UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

DANIELA CARVALHO GONZALEZ KRISTELLER

Identificação e caracterização de subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases de *Dictyostelim discoideum*

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

15/05/2007

DANIELA CARVALHO GONZALEZ KRISTELLER

Identificação e caracterização de subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases de *Dictyostelim discoideum*

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

Orientadora: Prof[a.] Dr[a.] Aline Maria da Silva

São Paulo
2007

"Identificação e caracterização de subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases de *Dictyostelim discoideum*"

DANIELA CARVALHO GONZALEZ KRISTELLER

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

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. ALINE MARIA **DA SILVA**
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. BETTINA MALNIC
IQ – USP

Profa. Dra. REGINA LÚCIA BALDINI
IQ – USP

Prof. Dr. FRANCISCO GORGÔNIO DA NÓBREGA
UNIVAP

Profa. Dra. MONICA MONTERO LOMELI
UFRJ

SÃO PAULO
27 DE JUNHO 2007

Dedico...

.... A meus queridos pais Nelson e Lina Maria e meus irmãos Maximiliano e Alexandre, pelo amor, apoio e alegria e por me ensinarem a ter sempre paciência não só nesta etapa, mas durante toda a minha vida.

... Ao meu marido Claudio que me acompanhou durante todo esse período com muita paciência, amor, amizade, carinho e total dedicação.

.

Agradeço...

...à Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Aline Maria da Silva, pelos ensinamentos, conselhos, paciência, amizade e competente orientação que tornaram possível a execução deste trabalho.

...ao Dr. Adam Kuspa por me receber em seu laboratório para realização de experimentos relativos a este trabalho.

...aos Drs. Richard Sucgang e Chris Dinh pela amizade, conselhos e auxilio técnico durante meu estágio de doutoramento.

...às Prof$^{as.}$ Dr$^{as.}$ Glaucia Mendes Souza e Suely Lopes Gomes e ao Prof. Dr. Sérgio Verjovski de Almeida pela cessão de equipamentos de seus respectivos laboratórios.

...a Juliana M. de Sousa Canavez, Daniela Beton, Ana Carolina Q. Simões, Layla F. Martins, Leonardo C. Fiorini, Renato A. Raposo e Isabel I. Ramos pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

...ao Alexandre Sanchez pela amizade, paciência, conselhos, apoio técnico e principalmente pelo seu enorme coração.

...às amigas Andréa C. Fogaça, Daniela Beton, Elisângela M. A. Ferreira, Juliana M. de Sousa Canavez, Layla F. Martins, Michelle Susin, Patrícia Pessoa da Silva e Raquel Bagattini pela ajuda, carinho e alegrias compartilhadas neste período.

...aos colegas do laboratório Fernanda Lupo, Isabel I. Ramos, Leandro M. Moreira, Paulo A. Zaini, Paulo de Paiva R. Amaral e Renato A. Raposo pelo apoio e convivência.

...aos colegas e amigos que fiz no Baylor College of Medicine e em Houston: Charlotte Cherry, Mishra e família, Rafael, Ricardo, Kai, Patrick, Chi e Olga.

...à Yvone não só pelo apoio técnico mas, principalmente pelos conselhos, carinho e imensa alegria.

...aos amigos Alessandra, Luciana, Érica, Sara, Milton, Humberto, Alessandro, Flavia, Luis, Flavia Terzini, Alessandra e Carol pelas risadas e momentos de descontração.

...aos demais companheiros e amigos do Instituto: Renato, Ricardo, Helder, Rodrigo, Camila, Ana Claudia, Julio, Giuliana, Luci, Karina, Rafaela, Regina, Cristina, Tie, Silvia, Sandra, Eduardo, Jefferson, Max, Luiza, Taís e Erica.

...à minha família e também à minha “nova família”, em especial a Dona Hannelore, Sylvia e Mario.

....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

Gonzalez-Kristeller, D.C. **Identificação e caracterização de subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases de *Dictyostelim discoideum*.** 2007. 149 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As proteínas fosfatases são enzimas responsáveis pela desfosforilação de resíduos de fosfoaminoácidos, principalmente fosfotirosina e fosfoserina/treonina, o que divide esta classe de proteínas nas famílias PTP (proteína tirosina fosfatase) e PP (proteína serina/treonina fosfatase). Diversos membros da família das PPs, em particular da subfamília PPP (*Phosphoprotein Phosphatase*), existem como holoenzimas compostas de uma subunidade catalítica associada a uma ou mais subunidades reguladoras, que lhes conferem diversidade funcional. Neste trabalho tivemos como objetivo identificar, utilizando ensaios no sistema de duplo híbrido em leveduras, proteínas que interagem com as subunidades catalíticas das serina/treonina fosfatases do tipo 1 (DdPP1c) e do tipo 4 (DdPP4c) da ameba social *D. discoideum*. Varreduras de bibliotecas de cDNA das fases de crescimento e desenvolvimento da linhagem AX4 de *D. discoideum* com as iscas DdPP1c e uma variante mutante da DdPP1c (DdPP1cF269C) possibilitaram a identificação de pelo menos 30 genes com evidência de interação com a PP1c. A varredura das bibliotecas com a isca DdPP4 propiciou a identificação de 10 potenciais genes candidatos com evidência de interação com a PP4c. Várias dos candidatos identificados nas varreduras correspondem a genes que codificam para proteínas hipotéticas que não apresentam similaridade significativa com proteínas de função conhecida. Entre essas, identificamos e caracterizamos DdI-3, um ortólogo do inibidor-3 da PP1c de mamíferos. A interação de DdI-3 com DdPP1c foi confirmada através de ensaios independentes no sistema do duplo híbrido em leveduras. Demonstramos que DdI-3 recombinante expresso em bactérias possui atividade inibidora da DdPP1c *in vitro,* sendo que esta enzima tem 50% de sua atividade de fosforilase fosfatase inibida por cerca de 0,55 nM de rDdI-3. Estes dados indicam que DdI-3 é 50 vezes mais potente do que DdI-2, um ortólogo do inibidor-2 previamente caracterizado em *D. discoideum*. Neste trabalho, também iniciamos a construção do catálogo (*The Dictyostelium Phosphatome*) que irá conter todas as subunidades catalíticas e reguladoras das proteínas fosfatases codificadas no genoma de *D. discoideum*. Até o momento, 101 genes foram catalogados e classificados nas diferentes famílias das proteínas fosfatases, sendo 16 na família das PTPs, 26 na família das DSPs (proteína fosfatase de dupla especificidade), 15 na família das PPMs (*Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent*) e 31 na família das PPPs, incluindo genes codificadores de subunidades catalíticas e reguladoras.

Palavras chave: proteína fosfatase, inibidor, *Dictyostelim discoideum*, interação protéica

ABSTRACT

Gonzalez-Kristeller, D.C. **Identification and characterization of catalytic and regulatory subunits of *Dictyostelim discoideum* protein phosphatases.** 2007. 149 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Protein phosphatases are responsible for dephosphorylating phosphoaminoacids residues, notably phosphotyrosine and phosphoserine/threonine, thus dividing these enzymes into PTP (protein tyrosine phosphatase) and PP (protein serine/threonine phosphatase) families. Several members of the PP family, in particular those belonging to PPP (*Phosphoprotein Phosphatase*) are composed of one catalytic subunit and one or more regulatory subunits that provide functional diversity to the holoenzyme. In this work our goal was to identify protein interactors to type 1 (DdPP1c) and type 4 (DdPP4c) phosphatase that might behave as potential regulatory subunits of these enzymes in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. For this intent, DdPP1c, a mutant isoform of DdPP1 (DdPP1cF269C) and DdPP4c were used as baits in yeast two-hybrid based screening of *D. discoideum* (AX-4 strain) cDNA libraries from growth as well as developmental stages. At least 30 genes were identified as potential DdPP1c interactors while 10 genes were selected as candidates to interact to DdPP4c. Most of them are currently annotated in *D. discoideum* genome as hypothetical proteins of unknown function. Among the potential PP1c interactors we selected DdI-3, an ortholog of mammalian inhibitor-3. Interaction of DdI-3 and DdPP1c was confirmed by independent yeast two-hybrid assays. We demonstrated that bacterial expressed recombinant DdI-3 is effective as an inhibitor of DdPP1c *in vitro,* since 50% of DdPP1c phosphorylase phosphatase activity is inhibited by circa 0,55 nM of purified rDdI-3. Our results also showed that DdI-3 is 50 times more effective than DdI-2, a previously characterized PP1c inhibitor in *D. discoideum*. In this work we began to organize *The Dictyostelium Phosphatome*, a catalog of all protein phosphatases, including their catalytic and regulatory subunits, encoded in *D. discoideum* genome. Until now, we have classified 101 genes into the protein phosphatase families, of which 16 were classified as classic PTP, 26 as DSP (dual-specificity phosphatases), 15 as PPM (*Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent*) and 31 as PPP, including genes for catalytic as well as regulatory subunits.

Keywords: protein phosphatase, inihibitor, *Dictyostelim discoideum*, protein interaction

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKAP: *A-kinase-anchoring protein*

3-AT: 3-aminotriazol

BSA: albumina de soro bovino

cAMP: 3',5' monofosfato cíclico de adenosina

Cdc25: *cell division cycle-25*

CD45: *cluster of differentiation-45*

CDK: *cyclin-dependent kinase*

cDNA: DNA complementar

CDS: *coding sequence*

CRHSP24: *calcium-regulated heat-stable protein of apparent molecular mass 24k*

CKII: caseína quinase II

CPI-17: *C-kinase dependent Phosphatase Inhibitor of 17KDa*

cpm: contagem por minuto

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

Dd: *Dictyostelim discoideum*

DdI-2: inibidor-2 da PP1 de *Dictyostelim discoideum*

DdI-3: inibidor-3 da PP1 de *Dictyostelim discoideum*

DEPC: dietilpirocarbonato

DNAse: desoxirribonuclease

dNTP: desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato

DO: densidade óptica

DSP: proteína fosfatase de dupla especificidade

DTT: ditiotreitol

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

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

EST: expressed sequence tag

FCP: *Fyn carboxyl-terminal peptide*

GADD34: *Growth-Arrest and DNA-Damage-inducible protein 34*

HEAT: *Huntingtin-Elongation A subunit-TOR*

ILKAP: *Integrin-Linked Kinase-Associated PP2C*

IPTG: isopropil-β-D-galactopiranosídeo

I-1, I-2 e I-3: inibidores do tipo 1, 2 e 3 da PP1

KO: *Knock Out*

LiAc: acetato de lítio

LMW: *low-molecular-weight* (subfamília das PTPs)

MAPK: *mitogen activated protein kinase*

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico

MYPT: *myosin phosphatase targetting subunit*

NIPP-1: *nuclear inhibitor of PP1*

Non-TM: PTP não trasmembrânica

ORF: *Open Read Frame*

pb: pares de base

PCPTP1: *PC12 protein Tyr phosphatase*

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDGFr: *platelet-derived factor receptor*

PEG: polietileno glicol

PK: proteína quinase

PKA: proteina quinase dependente de cAMP

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila

PNUTS: *Phosphatase Nuclear Targeting Subunit*

PP: proteína serina/ treonina fosfatase

PP1c, PP2Ac, PP2Bc...: subunidades catalíticas das respectivas PPs

PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 e PP7: PPs dos tipos 1, 2A, 2B, 4, 5, 6 e 7

PP2C: PP do tipo 2C

PPEF: *Protein phosphatase with EF calcium-binding domain*

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

PPO: 2,5-difeniloxasol

PPP: *Phosphoprotein Phosphatase* (subfamília das PPs)

PTEN: *Phosphatase and TENsin homolog*

PTK: proteína tirosina quinase

PTP: proteína tirosina fosfatase

qPCR: PCR quantitativo

rDdI-3: DdI-3 recombinante

RIPP-1: *Ribossomal Inhibitor of PP1*

RNAi: RNA de interferência

RNAse: Ribonuclease A

rpm: rotações por minuto

RPTP: PTP do tipo receptor

RT: transcrição reversa

RT-PCR: PCR precedido por RT

RT-qPCR: qPCR precedido por RT

SNF5: *Sucrose Non-Fermenting 5*

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TCA: ácido tricloro-acético

TC-PTP: *T-cell PTP*

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

Tm: temperatura de fusão

TPR: repetições de tetratricopeptídeo

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

U: unidade de atividade enzimática

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

SUMÁRIO

1. Introdução ***14***

1.1. Tirosina fosfatases **16**

1.2. Serina/ treonina fosfatases **19**

1.2.1. PPM 22

1.2.2. PPP 23

Serina/treonina fosfatase do tipo 1 23

Serina/treonina fosfatase do tipo 2A 28

Serina/treonina fosfatase do tipo 4 29

Serina/treonina fosfatase do tipo 6 32

Serina/treonina fosfatase do tipo 2B (calcineurina) 33

Serina/treonina fosfatase do tipo 5 35

Outras serina/treonina fosfatases 37

1.3. Aspectos da biologia de *Dictyostelim discoideum* **38**

1.3.1. Fosforilação reversível de proteínas em *D. discoideum* 42

2. Objetivos ***46***

3. Procedimentos Experimentais ***47***

3.1. Procedimentos experimentais utilizando *Dictyostelim discoideum* **47**

3.1.1. Manutenção e cultivo das células 47

3.1.2. Preparação de RNA total de *D. discoideum* 48

3.1.3. Preparação de DNA genômico de *D. discoideum* 49

3.1.4. Transfecção de DNA em *D. discoideum* por eletroporação 49

3.2. Procedimentos experimentais utilizando *Escherichia coli* **50**

3.2.1. Manutenção e cultivo das bactérias 50

3.2.2. Preparo de bactérias competentes para transformação 51

3.2.3. Transformação de bactérias por eletroporação 51

3.2.4. Preparação de plasmídeos em pequena escala 51

3.2.5. Preparação de plasmídeos em grande escala 52

3.3. Procedimentos experimentais utilizando *Saccharomyces cerevisiae* **53**

3.3.1. Manutenção e cultivo das células 53

3.3.2. Transformação de leveduras em pequena escala 54

3.3.3. Varredura da biblioteca de cDNA no sistema de duplo híbrido 54

3.3.4. Extração de plasmídeos de leveduras 55

3.3.5. Preparação de extratos protéicos de leveduras 56
3.3.6. Teste de β-galactosidase 57

3.4. Manipulação e análise de ácidos nucléicos 57
3.4.1. Digestão de DNA com enzimas de restrição 57
3.4.2. Eletroforese de DNA em gel de agarose 57
3.4.3. Eluição de fragmentos de DNA em papel 58
3.4.4. Transferência de DNA para membranas de náilon (*Southern blot*) 58
3.4.5. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído 59
3.4.6. Transferência de RNA para membranas de náilon (*Northern blot*) 59
3.4.7. Preparação de sonda radioativa 59
3.4.8. Hibridização de DNA e RNA com sonda radioativa 60
3.4.9. Descrição dos oligonucleotídeos 60
3.4.10. Reação de polimerase em cadeia (PCR) 61
3.4.11. Seqüenciamento automatizado de DNA 62
3.4.12. PCR quantitativo precedido de transcrição reversa (RT-qPCR) 62
3.4.13. Construções Plasmidiais 63

3.5. Manipulação e análise de proteínas 70
3.5.1. Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) 70
3.5.2. Dosagem de proteínas 70
3.5.3. Detecção imunológica de proteínas 70
3.5.4. Obtenção e purificação de DdI-3 recombinante 71
Avaliação da solubilidade de DdI-3 recombinante 72
Purificação da proteína DdI-3 recombinante a partir da fração solúvel 72
3.5.5. Expressão de DdPP1c recombinante em bactéria 73
3.5.6. Ensaios para medida de atividade da PP1c 73
Marcação de fosforilase *a* 73
Ensaio da atividade da PP1c na presença de rDdI-3 74

3.6. Análise e comparação de seqüências de DNA e proteínas 75

4. Resultados e Discussão 77

4.1. Identificação de subunidades moduladoras e/ou reguladoras das proteínas serina/treonina fosfatases de *Dictyostelim discoideum* 77
4.1.1. Obtenção das iscas para varredura das bibliotecas de cDNA do sistema de duplo híbrido 78

4.1.2. Varredura das bibliotecas de duplo híbrido com as iscas DdPP1c e DdPP1F269C 84
4.1.3. Varredura das bibliotecas de duplo híbrido com a isca DdPP4c. 95
4.1.4. Caracterização de DdI-3, um ortólogo do inibidor-3 da PP1c em *D. discoideum* 97

4.2. Catálogo das proteínas fosfatases de *Dictyostelim discoideum* 109
4.2.1.Tirosina fosfatases (PTP) 115
4.2.2. Serina treonina fosfatases da família PPM 115
4.2.3. Fosfatases FCP 116
4.2.4. Serina treonina fosfatases da família PPP 116

5. Conclusão e perspectivas 128

6. Referência 130

Anexos

Súmula Curricular

1. Introdução

Variações no estado de fosforilação de proteínas são decorrentes do balanço da atividade de duas diferentes classes de enzimas: as proteínas quinases e as proteínas fosfatases. As proteínas quinases são responsáveis pela fosforilação, e as fosfatases, pela desfosforilação; estes processos ocorrem predominantemente em resíduos de serina, treonina e tirosina. Além destes, outros resíduos também podem ser fosforilados, como os de histidina, aspartato, lisina e arginina, ainda que em menor freqüência (Shenolikar, 1994; Hunter, 1995; Matthews, 1995; Denu *et al.*, 1996; Cohen, 1997; Ramponi & Stefani, 1997b; Mizuno, 1998; Klumpp & Krieglstein, 2002; Klumpp & Krieglstein, 2005; Pawson & Scott, 2005; Busam *et al.*, 2006).

O primeiro relato descrevendo uma atividade de proteína quinase foi feito por Burnett e Kennedy (Burnett & Kennedy, 1954), que identificaram a presença de uma enzima na mitocôndria do fígado de rato capaz de catalisar a fosforilação da caseína, mas não de outras sete proteínas testadas. Nos anos seguintes, os trabalhos publicados descrevendo a fosforilação e desfosforilação da enzima glicogênio fosforilase definiram a importância da fosforilação reversível no controle da atividade de proteínas (Fischer & Krebs, 1955; Sutherland & Wosilait, 1956; Fischer *et al.*, 1959). Entretanto, até o final da década de 1960 o pensamento dominante era de que este mecanismo de controle fosse restrito a regulação da via metabólica de degradação e síntese de glicogênio. Trabalhos posteriores contribuíram de forma decisiva para a mudança deste conceito, incluindo os que demonstraram a inativação do complexo piruvato desidrogenase mitocondrial através da fosforilação e os que descreveram funções para proteína quinase dependente de cAMP (PKA) (Langan, 1969; Linn *et al.*, 1969; Corbin *et al.*, 1970; Ljungstrom *et al.*, 1974; England, 1975; Tada *et al.*, 1975). Atualmente, postula-se que pelo menos um terço das proteínas eucarióticas seja substrato para as diversas quinases e fosfatases existentes (Ceulemans *et al.*, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004).

As proteínas quinases são geralmente agrupadas com base no aminoácido ao qual o grupamento fosfato é ligado covalentemente. Um grupo compreende as proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de resíduos de serina e treonina (PKs), enquanto em outro estão agrupadas as enzimas que fosforilam resíduos de tirosina (PTKs). Um aspecto interessante é que, apesar das proteínas quinases pertencentes a estes dois grupos estarem sujeitas a modos distintos de regulação e atuarem em substratos específicos, todas elas possuem um domínio catalítico extremamente conservado. A conservação desse domínio catalítico entre as quinases, sejam elas PKs ou PTKs, sugere uma ancestralidade comum (Hunter, 1987; Hanks *et al.*, 1988; Shenolikar, 1994; Hanks & Hunter, 1995; Hunter, 1995). Da mesma forma, as proteínas fosfatases estão agrupadas em proteínas serina/treonina fosfatases (PPs) e proteínas

tirosina fosfatases (PTPs), de acordo com o tipo de fosfoaminoácido que desfosforilam, sendo que este último grupo inclui fosfatases que apresentam especificidade dupla (DSPs). Não se observa, entretanto, nenhuma conservação entre os domínios catalíticos de PPs e PTPs (Barton *et al.*, 1994; Shenolikar, 1994; Barford, 1996).

Outro grupo importante de quinases correponde às histidinas quinases, enzimas que são estruturalmente distintas das PKs e PTKs e que foram primeiramente descritas em eubactérias (Swanson *et al.*, 1993; Alex & Simon, 1994; Alex *et al.*, 1996; Selitrennikoff *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2005). As histidinas quinases também estão presentes em plantas, fungos e outros eucariotos. Elas fazem parte do sistema de dois componentes que consiste em um mecanismo de regulação por fosforilação reversível, este mecanismo envolve a autofosforilação da histidina quinase em um resíduo de histidina e a subseqüente transferência do grupamento fosfato para um resíduo de aspartato, localizado em um outro domínio da histidina quinase ou em uma outra proteína diferente (Alex *et al.*, 1996; Alex *et al.*, 1998; Besant & Attwood, 2005).

As quinases e fosfatases constituem duas das maiores famílias de proteínas codificadas no genoma dos eucariotos. Em humanos, até o momento já foram identificados aproximadamente 500 genes codificantes de quinases e 140 codificantes de fosfatases (Alonso *et al.*, 2004; Ceulemans & Bollen, 2004; Klumpp & Krieglstein, 2005). O somatório dos genes destas famílias corresponde a aproximadamente 2% do total de genes codificantes de proteínas preditos no genoma humano. Isto é proporcionalmente semelhante ao observado no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, levedura que exibe uma complexidade genética intermediária entre eucariotos e procariotos (Hanks & Quinn, 1991; Hunter & Plowman, 1997; Kostich *et al.*, 2002). Há, no entanto, diferenças importantes não mostradas por este tipo de análise. A primeira é a ausência de genes codificantes de tirosina quinases específicas no genoma de *S. cerevisiae* (Tomaska, 2000), o que dá suporte à proposição de que a sinalização envolvendo fosfotirosina está associada à evolução dos metazoários (Darnell, 1997). A segunda é a presença no genoma humano de quatro vezes mais genes codificantes de serina/treonina quinases do que no genoma de *S. cerevisiae*, comparado ao número semelhante de genes codificantes de serina/treonina fosfatases em ambos os organismos. Logo, fica evidente 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 para esta discrepância é o fato de a diversidade funcional das serina/treonina fosfatases ser conferida, predominantemente, por subunidades reguladoras distintas que se associam às suas subunidades catalíticas, como será detalhado adiante (Zhang *et al.*, 1992c; Hubbard & Cohen, 1993; Faux & Scott, 1996; Goldberg, 1999; Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001;

Ceulemans *et al.*, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004; Cohen *et al.*, 2005; Bennett & Alphey, 2006; Bennett *et al.*, 2006).

1.1. Tirosina fosfatases

A presença e a importância da fosforilação em resíduos de tirosina foi verificada a partir da década de 80, quando se descobriu que a proteína transformante do vírus do sarcoma Rous (pp60src) tem atividade de proteína quinase e que a malignidade do tumor está associada à atividade desta quinase que fosforila proteínas em resíduos de tirosina (Hunter & Sefton, 1980). A fosforilação reversível em tirosina foi posteriormente verificada em outros processos celulares e é hoje considerada fundamental na transdução de sinal de vias que regulam metabolismo, crescimento, proliferação e diferenciação de células eucarióticas (Walton & Dixon, 1993; Hunter, 1995; Li & Dixon, 2000; Tonks & Neel, 2001; Pawson, 2004; Tonks, 2006).

