molecular estão indicadas à esquerda.

Figura 8. Inibição da atividade de fosforilase fosfatase da PP1c recombinante pelo INc-1L recombinante. O sobrenadante do lisado bacteriano do clone pTrcHisA/COD-PP1 contendo 10 μ g de proteína foi incubado por 10 minutos a 4°C (A) ou a 30°C (B) com concentrações crescentes de INc-1L e em seguida ensaiado para atividade de fosforilase fosfatase durante 10 minutos a 30°C. Os valores de atividade foram transformados para porcentagem da atividade de PP1 em relação ao controle ensaiado na ausência de INc-1L. Em (A) o desvio padrão foi calculado a partir de três experimentos independentes com ensaios realizados em duplicatas. Em (B) o desvio padrão foi calculado a partir de dois experimentos independentes, com exceção dos pontos 16 e 26nM de INc-1L, com ensaios realizados em duplicata.

4.5. Identificação de um íntron no gene do INc-1

Em experimentos iniciais de RT-PCR para análise da expressão de INc-1 em diferentes fases de crescimento, detectamos mRNAs de dois tamanhos distintos, sendo um deles do tamanho esperado de acordo com a sequência codificadora mostrada na figura 4 (~1kpb) e outro de menor tamanho (~900pb), como apresentado no item 4.8, adiante. Paralelamente a estas observações, o seqüenciamento e a anotação do genoma de *N. crassa* foram finalizados, possibilitando a verificação da presença de um íntron na sequência que codificaria para o INc-1, como indicado na figura 9. É interessante ressaltar que os sítios canônicos de junção de *splicing* (GT/AG) estão presentes, e que por outro lado a sequência deste provável íntron codifica um segmento de 38 aminoácidos em fase com o restante da proteína. Estas observações sugerem que o RNA de maior tamanho que foi detectado pode ser resultado de processamento incompleto, onde o íntron não foi adequadamente removido, uma vez que foi descartada a possibilidade de contaminação com DNA genômico nas preparações de RNA (ver item 4.8). Outra possibilidade seria que tanto a isoforma que retém o íntron como a isoforma que é processada seriam traduzidas resultando em produtos protéicos, que eventualmente apresentariam características bioquímicas distintas. Experimentos adicionais são necessários para investigar estas possibilidades. Tendo em vista estes resultados, passamos a denominar de INc-1L, a isoforma que retém o íntron e INc-1, a isoforma sem íntron.

O seqüenciamento completo do genoma de *N. crassa* revelou a média de 1,7 íntrons por gene, sendo que o tamanho médio dos íntrons é de 134 nucleotídeos (Galagan et al., 2003). O íntron do gene de INc-1 é composto por 114 nucleotídeos (figura 4). Assim, o INc-1 (sem íntron) seria constituído por 310 resíduos (figura 9) com uma massa molecular estimada de aproximadamente 33,9 kDa e um *pI* teórico igual a 5, refletindo a fração de 19% de aminoácidos ácidos em sua composição. Os aminoácidos ácidos somados aos básicos representam 35,8% dos resíduos totais da sequência e se somados aos polares sem carga temos 58,3% de resíduos hidrofílicos. O INc-1 também apresenta uma alta porcentagem de resíduos de prolina (11,6%). Assim, as características bioquímicas de INc-1 (sem íntron) parecem

não diferir muito daquelas já discutidas para INc-1L (com íntron). Como já mencionado, a massa molecular calculada para INc-1L seria de aproximadamente 38kDa e conteúdo de aminoácidos hidrofílicos e de prolina, é de 59% e 11,2%, respectivamente (item 4.2).

O INc-1 assim como o I-2 pode não ter uma estrutura globular (Yang *et al.*, 2000). Estudos de dicroísmo circular indicam que aproximadamente 50% da estrutura do I-2 é aleatória o que pode estar correlacionado com uma forma alongada. Uma conformação estendida fornece base para o modelo no qual o I-2 envolva a subunidade catalítica da PP1 estabelecendo múltiplos contatos. Pelo menos cinco domínios de contato (indicados na figura 2) importantes para a atividade inibitória do I-2 sobre a PP1 foram identificados (Yang *et al.*, 2000; Connor *et al.*, 2000). Embora a similaridade entre as seqüências dos inibidores-2 de mamíferos, *D. melanogaster* e a dos fungos seja pequena (Zapella, 2001) as regiões mapeadas pelos trabalhos de Connor e de Yang como responsáveis pela atividade do I-2 (Yang *et al.*, 2000; Connor *et al.*, 2000) são razoavelmente conservadas em todos esses organismos, como mostra a figura 2. É importante ressaltar que a somatória da contribuição dessas várias regiões parece ser responsável pela atividade e ligação do I-2 a PP1.

Essas regiões estão presentes no INc-1L e o íntron encontra-se no meio da região 1, como mostram as figuras 4 e 9. A região 1 é considerada como fundamental na habilidade de ligação do inibidor a PP1. O polipeptídeo I-2 truncado na região amino-terminal, que contém a região 1, apresentou um potencial inibidor bastante reduzido quando comparado ao I-2 nativo, provavelmente devido a remoção de sítio de ligação forte. Nesta região está localizada a seqüência IKGI que passou então a ser considerada essencial para a ligação do inibidor a PP1 (Huang *et al.*, 1999; Connor *et al.*, 2000).

O motivo consenso RVXF, importante para interação de diversas subunidades regulatórias, está ausente no I-2. Evidências experimentais e estudos de modelagem molecular sugeriram que a seqüência KLHY do I-2 (apontada com região 3 na figura 2) seria equivalente ao motivo RVXF (Yang *et al.*, 2000), contudo dados posteriores não confirmaram esta hipótese. As seqüências IKGI e KLHY pertencem a motivos pentapeptídeos conservados filogeneticamente formando as seqüências consenso K-[GS]-I-L-K e R-[KR]-X-H-Y (Wakula *et al.*, 2003). Foi demonstrado que quando o motivo KGILK do I-2

foi substituído pelo motivo RVTF do NIPP-1, o IC₅₀ para a inibição da PP1 praticamente não sofreu alteração, mas a substituição do motivo KLHY pelo RVTF tornou o I-2 um fraco inibidor da PP1. Assim, embora o motivo KGILK de I-2 não seja similar ao motivo RVXF presente em outras subunidades moduladoras e não se ligue ao canal hidrofóbico existente na PP1c, ele pode ser substituído funcionalmente pela sequência RVXF (Connor et al., 2000; Wakula et al., 2003).

O motivo KGILK está presente no INc-1, sendo que no INc-1L ele apresenta-se interrompido pela presença do segmento de 38 aminoácidos relativos ao íntron (figuras 4 e 9). Contudo, observamos que INc-1L recombinante inibiu a atividade de PP1 com relativa eficácia. Certamente, este efeito inibidor deve-se à contribuição das outras regiões mapeadas na interação/inibição e também a conservação parcial da região 1. É importante ressaltar que na região 1 o motivo KGILK do INc-1 equivaleria a sequência PGILK em INc-1L (figuras 2, 4 e 9), sendo que não se trata de uma substituição funcionalmente equivalente (K → P) na primeira posição do motivo. Porém, não podemos excluir a possibilidade de que a interação possa estar ocorrendo através da sequência GILK. Portanto, para entender melhor a contribuição da região 1 na atividade do INc-1 foi imprescindível sua clonagem (sem íntron) para podermos avaliar a funcionalidade da respectiva proteína recombinante.

4.6. Clonagem da sequência codificadora de INc-1 a partir de uma biblioteca de cDNA de *N.crassa* e obtenção de INc-1 recombinante

Com o objetivo de clonar a sequência codificadora de INc-1 (sem íntron) e confirmar que este íntron é de fato processado em células de *N.crassa*, realizamos reações de PCR com os oligonucleotídeos INc-1F e INc-R e utilizando uma biblioteca de cDNA micelial de *N. crassa* como molde. As condições utilizadas na amplificação do INc-1 a partir do cDNA foram as mesmas utilizadas na amplificação de INc-1L a partir do DNA genômico. Como mostra a figura 10, a diferença de tamanho entre o fragmento amplificado a partir do DNA genômico e aquele amplificado a partir do cDNA é clara, indicando que ocorreu processamento deste íntron no mRNA de INc-1 na fase de crescimento em que foi isolado RNA para preparação da biblioteca.

