UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

RENATO ASTOLFI RAPOSO

**Análise de interações da subunidade catalítica
da fosfatase do tipo 1 (PP1c) de *Dictyostelium*
discoideum identificadas através do sistema de
duplo-híbrido em leveduras**

São Paulo

Data de Depósito na SPG: 16/08/2010

RENATO ASTOLFI RAPOSO

**Análise de interações da subunidade catalítica da
fosfatase do tipo 1 (PP1c) de *Dictyostelium*
discoideum identificadas através do sistema de
duplo-híbrido em leveduras**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Ciências, área Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva

São Paulo

2010

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO DE TODO OU PARTE DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO DO CONJUNTO DAS QUÍMICAS

Raposo, Renato Astolfi

Análise de interações da subunidade catalítica da fosfatase do tipo 1 (PP1c) de *Dictyostelium discoideum* identificadas através do sistema de duplo-híbrido em leveduras./ Renato Astolfi Raposo. --São Paulo, 2010.

Orientadora: Aline Maria da Silva.

74 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica.

Descritores: 1. Fosfatase. 2. Proteína.Fosfatase do tipo-1. 3. Interação Proteína-Proteína. 4. Proteína recombinante. 5. Sistema do duplo-híbrido. 6. Ameba social. I. da Silva, Aline Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). III. Título.

Renato Astolfi Raposo

Análise de interações da subunidade catalítica da fosfatase do tipo 1 (PP1c) de *Dictyostelium discoideum* identificadas através do sistema de duplo-híbrido em leveduras.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área Bioquímica.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico...

.... À minha família, em especial à minha mãe, Neusa Astolfi, pelo carinho e apoio recebidos durante toda a minha vida.

Agradeço...

...à Profa. Dra. Aline Maria da Silva pela paciência, amizade e ensinamentos dedicados a mim durante os cinco anos em que estudei em seu laboratório.

...às Profas. Dras. Glaucia Mendes Souza e Suely Lopes Gomes e aos Profs. Drs. Sérgio Verjovski-Almeida e Walter Ribeiro Terra pela cessão de equipamentos de seus respectivos laboratórios.

...à amiga Dra. Daniela Gonzalez-Kristeller, minha co-orientadora durante a iniciação científica, pela preocupação, grande apoio e conselhos dados durante toda a realização deste trabalho.

...à amiga e colega de laboratório Layla F. Martins pela ajuda e carinho recebidos neste período.

...ao amigo Alexandre Sanchez pelo eficiente auxílio técnico e, principalmente, pela amizade ao longo do meu curso.

...aos colegas de laboratório Wesley Santana, Paulo Pierry e Oséias Santos pela amizade e convivência.

...às amigas Andréa Fogaça e Patrícia Pessoa pelos ensinamentos e convívio no laboratório.

...aos grandes amigos Mauricio Barlera Alves, Carlos Cerqueira Júnior, André de Carvalho Frank, Rodrigo Fandiño de Andrade, Bruno Giuliano Nicolau, Thiago Correa, Susan Bruna e Júlio Massari Filho pelos momentos de amizade e descontração.

...à Ivone pelo auxílio técnico, mas também pelos momentos de conversa e amizade.

...aos demais amigos do Instituto de Química: Luciana, Érica, Milton, Max, Daniela Beton, Nathália, Alessandra e Carol pelos momentos de alegria.

....à USP, em especial ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, que tornaram possível a realização deste trabalho.

....ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

RESUMO

Raposo, Renato Astolfi. **Análise de interações da subunidade catalítica da fosfatase do tipo 1 (PP1c) de *Dictyostelium discoideum* identificadas através do sistema de duplo-híbrido em leveduras.** 2010. 74 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A proteína fosfatase do tipo-1 (PP1) é uma das principais proteínas serina/treonina fosfatases (PSTPs) e desempenha papéis fisiológicos tão diversos quanto importantes, tais como a regulação do metabolismo de carboidratos e do ciclo celular. A holoenzima PP1 é constituída por uma subunidade catalítica conservada (PP1c) que está associada a subunidades não-catalíticas que modulam sua localização subcelular, especificidade de substrato e atividade enzimática. Mais de 100 proteínas que interagem com a PP1c já foram identificadas em distintos organismos eucarióticos. Proteínas que interagem com a PP1c são, portanto, a chave para compreender os diferentes papéis biológicos da PP1.

A subunidade catalítica da PP1 da ameba social *Dictyostelium discoideum* (DdPP1c) é codificada por um gene em cópia única o qual é expresso ao longo de todo o ciclo de vida desse organismo. Algumas proteínas que interagem e possivelmente modulam a atividade da PP1 de *D. discoideum* já foram identificadas, utilizando-se tanto buscas por similaridades na sequência genômica deste microorganismo como ensaios utilizando o sistema de duplo-híbrido em leveduras, utilizando-se a PP1c como isca. Com esta última abordagem, foram selecionados mais de 25 clones distintos de cDNA que codificam proteínas que potencialmente interagem com a DdPP1c, após varreduras de bibliotecas de cDNA de diferentes estágios de desenvolvimento de *D. discoideum*. Neste trabalho, nós confirmamos que o produto protéico de 11 destes clones interagem com a isca DdPP1c com base em novos ensaios de duplo-híbrido. Os demais clones codificam proteínas que não interagem com DdPP1c ou promovem auto-ativação do gene repórter.

Selecionamos para estudos adicionais um clone do gene *DDB_G0269300* cujo produto protéico predito de 423 de aminoácidos não tem função ainda conhecida. A sequência codificadora completa de *DDB_G0269300* foi clonada para realização de novos ensaios de duplo-híbrido em leveduras, os quais confirmaram a especificidade de sua interação com DdPP1c. A proteína recombinante rDDB_G0269300 foi obtida com sucesso em bactérias, possibilitando a obtenção de anticorpos policlonais em camundongos. O anti-soro anti-rDDB_G0269300 é aparentemente específico no reconhecimento da proteína correspondente em extratos celulares de *D. discoideum* coletados em 12h e 16 da fase de desenvolvimento. Estes resultados coincidem com dados obtidos através de RT-qPCR que mostram aumento nos níveis dos transcritos de *DDB_G0269300* entre 8h e 12h da fase de desenvolvimento, o que é indicativo da sua importância desta proteína durante esta fase do ciclo de vida de *Dictyostelium* como uma potencial parceira molecular da DdPP1c.

Palavras chave: Proteína fosfatase do tipo-1; Interação proteína-proteína; Ameba social.

ABSTRACT

Raposo, Renato Astolfi. **Analysis of yeast two-hybrid system interactions of *Dictyostelium discoideum* type-1 protein phosphatase catalytic subunit (PP1c).** 2010. 74 p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Protein phosphatase type-1 (PP1) is a major protein serine/threonine phosphatase (PSTP) which plays as diverse as important physiological roles, such as regulation of carbohydrate metabolism and of cell cycle. The PP1 holoenzyme comprises a conserved catalytic subunit (PP1c) associated with non-catalytic subunits that modulate its subcellular localization, substrate specificity and enzymatic activity. More than 100 proteins that interact with PP1c have been identified in different eukaryotic organisms. Therefore proteins that interact with PP1c are key to the understanding of PP1 different biological roles.

The catalytic subunit of PP1 the social amoeba *Dictyostelium discoideum* (DdPP1c) is encoded by a single copy gene which is expressed throughout the life cycle of this organism. Some proteins that interact with and possibly modulate the activity of *D. discoideum* PP1 have been identified, using both similarity searches in the genome sequence of this microorganism as yeast two-hybrid screenings using PP1c as bait. With the latter approach, we have selected more than 25 distinct cDNA clones encoding proteins that potentially interact with DdPP1c after screening *D. discoideum* cDNA libraries from different developmental stages. In this study, we confirmed that the protein product from 11 of these clones interact with the bait DdPP1c based on two-hybrid assays. The other clones encode proteins that either does not interact or promote self-activation of the reporter gene.

The clone related to DDB_G0269300 gene that encodes a predicted protein of 423 amino acids with unknown function was selected for further studies. DDB_G0269300 full-length coding sequence was cloned and new yeast two-hybrid assays were performed confirming the specificity of the interaction with DdPP1c. The recombinant protein rDDB_G0269300 was successfully obtained in bacteria and further used for polyclonal antibodies production in mice. The antiserum anti-rDDB_G0269300 is apparently specific for recognition of the corresponding protein in *D. discoideum* cell extracts collected after 12h and 16h of development. These results agree with RT-qPCR data showing that the levels of DDB_G0269300 transcripts are increased between 8 h and 12 h during the development, which is indicative of its importance during this phase in *Dictyostelium* life cycle as a DdPP1c potential molecular partner.

Keywords: Protein phosphatase type-1, protein-protein interaction; Social amoeba.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLASTp: *Basic Local Alignment Search Tool* (para sequência de aminoácidos)
cAMP: 3',5' monofosfato cíclico de adenosina
cDNA: DNA complementar
Dd: *Dictyostelium discoideum*
DEPC: dietilpirocarbonato
DNase: desoxirribonuclease
dNTP: desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato
DO: densidade óptica
DSP: fosfatase de dupla-especificidade
DSPK: quinase de dupla-especificidade
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
IPTG: isopropil- β -D-galactopiranosídeo
LiOAc: acetato de lítio
MOPS: ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
PCR: reação em cadeia da polimerase
PEG: polietileno glicol
PIPES: ácido (1,4-piperazina)-dietanosulfônico
PK: proteína quinase
PKA: proteína quinase dependente de cAMP
PP: proteína fosfatase
PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 e PP7: PPs dos tipos 1, 2A, 2B, 4, 5, 6 e 7
PP1c, PP2Ac, PP2Bc...: subunidades catalíticas das respectivas PPs
PP2C: PP do tipo 2C
PPM: *Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent* (subfamília das PPs)
PPP: *Phosphoprotein Phosphatase* (subfamília das PPs)
PSI BLAST: *Position-Specific Iterated BLAST*
PSTP: proteína serina/treonina fosfatase
PTK: proteína tirosina quinase
PTK: tirosina quinase

PTP: proteína tirosina fosfatase

qPCR: PCR quantitativo

RNAse: Ribonuclease A

rpm: rotações por minuto

RT: transcrição reversa

RT-PCR: PCR precedido por RT

RT-qPCR: qPCR precedido por RT

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

STPK: serina/treonina quinase

TBS: Tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 contendo NaCl 150 mM

TE: Tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 contendo EDTA 1mM

Tm: temperatura de fusão

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

U: unidade de atividade enzimática

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

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1. Fosforilação reversível de proteínas	11
1.2. Serina/treonina fosfatases (PSTPs)	13
1.2.1. Serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1)	14
1.3. <i>Dictyostelium discoideum</i> como organismo modelo	18
1.3.1. Fosforilação reversível de proteínas em <i>Dictyostelium discoideum</i>	20
2. Objetivos	23
3. Materiais e Métodos	24
3.1. Manipulação de células de <i>Dictyostelium discoideum</i>	24
3.2. Procedimentos para extração, manipulação e análise de DNA e RNA	25
3.2.1. Preparação de DNA genômico de <i>D. discoideum</i>	25
3.2.2. Extração de RNA total de <i>D. discoideum</i>	26
3.2.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose	26
3.2.4. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído	26
3.2.5. Amplificação por PCR a partir de DNA genômico de <i>D. discoideum</i>	27
3.2.6. Purificação de DNA em gel de agarose	27
3.2.7. Digestão com enzimas de restrição	27
3.2.8. Reação de ligação	27
3.2.9. Sequenciamento	28
3.2.10. PCR quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR)	28
3.2.11. Planejamento dos oligonucleotídeos	29
3.2.12. Construções Plasmidiais	29
3.3. Procedimentos para manipulação de bactérias	31
3.3.1. Preparo de bactérias linhagem Sure competentes para transformação	31
3.3.2. Transformação de bactérias por choque térmico	31
3.3.3. Métodos de preparação de plasmídeos em pequena escala	32
3.3.4. Métodos de preparação de plasmídeos em média escala	32
3.4. Procedimentos para manipulação de leveduras	33
3.4.1. Cultivo da levedura <i>S. cerevisiae</i>	33
3.4.2. Transformação de leveduras em pequena escala	33
3.4.3. Teste de β -galactosidase	34
3.4.4. Diluição seriada de <i>S. cerevisiae</i>	34
3.5. Manipulação e análise de proteínas	35
3.5.1. Expressão da proteína recombinante	35
3.5.2. Purificação da proteína recombinante	36
3.5.3. Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	36
3.5.4. Detecção imunológica de proteínas	37
3.5.5. Imunização de camundongos para obtenção de anticorpo policlonal	37
4. Resultados e Discussão	39
4.1. Validação de interações com DdPP1c identificadas em ensaios de duplo-híbrido	39
4.2. Perfil de expressão do gene DDB_G0269300 durante o desenvolvimento de <i>D. discoideum</i>	43
4.3. Clonagem da sequência codificadora completa de DDB_G0269300 em vetores para expressão em levedura e bactéria	45
4.4. Confirmação da especificidade de interação de DDB_G0269300 com a DdPP1c	49
4.5. Obtenção da proteína recombinante rDDB_G0269300 em bactérias	52
4.6. Obtenção de anti-soro específico contra a proteína DDB_G0269300	55
5. Conclusões e Discussão final	57
6. Bibliografia	58
7. Apêndice	68
Súmula Curricular	75

1. Introdução

1.1. Fosforilação reversível de proteínas

A fosforilação reversível de proteínas pode ser considerada o mecanismo mais comum para o controle da atividade e da função de proteínas e talvez a modificação pós-tradução melhor estudada. Em células eucarióticas, estima-se que 30% das proteínas sejam alvos potenciais para fosforilação reversível. Os resíduos mais frequentemente fosforilados são Ser, Thr e Tyr. O doador universal do grupo fosfato é o ATP, sendo que o $\gamma\text{-PO}_3^{2-}$ sofre ataque nucleofílico do grupo OH da cadeia lateral do resíduo, em uma reação catalisada por enzimas denominadas proteínas quinases (PK, *Protein Kinases*). As proteínas fosfatases (PP, *Protein Phosphatases*) reverterem a reação de fosforilação pela hidrólise do grupo fosfato, com a liberação de ortofosfato (Hunter, 1995; Walsh, 2006).

Além de fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina, os outros fosfoaminoácidos de ocorrência natural nas proteínas são: fosfohistidina, fosfoaspartato, fosfolisina e fosfoarginina (Wolanin *et al.*, 2002; Walsh, 2006).

As proteínas quinases que fosforilam aminoácidos hidroxilados podem ser agrupadas em duas grandes categorias: as serina/treonina quinases (STPK) e as tirosinas quinases (PTK). Alguns exemplares dessas categorias são quinases de dupla-especificidade (DSPK), assim chamadas por catalisar a fosforilação tanto de resíduos de Ser e Thr como de Tyr. Aproximadamente 500 genes codificadores de proteínas quinases, das quais 400 são STPKs, foram identificados no genoma humano através de análises computacionais. Este número é quatro vezes maior que o predito para leveduras e o dobro do estimado para a mosca de frutas (Manning *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2004). As proteínas quinases pertencentes a estes três grupos possuem modos distintos de regulação e atuam em substratos específicos. Apesar disto, todas elas possuem um domínio catalítico de 250-300 aminoácidos cuja estrutura é bastante conservada (Hanks *et al.*, 1988; Hanks e Hunter, 1995; Hunter, 1995).

Assim como as PKs, as proteínas fosfatases também estão agrupadas em duas grandes categorias: as proteínas serina/treonina fosfatases (PSTPs) e as proteínas tirosina fosfatases (PTPs), sendo que esta última categoria inclui fosfatases que apresentam especificidade dupla (DSPs) (Arino e Alexander, 2004). Uma terceira

categoria, recentemente descoberta e ainda pouco estudada, compreende as histidina fosfatases (PHP) (Rigden, 2008). Porém, diferentemente das quinases, os grupos de fosfatases não apresentam similaridade entre suas sequências e possuem mecanismos catalíticos distintos (Barton *et al.*, 1994; Shenolikar, 1994; Barford, 1996).

A despeito da baixa similaridade entre suas sequências primárias, todas as tirosina fosfatases (PTPs) apresentam um motivo comum composto por um resíduo Cys separado de um resíduo de Arg por cinco resíduos variáveis. Este motivo, **Hys-Cys-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Arg** (Xaa podendo ser qualquer aminoácido), é o centro catalítico dessa superfamília de enzimas, sendo Cys o resíduo que executa o ataque nucleofílico no grupo fosfato do substrato. O genoma humano codifica para 107 membros da superfamília das PTPs. Com base em suas respectivas sequências de aminoácidos, estruturas e funções, as PTPs foram separadas em quatro diferentes subfamílias, denominadas: Específicas clássicas (PTPs); Dupla especificidade (DSPs); Tipo Cdc25 (cell division cycle-25) e de baixo peso molecular (LMW) (Tonks, 2006).

O mesmo não ocorre com os genes codificantes de serina/treonina fosfatases, os quais estão presentes em número menor (<50 genes), tanto em mamíferos quanto em leveduras, evidenciando que a diversidade das serina/treonina quinases cresceu com o aumento da complexidade dos organismos, enquanto que a das serina/treonina fosfatases permaneceu equivalente. Uma possível explicação é o fato de a diversidade funcional para vários membros das serina/treonina fosfatases ser conferida, predominantemente, por subunidades reguladoras distintas que se associam às suas subunidades catalíticas, como será detalhado adiante (Hubbard e Cohen, 1993; Faux e Scott, 1996; Goldberg, 1999; Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Ceulemans *et al.*, 2002; Ceulemans e Bollen, 2004).