A despeito da baixa similaridade entre suas seqüências de aminoácidos, todas as tirosina fosfatases (PTPs) apresentam um motivo comum composto por uma cisteína separada por cinco resíduos de um resíduo de arginina. Este motivo HCXXGXXR (X podendo ser qualquer aminoácido) é o centro catalítico dessa superfamília de enzimas, sendo o resíduo de cisteína essencial à catálise (Fauman & Saper, 1996; Yuvaniyama *et al.*, 1996; Jia, 1997; Denu & Dixon, 1998; Tonks & Neel, 2001). Todos os membros desta superfamília utilizam o mesmo mecanismo de catálise, no qual o resíduo de cisteína do motivo catalítico executa um ataque nucleofílico no grupamento fosfato do substrato. Adicionalmente, um resíduo invariante de aspartato tem papel crucial na catálise. Em um primeiro momento ele age como um ácido, protonando o grupo fenolato do substrato e, em um segundo momento, como uma base, ativando uma molécula de água para promover a hidrólise. Outras propriedades bioquímicas características destes grupos de enzimas são: inibição por vanadato (Shechter & Shisheva, 1993; Shisheva & Shechter, 1993; Nakai *et al.*, 1995; Krejsa *et al.*, 1997), mas não por ácido ocadáico - este último, um inibidor clássico das serina/treonina fosfatases (Cohen, 1990; Fernandez *et al.*, 2002) - e atividade catalítica independente de metais bivalentes ou outros cofatores.

Uma análise detalhada do genoma humano identificou 107 membros da superfamília das PTPs, 105 dos quais possuem ortólogos em camundongos (Alonso *et al.*, 2004). Atualmente, com base em suas respectivas seqüências 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 LMW (*low-molecular-weight* ou baixo peso molecular) (Fauman & Saper, 1996; Jia, 1997; Ramponi & Stefani, 1997b; Tonks & Neel, 2001; Tonks, 2006).

O domínio catalítico das PTPs específicas clássicas compreende aproximadamente 280 aminoácidos e é definido por motivos pequenos e em particular a seqüência assinatura do sítio catalítico, que contém o resíduo de cisteína. As PTPs específicas clássicas ainda podem ser subdivididas em dois grupos: as que se localizam na membrana citoplasmática e são denominadas PTPs do tipo receptor (RPTPs) e as intracelulares ou não transmembrânicas (non-TM) (Walton & Dixon, 1993; Li & Dixon, 2000; Tonks & Neel, 2001; Wang *et al.*, 2003b). As RPTPs são proteínas integrantes da membrana que apresentam um domínio extracelular na região carbóxi-terminal, um pequeno domínio transmembrânico e um domínio intracelular amino-terminal. A região extracelular apresenta grande variabilidade, presumivelmente devido à sua interação com diferentes ligantes fisiológicos, enquanto que na região intracelular está o domínio catalítico. As PTPs intracelulares são normalmente proteínas solúveis do citoplasma, apresentam um domínio catalítico conservado entre elas e também em relação às RPTPs, além de outros domínios nas regiões carboxi e/ou amino-terminal, relacionados à sua sublocalização ou regulação celular. Todavia esta divisão entre proteínas RPTPs e non-TM não é uma regra. Existem casos, como o da PCPTP1 (*PC12 protein Tyr phosphatase*), em que o gene *PCPTP1*, em virtude da ocorrência de *splicing* alternativo, codifica para duas isoformas da enzima, sendo uma com localização transmembrânica e outra com localização citoplasmática (Shiozuka *et al.*, 1995).

A enzima CD45, *cluster of differentiation-45*, é um exemplo de uma RPTP que contém somente um domínio transmembrânico, sendo sua porção citoplasmática constituída de repetições em série de domínios de proteína tirosina fosfatase e de uma cauda C-terminal de aproximadamente 80 aminoácidos. Somente o domínio catalítico próximo à membrana é ativo, mas todos eles são requeridos para a adequada função desta proteína. A CD45 desempenha um papel fundamental na ativação de linfócitos T e B. Em linfócitos B, por exemplo, a CD45 aparentemente potencializa o sinal do receptor BCR (*B-cell receptor*) (Katagiri *et al.*, 1995; Yanagi *et al.*, 1996; Katagiri *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 2002; Holmes, 2006).

As primeiras PTPs do tipo citoplasmático identificadas foram as PTP1B e TC-PTP (*T-cell PTP*) (Charbonneau *et al.*, 1989; Cool *et al.*, 1989; Mosinger *et al.*, 1992; Andersen *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2005). PTP1B e TC-PTP apresentam 74% de similaridade no domínio catalítico; entretanto, sua localização celular, função e regulação são diferentes. A PTP1B interage diretamente com o receptor de insulina (Seely *et al.*, 1996) e com vanadato (Khandelwal & Pugazhenthi, 1995), sendo que esta enzima tem altos níveis de expressão e atividade em músculo esquelético e tecido adiposo. O nocaute do gene da PTP1B em camundongos leva a um aumento da sensibilidade à insulina tecido-específica e à baixa concentração de glicose sanguínea e

de insulina circulante. Coincidentemente, camundongos PTP1B$^{-/-}$apresentaram maior nível de fosforilação quando comparado a camundongos PTP1B$^{+/+}$ (Elchebly *et al.*, 1999).

As PTPs de dupla especificidade são capazes de desfosforilar tanto substratos fosforilados em serina/treonina como em tirosina (Walton & Dixon, 1993; Camps *et al.*, 2000; Tonks, 2006). Apesar dessa dupla capacidade, essas enzimas apresentam o mesmo motivo HCXXGXXR do centro catalítico das outras PTPs; entretanto, elas não possuem similaridade com outras regiões das demais PTPs (Fauman & Saper, 1996; Jia, 1997; Camps *et al.*, 2000; Tamura *et al.*, 2006). Um exemplo importante dessa família são as enzimas MKP-1 e MKP-2 (*MAPK phosphatase 1 e 2*), que participam das vias de transdução de sinal que regulam a mitogênese, desfosforilando as MAPKs (*mitogen activated protein kinases*), que são ativadas quando duplamente fosforiladas em resíduos de treonina e tirosina (Brondello *et al.*, 1997; Camps *et al.*, 2000; Kassel *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Clark, 2003; Farooq & Zhou, 2004; Martin *et al.*, 2005).

As enzimas Cdc25 foram identificadas na levedura *S. cerevisiae* e posteriormente em vários outros organismos, como mamíferos. Essas enzimas também são de dupla especificidade, mas com divergências de seqüência na região do centro catalítico em relação às demais DSPs, e por isso estão classificadas como uma outra subfamília. Essas enzimas apresentam um papel fisiológico muito específico, desfosforilando as CDKs (*cyclin-dependent kinases*) que controlam as transições das fases do ciclo celular (Fauman & Saper, 1996; Draetta & Eckstein, 1997; McCain *et al.*, 2002; Kristjansdottir & Rudolph, 2004; Boutros *et al.*, 2006). O papel das Cdc25 no câncer se tornou mais evidente nos últimos anos. Mais de 20 estudos com amostras de pacientes de diversos tipos de câncer mostraram superexpressão significativa da Cdc25 com freqüente correlação com o quadro clínico do paciente (Galaktionov *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Clucas *et al.*, 2002; Lincoln *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003).

A subfamília das PTPs de baixo peso molecular (LMW), anteriormente denominadas fosfatases ácidas de baixo peso molecular, tem massa molecular em torno de 18 kDa e já foi encontrada em diversos organismos como mamíferos, leveduras e bactérias (Chiarugi *et al.*, 2001; Fiaschi *et al.*, 2001; Chiarugi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003b). Elas não apresentam nenhuma similaridade de seqüência com outras PTPs, com exceção do centro catalítico, mas, surpreendentemente, apresentam estrutura secundária, topologia geral e possivelmente mecanismo catalítico semelhantes às demais PTPs, constituindo um exemplo de convergência evolutiva. Essas enzimas têm sido associadas à desfosforilação de receptores de fatores de crescimento como o PDGFr (*platelet-derived factor receptor*) e o receptor de insulina (Fauman & Saper,

1996; Jia, 1997; Ramponi & Stefani, 1997b; Ramponi & Stefani, 1997a; Chiarugi *et al.*, 2002).

Muitos membros da superfamília PTP possuem o domínio consenso característico do sítio catalítico, mas carecem de resíduos que são críticos para a catálise e são, então, denominados pseudofosfatases (Wishart & Dixon, 1998; Wishart & Dixon, 2002). Um exemplo clássico é a proteína Styx, que é catalicamente inativa, pois ao invés de possuir o resíduo de cisteína no sítio catalítico, possui em seu lugar um resíduo de glicina. Uma única mutação (glicina sendo substituída por uma cisteína na posição esperada do sítio catalítico) leva essa proteína mutante a exibir atividade similar a uma DSP. Styx interage com a CRHSP24 (*calcium-regulated heat-stable protein of apparent molecular mass 24k*), e camundongos que carregam mutação em Styx possuem defeito na produção de esperma (Wishart & Dixon, 2002). No entanto, detalhes da função destas pseudofosfatases ainda não foram elucidados.

1.2. Serina/ treonina fosfatases

De acordo com suas características bioquímicas, as serina/treonina proteínas fosfatases foram inicialmente agrupadas em fosfatases do tipo 1 e tipo 2 (Ingebritsen & Cohen, 1983). As enzimas incluídas no tipo 1 (PP1) são aquelas capazes de desfosforilar a subunidade β da fosforilase quinase e são inibidas por concentrações nanomolares de duas proteínas termoestáveis denominadas inibidor-1 (I-1) e inibidor-2 (I-2). As fosfatases pertencentes ao tipo 2 desfosforilam a subunidade α da fosforilase quinase e não são inibidas por I-1 e I-2. Proteínas deste último grupo foram ainda subdivididas em 2A, 2B e 2C (PP2A, PP2B e PP2C), de acordo com suas necessidades por cátions bivalentes. PP2A, PP2B e PP2C tornam-se ativas na presença de Mn^{2+}, Ca^{2+} e Mg^{2+}, respectivamente, enquanto a PP1 independe de cátions bivalentes para sua atividade (Cohen, 1989; Cohen *et al.*, 1989; Shenolikar & Nairn, 1991). (SHENOLIKAr 19994).

Outra característica utilizada para diferenciar as enzimas dos tipos 1 e 2 é a sensibilidade a toxinas naturais tais como o ácido ocadáico e a microcistina. A PP1 é inibida por concentrações na faixa de 10 nM a 100 nM destas toxinas, enquanto as enzimas da família da PP2A são inibidas por concentrações 10-100 vezes menores. Já enzimas da família da PP2B são inibidas por concentrações de ácido ocadáico na ordem de 10^3-10^4 vezes maiores (> 10 mM) que enzimas da família da PP2A; por outro lado, enzimas da família da PP2C não são inibidas por esta toxina. Vale destacar que o ácido ocadáico é freqüentemente associado às ocorrências de envenenamento por alimentos oriundos do mar, além de ser um potente agente tumoral. A microcistina é uma hepatotoxina produzida pela alga verde-azul que contamina reservatórios de água

potável (Cohen, 1989; Cohen *et al.*, 1989; Shenolikar & Nairn, 1991; MacKintosh & MacKintosh, 1994; Moorhead *et al.*, 1994; MacKintosh *et al.*, 1995; Wera & Hemmings, 1995; Sheppeck *et al.*, 1997).

A partir da década de 90, a popularização de técnicas de clonagem gênica e seqüenciamento de DNA possibilitou a elucidação das estruturas primárias de diversos membros da família das PPs. A partir da comparação das seqüências destas enzimas uma nova classificação foi então proposta (Cohen *et al.*, 1990). Nesta, as PPs foram agrupadas em duas famílias denominadas PPP (*Phosphoprotein Phosphatase*) e PPM (*Phosphoprotein Phosphatase Magnesium-dependent*). As enzimas da família PPP apresentam um domínio catalítico conservado de 280 resíduos, ausente nos componentes da família PPM, e foram divididas nas subfamílias PP1, PP2A, PP2B e PP5. Além destas, existem outras fosfatases que não se enquadram em nenhuma destas subfamílias. A família PPM compreende as PP2C, a piruvato desidrogenase-fosfatase mitocondrial e algumas enzimas de procariotos (Barton *et al.*, 1994; Shenolikar, 1994; Wera & Hemmings, 1995; Barford, 1996; Villafranca *et al.*, 1996; Cohen, 1997; Beullens & Bollen, 2002; Kerk *et al.*, 2002). As principais características destas famílias estão resumidas na tabela 1 e serão detalhadas a seguir.

Tabela 1: Classificação das Serina/Treonina Fosfatases (PPs).

Família[1]	Subfamília[1]	Membros	Características Bioquímicas	
			Dependência de cátions[2]	Sensibilidade ao ácido ocadáico[3]
PPM	PP2C	PP2C, piruvato desidrogenase-fosfatase mitocondrial	Mg^{2+}/Mn^{2+}	Não é inibida
PPP	PP1	PP1, PPz1, PPY	Fe^{3+}/Zn^{2+} no sítio catalítico	IC_{50} = 3-10 μM
	PP2A	PP2A	Mn^{2+}	IC_{50} = 0,2-1 μM
	PP4	PP4, PPX	nd	IC_{50} = 0,1-1 μM
	PP6	PP6, PPV	nd	IC_{50} = 0,2-1 μM
	PP2B	PP2B	Ca^{2+}	IC_{50} >10 mM
	PP5	PP5	nd	IC_{50} < 3 μM
	Outras serina/treonina fosfatases	PP7, PPEF1 e 2, fosfatase FCP	nd	nd

[nd] não determinado; [1]Cohen, 1997; Kerk et al., 2002; [2] Cohen, 1989, Shenolikar, 1994, Leung-Hagesteijn *et al.*, 2001, Xing *et al.*, 2006; [3]Sheppeck et al., 1997, Cohen *et al.*, 2005.

1.2.1. PPM

Como descrito acima, a família PPM compreende as PP2C, a piruvato desidrogenase-fosfatase mitocondrial e algumas enzimas de procariotos (Barton *et al.*, 1994; Shenolikar, 1994; Wera & Hemmings, 1995; Barford, 1996; Villafranca *et al.*, 1996; Cohen, 1997; Kerk *et al.*, 2002; Schweighofer *et al.*, 2004; Klumpp *et al.*, 2006). As proteínas da família PPM apresentam seqüências protéicas conservadas entre si, porém distintas das enzimas da família PPP. Contudo, observa-se similaridade entre a estrutura terciária de enzimas das famílias PPP e PPM, refletindo a conservação de seus mecanismos de catálise (Egloff *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995; Barford, 1996; Das *et al.*, 1996).

Ao contrário das PPPs, que serão descritas a seguir, as PP2Cs são enzimas monoméricas e não reguladas por inibidores ou subunidades reguladoras. Uma característica interessante para distinguir a subfamília das PP2C das demais PPs é que essa subfamília requer íons Mg^{2+} ou Mn^{2+} para a sua atividade, além de serem insensíveis ao ácido ocadáico (Barford, 1995; Wera & Hemmings, 1995), como já mencionado.

Ainda não se determinou seguramente se é o Mg^{2+} ou o Mn^{2+} que regula a atividade das PP2C *in vivo*, dado que as concentrações destes íons livres na célula não apresentam flutuações significativas. Entretanto, a proteína humana ILKAP (*Integrin-Linked Kinase-Associated PP2C*) e sua ortóloga em rato são ativadas somente por Mg^{2+} (Tong *et al.*, 1998; Leung-Hagesteijn *et al.*, 2001). Além disso, a PP2Cα humana é ativada 1000 vezes mais por Fe^{2+} do que por Mg^{2+} (Fjeld & Denu, 1999). O estabelecimento da ordem dos eventos na catálise (ligação ao cátion metálico, seguido de ligação ao substrato fosforilado) levou à proposição de que a incorporação do metal aumenta a afinidade da fosfatase pelo substrato (Fjeld & Denu, 1999). Por outro lado, nenhuma atividade é observada quando se substitui os íons Mg^{2+}/Mn^{2+} por Ca^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+} ou Zn^{2+} para a ABI1, uma PP2C de *Arabidopsis thaliana*, ou para a MP2C, outra PP2C de plantas (Leube *et al.*, 1998; Baudouin *et al.*, 1999).

Em eucariotos, as PP2C desempenham papel importante na modulação de cascatas de sinalização relacionadas à resposta a estresses. Por exemplo, enzimas desta família modulam negativamente a via de resposta à alta osmolaridade na levedura *Saccharomyces cerevisiae* pela desfosforilação da MAPK Hog1, levando à inativação da mesma (Warmka *et al.*, 2001), além de atuarem na desfosforilação de outros componentes-chave de vias de sinalização de resposta a estresses (Meskiene *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2002; Ota & Mapes, 2006).

As PP2Cs também estão envolvidas na regulação do ciclo celular pela inativação reversível das CDKs (*cyclin-dependent protein kinases*). As CDKs são ativadas pela

CAK (*CDK-activating kinase*) via fosforilação da Thr161 e já foi descrito que as PP2Cα e PP2Cβ desfosforilam quinases desta família, como as Cdk2 e Cdk6 (Cheng *et al.*, 1999a; Cheng *et al.*, 1999b; De Smedt *et al.*, 2001). Mais recentemente, certas isoformas da PP2C foram implicadas na modulação da apoptose, sendo que neste caso a ativação destas enzimas envolve a ligação de ácidos graxos insaturados (Klumpp *et al.*, 1998a; Klumpp *et al.*, 1998b; Klumpp *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2006).

1.2.2. PPP

Como já mencionado, as enzimas da família PPP foram divididas nas subfamílias PP1, PP2A, PP2B, PP5, PP7 e FCP, sendo que a subfamília da PP2A engloba, além da PP2A propriamente dita, a PP4 e a PP6. As principais características destas enzimas estão destacadas a seguir.

Serina/treonina fosfatase do tipo 1

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

A seqüência primária da PP1c é muito conservada ao longo da evolução, especialmente nos resíduos de sua região central que apresentam identidade superior a 70%. Há, todavia, diferenças entre as espécies quanto ao número de genes codificantes das isoformas da PP1c. Estes variam de apenas um gene como em *S. cerevisiae* (Tu & Carlson, 1994), *Dictyostelim discoideum* (Andrioli *et al.*, 2003) e *Neurosporacrassa* (Zapella *et al.*, 1996; Szoor *et al.*, 1997; Zapella, 2001) a quatro em *Drosophila melanogaster* (Dombradi *et al.*, 1990) e até oito genes, encontrados em *Arabidopsis thaliana* (Smith & Walker, 1993). Em mamíferos, foram clonados três genes codificantes de quatro isoformas de PP1c (Sasaki *et al.*, 1990; Barker *et al.*, 1994). As participações destas diferentes isoformas de PP1c nas distintas holoenzimas ainda não foram completamente elucidadas, embora a associação preferencial de isoformas por certas subunidades reguladoras tenha sido constatada em alguns estudos (Rubin *et al.*, 1998; Berndt *et al.*, 1999; Vereshchagina *et al.*, 2004; Bennett & Alphey, 2006; Bennett *et al.*, 2006).

A estrutura tridimensional da PP1c de mamíferos vem sendo detalhada através de estudos cristalográficos desta enzima em complexo com toxinas ou com ligantes

protéicos. Até o momento, a PP1c já foi cristalizada em complexo com a caliculina A, microcistina, ácido ocadáico e com a MYPT1 *(myosin phosphatase targeting subunit 1*). Estes estudos mostraram que a PP1c apresenta uma estrutura elipsoidal consistindo de um sanduíche composto por onze folhas-β, rodeadas por sete α-hélices de um lado e um subdomínio composto de três α-hélices e três folhas-β do outro, como pode ser observado na figura 1. Na região central do sanduíche, três folhas-β e duas α-hélices estão conectadas formando um motivo β-α-β-α-β onde se localizam o provável centro ativo da enzima e os íons metálicos coordenados pelos resíduos Asp64, His66 e Asp92 da PP1. Este centro ativo conecta os sulcos hidrofóbicos, acídico e carbóxi-terminal (forma de Y) na superfície da PP1. Em geral, as toxinas localizam-se no sítio ativo da PP1, juntamente com os metais, as moléculas de água e os átomos ligantes, além de interagirem com os sulcos hidrofóbicos e acídico (Barford & Keller, 1994; Egloff *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995; Gauss *et al.*, 1997; Sheppeck *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1999; Kita *et al.*, 2002; Terrak *et al.*, 2004).

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

Diversos estudos estruturais indicam que a alça que conecta as folhas β12-β13 da PP1 é essencial para sua inibição por toxinas. Mutações ao longo desta alça aumentaram ou diminuíram a sensibilidade da PP1, sugerindo que elementos críticos para inibição da PP1 estão localizados entre os resíduos 269-301. Mais especificamente os resíduos Cys273, Tyr272, Glu275 e Phe276 foram determinantes para a sensibilidade da PP1 às várias toxinas e inibidores (Goldberg *et al.*, 1995; MacKintosh *et al.*, 1995; Barford, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Bagu *et al.*, 1997; Connor *et al.*, 1999; Maynes *et al.*, 2001; Andrioli *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2006a; Xie *et al.*, 2006b).

Figura 1: **Estrutura do complexo PP1δ–MYPT1$_{1–299}$**. Representação: PP1δ; α-hélices (azul) e folhas β (magenta); MYPT1 (*myosin phosphatase targeting subunit 1*; vermelho). Os dois cátions no sítio catalítico estão coloridos de laranja. Os motivos de repetição anquirina da MYPT1 estão numerados de 1 a 8 do amino para o carbóxi-terminal. Os contatos da PP1 envolvem três regiões separadas da MYPT1: o braço amino-terminal, o motivo RVxF e um segundo grupo de repetições anquirina, os quais interagem principalmente com os resíduos Tirosina 305 e Tirosina 307 da PP1δ. A alça β12 –β13 da PP1c e o motivo RVxF de MYPT1 estão apontados por setas. Figura retirada de Terrak *et al*., 2004.

A PP1c está sempre em complexo com subunidades reguladoras (geralmente compondo um dímero), formando uma variedade de holoenzimas distintas. Entretanto, as subunidades reguladoras não são necessariamente relacionadas entre si, exceto pela presença, na maioria delas, de uma pequena seqüência canônica de ligação à PP1c, geralmente referida como motivo RVxF, identificada através de estudos bioquímicos e cristalográficos. A seqüência completa deste motivo consenso foi definida através de alinhamentos de seqüências e mutagênese sítio-dirigida como [R/K]-X_1-[V/I]-X_2-[F/W], onde X_1 pode ser qualquer aminoácido e X_2 qualquer aminoácido exceto Prolina (Egloff *et al.*, 1997; Zhao & Lee, 1997; Aggen *et al.*, 2000; Cohen, 2002; Wakula *et al.*, 2003; Terrak *et al.*, 2004; Ceulemans & Bollen, 2006; Meiselbach *et al.*, 2006).

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

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

Outras subunidades reguladoras agem como proteínas direcionadoras, interagindo com a PP1c e com o substrato. Este é o caso das proteínas MYPT, que se ligam à PP1c e ao substrato miosina (Skinner & Saltiel, 2001). 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.*, 1994b; Shimizu *et al.*, 1994). Dentro do grupo de subunidades direcionadoras está também a p53BP2, uma proteína que interage com a proteína supressora tumoral p53 (Helps *et al.*, 1995); GADD34 (*Growth-Arrest and*

DNA-Damage-inducible protein 34), uma proteína induzida por estresse que direciona a PP1 para o substrato SNF5 (*Sucrose Non-Fermenting 5*) facilitando a interrupção do ciclo celular (Wu *et al.*, 2002) e PNUTS (*Phosphatase Nuclear Targeting Subunit*), envolvida na regulação da PP1 sobre a pRB (proteína do retinoblastoma) (Udho *et al.*, 2002). Além destas, existem as proteínas que ancoram PKA, denominadas AKAPs (*A-kinase anchoring proteins*), as quais possuem domínios para um direcionamento subcelular específico. Por exemplo, a AKAP149 direciona a PP1c para a lamina da membrana nuclear, AKAP220 direciona a PP1c para os peroxissomos e AKAP450 direciona a PP1c para os centrossomos (Steen *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004). As neurabinas, proteínas ligantes de actina, direcionam isoformas específicas da PP1 para o citoesqueleto de actina neural (Terry-Lorenzo *et al.*, 2002) e Sds22 é a provável proteína responsável pelo direcionamento da PP1 para o substrato Aurora-quinase (MacKelvie *et al.*, 1995; Peggie *et al.*, 2002; Pinsky *et al.*, 2006).

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 & Bollen, 2004; Pinsky *et al.*, 2006). 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). Outro substrato seria a proteína Bcl-2, que quando desfosforilada pela PP1, é direcionada para o proteassomo (Ayllon *et al.*, 2000; Brichese & Valette, 2002). Entretanto, outro estudo sugere que Bcl-2 também direcionaria a PP1 para o substrato Bad, formando um complexo trimérico (Garcia *et al.*, 2003).