A estratégia de clonagem do INc-1 foi a mesma utilizada para o INc-1L (item 4.1). O produto de PCR foi clonado no vetor pCR2.1 e a construção obtida foi submetida a seqüenciamento para verificação da sua autenticidade. O seqüenciamento confirmou a ausência do íntron no produto de PCR amplificado correspondente a INc-1, o qual foi subclonado no vetor de expressão pAE (Junqueira de Azevedo *et al.*, 2001) em fusão com uma seqüência que codifica para seis resíduos de histidina na porção amino-terminal.

A construção pAE-INc-1 foi utilizada na transformação de bactérias da cepa BL21(DE3)PLysS e 10 clones obtidos foram analisados quanto a expressão do INc-1 recombinante a 37°C por 3 horas. A partir do clone que expressou a proteína em maior quantidade foi feita uma indução em maior escala com IPTG 1mM a 37°C por 3 horas. A figura 11 mostra a indução do polipeptídeo de ~54kDa, que assim como INc-1L também foi recuperado na fração solúvel dos lisados bacterianos. De modo semelhante a INc-1L, INc-1 também apresentou migração anômala em gel de SDS-PAGE (~54kDa), pois sua massa molecular calculada a partir da sua seqüência de aminoácidos é de aproximadamente 33,9kDa.

4.7. Purificação do INc-1 recombinante e verificação de sua atividade inibidora sobre a PP1c recombinante de *N. crassa*

A purificação de INc-1 recombinante foi realizada através de cromatografia de afinidade em resina Ni⁺²-NTA agarose seguindo os mesmos procedimentos utilizados na purificação de INc-1L recombinante. Como mostrado na figura 12, a fração solúvel de lisados bacterianos (canaleta 1) obtidos de culturas induzidas com IPTG 1mM a 37°C por 3 horas foi adsorvida à resina, seguindo-se lavagem (canaletas 3 a 7) e eluição do material adsorvido com tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (canaletas 8 a 13). Diferentemente de INc-1L, a eluição de INc-1 iniciou-se com 75mM de imidazol (canaleta 10) e prosseguiu até a última concentração utilizada (300mM, canaleta 13). Contudo, nas frações 75, 100 e 150mM (canaletas 10 a 12) podem ser visualizados outros polipeptídeos que podem ser produtos de degradação ou impurezas capazes de ligar na resina. Nos

ensaios de atividade de INC-1 foi utilizado a amostra eluída com 300mM de imidazol que apresentou um grau de pureza satisfatório.

Os ensaios de inibição de PP1c recombinante de *N. crassa* pelo INC-1 foram realizados nas mesmas condições utilizadas para avaliação da atividade de INC-1L (item 4.4). A figura 13 mostra a curva de inibição de INC-1 recombinante sobre a atividade de fosforilase fosfatase, após pré-incubação, a 30°C, de diferentes concentrações de INC-1 com 10µg de proteína total da fração solúvel dos extratos bacterianos contendo PP1c recombinante. Como podemos observar a PP1c tem 50% de sua atividade inibida por ~11nM de INC-1. Com mostrado na figura 8, INC-1L foi efetivo para inibir a PP1c com um IC₅₀ de aproximadamente 50nM, que é um pouco maior que a observada para INC-1. Estes dados sugerem que a retenção do segmento de aminoácidos codificado pelo íntron na região 1 na isoforma INC-1L diminui o potencial inibitório do INC-1L. Portanto, é provável que o motivo PGILK que corresponderia a região 1 em INC-1L seja menos eficaz no ancoramento do inibidor a PP1c. Estas observações sugerem que o motivo KGILK de INC-1 seja fundamental na interação do inibidor com a PP1c, assim como proposto para o I-2 de mamíferos (Huang *et al.*, 1999; Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Wakula *et al.*, 2003).

```

1  atgtcaaccatcatggcatcgtcaccacacacactcgcgcgcc
   M S T I M A S S P T H T P P P
46  tccacggtccccgcggccaaagggtatgttgagccagctcccatcc
   S T V P R P K G
91  caatccagcgatgctgtgcgccagttcctggctttagcatgtacc

136 tacactgtcgtcgatatattcgattgctaacggatgottttacctcca

181 ggtattctcaagaactcgtaccgtaactctccgccccgcgggcccc
   I L K N S Y R N S P P A G P
226 acttccccctcgacacccaccacccatgacgcggctcacccccgc
   T S P L D T H H H D A A H P P
271 ccactcatccacatgccctcctccgccaaggaggccaaagaaatt
   P L I H M P S S A K E A K E I
316 accatcatgaacactcagatcaacgcgggacccccgcgcgtcctcg
   T I M N T Q I N A G P R R S S
361 tctgtcgcgggatcgcggcctggcctcagtggttctcgcggttca
   S V A G S R P G L S G S R R S
406 acgacgcccagccaccacgcgcgacgaagactcgacggagcaaggc
   T T P S H H G D E D S T E Q G
451 cagcgcctcaaattgggacgagggcgaacctctacctcacggagcaa
   Q R L K W D E A N L Y L T E Q
496 gagcgtccagcaccatgaagattgacgagcccaagacgccttat
   E R S S T M K I D E P K T P Y
541 gccaaagcactacgacccccgcggaggacccatcggaacgacgacgag
   A K H Y D P A E D P S D D D E
586 gaagtcccagaagccatcgaccccaacaagatcgacatggatcgc
   E V P E A I D P N K I D M D R
631 gtggatggcctgtcgcctcttccctaggcagaacaagcgcaggcac
   V D G L S P L P R Q N K R R H
676 ggcaacattgacgacgagatccctggcctctcgcctcggcgagccg
   G N I D D E I P G L S L G E P
721 gaggagggcgtgcctgagggcggcttcccccttggcaagggcgct
   E E A V P E G G F P F G K G A
766 actgcccattccgaagacgcgcggtcccccaagcgtcctagagct
   T A H S E D G G S P K R P R A
811 gtgcacgttgatagcaacgcgcagcgccatgatcccgatgatgaa
   V H V D S N G S G H D P D D E
856 ctggtcggcctcagcgcgaagagagggagaagcatcgcaagttt
   L V G L S A E E R E K H R K F
901 gaggagatgcgcaagaagcactacgagatgaagagcgtggcgctcg
   E E M R K K H Y E M K S V A S
946 ctacttggtcaccctgagaatctggaagatgaggacgaagatgag
   L L G H P E N L E D E D E D E
991 gatgaggagatccctgaggtgccggctctcccgacacgggtccaat
   D E E I P E V P A L P T R S N
1036 ggatcgtcgtag 1047
      G S S *

```

Figura 9. Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos de INC-1 de *N. crassa*. A figura mostra a presença do íntron (região em negrito) no gene que codifica para o INC-1 de *N. crassa*, o qual não está presente no produto de PCR codificador de INC-1. Note os consensos de junção de "splicing" GT/AG. As regiões sombreadas em cinza correspondem aos domínios 1 a 5 discutidos no texto e mostrados na figura 1.

Figura 10. Amplificação por PCR da sequência codificadora de INC-1 a partir de biblioteca de cDNA de *N. crassa*. Uma biblioteca de cDNA micelial de *N. crassa* (canaleta 3) e o DNA do clone de BAC C13d20 (canaleta 4) foram utilizados como molde nas reações de PCR. Foi feita uma reação controle sem DNA (canaleta 2). Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A seta cheia aponta o fragmento de ~1047pb e a vazia o fragmento de ~933 pb. Na canaleta 1 foi aplicado marcador de tamanho 1kpb DNA ladder. O tamanho de alguns fragmentos em kpb está indicado à esquerda.

Figura 11. (A) Expressão do INc-1 recombinante. A cultura de bactérias BL21(DE3)PLysS, transformada com a construção pAE-INc-1, crescida a 37°C, por uma noite, foi diluída 1:20 em meio fresco a 37°C. Após DO_{600nm} atingir 0,4, foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 3 horas a 37°C. Os extratos bacterianos protéicos das culturas controle-não induzida (C) e induzida com IPTG (I) foram separados em SDS-PAGE 10% e o gel foi corado com *Coomassie Blue*. As posições dos marcadores de massa molecular estão indicadas à esquerda. A seta indica o polipeptídeo de ~54kDa correspondente à proteína recombinante que é induzida. **(B) Solubilidade do INc-1 recombinante.** A indução foi realizada como (A), as bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado 10000xg, 30 minutos a 4°C. A fração solúvel (S) e o precipitado (P) foram analisados em SDS-PAGE como em (A).