Ao longo de décadas as proteínas fosfatases foram tratadas como meras enzimas de manutenção, às quais era atribuído o papel de reverter a ação das proteínas quinases. Este conceito foi profundamente modificado e hoje as proteínas fosfatases são reconhecidas como reguladores centrais de variados processos celulares que envolvem fosforilação reversível de proteínas, com importância equivalente às proteínas quinases.

1.2. Serina/treonina fosfatases (PSTPs)

Com base na comparação de suas sequências de aminoácidos e determinadas propriedades bioquímicas, as PSTPs são atualmente categorizadas em três famílias: FCP (fosfatase do peptídeo carboxiterminal de fyn), PPP (fosfoproteína fosfatase) e PPM (fosfoproteína fosfatase dependente de magnésio). A família FCP inclui as fosfatases do domínio carboxiterminal da RNA polimerase II, enquanto que a família PPM compreende as PP2C, que são enzimas monoméricas dependentes de magnésio (Barton *et al.*, 1994; Shenolikar, 1994; Wera e Hemmings, 1995; Barford, 1996; Villafranca *et al.*, 1996; Cohen, 1997; Rusnak, 2000; Andreeva e Kutuzov, 2001; Beullens e Bollen, 2002; Kerk *et al.*, 2002; Arino e Alexander, 2004).

As enzimas da família PPP apresentam um domínio catalítico conservado de 280 resíduos, ausente nos componentes da família PPM, e compreendem as subfamílias PP1, PP2A, PP2B, PP5 e PP7, sendo que a subfamília da PP2A engloba, além da PP2A propriamente dita, a PP4 e a PP6 (Barton *et al.*, 1994; Shenolikar, 1994; Wera e Hemmings, 1995; Barford, 1996; Villafranca *et al.*, 1996; Cohen, 1997; Rusnak, 2000; Andreeva e Kutuzov, 2001; Beullens e Bollen, 2002; Kerk *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que a diversidade funcional das serina/treonina fosfatases de vários membros da família PPP é conferida, predominantemente, por subunidades reguladoras distintas que se associam as suas subunidades catalíticas (Cohen, 1997; Virshup e Shenolikar, 2009). Por exemplo, a PP2A é um heterotrímero composto da subunidade catalítica, uma subunidade estrutural e uma subunidade regulatória variável, a qual regula diretamente a especificidade ao substrato, a localização subcelular e a função da holoenzima *in vivo*. Esta fosfatase participa na regulação do ciclo celular e na apoptose em diversos organismos, além de ser considerada um supressor tumoral em potencial (Westermarck e Hahn, 2008). Outro exemplo é a holoenzima da PP1, uma das principais PSTPs encontradas nas células eucarióticas e que participa da regulação de uma série de eventos fisiológicos. Como será detalhado adiante, nas células, a subunidade catalítica da PP1 (PP1c) não é encontrada livre, mas em associação com uma ou mais subunidades não-catalíticas, que se associam com a PP1c modulando sua localização subcelular, especificidade de substrato e atividade enzimática (Aggen *et al.*, 2000; Ceulemans e Bollen, 2004; Virshup e Shenolikar, 2009).

Vale lembrar que até o início dos anos 90, as PSTPs eram classificadas com base exclusivamente em critérios bioquímicos (Cohen, 1989). Assim o grupo das PPs

do tipo 1, compreendiam enzimas capazes de desfosforilar a subunidade β da fosforilase quinase e que eram suscetíveis à inibição por concentrações nanomolares das proteínas I-1 (inibidor 1) e I-2 (inibidor 2). Já as PPs do tipo 2, incluíam enzimas com propriedade de desfosforilar a subunidade α da fosforilase quinase, sendo refratárias aos efeitos desses dois inibidores. As fosfatases do tipo-2 foram 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, as fosfatases do tipo 1 e tipo 2 eram também separadas com base em sua sensibilidade a inibidores não-proteicos, como o ácido ocadaico, o qual inibe a PP2A na faixa de 0,1-1 nM que é uma concentração de 10 a 100 vezes mais baixa daquela necessária para inibir a PP1 ($\text{IC}_{50} \approx 10$ nM). Por outro lado, a PP2B é inibida apenas na presença de concentrações micromolares desta toxina e a PP2C não é afetada (Cohen, 1989; Shenolikar, 1994; Wera e Hemmings, 1995).

1.2.1. Serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1)

A serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1) desempenha papéis fisiológicos tão diversos quanto importantes, tais como a regulação do metabolismo de carboidratos e do ciclo celular, além de um papel na recuperação de estresses, na apoptose e no desenvolvimento. Estudos recentes mostram que a PP1 é um regulador crítico da remodelação da cromatina do cérebro de mamíferos, controlando a transcrição de genes associados com a memória de longo prazo (Stark, 1996; Kirchner *et al.*, 2007; Koshibu *et al.*, 2009; Virshup e Shenolikar, 2009; Ohkura *et al.*, 1989).

A holoenzima PP1 é constituída por uma subunidade catalítica conservada que está associada a subunidades não-catalíticas que modulam sua localização subcelular, especificidade de substrato e atividade enzimática (Hubbard e Cohen, 1993; Egloff *et al.*, 1997). Mais de 100 proteínas que interagem com a PP1c já foram identificadas em mamíferos. Embora em número menor, também em leveduras já foram identificadas dezenas de proteínas que associam-se a PP1c (Egloff *et al.*, 1997; Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Janssens e Goris, 2001; Ceulemans *et al.*, 2002; Cohen, 2002; Rudenko *et al.*, 2003; Ceulemans e Bollen, 2004; Moorhead *et al.*, 2008).

Ainda que não exista uma conservação explícita entre as sequências de aminoácidos das diversas proteínas que se associam a PP1c, estudos bioquímicos e cristalográficos identificaram um pequeno motivo consenso, chamado de motivo

RVXF, em muitas destas subunidades. A sequência completa deste motivo consenso foi definida através de alinhamentos de sequências e mutagênese sítio-dirigida como [R/K]-X1-[V/I]-X2-[F/W], onde X1 pode ser qualquer aminoácido e X2 qualquer aminoácido exceto prolina (Egloff *et al.*, 1997; Zhao e Lee, 1997; Aggen *et al.*, 2000; Cohen, 2002; Wakula *et al.*, 2003; Terrak *et al.*, 2004; Ceulemans e Bollen, 2006; Meiselbach *et al.*, 2006).

A função do motivo RVXF parece ser a de aproximar as moléculas e promover a ligação de sítios secundários, estes sim capazes de alterar a atividade de PP1c e sua especificidade pelo substrato. Esta noção de que a interação com a subunidade catalítica da PP1 envolve múltiplos contatos foi verificada para subunidades inibidoras (Park *et al.*, 1994; Endo *et al.*, 1996; Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Weiser *et al.*, 2004). Contudo, acredita-se que as demais subunidades reguladoras possuam múltiplos sítios de interação com a PP1c e que há compartilhamento de alguns destes sítios entre elas. Logo, a competição entre os diferentes reguladores por uma combinação de sítios de interação parece definir a atividade final da holoenzima (Beullens *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Ceulemans e Bollen, 2004; Pedelini *et al.*, 2007; Sousa-Canavez *et al.*, 2007).

Apesar das diferenças entre as espécies quanto ao número de genes de PP1c, a sua sequência primária é muito conservada ao longo da evolução, chegando a identidade superior a 70% nos resíduos de sua região central. Alguns organismos como, por exemplo, *S. cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum* e *Neurospora crassa* apresentam apenas um gene de PP1 (Tu *et al.*, 1996; Szoor *et al.*, 1997; Zapella, 2001; Andrioli *et al.*, 2003). Por outro lado, o genoma humano, de *Drosophila melanogaster* e de *Arabidopsis thaliana* codificam respectivamente três, quatro e oito genes de PP1c (Dombradi *et al.*, 1990; Smith e Walker, 1993; Barker *et al.*, 1994). Alguns estudos indicam que os múltiplos genes de PP1c codificam isoformas com funções tanto distintas como redundantes, sendo que há evidência de associações preferências de diferentes isoformas a determinadas subunidades reguladoras (Rubin *et al.*, 1998; Berndt, 1999; Vereshchagina *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2007; Kirchner *et al.*, 2007).

Estudos cristalográficos da PP1c de mamíferos em complexos com toxinas de ocorrência natural mostraram que a PP1c apresenta uma estrutura elipsoidal consistindo de um sanduíche composto por onze folhas- β , rodeadas por sete α -hélices de um lado e um subdomínio composto de três α -hélices e três folhas- β do

outro. Na região central do sanduíche, três folhas- β e duas α -hélices estão conectadas formando um motivo β - α - β - α - β onde se localiza o provável centro ativo da enzima contendo íons metálicos (Fe^{2+} e Mn^{2+} ou Fe^{2+} e Zn^{2+}). Este centro ativo conecta os sulcos hidrofóbicos, ácido e carboxi-terminal (forma de Y) na superfície da PP1. Em geral, as toxinas localizam-se no sítio ativo da PP1c, juntamente com os metais e as moléculas de água, além de interagirem com os sulcos hidrofóbicos e ácido (Barford e Keller, 1994; Egloff *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995; Gauss *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1999; Kita *et al.*, 2002; Terrak *et al.*, 2004).

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

Alguns estudos sugerem que a alça que conecta as folhas β 12- β 13 da PP1 é essencial para sua inibição por toxinas. Mutações nesta alça aumentaram ou diminuíram a sensibilidade da PP1, indicando que componentes importantes para a inibição da PP1 estão localizados entre os resíduos 269-301 (Goldberg *et al.*, 1995; Mackintosh *et al.*, 1995a; MacKintosh *et al.*, 1995b; Barford, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Bagu *et al.*, 1997; Connor *et al.*, 1999; Maynes *et al.*, 2001; Andrioli *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2006).

É importante destacar que a maioria das proteínas que interage com a PP1c foi identificada utilizando-se esta subunidade catalítica como isca em ensaios de duplo-híbrido em levedura. Abordagens convencionais, como purificação da holoenzima e co-imunoprecipitação com anticorpo anti-PP1 também têm sido empregadas para identificar proteínas possivelmente reguladoras desta fosfatase. Outras estratégias para identificação de proteínas que interagem com a PP1c incluem a varredura de uma biblioteca de expressão de cDNAs com uma sonda preparada a partir da PP1 recombinante conjugada com digoxigenina ou a separação de extratos celulares em

cromatografia de afinidade em resina de microcistina-agarose conjugada à PP1 (Durfee *et al.*, 1993; Moorhead *et al.*, 1994; Helps *et al.*, 1995; Hirano *et al.*, 1995; Campos *et al.*, 1996; Hirano *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; MacMillan *et al.*, 1999; Aggen *et al.*, 2000; Ajuh *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Janssens e Goris, 2001; Cohen, 2002; Rudenko *et al.*, 2003; Ceulemans e Bollen, 2004; Meiselbach *et al.*, 2006; Moorhead *et al.*, 2008). Contudo, a identificação é apenas o primeiro passo na investigação do papel fisiológico desses complexos enzimáticos *in vivo*

Como já mencionado, entre as proteínas que se associam à PP1c, muitas são moduladoras de sua atividade, agindo como inibidores específicos dessa fosfatase. Neste grupo se incluem os inibidores citoplasmáticos termoestáveis I-1 e I-2; o citoplasmático DARPP-32 (*Dopamine and cAMP-Regulated protein of 32kDa*); o inibidor nuclear NIPP-1 (*Nuclear Inhibitor of PP1*); a proteína associada a ribossomos RIPP-1 (*Ribosomal Inhibitor of PP1*) e o inibidor da miosina fosfatase CPI-17 (*C-kinase dependent Phosphatase Inhibitor of 17kDa*), entre outros (Nimmo e Cohen, 1978; Hemmings *et al.*, 1990; Park e DePaoli-Roach, 1994; Park *et al.*, 1994; Eto *et al.*, 1995; Van Eynde *et al.*, 1995; Beullens *et al.*, 1996; Tanuma *et al.*, 2008).

Além destas, outras proteínas capazes de inibir a PP1 foram identificadas como, por exemplo, o inibidor 3 (I-3), previamente denominado HCG V (*Hemochromatosis Candidate gene V*) (Zhang *et al.*, 1998) e o inibidor 4 (Shirato *et al.*, 2000). Ortólogos de I-3 estão presentes em microorganismos eucarióticos como *S. cerevisiae* e *D. discoideum* (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003; Gonzalez-Kristeller, 2007). Tanto I-3 humano quanto seu ortólogo em leveduras são extremamente hidrofóbicos e estáveis a altas temperaturas e apresentam, assim como os inibidores 1 e 2, uma migração anômala em SDS-PAGE, exibindo massa molecular aparente maior que a massa molecular calculada de 14 kDa. Estudos realizados em células HEK293 demonstraram que a PP1c está co-localizada com o inibidor 3 tanto no nucléolo quanto nos centríolos da célula durante o período da interfase, implicando este inibidor em processos de citocinese e eventos nucleolares (Huang *et al.*, 2005).

Outras subunidades reguladoras agem como proteínas direcionadoras, interagindo com a PP1c e com o substrato. Este é o caso das proteínas MYPT, que se ligam à PP1c e ao substrato miosina (Skinner e Saltiel, 2001). A proteína Sds22, por exemplo, é uma subunidade regulatória conservada da PP1c que controla a morfologia e a polaridade celular (Grusche *et al.*, 2009). Sabe-se que Sds22 interage também com o inibidor 3 formando um complexo com a PP1 (Lesage *et al.*, 2007).

Em alguns casos, a proteína reguladora não se liga diretamente ao substrato, mas associa-se com uma estrutura celular que contém o substrato. Isto é o que acontece com a subunidade G, que direciona a PP1c para partículas de glicogênio, às quais o substrato, glicogênio sintase, se encontra ligado (Chen *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1994; Kellsall *et al.*, 2007).

Entre as proteínas que se associam à PP1c estão seus próprios substratos, tais como as proteínas quinases Aurora e Nek2. A proteína quinase Aurora, bem como a PP1, está envolvida na progressão da mitose, citocinese e meiose (Ceulemans e Bollen, 2004; Pinsky *et al.*, 2006; Akiyoshi *et al.*, 2009). Nek2 é uma proteína quinase centrossômica regulada pelo ciclo celular, que atua como substrato e subunidade direcionadora, interagindo com a PP1 e com C-Nap1 formando um complexo trimérico. C-Nap1, por sua vez, é um substrato para PP1 e Nek2 (Helps *et al.*, 2000).

1.3. *Dictyostelium discoideum* como organismo modelo

Dictyostelium discoideum é um organismo modelo muito estudado, o qual exhibe em seu ciclo de vida tanto uma fase unicelular como uma fase multicelular. Na natureza, este protista habita superfícies úmidas do solo, alimentando-se predominantemente de bactérias (Loomis, 1996; Loomis e Kuspa, 2005). Suas células possuem genoma haplóide de 34 Mpb, organizado em seis cromossomos e um elemento extra-cromossômico de 88 kbp, presente em cerca de 100 cópias e que contém os genes de RNA ribossômico, além do genoma mitocondrial de 55 kbp. A sequência completa do genoma de *D. discoideum* já foi elucidada, sendo a porcentagem média de A+T em éxons de 73%, em íntrons é de 88% e nas regiões intergênicas é de 85%. Os genes de *Dictyostelium* são proporcionalmente pequenos quando comparados aos de mamíferos, visto que seus íntrons são curtos, com tamanho médio é 146pb (Eichinger *et al.*, 2005).

Análises bioinformáticas da sequência genômica de *D. discoideum* confirmaram a existência de genes relacionados a proteínas e processos moleculares típicos de metazoários. Por exemplo, seu genoma codifica tanto proteínas quinases compartilhadas por fungos e metazoários, como quinases típicas de metazoários, como por exemplo as tirosinas quinases (Goldberg *et al.*, 2006).

Durante o seu crescimento vegetativo, as células de *D. discoideum* se dividem por fissão binária, apresentam mobilidade e consomem bactérias por fagocitose (Loomis, 1996). Nesta fase, *D. discoideum* tem sido utilizado experimentalmente

como hospedeiro para uma variedade de patógenos bacterianos intracelulares, principalmente a *Legionella*, e, assim como outras amebas presentes na natureza, acredita-se que *D. discoideum* possa ser um dos hospedeiros naturais para estes patógenos (Steinert e Heuner, 2005).

Durante o desenvolvimento, que é disparado pela ausência de nutrientes, as células se agregam em resposta a sinais quimiotáticos e se diferenciam em pelo menos dois tipos distintos, esporos e células do talo, para formar, após 24 horas, a estrutura denominada corpo de frutificação (Gross, 1994; Chisholm e Firtel, 2004; Dormann e Weijer, 2006).

O sinal para a agregação é iniciado por alguns indivíduos da população que liberam no meio AMP cíclico (cAMP). O cAMP liberado no meio se liga a receptores específicos presentes na superfície das células, que se associam a proteínas G heterotriméricas e dessa forma desencadeiam respostas coordenadas nas células sensibilizadas. Estas se deslocam em direção às células que iniciaram a secreção de cAMP e, por sua vez, sintetizam e liberam mais pulsos de cAMP, atraindo outras células mais afastadas. A síntese e secreção de cAMP não é constante, mas sim em pulsos a partir dos centros de sinalização com intervalos de cerca de 6 minutos. Isto garante um movimento direcional das células em direção ao gradiente espacial e temporal de cAMP. Na migração, as células se tornam adesivas e se encadeiam, formando correntes que se reúnem até constituir um organismo contendo aproximadamente 10^5 células (Soderbom e Loomis, 1998; Chisholm e Firtel, 2004; Dormann e Weijer, 2006).