Enfim, para dezenas de proteínas tem sido atribuída a propriedade de subunidade moduladora ou reguladora da PP1c, com base em interações detectadas em experimentos como o de duplo híbrido em leveduras. 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. Contudo, a identificação é apenas o primeiro passo na investigação do papel fisiológico desses complexos enzimáticos *in vivo* (Durfee *et al.*, 1993; Moorhead *et al.*, 1994; Helps *et al.*, 1995; Hirano *et al.*, 1995; Campos *et al.*, 1996; Hirano *et al.*, 1996; Zhang *et al.*,

1998; MacMillan *et al.*, 1999; Ajuh *et al.*, 2000; Bennett & Alphey, 2006; Bennett *et al.*, 2006; Meiselbach *et al.*, 2006).

A busca por outras proteínas capazes de inibir a PP1 levaram ao isolamento e caracterização de novos inibidores, entre eles o inibidor 3 (Zhang *et al.*, 1998), o inibidor 4 (Shirato *et al.*, 2000) e inibidores com ação mais específica, como os já mencionados NIPP-1 e CPI-17. O HCG V (*Hemochromatosis Candidate gene V*), recentemente denominado inibidor-3, foi inicialmente isolado a partir de uma biblioteca de cDNA de células de humanos (Zhang *et al.*, 1998), mas também está presente em microorganismos eucarióticos como *Saccharomyces cerevisiae* (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Tanto a proteína HCG V de humano quanto a proteína ortóloga em leveduras são extremamente hidrofóbicas e estáveis a altas temperaturas e apresentam, assim como os inibidores 1 e 2 de mamífero, uma migração anômala em gel de SDS-PAGE com massa molecular aparente maior que a massa molecular calculada de 14 kDa. Estudos recentes realizados em células HEK293 demonstraram que a PP1c está co-localizada com o inibidor 3 tanto no nucléolo quanto nos centrossomos da célula durante o período da interfase, implicando este inibidor em processos de citocinese e eventos nucleolares (Huang *et al.*, 2005).

Serina/treonina fosfatase do tipo 2A

Esta enzima representa uma subfamília de holoenzimas heterotriméricas, constituídas de uma subunidade catalítica, uma estrutural e uma reguladora denominadas C, A e B, respectivamente. A subunidade catalítica C possui massa molecular de aproximadamente 36 kDa, enquanto que a subunidade A possui 65 kDa. Esta última é também muito conservada evolutivamente e apresenta uma estrutura com 15 repetições imperfeitas de 38 a 40 aminoácidos, ricas em leucina, denominadas HEAT (*Huntingtin-Elongation A subunit-TOR*). A estrutura tridimensional desta subunidade já foi elucidada (Groves *et al.*, 1999). Os resultados sugerem que sua função seja eminentemente estrutural, aproximando as subunidades B e C. A subunidade C interage estavelmente com a porção C-terminal da subunidade A para formar o dímero AC. Este dímero associa-se, através da região amino-terminal da subunidade A, a uma das diferentes subunidades reguladoras B, que possuem massa molecular variada (Mayer-Jaekel & Hemmings, 1994). Recentemente foram elucidadas as estruturas do dímero AC ligado a toxinas inibitórias (Xing *et al.*, 2006) e da subunidade catalítica em complexo com a subunidade regulatória B56γ (Xu *et al.*, 2006; Cho & Xu, 2007). Xing e colaboradores também demostram que o íon metálico requerido pela PP2A é o Mn^{2+} (Xing *et al.*, 2006).

Em mamíferos existem duas isoformas da subunidade catalítica C da PP2A, denominadas α e β, codificadas por dois genes com 97% de identidade entre suas seqüências codificadoras. Existem também duas isoformas da subunidade A, também denominadas α e β, que são produtos de genes distintos e similares (Hemmings *et al.*, 1990a).

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

Diversos dados da literatura sugerem que esta subunidade regula diretamente a especificidade ao substrato, a localização subcelular e a função da PP2A *in vivo*. Por exemplo, o sinal que dirige a PP2A para o núcleo é parte da seqüência primária de uma subunidade B de 72 kDa (PR72). Foi demonstrado que a desfosforilação da fosfohistona H1, catalisada pela PP2A, ocorre com diferente eficiência quando o heterotrímero contém a subunidade B de 55 kDa (PR55) ou a PR72, mas não com o dímero AC ou com C livre. Além disso, a PP2A que contén a PR72 desfosforila preferencialmente os resíduos Ser-120 e Ser-123 no antígeno *large T* do vírus SV40, ativando a replicação do DNA viral. Por outro lado, a PP2A que contém a PR55 desfosforila o resíduo Thr-124, inativando a propriedade do antígeno *large T* de iniciar a replicação do vírus SV40 (Hendrix *et al.*, 1993; Cegielska *et al.*, 1994; Kamibayashi *et al.*, 1994; Turowski *et al.*, 1995; Sontag & Sontag, 2006).

Além disso, mutações pontuais em diversos aminoácidos da subunidade A da PP2A estão associadas a múltiplos tipos de câncer; visto que aparentemente essas mutações alteram a conformação da holoenzima, dificultando ou até impedindo a interação com subunidades reguladoras (Ruediger *et al.*, 2001a; Ruediger *et al.*, 2001b). Vale destacar que a PP2A tem sido implicada na regulação do ciclo celular e na apoptose em diversos organismos, além de ser considerada um supressor tumoral em potencial (Janssens *et al.*, 1998; Perdiguero & Nebreda, 2004; Arroyo & Hahn, 2005; Jiang, 2006; Trinkle-Mulcahy & Lamond, 2006; Mumby, 2007).

Serina/treonina fosfatase do tipo 4

A PP4 foi originalmente identificada através de clonagem de um cDNA parcial de coelhos (da Cruz e Silva *et al.*, 1988) e denominada PPX. Posteriormente, o cDNA humano correspondente foi isolado de uma biblioteca de teratocarcinoma e o alinhamento destas seqüências mostrou elevada conservação destas enzimas (Brewis &

Cohen, 1992). O cDNA completo da subunidade catalítica da PP4 de coelhos codifica uma proteína de 307 aminoácidos com massa molecular deduzida de aproximadamente35 kDa, que apresenta 65% de identidade com a isoforma α da subunidade catalítica da PP2A. Observou-se a presença do transcrito em todos os tecidos estudados, com níveis pouco aumentados no fígado e testículo. A PP4 de coelhos expressa em baculovírus mostrou-se três e quatro vezes menos sensível aos inibidores ácido ocadáico e microcistina, respectivamente, quando comparada à PP2A da mesma espécie; entretanto, as atividades de fosforilase fosfatase da PP4 e da PP2Ac foram similares (Brewis *et al.*, 1993). A PP4c também é inibida pelos agentes anti-tumorais fostriecina e cantaridina nas concentrações de 3 e 50 nM, respectivamente (Hastie & Cohen, 1998; Honkanen & Golden, 2002; Cohen *et al.*, 2005).

A localização subcelular da PP4 foi investigada em células pulmonares fetais humanas e em células de carcinoma epidérmico, com a utilização de anticorpos policlonais específicos para a PP4 e microscopia de fluorescência. Estes experimentos revelaram fluorescência fraca e difusa no citossol, moderada e difusa em núcleos de células na fase da interfase e muito intensa nos centrossomos de células mitóticas (Brewis *et al.*, 1993). A localização subcelular da PP4 em centrossomos também foi verificada em *Drosophila melanogaster*, sendo que a diminuição da expressão da PP4 leva à redução da viabilidade deste organismo. Células expressando 25% dos níveis de PP4 verificados em células normais apresentam divisões celulares assincrônicas e com surgimento aleatório de centrossomos livres, em torno dos quais a nucleação de microtúbulos é mal definida ou mesmo ausente, ou ainda com microtúbulos não conectados ao centrossomo. Nestes mutantes também se observa que a γ-tubulina, essencial ao início do crescimento dos microtúbulos, está alterada conformacionalmente ou localizada em outras regiões celulares (Helps *et al.*, 1998). Adicionalmente, o silenciamento da expressão da PP4c através de RNAi em *C. elegans* resultou em um fenótipo semi-letal, similar ao observado em *Drosophila,* com formação aberrante dos microtúbulos durante a mitose (Sumiyoshi *et al.*, 2002). Estes e outros dados da literatura fornecem fortes evidências da participação da PP4 na nucleação, crescimento e/ou estabilização de microtúbulos (Brewis *et al.*, 1993; Helps *et al.*, 1998; Sumiyoshi *et al.*, 2002).

A PP4c existe como um complexo de alta massa molecular (450-600 kDa) em tecidos de mamíferos. Duas subunidades reguladoras exclusivas da PP4c foram encontradas e denominadas R1 e R2. A subunidade R1 (105 kDa) possui 14 repetições não-idênticas, com alta similaridade com o mesmo motivo encontrado na subunidade do tipo A da PP2A (Kloeker & Wadzinski, 1999). A subunidade R2 possui massa molecular de 55 kDa, embora, em cromatografia de gel filtração, ela seja eluida na fração

correspondente a 450 kDa, em um complexo com outras proteínas (Hastie *et al.*, 2000). Aparentemente essas subunidades associadas à PP4c formam um complexo que interage com uma terceira subunidade variável, como observado para a PP2A (Janssens & Goris, 2001; Carnegie *et al.*, 2003). Por outro lado, a subunidade reguladora alfa 4 (39 kDa) dimeriza com as subunidades catalíticas da PP4, PP2A e PP6 e não necessita da formação do complexo PP4c/R1 ou PP4c/R2 (Murata *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998).

A PP4 de coelho é carboximetilada, à semelhança da PP2A. Apesar do significado biológico desta modificação não estar elucidado, estudos realizados *in vitro* indicam uma considerável diminuição na atividade enzimática da PP4 quando carboximetilada em relação à enzima não-modificada (Favre *et al.*, 1994; Kloeker *et al.*, 1997). Além da carboximetilação da subunidade catalítica, modificações covalentes de subunidades reguladoras podem influenciar em sua ligação com a subunidade catalítica.

A interação da PP4 com as proteínas humanas c-Rel e NF-κBp50 (membros da família NF-κB) foi observada em ensaios do sistema de duplo híbrido. Estes dois fatores de transcrição foram utilizados como iscas na varredura de uma biblioteca de cDNA de linfócitos B humanos, sendo que a interação com a PP4 foi confirmada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Neste estudo, foram realizadas mutações sítio-dirigidas com o objetivo de abolir a atividade catalítica da PP4 para verificar se esta enzima é capaz de alterar propriedades de c-Rel. Os resultados indicaram que a PP4 aumenta quatro vezes a afinidade de c-Rel por seqüências específicas de DNA e provoca um aumento de cerca de 5 a 6 vezes na atividade do gene repórter sob controle de um promotor responsivo a NF−κB. Como esperado, nenhuma mudança nestes parâmetros foi observada com a utilização de mutantes sem atividade catalítica (Hu *et al.*, 1998).

Estudos recentes sugerem que a PP4 interage com o receptor de insulina IRS-4 (*insulin receptor substrate 4*), causando sua repressão quando a célula é estimulada pelo fator de necrose tumoral TNFα (Mihindukulasuriya *et al.*, 2004). A PP4c também está envolvida na ativação da via da quinase Jun (JunK) por TNFα (Zhou *et al.*, 2002). Resultados obtidos por Zhang e colaboradores sugerem que a PP4 também se associa a HDAC3 (*histone deacetylase 3*), desfosforilando-a e inibindo sua atividade (Zhang *et al.*, 2005b).

Linhagens mutantes para Pph3 (ortólogo da PP4) de *Saccharomyces cerevisiae* tornaram-se sensíveis à droga anti-cancerígena cisplatina, sugerindo um importante papel desta enzima na sinalização por dano ao DNA. Vale ressaltar que em linhagens mutantes para Pph22 (ortóloga a PP2A) isso não ocorre (Gingras *et al.*, 2005). A PP4 também interage com a quinase HPK1 (*mitogen-activated protein kinase upstream*

regulator) em células T de uma maneira dependente do TCR (*T cell receptor)* (Zhuo et al., 2004). Resultados recentes sugerem que camundongos nos quais o gene da PP4 foi nocauteado de uma maneira específica em células T apresentam letalidade embrionária e maturação de timócitos de uma maneira anormal, indicando que a PP4 é essencial no desenvolvimento de timócitos e na sinalização pré-TCR (Shui *et al.*, 2007).

Serina/treonina fosfatase do tipo 6

Comparações entre as seqüências de aminoácidos preditas para a PP6 humana (massa molecular entre 35 e 36 kDa) e as demais fosfatases mostram o seguinte grau de similaridade: 57% com a PP2A humana, 59% com a PP4 humana, 74% com a PPV de *Drosophila melanogaster*, 68% com a ppe1 de *Shizosaccharomyces pombe* e 61% com a Sit4p de *Saccharomyces cerevisiae* (Bastians & Ponstingl, 1996). Além disso, experimentos de complementação gênica demonstraram que a PP6 humana e a PPV 6A de *Drosophila* são homólogas funcionais da fosfatase Sit4 de *S. cerevisiae* e da ppe1 de *S. pombe*. Nestes estudos foi possível a recuperação fenotípica de um mutante letal condicional de Sit4 (*sit4⁻102*) pelas PP6 e PPV 6A (Mann *et al.*, 1993; Bastians & Ponstingl, 1996). Um mutante por deleção de ppe1 também pode ser recuperado por Sit4 e PP6 (Shimanuki *et al.*, 1993; Bastians & Ponstingl, 1996; Goshima *et al.*, 2003). Estes dados sugerem a participação da PP6 humana no ciclo celular, assim como verificado em *Drosophila* e leveduras.

Em *S. cerevisiae* estudos genéticos sugerem que a Sit4 está envolvida no ciclo celular, mais detalhadamente na progressão de G1 para S (Sutton *et al.*, 1991; Fernandez-Sarabia *et al.*, 1992; Clotet *et al.*, 1999). Adicionalmente, Sit4 está envolvida em uma variedade de processos incluindo transcrição, tradução, brotamento, metabolismo de glicogênio e transporte de prótons (Arndt *et al.*, 1989; Posas *et al.*, 1991; Masuda *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2005; Shirra *et al.*, 2005).

A região amino-terminal da PPV 6A de *D. melanogaster* foi considerada crítica para o funcionamento desta enzima. Isto porque a complementação do mutante *sit4⁻102* de levedura não só foi obtida com a PPV 6A de *Drosophila*, mas também com os 55 aminoácidos amino-terminais de PPV 6A de *Drosophila* fundidos ao domínio catalítico da PP1 (Mann *et al.*, 1993). Isto sugere que a região amino-terminal deve possuir sítios que interagem com subunidades reguladoras específicas, possivelmente aproximando a PPV 6A dos seus substratos e/ou regulando sua atividade e especificidade (Mann *et al.*, 1993; Bastians & Ponstingl, 1996).

A proteína Sit4 se associa com o produto do gene essencial em *S. cerevisiae* Tap42, o qual atua como um supressor do mutante sensível à temperatura *sit4⁻102* (Di Como & Arndt, 1996; Wang & Jiang, 2003; Wang *et al.*, 2003a). A ligação de Tap42 com

Sit4 é evolutivamante conservada, visto que alfa 4, homóloga humana de Tap42, se liga a PP6 (Chen *et al.*, 1998). Ao contrário de outras subunidades reguladoras conhecidas, a ligação a alfa 4 não é específica para a PP6, porque esta subunidade também se associa a PP2A e PP4 (Murata *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Nanahoshi *et al.*, 1999).

A proteína alfa 4 não é a única subunidade reguladora que foi identificada para a PP6. Em leveduras, além desta, Sit4 co-precipita com outras três subunidades conhecidas como SAPs (*Sit4-associated proteins*), SAP155, SAP185, and SAP190 (Luke *et al.*, 1996). A deleção das SAPs produz o mesmo fenótipo da deleção da Sit4, indicando que as funções de Sit4 e das SAPs dependem uma das outras (Luke *et al.*, 1996). Modificações fenotípicas em resposta à deleção ou superexpressão dos diferentes genes da SAPs em *S. cerevisiae* sugerem funções celulares distintas para cada uma dessas proteínas (Luke *et al.*, 1996; Jablonowski *et al.*, 2001; Rohde *et al.*, 2004; Manlandro *et al.*, 2005). Linhagens mutantes das SAP185 e SAP190 são hipersensíveis a rapamicina e exibem fosforilação constitutiva do fator de iniciação eucariótico eIF2α (Rohde *et al.*, 2004). O aumento da expressão da SAP155, mas não de outras SAPs, confere resistência a zimocina de *Kluyveromyces lactis* (Jablonowski *et al.*, 2001). Além disso, superexpressão da SAP155 causa diminuição da difusão de íons K^+, enquanto que a deleção da SAP155 aumenta a difusão (Manlandro *et al.*, 2005). Recentemente sugeriu-se que a PP6 desempenha um importante papel biológico na sobrevivência de células, tendo em vista que a supressão de sua expressão provocou altas taxas de apoptose (MacKeigan *et al.*, 2005).

Três novas subunidades reguladoras específicas da PP6 e que são similares às SAPs foram recentemente identificadas em tecidos humanos e denominadas PP6R1, PP6R2 e PP6R3. Estas subunidades apresentam expressão e distribuição diferencial nos tecidos estudados (cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, testículos e placenta, entre outros). É interessante notar que as PP6R1 e PP6R2 co-precipitam com IκBε (proteína inibidora de NF-κB), sendo que o silenciamento da expressão da PP6 ou da PP6R1 se correlaciona a um aumento da degradação de IκBε (Stefansson & Brautigan, 2006).

Serina/treonina fosfatase do tipo 2B (calcineurina)

A calcineurina, também denominada PP2B, foi primeiramente purificada a partir de tecidos neurais no final da década de 1970, como uma enzima regulada por íons cálcio (Klee & Krinks, 1978; Klee *et al.*, 1979). Esta serina/treonina fosfatase existe como um heterotrímero e está conservada desde leveduras até humanos. A subunidade catalítica (CnA) tem de 57 a 61kDa e está associada a duas pequenas proteínas que

possuem motivo do tipo *EF-hand*, de ligação a cálcio. Uma delas é a calcineurina B ou CnB e a outra é a calmodulina (Klee *et al.*, 1998). Em mamíferos, três genes, não ligados entre si, codificam para a subunidade catalítica (CnAα, CnAβ e CnAγ), enquanto dois genes codificam para a subunidade reguladora (CnB1 e CnB2) que controla a atividade catalítica em conjunto com a calmodulina, uma proteína expressa ubiquamente em todos organismos e tecidos já estudados (Rusnak & Mertz, 2000).

A expressão de CnAγ e de B2 é na maioria dos casos restrita aos testículos, enquanto CnAα, CnAβ e CnB1 são expressas em vários tecidos, incluindo o coração (Molkentin, 2000). Devido à alta conservação entre suas seqüências, não surpreende a observação de que o mecanismo de regulação da calcineurina também é conservado ao longo de todas as espécies estudadas. O domínio catalítico N-terminal da CnA contém outros três motivos: a hélice que liga a CnB, o de ligação a calmodulina e outro auto-inibitório. A proteína CnB contém quatro motivos de ligação a cálcio do tipo *EF-hand* e se liga fortemente a CnA em concentrações sub-micromolares. Em baixas concentrações de cálcio, a calmodulina não se liga ao complexo e o domínio autoinibitório bloqueia alostericamente o sítio ativo. Em concentrações elevadas de cálcio, este último se liga aos motivos do tipo *EF-hand* da calmodulina e com isso facilita a interação da calmodulina com a CnA. A conformação da enzima se altera, fazendo com que o domínio autoinibitório não obstrua mais o sítio ativo da enzima (Klee *et al.*, 1998).

Além da ativação por altos níveis de cálcio intracelular, a regulação endógena da calcineurina é também afetada pelo estado redox da célula. Por exemplo, ânions superóxido inativam rapidamente a calcineurina, e o estado ativo da enzima é mantido pela superóxido dismutase, provavelmente prevenindo a oxidação do centro Fe–Zn que está contido no sítio ativo da subunidade CnA (Wang *et al.*, 1996; Namgaladze *et al.*, 2002). A atividade da calcineurina é também regulada por uma variedade de fatores moduladores e/ou inibidores. A proteína Cabin1/Cain de aproximadamente 2200 aminoácidos tem um domínio C-terminal que age como um inibidor não-competitivo da calcineurina (Lai *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998). A proteína estrutural AKAP79 também inativa a calcineurina bloqueando seu sítio ativo (Coghlan *et al.*, 1995; Kashishian *et al.*, 1998).

O potencial modulatório das proteínas MCIP (*modulatory calcineurin-interacting protein*) como inibidores das vias de sinalização mediadas pela calcineurina está sendo investigado (Aramburu *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2006). Estas proteínas têm função inibitória quando superexpressas em vários sistemas, indicando que a regulação da sinalização mediada pela calcineurina pode ser ainda mais complexa. É sabido que inibidores endógenos têm um importante papel na modulação da atividade da

calcineurina em uma variedade de tipos celulares, mas a estratégia para inibí-la ainda está baseada na utilização de agentes farmacológicos, tais como a ciclosporina A (CsA) e FK506, compostos extraídos de fungos que atuam como imunosupressores eficientes na prevenção da rejeição de órgãos em indivíduos transplantados. Estes compostos inibem indiretamente a calcineurina ligando-se às proteínas endógenas imunofilinas (*cyclophilin A* para CsA e FKPB12 para FK506), as quais interagem e inibem diretamente a calcineurina (Liu *et al.*, 1991).

Serina/treonina fosfatase do tipo 5

As PP5 possuem uma massa molecular de 58 kDa e são constituídas por um domínio catalítico na extremidade carbóxi-terminal estruturalmente semelhante ao domínio catalítico das demais proteínas fosfatases da família PPP (PP1, PP2A e PP2B) (Bahl *et al.*, 2001). O que diferencia as PP5 das demais PPs é a existência de um domínio com três ou quatro repetições do tetratricopeptídeo (TPR) na região aminoterminal (Cohen, 1997; Chinkers, 2001; Kang *et al.*, 2001; Ramsey & Chinkers, 2002; D'Andrea & Regan, 2003). O motivo TPR é uma seqüência degenerada de 34 aminoácidos do tipo [WLF]-X(2)-[LIM]-[GAS]-X(2)-[YLF]-X(8)-[ASE]-X(3)-[FYL]-X(2)-[ASL]-X(4)-[PKE], o qual está presente em uma grande variedade de proteínas, tanto procarióticas como eucarióticas. Nessas proteínas, os TPRs normalmente são encontrados em cópias múltiplas (entre 3 e 16) que estão dispostas em série e próximas entre si. Esta disposição favorece a formação de α-hélices antiparalelas que medeiam interações proteína/proteína e agregação de complexos multiprotéicos. Existem muitos exemplos nos quais o motivo TPR foi expresso isolado do resto da proteína e exibe características de ligação idênticas de quando é expresso com a proteína inteira (Brinker *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005).

O domínio TPR presente na extremidade aminoterminal da PP5 aparentemente serve como interface para a interação com outras proteínas ou com domínios TPR, sugerindo que ele deve regular alostericamente a atividade da PP. Estas constatações foram feitas na PP5 expressa em bactérias, a qual é praticamente inativa, e que foi ativada em conseqüência da clivagem proteolítica do domínio TPR. Este resultado sugere que o domínio TPR suprime o domínio catalítico, encobrindo o sítio ativo (Chen & Cohen, 1997; Sinclair *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2001). Através de proteólise limitada e mutagênese sítio-dirigida, foi demonstrado que o domínio carbóxi-terminal da PP5 também participa da inativação da enzima juntamente com o domínio TPR, sendo que ambos os domínios agem de maneira coordenada para suprimir a atividade da PP5, além de mediar sua ativação por lipídeos (Sinclair *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2003).

A estrutura cristalográfica da PP5 foi publicada recentemente, revelando que o motivo TPR de fato bloqueia o acesso ao arcabouço catalítico da fosfatase. Os resíduos C-terminais da PP5 interagem com o domínio TPR e estabilizam a conformação auto-inibitória desta enzima (Yang *et al.*, 2005). Alguns ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido araquidônico, ligam-se ao domínio TPR da PP5 e aumentam a sua atividade de proteína fosfatase *in vitro* (Skinner *et al.*, 1997; Ramsey & Chinkers, 2002). Outro estudo recente mostrou que o ácido araquidônico e o composto nocodazol induzem a quebra do C-terminal da PP5 e conseqüentemente estimulam a atividade enzimática da fosfatase (Zeke *et al.*, 2005).