Figura 12. Purificação do INc-1 recombinante por cromatografia de afinidade. A purificação foi realizada a partir de culturas induzidas com IPTG a 37°C por 3 horas. A fração solúvel do lisado bacteriano (canaleta 1) foi incubada com a resina Ni²⁺-NTA agarose por 1 hora a 4°C. A canaleta 2 mostra a fração não adsorvida a resina. A resina foi lavada com o mesmo tampão utilizado na lise das bactérias (canaletas 3 a 7). As eluições foram feitas com 25, 50, 75, 100, 150 e 300mM de imidazol (canaletas 8 a 13). As posições dos marcadores de massa molecular estão indicadas à esquerda. A seta indica o polipeptídeo de ~54kDa correspondente ao INc-1 recombinante. As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue.

Figura 13. Inibição da atividade de fosforilase fosfatase da PP1c recombinante pelo INc-1 recombinante. O sobrenadante do lisado bacteriano do clone pTrcHis-COD-PP1 contendo 10 μ g de proteína foi incubado por 10 minutos a 30°C com concentrações crescentes de INc-1. Após a incubação a atividade de fosforilase fosfatase foi ensaiada durante 10 minutos a 30°C. O gráfico mostra a percentagem de atividade de PP1c em relação ao controle (ausência de INc-1). O desvio padrão foi calculado a partir de três experimentos independentes com ensaios realizados em duplicata.

4.8. Análise da expressão do gene de INc-1 de *N. crassa*

Inicialmente tentamos analisar os níveis de expressão do mRNA do INc-1 nas diferentes fases de crescimento de *N. crassa* através da técnica de *Northern blot*, mas não obtivemos resultados reprodutíveis. Essa dificuldade encontrada nos experimentos de *Northern blot* pode ser devido a um baixo nível de expressão do gene do INc-1. Decidimos então utilizar a metodologia de RT-PCR.

Nos ensaios de RT-PCR foram utilizadas amostras de RNA total isolado de células coletadas em diferentes tempos do crescimento vegetativo de *N. crassa* no intervalo de 0 a 72 horas, sendo o tempo 0h correspondente a conídios não germinados. As amostras de RNA total foram tratadas com DNAase, para eliminar possíveis contaminações de DNA genômico e tiveram suas concentrações equiparadas previamente ao ensaio de RT-PCR com os oligos INc-1F e INc-R.

A figura 14A mostra que o RNA de INc-1 (sem íntron) é expresso constitutivamente ao longo do crescimento. Os níveis do mRNA são aparentemente equivalentes nas amostras de conídios não germinados (0h) e 6 horas de germinação ocorrendo um aumento após 12 até 24 horas, fase que corresponde ao crescimento exponencial. A partir de 48h de cultivo, que corresponde a entrada na fase estacionária, ocorre uma redução na abundância do transcrito de INc-1. Ainda que na figura mostrada, as amostras de 72 horas indiquem um aumento dos níveis do mRNA de INc-1, este fato não foi consistentemente observado.

Como controle da quantidade de RNA utilizada nas reações e da ausência de contaminação das amostras com DNA genômico fizemos, paralelamente, reações de RT-PCR utilizando um par de oligonucleotídeos que amplifica um segmento do gene de β -tubulina (D' Enfert et al., 1999). A amplificação a partir de cDNA gera um produto de 390pb, enquanto que a amplificação a partir de DNA genômico resulta em um produto de 550 pb, que inclui um íntron. Como mostrado na figura 14B, as amostras de RNA utilizadas não estão contaminadas com DNA genômico e estão em quantidades equivalentes nas diversas reações realizadas.

Vale ressaltar que em alguns experimentos realizados detectamos a presença do RNA de INc-1 não processado (~1kpb) juntamente com o RNA processado (~0,9kpb) em células coletadas entre 0h e 4 horas (figura 14C). A detecção da banda de maior tamanho não reflete contaminação de DNA genômico, como pode ser verificado pelas reações controle de amplificação do mRNA da tubulina que foram realizadas em paralelo (figura 14D). Não podemos descartar a possibilidade de que em determinadas situações experimentais o processamento do mRNA de INc-1 seja afetado. A diferença observada certamente reflete o fato de as células utilizadas na preparação de RNA total utilizado nos dois experimentos mostrados na figura 14 nos foram cedidas por laboratórios diferentes. Experimentos adicionais são necessários para avaliar se a retenção do íntron no mRNA de INc-1 é um fenômeno reprodutível e em que situação experimental ele pode ser melhor detectada bem como se apresenta algum significado fisiológico.

Figura 14. Reação de RT-PCR para análise dos níveis de mRNA do INc-1 durante o crescimento de *N. crassa*. A partir do RNA total extraído de células coletadas nos tempos indicados foi analisada a expressão dos genes do INc-1 (A, C) e da β -tubulina (B, D) por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e submetidos a *Southern blot* hibridizados com as sondas do gene INc-1 ou β -tubulina. As setas cheias e vazia, indicam respectivamente o produto correspondente ao INc-1 e a β -tubulina. Foi utilizado marcador de tamanho 1Kpb DNA ladder. O tamanho aproximado de alguns marcadores está indicado à esquerda.

4.9. Discussão final

Neste trabalho realizamos com sucesso a clonagem da sequência codificadora de INC-1, um inibidor termoestável da PP1c de *N.crassa*. A atividade inibidora de PP1c de duas isoformas recombinantes purificadas, INC-1L e INC-1, foram avaliadas e comparadas.

A forma denominada INC-1L apresenta em sua região amino-terminal um segmento de 38 aminoácidos derivado da retenção de um íntron, sem alterar a fase de leitura. Contudo, a inserção deste segmento de 38 aminoácidos ocorre após a primeira posição do motivo KGILK, que no inibidor 2 de mamíferos é fundamental na sua interação com a PP1c. Assim, no INC-1L o motivo equivalente apresenta a sequência PGILK. A forma denominada INC-1, não possui a sequência do íntron, e o motivo KGILK é mantido intacto. Ambas proteínas recombinantes exibiram atividade inibidora de PP1c, sendo que a IC₅₀ determinada para INC-1L foi de ~50nM e para INC-1 foi de ~11nM. Estes dados sugerem que a retenção do segmento de aminoácidos codificado pelo íntron na região na isoforma INC-1L diminui o potencial inibidor do INC-1L. Assim é, provável que o motivo PGILK que corresponderia a região 1 em INC-1L seja menos eficaz no ancoramento do inibidor a PP1c, indicando que o motivo KGILK de INC-1 seja importante na interação do inibidor com a PP1c, assim como verificado no I-2 de mamíferos. Ensaios utilizando a metodologia de duplo híbrido de leveduras estão em andamento e irão nos fornecer caracterização mais detalhada da interação *in vivo* entre INC-1, INC-1L e PP1c.

Experimentos anteriores (Zapella, 2001) mostraram que INC-1 nativo purificado de micélios de *N.crassa* é capaz de inibir especificamente tanto PP1c nativa como a PP1c recombinante de *N.crassa*. Contudo, não é possível comparar a eficácia do INC-1 nativo e recombinante, uma vez que as preparações de INC-1 nativo não foram quantificadas. Também foi demonstrado que INC-1 nativo é fosforilado *in vitro* pela PKA e pela GSK3 recombinantes (Zapella, 2001). Será interessante verificar se o INC-1 recombinante é substrato para estas enzimas e qual o efeito que a fosforilação tem sobre sua atividade inibidora de PP1c e/ou sobre sua capacidade de interação com esta enzima. Dados da literatura indicam que a re-ativação da

PP1 associada a I-2 é dependente de mecanismos de fosforilação, que dependem de GSK3, *in vitro* e de CDKs, *in vivo* (Tan *et al.*, 2003; Agarwal-Mawal *et al.*, 2001; Leach *et al.*, 2003; DePaoli-Roach, 1984; Jurgensen *et al.*, 1984; Price *et al.*, 1986; Picking *et al.*, 1991).

A análise dos níveis de expressão do mRNA de INc-1 nas diferentes fases de crescimento de *N.crassa* mostrou expressão predominante e constitutiva do transcrito processado de INc-1, com níveis máximos na fase exponencial. Contudo, será interessante investigar se em alguma condição fisiológica o RNA não processado é acumulado e qual o significado de uma eventual expressão da proteína equivalente a INc-1L. Outra abordagem para investigarmos a função de INc-1 em *N.crassa* é a inativação do gene de INc-1 em *N.crassa* e avaliação das características fenotípicas da linhagem mutante.