Após 8-10 horas do início da carência nutricional, o agregado se compacta, assumindo a forma de um monte (*mound*). Uma vez formado, o agregado desenvolve uma polaridade, definindo-se a região anterior e posterior, originando uma estrutura parecida com um dedo. Este agregado, chamado de *slug*, desliza através de uma matriz extracelular que é deixada para trás como um rastro quando o organismo migra. O *slug* responde a variações de temperatura e intensidades de luz e, em condições favoráveis, a migração das células cessa na região anterior, enquanto as células da região posterior continuam em movimento até se disporem em torno e embaixo da região anterior, originando uma estrutura que se assemelha a um chapéu mexicano. Com o tempo, as células se diferenciam em dois grandes grupos, chamados pré-talo e pré-esporos. Como os próprios nomes explicam, essas células formarão o talo e os esporos do corpo de frutificação. Enquanto as células pré-talo,

dispostas na parte superior no agregado, auto-invaginam, as células pré-esporo ascendem em direção à extremidade do talo em formação. Estas células originam um capsídeo globular terminal contendo esporos no seu interior e as células pré-talo são externamente cobertas de celulose na sua superfície, formando o talo do corpo de frutificação. Todo o processo de diferenciação leva 24h a partir do momento em que as células são submetidas à carência nutricional (Soderbom e Loomis, 1998; Aubry e Firtel, 1999; Golstein *et al.*, 2003; Chisholm e Firtel, 2004; Laporte *et al.*, 2007; Giusti *et al.*, 2009).

Deste modo, *D. discoideum* possibilita o estudo de processos de diferenciação celular, adesão entre células, migração celular, sinalização intercelular, quimio, foto e termotaxias (Williams e Harwood, 2003; Chisholm e Firtel, 2004; Parent, 2004). Esta riqueza de fenótipos faz de *D. discoideum* um ótimo modelo experimental. Paralelamente, características importantes deste microorganismo eucariótico, tais como genoma haplóide, facilidade de cultivo em laboratório, sincronia do desenvolvimento e a possibilidade de manipulação genética somam-se às justificativas para sua vasta utilização para estudos de diversos processos e mecanismos biológicos (Loomis, 1996; Loomis e Kuspa, 2005; Kuspa e Loomis, 2006; Loomis, 2006; Williams, 2010).

1.3.1. Fosforilação reversível de proteínas em *Dictyostelium discoideum*

Assim como nos demais organismos eucarióticos, os processos de crescimento e desenvolvimento de *D. discoideum* são regulados através de vias de sinalização que envolvem predominantemente a fosforilação reversível de proteínas. Os mecanismos de fosforilação reversíveis já identificados em *D. discoideum* incluem a fosforilação em resíduos de serina/treonina e tirosina, além do sistema de dois componentes que consiste na fosforilação de resíduos de histidina e aspartato. Uma análise recente do genoma de *Dictyostelium* identificou 285 proteínas quinases putativas (Goldberg *et al.*, 2006). Genes de aproximadamente 44 quinases de *D. discoideum* foram alvo de inativação gênica, em sua maioria resultando em alterações fenotípicas relevantes, implicando-as diretamente no controle do crescimento ou desenvolvimento de *D. discoideum*. Entre estas citamos PKA e as MAP quinases (Loomis, 1998; Souza *et al.*, 1998; Aubry e Firtel, 1999; Maeda *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2010). Tirosinas quinases e tirosinas fosfatases identificadas em *D. discoideum* também desempenham papéis importantes no desenvolvimento deste

microorganismo (Tan e Spudich, 1990; Kay, 1997). Além disso, várias das histidinas quinases existentes em *D.discoideum* estão claramente implicadas na regulação do desenvolvimento (Singleton *et al.*, 1998; Zinda e Singleton, 1998).

Apesar do conhecido envolvimento de fosforilação em resíduos de serina e treonina no crescimento e na diferenciação celular de *D. discoideum*, há ainda poucos estudos sobre as proteínas fosfatases que modulam estes processos. O genoma de *D.discoideum* sugere a existência de pelo menos 17 genes que potencialmente codificam para serina/treonina fosfatases, incluindo membros da família PPP, tais como PP1, PP2A e PP5 e da família PPM, como a PP2C (Eichinger *et al.*, 2005; Gonzalez-Kristeller, 2007). Estudos anteriores à elucidação do genoma, já haviam demonstrado que *D.discoideum* possui PP1, PP2A, PP2B, PP2C, PP4 e PP5 com características similares as enzimas descritas em outros organismos (Simon *et al.*, 1992; Dammann *et al.*, 1996; Horn e Gross, 1996; Hellstern *et al.*, 1997; Aubry e Firtel, 1998; Murphy e Egelhoff, 1999; Murphy *et al.*, 1999; Andrioli *et al.*, 2003; Fiorini, 2003).

A enzima PP2A de *D.discoideum* foi implicada na desfosforilação da cadeia pesada de miosina promovendo o rearranjo dos filamentos em *D. discoideum* (Murphy e Egelhoff, 1999; Murphy *et al.*, 1999), enquanto que um membro da subfamília das PP2C parece ser essencial para o desenvolvimento logo após a agregação. A PP2B (calcineurina) parece também desempenhar um papel na morfogênese, uma vez que o silenciamento da expressão de sua subunidade reguladora levou ao surgimento de corpos de frutificação aberrantes (Boeckeler *et al.*, 2006)

A subunidade catalítica da PP1 de *D.discoideum* (*DdPP1c*) origina-se a partir de um gene em cópia única o qual é expresso ao longo de todo o ciclo de vida desse organismo. Ainda que sua sequência de aminoácidos tenha uma identidade de 80% com PP1c de outros organismos, a *DdPP1c* apresenta propriedades bioquímicas distintas, como por exemplo, uma menor sensibilidade a caliculina A, um inibidor específico de enzimas desta subfamília (Andrioli *et al.*, 2003).

Estudos realizados em nosso grupo resultaram na identificação de algumas proteínas que interagem e possivelmente modulam a atividade da PP1 de *D. discoideum*. Para estes estudos foram utilizadas tanto buscas por similaridades na sequência genômica deste microorganismo como ensaios utilizando o sistema de duplo-híbrido em leveduras, utilizando-se a PP1c como isca. A primeira abordagem

possibilitou a identificação e caracterização de uma proteína que atua como inibidora da atividade da *DdPP1c* e que é ortóloga do inibidor 2 da PP1 de mamíferos (Sousa-Canavez *et al.*, 2007). Com a segunda abordagem, foram selecionados mais de 25 clones distintos de cDNA que codificam proteínas que potencialmente interagem com a *DdPP1c*, após varreduras de bibliotecas de cDNA de diferentes estágios de desenvolvimento de *D. discoideum*. Entre estes clones foi identificado um ortólogo do I-3 (*Ddl-3*) que foi caracterizado funcionalmente como um potente inibidor da PP1c de *D. discoideum* (Gonzalez-Kristeller, 2007).

2. Objetivos

Nosso grupo desenvolve uma linha de pesquisa que tem como objetivo investigar as características bioquímicas e a função biológica de serina/treonina fosfatases em *D. discoideum*, em particular a PP1. A motivação para utilização deste microorganismo como modelo de estudo, é de que seja possível identificar novas proteínas que interagem com a subunidade catalítica da PP1. A utilidade de *D. discoideum* na identificação e caracterização funcional destes ortólogos justifica-se por ser um organismo geneticamente tratável e que apresenta uma complexidade intermediária entre as leveduras e organismos eucarióticos superiores. Neste contexto, tivemos neste projeto de Mestrado os seguintes objetivos específicos:

1. Validar as interações da PP1c identificadas em ensaios de duplo-híbrido em leveduras.

Estudos anteriores em nosso laboratório, utilizando-se a DdPP1c como isca em ensaios de duplo-híbrido em leveduras, possibilitaram a seleção 25 clones distintos de cDNA (presas) que codificam proteínas que potencialmente interagem com a DdPP1c. Cinco bibliotecas foram utilizadas nestas varreduras, as quais foram preparadas no vetor pACT2 (Clontech) a partir de cDNAs obtidos de mRNAs de fase vegetativa e de desenvolvimento de *D. discoideum* (Gonzalez-Kristeller, 2007). Vale ressaltar que os clones de cDNA isolados nas varreduras nem sempre representavam a sequência codificadora completa do gene correspondente. Para as validações optamos por realizar novamente ensaios de duplo-híbrido da isca DdPP1c com cada um dos clones selecionados nas varreduras.

2. Caracterizar uma das proteínas que potencialmente interagem com DdPP1c

A proteína que selecionamos para esta caracterização e que interage com DdPP1c nos ensaios de duplo-híbrido, é codificada pelo gene DDB_G0269300, cujo produto não tem função conhecida. Para tal propusemos avaliar o perfil de expressão deste gene nas diferentes fases de desenvolvimento de *D. discoideum*, realizar a clonagem de sua região codificadora completa e reavaliar sua interação com DdPP1c. Também propusemos a obtenção da proteína recombinante correspondente expressa em bactérias visando a preparação de anticorpos policlonais para utilização em experimentos de caracterização funcional do produto do gene DDB_G0269300.

3. Materiais e Métodos

3.1. Manipulação de células de *Dictyostelium discoideum*

A linhagem axênica AX4 de *D. discoideum*, utilizada em nossos experimentos, foi cedida pelo Dr. William Loomis (University of California, San Diego, EUA). O cultivo foi realizado em placas de meio SM [bacto peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,1% (p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v), glicose 1% (p/v), agar 2% (p/v), KH_2PO_4 13,9 mM e $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3,4 mM, pH 6,4]. Para iniciar uma cultura, uma pequena porção de corpos de frutificação maduros de *D. discoideum* foi misturada a 0,3 mL de uma suspensão de bactérias *Klebsiella aerogenes* preparada em meio SM líquido (sem ágar). A mistura foi espalhada com alça de vidro em placas de meio SM que foram mantidas a 22°C até a formação de novos corpos de frutificação, seguindo-se armazenagem a 4°C por até 15 dias, quando um novo estoque era feito.

Estoques de células foram mantidos a -80°C. Para tanto, o sedimento de 5×10^7 células em crescimento foi suspenso em 2 mL de uma solução contendo HL-5 [proteose peptona nº2 1% (p/v), glicose 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), KH_2PO_4 2,5 mM e $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3,4 mM, pH 6,4] 90% (v/v) e DMSO 10% (v/v) e em seguida congelado em gelo seco e imediatamente armazenado a -80°C. Para iniciar uma cultura, as células de *D. discoideum* foram descongeladas na presença de 300 µL de uma suspensão de bactérias *K. aerogenes* e a suspensão obtida foi semeada em meio SM, como descrito anteriormente. Esses estoques de células congeladas foram utilizados periodicamente como fonte de material para dar início a novas culturas em meio de crescimento sólido.

Para iniciar cultivo em meio líquido, células em crescimento em meio sólido foram transferidas para um frasco contendo 10 mL de meio de cultura HL-5 e mantidas sob agitação de 200 rpm a 22°C. Após dois dias, o volume de meio foi aumentado para 50mL.

Para obtenção de células em diferentes fases de desenvolvimento, células provenientes de culturas em meio HL-5 foram submetidas à carência nutricional sobre filtros de nitrocelulose (Millipore) de cor preta na porosidade de 0,45 µm e com 47 mm de diâmetro, como descrito por Sussman (Sussman, 1987). Esses filtros foram fervidos em água destilada por 10 minutos por três vezes e colocados sobre pré-filtros (Schleicher & Schuel nº 8, 47 mm) previamente embebidos em tampão Sorensen

(KH_2PO_4 20 mM, pH 6,4). Alíquotas contendo 10^8 células suspensas em 1,0 mL de tampão Sorensen foram espalhadas uniformemente sobre os filtros e incubadas em câmara úmida a 22°C. Nessas condições, obtínhamos o desenvolvimento sincrônico e completo, até a formação do corpo de frutificação maduro, após período médio de 24 horas a 22°C. Os estágios de desenvolvimento foram monitorados por observação na lupa e células de diversas fases do ciclo de vida foram ressuspensas em 1,0 mL de tampão Sorensen e imediatamente processadas para extração de RNA total.

3.2. Procedimentos para extração, manipulação e análise de DNA e RNA

Os protocolos experimentais para extração, manipulação e análise de ácidos nucleicos descritos a seguir são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de protocolos descritos na literatura (Spudich, 1987; Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1995; Kreppel *et al.*, 2004).

3.2.1. Preparação de DNA genômico de *D. discoideum*

Após crescimento em meio líquido HL-5, 5×10^7 células foram resfriadas e centrifugadas a 800 xg por 5 minutos a 4°C. O meio de cultura foi desprezado e 75 µL de EDTA gelado 150 mM, pH 8,0 foram adicionados para ressuspensão das células em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 100 µL de Sarcosil 10 % (p/v) e o tubo foi agitado moderadamente e incubado a 55°C por 30 minutos. Foram adicionados 250 µL de acetato de cálcio 4 M e, após agitação, o tubo foi centrifugado a 16.000 xg a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v). O tubo foi agitado e centrifugado a 16.000 xg por 4 minutos. Esta extração foi repetida por mais duas vezes. A fase aquosa foi então extraída com clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v) e centrifugada nas mesmas condições descritas acima. Em seguida, o DNA foi precipitado pela adição de 2,2 volumes de etanol 100% e 0,1 volume de CH_3COOK 3 M, pH 5,5 à fase aquosa. O tubo foi centrifugado a 16.000 xg por 15 minutos e o precipitado foi lavado em etanol 75% (v/v) e centrifugado nas mesmas condições. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco por centrifugação a vácuo (Eppendorf concentrator 5301) por 5 minutos e ressuspenso em 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 e EDTA 1 mM) contendo 10 µg/µL de RNase. A concentração do DNA foi estimada pela medida da absorbância a 260 nm, sendo que $\text{Abs}_{260\text{nm}} = 1$ equivale a 50 µg de DNA fita dupla /mL.

3.2.2. Extração de RNA total de *D. discoideum*

Para extração de RNA total, foi adicionado 1mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies) ao precipitado de 2×10^7 células de *D. discoideum*. A suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 200 μ L de clorórmio e o tubo foi agitado vigorosamente. Após uma incubação de 3 minutos a temperatura ambiente, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C. A fase aquosa foi separada e misturada a 500 μ L de isopropanol, seguindo-se incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e nova centrifugação por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v). A centrifugação foi repetida por 5 minutos. Após a secagem do sedimento por 1 hora no fluxo laminar, ele foi ressuspense em 50 μ L de água pré-tratada com DEPC (dietil pirocarbonato). Por fim, a preparação de RNA foi aquecida por 10 minutos a 60°C, congelada a -20°C por 15 minutos e, novamente, aquecida nas mesmas condições.

A concentração e a pureza do RNA total foram estimadas pela medida da absorbância a 260 nm e 280 nm, sendo que $Abs_{260nm} = 1$ equivale a 40 μ g de RNA/mL quando a razão $A_{260nm}/A_{280nm} \sim 1,8$. A integridade do RNA total obtido foi avaliada pela análise da proporção relativa das bandas do rRNA 18S e 26S em eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído.

3.2.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A amostra DNA a ser analisada por eletroforese foi misturada com o tampão de amostra [azul de bromofenol 0,25% (p/v) e sacarose 40% (p/v)]. O gel de agarose 0,8% (p/v) foi preparado com TBE (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) e 0,5 μ g/mL brometo de etídio 10mg/mL. A eletroforese foi realizada com tampão TBE a uma diferença de potencial de 80-100V.

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.

3.2.4. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído

A amostra de RNA (15-20 μ g) a ser analisada foi misturada com 3 vezes o volume de tampão de amostra [formamida 65% (v/v), MOPS10X 12% (v/v), formaldeído 8% (v/v), azul de bromofenol 3% (p/v) e brometo de etídeo 0,5 mg/mL],

preparado em H₂O livre de RNase imediatamente antes da aplicação em gel de agarose contendo formaldeído [agarose 1,25% (p/v) e MOPS 1X contendo 16% (v/v) de formaldeído, adicionado após a fusão da agarose]. A solução de MOPS 10X corresponde a MOPS ácido 4,1% (p/v), acetato de sódio 0,4% (p/v) e EDTA 0,028% (p/v). A H₂O livre de RNase corresponde a H₂O previamente tratada com dietilpírocarbonato como descrito na literatura. A eletroforese foi realizada em baixa voltagem (75 V) em aparato mantido livre de contaminação com RNase.

3.2.5. Amplificação por PCR a partir de DNA genômico de *D. discoideum*

A reação de polimerização foi feita com 100 ng de DNA genômico num volume final de 50 µL, com adição de 0,2µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada dNTP (Stratagene), tampão da Taq DNA polimerase 1x, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) e 1,5 mM de MgCl₂.

A condição usual de programação dos ciclos do termociclador (Perkin Elmer) foi: desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, seguida de 30-35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50-60°C (variável de acordo com a T_m do oligonucleotídeo) e 1 minuto a 72°C. O produto da reação foi armazenado a 4°C e analisado em gel de agarose 1-2%.