A maioria das proteínas que contêm motivos TPR se encontra associada a complexos multiprotéicos envolvidos no dobramento de proteínas, na mitose, no transporte de proteínas, na formação de complexos protéicos, na transcrição e no *splicing* de RNA (Chen *et al.*, 1994a; Smith *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Das *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1999; Brychzy *et al.*, 2003; Winnefeld *et al.*, 2004; Hahn, 2005)

Funções para a PP5 têm sido propostas em diversos estudos, tendo sido identificadas, *in vivo,* proteínas que se associam a PP5, tais como: Hsp90 (*heat shock protein 90*), receptores de glucocorticóides, receptor ANP (*atrial natriuretic peptide receptor*), proteína ASK1 (a*poptosis signal kinase-1*), dois componentes do complexo promotor da anáfase (CDC16 and CDC27), quinases ATM (*ataxia telengiectasia mutated*) e ATRs (*ATM- and Rad3 related kinases*). Através das funções biológicas em que estas proteínas estão envolvidas, podemos sugerir que a PP5 participa de uma variedade de processos celulares envolvendo diversas vias de sinalização (Chen *et al.*, 1996; Ollendorff & Donoghue, 1997; Silverstein *et al.*, 1997; Zuo *et al.*, 1999; Dean *et al.*, 2001; Urban *et al.*, 2001; Bolanos-Garcia *et al.*, 2005).

Outros estudos sugerem, de modo mais direto, a participação da PP5 na indução de apoptose em resposta a danos ao DNA que provocam ativação das proteínas quinases ATM e ATR (Morita *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005a). Além disso, a PP5 se associa com as proteínas que se ligam ao microtúbulo tau e dineina (Liu *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005), evidenciando o papel da PP5 no transporte citoplasmático através da interação com as proteínas estruturais tubulina e/ou actina. Recentemente foi demonstrado que a PP5 está localizada nos microtúbulos, sendo que o silenciamento da expressão da PP5 em células HeLa induzem a organização anormal dos mesmos (Fukuda *et al.*, 2006). Outros estudos também já identificaram a PP5 no núcleo celular (Chen *et al.*, 1996; Borthwick *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2003).

Outras serina/treonina fosfatases

A PP7 foi identificada em 1997 (Cohen, 1997) e até o momento o único organismo no qual a seqüência completa desta fosfatase está descrita é *A. thaliana*, embora seqüências parciais de outras espécies de plantas como milho, arroz e cana-de-açúcar estejam depositadas em bancos de dados, indicando que aparentemente esta é uma serina/treonina fosfatase específica de plantas (Andreeva *et al.*, 1997; Andreeva *et al.*, 1998; Kutuzov *et al.*, 1998; Andreeva & Kutuzov, 1999).

A AtPP7 (PP7 de *A. thaliana*) apresentou similaridade estrutural com a proteína rdgC (*retinal degeneration C*) de *Drosophila* (Andreeva *et al.*, 1998). Estudos bioquímicos demonstraram que a AtPP7 liga Ca^{2+} e calmodulina (Kutuzov *et al.*, 2001), embora aparentemente ela esteja mais relacionada com a PP5 do que com as PP1, PP2A ou PP2B (Andreeva *et al.*, 1998; Andreeva & Kutuzov, 1999; Andreeva & Kutuzov, 2001; Andreeva *et al.*, 2001). A AtPP7 está localizada no núcleo da célula (Andreeva & Kutuzov, 2001) e a sua proteína recombinante, expressa em bactéria, não é inibida por ácido ocadáico e caliculina A, embora seja inibida por ortofosfato por um mecanismo não competitivo (Kutuzov *et al.*, 1998; Kutuzov & Andreeva, 2001).

Estudos sugerem que esta proteína tem um importante papel na ativação do criptocromo em resposta a irradiação de luz azul (Shalitin *et al.*, 2002); também foi demonstrado que o fotorreceptor humano para luz azul (hCRY2) interage com a PP5 modulando a atividade desta fosfatase (Zhao & Sancar, 1997). Criptocromo é o nome usado para uma classe de receptores de luz azul em plantas; tal família de receptores são flavoproteínas que regulam a germinação, a elongação e o fotoperiodismo em plantas superiores (van der Schalie & Green, 2005; Li & Yang, 2006). Estes receptores também são encontrados em insetos e em mamíferos; resultados sugerem que os dois tipos de criptocromos encontrados em mamíferos têm papel fundamental no ciclo circadiano (Kavakli & Sancar, 2002).

Outra subfamília de fosfatases compreeende as fosfatases FCPs (*Fyn Carboxyl-terminal Peptide*). A fosfatase Fcp1 pertence a esta subfamília e tem como função hidrolisar resíduos de fosfoserina do domínio C-terminal (CTD) da subunidade maior da RNA polimerase II (Pol II). A Fcp1 tem um importante papel na regulação da fosforilação de CTD, sendo fundamental na função transcricional da Pol II. A Fcp1 humana e de levedura é estimulada através de seu domínio C-terminal pelo fator de transcrição TFIIF (Chambers *et al.*, 1995; Chambers & Kane, 1996; Archambault *et al.*, 1997; Archambault *et al.*, 1998). Foi sugerido que em levedura a Fcp1 seria responsável pela desfosforilação *in vivo* do CTD, sendo essencial na transcrição pela Pol II e para a viabilidade da célula (Archambault & Greenblatt, 1997; Kobor & Young, 1999). Ortólogos

da Fcp1 já foram descritos em fungos e metazoários (Archambault *et al.*, 1997; Hausmann & Shuman, 2002; Kimura & Ishihama, 2004).

A Fcp1 contém, além do domínio homólogo a FCP, um outro domínio com homologia a BRCT (*breast cancer 1 C terminus*) (Archambault *et al.*, 1997); além destes, o motivo DXDX(T/V) também está presente no sítio ativo desta enzima (Kobor *et al.*, 1999; Hausmann & Shuman, 2002). A estrutura cristalográfica para a Scp1 (fosfatase que apresenta um domínio homólogo ao FCP da Fcp1) foi elucidada recentemente; este dado, juntamente com dados de experimentos com mutantes da Fcp1 de *Schizosaccharomyces pombe,* definiram o sítio e o mecanismo catalítico dessa subfamília como sendo semelhantes aos da família das PPs, mas ainda não definiram qual a base estrutural para o reconhecimento da Pol II fosforilada (Hausmann & Shuman, 2003; Yeo *et al.*, 2003; Hausmann *et al.*, 2004; Kamenski *et al.*, 2004).

1.3. Aspectos da biologia de *Dictyostelim discoideum*

A ameba social *Dictyostelim discoideum* é utilizada há mais de 60 anos como um modelo experimental para estudos de diversos processos celulares, tais como mobilidade celular, fagocitose, quimiotaxia, sinalização e diferenciação celular. Na natureza, este protista habita superfícies úmidas do solo, alimentando-se predominantemente de bactérias. Características importantes deste microorganismo eucariótico, tais como genoma haplóide, facilidade de cultivo em laboratório, sincronia do desenvolvimento e a possibilidade de manipulação genética, entre outras, são boas justificativas para sua vasta utilização como sistema modelo (Loomis, 1996; Eichinger *et al.*, 1999; Kuspa & Loomis, 2006; Loomis, 2006).

O ciclo de vida de *D. discoideum* compreende as fases de crescimento e de desenvolvimento. Durante o crescimento, as amebas de *D. discoideum* são células idênticas não especializadas, quimiotaticamente sensíveis ao ácido fólico e que podem atingir alta densidade (10^7 células/mL), quando cultivadas em suspensão de bactérias ou em meio axênico. O tempo de duplicação varia entre 3 e 8 horas, dependendo das condições de cultivo e da linhagem, sendo que as células se dividem por fissão binária. Como esquematizado na figura 2, durante o desenvolvimento, que é disparado pela ausência de nutrientes, as células se agregam e se diferenciam em pelo menos dois tipos distintos - esporos e células do talo - para formar, após 24 horas, a estrutura denominada corpo de frutificação (Loomis, 1982; Devreotes, 1989b; Kessin & Campagne, 1992; Gross, 1994; Maeda & Takeuchi, 1997; Soderbom & Loomis, 1998).

O sinal para a agregação é iniciado por alguns indivíduos da população que liberam no meio AMP cíclico (cAMP), que é a molécula responsável pela quimiotaxia durante o início do desenvolvimento de *D. discoideum*. O cAMP liberado no meio se liga

a receptores específicos presentes na superfície das células, que se associam a proteínas G heterotriméricas e dessa forma 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. Na migração, as células se tornam adesivas e se encadeiam, formando correntes que se reúnem até constituir um organismo contendo aproximadamente 10^5 células. Como mostrado na figura 2, após 8-10 horas do início da carência nutricional, o agregado se compacta, assumindo a forma de um monte (*tight mound*), e as células do cume passam a exibir um padrão de expressão gênica distinto das demais. As células do cume compreendem aproximadamente 25% do organismo e correspondem às células pré-talo, enquanto os outros 75% correspondem às células pré-esporo. O cume do agregado compacto coordena a distribuição correta das células e as mudanças morfogenéticas que ocorrem no organismo multicelular (Soderbom & Loomis, 1998; Aubry & Firtel, 1999).

No estágio seguinte do desenvolvimento (figura 2), o organismo multicelular assume forma mais alongada, e então duas alternativas se apresentam: a culminação ou, em determinadas condições, o estabelecimento de uma forma intermediária denominada pseudoplasmódio (*slug*). O pseudoplasmódio pode se deslocar em resposta a gradientes de luz e de temperatura. Em condições favoráveis (luz e temperatura apropriadas), a migração das células cessa na região anterior, enquanto as células da região posterior continuam em movimento até se disporem em torno e embaixo da região anterior, originando uma estrutura que se assemelha a um chapéu mexicano. Nesse momento inicia-se a culminação, que envolve um processo de alongamento das células pré-talo por vacuolização e deposição de celulose na sua superfície externa, formando o talo. No decorrer desse processo, a massa de células pré-esporo progressivamente ascende em direção à extremidade do talo e origina um capsídeo globular terminal contendo esporos no seu interior. Os esporos são liberados no meio e, após a germinação, reiniciam um novo ciclo assexuado (Loomis, 1982; Devreotes, 1989b; Devreotes, 1989a; Darnell *et al.*, 1990; Kessin & Campagne, 1992; Gross, 1994; Maeda & Takeuchi, 1997; Soderbom & Loomis, 1998).

Após a formação do agregado, as vias de sinalização ativadas pelos pulsos de cAMP sofrem um processo de adaptação e/ou desligamento em resposta ao aumento nos níveis extracelulares de cAMP no interior do agregado. Paralelamente, a transcrição de um conjunto de genes é ativada neste estágio pós-agregação. Entre estes genes está o que codifica o fator de transcrição GBF (G-box-binding factor), que desempenha um papel essencial na regulação da expressão gênica pós-agregação e na diferenciação celular que se segue. Simultaneamente à ativação de GBF, ocorre a

fosforilação em tirosina e ativação da proteína STAT (*Signal transducer and activator of transcription*), que atua como regulador da distribuição espacial das células no organismo multicelular e da diferenciação das células do talo. Durante o desenvolvimento multicelular, após a fase de agregação, o cAMP atua em conjunto com outro morfógeno, denominado DIF-1 (*Differentiation-inducing factor-1*), na regulação da diferenciação celular. Ademais, a diferenciação terminal em células do talo e esporos para formação do corpo de frutificação maduro requer uma reorganização das distintas populações celulares no pseudoplasmódio. Esta etapa final do desenvolvimento envolve sinalização mediada por histidina quinases, típicas do sistema de dois componentes, e é disparada pela proteína quinase dependente de cAMP (PKA). Além disso, os peptídeos SDF1 e SDF2 (*spore differentiation factor*) secretados por células pré-talo controlam a maturação dos esporos (Soderbom & Loomis, 1998; Aubry & Firtel, 1999; Kay & Williams, 1999).

O genoma de *D. discoideum* possui 34 Mpb e está organizado em seis cromossomos e um elemento extra-cromossômico de 88 kpb, presente em cerca de 100 cópias e que contém os genes de RNA ribossômico, além do genoma mitocondrial de 55 kpb. A seqüência completa do genoma de *D. discoideum* foi recentemente elucidada (Glockner *et al.*, 2002; Eichinger *et al.*, 2005), possibilitando uma compreensão mais abrangente da sua biologia e o fortalecimento de seu posicionamento filogenético próximo à base da evolução dos metazoários, anterior à separação dos fungos e metazoários, porém posterior à divergência do reino das plantas (Baldauf *et al.*, 2000; Glockner *et al.*, 2002; Eichinger *et al.*, 2005; Kuspa & Loomis, 2006). Os cromossomos de *D. discoideum* variam de 4 a 8 Mpb e contêm genes com características peculiares, tais como alto conteúdo de A/T (78%) e íntrons raros e pequenos (50-200 pb). A análise da seqüência genômica mostrou uma densidade gênica menor em *D. discoideum* (1 gene/2,5 kpb) que a observada na levedura *S. cerevisiae* (1 gene/2 kpb), sendo que a anotação automática encontrou 13.541 genes putativos para proteínas de até 50 aminoácidos. Excluídos estes genes pequenos e pseudogenes, o número de genes codificadores de proteínas está em torno de 10.000 (Kay & Williams, 1999; Glockner *et al.*, 2002; Eichinger *et al.*, 2005; Kuspa & Loomis, 2006).

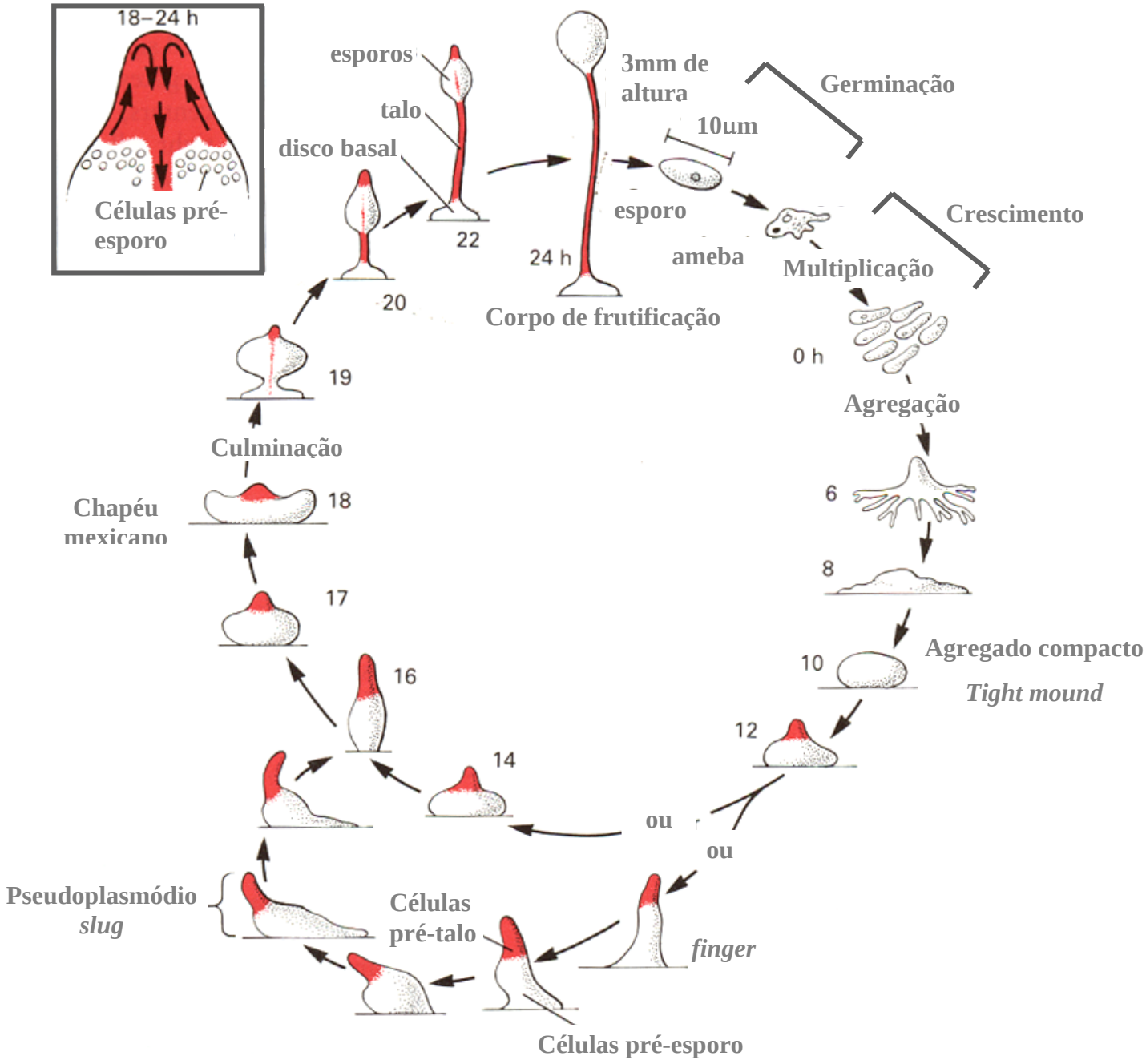


Figura 2: Ciclo de vida de *D. discoideum* (Adaptado de Darnell *et al*., 1990). O tempo de desenvolvimento, induzido após carência nutricional, está indicado em horas. O inserto mostra a migração de células que ocorre após a culminação. Os nomes dos principais tipos celulares estão indicados.

1.3.1. Fosforilação reversível de proteínas em *D. discoideum*

Assim como nos demais organismos, 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 reversível já identificados em *D. discoideum* incluem a fosforilação em resíduos de serina/treonina e tirosina, além do sistema de dois componentes que envolve a fosforilação de resíduos de histidina e aspartato, sendo que uma recente análise do genoma de *D. discoideum* identificou 285 proteínas quinases putativas (Kimmel & Firtel, 2004; Goldberg *et al.*, 2006). Genes de aproximadamente 44 quinases de *D. discoideum* já foram alvo de inativação gênica, a maioria resultando em alterações fenotípicas relevantes, implicando-as diretamente no controle do crescimento e/ou desenvolvimento de *D. discoideum* (Kimmel & Firtel, 2004).

A PKA é uma das quinases mais estudadas em *D. discoideum*, ainda que seus substratos não tenham sido identificados até o momento. Essa enzima parece desempenhar múltiplos papéis no desenvolvimento de *D. discoideum*, atuando durante a agregação quimiotática, a diferenciação das células pré-talo e pré-esporo e nas fases finais do desenvolvimento (Veron *et al.*, 1988; Loomis, 1998; Jia *et al.*, 2001). Outra quinase bastante estudada é a YakA, cuja ausência ou superexpressão resulta no descontrole da divisão celular e crescimento acelerado de *D. discoideum*. Além disso, a YakA diminui a expressão de genes envolvidos no crescimento vegetativo e induz genes de desenvolvimento em células submetidas a carência nutricional (Souza *et al.*, 1998; Taminato *et al.*, 2002). Um dos genes cuja expressão é diminuída é o *pufA*, que inibe a tradução da subunidade catalítica da PKA, e como conseqüência a agregação (Souza *et al.*, 1999). Além destas duas quinases, destacamos a GSK3 (*Glicogen synthase kinase 3*) que desempenha papel central no desenvolvimento de *D. discoideum* (Schilde *et al.*, 2004; Strmecki *et al.*, 2007). Em *D. discoideum,* a GSK3 é ativada pela tirosina quinase de dupla especificidade ZAK1 e exerce alguns de seus efeitos através de STATa (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), promovendo a exportação deste fator de transcrição do núcleo (Kim *et al.*, 1999; Ginger *et al.*, 2000).

Assim como os metazoários, *D. discoideum* possui e utiliza fatores de transcrição da família STAT, os quais são ativados através da fosforilação em resíduos de tirosina, seguindo-se então sua dimerização e importação para o núcleo (Bromberg & Darnell, 2000). Três ortológos de STATs e uma SHK (*SH2-domain-containing kinase*) já foram isolados de células de *D. discoideum* (Kawata *et al.*, 1997; Fukuzawa *et al.*, 2001; Moniakis *et al.*, 2001; Araki *et al.*, 2003; Zhukovskaya *et al.*, 2004). Além disso, um quarto STAT, quatro SHKs e outras três proteínas que contêm domínio SH2 (S*rc homology domain 2*) foram preditas após análise do genoma de *D. discoideum*

(Eichinger *et al.*, 2005). Aparentemente *D. discoideum* não possui tirosina quinases monoespecíficas ou PTKs do tipo receptor, como ocorre em mamíferos. Entretanto, várias proteínas TKL (*Tyrosine Kinase-Like*) foram identificadas neste organismo (Tan & Spudich, 1990; Adler *et al.*, 1996; Nuckolls *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1999; Espanel & van Huijsduijnen, 2005; Goldberg *et al.*, 2006). Além da GSK3 e dos STATs, outras proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina já foram detectadas em *D. discoideum*, como a actina e dois polipeptídeos de aproximadamente 64 e 62 kDa (Schweiger *et al.*, 1990; Howard *et al.*, 1993; Gamper *et al.*, 1999; Andrioli *et al.*, 2006).

Entre as proteínas quinases identificadas no genoma de *D. discoideum*, 14 correspondem a histidina quinases (HKs). Todas contêm um domínio receptor C-terminal e cinco delas possuem hélices transmembrânicas, sugerindo um papel na transdução do sinal extracelular. Algumas das HKs (DhkA, DhkB, DhkC, DhkK e DokA) já foram diretamente implicadas no controle de fases distintas do desenvolvimento e também na osmorregulação (Singleton *et al.*, 1998; Zinda & Singleton, 1998; Wang *et al.*, 1999; Oehme & Schuster, 2001; Thomason *et al.*, 2006).

Contrastando com os vários trabalhos de identificação e caracterização funcional das proteínas quinases de *D. discoideum*, ainda são poucos os estudos sobre as proteínas fosfatases, em particular sobre as serina/treonina fosfatases deste organismo. Três tirosina fosfatases específicas (PTP1, PTP2 e PTP3) e uma ortóloga da fosfatase de dupla-especificidade Cdc25 já foram identificadas em *D. discoideum*. (Howard *et al.*, 1992; Ramalingam *et al.*, 1993; Howard *et al.*, 1994; Gamper *et al.*, 1996; Gamper *et al.*, 1999; Early *et al.*, 2001). A PTP1 regula negativamente o fator de transcrição STATa, uma vez que em mutantes que não expressam esta fosfatase se observa um aumento na fosforilação em resíduos de tirosina de STATa coincidente com a sua retenção nuclear (Early *et al.*, 2001). O papel desempenhado para PTP2 ainda é pouco claro, enquanto que a PTP3 parece estar relacionada à resposta a diversos estresses (Howard *et al.*, 1994; Gamper *et al.*, 1999).

Empregando-se as metodologias utilizadas na caracterização bioquímica das primeiras serina/treonina fosfatates de mamíferos (Cohen *et al.*, 1990), demonstrou-se que *D. discoideum* possui fosfatases do tipo 2A e 2C, com propriedades muito semelhantes às encontradas na maioria das células já estudadas, tais como sensibilidade ao inibidor ácido ocadáico, preferência por diferentes substratos e dependência de íons bivalentes (Simon et al., 1992; Barroso, 1996). Posteriormente, constatou-se que outras fosfatases da família PPP, tais como PP1, PP2B, PP4 e PP6, também estão presentes em *D. discoideum* (Dammann *et al.*, 1996; Horn & Gross, 1996; Hellstern *et al.*, 1997; Andrioli *et al.*, 2003; Fiorini, 2003).

Em *D. discoideum,* acredita-se que a holoenzima PP2A seja a principal responsável pela desfosforilação da cadeia pesada de miosina promovendo o rearranjo dos filamentos (Aubry & Firtel, 1998; Murphy & Egelhoff, 1999; Murphy *et al.*, 1999), enquanto que PP2B (calcineurina) parece desempenhar um papel na morfogênese, uma vez que o silenciamento da expressão de sua subunidade reguladora levou ao surgimento de corpos de frutificação deformados (Boeckeler *et al.*, 2006). O gene da PP2C também foi clonado e o seu seqüenciamento revelou que a proteína por ele codificada é composta por um domínio catalítico e um domínio regulador similar à subunidade α da proteína G ligante de GTP. Verificou-se ainda que essa enzima é essencial para o desenvolvimento logo após a agregação das células de *D. discoideum* (Aubry & Firtel, 1998).