5. Bibliografia

- Agarwal-Mawal, A. & Paudel, H.K. (2001) Neuronal Cdc2-like protein kinase (Cdk5/p25) is associated with protein phosphatase 1 and phosphorylates inhibitor-2. *J Biol Chem*, **276**, 23712-23718.
- Aggen, J.B., Nairn, A.C. & Chamberlin, R. (2000) Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol*, **7**, R13-23.
- Aitken, A., Bilham, T. & Cohen, P. (1982) Complete primary structure of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **126**, 235-246.
- Ajuh, P.M., Browne, G.J., Hawkes, N.A., Cohen, P.T., Roberts, S.G. & Lamond, A.I. (2000) Association of a protein phosphatase 1 activity with the human factor C1 (HCF) complex. *Nucleic Acids Res*, **28**, 678-686.
- Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M. & Cohen, P. (1992) The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem*, **210**, 1023-1035.
- Alessi, D.R., Street, A.J., Cohen, P. & Cohen, P.T. (1993) Inhibitor-2 functions like a chaperone to fold three expressed isoforms of mammalian protein phosphatase-1 into a conformation with the specificity and regulatory properties of the native enzyme. *Eur J Biochem*, **213**, 1055-1066.
- Alex, L.A., Korch, C., Selitrennikoff, C.P. & Simon, M.I. (1998) COS1, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7069-7073.
- Allen, P.B., Hvalby, O., Jensen, V., Errington, M.L., Ramsay, M., Chaudhry, F.A., Bliss, T.V., Storm-Mathisen, J., Morris, R.G., Andersen, P. & Greengard, P. (2000) Protein phosphatase-1 regulation in the induction of long-term potentiation: heterogeneous molecular mechanisms. *J Neurosci*, **20**, 3537-3543.
- 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**, 4089-4095.
- Alms, G.R., Sanz, P., Carlson, M. & Haystead, T.A. (1999) Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in *Saccharomyces cerevisiae*: characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. *Embo J*, **18**, 4157-4168.
- Ammosova, T., Jerebtsova, M., Beullens, M., Voloshin, Y., Ray, P.E., Kumar, A., Bollen, M. & Nekhai, S. (2003) Nuclear protein phosphatase-1 regulates HIV-1 transcription. *J Biol Chem*, **278**, 32189-32194.
- Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Villa-Moruzzi, E. & Margolis, R.L. (1998) Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol*, **141**, 1207-1215.
- Andrioli, L.P., Zaini, P.A., Viviani, W. & Da Silva, A.M. (2003) *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase-1 catalytic subunit exhibits distinct biochemical properties. *Biochem J*, **373**, 703-711.
- Armstrong, C.G., Doherty, M.J. & Cohen, P.T. (1998) Identification of the separate domains in the hepatic glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 that interact with phosphorylase a, glycogen and protein phosphatase 1. *Biochem J*, **336** (Pt 3), 699-704.
- Arpaia, G., Cerri, F., Baima, S. & Macino, G. (1999) Involvement of protein kinase C in the response of *Neurospora crassa* to blue light. *Mol Gen Genet*, **262**, 314-322.
- Ausubel, F.M. & Frederick, M. (1995) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Axton, J.M., Dombradi, V., Cohen, P.T. & Glover, D.M. (1990) One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell*, **63**, 33-46.

- Ayllon, V., Cayla, X., Garcia, A., Fleischer, A. & Rebollo, A. (2002) The anti-apoptotic molecules Bcl-xL and Bcl-w target protein phosphatase 1 α to Bad. *Eur J Immunol*, **32**, 1847-1855.
- Bailis, J.M. & Roeder, G.S. (1998) Synaptonemal complex morphogenesis and sister-chromatid cohesion require Mek1-dependent phosphorylation of a meiotic chromosomal protein. *Genes Dev*, **12**, 3551-3563.
- Barford, D. (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci*, **21**, 407-412.
- Barker, H.M., Brewis, N.D., Street, A.J., Spurr, N.K. & Cohen, P.T. (1994) Three genes for protein phosphatase 1 map to different human chromosomes: sequence, expression and gene localisation of protein serine/threonine phosphatase 1 β (PPP1CB). *Biochim Biophys Acta*, **1220**, 212-218.
- Barton, G.J., Cohen, P.T. & Barford, D. (1994) Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur J Biochem*, **220**, 225-237.
- Berman, H.K., O'Doherty, R.M., Anderson, P. & Newgard, C.B. (1998) Overexpression of protein targeting to glycogen (PTG) in rat hepatocytes causes profound activation of glycogen synthesis independent of normal hormone- and substrate-mediated regulatory mechanisms. *J Biol Chem*, **273**, 26421-26425.
- Berndt, N. (1999) Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number. *Front Biosci*, **4**, D22-42.
- Bettoun, D.J., Buck, D.W., 2nd, Lu, J., Khalifa, B., Chin, W.W. & Nagpal, S. (2002) A vitamin D receptor-Ser/Thr phosphatase-p70 S6 kinase complex and modulation of its enzymatic activities by the ligand. *J Biol Chem*, **277**, 24847-24850.
- Beullens, M., Stalmans, W. & Bollen, M. (1996) Characterization of a ribosomal inhibitory polypeptide of protein phosphatase-1 from rat liver. *Eur J Biochem*, **239**, 183-189.
- Beullens, M., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Connor, J., Shenolikar, S., Stalmans, W. & Bollen, M. (1999) Molecular determinants of nuclear protein phosphatase-1 regulation by NIPP-1. *J Biol Chem*, **274**, 14053-14061.
- Beullens, M., Vulsteke, V., Van Eynde, A., Jagiello, I., Stalmans, W. & Bollen, M. (2000) The C-terminus of NIPP1 (nuclear inhibitor of protein phosphatase-1) contains a novel binding site for protein phosphatase-1 that is controlled by tyrosine phosphorylation and RNA binding. *Biochem J*, **352 Pt 3**, 651-658.
- Bibb, J.A., Nishi, A., O'Callaghan, J.P., Ule, J., Lan, M., Snyder, G.L., Horiuchi, A., Saito, T., Hisanaga, S., Czernik, A.J., Nairn, A.C. & Greengard, P. (2001) Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by Cdk5. *J Biol Chem*, **276**, 14490-14497.
- Bollen, M. (2001) Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci*, **26**, 426-431.
- Bollen, M., DePaoli-Roach, A.A. & Stalmans, W. (1994) Native cytosolic protein phosphatase-1 (PP-1S) containing modulator (inhibitor-2) is an active enzyme. *FEBS Lett*, **344**, 196-200.
- Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D.J., Zelter, A., Kalkman, E.R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W. & Pratt, R. (2004) Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 1-108, table of contents.
- Boudrez, A., Beullens, M., Groenen, P., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Jagiello, I., Murray, M., Krainer, A.R., Stalmans, W. & Bollen, M. (2000) NIPP1-mediated

- interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry. *J Biol Chem*, **275**, 25411-25417.
- Boudrez, A., Beullens, M., Waelkens, E., Stalmans, W. & Bollen, M. (2002) Phosphorylation-dependent interaction between the splicing factors SAP155 and NIPP1. *J Biol Chem*, **277**, 31834-31841.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brautigan, D.L., Sunwoo, J., Labbe, J.C., Fernandez, A. & Lamb, N.J. (1990) Cell cycle oscillation of phosphatase inhibitor-2 in rat fibroblasts coincident with p34cdc2 restriction. *Nature*, **344**, 74-78.
- Bruno, K.S., Aramayo, R., Minke, P.F., Metzenberg, R.L. & Plamann, M. (1996) Loss of growth polarity and mislocalization of septa in a *Neurospora* mutant altered in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Embo J*, **15**, 5772-5782.
- Caenepeel, S., Charyczak, G., Sudarsanam, S., Hunter, T. & Manning, G. (2004) The mouse kinome: Discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Cannon, J.F., Pringle, J.R., Fiechter, A. & Khalil, M. (1994) Characterization of glycogen-deficient glc mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **136**, 485-503.
- Carr, A.N., Schmidt, A.G., Suzuki, Y., del Monte, F., Sato, Y., Lanner, C., Breeden, K., Jing, S.L., Allen, P.B., Greengard, P., Yatani, A., Hoit, B.D., Grupp, I.L., Hajjar, R.J., DePaoli-Roach, A.A. & Kranias, E.G. (2002) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol*, **22**, 4124-4135.
- Ceulemans, H. & Bollen, M. (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev*, **84**, 1-39.
- Ceulemans, H., Stalmans, W. & Bollen, M. (2002) Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays*, **24**, 371-381.
- Cheng, A., Dean, N.M. & Honkanen, R.E. (2000) Serine/threonine protein phosphatase type 1gamma1 is required for the completion of cytokinesis in human A549 lung carcinoma cells. *J Biol Chem*, **275**, 1846-1854.
- Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem*, **58**, 453-508.
- Cohen, P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci*, **25**, 596-601.
- Cohen, P., Klumpp, S. & Schelling, D.L. (1989) An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett*, **250**, 596-600.
- Cohen, P.T. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci*, **22**, 245-251.
- Cohen, P.T. (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci*, **115**, 241-256.
- Colbran, R.J., Carmody, L.C., Bauman, P.A., Wadzinski, B.E. & Bass, M.A. (2003) Analysis of specific interactions of native protein phosphatase 1 isoforms with targeting subunits. *Methods Enzymol*, **366**, 156-175.
- Colligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. & Wingfield, P.T. (1995) *Current Protocols in proteins science*. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Connor, J.H., Frederick, D., Huang, H., Yang, J., Helps, N.R., Cohen, P.T., Nairn, A.C., DePaoli-Roach, A., Tatchell, K. & Shenolikar, S. (2000) Cellular mechanisms regulating protein phosphatase-1. A key functional interaction between inhibitor-2 and the type 1 protein phosphatase catalytic subunit. *J Biol Chem*, **275**, 18670-18675.
- Connor, J.H., Kleeman, T., Barik, S., Honkanen, R.E. & Shenolikar, S. (1999) Importance of the beta12-beta13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for

- inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors. *J Biol Chem*, **274**, 22366-22372.
- Connor, J.H., Weiser, D.C., Li, S., Hallenbeck, J.M. & Shenolikar, S. (2001) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol*, **21**, 6841-6850.
- Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T. & Barford, D. (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *Embo J*, **15**, 6798-6809.
- 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.
- Davis, R.H. & Perkins, D.D. (2002) Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes. *Nat Rev Genet*, **3**, 397-403.
- Dawson, J.F., Wang, K.H. & Holmes, C.F. (1996) Identification and characterization of cAMP-dependent protein kinase and its possible direct interactions with protein phosphatase-1 in marine dinoflagellates. *Biochem Cell Biol*, **74**, 559-567.
- DePaoli-Roach, A.A. (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *J Biol Chem*, **259**, 12144-12152.
- Desdouits, F., Siciliano, J.C., Greengard, P. & Girault, J.A. (1995) Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein DARPP-32: phosphorylation of Ser-137 by casein kinase I inhibits dephosphorylation of Thr-34 by calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2682-2685.
- Dickman, M.B. & Yarden, O. (1999) Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, **26**, 99-117.
- Dohadwala, M., da Cruz e Silva, E.F., Hall, F.L., Williams, R.T., Carbonaro-Hall, D.A., Nairn, A.C., Greengard, P. & Berndt, N. (1994) Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6408-6412.
- Doherty, M.J., Young, P.R. & Cohen, P.T. (1996) Amino acid sequence of a novel protein phosphatase 1 binding protein (R5) which is related to the liver- and muscle-specific glycogen binding subunits of protein phosphatase 1. *FEBS Lett*, **399**, 339-343.
- Dombradi, V., Mann, D.J., Saunders, R.D. & Cohen, P.T. (1993) Cloning of the fourth functional gene for protein phosphatase 1 in *Drosophila melanogaster* from its chromosomal location. *Eur J Biochem*, **212**, 177-183.
- Doonan, J.H. & Morris, N.R. (1989) The bimG gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell*, **57**, 987-996.
- Egloff, M.P., Cohen, P.T., Reinemer, P. & Barford, D. (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol*, **254**, 942-959.
- Egloff, M.P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P.T., Cohen, P. & Barford, D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J*, **16**, 1876-1887.
- Endo, S., Zhou, X., Connor, J., Wang, B. & Shenolikar, S. (1996) Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry*, **35**, 5220-5228.
- Eto, M., Elliott, E., Prickett, T.D. & Brautigan, D.L. (2002) Inhibitor-2 regulates protein phosphatase-1 complexed with NimA-related kinase to induce centrosome separation. *J Biol Chem*, **277**, 44013-44020.
- Faux, M.C. & Scott, J.D. (1996) More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem Sci*, **21**, 312-315.

- Fawell, S.E. & Lenard, J. (1988) A specific insulin receptor and tyrosine kinase activity in the membranes of *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Commun*, **155**, 59-65.
- Feng, Z.H., Wilson, S.E., Peng, Z.Y., Schlender, K.K., Reimann, E.M. & Trumbly, R.J. (1991) The yeast GLC7 gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *J Biol Chem*, **266**, 23796-23801.
- Fernandez, A., Brautigan, D.L. & Lamb, N.J. (1992) Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis: chromosomal localization and involvement in mitotic exit. *J Cell Biol*, **116**, 1421-1430.
- Fong, N.M., Jensen, T.C., Shah, A.S., Parekh, N.N., Saltiel, A.R. & Brady, M.J. (2000) Identification of binding sites on protein targeting to glycogen for enzymes of glycogen metabolism. *J Biol Chem*, **275**, 35034-35039.
- Foulkes, J.G. & Cohen, P. (1980) The regulation of glycogen metabolism. Purification and properties of protein phosphatase inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **105**, 195-203.
- Fresu, M., Bianchi, M., Parsons, J.T. & Villa-Moruzzi, E. (2001) Cell-cycle-dependent association of protein phosphatase 1 and focal adhesion kinase. *Biochem J*, **358**, 407-414.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C.P., Kinsey, J.A., Braun, E.L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G.O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R.L., Perkins, D.D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R.J., Osmani, S.A., DeSouza, C.P., Glass, L., Orbach, M.J., Berglund, J.A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D.O., Alex, L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D.J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M.S., Lander, E.S., Nusbaum, C. & Birren, B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, **422**, 859-868.
- Garcia-Gimeno, M.A., Munoz, I., Arino, J. & Sanz, P. (2003) Molecular characterization of Ypi1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J Biol Chem*, **278**, 47744-47752.
- Gasa, R., Jensen, P.B., Berman, H.K., Brady, M.J., DePaoli-Roach, A.A. & Newgard, C.B. (2000) Distinctive regulatory and metabolic properties of glycogen-targeting subunits of protein phosphatase-1 (PTG, GL, GM/RGI) expressed in hepatocytes. *J Biol Chem*, **275**, 26396-26403.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D. & Mansuy, I.M. (2002) Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, **418**, 970-975.
- Gold, M.H., Farrand, R.J., Livoni, J.P. & Segel, I.H. (1974) *Neurospora crassa* glucogen phosphorylase: interconversion and kinetic properties of the "active" form. *Arch Biochem Biophys*, **161**, 515-527.
- Gold, M.H. & Segel, I.H. (1974) *Neurospora crassa* protein kinase. Purification, properties, and kinetic mechanism. *J Biol Chem*, **249**, 2417-2423.
- Goldberg, J., Huang, H.B., Kwon, Y.G., Greengard, P., Nairn, A.C. & Kuriyan, J. (1995) Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*, **376**, 745-753.
- Goldberg, Y. (1999) Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem Pharmacol*, **57**, 321-328.
- Goris, J., Defreyn, G. & Merlevede, W. (1979) Resolution of the ATP-Mg-dependent phosphorylase phosphatase from liver into a two protein component system. *FEBS Lett*, **99**, 279-282.