3.2.6. Purificação de DNA em gel de agarose

Para extração de fragmentos de DNA previamente separados em eletroforese em gel de agarose, utilizamos o kit Wizard SGV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

3.2.7. Digestão com enzimas de restrição

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

3.2.8. Reação de ligação

As reações de ligação foram realizadas em volume final de 10 µL, por 16 horas a 14°C, utilizando-se 1:1 ou 3:1 da proporção inserto:vetor, com a adição de 1 µL de T4 ligase e 1 µL de tampão da ligase 10x.

3.2.9. Sequenciamento

Para sequenciamento de DNA foi utilizado o aparelho ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada com 2,0 µL de Big dye terminator mix (Perkin Elmer), 100-200 ng de DNA, 9,6 pmol de cada oligonucleotídeo, Tris-HCl 200 mM pH 9,0 e MgCl₂ 5 mM em um volume final de 15 µL. A amplificação foi feita com 35 ciclos de: 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. À solução inicial, foram adicionados 25 µL da solução de precipitação [500 µL etanol 100% gelado, 20 µL acetato de édio 3M pH 5,2, 20 µL glicogênio 1mg/mL]. A preparação foi agitada e incubada em gelo por 15 minutos, seguindo-se centrifugação a 14000rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e drenado através de uma centrifugação com a placa invertida sobre papel absorvente em dois pulsos de 1000 rpm. Foram adicionados 50 µL de etanol 70% (v/v) gelado e a centrifugação seguida de drenagem foi repetida. A amostra foi seca no termociclador por 1 minuto a 95°C. A placa foi embrulhada em papel alumínio e as amostras submetidas ao sequenciamento automatizado.

3.2.10. PCR quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR)

Para síntese da primeira fita de cDNA utilizamos 5 µg de RNA total pré-tratado com RQ1 DNase livre de RNAase (Promega) e da transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) e iniciadores dT12-18 ou dT20, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi diluído com água livre de nuclease e guardado congelado até o uso nos ensaios de qPCR.

Os ensaios de qPCR em tempo real foram feitos no equipamento ABI PRISM 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizando-se Platinum Sybr Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), iniciadores gene-específicos, cDNA molde com parâmetros padrão do equipamento. Para confirmar a geração de produtos específicos, a reação é seguida por análise da curva de fusão do produto de PCR, de acordo com as recomendações do fabricante.

As sequências dos iniciadores gene-específicos foram planejadas com o programa PRIMER EXPRESS 2.0 (Applied Biosystems). Como controle para normalizar a quantidade de RNA total por amostra foram utilizados iniciadores para amplificação do mRNA 1G7 (um gene de expressão constitutiva e invariável, frequentemente utilizado como normalizador em *D. discoideum*). A razão de expressão em cada amostra, comparada ao controle (células não tratadas ou tempo

zero) é calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, como descrito em (Livak e Schmittgen, 2001), com ensaios de RT-qPCR realizados em triplicata.

3.2.11. Planejamento dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*) de reações de PCR, RT-qPCR ou de sequenciamento de DNA foram encomendados à Prodimol Biotecnologia e estão descritos abaixo:

Oligonucleotídeos utilizados para amplificação (PCR) da sequência codificadora de DDB_G0269300:

DDB_G0269300 F – 5' CAT ATG GAC GAA TCA AAT CAA GAA 3'

DDB_G0269300 R – 5' GCG GCC GCT AGT AAT GGT TGA TAA TT 3'

Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de RT-qPCR:

DDB_G0269300 F- 5' GGATCGAAAAGAAGATGATGC 3'

DDB_G0269300 R- 5' TTGGTGTTCAAGTTCCCAA 3'

rnIA (IG7)F- 5' GTGGTTCGGCACCTCGAT 3'

rnIA (IG7)R- 5' CACCCCAACCCTTGGAAGT 3'

Oligonucleotídeos utilizados nos sequenciamentos de construções no vetor pET-36b:

pET-36bF: 5' TAATACGACTCACTATAGG 3'

pET-36bR: 5' CTAGTTATTGCTCAGCGG 3'

3.2.12. Construções Plasmidiais

As construções plasmidiais geradas neste trabalho estão descritas a seguir com indicação das principais características dos vetores utilizados.

pCR2.1-DDB_G0269300

Foi feita uma amplificação do gene DDB_G0269300 por PCR a partir de DNA genômico de *D. discoideum* com iniciadores que contém em suas sequências *forward*

e *reverse*, respectivamente, sítios de restrição para *NdeI* e *NotI*, visando uma posterior subclonagem no vetor de expressão pET36b (Novagen). O produto de PCR obtido foi purificado do gel de agarose e diretamente ligado ao vetor de clonagem pCR2.1, que é parte do TA cloning kit (Invitrogen).

pET36b-DDB_G0269300

Realizamos a clonagem da porção codificadora DDB_G0269300 no vetor de expressão pET36b, o qual confere uma cauda de oito resíduos de histidina no C-terminal da proteína recombinante. A expressão está sob controle do promotor T7 e o vetor tem como marca de seleção a resistência a canamicina.

Para a clonagem do gene DDB_G0269300 no vetor de expressão pET36b, o fragmento de DNA foi removido da construção pCR2.1-DDB_G0269300 com as enzimas *NdeI* e *NotI* e ligado no vetor pET36b previamente linearizado com as mesmas enzimas.

pGADT7-DDB_G0269300

O vetor pGADT7 expressa proteínas em fusão com os aminoácidos 768-881 do domínio de ativação de GAL4 (DNA-AD). Em levedura, as proteínas de fusão são expressas a partir do promotor constitutivo *ADH1* (P_{ADH1}) e a transcrição terminada pelos sinais de terminação de transcrição *ADH1* (T_{ADH1}). A proteína de fusão é direcionada para o núcleo da levedura através de uma sequência de localização nuclear (SV40) adicionada à sequência do domínio de ativação. O vetor também contém o promotor T7 e codifica o epítipo HA em fusão com a proteína heteróloga expressa. Este vetor pode se replicar tanto em *E. coli* quanto em *S. cerevisiae* a partir de *oriC* e *ori2μ*, respectivamente. As células transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico ampicilina (Amp^r), no caso de bactéria, e com o marcador nutricional leucina (*LEU2*), no caso de levedura.

Para a clonagem do gene DDB_G0269300 no vetor de expressão pGADT7, o fragmento de DNA foi removido da construção pCR2.1-DDB_G0269300 com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* e ligado no vetor pGADT7 previamente linearizado com as mesmas enzimas.

3.3. Procedimentos para manipulação de bactérias

Os protocolos experimentais relativos à transformação de bactérias e preparação de plasmídeos descritos a seguir são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de protocolos descritos na literatura (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1995).

3.3.1. Preparo de bactérias linhagem Sure competentes para transformação

Inicialmente as bactérias foram estriadas em placas de meio LB sólido [meio LB contendo agar 2% (p/v)] e incubadas a 37°C por 16-18 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi inoculada em 3 mL de meio LB [Tryptona 1% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 0,5% (p/v), pH 7,5] ou 2X TY [Tryptona 1,6% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v) e NaCl 8,5 mM, pH 7,4] e crescida a 37°C, por 16-18 horas a 200 rpm. Aproximadamente 0,5 mL de pré-inóculo foi transferido para 250 mL de meio SOB [extrato de levedura 0.5% (p/v), triptona 2% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM e MgSO₄ 10 mM] líquido fresco, seguindo-se crescimento a 22°C por 16-24 h até DO_{600nm} = 0,5. As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e em seguida coletadas por centrifugação (8461xg por 10 minutos a 4°C). O sedimento foi suspenso em 80 mL de TB (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM, pH 6.7) gelado, mantido em gelo por 10 minutos e centrifugado nas condições anteriores. As células foram suspensas em 20 mL de TB gelado e 1,4 mL de DMSO, distribuídas em alíquotas de 500 µL, congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a -80°C.

3.3.2. Transformação de bactérias por choque térmico

O procedimento foi realizado com aproximadamente 100 ng de DNA adicionados em 200 µL de células competentes. As células foram mantidas em banho de gelo por 30 minutos e em seguida foi aplicado choque térmico a 42°C por 90 segundos e rápido resfriamento por 3 minutos. Um mL de meio LB foi adicionado, sendo a suspensão bacteriana então transferida para tubo de cultura e incubada a 37°C por 1 h a 200 rpm. Em seguida, 100 µL a 300 µL desta cultura foram semeados em placas de meio LB sólido contendo o antibiótico apropriado por 16 horas a 37°C.

Algumas colônias transformantes foram inoculadas em meio LB líquido contendo antibiótico para minipreparação de plasmídeos e posterior análise quanto à presença das construções plasmidiais de interesse.

3.3.3. Métodos de preparação de plasmídeos em pequena escala

Uma colônia bacteriana foi semeada isolada em 3mL de LB contendo o antibiótico apropriado, seguindo-se incubação a 37°C por 16 horas. Após este período, a cultura é centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante é descartado. O sedimento é ressuspenso em 300µL de solução P1 [0,1 mL Tris HCl 1M, 0,25mL EDTA 0,5M, 50 µL RNase 10 mg/mL, 4,7 mL H₂O]. Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução P2 [0,25mL de NaOH 4M, 0,5mL de SDS 10%, 4,25mL H₂O]. Após agitação branda por inversão do tubo, a preparação foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 300 de solução P3 [acetato de potássio 3M pH 5,5]. Após agitação branda, a solução, contendo um precipitado branco, foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado, seguindo-se duas extrações por centrifugação durante 5 minutos com volumes iguais de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) [CHCl₃ misturado a fenol equilibrado com Tris-HCl pH 8]. Após extração final com CHCl₃/álcool isoamílico 24:1 (v/v), a precipitação do DNA foi realizada pela adição de 2,2 volumes de etanol 100%, agitação e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. O etanol foi aspirado e o sedimento foi lavado com 1mL de etanol 70% (v/v). A centrifugação foi repetida, o sedimento foi seco por 1 hora no fluxo laminar e em seguida ressuspenso em 50 µL de H₂O. A esta preparação foram adicionados RNase 20 µg/mL e 0,1 volume de acetato de potássio 3M pH 5,2. Após agitação, foram adicionados 2 vezes o volume de etanol 100% gelado. A solução é misturada e, então, incubada no gelo por 30 minutos. Após centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm, o sobrenadante é descartado e o precipitado é lavado com etanol 70% (v/v) por centrifugação nas mesmas condições. O sedimento de DNA é seco por 1 hora no fluxo laminar, dissolvido em 50 µL de H₂O e armazenado a -20C.

3.3.4. Métodos de preparação de plasmídeos em média escala

A preparação de plasmídeos em média escala foi realizada como os kits PureLink HiPure Plasmid DNA Purification (Invitrogen) e Hispeed Plasmid Midi (Qiagen), segundo as instruções dos fabricantes.

3.4. Procedimentos para manipulação de leveduras

Os protocolos experimentais utilizando a levedura *S. cerevisiae* descritos a seguir são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de protocolos descritos nos manuais dos fabricantes dos reagentes utilizados bem como de protocolos descritos na literatura (Sambrook *et al.*, 1989; Bai e Elledge, 1997; Woods e Gietz, 2001; Gietz e Woods, 2002).

3.4.1. Cultivo da levedura *S. cerevisiae*

Células de levedura, armazenadas a -80°C em meio YPD [extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glicose 2% (p/v)] com 25% de glicerol, foram descongeladas e plaqueadas em YPD sólido [YPD contendo agar 2% (p/v)]. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias. Para obtenção de culturas em meio líquido, uma colônia foi transferida para meio YPD, seguindo-se incubação a 30°C por 16-18 horas com agitação de 200-250rpm. Para a maioria das linhagens isto fornece uma cultura em fase estacionária ($DO_{600nm} > 1,5$). Para obtenção de uma cultura em fase exponencial, um volume adequado de uma cultura de fase estacionária foi transferido para meio fresco, de forma a obter DO_{600nm} entre 0,2-0,3. A cultura foi então incubada a 30°C com agitação (200-250rpm) até atingir a DO desejada. As linhagens utilizadas exibem pelo menos uma marca genética nutricional plasmidial, a qual permite seleção de transformantes através de seu crescimento em meio SD [YNB w/a 0,67% (p/v), glicose 2% (p/v), 10% de solução de aminoácido 10X (v/v)] contendo os aminoácidos requeridos. Foram preparadas soluções concentradas 10X contendo os aminoácidos e bases apropriados (L-isoleucina 300mg/L, L-valina 1500mg/L, L-adenina hemissulfato 200mg/L, L-arginina 200mg/L, L-histidina 200mg/L, L-leucina 1000mg/L, L-lisina 300mg/L, L-metionina 200mg/L, L-fenilalanina 500mg/L, L-treonina 2000mg/L, L-triptofano 200mg/L, L-tirosina 300mg/mL, L-uracil 200mg/L), omitindo-se para cada uma delas os componentes necessários para seleção, por exemplo, L-triptofano, L-histidina ou L-leucina.

3.4.2. Transformação de leveduras em pequena escala

A linhagem de levedura AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4D*, *gal80D*, *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*) foi inoculada em 10mL meio SD complementado com aminoácidos requeridos pela linhagem. A cultura foi incubada a 30°C até atingir

DO_{600nm} entre 0,8-1,0. Seis mL da cultura foram transferidos para tubos estéreis e centrifugados a 3.220 xg por 5 minutos. As células foram suspensas em 2mL de água estéril e centrifugadas novamente. Em seguida, foram adicionados ao precipitado, 200µL de uma solução TE/LiOAc preparado na hora (10X TE e LiOAc 1M). Aproximadamente 5µg do DNA plasmidial foram transferidos para microtubo juntamente com 200µg de DNA de esperma de salmão (10µg/µL) e 100µL de células foram então adicionados e misturados com ajuda da micropipeta. Em seguida, foram adicionados 600µL de solução estéril PEG/LiOAc (40%PEG, LiOAc 0,1M). A mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos com agitação ocasional dos tubos e então submetida a choque térmico a 42°C por 15 minutos em banho-maria. Posteriormente, a suspensão de células foi centrifugada 3.220xg por 2 minutos, o sobrenadante foi removido, as células foram suspensas em 0,4mL de TE pH 7,5 e plaqueadas em meio seletivo. As placas foram incubadas a 30°C por no mínimo 48 horas ou até o aparecimento de colônias.

3.4.3. Teste de β-galactosidase

Para o teste de β-galactosidase (ativação do gene repórter lacZ), as colônias de leveduras foram crescidas sobre filtro de nitrocelulose (82,5mm de diâmetro, BIO-RAD) em meio SD -TRP-LEU-HIS (meio SD sem Trp, Leu e His) a 30°C por 48 horas. Os filtros de nitrocelulose contendo as colônias foram submetidos a um rápido congelamento em nitrogênio líquido. Em seguida, após alguns segundos de descongelamento, o filtro foi depositado em uma placa de Petri contendo papel de filtro em circular embebido em 5mL de tampão Z (NaHPO₄.7H₂O, Na₂HPO₄ 40mM, KCl 10mM, MgSO₄.7H₂O 0,1mM), X-β-Gal 1mg/mL e β-mercaptoetanol 4mM. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas a 37°C. O aparecimento de colônias azuis foi verificado periodicamente por um período mínimo de 1 hora e máximo de 8 horas.

3.4.4. Diluição seriada de *S. cerevisiae*

Células de levedura da cepa AH109 foram transformadas com os plasmídeos de interesse e inoculadas em 5mL de meio SD complementado com aminoácidos e bases nitrogenadas requeridos pela linhagem por 12 h a 28°C. A cultura foi diluída até DO_{600nm} ~ 0,2 e a partir dessa suspensão foram feitas quatro diluições: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴. A cultura e suas respectivas diluições foram semeadas em meio SD-TRP-LEU+HIS e SD-TRP-LEU-HIS e incubadas a 30°C durante 3 dias.

3.5. Manipulação e análise de proteínas

Os protocolos experimentais para obtenção de proteínas recombinantes, para análise de proteínas por eletroforese e para preparação de anticorpos policlonais descritos a seguir são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de protocolos descritos na literatura adaptados e em manuais dos fabricantes dos reagentes (Laemmli, 1970; Harlow e Lane, 1988; Ausubel *et al.*, 1995).

3.5.1. Expressão da proteína recombinante

Para expressão da proteína recombinante DDB0233538 foi utilizada a cepa BL21(DE3), transformada por choque térmico com a construção pET36b-DDB0233538. Após a transformação, 6 clones foram inoculados em 3 mL de meio LB acrescido de canamicina 30 µg/mL e 1% de glicose e crescidos a 37°C, 200 rpm, por 14-16 h. Alíquotas de 1 mL das culturas crescidas durante a noite foram centrifugadas a 16000 xg por 1 minuto à temperatura ambiente e diluídas para $DO_{600nm} = 0,1$ em 50 mL de meio LB fresco contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo então incubadas a 37°C. Quando a cultura atingiu $DO_{600nm} = 0,4$, uma alíquota de 1 mL foi retirada (cultura não induzida) e submetida a centrifugação a 16000 xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias suspenso em 100 µL de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 1 mM e alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após incubação por 3 h a 37°C ou 16 h a 20°C. As amostras de cultura induzida (1 mL) foram processadas como já descrito, exceto que o sedimento de bactérias foi suspenso em 200 µL de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE. As amostras das culturas não induzida e induzida foram armazenadas a -20°C até sua avaliação em eletroforese em SDS-PAGE e coloração com azul de Coomassie R.