A subunidade catalítica da PP1 de *D. discoideum* (DdPP1c) origina-se a partir de um gene em cópia única no genoma, o qual é expresso ao longo de todo o ciclo de vida desse organismo. Experimentos com o objetivo de inativar ou superexpressar o gene da DdPP1c não resultaram em células viáveis, sugerindo que esta fosfatase teria um possível papel no crescimento ou na divisão celular em *D. discoideum*, a exemplo do que ocorre em outras espécies estudadas. Além disso, embora a seqüência de aminoácidos da DdPP1c tenha uma identidade de 80% com PP1c de outros organismos, esta enzima apresenta propriedades bioquímicas distintas, como por exemplo, menor estabilidade e menor sensibilidade a caliculina A, um inibidor específico de enzimas desta subfamília. Estas diferenças se devem à substituição da cisteína conservada da posição 269 por uma fenilalanina (Andrioli *et al.*, 2003).

Recentemente demonstrou-se que o genoma de *D. discoideum* possui uma única cópia do gene que codifica um ortólogo do inibidor do tipo 2 da PP1c, cujo mRNA é expresso durante o crescimento e ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento, com níveis variáveis. Este gene (*dpiA*) codifica um verdadeiro inibidor da PP1c, pois seu produto recombinante (DdI-2) obtido em bactéria foi capaz de inibir completamente a atividade de fosforilase fosfatase da PP1c recombinante selvagem (DdPP1c) *in vitro*. Além disso, ensaios de duplo híbrido demonstraram que DdI-2 e DdPP1c interagem *in vivo*. As regiões de DdI-2 envolvidas na interação física com a DdPP1c foram mapeadas, revelando que o carbóxi-terminal de cerca de 100 aminoácidos de DdI-2 não é essencial para a interação, mas que o somatório de outras regiões responde pela integridade da interação (Sousa-Canavez *et al.*, 2007).

Finalmente, recentemente demonstrou-se que a PP4c de *D. discoideum,* em conjunto com a quinase MEK1 (*MAPK kinase-1*) e a subunidade reguladora SMKE (ortóloga a PP4R3), desempenha um papel importante no controle do desenvolvimento,

da quimiotaxia e da expressão de vários genes relacionados à resposta ao estresse e a motilidade celular (Mendoza *et al.*, 2007).

Os aspectos apresentados ao longo deste texto ilustram a importância da fosforilação reversível de proteínas na regulação dos mais diversos processos celulares dos seres vivos, entre eles de *D. discoideum*, justificando, a nosso ver, a realização de estudos mais aprofundados sobre as proteínas fosfatases de *D. discoideum*. Esta espécie desperta grande interesse por apresentar um estágio multicelular no seu ciclo de vida, o que possibilita o estudo de diversos aspectos de um organismo multicelular, com as vantagens do uso de um eucarioto menos complexo e passível de manipulação genética.

2. Objetivos

Dando continuidade aos estudos realizados em nosso laboratório para investigar as características bioquímicas e os papéis desempenhados pelas serina/treonina fosfatases no crescimento e desenvolvimento de *D. discoideum*, tivemos neste trabalho os seguintes objetivos:

1) Identificar, utilizando ensaios no sistema de duplo híbrido em leveduras, proteínas que interagem com as subunidades catalíticas das serina/treonina fosfatases do tipo 1 (DdPP1c) e do tipo 4 (DdPP4c) de *D. discoideum*, com o intuito de identificar potenciais candidatos a subunidades reguladoras destas enzimas. Associado a este objetivo, propusemos confirmar algumas das interações identificadas e caracterizar em maior detalhe pelo menos um dos potenciais candidatos.

2) Catalogar todas as proteínas fosfatases e suas subunidades reguladoras codificadas no genoma de *D. discoideum* que possam ser identificadas através de buscas por similaridade com ortólogos identificados em outros organismos. Os genes identificados nestas análises serão reunidos aos genes previamente caracterizados destas famílias de proteínas, para construirmos um catálogo completo das proteínas fosfatases de *D. discoideum*, o qual será denominado ***The Dictyostelim Phosphatome*.**

3) Caracterizar os cDNAs codificadores das fosfatases do tipo 5 (DdPP5c) e do tipo 6 (DdPP6c) e avaliar seus perfis de expressão ao longo do ciclo de vida de *D. discoideum.* Também propusemos realizar estudos para investigar a função destas enzimas neste organismo.

3. Procedimentos Experimentais

3.1. Procedimentos experimentais utilizando *Dictyostelim discoideum*

Os protocolos experimentais utilizando *D. discoideum* descritos a seguir são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de protocolos descritos na literatura (Spudich, 1987; Sussman, 1987; Kuspa *et al.*, 2001; Eichinger & Noegel, 2003; Kreppel *et al.*, 2004; Rivero & Maniak, 2006)

3.1.1. Manutenção e cultivo das células

Estoques da linhagem AX4 de *D. discoideum* (gentilmente cedida pelo Dr. William Loomis, University of California, San Diego, EUA) foram cultivados em placas de meio SM [bacto peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,1% (p/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0,1% (p/v), glicose 1% (p/v), agar 2% (p/v), KH_2PO_4 13,9 mM e $K_2HPO_4.3H_20$ 3,4 mM, pH 6,4]. Para iniciar uma cultura, uma pequena porção de corpos de frutificação maduros de *D. discoideum* foi misturada a 0,2 mL de uma suspensão de bactérias *Klebisiella aerogenes* preparada em meio LB [Triptona 1% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v), e NaCl 0,5% (p/v), pH 7,5] ou SM líquido (sem agar). 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 $5x10^7$ células em crescimento foi ressuspenso em 2 mL de uma solução contendo HL-5 [proteose peptona nº2 1% (p/v), glicose 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), KH_2PO_4 2,5 mM e $K_2HPO_4.3H_20$ 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 500 μL de uma suspensão de bactérias *K. aerogenes* e a suspensão obtida foi semeada em meio SM, como descrito anteriormente. Esses estoques de células congeladas foram utilizados periodicamente como fonte de material para dar início a novas culturas em meio de crescimento sólido.

O cultivo em meio líquido foi iniciado a partir de células no início da fase de desenvolvimento obtidas em placas de meio SM. Uma pequena fração destas células foi transferida para um frasco contendo 10 mL de meio HL-5 e mantida sob agitação de 200 rpm a 22°C. A densidade dessas culturas foi sempre mantida entre 2 e $6x10^6$ células/mL, faixa na qual o crescimento está na fase exponencial.

Para obtenção de células em diferentes fases de desenvolvimento, células provenientes de culturas em meio HL-5 foram submetidas a carência nutricional sobre filtros de nitrocelulose Millipore de cor preta na porosidade de 0,45 mm 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 n° 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 de acordo com o experimento planejado.

3.1.2. Preparação de RNA total de *D. discoideum*

A suspensão equivalente a $2x10^7$ células de *D. discoideum* foi centrifugada a 800xg por 5 min a 4°C e o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de Trizol (Life Technologies, Gibco BRL). Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente foram adicionados 0,2 volumes de $CHCl_3$, seguindo-se agitação vigorosa e incubação por mais 3 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 16.000xg por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi transferida para novo tubo. A esta fase foi adicionado meio volume de isopropanol seguindo-se incubação por 10 minutos. O tubo foi então centrifugado a 16.000xg por 10 minutos a 4°C; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com igual volume de etanol 75% (v/v) por centrifugação nas mesmas condições. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco por centrifugação a vácuo (Eppendorf concentrator 5301) por 5 minutos. O precipitado de RNA foi ressuspenso em 50 μL de H_2O livre de RNAse e a amostra foi aquecida por 10 minutos a 65°C. Após ressuspensão, a concentração e a pureza do RNA total foram estimadas pela medida da absorbância a 260 nm e 280nm, sendo que Abs_{260nm}= 1 equivale a 40 μg de RNA/mL quando a razão $A_{260nm}/A_{280nm} \cong 1,8$. 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. Em alguns experimentos a qualidade e quantidade do RNA total foi avaliada no aparelho BioAnalyser (Agilent).

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

Após crescimento em meio líquido HL-5, $5x10^7$ células foram resfriadas e centrifugadas a 800xg 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 amônio 4 M e, após agitação, o tubo foi centrifugado a 16.000xg a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v). O tubo foi agitado e centrifugado a 16.000xg por 4 minutos. Esta extração foi repetida por mais duas vezes. A fase aquosa foi 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 16.000xg por 15 minutos e o precipitado foi lavado em etanol 75% (v/v) e centrifugado nas mesmas condições. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco 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 Abs_{260nm}= 1 equivale a 50 μg de DNA fita dupla /mL.

3.1.4. Transfecção de DNA em *D. discoideum* por eletroporação

Na tentativa de obtenção de mutantes de *D. discoideum* que tivessem o gene da PP5 inativado foi utilizada a técnica de substituição do gene por recombinação homóloga (Egelhoff *et al.*, 1991). Neste método, o gene ou cDNA de interesse é previamente modificado pela inserção de um cassete contendo o gene de resistência ao antibiótico blasticidina e então utilizado na transfecção das células. Os clones transfectantes resistentes ao antibiótico são analisados para verificação da eventual ocorrência de recombinação homóloga e inativação do gene (Sutoh, 1993). Para detalhes da construção plasmidial utilizada (pBS_DdPP5-KO), ver item 3.4.13.

Aproximadamente 10^7 células da linhagem AX4, em fase de crescimento exponencial, foram mantidas previamente por 15 minutos no gelo e a seguir foram concentradas por centrifugação e ressuspensas em 1 mL de tampão de eletroporação (NaH_2PO_4 10 mM, pH 6,1 e sucrose 1,5 mM). Aproximadamente 800 μL desta suspensão foram transferidos para uma cubeta gelada (Gene Pulser Cuvette 0,4 cm, BIO-RAD), seguindo-se adição de aproximadamente 40 μg do cDNA interrompido pelo cassete de resistência a blasticidina. Em seguida, as células foram submetidas a

eletroporação no aparelho Electro Cell Manipulator (BTX) nas seguintes condições: 1,1 kV, 24 Ω e 50 mF. Após a descarga elétrica, foram acrescentados imediatamente 10 μL de uma solução de $MgCl_2$ 100 mM e $CaCl_2$ 100 mM, mantendo-se a cubeta no gelo por 5 minutos. Aproximadamente $2x10^6$ células foram transferidas para placas de cultura de tecidos às quais foram adicionados 10 mL de meio nutriente HL-5 contendo sulfato de estreptomicina 100 mg/mL. As placas foram incubadas a 22°C e no dia seguinte foi adicionado o antibiótico blasticidina na concentração final de 4 mg/mL. Após o crescimento na placa por aproximadamente 7 dias os clones resistentes à droga foram recuperados pipetando-se repetidamente o meio de cultura e submetidos a plaqueamento em diluições apropriadas para isolamento de clones em meio sólido SM.

3.2. Procedimentos experimentais utilizando *Escherichia coli*

Os protocolos experimentais relativos à manipulação 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, 1989; Ausubel, 1995).

3.2.1. Manutenção e cultivo das bactérias

Repiques, estoques e culturas de *E. coli* foram realizados seguindo protocolos padrões (Sambrook, 1989). Para os experimentos de transformação de DNA foi utilizada a cepa Sure e para os experimentos de expressão de PP1c e DdI-3 recombinantes utilizamos as cepas BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS, respectivamente. Estas cepas foram obtidas da Stratagene, e apresentam os seguintes genótipos:

Sure: e14$^-$(McrA$^-$) Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171*end*A1 *sup*E44 thi-1 *gyr*A96 relA1 *lac rec*B *rsc*J *sbc*C *umu*C.Tn5 (kan^r) *uvr*C [F´proAB lac^{q}Z ΔM15 Tn10 (Tet^r)]^c

BL21(DE3): F$^-$ *omp*T *hsd* S_B (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)

BL21(DE3)pLys: BF$^-$ *dcm omp*T *hsd* S (r_B^- m_B^-) galλ (DE3) [pLysS Cam^r]

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

3.2.2. Preparo de bactérias competentes para transformação

Inicialmente as bactérias foram estriadas em placas de meio LB sólido e incubadas a 37°C por 16-18 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi inoculada em 3 mL de meio LB ou 2X TY líquido e crescida a 37°C, por 16-18 horas a 225 rpm. Cerca de 1,0 mL de pré-inóculo foi transferido para 500 mL de meio LB ou 2X TY líquido fresco, seguindo-se crescimento por 2-3 horas nas mesmas condições anteriores, até DO_{600nm} = 0,5. As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis, resfriadas em banho de gelo por 15 minutos e em seguida coletadas por centrifugação (8461xg por 15 minutos a 4°C). O sedimento foi suspenso em 250 mL de água destilada estéril gelada e centrifugado nas condições anteriores. A etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes, as células foram suspensas em 50 mL de glicerol 10% (v/v) gelado e submetidas novamente a centrifugação. Por fim, as bactérias foram suspensas em 1 mL de glicerol 10% (v/v), distribuídas em alíquotas de 45 µL, congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a –80°C.

3.2.3. Transformação de bactérias por eletroporação

Aproximadamente 0,2 µg do DNA plasmidial foram adicionados a 45 µL de bactérias competentes e a mistura foi transferida para uma cubeta (Gene Pulser Cuvette 0,2 cm, BIO-RAD) previamente resfriada. Em seguida as células foram submetidas a eletroporação no aparelho Electro Cell Manipulator (BTX) nas seguintes condições: 2,5 kV, 50 µF e 129 Ω. Adicionou-se imediatamente 1 mL de meio LB, sendo a suspensão bacteriana então transferida para tubo de cultura e incubada a 37ºC por 1 hora a 200 rpm. Em seguida, 100 µL, 200 µL e 300 µL desta cultura foram semeados em placas de meio LB sólido contendo carbenicilina 100 µg/mL. Algumas colônias transformantes foram inoculadas em meio LB líquido contendo carbenicilina 100 µg/mL para minipreparação de plasmídeos e posterior análise quanto à presença das construções plasmidiais de interesse.

3.2.4. Preparação de plasmídeos em pequena escala

As bactérias foram crescidas em 1,5 mL de LB contendo carbenicilina 100 µg/mL ou canamicina 30 µg/mL a 37°C por 16-18 horas a 225 rpm e então submetidas a centrifugação a 16.000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 100 µL de solução GET/RNAse (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, glicose 0,5 M, EDTA 10mM e ribonuclease A 150 µg/mL) foram adicionados para suspensão do sedimento de bactérias. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de lise [SDS 1% (p/v) e NaOH 0,2 M] recém-preparada misturando-se delicadamente por inversão

até completa homogeneização. A suspensão foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se a adição de 200 µL de solução de neutralização (CH_3COOK 5 M, pH 4,8). Após mistura da suspensão por inversão suave do tubo, seguiu-se incubação por 20-30 minutos a 4°C e centrifugação a 16.000xg por 15 minutos à temperatura ambiente. Do sobrenadante obtido, foram tomados 400 µL e adicionados a 300 µL de isopropanol, em um novo tubo. Após centrifugação a 16.000xg por 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v) nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi seco a vácuo (Eppendorf concentrator 5301), suspenso em 25 µL de Tris.HCl 10mM, pH 8,0 e mantido a -20°C.

3.2.5. Preparação de plasmídeos em grande escala

Para obtenção de plasmídeos em maior quantidade, clones transformantes de *E. coli* Sure foram crescidos em 3 mL de LB contendo carbenicilina 100 µg/mL ou canamicina 30 µg/mL. Para cada 250 mL de meio LB fresco com antibiótico nas mesmas proporções anteriores, foram adicionados 250 µL de pré-inóculo, seguindo-se incubação a 37ºC por 16-18 horas a 225 rpm. A cultura foi submetida a centrifugação a 13.750xg por 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi completamente removido e o sedimento ressuspenso em 15 mL de solução I (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicose 50 mM e EDTA 10 mM) acrescida de 75 mg de lisozima. Foram adicionados 30 mL de solução II [NaOH 0,2 M e SDS 1% (p/v)] recém-preparada e a suspensão foi misturada delicadamente por inversão. Por fim, foram adicionados 15 mL de solução III (acetato de potássio 5 M, pH 4,8), misturados e submetidos a centrifugação a 13.750xg por 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi recolhido em uma nova garrafa por filtração em gaze, acrescido de 36 mL de isopropanol e submetido a centrifugação a 13.750xg por 15 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado em estufa a 37ºC para completa evaporação do isopropanol. O DNA foi ressuspenso em 2,5 mL de TE e transferido para um tubo de vidro de 15 mL. A proteína foi precipitada pela adição de acetato de amônio 2,5 M e incubação em gelo por 20 minutos. A mistura foi submetida a centrifugação a 19.120xg por 15 minutos a 4ºC e o sobrenadante transferido para outro tubo de vidro. O DNA foi precipitado com 2 vezes o volume de etanol 100% e incubado em gelo por 20 minutos. O etanol foi então removido por centrifugação a 19.120xg por 15 minutos a 4ºC e o precipitado incubado a 37ºC, até secar completamente. Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em TE adicionado de RNAse (10 µg/mL) e incubado a 37ºC por 15 minutos. Após adição de NaCl para 1,5 mM e ¼ do volume de PEG/NaCl [PEG 6.000-8.000 30% (p/v) e NaCl 1,5M] a mistura foi incubada a 4ºC por 16-18 horas. O DNA precipitado foi centrifugado a 23.900xg por 15 minutos a 4ºC e o

sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 50 μL de água estéril, seguindo-se adição de 50 μL de tampão PK 2X [Tris.HCl 20mM, pH 8,0, EDTA 10mM, pH 8,0 e SDS 1% (p/v)] e proteinase K para concentração final 500 μg/mL, seguindo-se incubação por 30 minutos a 37ºC. Uma extração com igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) foi realizada seguida por uma extração com igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v). O DNA foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de acetato de potássio 3M, pH 5,5 juntamente com 2,2 volumes de etanol 100%, seguindo-se centrifugação a 16.000xg por 15 minutos à temperatura ambiente. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) por centrifugação nas condições anteriores e, após aspiração de etanol, o DNA foi seco em concentrador a vácuo (Eppendorf Concentrator 5301) e finalmente ressuspenso em 50 μL de TE. A determinação da quantidade de DNA foi feita pela medida da absorbância a 260 nm, sendo que Abs_{260nm}= 1 equivale a 50 μg de DNA fita dupla/mL.

3.3. Procedimentos experimentais utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

Os protocolos experimentais utilizando a levedura *Saccharomyces 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, 1989; Bai & Elledge, 1997; Woods & Gietz, 2001; Gietz & Woods, 2002).

3.3.1. Manutenção e cultivo das células

Células de *Saccharomyces cerevisiae* das linhagens utilizadas, armazenadas a -80°C em meio YPD [Extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v) e glicose 2% (p/v)] contendo 25% de glicerol foram descongeladas e semeadas em YPD sólido [YPD contendo ágar 2% (p/v)]. As placas foram incubadas a 30ºC por 48 horas ou até que as colônias atingissem aproximadamente 2 mm de diâmetro. Em seguida, as placas foram seladas com filme plástico (Parafilm M) e armazenadas a 4°C por no máximo 2-3 meses. Para iniciar culturas líquidas, uma colônia da placa de estoque foi inoculada em meio YPD, seguindo-se incubação a 30°C por 16-18 horas com agitação a 200-250 rpm. Para a maioria das linhagens esta condição gera uma cultura em fase estacionária (DO_{600nm} > 1,5). Para obtenção de culturas em fase exponencial, alíquotas de culturas em fase estacionária foram diluídas em meio fresco até DO_{600nm} = 0,2-0,3, seguindo-se incubação a 30°C com agitação (200 rpm) até a DO_{600nm} desejada. As linhagens utilizadas contêm plasmídeos com pelo menos uma marca nutricional que permite seleção de transformantes através de crescimento em meio SD complementado com os

aminoácidos requeridos. O meio SD [YNB sem aminoácidos 0,67% (p/v), glicose 2% (p/v), solução de aminoácidos e bases 10x 10% (v/v)] foi preparado utilizando-se diferentes soluções de aminoácidos e bases concentradas 10X, as quais continham L-isoleucina 300mg/L, L-valina 1500mg/L, hemissulfato de L-adenina 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-uracila 200mg/L, omitindo-se para cada uma delas os componentes necessários para seleção, como por exemplo L-triptofano, L-histidina ou L-leucina.

3.3.2. Transformação de leveduras em pequena escala

A levedura AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2* ::$GAL1_{UAS}$-$GAL1_{TATA}$-*HIS3*, $GAL2_{UAS}$-$GAL2_{TATA}$-*ADE2*, *URA3*:: $MEL1_{UAS}$-$MEL1_{TATA}$-*lacZ*) foi inoculada em 10 mL de YPD ou meio SD complementado com aminoácidos requeridos pela linhagem. A cultura foi incubada a 30°C até atingir DO_{600nm} = 0,8-1,0. Cerca de 8 mL da cultura foram transferidos para tubos estéreis e centrifugados a 3.220xg por 5 minutos. As células foram suspensas em 2 mL de água estéril e centrifugadas novamente. Em seguida, adicionaram-se ao sedimento de células 200 µL da solução TE/LiOAc (Tris-HCl 0,01M, EDTA 1mM e $C_2H_3LiO_2$ 0,1M, pH 7,5) preparada na hora do uso. Aproximadamente 5 µg do DNA plasmidial de interesse foram transferidos para um tubo de microcentrífuga juntamente com 200 µg de DNA de esperma de salmão (10 µg/µL). Cerca de 100 µL de células foram então misturados à solução de DNA, seguindo-se adição de 600 µL da solução PEG/LiOAc [PEG 4000 40% (v/v), $C_2H_3LiO_2$ 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. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 3.220xg por 2 minutos e o sobrenadante removido com auxílio da micropipeta. Por fim, as células foram suspensas em 0,4 mL de TE pH 7,5 estéril e semeadas em meio seletivo. As placas foram incubadas a 30°C por no mínimo 48 horas ou até o aparecimento de colônias.

3.3.3. Varredura da biblioteca de cDNA no sistema de duplo híbrido

Células de levedura da linhagem AH109 carregando uma entre as construções plasmidiais pGBKT7-DdPP1c, pGBKT7-DdPP1cF269C ou pGBKT7-PP4c foram transformadas com DNA plasmidial obtido a partir de bibliotecas de cDNA construídas no vetor para o sistema de duplo híbrido pACT2 (Clontech). As bibliotecas de cDNA utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Dr. Adam Kuspa (Baylor College of Medicine, Houston, EUA) e serão melhor descritas no item 4.1. Elas foram preparadas a partir do cDNA das fases de crescimento e de desenvolvimento de *D.*

discoideum seguindo protocolos previamente descritos na literatura (Sambrook, 1989; Bai & Elledge, 1997; Woods & Gietz, 2001; Gietz & Woods, 2002).