- Graves, J.D. & Krebs, E.G. (1999) Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol Ther*, **82**, 111-121.
- Gribskov, M., Fana, F., Harper, J., Hope, D.A., Harmon, A.C., Smith, D.W., Tax, F.E. & Zhang, G. (2001) PlantsP: a functional genomics database for plant phosphorylation. *Nucleic Acids Res*, **29**, 111-113.
- Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K. & Navia, M.A. (1995) X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, **82**, 507-522.
- Hanks, S.K. & Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J*, **9**, 576-596.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.
- Helps, N.R. & Cohen, P.T. (1999) *Drosophila melanogaster* protein phosphatase inhibitor-2: identification of a site important for PP1 inhibition. *FEBS Lett*, **463**, 72-76.
- Helps, N.R., Luo, X., Barker, H.M. & Cohen, P.T. (2000) NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J*, **349**, 509-518.
- Helps, N.R., Street, A.J., Elledge, S.J. & Cohen, P.T. (1994) Cloning of the complete coding region for human protein phosphatase inhibitor 2 using the two hybrid system and expression of inhibitor 2 in *E. coli*. *FEBS Lett*, **340**, 93-98.
- Hemmings, B.A., Resink, T.J. & Cohen, P. (1982) Reconstitution of a Mg-ATP-dependent protein phosphatase and its activation through a phosphorylation mechanism. *FEBS Lett*, **150**, 319-324.
- Hemmings, H.C., Jr., Greengard, P., Tung, H.Y. & Cohen, P. (1984) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature*, **310**, 503-505.
- Hemmings, H.C., Jr., Nairn, A.C., Elliott, J.I. & Greengard, P. (1990) Synthetic peptide analogs of DARPP-32 (Mr 32,000 dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein), an inhibitor of protein phosphatase-1. Phosphorylation, dephosphorylation, and inhibitory activity. *J Biol Chem*, **265**, 20369-20376.
- Higuchi, S., Tamura, J., Giri, P.R., Polli, J.W. & Kincaid, R.L. (1991) Calmodulin-dependent protein phosphatase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and expression of recombinant catalytic subunit. *J Biol Chem*, **266**, 18104-18112.
- Hiraga, A. & Cohen, P. (1986) Phosphorylation of the glycogen-binding subunit of protein phosphatase-1G by cyclic-AMP-dependent protein kinase promotes translocation of the phosphatase from glycogen to cytosol in rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **161**, 763-769.
- Holmes, C.F., Campbell, D.G., Caudwell, F.B., Aitken, A. & Cohen, P. (1986) The protein phosphatases involved in cellular regulation. Primary structure of inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **155**, 173-182.
- Holmes, C.F., Tonks, N.K., Major, H. & Cohen, P. (1987) Analysis of the in vivo phosphorylation state of protein phosphatase inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle by fast-atom bombardment mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, **929**, 208-219.
- Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. & Allis, C.D. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.
- Huang, F.L. & Glinemann, W.H. (1976) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **70**, 419-426.

- Huang, H.B., Horiuchi, A., Watanabe, T., Shih, S.R., Tsay, H.J., Li, H.C., Greengard, P. & Nairn, A.C. (1999) Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem*, **274**, 7870-7878.
- Huang, K.X. & Paudel, H.K. (2000) Ser67-phosphorylated inhibitor 1 is a potent protein phosphatase 1 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5824-5829.
- Hubbard, M.J. & Cohen, P. (1989) Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates. *Eur J Biochem*, **186**, 711-716.
- Hubbard, M.J. & Cohen, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci*, **18**, 172-177.
- Hunter, T. (1987) A thousand and one protein kinases. *Cell*, **50**, 823-829.
- Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236.
- Jagiello, I., Beullens, M., Stalmans, W. & Bollen, M. (1995) Subunit structure and regulation of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *J Biol Chem*, **270**, 17257-17263.
- Jagiello, I., Beullens, M., Vulsteke, V., Wera, S., Sohlberg, B., Stalmans, W., von Gabain, A. & Bollen, M. (1997) NIPP-1, a nuclear inhibitory subunit of protein phosphatase-1, has RNA-binding properties. *J Biol Chem*, **272**, 22067-22071.
- Janssens, V. & Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, **353**, 417-439.
- Jin, Q., van Eynde, A., Beullens, M., Roy, N., Thiel, G., Stalmans, W. & Bollen, M. (2003) The protein phosphatase-1 (PP1) regulator, nuclear inhibitor of PP1 (NIPP1), interacts with the polycomb group protein, embryonic ectoderm development (EED), and functions as a transcriptional repressor. *J Biol Chem*, **278**, 30677-30685.
- Junqueira de Azevedo, I.L., Farsky, S.H., Oliveira, M.L. & Ho, P.L. (2001) Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis pit viper*. A new member of the VEGF family of proteins. *J Biol Chem*, **276**, 39836-39842.
- Jurgensen, S., Shacter, E., Huang, C.Y., Chock, P.B., Yang, S.D., Vandenheede, J.R. & Merlevede, W. (1984) On the mechanism of activation of the ATP X Mg(II)-dependent phosphoprotein phosphatase by kinase FA. *J Biol Chem*, **259**, 5864-5870.
- Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M. & Bryant, P.J. (1995) The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev*, **9**, 534-546.
- Kakinoki, Y., Somers, J. & Brautigan, D.L. (1997) Multisite phosphorylation and the nuclear localization of phosphatase inhibitor 2-green fluorescent protein fusion protein during S phase of the cell growth cycle. *J Biol Chem*, **272**, 32308-32314.
- Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M. & Sen, S. (2001) Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem*, **276**, 46219-46224.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S. & Gribskov, M. (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **129**, 908-925.
- Kita, A., Matsunaga, S., Takai, A., Kataiwa, H., Wakimoto, T., Fusetani, N., Isobe, M. & Miki, K. (2002) Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Structure (Camb)*, **10**, 715-724.
- Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheysas, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J. & Laz, T.M. (2002) Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0043.

- Kothe, G.O. & Free, S.J. (1998a) Calcineurin subunit B is required for normal vegetative growth in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*, **23**, 248-258.
- Kothe, G.O. & Free, S.J. (1998b) The isolation and characterization of *nrc-1* and *nrc-2*, two genes encoding protein kinases that control growth and development in *Neurospora crassa*. *Genetics*, **149**, 117-130.
- Kwon, Y.G., Huang, H.B., Desdouits, F., Girault, J.A., Greengard, P. & Nairn, A.C. (1997) Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP-32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3536-3541.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lauter, F.R. & Russo, V.E. (1990) Light-induced dephosphorylation of a 33 kDa protein in the wild-type strain of *Neurospora crassa*: the regulatory mutants *wc-1* and *wc-2* are abnormal. *J Photochem Photobiol B*, **5**, 95-103.
- Leach, C., Eto, M. & Brautigan, D.L. (2002) Domains of type 1 protein phosphatase inhibitor-2 required for nuclear and cytoplasmic localization in response to cell-cell contact. *J Cell Sci*, **115**, 3739-3745.
- Leach, C., Shenolikar, S. & Brautigan, D.L. (2003) Phosphorylation of phosphatase inhibitor-2 at centrosomes during mitosis. *J Biol Chem*, **278**, 26015-26020.
- Lin, Q., Buckler, E.S.t., Muse, S.V. & Walker, J.C. (1999) Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases. *Mol Phylogenet Evol*, **12**, 57-66.
- Lin, T.H., Chen, Y.C., Chyan, C.L., Tsay, L.H., Tang, T.C., Jeng, H.H., Lin, F.M. & Huang, H.B. (2003) Phosphorylation by glycogen synthase kinase of inhibitor-2 does not change its structure in free state. *FEBS Lett*, **554**, 253-256.
- Liu, H.T., Lin, T.H., Kuo, H.C., Chen, Y.C., Tsay, H.J., Jeng, H.H., Tsai, P.C., Shie, F.K., Chen, J.H. & Huang, H.B. (2002) Identification of the alternative splice products encoded by the human protein phosphatase inhibitor-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 1293-1296.
- Liu, J. & Brautigan, D.L. (2000) Glycogen synthase association with the striated muscle glycogen-targeting subunit of protein phosphatase-1. Synthase activation involves scaffolding regulated by beta-adrenergic signaling. *J Biol Chem*, **275**, 26074-26081.
- Mackintosh, C., Garton, A.J., McDonnell, A., Barford, D., Cohen, P.T., Tonks, N.K. & Cohen, P. (1996) Further evidence that inhibitor-2 acts like a chaperone to fold PP1 into its native conformation. *FEBS Lett*, **397**, 235-238.
- Mackintosh, R.W., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T., Cohen, P. & MacKintosh, C. (1995) The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett*, **371**, 236-240.
- MacMillan, L.B., Bass, M.A., Cheng, N., Howard, E.F., Tamura, M., Strack, S., Wadzinski, B.E. & Colbran, R.J. (1999) Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. *J Biol Chem*, **274**, 35845-35854.
- Mannhaupt, G., Montrone, C., Haase, D., Mewes, H.W., Aign, V., Hoheisel, J.D., Fartmann, B., Nyakatura, G., Kempken, F., Maier, J. & Schulte, U. (2003) What's in the genome of a filamentous fungus? Analysis of the *Neurospora* genome sequence. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1944-1954.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002a) Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci*, **27**, 514-520.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002b) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912-1934.
- Maynes, J.T., Bateman, K.S., Cherney, M.M., Das, A.K., Luu, H.A., Holmes, C.F. & James, M.N. (2001) Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, **276**, 44078-44082.
- Merlevede, W., Goris, J. & De Brandt, C. (1969) Interconversion in vitro of two forms of liver phosphorylase phosphatase. *Eur J Biochem*, **11**, 499-502.