A avaliação da solubilidade da proteína recombinante foi utilizada numa cultura bacteriana obtida em média-escala. Para tal, um clone bacteriano positivo para a expressão da proteína foi inoculado 3 mL de meio LB acrescido de canamicina 30 µg/mL e 1% de glicose e cultivado a 37°C, 200 rpm, por 14-16 h. Uma alíquota dessa cultura foi centrifugada a 16.000 xg por 1 min à temperatura ambiente e diluída para $DO_{600nm} = 0,1$ em 50 mL de meio LB fresco contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo então incubadas a 37°C. Quando a cultura atingiu

DO_{600nm} = 0,3 uma alíquota de 1 mL foi retirada (cultura não induzida), sendo então adicionado IPTG na concentração final de 1 mM. Após 16 h de incubação a 20°C, alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas para análise em SDS-PAGE. O restante da cultura foi submetido à centrifugação a 4.000 xg por 20 min a 4°C e o sedimento bacteriano foi suspenso em 1mL de tampão de lise [Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM, PMSF 1 mM e glicerol 10% (v/v)]. A suspensão foi submetida à sonicação com 6 pulsos de 10 segundos cada, posição 3 (Branson Sonifier 450) com intervalos de incubação de 1 minuto em gelo entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 9.880 xg por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante e precipitados foram recolhidos para avaliação em SDS-PAGE.

3.5.2. Purificação da proteína recombinante

Para purificação da proteína a partir de corpos de inclusão (fração insolúvel do extrato bacteriano), o sedimento bacteriano obtido de 250 mL de cultura induzida com 1mM de IPTG, como descrito acima, incubado em banho de gelo por 15 minutos e ressuspenso em 5 mL de tampão contendo uréia [100 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de Tris-HCl, pH8,0, 8M de uréia] por grama de sedimento úmido. A suspensão foi agitada levemente por 1 hora a temperatura ambiente. O lisado foi centrifugado a 10.000 xg por 20 min 4 mL do sobrenadante obtido foram misturados a 1 mL de resina Ni²⁺-NTA (Qiagen), seguindo-se agitação branda por 1 hora. A mistura foi então colocada numa coluna vazia e, após a abertura da parte inferior da coluna, a fração que não aderiu à resina (*flow-through*) foi coletada. A resina foi lavada duas vezes com 4 mL de tampão de uréia pH 6,3. A eluição da proteína adsorvida à resina foi realizada com tampão de uréia pH 5,9 em quatro frações de 0,5 mL e com tampão pH 4,5 em quatro frações de 0,5 mL. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE.

3.5.3. 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 em placas. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, DTT 25 mM, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v) e azul de bromofenol 0,025% (p/v)] e fervidas por 3 minutos antes da aplicação no gel. A eletroforese foi realizada a 200 V 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 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). Alternativamente, imediatamente após a eletroforese, o gel foi submetido a transferência eletroforética como descrito a seguir.

3.5.4. Detecção imunológica de proteínas

Após separação das proteínas em SDS-PAGE, as mesmas foram submetidas à transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose pelo método semi-seco, como descrito por (Harlow e Lane, 1988). Para verificação da eficiência da transferência realizada, a membrana foi corada com Ponceau-S 0,1% (p/v) dissolvido em ácido acético 10% (v/v) seguindo-se breve lavagem com água para remoção do excesso de corante. A membrana foi então incubada em TBS 1X (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e NaCl 150 mM) contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado por 1 h à temperatura ambiente sob agitação lenta. Após esta etapa de bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo anti-His (anticorpo contra cauda de histidinas) diluído 1:500 em TBS 1X contendo 0,1% Tween-20 (v/v) por 1 h. A membrana foi submetida a seis lavagens de 10 minutos cada com TBS 1X contendo 0,1% Tween-20 (v/v). Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente sob agitação, com anticorpos secundários conjugados a peroxidase diluídos em TBS 1X contendo Tween-20 0,1% (v/v). As membranas foram novamente submetidas a seis lavagens com TBS 1X acrescido de Tween-20 0,1% (v/v) por 10 minutos cada. Finalmente, as proteínas contidas nas membranas que reagiram com os anticorpos foram reveladas colorimetricamente pela adição de uma solução de TBS 1X pré-aquecida a 37°C contendo 20 mg cloronaftol, 17% metanol (v/v) e 15 µl de H₂O₂ preparados na hora ou segundo as instruções do kit ECL Plus Western blotting detection system (GE Healthcare), com tempos de exposição a filme de Raios-X de 1, 5 e 15 minutos.

3.5.5. Imunização de camundongos para obtenção de anticorpo policlonal

Para a primeira imunização de quatro camundongos fêmeas espécie BALB/C foram utilizadas alíquotas de 40 µg de rDDB0233538 purificada por animal. A amostra de proteína suficiente para imunizar os camundongos foi misturada com o mesmo volume de adjuvante de Freund completo (Sigma) e injetada nos animais. Novas

imunizações foram repetidas semanalmente por mais 3 vezes após a primeira nas mesmas condições, exceto pelo uso de 20 µg de proteína por animal e do adjuvante de Freund incompleto (Sigma). Após uma semana da quarta imunização o sangue dos camundongos foi coletado para obtenção do soro imune. Um camundongo não imunizado foi utilizado para obtenção do soro controle.

O sangue coletado (controle e imune) foi incubado 1 h a 37°C, seguindo-se incubação a 4°C por uma noite. O material não coagulado foi coletado e submetido a centrifugação a 3000xg por 30 minutos a 4°C. O soro resultante foi aliquotado e mantido a -20° C.

4. Resultados e Discussão

4.1. Validação de interações com DdPP1c identificadas em ensaios de duplo-híbrido

Trabalho anterior realizado em nosso grupo possibilitou a seleção de mais de 25 clones distintos de cDNA parciais que codificam proteínas que potencialmente interagem com a DdPP1c. Estes clones foram selecionados em varreduras de bibliotecas de cDNA de diferentes estágios de desenvolvimento de *D. discoideum*, utilizando-se a DdPP1c como isca em ensaios de duplo-híbrido em leveduras (Gonzalez-Kristeller, 2007). As cinco bibliotecas utilizadas nestas varreduras foram preparadas a partir de cDNAs obtidos de RNA poli A⁺ de fase vegetativa (bibliotecas veg01, veg02 e veg03) e de desenvolvimento (tempo entre 4 e 18 horas de desenvolvimento, bibliotecas dev01 e dev02) de *D. discoideum*. A biblioteca foi construída no vetor pACT2 (Clontech) sendo os cDNAs clonados nos sítios de restrição *EcoRI* e *XhoI*.

Visando a confirmação destes dados, os plasmídeos preparados a partir dos clones de levedura foram utilizados para transformar bactérias competentes. Os plasmídeos correspondente as presas clonadas no vetor pACT2 foram utilizados na transformação de leveduras da cepa AH109 sequencialmente à isca DdPP1c. Nestes ensaios de duplo-híbrido, se a isca DdPP1c interagir com a presa ocorre a ativação dos genes repórteres β -galactosidase e *HIS3*) e a levedura cresce em meio sem histidina e apresenta colônias azuis no teste da X- β -Gal.

Os resultados obtidos estão apresentados no apêndice ao final deste trabalho e resumidos na Tabela 1, onde (+) significa a confirmação da interação da isca DdPP1c com a presa e (-) indica ausência de interação. Para nove clones observamos autoativação, o que significa que houve ativação dos genes repórteres independente interação da presa com a isca DdPP1c. Entre os onze clones cuja interação foi confirmada nestes ensaios, está o clone que codifica *Ddl-3*, um novo inibidor da DdPP1c (Gonzalez-Kristeller, 2007).

Dictybase ID	gene	Produto Gênico	Validação por 2Hyb
		- acetyl-CoA C-acyltransferase	
		- beta-ketothiolase	
DDB0167887	<i>DDB_G0274339</i>	- 3-ketoacyl-CoA thiolase	autoativação
DDB0185029	<i>chcA</i>	clathrin heavy chain	autoativação
DDB0185197	<i>gefL</i>	Ras guanine nucleotide exchange factor	autoativação
DDB0187208	<i>DDB_G0286951</i>	ORF hipotética	+
DDB0188859	<i>DDB_G0290381</i>	ORF hipotética	autoativação
DDB0233538	<i>DDB_G0269300</i>	ORF hipotética	+
DDB0190281	<i>DDB_G0269460</i>	ORF hipotética	+
DDB0190820	<i>DDB_G0270118</i>	DdI-3, <i>dpiB</i>	+
DDB0191404	<i>kif4</i>	kinesin 4	+
		- LISK family protein kinase	
		- protein kinase, TKL group	
		- tyrosine kinase-like protein	+
DDB0191487	<i>kinX</i>		+
DDB0191863	<i>DDB_G0293300</i>	Breast cancer type 1 susceptibility protein	autoativação
DDB0191988	<i>DDB_G0293544</i>	centrosomal protein 248 kDa	+
DDB0202465	<i>med26</i>	putative mediator complex subunit 26	+
		- cathepsin D	
		- preprocathepsin D	-
DDB0215012	<i>ctsD</i>		-
DDB0216674	<i>DDB_G0270902</i>	Ninein-like protein	autoativação
DDB0216865	<i>rev3</i>	DNA polymerase zeta catalytic subunit	+
DDB0218538	<i>mlh3</i>	MutL DNA mismatch repair protein	+
DDB0218699	<i>DDB_G0285313</i>	ORF hipotética	autoativação
DDB0219724	<i>DDB_0292194</i>	ORF hipotética	+
		- ribosomal acidic phosphoprotein P0	
		- 60S acidic ribosomal protein P0	-
DDB0219977	<i>rplP0</i>		-
		- putative protein serine/threonine kinase	
		- STE20 family protein kinase	
		- protein kinase, STE group	
		- FRAY subfamily protein kinase	-
DDB0230012	<i>fray1</i>		-
DDB0230023	<i>rps6</i>	40S ribosomal protein S6	-
DDB0231259	<i>rpl9</i>	60S ribosomal protein L9	autoativação
DDB0231321	<i>gluS</i>	glutamate-tRNA ligase	autoativação
DDB0231339	<i>rpl7a</i>	60S ribosomal protein L7a	-

Tabela 1. Presas obtidas na varredura das cinco bibliotecas de cDNA com a isca DdPP1c. O sinal (+) indica confirmação da interação nos experimentos de validação por duplo-híbrido (2Hyb). O sinal (-) indica a ausência de interação entre a isca DdPP1c e a presa. Para algumas presas observamos autoativação dos genes repórteres, ou seja, resultado positivo de interação quando co-transformadas apenas com o vetor vazio (sem a isca DdPP1c). A identificação de cada gene e dados a ele associados foram extraídos do Dictybase (<http://dictybase.org>).

A

```
>DDB0233538 |DDB_G0269300 |Protein| gene: DDB_G0269300 on chromosome:
1 position 2481510 to 2482781
```

MDES NQ EEDKNSKEKKVRFNDDIQT KVI EEENN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNFENEILKQIEIGNEKQRKRDEEFKKKNKIQLDSKEHKYIEEVVNDQIDSVQG
EEYIDSDEDENQKKHVEKIYKRVRGKRSFLKNDDEYSDDDDDDKMNDKIRKEGDNNNNNNNNNSNDNEGE
EEEEEDIEYDSFNLKGESSEEGYFDASGNFI FKKDRKEDDAWLQEYDQVSSKVPKLTKRELKKQNDQQT
EEEEDLWELEHQKELKKRRLGLLDDEKSLRLERL NKIYNILQSDKESVL SALRRLSGNPTGTNK RPEIK
RKNPPKNKRSNVDTTTTTTTTTTTTTTTPTKTQSESDKILFNQLTELADSLLSNGFVN IYSETKY SINETF
KKENYOPLL*

Query	214	IEYDSFNLKGEESEEGYFDASGNFIFKKDRKEDDAWLQEYDQV	255
		+ FNL+ E EEG+FDA GN+ +D + D+WL D V	
Sbjct	85	VRITPFLNLQEEEMEEGHFDADGNYFLNRDAQIRDSWLDNIDWV	126

Figura 1. Sequência de aminoácidos de *DDB_G0269300* e mapeamento genômico. (A) Mapeamento do gene *DDB_G0269300* no cromossomo 1 (seta vermelha grossa) revelando a ausência de introns. (B) Sequência de aminoácidos predita para o produto do gene *DDB_G0269300*. Potenciais motivos RVXF estão em negrito e sublinhados. A região que apresenta similaridade com a proteína CD2BP2 está sublinhada, sendo o alinhamento apresentado em (C), onde *Query* e *Sbjct* correspondem, respectivamente, a *DDB_G0269300* e *CD2BP2*.

No banco de dados de *Dictyostelium* (<http://www.dictybase.org/>) a proteína DDB_G0269300 está anotada como similar à proteína CD2BP2 de humanos e à proteína LIN1 de leveduras, um componente não essencial da snRNP U5. A função da proteína CD2BP2 humana, uma proteína de 341 aminoácidos, que interage com o antígeno CD2 de linfócitos T, ainda não foi esclarecida, sabendo-se apenas que apresenta localização nuclear e que interage com proteínas envolvidas no *splicing* (Kofler *et al.*, 2005). As proteínas CD2BP2 e LIN1 possuem um domínio denominado GYF que reconhece sequências ricas em prolina. Análises estruturais mostram a sequência conservada W-X-Y-X(6-11)-GPF-X(4)-M-X(2)-W-X(3)-GYF para este domínio, que é frequente em proteínas relacionadas ao *splicing* de pré-mRNA (Kofler e Freund, 2006; Kofler *et al.*, 2009). Contudo, a similaridade entre DDB_G0269300 e CD2BP2 restringe-se a uma pequena região de ~40 aminoácidos posicionada entre os aminoácidos 214 a 255 de DDB_G0269300 (Figura 1C), a qual não inclui o domínio GYF identificado na proteína CD2BP2. Além disso, análises por BLASTp ou PSI BLAST não revelaram similaridade significativa de DDB_G0269300 com a proteína LIN1 de *S.cerevisiae*.

Análises adicionais visando a identificação de potenciais ortólogos de DDB_G0269300, utilizando-se os programas BLASTp ou PSI BLAST na base de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), revelaram que a porção carboxiterminal desta proteína (resíduos 214 a 417) exibe similaridade de ~30% com proteínas de função desconhecida codificadas no genoma de algumas plantas, como *Arabidopsis thaliana* e *Vitis vinifera*, e do protista *Polysphondylium pallidum*. Além disso, a comparação com o genoma recém sequenciado de *Dictyostelium purpureum* mostra o alinhamento da sequência completa da proteína DDB_G0269300 com a proteína hipotética DPU_G0062536 deste organismo, com identidade e similaridade respectivamente de 56% e 69%.

Identificamos na sequência de DDB_G0269300 dois motivos (Figura 1B) que apresentam características do motivo RVXF que é encontrado em proteínas que associam-se a PP1c (Egloff *et al.*, 1997; Zhao e Lee, 1997; Aggen *et al.*, 2000; Cohen, 2002; Wakula *et al.*, 2003; Terrak *et al.*, 2004; Ceulemans e Bollen, 2006; Meiselbach *et al.*, 2006).

4.2. Perfil de expressão do gene DDB_G0269300 durante o desenvolvimento de *D. discoideum*

Células de *D. discoideum* linhagem AX-4 foram submetidas à carência nutricional sobre filtros de nitrocelulose. As células foram coletadas nas diferentes fases de desenvolvimento e o RNA total foi extraído. Este foi tratado com DNase e utilizado como molde para a síntese de cDNA, o qual foi utilizado nas reações qPCR. O gene constitutivo *IG7* que codifica a subunidade maior do RNA ribossomal da mitocôndria foi utilizado como normalizador da quantidade de RNA utilizada nos ensaios de qPCR. A razão de expressão em cada amostra relativa a amostra controle (tempo zero do desenvolvimento) foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

A figura 2 mostra que o gene DDB_G0269300 tem seus níveis de expressão aumentados em 8 h e 12h da fase de desenvolvimento de *D. discoideum*, o que sugere uma importância para esta proteína durante a fase de agregação. Os experimentos foram realizados com três réplicas biológicas, sendo que cada ensaio possui três réplicas técnicas. A curva de fusão do produto de PCR também foi analisada, demonstrando a especificidade dos oligonucleotídeos na reação (dados não apresentados).

Figura 2: Análise do perfil de expressão do DDB_G0269300 durante o desenvolvimento de *D. discoideum*. O RNA total de células da linhagem AX-4 foi isolado. O cDNA foi submetido a RT-qPCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificação da sequência relativa a DDB_G0269300. A razão de expressão em cada amostra foi calculada em relação à expressão do gene constitutivo de cada tempo. O gráfico mostra um experimento representativo. Os desvios indicados pelas barras de erro correspondem a réplicas técnicas em triplicata.

4.3. Clonagem da sequência codificadora completa de *DDB_G0269300* em vetores para expressão em levedura e bactéria

O clone de cDNA correspondente ao gene *DDB_G0269300* que foi isolado das varreduras nos ensaios de duplo-híbrido não estava completo, representando apenas uma parte de sua sequência codificadora. Planejamos então a clonagem da porção codificadora completa deste gene para confirmação adicional da interação com a DdPP1c e também para futura obtenção da proteína recombinante correspondente.