Para a varredura, colônias das respectivas linhagens crescidas em placas e armazenadas por no máximo quatro semanas foram inoculadas em 150 mL de meio SD complementado com os aminoácidos requeridos pela linhagem e incubadas sob agitação de 200 rpm a 30°C por 16 horas. O pré-inóculo foi então diluído em 1 L do mesmo meio para DO_{600nm} = 0,2-0,3 e a cultura foi incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm por 4 horas ou até atingir DO_{600nm}= 0,4-0,6. Após este período, as células foram centrifugadas a 1000xg por 5 minutos e o sedimento foi suspenso em 4 mL de TE/LiOAc (Tris-HCl 0,01M, EDTA 1mM e $C_2H_3LiO_2$ 0,1M, pH 7,5) preparado no dia do uso. Estas células competentes para transformação foram misturadas com 500 µg de DNA purificado da biblioteca de cDNA e 20 mg de DNA de esperma de salmão em tubos de 50 mL. A suspensão foi vigorosamente agitada, seguindo-se adição de 30 mL da solução PEG/TE/LiOAc [PEG 4000 40% (v/v), Tris-HCl 0,1M, EDTA 10 mM e $C_2H_3LiO_2$ 0,1 M, pH 7,5) e novamente agitação vigorosa. Após incubação a 30°C durante 30 minutos sob agitação a 200 rpm, foram adicionados 5 mL de DMSO [10% (v/v)]. A mistura foi agitada delicadamente e incubada a 42°C por 20 minutos com agitações periódicas. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho de gelo por 15 minutos, as células foram centrifugadas a 1500xg por 5 minutos à temperatura ambiente e então suspensas em 5mL de tampão TE 1X. Uma alíquota de 300 µL e outras três alíquotas de diluições 1:10, 1:100 e 1:1000 em TE 1X foram semeadas em meio seletivo SD -Trp, -Leu (SD sem Triptofano e Leucina) para avaliarmos a eficiência da co-transformação. O restante das células transformadas foi semeado em volumes de 300 µL em placas contendo meio SD -Trp, -Leu, -His (SD sem Triptofano, Leucina e Histidina) acrescido de concentrações variáveis (5 mM ou 10 mM) de 3-AT (3-aminotriazol 1M) e incubadas a 30°C por 6-8 dias.

3.3.4. Extração de plasmídeos de leveduras

Colônias isoladas foram inoculadas em 2 mL de meio SD com suplementos requeridos e crescidas a 30°C por 16-18 horas sob agitação a 200 rpm. As culturas foram então transferidas para tubos de microcentrífuga e submetidas a centrifugação por 1 minuto a 15000xg à temperatura ambiente. Ao sedimento de células foram adicionados 0,2 mL de solução de lise (2% Triton X-100, SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM, Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1,0 mM), 0,2 mL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e 0,3 g de pérolas de vidro de 425-600 microns, seguindo-se agitação vigorosa por 2 minutos e centrifugação a 15000xg por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA plasmidial foi precipitado pela

adição de 0,1 volume de CH_3COONa 3M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto, seguindo-se incubação a -20°C por 16 horas. Após centrifugação a 15000xg por 15 minutos à temperatura ambiente, o precipitado foi suspenso em 500 µL de etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado a 15000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi dissolvido em 50 µL de água Milli-Q, seguindo-se incubação por 15 minutos a 65°C para completa ressuspensão do DNA. Uma alíquota de 0,5 µL foi utilizada na eletroporação de bactérias *E. coli* (cepa Sure) competentes para transformação.

3.3.5. Preparação de extratos protéicos de leveduras

Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio YPD ou SD e crescidas a 30°C por 16-18 horas sob agitação de 200 rpm. O pré-inóculo foi adicionado em 50 mL do mesmo meio fresco e as células foram incubadas a 30°C sob agitação a 200 rpm até DO_{600nm} = 0,4-0,6. A cultura foi imediatamente resfriada em gelo e centrifugada a 1.000xg por 5 minutos a 4°C. O sedimento foi suspenso em 50 mL de água gelada, centrifugado novamente a 1.000xg por 5 minutos a 4°C, imediatamente congelado em banho de gelo seco/etano e armazenado a -80°C até o uso.

Para preparação de extratos protéicos, o sedimento de célula obtido acima foi mantido em gelo até descongelamento e então lavado com NaN_3 10 mM por centrifugação a 1.000xg por 5 minutos a 4°C. O sedimento lavado foi suspenso em tampão de lise (MOPS 50 mM, pH 7,5; sacarose 0,3 M; $CaCl_2$ 1 mM; β-mercaptoetanol 10 mM e PMSF 1 mM, os dois últimos adicionados na hora do uso) contendo solução de inibidores de protease (aprotinina 10 mg/mL, leupeptina 10 mg/mL, pepstatina 10 mg/mL, quimostatina 25 mg/mL). Ao sedimento de células foi adicionado 1 mL de tampão de lise contendo os inibidores de protease e o mesmo volume de pérolas de vidro de 425-600 microns. Esta suspensão foi submetida a agitação vigorosa em agitador de tubos por seis períodos de 30 segundos com intervalo de 30 segundos de incubação em banho de gelo. Após centrifugação a 1.000xg por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido, aliquotado e armazenado a -80°C até o uso. A cada 20 µL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de TCA 10% (v/v), seguindo-se centrifugação a 20.000xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 200 mL de MOPS 50 mM, pH 7,5. A amostra foi submetida a centrifugação nas mesmas condições anteriores e o sedimento obtido foi suspenso em 100 µL de tampão da amostra 1X [Tris-HCl 50 mM pH 6,8, DTT 25 mM, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v) e azul de bromofenol 1% (p/v)]. Por fim, as amostras foram fervidas a 100°C por 3-5

minutos e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).

3.3.6. Teste de β-galactosidase

Colônias de leveduras crescidas em meio SD com suplementos requeridos pela linhagem foram depositadas sobre filtro de nitrocelulose (82,5 mm de diâmetro, BIO-RAD) a 30°C por 48 horas foram testadas quanto à ativação do gene repórter *lacZ*. Para tanto, os filtros de nitrocelulose contendo as colônias foram submetidos a um rápido congelamento em nitrogênio líquido. Após alguns segundos de descongelamento, o filtro foi depositado em uma placa de petri contendo papel de filtro cortado em círculo e embebido em 5 mL de Tampão Z (NaH_2PO_4 40mM, pH 7,0, Na_2HPO_4 60mM, pH 7,0, KCl 10 mM e $MgSO_4$ 0,1 mM) contendo X-β-Gal 1mg/mL e β-mercaptoetanol 4 mM. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas a 37°C. O aparecimento de colônias azuis foi verificado periodicamente por um período mínimo de 1 hora e máximo de 8 horas.

3.4. Manipulação e análise de ácidos nucléicos

Os protocolos experimentais relativos à manipulação e análise de ácidos nucléicos 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; Ausubel *et al.*, 1995).

3.4.1. Digestão de DNA com enzimas de restrição

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

3.4.2. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A amostra de DNA a ser analisada foi previamente misturada com 0,1 volume de tampão de amostra [azul de bromofenol 0,25% (p/v) e sacarose 40% (p/v)] e a eletroforese foi realizada em gel de agarose [0,7-0,9% (p/v)] contendo 0,5 μg/mL de brometo de etídio, a 80-90 V em TBE (Tris-HCl 89mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). A corrida foi interrompida após o corante ter percorrido aproximadamente 4/5 da distância entre o local da aplicação e o limite inferior do gel. O gel foi fotografado

sob luz ultravioleta e os tamanhos dos fragmentos foram estimados mediante comparação com a mobilidade de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos.

3.4.3. Eluição de fragmentos de DNA em papel

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

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

O DNA genômico de *D. discoideum* digerido ou não por enzimas de restrição foi separado por eletroforese em gel de agarose como descrito em 3.4.2. O gel foi incubado por 30 minutos seqüencialmente em solução de depurinação (HCl 0,25 M), em solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) e, finalmente, em solução de neutralização (Tris.base 1 M, pH 7,4 e NaCl 1,5 M). Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação branda.

A transferência para membrana de náilon foi realizada por 1 hora no sistema de transferência por pressão (Posi Blot 30-30 Pressure Blotter and Pressure Control Station, Stratagene) seguindo-se as instruções do fabricante. Após a transferência, a membrana foi marcada com caneta na região de aplicação das amostras, e a fixação do DNA à membrana foi feita diretamente no aparelho UV Stratalinker 1800 (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram imediatamente utilizadas para hibridização ou embaladas em filme plástico e armazenadas.

3.4.5. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído

A amostra de RNA (15-20 μg) 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 H_2O 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 H_2O livre de RNAse corresponde a H_2O previamente tratada com dietilpirocarbonato como descrito na literatura (Ausubel, 1995). A eletroforese foi realizada em baixa voltagem (40-60 V) em aparato mantido livre de contaminação com RNAse.

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

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

3.4.7. Preparação de sonda radioativa

A marcação da sonda de DNA foi feita com o kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, utilizando-se 50 μCi de [α^{32}P] dATP e/ou [α^{32}P] dCTP. Em cada reação de marcação foram utilizados 25 μL de uma solução contendo 50-100 ng de DNA diluído em água (em geral fragmento de DNA purificado por eletroforese em gel de agarose). O DNA havia sido previamente desnaturado por fervura durante 5 minutos e resfriado rapidamente em gelo. Para purificação da sonda radioativa, uma pequena quantidade de lã de vidro foi empacotada no fundo de uma seringa de 1 mL sem agulha que foi em seguida apoiada num tubo cônico de 15 mL e preenchida com 0,9 mL de resina Sephadex G-50 previamente equilibrada em TE. A resina foi lavada com 5 a 10 mL de STE (Tris-HCl 10mM, NaCl 10mM e EDTA 10mM, pH 7,5) por centrifugação a 1258xg

por 3 minutos, à temperatura ambiente. Foram adicionados 50 μL da reação contendo a sonda radioativa seguindo-se eluição da sonda por centrifugação nas mesmas condições diretamente no tubo acoplado à seringa. Para verificação da eficiência da incorporação radioativa, alíquotas de 1 μL da sonda purificada e não purificada foram adsorvidas em pedaços de papel de filtro (1 x 1 cm cada). Um pedaço contendo a sonda não purificada e outro contendo a sonda purificada foram tratados com 25 mL de TCA 10% (v/v), a 4°C por 10 minutos, por duas vezes. Em seguida os papéis foram lavados com etanol e, depois de secos, a radioatividade foi medida em espectrofotômetro de cintilação (Beckman) e comparada com os papéis contendo as mesmas amostras que não tinham sido submetidas ao tratamento com TCA. Em geral, a atividade específica das sondas preparadas estava na faixa de $5x10^8$ a 10^9 cpm/μg de DNA.

3.4.8. Hibridização de DNA e RNA com sonda radioativa

A membrana (*Southern* ou *Northern blot*) foi apoiada sobre uma tela de náilon e então colocada na garrafa de hibridização contendo solução de hibridização [Formamida 50% (v/v), Denhardts 5X, SSPE 6X, SDS 0,1% (p/v) e DNA de esperma de salmão 100 μg/mL]. A solução de Denhardts corresponde a: Ficol 1% (p/v), polivinilpirrolidona 1% (p/v) e BSA fração V 1% (p/v). A solução SSPE 20X corresponde a: NaCl 3 M, NaH_2PO_4 0,2 M pH 7,4 e EDTA 20 mM. Esta pré-hibridização foi realizada a 37°C por pelo menos 2 horas. Após este prazo, a sonda radioativa foi acrescida à solução de hibridização seguindo-se incubação por no mínimo 12-16 horas a 37°C. Após hibridização, foram realizadas duas lavagens da membrana com solução de lavagem [SSPE 0,5X, NaCl 3 M, NaH_2PO_4 0,2 M, pH 7,4, EDTA 20 mM e SDS 0,1% (p/v)] por 30 minutos a 65°C, sob agitação branda. Após secagem ao ar, a membrana foi envolvida em filme plástico para exposição a filme de raios-X a -80°C, por períodos variados. Nos casos em que foi necessária a re-hibridização da membrana com outra sonda radioativa, a primeira sonda foi removida pelo tratamento da membrana com solução de retirada [Tris-HCl 0,2 M, pH 7,5, SSC 0,1X e SDS 0,1% (p/v)] a 80°C por 5 minutos por três vezes. A remoção completa da sonda era confirmada pela exposição da membrana a filmes de Raios-X por tempos prolongados antes da sua re-hibridização com uma nova sonda.

3.4.9. Descrição dos oligonucleotídeos

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

Oligonucleotídeos utilizados para determinação da seqüência interna do cDNA da DdPP5*:*

DdPP5_F3 5' CCCTTCAAC ACTTTCAAAAGAAG 3'

DdPP5_R4 5' GCATCATTTTCTTTTGGATTC 3'

DdPP5_INT 5' CCACCATGTACCACCATAAACG 3´

Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de RT-qPCR:

PP4_F_RT 5´ TCAAAGAGAGTGAAGTTAGAGCATTATGT 3´

PP4_R_RT 5´ CACCACAATAGTTACTGGTGAATCTACT 3´

CKII_F_RT 5´ CACCAAGTTAATTTTTGAGTATATCAAC 3´

CKII_R_RT 5´ AATGACAAAAATCCAATGCGTGTA 3´

Oligonucleotídeos utilizados nos seqüenciamentos de construções nos vetores para duplo híbrido:

T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGGCGA 3' (pGBKT7)

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

GAL4AD: 5' AATACCACTACAATGGATGATG 3' (pACT2)

pACT2: 5' CTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACG 3' (pACT2)

Oligonucleotídeos que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor pCR2.1:

M13R : 5' GAGGAAACAGCTATGACC 3'

M13F(-20): 5' GTAAAACGACGGCCAG 3'

Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA de DdI-3:

DdI-3F: 5' CATCGATACATGAATAAAGATGAAGAATTTTTAGAAGAACATC 3'

DdI-3R: 5' GCAAATTTATCAGATGACGAACAATAA 3'

3.4.10. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

As PCRs foram geralmente realizadas em soluções contendo 0,2-1 μM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada dNTP (Stratagene), 1X tampão da Taq DNA polimerase, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 50-100 ng de DNA em um volume final de 50 μL. 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 50-55°C (variável de acordo com a Tm do oligonucleotídeo) e 1 minuto a 72°C. Por fim, o produto da reação for armazenado a 4°C.

A amplificação da seqüência codificadora de DdI-3 foi realizada por transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR). Para tal, o RNA total de *D. discoideum* foi transcrito reversamente utilizando-se oligo $(dT)_{12-18}$ fornecido no kit de síntese de cDNA (Invitrogen Life Technologies). Em seguida, executou-se a PCR com os oligonucleotídeos DdI-3F e DdI-3R (item 3.4.9).

3.4.11. Seqüenciamento automatizado de DNA

O seqüenciamento de DNA foi realizado no aparelho ABI PRISM™ 3100 (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante. Em cada reação de seqüenciamento foram utilizados 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 $MgCl_2$ 5 mM em um volume final de 15 μL. A reação foi incubada 2 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Terminada a reação, as amostras foram precipitadas com etanol 100% e glicogênio 1 mg/mL, lavadas com etanol 70% (v/v), suspensas em 20 μL de formamida, desnaturadas a 94°C por 5 minutos e submetidas ao seqüenciamento automatizado.

3.4.12. PCR quantitativo precedido de transcrição reversa (RT-qPCR)

O cDNA foi gerado a partir de 5 µg de RNA total livre de DNA, usando 200 U da transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen) e 500 µg de iniciadores nonaméricos aleatórios, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi diluído com água livre de nuclease para 35 µg/µL e armazenado a -20°C até o uso. Os ensaios de PCR quantitativo em tempo real foram realizados no equipamento ABI PRISM 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) usando-se os parâmetros padrões recomendados pelo fabricante. A mistura da PCR incluía 10 µL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), 600 nM de cada iniciador e 180 ng de cDNA molde. Para confirmar a geração de produtos específicos, a PCR foi imediatamente seguida por análise da curva de fusão do produto de PCR, de acordo com as recomendações do fabricante (Applied Biosystems). A seqüência dos iniciadores foi planejada com o programa PRIMER EXPRESS 2.0 (Applied Biosystems) e estão apresentadas no item 3.4.9.

Iniciadores para um segmento do gene que codifica para a caseína quinase II (CKII) de *D. discoideum* foram usados como controles para normalizar a quantidade de RNA total por amostra. A razão de expressão em cada amostra em relação ao tempo zero, foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) a partir de dois experimentos independentes.

3.4.13. Construções Plasmidiais

As construções plasmidiais geradas neste trabalho estão descritas a seguir e os seus respectivos esquemas estão apresentados nas figuras 3, 5 e 6, com indicação das principais características dos vetores utilizados.

pBS_DdPP5c e pBS_DdPP6c

As construções pBS_DdPP5c (clone SSI 675, figura 3A) e pBS_DdPP6c (clone SAE 803, figura 3B) que contêm, respectivamente, os cDNAs completos relativos às DdPP5c e DdPP6c, clonados no vetor pBluescriptS/KII- (Fermentas Life Science) nos foram cedidas pelo grupo japonês que realizou o projeto de seqüenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de *D. discoideum* (Morio *et al.*, 1998). A figura 4A mostra que a digestão com *Sal*I e *Not*I libera um inserto de cerca de 1,6 kpb correspondente ao cDNA da PP5c de *D. discoideum* (canaleta 1) e um inserto de cerca de 1,1 kpb correspondente ao cDNA da PP6c de *D. discoideum* (canaleta 2).

pBS_DdPP5c-KO

A porção codificadora da DdPP5c contida na construção pBS_DdPP5c foi interrompida com a inserção de um cassete de expressão para a resistência ao antibiótico blasticidina (BsR). Essa marca de resistência possibilita a seleção de clones de *D. discoideum* resistentes a esse antibiótico, ou seja, que tenham a cópia do cDNA alterada integrada no genoma após a transfecção. Para obtenção da construção pBS_DdPP5c-KO (figura 3C), o vetor pBS_DdPP5c foi digerido com a enzima *Bam*HI, que lineariza a construção. O sítio para *Bam*HI se encontra na posição 360 pb deste vetor. O cassete de aproximadamente 1,4 kpb contendo o gene de resistência à blasticidina (BsR) foi excisado do vetor pBsR519 (Puta & Zeng, 1998) também pela enzima *Bam*HI e em seguida ligado ao pBS_DdPP5c previamente linearizado e desfosforilado com enzima fosfatase alcalina. A construção resultante foi utilizada na transformação de bactérias Sure. O sucesso da clonagem foi avaliado pela digestão dos clones recombinantes com as enzimas *Sal*I e *Not*I que liberam um fragmento de cerca de 3,0 kpb. A figura 4B mostra o resultado da digestão de um destes clones (canaleta 1).

pGBKT7-DdPP1c, pGBKT7-DdPP1cF269C e pGBKT7-DdPP4c

As construções pGBKT7-DdPP1c e pGBKT7-DdPP1cF269C (Sousa-Canavez, 2005; Sousa-Canavez *et al.*, 2007) esquematizadas nas figuras 5A e 5B contêm as porções codificadoras completas das DdPP1c e DdPP1cF269C (Andrioli *et al.*, 2003). A

construção pGBKT7-DdPP4c (figura 5C) foi preparada pela clonagem da porção codificadora completa do cDNA da DdPP4c, removida da construção pBS-DdPP4c (Fiorini, 2003). Estas construções foram utilizadas como iscas nos ensaios de duplo híbrido em leveduras.

O vetor pGBKT7 expressa a proteína em fusão com os aminoácidos 1-147 do domínio de ligação a GAL4 (DNA-BD). Em levedura, as proteínas de fusão são expressas a partir do promotor constitutivo *ADH1* (P_{ADH1}) e a transcrição é terminada pelos sinais de terminação de transcrição, T7 e *ADH1* (T_{T7} e T_{ADH1}). A proteína de fusão é direcionada para o núcleo da levedura através de uma seqüência de localização nuclear (SV40) adicionada à seqüência do domínio de ligação. O vetor também contém o promotor T7 e codifica o epitopo c-Myc em fusão com a proteína heteróloga. Além disso, pode se replicar tanto em *E. coli* quanto em *S. cerevisiae* a partir de oriC e ori 2μ, respectivamente. As células transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico canamicina (kan^r) em bactérias e com o marcador nutricional triptofano (*TRP1*) em leveduras.

pACT2-DdI-3

A porção codificadora de DdI-3 está clonada no vetor pACT2. O esquema da construção resultante está apresentado na figura 5D. Este vetor foi digerido com a enzima *Bgl*II para verificação da existência do inserto e o mesmo foi seqüenciado com os primers GAL4AD e pACT2 descritos no item 3.4.9. O vetor pACT2 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 é terminada pelos sinais de terminação de transcrição *ADH1* (T_{ADH1}). A proteína de fusão é direcionada para o núcleo da levedura através de uma seqüência de localização nuclear (SV40) adicionada à seqüência do domínio de ativação. O vetor também contém o promotor T7 e codifica o epitopo HA em fusão com a proteína heteróloga expressa. Além disso, pode se replicar tanto em *E. coli* quanto em *S. cerevisiae* a partir de oriC e ori 2μ, respectivamente. As células transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico ampicilina (Amp^r) em bactérias e com o marcador nutricional leucina (*LEU2*) em leveduras.

pCR2.1-DdI-3

Para clonagem do cDNA de DdI-3 (393 pb), foram sintetizados os oligonucleotídeos DdI-3F e DdI-31R para amplificação da região codificadora completa. Os oligonucleotídeos foram planejados de forma a permitir a posterior subclonagem do cDNA de DdI-3 no vetor pAE (expressão de DdI-3 recombinante em bactérias). Como

molde, utilizamos cDNA total obtido a partir da transcrição reversa de 5 μg de RNA total isolado de *D. discoideum* em fase de crescimento. O fragmento de cDNA amplificado foi ligado ao vetor pCR2.1, que é parte do TA cloning kit (Invitrogen), gerando a construção pCR-DdI-3 (Figura 6A). As bactérias transformadas com este vetor podem ser selecionadas com o antibiótico ampicilina.

pAE-DdI-3

Para testar a expressão do DdI-3 em bactérias, utilizamos o vetor pAE (Ramos *et al.*, 2004). Este vetor confere uma cauda de seis resíduos de histidina e um espaçador de 16 aminoácidos ao amino-terminal da proteína expressa. A expressão da proteína recombinante está sob controle do promotor T7 e apresenta como marca de seleção a resistência a ampicilina. Para construção de pAE-DdI-3 (Figura 6B), o cDNA DdI-3 foi removido da construção pCR-DdI-3 com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RV e ligado no vetor pAE previamente linearizado com *Bam*HI e *Pvu*II. Os sítios *Eco*RV e *Pvu*II foram perdidos na construção pAE-DdI-3.

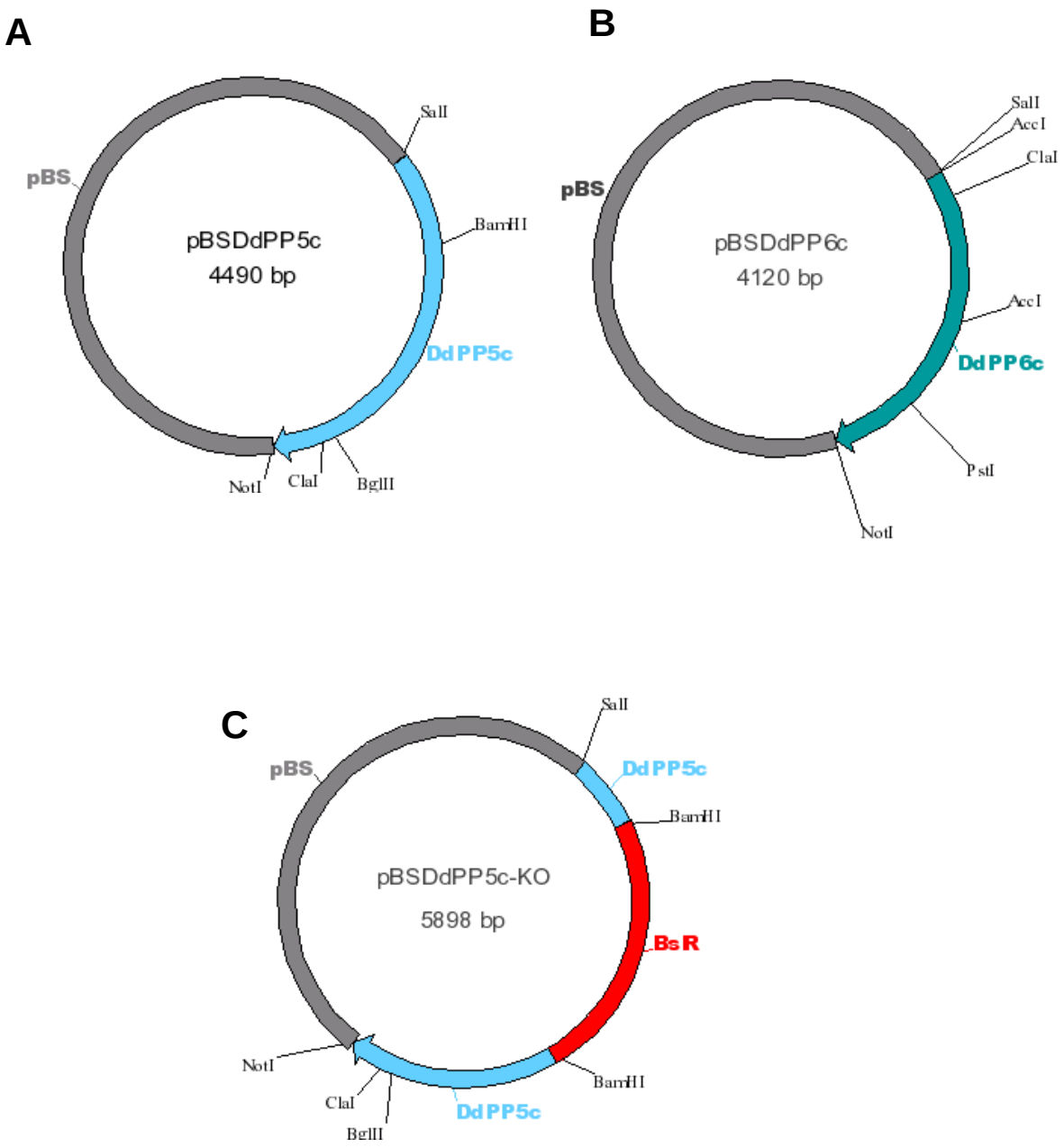


Figura 3: Esquema das construções plasmidiais. A. pBS_DdPP5c (clone SSI 675) contém o cDNA da DdPP5c clonado no vetor pBluescript II S/K-. **B.** pBS_DdPP6c (clone SAE 803) contém o cDNA da PP6c clonado no vetor pBluescript II S/K-. **C.** pBS_DdPP5c-KO. O cDNA da DdPP5 clonado no plasmídeo pBS_DdPP5c foi interrompido no sítio *Bam*HI com a inserção de um cassete de expressão para a resistência ao antibiótico blasticidina (BsR) de aproximadamente 1,4 kbp. O vetor pBluescript II S/K- confere resistência ao antibiótico ampicilina.