- Merlevede, W. & Riley, G.A. (1966) The activation and inactivation of phosphorylase phosphatase from bovine adrenal cortex. *J Biol Chem*, **241**, 3517-3524.
- Metzenberg, R.L. (1979) Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*. *Microbiol Rev*, **43**, 361-383.
- Moorhead, G., MacKintosh, R.W., Morrice, N., Gallagher, T. & MacKintosh, C. (1994) Purification of type 1 protein (serine/threonine) phosphatases by microcystin-Sepharose affinity chromatography. *FEBS Lett*, **356**, 46-50.
- Mulkey, R.M., Endo, S., Shenolikar, S. & Malenka, R.C. (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, **369**, 486-488.
- Nekhai, S., Zhou, M., Fernandez, A., Lane, W.S., Lamb, N.J., Brady, J. & Kumar, A. (2002) HIV-1 Tat-associated RNA polymerase C-terminal domain kinase, CDK2, phosphorylates CDK7 and stimulates Tat-mediated transcription. *Biochem J*, **364**, 649-657.
- Nigavekar, S.S., Tan, Y.S. & Cannon, J.F. (2002) Glc8 is a glucose-repressible activator of Glc7 protein phosphatase-1. *Arch Biochem Biophys*, **404**, 71-79.
- Nimmo, G.A. & Cohen, P. (1978) The regulation of glycogen metabolism. Purification and characterisation of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **87**, 341-351.
- Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. & Yanagida, M. (1989) The fission yeast *dis2+* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell*, **57**, 997-1007.
- Pall, M.L., Trevillyan, J.M. & Hinman, N. (1981) Deficient cyclic adenosine 3',5'-monophosphate control in mutants of two genes of *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol*, **1**, 1-8.
- Pandey, A., Roca, M.G., Read, N.D. & Glass, N.L. (2004) Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, **3**, 348-358.
- Park, I.K., Roach, P., Bondor, J., Fox, S.P. & DePaoli-Roach, A.A. (1994) Molecular mechanism of the synergistic phosphorylation of phosphatase inhibitor-2. Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of inhibitor-2. *J Biol Chem*, **269**, 944-954.
- Parker, L., Gross, S., Beullens, M., Bollen, M., Bennett, D. & Alpey, L. (2002) Functional interaction between nuclear inhibitor of protein phosphatase type 1 (NIPP1) and protein phosphatase type 1 (PP1) in *Drosophila*: consequences of over-expression of NIPP1 in flies and suppression by co-expression of PP1. *Biochem J*, **368**, 789-797.
- Perkins, D.D. (1992) *Neurospora*: the organism behind the molecular revolution. *Genetics*, **130**, 687-701.
- Picking, W.D., Kudlicki, W., Kramer, G., Hardesty, B., Vandenheede, J.R., Merlevede, W., Park, I.K. & DePaoli-Roach, A. (1991) Fluorescence studies on the interaction of inhibitor 2 and okadaic acid with the catalytic subunit of type 1 phosphoprotein phosphatases. *Biochemistry*, **30**, 10280-10287.
- Plowman, G.D., Sudarsanam, S., Bingham, J., Whyte, D. & Hunter, T. (1999) The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13603-13610.
- Prakash, V. (1972) Regulation of sexual competence in *Neurospora*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **353**, 745-746.
- Price, D.J., Tabarini, D. & Li, H.C. (1986) Purification, subunit composition and regulatory properties of the ATP X Mg²⁺-dependent form of type I phosphoprotein phosphatase from bovine heart. *Eur J Biochem*, **158**, 635-645.
- Printen, J.A., Brady, M.J. & Saltiel, A.R. (1997) PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism. *Science*, **275**, 1475-1478.
- Prokisch, H., Yarden, O., Dieminger, M., Tropschug, M. & Barthelmess, I.B. (1997) Impairment of calcineurin function in *Neurospora crassa* reveals its essential role in

- hyphal growth, morphology and maintenance of the apical Ca^{2+} gradient. *Mol Gen Genet*, **256**, 104-114.
- Raghavan, S., Williams, I., Aslam, H., Thomas, D., Szoor, B., Morgan, G., Gross, S., Turner, J., Fernandes, J., VijayRaghavan, K. & Alphey, L. (2000) Protein phosphatase 1 β is required for the maintenance of muscle attachments. *Curr Biol*, **10**, 269-272.
- Ramaswamy, N.T., Li, L., Khalil, M. & Cannon, J.F. (1998) Regulation of yeast glycogen metabolism and sporulation by Glc7p protein phosphatase. *Genetics*, **149**, 57-72.
- Rubin, E., Mitnacht, S., Villa-Moruzzi, E. & Ludlow, J.W. (2001) Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1. *Oncogene*, **20**, 3776-3785.
- Rubin, E., Tamrakar, S. & Ludlow, J.W. (1998) Protein phosphatase type 1, the product of the retinoblastoma susceptibility gene, and cell cycle control. *Front Biosci*, **3**, D1209-1219.
- Sakashita, G., Shima, H., Komatsu, M., Urano, T., Kikuchi, A. & Kikuchi, K. (2003) Regulation of type 1 protein phosphatase/inhibitor-2 complex by glycogen synthase kinase-3 β in intact cells. *J Biochem (Tokyo)*, **133**, 165-171.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A. & Carlson, M. (2000) Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol Cell Biol*, **20**, 1321-1328.
- Sasaki, K., Shima, H., Kitagawa, Y., Irino, S., Sugimura, T. & Nagao, M. (1990) Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 α gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, **81**, 1272-1280.
- Sassoon, I., Severin, F.F., Andrews, P.D., Taba, M.R., Kaplan, K.B., Ashford, A.J., Stark, M.J., Sorger, P.K. & Hyman, A.A. (1999) Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p. *Genes Dev*, **13**, 545-555.
- 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**, 321-324.
- Schillace, R.V., Voltz, J.W., Sim, A.T., Shenolikar, S. & Scott, J.D. (2001) Multiple interactions within the AKAP220 signaling complex contribute to protein phosphatase 1 regulation. *J Biol Chem*, **276**, 12128-12134.
- Schmit, J.C. & Brody, S. (1976) Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol Rev*, **40**, 1-41.
- Scrimgeour, A.G., Allen, P.B., Fienberg, A.A., Greengard, P. & Lawrence, J.C., Jr. (1999) Inhibitor-1 is not required for the activation of glycogen synthase by insulin in skeletal muscle. *J Biol Chem*, **274**, 20949-20952.
- Shenolikar, S. (1994) Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 55-86.
- Shenolikar, S. & Ingebritsen, T.S. (1984) Protein (serine and threonine) phosphate phosphatases. *Methods Enzymol*, **107**, 102-129.
- Shenolikar, S. & Nairn, A.C. (1991) Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **23**, 1-121.
- Sheppeck, J.E., 2nd, Gauss, C.M. & Chamberlin, A.R. (1997) Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg Med Chem*, **5**, 1739-1750.
- Shirato, H., Shima, H., Sakashita, G., Nakano, T., Ito, M., Lee, E.Y. & Kikuchi, K. (2000) Identification and characterization of a novel protein inhibitor of type 1 protein phosphatase. *Biochemistry*, **39**, 13848-13855.
- Skinner, J.A. & Saltiel, A.R. (2001) Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targeting subunit of protein phosphatase 1. *Biochem J*, **356**, 257-267.