Para tal, foi feita uma amplificação por PCR a partir de DNA genômico de *D. discoideum* com iniciadores que contêm em suas sequências *forward* e *reverse*, respectivamente, sítios de restrição para *NdeI* e *NotI*, visando uma posterior subclonagem no vetor de expressão pET36b (Novagen). O produto de PCR obtido (Figura 3A) foi purificado do gel de agarose e diretamente ligado ao vetor de clonagem pCR2.1. Como mostrado na figura 3B, a digestão da construção pCR2.1-*DDB_G0269300* com as enzimas *NdeI* e *NotI*, gera um fragmento de 1269pb, corresponde ao gene *DDB_G0269300*, indicando o sucesso da clonagem e a integridade dos sítios de restrição introduzidos no par de oligonucleotídeos utilizados na PCR. A autenticidade da sequência amplificada por PCR foi confirmada por sequenciamento de DNA.

Figura 3: Construção pCR2.1-DDB_G0269300. (A) Eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR a partir de DNA genômico de *D. discoideum*. A seta indica o tamanho esperado para o inserto de 1269 pb. Posteriormente, o fragmento foi purificado e digerido com as enzimas *NdeI* e *NotI* para ser ligado ao vetor pCR2.1. (B) A construção pCR2.1-DDB_G0269300 foi digerida com as enzimas *NdeI* e *NotI* e analisada por eletroforese em gel de agarose. A seta grossa indica o tamanho esperado de 3900 pb para o vetor pCR2.1 e a seta fina indica o tamanho esperado de 1269 pb para o inserto DDB_G0269300.

O fragmento de DNA correspondente a sequência codificadora do gene DDB_G0269300 foi utilizado para subclonagem nos vetores pGADT7 e pET36b, para realização de novos ensaios de duplo híbrido e para obtenção da proteína recombinante, respectivamente.

Para a clonagem do gene DDB_G0269300 no vetor de expressão pGADT7, o fragmento de DNA foi removido da construção pCR2.1- DDB_G0269300 com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* e ligado no vetor pGADT7 previamente linearizado com as mesmas enzimas. Após a preparação dos plasmídeos em média escala, a construção pGADT7-DDB_G0269300 foi confirmada pela digestão com *NdeI* e *EcoRI*, conforme mostra a figura 4A. A construção pGADT7-DDB_G0269300 foi utilizada na transformação de leveduras AH109 como será apresentado adiante.

A porção codificadora do gene DDB_G0269300 foi também subclonada no vetor de expressão pET36b para obtenção da proteína recombinante para posterior preparação de anticorpos policlonais. O fragmento de 1269 pb foi retirado da construção pCR2.1-DDB_G0269300 pela digestão com as enzimas *NdeI* e *NotI* (canaleta 1 da figura 4B). O vetor pET36b, o qual possui 5923 pb, foi digerido com as mesmas enzimas, liberando fragmentos de aproximadamente 665 pb e 5258 pb (canaleta 2 da figura 4B). O fragmento de 1269 pb e o vetor linearizado (banda de 5258 pb) foram purificados (canaletas 3 e 4, respectivamente) para posterior ligação. A construção pET36b-DDB_G0269300 foi confirmada por sequenciamento e por reações de digestão com as enzimas citadas, como mostra a figura 4C. Concluímos, portanto, que a clonagem do DDB_G0269300 no vetor de expressão pET36b foi bem sucedida. A construção pET36b-DDB_G0269300 foi utilizada na transformação da cepa bacteriana BL21(DE3) (Stratagene).

Figura 4: Subclonagem nos vetores pGADT7 e pET36b. (A) Análise da eletroforese em gel de agarose da digestão da construção pGADT7-DDB_G0269300 com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*. O fragmento de 8000 pb é referente ao vetor digerido e o inserto de 1269 pb, referente ao cDNA DDB_G0269300, está indicado pela seta. (B) Eletroforese em gel de agarose da digestão da construção pCR2-DDB_G0269300 (canaleta 1) e do vetor pET36b (canaleta 2) com as enzimas *NdeI* e *NotI*. O fragmento de 5258 pb, referente ao vetor pET36b digerido, está indicado pela seta grossa. O inserto de 1269 pb, referente a porção codificadora de DDB_G0269300, está indicado pela seta fina. Ambos foram purificados para posterior ligação. A canaleta 3 possui o inserto purificado e a canaleta 4, o vetor purificado. (C) A construção pET36b-DDB_G0269300 foi digerida com as enzimas *NdeI* e *NotI* e analisada por eletroforese em gel de agarose. A seta indica o fragmento de 1269 pb correspondente ao inserto DDB_G0269300.

4.4 Confirmação da especificidade de interação de DDB_G0269300 com a DdPP1c

Para confirmarmos se a sequência codificadora completa da presa DDB_G0269300 mantinha interação com a DdPP1c de maneira semelhante ao seu cDNA parcial e também se esta interação era específica realizamos novos ensaios de duplo híbrido cujos resultados estão apresentados na figura 5.

Inicialmente, fizemos a transformação em pequena escala da linhagem AH109 com as iscas pGBKT7_PP1c e pGBKT7_PP4. Paralelamente, fizemos transformação com os vetores pGBKT7_p53, pGBKT7_pLam e pGBKT7_vazio, como controle. O resultado foi positivo, pois todas as transformações cresceram em meio sem triptofano.

Em seguida, as células transformadas com pGBKT7_pLam e pGBKT7_p53 foram transformadas com a construção pGADT7_AntígenoT. É sabido que a proteína p53 interage com antígeno T no ensaio de duplo-híbrido funcionando como controle positivo (Iwabuchi *et al.*, 1993; Li e Fields, 1993). Já a proteína pLam, que não forma complexo e não interage com a maioria das proteínas, é utilizada como controle negativo (Bartel *et al.*, 1993; Ye e Worman, 1995). As células transformadas com os plasmídeos pGBKT7_PP1c, pGBKT7_PP4 e pGBKT7_vazio foram transformadas sequencialmente com a construção pGADT7- DDB_G0269300.

Confirmamos que na ausência de histidina apenas as colônias transformadas com pGBKT7_PP1c e pGADT7-DDB_G0269300 (colônia 3 da figura 5A) ou pGBKT7_p53 e pGADT7_AntígenoT (colônia 5 da figura 5A) apresentaram crescimento, sugerindo a interação da presa DDB_G0269300 com a isca DdPP1c.

Os resultados foram confirmados através de ensaios de interação em diluições seriadas para as culturas transformadas, conforme mostra a figura 5B. A ausência de crescimento das células transformadas sequencialmente com pGBKT7_PP4 e pGADT7-DDB_G0269300 sugere especificidade de interação entre DDB_G0269300 e a isca DdPP1c. Portanto, este resultado indica que a presa DDB_G0269300 interage com a isca DdPP1c, mas não interage com a isca DdPP4c. Como a DdPP4 possui similaridade com outras fosfatases de *D.discoideum*, em especial com a DdPP2A (Gonzalez-Kristeller, 2007), este resultado sugere que a interação da DDB_G0269300 é específica para DdPP1c.

As células crescidas nos requeridos meios foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para a realização do teste de X- β -Gal. O resultado também foi positivo conforme mostra a figura 5C. Assim, sugerimos que DDB_G0269300 interage com a *DdPP1c* no sistema de duplo-híbrido de levedura, pois além de crescerem em meio SD suplementado com aminoácidos e bases requeridos pela linhagem, mas sem histidina, também apresentaram colônias azuis no teste da X- β -Gal.

Figura 5: Interação entre DDB_G0269300 e DdPP1c. (A) A cepa AH109 foi transformada com o vetor pGBKT7_vazio (clone 2) e também com o vetor pGBKT7_PP1c (clone 1), sendo estes transformados sequencialmente com o vetor pGADT7_DDB_G0269300 (clones 3 e 4) para análise da interação por duplo-híbrido. O clone 2 representa o controle positivo (p53-AntígenoT) e o 6, controle negativo (Lam-AntígenoT) da interação. Os transformantes contendo os dois plasmídeos selecionados em meio SD sem Trp/Leu foram semeados em meio SD sem Trp/Leu/His para avaliação do crescimento. (B) As culturas foram diluídas até $DO_{600nm} \sim 0,2$ em SD-TRP-LEU para posterior diluição seriada 10x. Os valores a cima da figura indicam as diluições realizadas, onde ND significa não diluído. (C) Teste de β -galactosidase. Células transformadas com pCL1 (1), p53 e antígeno T (2), pLam e antígeno T (3), PP1 (4), pGBKT7_vazio (5), PP1 e DDB_G0269300 (6), pGBKT7_vazio e DDB_0269300 (7).

4.5. Obtenção da proteína recombinante rDDB_G0269300 em bactérias

A construção pET36b-DDB_G0269300 foi utilizada na transformação da cepa bacteriana BL21(DE3) (Stratagene). A partir destas células transformadas, seis colônias foram crescidas em meio líquido para indução com IPTG 1mM a 37°C por 3 horas. Como não foi observada a indução da proteína (dados não apresentados), as condições experimentais foram alteradas e testamos a indução a 20°C por 16h.

A figura 6A mostra que um polipeptídeo de cerca de 46kDa e outro de aproximadamente 65kDa foram induzidos nestas condições. A proteína recombinante do DDB_G0269300 tem uma massa molecular esperada de 50 kDa e portanto poderia corresponder a banda de aproximadamente 46kDa. A eletroforese dos extratos bacterianos em SDS-PAGE (figura 6B) mostrou que a proteína mantém-se na fração insolúvel (canaleta P). Devido ao resultado que mostrou que tanto a proteína de massa 46kDa como a de 65 kDa estão na fração insolúvel do extrato bacteriano, optamos por realizar um ensaio de purificação em coluna de Ni²⁺-NTA-agarose em condições desnaturantes (presença de uréia 8 M). Observamos na figura 6C que o polipeptídeo de 46 kDa não foi retido na coluna, indicando a ausência da cauda de histidina. Porém, notou-se que o polipeptídeo de 65 kDa foi purificado quando eluído com o tampão pH 4,5 (canaletas E – pH = 4,5 da figura 6C). Sugere-se então que a proteína recombinante não seja referente à banda de 45 kDa, mas sim a banda de 65kDa, o que pode ser explicado como uma migração anômala, possivelmente, devido à abundância de resíduos de asparagina nesta proteína, o que é uma característica presente em várias outras proteínas de *D.discoideum* (Michelitsch e Weissman, 2000; Eichinger *et al.*, 2005).

A indução teve um rendimento abaixo do desejado. Uma possível explicação para a dificuldade de expressão seria o alto conteúdo de asparaginas em série da proteína recombinante (Gamper *et al.*, 1996). Assim, os experimentos de indução e purificação foram repetidos seis vezes a partir de culturas de 500 mL para se obter uma quantidade satisfatória (~500 µg) de proteína recombinante purificada.

Figura 6: Indução e purificação da proteína recombinante DDB_G0269300. (A) A cultura de bactérias BL21(DE3) transformada com a construção pET36b vazio ou pET36b-DDB_G0269300 crescida a 37°C, por aproximadamente 16h, foi diluída 1:20 em meio fresco até DO_{600nm} atingir 0,3. Neste momento, foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 16 h a 20°C. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controles não induzidas (canaletas NI) e de culturas induzidas com IPTG (canaletas I) foram separados em SDS-PAGE 10%. (B) Um dos clones de bactéria transformada com pET36b-DDB_G0269300 que aparentemente induziu a proteína recombinante foi utilizado para se fazer uma indução em maior escala (50 mL) a 20°C por 16 h. Os extratos bacterianos protéicos da cultura controle não induzida (canaleta NI) e induzida com IPTG (canaleta I) foram separados e o restante da cultura foi centrifugado, suspenso em 1 mL de tampão de lise e sonificado. Os lisados bacterianos, o sobrenadante (canaleta S) e o precipitado (canaleta P) foram analisados em SDS-PAGE 10%. Os géis foram corados com azul de Coomassie. As setas grossa e fina em A e B indicam, respectivamente, polipeptídeos de ~ 65 kDa e ~45 kDa que foram induzidos na condição testada. (C) A purificação dos lisados obtidos a partir de 500 mL de cultura foi realizada em meio desnaturante em coluna de Ni^{+2} -NTA-agarose. A canaleta FT corresponde à parte não retida pela coluna (*flow-through*). As canaletas L correspondem as frações de lavagem da coluna. As canaletas E indicam as frações eluídas com tampão de pH 5,9 ou com tampão de pH 4,5. O peptídeo de 65 kDa foi retido pela coluna e está indicado pela seta.

Para confirmar a natureza do polipeptídeo de 65 kDa purificado, realizamos a detecção com anticorpo anti-His tag em *immunoblots* dos extratos bacterianos, como mostra a figura 7A e 7B.

Podemos observar que o polipeptídeo de 65 kDa purificado na coluna de Ni²⁺-NTA agarose é o polipeptídeo reconhecido pelo anticorpo anti-His e, portanto, ele foi utilizado nas imunizações em camundongos.

Figura 7. Extratos de culturas de bactérias transformadas com pET36b-DDB_G0269300 não induzidas (canaletas NI) ou induzidas (canaletas I) com 1mM IPTG e a proteína recombinante purificada em coluna de Ni²⁺-NTA agarose (canaletas PR) foram separadas em 10% SDS-PAGE. O gel foi corado com Comassie blue (A) ou usado para transferir as proteínas para uma membrana de nitrocelulose (B). A membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-His-HRP (1:500) por 1 h. A detecção do complexo antígeno-anticorpo foi realizada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase segundo as instruções do kit ECL Plus Western blotting detection system (GE Healthcare), com exposição a filme de Raios-X por 5 minutos.

4.6. Obtenção de anti-soro específico contra a proteína DDB_G0269300

A proteína rDDB_G0269300 expressa em maior quantidade, purificada e concentrada em Microcon Centrifugal Filter (Millipore) foi utilizada nas inoculações em camundongos para produção de anticorpos policlonais. Um camundongo não inoculado foi utilizado para obtenção do soro controle e em seguida 40 µg da proteína recombinante foram inoculados em cada um dos quatro camundongos BALB-C. As imunizações seguintes foram feitas com inoculações de 20 µg de proteína recombinante.

Além da proteína recombinante de ~65 kDa, o anti-soro obtido também reconhece inespecificamente outros polipeptídeos de menor massa molecular (Fig, 8A, canaleta I). Uma possibilidade é que estes polipeptídeos de menor massa sejam resultado da degradação da proteína recombinante pela bactéria ou durante a obtenção do lisado celular. Isto ocorre com os inibidores proteicos da PP1c, os quais são muito sensíveis à proteases. Alternativamente, o reconhecimento destes peptídeos pelo anti-soro pode ser explicado pela presença incomum da sequência de asparaginas na proteína recombinante, causando abortos na tradução com, consequente, formação de peptídeos menores. A partir do resultado da canaleta NI da figura 8A, o qual o soro não reconheceu nenhuma proteína do lisado de células não induzidas, podemos sugerir a especificidade do anti-soro ao reconhecer a proteína recombinante.

O anti-soro foi utilizado em experimentos de Western blotting contra lisados proteicos de *D. discoideum* obtidos a partir de células de diferentes fases de desenvolvimento (figura 8B). O anti-soro foi capaz de detectar especificamente um polipeptídeo de ~65kDa que possivelmente corresponde a DDB_G0269300 presente em extratos de *D. discoideum* após 12 e 16 horas de desenvolvimento. Estes dados correlacionam-se positivamente com os resultados de RT-qPCR que mostraram aumento dos níveis dos transcritos do gene DDB_G0269300 após 8h e 12h de desenvolvimento (Figura 2).

Figura 8. (A) Extratos de culturas de bactérias transformadas com pET36b-DDB_G0269300 não induzidas (NI) ou induzidas (I) com 1mM IPTG e a proteína recombinante purificada em coluna de Ni²⁺-NTA agarose (PR) foram separados em 10% SDS-PAGE. O gel foi usado para transferir as proteínas para uma membrana de nitrocelulose e esta foi incubada na diluição 1:250 com o soro anti-DDB_G0269300 obtido após a 4ª imunização dos camundongos. Os complexos antígeno-anticorpo foram detectados colorimetricamente pela reação com cloronaftol após incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. A seta indica a proteína recombinante (~65 kDa). (B) Extratos de *D. discoideum* obtidos nas fases vegetativa (V) e de desenvolvimento (4h, 12h e 16h) foram separados em dois géis 10% SDS-PAGE. As proteínas dos géis foram transferidas para membranas de nitroceluloses. A primeira foi incubada com o soro anti-DDB_G0269300 na diluição 1:250. Paralelamente, uma segunda membrana foi incubada com anti-actina na diluição 1:1000. A detecção do complexo antígeno-anticorpo foi realizada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase segundo as instruções do kit ECL Plus Western blotting detection system (GE Healthcare), com exposição a filme de Raios-X por 5 minutos.

5. Conclusões e Discussão final

Neste trabalho, nós confirmamos que o produto protéico de onze clones de cDNA, de um total de vinte e cinco previamente identificados em varreduras de bibliotecas do sistema duplo-híbrido em leveduras, interagem com a isca *DdPP1c* com base em novos ensaios de duplo-híbrido que realizamos. Os demais clones codificam proteínas que ou não interagem ou a promovem auto-ativação do gene repórter. Entre os onze clones cuja interação foi confirmada nestes ensaios, está o clone que codifica *Ddl-3*, um novo inibidor da *DdPP1c* (Gonzalez-Kristeller, 2007), e o clone que codifica a proteína *DDB_G0269300*, a qual selecionamos para estudos adicionais. Identificamos uma possível ortóloga desta proteína predita a partir do genoma de *Dictyostelium purpureum* e outras potenciais candidatas preditas em genomas de algumas plantas.