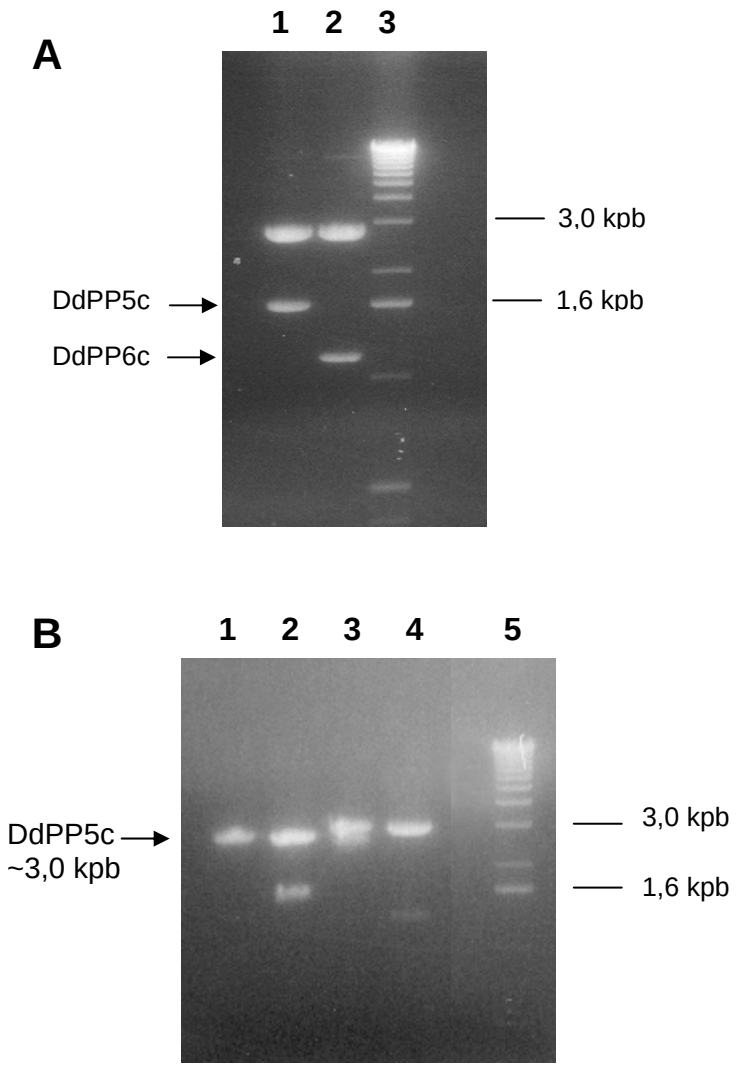


Figura 4: Análise das construções plasmidiais com enzimas de restrição. A. O plasmídeo pBS_DdPP5c foi digerido com as enzimas de restrição *Sal*I e *Not*I para liberação de um fragmento de cerca de 1,6 kpb (canaleta 1) e o plasmídeo pBS_DdPP6c foi digerido com as enzimas de restrição *Sal*I e *Not*I para liberação de um fragmento de cerca de 1,1 kpb (canaleta 2). **B.** A construção pBS_DdPP5c-KO foi digerida com as enzimas de restrição *Sal*I e *Not*I, liberando um fragmento de aproximadamente 3,0 kpb (canaleta 1), que corresponde ao cDNA da DdPP5c interrompido pelo cassete de resistência a blasticidina (aproximadamente 1,4 kpb) previamente excisado do pBsR519. A banda do cDNA interrompido migra juntamente com a banda do vetor pBluescript II S/K- (aproximandamente 3,1 kpb). O plasmídeo pBS_DdPP5c digerido com as enzimas *Sal*I e *Not*I está mostrado na canaleta 2, o plasmídeo pBS_DdPP5c-KO digerido com a enzima de restrição *Cla*I está mostrado na canaleta 3 e o plasmídeo pBS_DdPP5c digerido com *Cla*I está mostrado na canaleta 4. O marcador de tamanho (1 kpb DNA ladder) pode ser observado na última canaleta das figuras A e B e o tamanho de alguns fragmentos em kpb está indicado à direita. As figuras mostram fotos de géis de agarose 0,8% corados com brometo de etídeo.

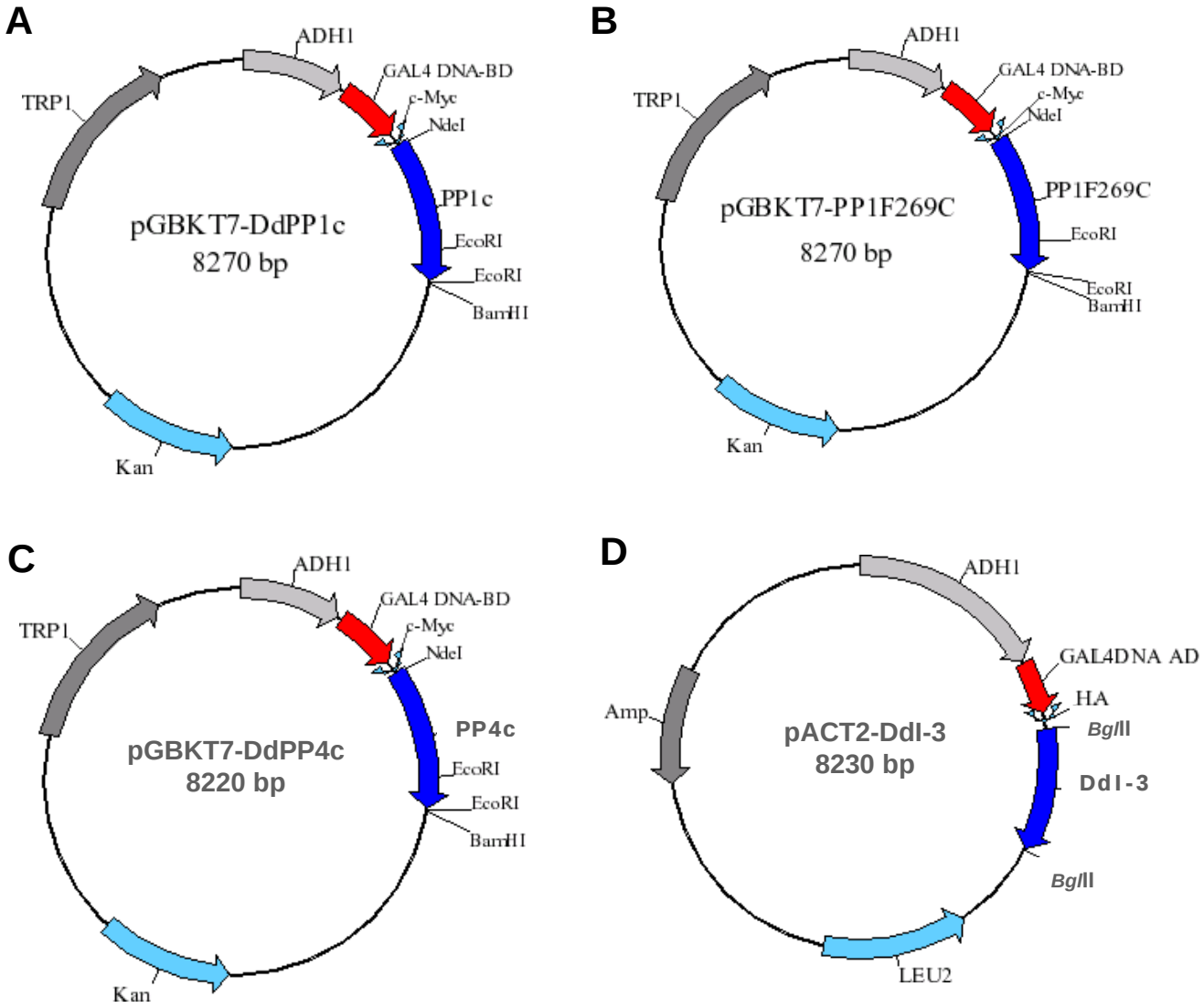


Figura 5. Esquema das construções plasmidiais. A. pGBKT7-DdPP1c: cDNA da DdPP1c subclonado no vetor de duplo híbrido no sítio da enzima *Nde*I. O vetor pGBKT7 expressa proteínas em fusão com os aminoácidos 1-147 do domínio de ligação a GAL4 (DNA-BD). Apresenta como marca de seleção em bactéria resistência a canamicina (kan^r) e o marcador nutricional triptofano (*TRP1*), no caso de levedura. **B.** pGBKT7-DdPP1cF269C: cDNA da DdPP1cF269C subclonado no vetor de duplo híbrido no sítio da enzima *Nde*I. **C.** pGBKT7-DdPP4c: cDNA da DdPP4c subclonado no vetor de duplo híbrido no sítio da enzima *Nde*I. **D.** pACT2-DdI-3: cDNA do DdI-3 clonado no vetor de duplo híbrido no sítio da enzima *Bgl*II. O vetor pACT2 expressa proteínas em fusão com os aminoácidos 768-881 do domínio de ativação de GAL4 (DNA-AD). Apresenta como marca de seleção em bactéria resistência a ampicilina (Amp^r) e o marcador nutricional leucina (*LEU2*), no caso de levedura.

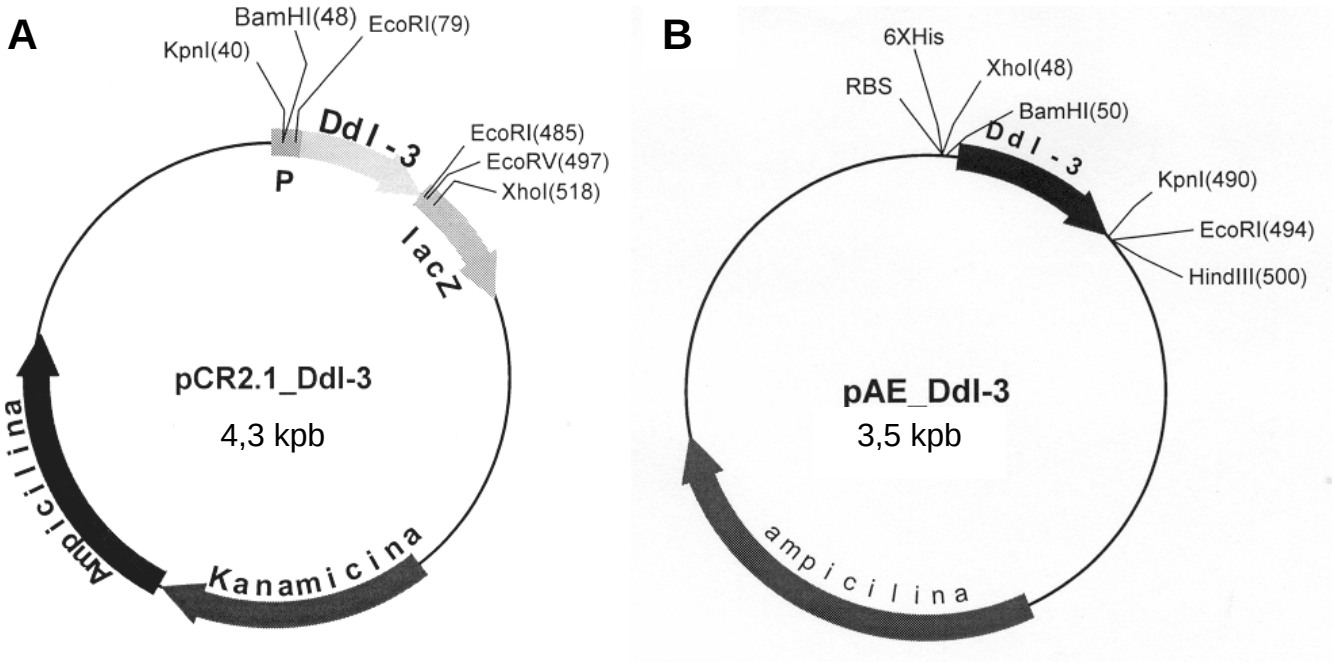


Figura 6: Esquema das construções plasmidiais. A. pCR2.1-DdI-3: O cDNA do inibidor-3 de *D. discoideum* foi clonado no vetor pCR2.1. **B.** pAE-DdI-3: O cDNA do DdI-3 subclonado no vetor de expressão pAE (Ramos *et al*., 2004) nos sítios *Bam*HI e *Pvu*II; este último foi perdido após a clonagem. Este vetor confere fusão com 6 resíduos de histidina no amino-terminal da proteína expressa em bactérias.

3.5. Manipulação e análise de proteínas

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

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS (Laemmli, 1970) em placas. As amostras a serem analisadas foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris-HCl 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).

3.5.2. Dosagem de proteínas

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

3.5.3. Detecção imunológica de proteínas

As membranas de nitrocelulose obtidas após transferência eletroforética de proteínas (item 3.5.1) foram coradas com Ponceau-S 0,1% (p/v) dissolvido em ácido acético 10% (v/v). Em seguida, as membranas foram lavadas brevemente com água para remoção do excesso de corante e checagem da eficiência da transferência realizada. Estas membranas foram então incubadas em TBS 1X [Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM e NaN_3 0,02% (p/v)] contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação lenta. Após esta etapa de bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpos específicos diluídos em TBS 1X contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado por uma noite. No dia seguinte, as membranas foram submetidas a seis lavagens de 10 minutos cada com TBS 1X contendo 0,05% Tween-20 (v/v). Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação, com anticorpos secundários conjugados a peroxidase diluídos em TBS 1X contendo Tween-20 0,05% (v/v) sem NaN_3. As membranas foram novamente submetidas a seis lavagens com TBS 1X acrescido de Tween-20 0,05% (v/v) sem NaN_3 por 10 minutos cada. Finalmente, as proteínas que reagiram com os anticorpos foram

reveladas 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 30 minutos. Utilizamos o anticorpo anti-c-Myc (Clontech) na diluição 1:500 seguindo-se incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo na diluição 1:5000 (GE Healthcare).

3.5.4. Obtenção e purificação de DdI-3 recombinante

Para expressão do rDdI-3 foi utilizada a cepa BL21(DE3)pLysS, transformada por eletroporação com a construção pAE-DdI-3 (Figura 6B). Após a transformação, 10 clones foram inoculados em 3 mL de meio 2X TY acrescido de carbenicilina 100 μg/mL e cloranfenicol 34 μg/mL e crescidos a 37ºC, 200 rpm, por 14-16 horas. As culturas crescidas durante a noite foram diluídas para DO_{600nm}= 0,1 em 10 mL de meio 2X TY fresco contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo então incubadas a 37°C. Quando a cultura atingiu DO_{600nm}= 0,4, uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida) e submetida a centrifugação a 16000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias ressuspenso 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 3 horas de incubação a 37ºC. As amostras coletadas da cultura induzida (1 mL) foram processadas como descrito acima, exceto que o sedimento de bactérias foi ressuspenso em 200 μL de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE. As amostras das culturas não induzida e induzida foram armazenadas a -20ºC até utilização.

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

eletroforese dos extratos bacterianos em SDS-PAGE e coloração com azul de Coomassie R.

Avaliação da solubilidade de DdI-3 recombinante

Após indução da expressão de DdI-3 recombinante com IPTG 1 mM em diferentes temperaturas (25, 30 e 37ºC), o sedimento bacteriano correspondente a 1 mL de cultura foi coletado e ressuspenso 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 a sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, posição 3 (Branson Sonifier 450) com intervalos de incubação de 1 minuto em gelo entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 9880 xg por 30 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento ressuspenso em 1 mL do tampão de lise. Alíquotas do sobrenadante e do sedimento foram analisados em SDS-PAGE como descrito no item anterior.

Purificação da proteína DdI-3 recombinante a partir da fração solúvel

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

Como a atividade da proteína recombinante se mostrou estável, purificamos uma maior quantidade da proteína recombinante, a qual foi armazenada a -80°C em glicerol 10% (v/v). Assim, 6 sedimentos correspondentes a 45 mL de culturas bacterianas induzidas foram lisados e centrifugados separadamente, como descrito anteriormente. 600 μL de resina equilibrada com 15 mL de tampão de lise foram incubadas com a fração solúvel do extrato bruto nas mesmas condições anteriores. Após essa incubação, a resina foi transferida para uma coluna (Poly-Prep Chromatography Column, Bio-Rad Laboratories), onde foi feita a eluição da proteína recombinante a 4ºC, como anteriormente descrito.

A concentração protéica do inibidor recombinante purificado foi estimada pelo método de Bradford (item 3.5.2) e a molaridade da solução de rDdI-3 purificado foi

estimada a partir da massa molecular, calculada com base na seqüência de aminoácidos predita para esta proteína recombinante.

3.5.5. Expressão de DdPP1c recombinante em bactéria

Para expressão da PP1c recombinante de *D. discoideum* utilizamos construções disponíveis no laboratório nas quais a porção codificadora desta fosfatase foi clonada no vetor pTrcHisA (Invitrogen Life Technologies), que confere fusão com uma seqüência que codifica para seis resíduos de histidina na porção amino-terminal. As construções pTrcHisA-DdPP1c e pTrcHisA-DdPP1cF269C (Andrioli *et al.*, 2003) foram utilizadas para transformar as bactérias competentes BL21(DE3). A indução das PP1c recombinantes foi realizada de acordo com procedimentos já estabelecidos (Zhang *et al.*, 1992b; Zapella *et al.*, 1996; Andrioli *et al.*, 2003). Após transformação, colônias isoladas foram transferidas para pré-inóculos em tubos contendo 5 mL de meio LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina ou carbenicilina e crescidos a 37°C sob agitação durante a noite. No dia seguinte 250 mL de meio LB contendo antibiótico e $MnCl_2$ 0,5 mM foram semeados com 1/20 de pré-inóculo. As células cresceram a 37°C até DO_{600nm} = 0,3. Neste momento foi adicionado IPTG para concentração final de 0,3 mM e a temperatura de crescimento foi diminuida para 26°C. As culturas foram mantidas nestas condições por cerca de 18 horas, quando então foram submetidas a centrifugação (4000xg por 20 minutos a 4°C). O sedimento de células foi armazenado a -80°C por no máximo uma semana. Vale ressaltar que uma diferença entre a PP1c recombinante e a PP1c nativa é que a última não depende de Mn^{2+} para sua atividade. Portanto, a adição de $MnCl_2$ à cultura e em todos os tampões utilizados é fundamental para obtenção da PP1c recombinante ativa (Zhang *et al.*, 1992b; Alessi *et al.*, 1993).

3.5.6. Ensaios para medida de atividade da PP1c

Os ensaios enzimáticos para medida da atividade de fosforilase fosfatase da PP1c foram realizados de acordo com procedimentos já estabelecidos, utilizando-se [^{32}P] fosforilase *a* como substrato (Shenolikar & Ingebritsen, 1984; Zhang *et al.*, 1992b; Zapella *et al.*, 1996; Andrioli *et al.*, 2003).

Marcação de fosforilase *a*

O substrato mais usado para medida de atividade enzimática de PP1 é a glicogênio fosforilase *a*, fosforilada *in vitro.* A obtenção de fosforilase *a* marcada com [^{32}P] foi realizada conforme o protocolo descrito na literatura (Shenolikar & Ingebritsen, 1984). A reação contendo fosforilase *b* 32 mg/mL, fosforilase quinase 56,4 U, Tris-HCl 100 mM, pH 8,2, glicerolfosfato de sódio 100 mM, $CaCl_2$ 0,1 mM, acetato de magnésio

10 mM e [γ^{32}P]ATP 0,2 mM (5 x 10^8 cpm/mmol) em volume final de 500 μL foi mantida por 60 minutos a 30°C. Em seguida acrescentou-se um volume de sulfato de amônio 90% (p/v). Após 30 minutos em gelo, a suspensão foi centrifugada a 16000xg por 10 minutos à temperatura ambiente e o precipitado obtido foi dissolvido em 250 μL de tampão Tris-HCl 5 mM pH 7,5, contendo EGTA 0,1 mM, glicerol 10% (v/v) e sulfato de amônio 45% (p/v). Após 30 minutos em gelo, a solução foi submetida a centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 250 μL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 e EGTA 0,1 mM e β-mercaptoetanol 0,1% (v/v). Esta solução foi dialisada a 4°C por 48 horas contra o tampão acima descrito, sendo o tampão trocado a cada 12 horas. Durante a diálise a fosforilase *a* se cristaliza. Após a diálise, a amostra foi incubada por 2 horas em gelo e os cristais foram precipitados por centrifugação a 16000xg por 5 minutos à temperatura ambiente, dissolvidos em 250 μL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 e EGTA 0,1 mM e β-mercaptoetanol 0,1% e mantidos a 4°C até o momento do uso.

Ensaio da atividade da PP1c na presença de rDdI-3

Para o ensaio da atividade enzimática das PP1c recombinantes, o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 1 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 contendo $MnCl_2$ 2 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, PMSF 1 mM e glicerol 10% (v/v). As células em suspensão foram submetidas a sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, posição 3 (Branson Sonifier 450), com intervalos de incubação de 1 minuto em gelo entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 16.000xg por 20 minutos a 4°C. A PP1c, purificada de músculo esquelético de coelho (New England Biolabs), foi utilizada diretamente na reação. A reação foi realizada a 30°C em um volume final de 100 μL; para tanto, a reação foi iniciada pela adição de 80 μL de tampão de reação [imidazol 50 mM, pH 7,2, DTT 2 mM, BSA 0,5 mg/mL, cafeína 5 mM, $MnCl_2$ 0,2 mM e [^{32}P] fosforilase *a* (250-1000 cpm/pmol)] a 20 μL de uma preparação contendo 1,5 μg (DdPP1c) ou 0,5 μg (DdPP1cF269C) de proteína total (sobrenadante dos lisados bacterianos) ou 1 mU de PP1c de músculo esquelético de coelho diluída em imidazol 50 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, BSA 0,5 mg/mL e $MnCl_2$ 0,2 mM. Após incubação de 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de TCA 10% gelado e então submetida a centrifugação (16.000xg por 4 minutos). Foram coletados 100 μL de sobrenadante e adicionados a 1 mL de líquido de cintilação [naftaleno 10% (p/v), PPO 0,5% (p/v) em dioxano]. A radioatividade liberada foi quantificada em espectrofotômetro de cintilação (Beckman). Uma unidade de fosforilase fosfatase é a quantidade necessária para catalisar a liberação de 1 nmol de fosfato da fosforilase *a* por minuto a 30°C. Os ensaios

foram dimensionados para que o consumo de substrato fosse no máximo 15%. Para ensaio do inibidor rDdI-3, concentrações crescentes desta proteína recombinante purificada foram pré-incubadas com 1,5 μg ou 0,5 μg de extratos protéicos de bactérias expressando DdPP1c ou DdPP1cF269C, respectivamente, ou com 1 mU de PP1c purificada de músculo esquelético de coelho a 30°C, por 10 minutos, antes da realização do ensaio de fosforilase fosfatase propriamente dito.