- Springer, M.L. (1993) Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Bioessays*, **15**, 365-374.
- Stewart, A.A., Hemmings, B.A., Cohen, P., Goris, J. & Merlevede, W. (1981) The MgATP-dependent protein phosphatase and protein phosphatase 1 have identical substrate specificities. *Eur J Biochem*, **115**, 197-205.
- 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**, 485-490.
- Szoor, B., Dombradi, V., Gergely, P. & Feher, Z. (1997) Purification and characterization of the catalytic subunit of protein phosphatase 1 from *Neurospora crassa*. *Acta Biol Hung*, **48**, 289-302.
- Szoor, B., Feher, Z., Bako, E., Erdodi, F., Szabo, G., Gergely, P. & Dombradi, V. (1995) Isolation and characterization of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A from *Neurospora crassa*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **112**, 515-522.
- Szoor, B., Feher, Z., Zeke, T., Gergely, P., Yatzkan, E., Yarden, O. & Dombradi, V. (1998) pzl-1 encodes a novel protein phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase in *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta*, **1388**, 260-266.
- Tamrakar, S. & Ludlow, J.W. (2000) The carboxyl-terminal region of the retinoblastoma protein binds non-competitively to protein phosphatase type 1 α and inhibits catalytic activity. *J Biol Chem*, **275**, 27784-27789.
- Tan, Y.S., Morcos, P.A. & Cannon, J.F. (2003) Pho85 phosphorylates the Glc7 protein phosphatase regulator Glc8 in vivo. *J Biol Chem*, **278**, 147-153.
- Tchieu, J.H., Fana, F., Fink, J.L., Harper, J., Nair, T.M., Niedner, R.H., Smith, D.W., Steube, K., Tam, T.M., Veretnik, S., Wang, D. & Gribskov, M. (2003) The PlantsP and PlantsT Functional Genomics Databases. *Nucleic Acids Res*, **31**, 342-344.
- Tellez-Inon, M.T. & Torres, H.N. (1970) Interconvertible forms of glycogen phosphorylase in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **66**, 459-463.
- Tellez-Inon, M.T. & Torres, H.N. (1973) Regulation of glycogen phosphorylase a phosphatase in *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta*, **297**, 399-412.
- Terry-Lorenzo, R.T., Elliot, E., Weiser, D.C., Prickett, T.D., Brautigan, D.L. & Shenolikar, S. (2002) Neurabins recruit protein phosphatase-1 and inhibitor-2 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **277**, 46535-46543.
- Terry-Lorenzo, R.T., Inoue, M., Connor, J.H., Haystead, T.A., Armbruster, B.N., Gupta, R.P., Oliver, C.J. & Shenolikar, S. (2000) Neurofilament-L is a protein phosphatase-1-binding protein associated with neuronal plasma membrane and post-synaptic density. *J Biol Chem*, **275**, 2439-2446.
- Trevillyan, J.M. & Pall, M.L. (1982) Isolation and properties of a cyclic AMP-binding protein from *Neurospora*. Evidence for its role as the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **257**, 3978-3986.
- Tu, J. & Carlson, M. (1995) REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **14**, 5939-5946.
- Tu, J., Song, W. & Carlson, M. (1996) Protein phosphatase type 1 interacts with proteins required for meiosis and other cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 4199-4206.
- Tung, H.Y. & Cohen, P. (1984) The protein phosphatases involved in cellular regulation. Comparison of native and reconstituted Mg-ATP-dependent protein phosphatases from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **145**, 57-64.
- Tung, H.Y., Wang, W. & Chan, C.S. (1995) Regulation of chromosome segregation by Glc8p, a structural homolog of mammalian inhibitor 2 that functions as both an activator and an inhibitor of yeast protein phosphatase 1. *Mol Cell Biol*, **15**, 6064-6074.
- Van Eynde, A., Wera, S., Beullens, M., Torrekens, S., Van Leuven, F., Stalmans, W. & Bollen, M. (1995) Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein

- phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing. *J Biol Chem*, **270**, 28068-28074.
- Vandenhede, J.R., Yang, S.D., Merlevede, W., Jurgensen, S. & Chock, P.B. (1985) Kinase FA-mediated regulation of rabbit skeletal muscle protein phosphatase. Reversible phosphorylation of the modulator subunit. *J Biol Chem*, **260**, 10512-10516.
- Villafranca, J.E., Kissinger, C.R. & Parge, H.E. (1996) Protein serine/threonine phosphatases. *Curr Opin Biotechnol*, **7**, 397-402.
- Villa-Moruzzi, E., Dalla Zonca, P. & Crabb, J.W. (1991) Phosphorylation of the catalytic subunit of type-1 protein phosphatase by the v-abl tyrosine kinase. *FEBS Lett*, **293**, 67-71.
- Vogel, H.J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium M.). *Microbiol Genet Bull*, **13**, 42-43.
- Waddell, S. (2003) Protein phosphatase 1 and memory: practice makes PP1 imperfect? *Trends Neurosci*, **26**, 117-119.
- Wakula, P., Beullens, M., Ceulemans, H., Stalmans, W. & Bollen, M. (2003) Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, **278**, 18817-18823.
- Wang, H. & Brautigan, D.L. (2002) A novel transmembrane Ser/Thr kinase complexes with protein phosphatase-1 and inhibitor-2. *J Biol Chem*, **277**, 49605-49612.
- Washington, K., Ammosova, T., Beullens, M., Jerebtsova, M., Kumar, A., Bollen, M. & Nekhai, S. (2002) Protein phosphatase-1 dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase-II. *J Biol Chem*, **277**, 40442-40448.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, **420**, 520-562.
- Wera, S. & Hemmings, B.A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J*, **311** (Pt 1), 17-29.
- Williams, K.R., Hemmings, H.C., Jr., LoPresti, M.B., Konigsberg, W.H. & Greengard, P. (1986) DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated neuronal phosphoprotein. Primary structure and homology with protein phosphatase inhibitor-1. *J Biol Chem*, **261**, 1890-1903.
- Wu, X. & Tatchell, K. (2001) Mutations in yeast protein phosphatase type 1 that affect targeting subunit binding. *Biochemistry*, **40**, 7410-7420.
- Yamano, H., Ishii, K. & Yanagida, M. (1994) Phosphorylation of dis2 protein phosphatase at the C-terminal cdc2 consensus and its potential role in cell cycle regulation. *Embo J*, **13**, 5310-5318.
- Yamawaki, K., Ito, M., Machida, H., Moriki, N., Okamoto, R., Isaka, N., Shimpō, H., Kohda, A., Okumura, K., Hartshorne, D.J. & Nakano, T. (2001) Identification of human CPI-17, an inhibitory phosphoprotein for myosin phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 1040-1045.
- Yang, J., Hurley, T.D. & DePaoli-Roach, A.A. (2000) Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif. *J Biol Chem*, **275**, 22635-22644.
- Yang, Y., He, Q., Cheng, P., Wrage, P., Yarden, O. & Liu, Y. (2004) Distinct roles for PP1 and PP2A in the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev*, **18**, 255-260.
- Yarden, O., Plamann, M., Ebbole, D.J. & Yanofsky, C. (1992) cot-1, a gene required for hyphal elongation in *Neurospora crassa*, encodes a protein kinase. *Embo J*, **11**, 2159-2166.
- Yatzkan, E., Szoor, B., Feher, Z., Dombradi, V. & Yarden, O. (1998) Protein phosphatase 2A is involved in hyphal growth of *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet*, **259**, 523-531.
- Yatzkan, E. & Yarden, O. (1995) Inactivation of a single-2A phosphoprotein phosphatase is lethal in *Neurospora crassa*. *Curr Genet*, **28**, 458-466.

- Yatzkan, E. & Yarden, O. (1997) ppt-1, a *Neurospora crassa* PPT/PP5 subfamily serine/threonine protein phosphatase. *Biochim Biophys Acta*, **1353**, 18-22.
- Yatzkan, E. & Yarden, O. (1999) The B regulatory subunit of protein phosphatase 2A is required for completion of macroconidiation and other developmental processes in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol*, **31**, 197-209.
- Zapella, P.D., da-Silva, A.M., da-Costa-Maia, J.C. & Terenzi, H.F. (1996) Serine/threonine protein phosphatases and a protein phosphatase 1 inhibitor from *Neurospora crassa*. *Braz J Med Biol Res*, **29**, 599-604.
- Zapella, P.D.A. (2001) Caracterização de alguns componentes envolvidos na desfosforilação de proteínas fosforiladas em resíduos de serina/treonina em *Neurospora crassa*. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo. São Paulo, pp175.
- Zeke, T., Kokai, E., Szoor, B., Yatzkan, E., Yarden, O., Szirak, K., Feher, Z., Bagossi, P., Gergely, P. & Dombradi, V. (2003) Expression of protein phosphatase 1 during the asexual development of *Neurospora crassa*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **134**, 161-170.
- Zhang, J., Zhang, L., Zhao, S. & Lee, E.Y. (1998) Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. *Biochemistry*, **37**, 16728-16734.
- Zhang, Z., Bai, G., Deans-Zirattu, S., Browner, M.F. & Lee, E.Y. (1992a) Expression of the catalytic subunit of phosphorylase phosphatase (protein phosphatase-1) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **267**, 1484-1490.
- Zhang, Z., Bai, G. & Lee, E.Y. (1992b) PCR cloning of the cDNA of rabbit skeletal muscle protein phosphatase inhibitor-2. *Biochem Biophys Res Commun*, **186**, 1168-1170.
- Zhao, S. & Lee, E.Y. (1997) Targeting of the catalytic subunit of protein phosphatase-1 to the glycolytic enzyme phosphofructokinase. *Biochemistry*, **36**, 8318-8324.
- Zolnierowicz, S. & Bollen, M. (2000) Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. *Embo J*, **19**, 483-488.