A sequência codificadora completa do gene *DDB_G0269300* foi clonada e o ensaio de duplo-híbrido foi refeito com as iscas *DdPP1c* e *DdPP4c*. Os resultados confirmaram a interação da presa com a isca *DdPP1c*, mas não houve interação com a isca *DdPP4c*, o que sugere uma especificidade de interação entre a presa *DDB_G0269300* e a isca *DdPP1c*.

A proteína recombinante *rDDB_G0269300* foi obtida com sucesso em bactérias e foi utilizada na preparação de anticorpos policlonais em camundongos. O anti-soro anti- *rDDB_G0269300* é aparentemente específico no reconhecimento desta proteína em extratos celulares de *D. discoideum* coletados em 12h e 16 da fase de desenvolvimento. Estes resultados coincidem com nossas observações de que os níveis dos transcritos de *DDB_G0269300* por RT-qPCR são aumentados entre 8h e 12h da fase de desenvolvimento de *D. discoideum*, sugerindo uma importância para a proteína *DDB_G0269300* durante a fase de desenvolvimento deste organismo.

Análises da sequência de *G0269300* com ferramentas computacionais publicamente disponíveis (Lei e Dai, 2005; Horton *et al.*, 2007) indicam que embora ela aparentemente não possua uma sequência de localização nuclear típica, a predição é de que esta seja uma proteína nuclear, potencialmente associada a lâmina nuclear.

Tanto a proteína recombinante *rDDB_G0269300* como o anti-soro obtido poderão ser utilizados em futuros ensaios para a caracterização funcional desta proteína que parece ser um novo parceiro molecular da *DdPP1c*.

6. Bibliografia

1. **Aggen, J. B., Nairn, A. C. e Chamberlin, R.** 2000. Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol* 7:R13-23.
2. **Ajuh, P. M., Browne, G. J., Hawkes, N. A., Cohen, P. T., Roberts, S. G. e Lamond, A. I.** 2000. Association of a protein phosphatase 1 activity with the human factor C1 (HCF) complex. *Nucleic Acids Res* 28:678-86.
3. **Akiyoshi, B., Nelson, C. R., Ranish, J. A. e Biggins, S.** 2009. Quantitative proteomic analysis of purified yeast kinetochores identifies a PP1 regulatory subunit. *Genes Dev* 23:2887-99.
4. **Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. e Mustelin, T.** 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117:699-711.
5. **Andreeva, A. V. e Kutuzov, M. A.** 2001. Nuclear localization of the plant protein Ser/Thr phosphatase PP7. *Mol Cell Biol Res Commun* 4:345-52.
6. **Andrioli, L. P., Zaini, P. A., Viviani, W. e Da Silva, A. M.** 2003. *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase-1 catalytic subunit exhibits distinct biochemical properties. *Biochem J* 373:703-11.
7. **Arino, J. e Alexander, D.** 2004. Protein Phosphatases. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
8. **Aubry, L. e Firtel, R.** 1999. Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:469-517.
9. **Aubry, L. e Firtel, R. A.** 1998. Spalten, a protein containing Galpha-protein-like and PP2C domains, is essential for cell-type differentiation in *Dictyostelium*. *Genes Dev* 12:1525-38.
10. **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. A. e Struhl, K.** 1995. Current Protocols in Molecular Biology.
11. **Bagu, J. R., Sykes, B. D., Craig, M. M. e Holmes, C. F.** 1997. A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1. Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A. *J Biol Chem* 272:5087-97.
12. **Bai, C. e Elledge, S. J.** 1997. Gene identification using the yeast two-hybrid system. *Methods Enzymol* 283:141-56.
13. **Barford, D.** 1996. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* 21:407-12.
14. **Barford, D. e Keller, J. C.** 1994. Co-crystallization of the catalytic subunit of the serine/threonine specific protein phosphatase 1 from human in complex with microcystin LR. *J Mol Biol* 235:763-6.
15. **Barker, H. M., Brewis, N. D., Street, A. J., Spurr, N. K. e Cohen, P. T.** 1994. Three genes for protein phosphatase 1 map to different human chromosomes: sequence, expression and gene localisation of protein serine/threonine phosphatase 1 beta (PPP1CB). *Biochim Biophys Acta* 1220:212-8.
16. **Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. e Fields, S.** 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14:920-4.
17. **Barton, G. J., Cohen, P. T. e 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* 220:225-37.

18. **Berndt, N.** 1999. Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number. *Front Biosci* 4:D22-42.
19. **Beullens, M. e Bollen, M.** 2002. The protein phosphatase-1 regulator NIPP1 is also a splicing factor involved in a late step of spliceosome assembly. *J Biol Chem* 277:19855-60.
20. **Beullens, M., Stalmans, W. e Bollen, M.** 1996. Characterization of a ribosomal inhibitory polypeptide of protein phosphatase-1 from rat liver. *Eur J Biochem* 239:183-9.
21. **Beullens, M., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Connor, J., Shenolikar, S., Stalmans, W. e Bollen, M.** 1999. Molecular determinants of nuclear protein phosphatase-1 regulation by NIPP-1. *J Biol Chem* 274:14053-61.
22. **Boeckeler, K., Tischendorf, G., Mutzel, R. e Weissenmayer, B.** 2006. Aberrant stalk development and breakdown of tip dominance in *Dictyostelium* cell lines with RNAi-silenced expression of calcineurin B. *BMC Dev Biol* 6:12.
23. **Bollen, M.** 2001. Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci* 26:426-31.
24. **Campos, M., Fadden, P., Alms, G., Qian, Z. e Haystead, T. A.** 1996. Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography. *J Biol Chem* 271:28478-84.
25. **Ceulemans, H. e Bollen, M.** 2004. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84:1-39.
26. **Ceulemans, H. e Bollen, M.** 2006. A tighter RVxF motif makes a finer Sift. *Chem Biol* 13:6-8.
27. **Ceulemans, H., Stalmans, W. e Bollen, M.** 2002. Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays* 24:371-81.
28. **Chen, Y. H., Hansen, L., Chen, M. X., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Cohen, P. T. e Pedersen, O.** 1994. Sequence of the human glycogen-associated regulatory subunit of type 1 protein phosphatase and analysis of its coding region and mRNA level in muscle from patients with NIDDM. *Diabetes* 43:1234-41.
29. **Chisholm, R. L. e Firtel, R. A.** 2004. Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:531-41.
30. **Chu, Y., Lee, E. Y. e Schlender, K. K.** 1996. Activation of protein phosphatase 1. Formation of a metalloenzyme. *J Biol Chem* 271:2574-7.
31. **Cohen, P.** 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58:453-508.
32. **Cohen, P. T.** 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* 22:245-51.
33. **Cohen, P. T.** 2002. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115:241-56.
34. **Connor, J. H., Frederick, D., Huang, H., Yang, J., Helps, N. R., Cohen, P. T., Nairn, A. C., DePaoli-Roach, A., Tatchell, K. e 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* 275:18670-5.
35. **Connor, J. H., Kleeman, T., Barik, S., Honkanen, R. E. 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* 274:22366-72.

36. **Dammann, H., Hellstern, S., Husain, Q. e Mutzel, R.** 1996. Primary structure, expression and developmental regulation of a Dictyostelium calcineurin A homologue. *Eur J Biochem* 238:391-9.
37. **Dombradi, V., Axton, J. M., Brewis, N. D., da Cruz e Silva, E. F., Alphey, L. e Cohen, P. T.** 1990. Drosophila contains three genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1. *Eur J Biochem* 194:739-45.
38. **Dormann, D. e Weijer, C. J.** 2006. Chemotactic cell movement during Dictyostelium development and gastrulation. *Curr Opin Genet Dev* 16:367-73.
39. **Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. e Elledge, S. J.** 1993. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7:555-69.
40. **Egloff, M. P., Cohen, P. T., Reinemer, P. e Barford, D.** 1995. Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol* 254:942-59.
41. **Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T., Cohen, P. e Barford, D.** 1997. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J* 16:1876-87.
42. **Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glockner, G., Rajandream, M. A., Sucgang, R. et al.** 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435:43-57.
43. **Endo, S., Zhou, X., Connor, J., Wang, B. e Shenolikar, S.** 1996. Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry* 35:5220-8.
44. **Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K. e Morita, F.** 1995. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem (Tokyo)* 118:1104-7.
45. **Faux, M. C. e Scott, J. D.** 1996. More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem Sci* 21:312-5.
46. **Fiorini, L. C.** 2003. Identificação de genes codificadores de serina/treonina fosfatases em *Dictyostelium discoideum* e caracterização funcional da proteína fosfatase do tipo 4 (PP4). Doutorado. Departamento de Bioquímica, USP, São Paulo. 112.
47. **Gamper, M., Howard, P. K., Hunter, T. e Firtel, R. A.** 1996. Multiple roles of the novel protein tyrosine phosphatase PTP3 during Dictyostelium growth and development. *Mol Cell Biol* 16:2431-44.
48. **Garcia-Gimeno, M. A., Munoz, I., Arino, J. e Sanz, P.** 2003. Molecular characterization of Ypi1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J Biol Chem* 278:47744-52.
49. **Gauss, C. M., Sheppeck, J. E., 2nd, Nairn, A. C. e Chamberlin, R.** 1997. A molecular modeling analysis of the binding interactions between the okadaic acid class of natural product inhibitors and the Ser-Thr phosphatases, PP1 and PP2A. *Bioorg Med Chem* 5:1751-73.
50. **Gibbons, J. A., Kozubowski, L., Tatchell, K. e Shenolikar, S.** 2007. Expression of human protein phosphatase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* highlights the role of phosphatase isoforms in regulating eukaryotic functions. *J Biol Chem* 282:21838-47.
51. **Gietz, R. D. e Woods, R. A.** 2002. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 185:471-86.

52. **Giusti, C., Tresse, E., Luciani, M. F. e Golstein, P.** 2009. Autophagic cell death: analysis in *Dictyostelium*. *Biochim Biophys Acta* 1793:1422-31.
53. **Goldberg, J., Huang, H. B., Kwon, Y. G., Greengard, P., Nairn, A. C. e Kuriyan, J.** 1995. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376:745-53.
54. **Goldberg, J. M., Manning, G., Liu, A., Fey, P., Pilcher, K. E., Xu, Y. e Smith, J. L.** 2006. The dictyostelium kinome--analysis of the protein kinases from a simple model organism. *PLoS Genet* 2:e38.
55. **Goldberg, Y.** 1999. Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem Pharmacol* 57:321-8.
56. **Golstein, P., Aubry, L. e Levraud, J. P.** 2003. Cell-death alternative model organisms: why and which? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:798-807.
57. **Gonzalez-Kristeller, D. C.** 2007. Identificação e caracterização de subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases de *Dictyostelium discoideum*. Doutorado. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, IQUSP.
58. **Gross, J. D.** 1994. Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiol Rev* 58:330-51.
59. **Grusche, F. A., Hidalgo, C., Fletcher, G., Sung, H. H., Sahai, E. e Thompson, B. J.** 2009. Sds22, a PP1 phosphatase regulatory subunit, regulates epithelial cell polarity and shape [Sds22 in epithelial morphology]. *BMC Dev Biol* 9:14.
60. **Hanks, S. K. e Hunter, T.** 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* 9:576-96.
61. **Hanks, S. K., Quinn, A. M. e Hunter, T.** 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241:42-52.
62. **Harlow, E. e Lane, D.** 1988. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
63. **Hellstern, S., Dammann, H., Husain, Q. e Mutzel, R.** 1997. Overexpression, purification and characterization of *Dictyostelium* calcineurin A. *Res Microbiol* 148:335-43.
64. **Helps, N. R., Barker, H. M., Elledge, S. J. e Cohen, P. T.** 1995. Protein phosphatase 1 interacts with p53BP2, a protein which binds to the tumour suppressor p53. *FEBS Lett* 377:295-300.
65. **Helps, N. R., Luo, X., Barker, H. M. e 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* 349:509-18.
66. **Hemmings, H. C., Jr., Nairn, A. C., Elliott, J. I. e 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* 265:20369-76.
67. **Hirano, K., Erdodi, F., Patton, J. G. e Hartshorne, D. J.** 1996. Interaction of protein phosphatase type 1 with a splicing factor. *FEBS Lett* 389:191-4.
68. **Hirano, K., Ito, M. e Hartshorne, D. J.** 1995. Interaction of the ribosomal protein, L5, with protein phosphatase type 1. *J Biol Chem* 270:19786-90.
69. **Horn, F. e Gross, J.** 1996. A role for calcineurin in *Dictyostelium discoideum* development. *Differentiation* 60:269-275.

70. **Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J. e Nakai, K.** 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35:W585-7.
71. **Huang, H. S., Pozarowski, P., Gao, Y., Darzynkiewicz, Z. e Lee, E. Y.** 2005. Protein phosphatase-1 inhibitor-3 is co-localized to the nucleoli and centrosomes with PP1gamma1 and PP1alpha, respectively. *Arch Biochem Biophys* 443:33-44.
72. **Hubbard, M. J. e Cohen, P.** 1993. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 18:172-7.
73. **Hunter, T.** 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-36.
74. **Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. e Fields, S.** 1993. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8:1693-6.
75. **Janssens, V. e Goris, J.** 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353:417-39.
76. **Kay, R. R.** 1997. Dictyostelium development: lower STATs. *Curr Biol* 7:R723-5.
77. **Kelsall, I. R., Munro, S., Hallyburton, I., Treadway, J. L. e Cohen, P. T.** 2007. The hepatic PP1 glycogen-targeting subunit interaction with phosphorylase a can be blocked by C-terminal tyrosine deletion or an indole drug. *FEBS Lett* 581:4749-53.
78. **Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D. W., Barsam, B., Veretnik, S. e Gribskov, M.** 2002. The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129:908-25.
79. **Kirchner, J., Gross, S., Bennett, D. e Alpey, L.** 2007. Essential, overlapping and redundant roles of the Drosophila protein phosphatase 1 alpha and 1 beta genes. *Genetics* 176:273-81.
80. **Kita, A., Matsunaga, S., Takai, A., Kataiwa, H., Wakimoto, T., Fusetani, N., Isobe, M. e Miki, K.** 2002. Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Structure (Camb)* 10:715-24.
81. **Kofler, M., Motzny, K., Beyermann, M. e Freund, C.** 2005. Novel interaction partners of the CD2BP2-GYF domain. *J Biol Chem* 280:33397-402.
82. **Kofler, M., Schuemann, M., Merz, C., Kosslick, D., Schlundt, A., Tannert, A., Schaefer, M., Luhrmann, R., Krause, E. e Freund, C.** 2009. Proline-rich sequence recognition: I. Marking GYF and WW domain assembly sites in early spliceosomal complexes. *Mol Cell Proteomics* 8:2461-73.
83. **Kofler, M. M. e Freund, C.** 2006. The GYF domain. *Febs J* 273:245-56.
84. **Koshibu, K., Graff, J., Beullens, M., Heitz, F. D., Berchtold, D., Russig, H., Farinelli, M., Bollen, M. e Mansuy, I. M.** 2009. Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *J Neurosci* 29:13079-89.
85. **Kreppel, L., Fey, P., Gaudet, P., Just, E., Kibbe, W. A., Chisholm, R. L. e Kimmel, A. R.** 2004. dictyBase: a new *Dictyostelium discoideum* genome database. *Nucleic Acids Res* 32:D332-3.
86. **Kuspa, A. e Loomis, W. F.** 2006. The Genome of *Dictyostelium discoideum*. *Methods Mol Biol* 346:15-30.
87. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.

88. **Laporte, C., Kosta, A., Klein, G., Aubry, L., Lam, D., Tresse, E., Luciani, M. F. e Golstein, P.** 2007. A necrotic cell death model in a protist. *Cell Death Differ* 14:266-74.
89. **Lei, Z. e Dai, Y.** 2005. An SVM-based system for predicting protein subnuclear localizations. *BMC Bioinformatics* 6:291.
90. **Lesage, B., Beullens, M., Pedelini, L., Garcia-Gimeno, M. A., Waelkens, E., Sanz, P. e Bollen, M.** 2007. A complex of catalytically inactive protein phosphatase-1 sandwiched between Sds22 and inhibitor-3. *Biochemistry* 46:8909-19.
91. **Li, B. e Fields, S.** 1993. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *Faseb J* 7:957-63.
92. **Lin, Q., Buckler, E. S. t., Muse, S. V. e Walker, J. C.** 1999. Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases. *Mol Phylogenet Evol* 12:57-66.
93. **Livak, K. J. e Schmittgen, T. D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8.
94. **Loomis, W. F.** 1996. Genetic networks that regulate development in *Dictyostelium* cells. *Microbiol Rev* 60:135-50.
95. **Loomis, W. F.** 1998. Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:684-94.
96. **Loomis, W. F.** 2006. The *Dictyostelium* genome. *Curr Issues Mol Biol* 8:63-73.
97. **Loomis, W. F. e Kuspa, A.** 2005. *Dictyostelium* Genomics. Horizon Bioscience, Norfolk.
98. **Mackintosh, C., Douglas, P. e Lillo, C.** 1995a. Identification of a Protein That Inhibits the Phosphorylated Form of Nitrate Reductase from Spinach (*Spinacia oleracea*) Leaves. *Plant Physiol* 107:451-457.
99. **MacKintosh, R. W., Dalby, K. N., Campbell, D. G., Cohen, P. T., Cohen, P. e MacKintosh, C.** 1995b. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett* 371:236-40.
100. **MacMillan, L. B., Bass, M. A., Cheng, N., Howard, E. F., Tamura, M., Strack, S., Wadzinski, B. E. e Colbran, R. J.** 1999. Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. *J Biol Chem* 274:35845-54.
101. **Maeda, M., Lu, S., Shaulsky, G., Miyazaki, Y., Kuwayama, H., Tanaka, Y., Kuspa, A. e Loomis, W. F.** 2004. Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA. *Science* 304:875-8.
102. **Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. e Sudarsanam, S.** 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-34.
103. **Maynes, J. T., Bateman, K. S., Cherney, M. M., Das, A. K., Luu, H. A., Holmes, C. F. e James, M. N.** 2001. Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 276:44078-82.
104. **Meiselbach, H., Sticht, H. e Enz, R.** 2006. Structural analysis of the protein phosphatase 1 docking motif: molecular description of binding specificities identifies interacting proteins. *Chem Biol* 13:49-59.

105. **Michelitsch, M. D. e Weissman, J. S.** 2000. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11910-5.
106. **Moorhead, G., MacKintosh, R. W., Morrice, N., Gallagher, T. e MacKintosh, C.** 1994. Purification of type 1 protein (serine/threonine) phosphatases by microcystin-Sepharose affinity chromatography. *FEBS Lett* 356:46-50.
107. **Moorhead, G. B., Trinkle-Mulcahy, L., Nimick, M., De Wever, V., Campbell, D. G., Gourlay, R., Lam, Y. W. e Lamond, A. I.** 2008. Displacement affinity chromatography of protein phosphatase one (PP1) complexes. *BMC Biochem* 9:28.
108. **Murphy, M. B. e Egelhoff, T. T.** 1999. Biochemical characterization of a *Dictyostelium* myosin II heavy-chain phosphatase that promotes filament assembly. *Eur J Biochem* 264:582-90.
109. **Murphy, M. B., Levi, S. K. e Egelhoff, T. T.** 1999. Molecular characterization and immunolocalization of *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase 2A. *FEBS Lett* 456:7-12.
110. **Nguyen, H. N., Raisley, B. e Hadwiger, J. A.** 2010. MAP kinases have different functions in *Dictyostelium* G protein-mediated signaling. *Cell Signal* 22:836-47.
111. **Nimmo, G. A. e Cohen, P.** 1978. The regulation of glycogen metabolism. Phosphorylation of inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle, and its interaction with protein phosphatases-III and -II. *Eur J Biochem* 87:353-65.
112. **Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. e 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.
113. **Parent, C. A.** 2004. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*. *Curr Opin Cell Biol* 16:4-13.
114. **Park, I. K. e DePaoli-Roach, A. A.** 1994. Domains of phosphatase inhibitor-2 involved in the control of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *J Biol Chem* 269:28919-28.
115. **Park, I. K., Roach, P., Bondor, J., Fox, S. P. e 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* 269:944-54.
116. **Pedelini, L., Marquina, M., Arino, J., Casamayor, A., Sanz, L., Bollen, M., Sanz, P. e Garcia-Gimeno, M. A.** 2007. YPI1 and SDS22 proteins regulate the nuclear localization and function of yeast type 1 phosphatase Glc7. *J Biol Chem* 282:3282-92.
117. **Pinsky, B. A., Kotwaliwale, C. V., Tatsutani, S. Y., Breed, C. A. e Biggins, S.** 2006. Glc7/protein phosphatase 1 regulatory subunits can oppose the Ipl1/aurora protein kinase by redistributing Glc7. *Mol Cell Biol* 26:2648-60.
118. **Rigden, D. J.** 2008. The histidine phosphatase superfamily: structure and function. *Biochem J* 409:333-48.
119. **Rubin, E., Tamrakar, S. e Ludlow, J. W.** 1998. Protein phosphatase type 1, the product of the retinoblastoma susceptibility gene, and cell cycle control. *Front Biosci* 3:D1209-19.
120. **Rudenko, A., Bennett, D. e Alphey, L.** 2003. Trithorax interacts with type 1 serine/threonine protein phosphatase in *Drosophila*. *EMBO Rep* 4:59-63.

121. **Rusnak, F.** 2000. Manganese-activated phosphatases. *Met Ions Biol Syst* 37:305-43.
122. **Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
123. **Shenolikar, S.** 1994. Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol* 10:55-86.
124. **Shimizu, H., Ito, M., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., Naka, M., Tanaka, T., Hirano, K., Hartshorne, D. J. e et al.** 1994. Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 269:30407-11.
125. **Shirato, H., Shima, H., Sakashita, G., Nakano, T., Ito, M., Lee, E. Y. e Kikuchi, K.** 2000. Identification and characterization of a novel protein inhibitor of type 1 protein phosphatase. *Biochemistry* 39:13848-55.
126. **Simon, M. N., Winckler, T., Mutzel, R., Veron, M. e da Costa Maia, J. C.** 1992. Serine/threonine protein phosphatases in *Dictyostelium discoideum*: no evidence for type I activity. *Biochem Biophys Res Commun* 184:1142-51.
127. **Singleton, C. K., Zinda, M. J., Mykytka, B. e Yang, P.** 1998. The histidine kinase dhkC regulates the choice between migrating slugs and terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* 203:345-57.
128. **Skinner, J. A. e Saltiel, A. R.** 2001. Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targetting subunit of protein phosphatase 1. *Biochem J* 356:257-67.
129. **Smith, R. D. e Walker, J. C.** 1993. Expression of multiple type 1 phosphoprotein phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 21:307-16.
130. **Soderbom, F. e Loomis, W. F.** 1998. Cell-cell signaling during *Dictyostelium* development. *Trends Microbiol* 6:402-6.
131. **Sousa-Canavez, J. M., Beton, D., Gonzalez-Kristeller, D. C. e da Silva, A. M.** 2007. Identification and domain mapping of *Dictyostelium discoideum* type-1 protein phosphatase inhibitor-2. *Biochimie* 89:692-701.
132. **Souza, G. M., Lu, S. e Kuspa, A.** 1998. YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. *Development* 125:2291-302.
133. **Spudich, J. A. (ed.).** 1987. *Dictyostelium discoideum*: Molecular Approaches to Cell Biology, vol. 28. Academic Press, Inc, Orlando.
134. **Stark, M. J.** 1996. Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast* 12:1647-75.
135. **Steinert, M. e Heuner, K.** 2005. Dictyostelium as host model for pathogenesis. *Cell Microbiol* 7:307-14.
136. **Sussman, M.** 1987. Cultivation and synchronous morphogenesis of Dictyostelium under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol* 28:9-29.
137. **Szoor, B., Dombradi, V., Gergely, P. e Feher, Z.** 1997. Purification and characterization of the catalytic subunit of protein phosphatase 1 from *Neurospora crassa*. *Acta Biol Hung* 48:289-302.
138. **Tan, J. L. e Spudich, J. A.** 1990. Developmentally regulated protein-tyrosine kinase genes in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol* 10:3578-83.
139. **Tanuma, N., Kim, S. E., Beullens, M., Tsubaki, Y., Mitsushashi, S., Nomura, M., Kawamura, T., Isono, K., Koseki, H., Sato, M., Bollen, M., Kikuchi, K. e Shima, H.** 2008. Nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP1) directs

- protein phosphatase-1 (PP1) to dephosphorylate the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) component, spliceosome-associated protein 155 (Sap155). *J Biol Chem* 283:35805-14.
140. **Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T. e Dominguez, R.** 2004. Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* 429:780-4.
141. **Tonks, N. K.** 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:833-46.
142. **Tu, J., Song, W. e Carlson, M.** 1996. Protein phosphatase type 1 interacts with proteins required for meiosis and other cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16:4199-206.
143. **Van Eynde, A., Wera, S., Beullens, M., Torrekens, S., Van Leuven, F., Stalmans, W. e 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* 270:28068-74.
144. **Vereshchagina, N., Bennett, D., Szoor, B., Kirchner, J., Gross, S., Vissi, E., White-Cooper, H. e Alphey, L.** 2004. The essential role of PP1beta in *Drosophila* is to regulate nonmuscle myosin. *Mol Biol Cell* 15:4395-405.
145. **Villafranca, J. E., Kissinger, C. R. e Parge, H. E.** 1996. Protein serine/threonine phosphatases. *Curr Opin Biotechnol* 7:397-402.
146. **Virshup, D. M. e Shenolikar, S.** 2009. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33:537-45.
147. **Wakula, P., Beullens, M., Ceulemans, H., Stalmans, W. e Bollen, M.** 2003. Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 278:18817-23.
148. **Walsh, C. T.** 2006. Posttranslational modification of proteins:expanding nature's inventory. Roberts and Company Publishers, Greenwood Village, Colorado.
149. **Weiser, D. C., Sikes, S., Li, S. e Shenolikar, S.** 2004. The inhibitor-1 C terminus facilitates hormonal regulation of cellular protein phosphatase-1: functional implications for inhibitor-1 isoforms. *J Biol Chem* 279:48904-14.
150. **Wera, S. e Hemmings, B. A.** 1995. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* 311 (Pt 1):17-29.
151. **Westermarck, J. e Hahn, W. C.** 2008. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med* 14:152-60.
152. **Williams, H. P. e Harwood, A. J.** 2003. Cell polarity and Dictyostelium development. *Curr Opin Microbiol* 6:621-7.
153. **Williams, J. G.** 2010. *Dictyostelium* finds new roles to model. *Genetics* 185:717-26.
154. **Wolanin, P. M., Thomason, P. A. e Stock, J. B.** 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* 3:3013.1.
155. **Woods, R. A. e Gietz, R. D.** 2001. High-efficiency transformation of plasmid DNA into yeast. *Methods Mol Biol* 177:85-97.
156. **Xie, X., Xue, C., Huang, W. e Wei, Q.** 2006. The beta12-beta13 loop of protein phosphatase-1 is involved in activity regulation. *IUBMB Life* 58:487-92.
157. **Yang, J., Hurley, T. D. e 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* 275:22635-44.

158. **Ye, Q. e Worman, H. J.** 1995. Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp Cell Res* 219:292-8.
159. **Zapella, P. D.** 2001. Caracterização de algumas componentes envolvidos na desfosforilação de proteínas fosforiladas em resíduos de serina e treonina em *Neurospora crassa*. Doutorado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 176.
160. **Zhang, J., Zhang, L., Zhao, S. e Lee, E. Y.** 1998. Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. *Biochemistry* 37:16728-34.
161. **Zhang, L., Zhang, Z., Long, F. e Lee, E. Y.** 1996. Tyrosine-272 is involved in the inhibition of protein phosphatase-1 by multiple toxins. *Biochemistry* 35:1606-11.
162. **Zhang, Z., Bai, G. e Lee, E. Y.** 1992. PCR cloning of the cDNA of rabbit skeletal muscle protein phosphatase inhibitor-2. *Biochem Biophys Res Commun* 186:1168-70.
163. **Zhao, S. e Lee, E. Y.** 1997. Targeting of the catalytic subunit of protein phosphatase-1 to the glycolytic enzyme phosphofructokinase. *Biochemistry* 36:8318-24.
164. **Zinda, M. J. e Singleton, C. K.** 1998. The hybrid histidine kinase dhkB regulates spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* 196:171-83.

7. Apêndice

Figura Suplementar. Ensaio de validação das interações da isca DdPP1c com as presas indicadas. A cepa AH109 foi transformada com o vetor pGBKT7_vazio e também com o vetor pGBKT7_PP1c, sendo estes transformados sequencialmente com as construções indicadas, previamente selecionadas das varreduras da biblioteca de duplo-híbrido e indicadas em A, B, C, D, E, e F (páginas seguintes). O controle positivo (p53-AntígenoT) e controle negativo (Lam-AntígenoT) da interação foram incluídos em cada ensaio. Os transformantes contendo os dois plasmídeos selecionados em meio SD sem Trp/Leu foram semeados em meio SD sem Trp/Leu/His para avaliação do crescimento. Os resultados dos ensaios para cada presa estão resumidos na Tabela 1.

Figura Suplementar. Ensaio de validação das interações da isca DdPP1c com as presas indicadas.

A)

- 1- pGBKT7_PP1
- 2- pGBKT7_vazio
- 3- pGBKT7_PP1 / pGADT7_x
- 4- pGBKT7_vazio / pGADT7_x
- 5- pGBKT7_pLAM/ pACT2_antigT
- 6- pGBKT7_p53/ pACT2_antigT

SD-TRP-LEU

SD-TRP-LEU-HIS

pGADT7_kinX

pGADT7_DDB_G0270902

pGADT7_DDB_G0285313

pGADT7_DDB_G0269460

pGADT7_mlh3

Figura Suplementar. Ensaio de validação das interações da isca DdPP1c com as presas indicadas.

B)

- 1- pGBKT7_PP1
- 2- pGBKT7_vazio
- 3- pGBKT7_PP1 / pGADT7_x
- 4- pGBKT7_vazio / pGADT7_x
- 5- pGBKT7_pLAM/ pACT2_antigT
- 6- pGBKT7_p53/ pACT2_antigT

SD-TRP-LEU

SD-TRP-LEU-HIS

pGADT7_DDB_G0290381

pGADT7_rplP0

pGADT7_chcA

pGADT7_DDB_G0269300

Figura Suplementar. Ensaio de validação das interações da isca DdPP1c com as presas indicadas.

C)

- 1- pGBKT7_PP1
- 2- pGBKT7_vazio
- 3- pGBKT7_PP1 / pGADT7_x
- 4- pGBKT7_vazio / pGADT7_x
- 5- pGBKT7_p53/ pACT2_antigT
- 6- pGBKT7_pLAM/ pACT2_antigT

SD-TRP-LEU

SD-TRP-LEU-HIS

pGADT7_rps6

pGADT7_rpl7a

pGADT7_rpl9

pGADT7_DDB_G0274339

pGADT7_ctsD

Figura Suplementar. Ensaio de validação das interações da isca DdPP1c com as presas indicadas.

D)

- 1- pGBKT7_PP1
- 2- pGBKT7_vazio
- 3- pGBKT7_vazio / pGADT7_x
- 4- pGBKT7_PP1 / pGADT7_x
- 5- pGBKT7_pLAM/ pACT2_antigT
- 6- pGBKT7_p53/ pACT2_antigT

SD-TRP-LEU

SD-TRP-LEU-HIS

pGADT7_DDB_G0292194

pGADT7_med26

Figura Suplementar. Ensaio de validação das interações da isca DdPP1c com as presas indicadas.

E)

- 1- pGBKT7_vazio / pGADT7_x
- 2- pGBKT7_PP1c / pGADT7_x
- 3- pGBKT7_p53/ pACT2_antigT
- 4- pGBKT7_pLAM/ pACT2_antigT

SD-TRP-LEU

SD-TRP-LEU-HIS

pGADT7_kif4

pGAT7_DDB_G0269460

pGAT7_DDB_G0293544

Figura Suplementar. Ensaios de validação das interações da isca DdPP1c com as presas indicadas.

F)

- 1- pGBKT7_PP1c / pGADT7_x
- 2- pGBKT7_vazio / pGADT7_x
- 3- pGBKT7_p53/ pACT2_antigT
- 4- pGBKT7_pLAM/ pACT2_antigT

Súmula Curricular

Súmula Curricular

Renato Astolfi Raposo

Nascimento: 23/10/1984 – São Caetano do Sul / SP - Brasil

Formação Acadêmica

- 2003 - 2007** Graduação em Química
Licenciatura
Bacharelado com atribuições tecnológicas e biotecnológicas
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2007 -2010** Curso de Mestrado, Programa de Ciências Biológicas (Bioquímica).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
-

Formação complementar

- 2005-2007** Iniciação Científica
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva
Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)
- CNPq
- 2009** Prática de Ensino de Química e Bioquímica
Monitor da disciplina de Bioquímica do curso de graduação em Biologia
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2009** Escritor de capítulos de livro didático de Química para Ensino Médio.
Editora SM.
-

Prêmios

- 2007** Prêmio Lavoisier como melhor aluno do curso de Bacharelado do curso de Química da USP.
-

Comunicações em Congressos

- Raposo, R. A., Fogaça, A. C. & da Silva, A. M. 2006. Caracterização molecular de componentes responsáveis pela patogenicidade de *Xylella fastidiosa* em citros. 14º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo.
- Raposo, R. A., Gonzalez-Kristeller, D. C. & da Silva, A. M. 2007. Caracterização de proteínas que interagem com a subunidade catalítica da serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1c) de *Dictyostelium discoideum*. 15º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo.

Súmula Curricular

- Raposo, R. A., Gonzalez-Kristeller, D. C. & da Silva, A. M. 2008. Caracterização de proteínas que interagem com a subunidade catalítica da serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1c) de *Dictyostelium discoideum*. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Águas de Lindóia, São Paulo.
- Raposo, R. A. & da Silva, A. M. 2009. Caracterização de proteínas que interagem com a subunidade catalítica da serina/treonina fosfatase do tipo 1 (PP1c) de *Dictyostelium discoideum*. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Águas de Lindóia, São Paulo.

Outras Informações

- Ministrante no III Curso de Inverno (2008) do Departamento de Bioquímica do IQ-USP 2008.