3.6. Análise e comparação de seqüências de DNA e proteínas

Para pesquisa de similaridade de seqüências de DNA ou de proteínas utilizamos o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) em bases de dados públicos tais como o GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information,* http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e o dictyBase (http://dictybase.org) (Chisholm *et al.*, 2006). Para o alinhamento de seqüências de aminoácidos utilizamos o programa ClustalX ou ClustalW (Higgins, 1994; Thompson *et al.*, 1994) e para análise de domínios protéicos utilizamos principalmente o Pfam e o InterPro (Finn *et al.*, 2006; Mulder *et al.*, 2007). O planejamento de alguns oligonucleotídeos foi realizado com programa PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 2000).

A construção da base de dados, que conterá o catálogo de todas as proteínas fosfatases e suas subunidades reguladoras codificadas no genoma de *D. discoideum* (***The Dictyostelim Phosphatome***), foi realizada em colaboração com a aluna Ana Carolina Quirino Simões (Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioinformática, USP). Para tanto foi utilizado o sistema gerenciador de bancos de dados MySQL e também programas específicos escritos nas linguagens Perl e CGI.

Resumidamente, foram recuperadas automaticamente do GenBank 962 seqüências protéicas (denominadas *driver sequences*) que apresentaram relação com o termo “proteínas fosfatases” e que são oriundas das espécies *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* e *Plasmodium falciparum*. Este conjunto foi utilizado na busca por seqüências similares na base de dados de genes anotados do genoma de *D. discoideum*, denominada *primary cds*. Para tanto, o arquivo de *primary cds* foi recuperado do dictyBase e instalado localmente.

Utilizamos a estratégia de blast bidirecional onde o conjunto de *driver sequences* foi utilizado para interrogar a base de dados *primary cds* (genes mapeados no genoma) e vice-versa. Foi utilizado o programa tblastn do BLAST (*release* 2.2.14, instalado localmente) com os parâmetros “com filtro” e “*e-value* ≤ 10^{-5}”, resultando em 1355 respostas (denominadas *matches*). A outra análise feita com o programa blastx,

utilizando os mesmos parâmetros, apontou 1274 *matches*, os quais estão contidos no primeiro conjunto de 1355 *matches*.

O conjunto de 1274 CDS foi então manualmente examinado através de uma interface gráfica, a qual apresentava algumas funcionalidades, tais como alinhamento da seqüência de *D. discoideum* com as seqüências *drivers* com as quais tinham alguma similaridade, lista de domínios protéicos preditos e conexões para recursos externos - por exemplo, o próprio dictyBase. Nesta curagem manual, as seqüências de *D. discoideum* com similaridades a subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases foram classificadas em categorias pré-definidas na base de dados, tais como PTP (PTP, DSP, Cdc25, LMW), PPM (PP2C), PPP (PP1, PP2A, PP4, PP6, PP2B, PP5 e PP7) e fosfatase FCP.

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação de subunidades moduladoras e/ou reguladoras das proteínas serina/treonina fosfatases de *Dictyostelim discoideum*

Como detalhado na introdução, as subunidades catalíticas das PP1 (PP1c) e PP4 (PP4c) não existem livremente, mas sim em associação com uma ou mais subunidades não-catalíticas que modulam sua localização subcelular, especificidade de substrato e atividade enzimática (Aggen *et al.*, 2000; Bollen, 2001; Ceulemans *et al.*, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004; Cohen *et al.*, 2005; Bennett & Alphey, 2006). Até hoje, mais de 50 proteínas apontadas como potenciais subunidades reguladoras, moduladoras ou direcionadoras da PP1c já foram identificadas em diversos organismos, mas a caracterização funcional está restrita à apenas algumas delas. Assim, nosso objetivo nesta parte do trabalho foi identificar, utilizando ensaios no sistema de duplo híbrido em leveduras, proteínas que interagem com as subunidades catalíticas das serina/treonina fosfatases do tipo 1 (DdPP1c) e do tipo 4 (DdPP4c) de *D. discoideum*, na busca de potenciais candidatas a subunidades reguladoras destas enzimas neste organismo.

Para os ensaios de duplo híbrido em leveduras, utilizamos o sistema baseado em GAL4, um fator de transcrição que possui dois domínios funcionais: o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ativação da transcrição (Bartel & Fields, 1995; Bai & Elledge, 1997; Fields & Bartel, 2001)**.** Neste sistema, o domínio de ligação de GAL4 ao DNA é expresso em fusão com a proteína denominada “isca” (em nosso trabalho, DdPP1c e DdPP4c), enquanto seu domínio de ativação é expresso fusionado à proteína denominada “presa”, que eventualmente estará codificada na biblioteca de cDNA utilizada na varredura. Utilizamos os vetores pGBKT7 e pACT2, que possibilitam, respectivamente, a clonagem da isca em fusão com o domínio de ligação de GAL4 e a construção da biblioteca de cDNA em fusão com o domínio de ativação de GAL4. Ambas as proteínas de fusão co-expressas na levedura são direcionadas para o núcleo da célula e, se houver interação entre elas, os genes repórteres cromossomais *HIS3* e *lacZ* serão ativados, tendo em vista a aproximação dos domínios de ligação e de ativação de GAL4. Na linhagem de levedura que utilizamos, AH109, a expressão desses dois genes repórteres está sob controle de dois diferentes promotores, GAL1 e MEL1, ambos ativados por GAL4.

Para a varredura utilizamos bibliotecas de cDNA das fases de crescimento e desenvolvimento da linhagem AX4 de *D. discoideum*, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Adam Kuspa (Baylor College of Medicine, Houston, EUA). As bibliotecas denominadas VEG01, VEG02 e VEG03 foram preparadas a partir de mRNAs de células da fase de crescimento (vegetativas) e diferem quanto ao tamanho médio de seus insertos (figura

7A). Para preparação das bibliotecas denominadas DEV01 e DEV02, foi utilizado mRNA de diferentes tipos celulares coletados entre 4 e 18 horas ao longo do desenvolvimento em filtros (S. Lu e A. Kuspa, resultados não publicados). Também neste caso, as duas bibliotecas diferem quanto ao tamanho médio de seus insertos (figura 7A). Os cDNAs de cada fase foram clonados nos sítios de restrição *Eco*RI e *Xho*I do vetor pACT2 (Clontech) e podem ser excisados pela clivagem com *Bgl*II (figura 7B)

4.1.1. Obtenção das iscas para varredura das bibliotecas de cDNA do sistema de duplo híbrido

Para obtenção das iscas, os cDNAs das DdPP1c, DdPP1cF269C e DdPP4c foram clonados em fusão com o domínio de ligação do fator de transcrição GAL4 no vetor pGBKT7, gerando as construções pGBKT7-DdPP1c, pGBKT7-DdPP1cF269C e pGBKT7-DdPP4c (Fiorini, 2003; Sousa-Canavez, 2005). Para obtenção da construção pGBKT7-DdPP1cF269C, foi utilizada uma seqüência codificadora mutante da DdPP1c, onde o resíduo de fenilalanina 269 foi substituído por um resíduo de cisteína. Como mencionado anteriormente, em *D. discoideum*, esta fenilalanina substitui um resíduo de cisteína que é conservado na PP1c de todos os demais eucariotos. Apesar desta substituição de apenas um resíduo, a DdPP1cF269C recombinante exibe uma atividade enzimática aumentada e uma maior sensibilidade a caliculina A (Andrioli *et al.*, 2003).

As três construções foram utilizadas na transformação da cepa de levedura AH109 e a expressão das proteínas de fusão foi confirmada por imunodetecção com o anticorpo anti-c-Myc (Clontech), uma vez que o vetor pGBKT7 também confere fusão com este epitopo. A figura 8A mostra que as proteínas DdPP1c e DdPP1cF269C estão sendo expressas na levedura AH109 com massa molecular de aproximadamente 57 kDa (canaletas 3 e 4), em virtude da fusão com o domínio de ligação GAL4 e com o epitopo c-Myc que acrescenta cerca de 20 kDa às proteínas fusionadas. Na canaleta 3 da figura 8B podemos observar que a DdPP4c foi expressa com massa molecular de aproximadamente 55 kDa, refletindo o acréscimo de cerca de 20 kDa à sua massa de aproximadamente 35 kDa. Como esperado, o anticorpo anti-c-Myc também reconheceu a proteína p53 expressa nas leveduras transformadas com a construção pGBKT7-p53 (Clontech), utilizada como controle positivo nestes ensaios (Figuras 8A e 8B, canaleta 2).

Uma vez que as iscas estavam sendo expressas adequadamente, verificamos a existência ou não de auto-ativação do sistema pelas proteínas de fusão. Dados anteriores (Sousa-Canavez, 2005) já haviam demonstrado que as iscas DdPP1c e DdPP1cF269C não ativam os genes repórteres *HIS3* e *lacZ* independente da interação com a presa. A figura 9A mostra que os clones expressando DdPP1c ou DdPP1cF269C, quando seqüencialmente transformados com o vetor pGADT7 vazio, não cresceram no meio sem

histidina e não exibiram atividade de β-galactosidase. Observamos o mesmo resultado para a isca DdPP4c. A figura 9B mostra a ausência de crescimento em meio seletivo (sem histidina) das leveduras AH109 transfectadas com a construção pGBKT7-DdPP4c e seqüencialmente com o vetor pGADT7 vazio. Vale destacar que este vetor é derivado do pACT2 sendo a diferença apenas a inclusão de alguns sítios adicionais de clonagem.

Como controles nos ensaios de interação no sistema duplo híbrido, utilizamos proteínas de fusão que sabidamente interagem ou não neste sistema. A proteína p53 que interage com antígeno T funciona como controle positivo da interação (Iwabuchi *et al.*, 1993; Li & Fields, 1993). Já a Lamina C que não forma complexo e não interage com a maioria das proteínas já testadas é utilizada como controle negativo (Bartel *et al.*, 1993; Ye & Worman, 1995). Como esperado, as leveduras AH109 co-expressando p53 e antígeno T cresceram no meio seletivo para interação (sem histidina) e apresentaram colônias azuis no teste de β-galactosidase. Já as leveduras AH109 co-expressando Lamina C e antígeno T não cresceram na ausência de histidina e não produziram colônias azuis. Como controle positivo para ensaio de β-galactosidase também utilizamos em alguns experimentos a levedura AH109 transformada com a construção pCL1 (Clontech), que expressa o fator de transcrição GAL4 selvagem. Um resumo das características destas construções está apresentado na tabela 2, juntamente com as características dos demais vetores utilizados nesta parte do trabalho.

A

NOME DA BIBLIOTECA	FASE DO CICLO DE VIDA DE *D. discoideum*	TAMANHO MÉDIO DOS INSERTOS (kpb)	TITULAÇÃO DA BIBLIOTECA[1] (pfu/mL)	NÚMERO DE CLONES INDEPENDENTES[2]
VEG01	Crescimento	0,5 – 1,0	$1,5 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^{6}$
VEG02		1,0 – 1,6	$1,5 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^{7}$
VEG03		1,6 – 5,0	$3,0 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^{6}$
DEV01	Entre 4 e 18 horas de desenvolvimento em filtros	0,5 – 7,0	$7,0 \times 10^{9}$	$4,3 \times 10^{6}$
DEV02		1,3 – 5,0	$8,0 \times 10^{9}$	$1,2 \times 10^{7}$

[1] não amplificada
[2]após a excisão de 10^{8} fagos recombinantes

B

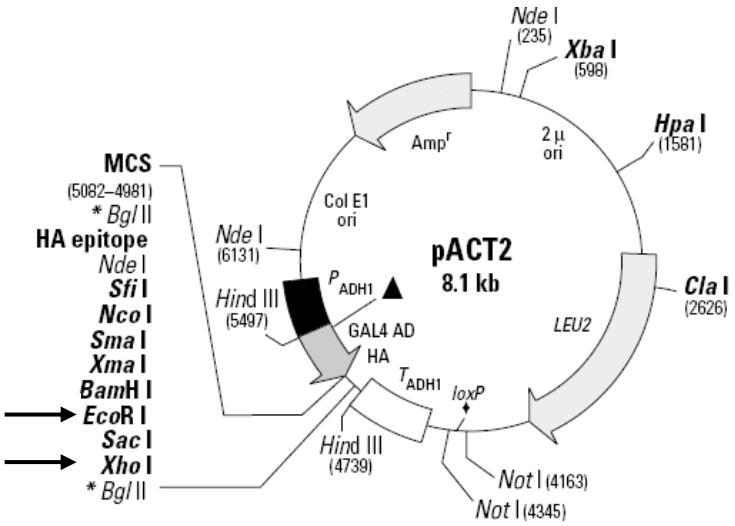


Figura 7: A. Lista das bibliotecas utilizadas para a varredura. Estas bibliotecas foram preparadas no vetor pACT2 a partir de cDNAs obtidos de mRNAs de fase de crescimento (bibliotecas VEG01, 02 e 03) e de desenvolvimento (bibliotecas DEV01 e 02) de *D. discoideum*. O tamanho dos insertos e a titulação da biblioteca estão indicados para cada caso. **B. Mapa do vetor pACT2 (Clontech).** Os cDNAs foram clonados nos sítios de restrição *Eco*RI e *Xho*I (indicados pelas setas) em fusão com o domínio de ativação GAL4AD e com epitopo HA (hemaglutinina). Este vetor apresenta as marcas *LEU2* e Amp^{r}, para seleção, respectivamente, em leveduras e bactérias. Os sítios da enzima *Bgl*II, utilizada na excisão dos insertos, estão indicados com asteriscos.

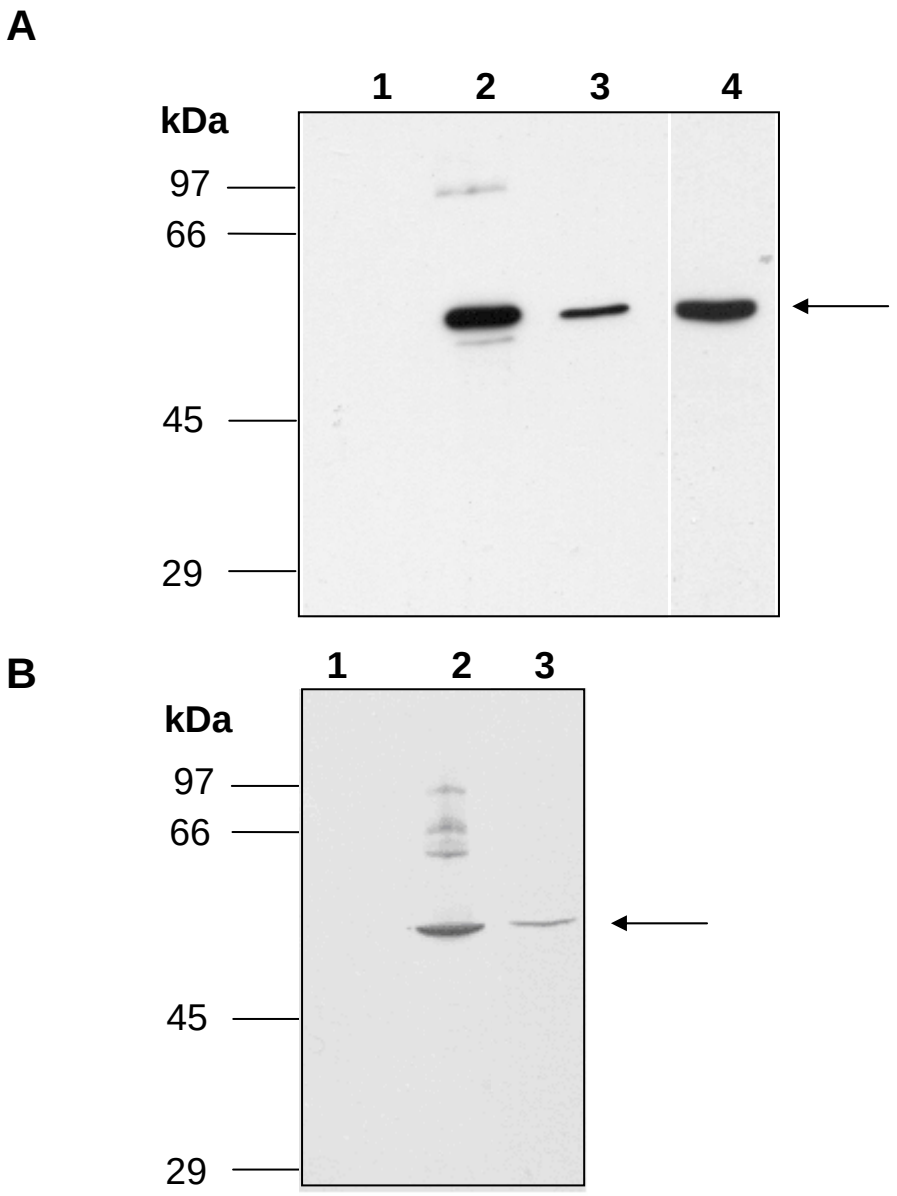


Figura 8: Expressão das fosfatases DdPP1c, DdPP1cF269C e DdPP4c em fusão com o domínio de ligação GAL4. Amostras de extratos celulares lisados da linhagem AH109 selvagem e transformada separadamente com as distintas construções plasmidiais foram submetidas a SDS-PAGE. Após a separação, os polipeptídeos foram transferidos para membranas de nitrocelulose, seguindo-se incubação com o anticorpo monoclonal anti-cMyc na diluição 1:500 e detecção por quimioluminescência (kit ECL - GE Healthcare). **A.** Extrato celular da linhagem AH109 transformada com as construções pGBKT7-p53 (canaleta 2), pGBKT7-DdPP1c (canaleta 3) e pGBKT7-DdPP1cF269C (canaleta 4). **B.** Extrato celular da linhagem AH109 transformada com as construções pGBKT7-p53 (canaleta 2) e pGBKT7-DdPP4c (canaleta 3). Em ambos os géis, o extrato da linhagem AH109 não transfomada foi aplicado na canaleta 1. Os marcadores de massa molecular em kDa estão indicados à esquerda e as setas à direita indicam as proteínas de fusão expressas. A foto mostrada no painel A foi modificada de Sousa-Canavez, 2005.

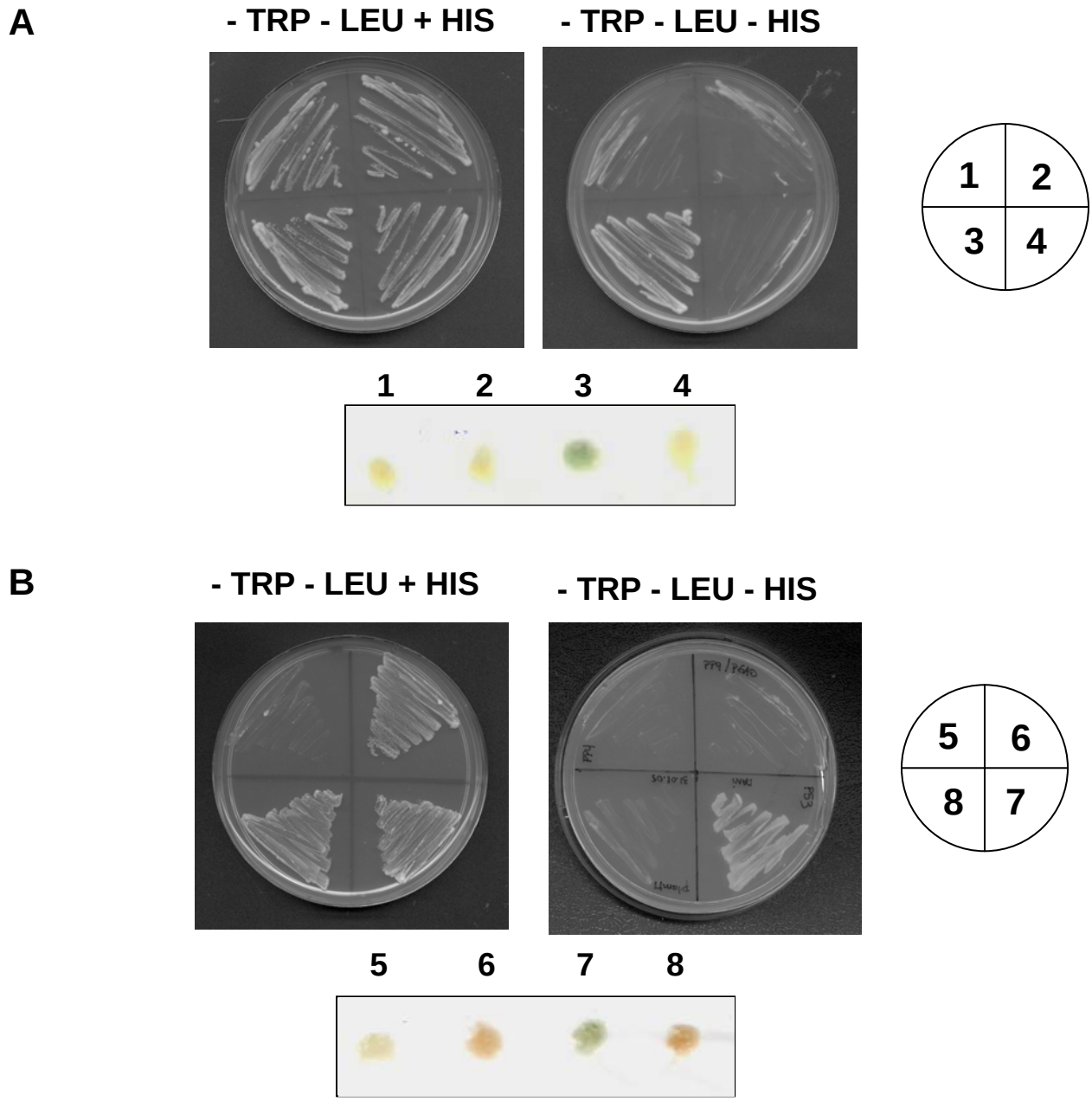


Figura 9: Verificação da existência ou não de auto-ativação dos genes repórteres pelas iscas DdPP1c, DdPP1cF269C e DdPP4c. A. A cepa AH109 foi transformada com a construção pGBKT7-DdPP1c (clone 1) ou pGBKT7-DdPP1cF269C (clone 2) e em seguida com o plasmídeo pGADT7. **B.** A cepa AH109 foi transformada com a construção pGBKT7-DdPP4c (clone 6) e sequencialmente com o vetor pGADT7. Os clones 3 e 7 (controle positivo da interação) foram obtidos após transformação de AH109 com pGBKT7-p53 e pGADT7-antígenoT, enquanto os clones 4 e 8 (controle negativo da interação) foram obtidos após transformação com pGBKT7-Lam e pGADT7-antígenoT. O clone 5 corresponde à linhagem AH109 transformada apenas com pGBKT7-DdPP4c. A interação foi analisada pela ativação dos repórteres *HIS3* e *lac*Z. Os transformantes que continham os dois plasmídeos selecionados em meio SD sem Trp e Leu (-Trp -Leu +His) foram semeados em meio SD sem Trp, Leu e His (-Trp -Leu -His). As placas foram incubadas a 30°C por 2-3 dias. Colônias crescidas neste meio foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas em nitrogênio líquido por 30 segundos. A membrana foi então colocada em tampão Z, contendo X-β-Gal (1 mg/mL) e incubada a 37°C, por no máximo 4 horas, até o aparecimento de cor. A figura mostrada em **A** foi modificada de Sousa-Canavez, 2005.

Tabela 2: Vetores utilizados no sistema de duplo híbrido em levedura baseado em GAL4

NOME DO VETOR (CLONTECH)	FUSÃO	EPITOPO[1]	MARCA DE SELEÇÃO EM LEVEDURA	MARCA DE SELEÇÃO EM BACTÉRIA
pGBKT7	Domínio de ligação de GAL4/isca	c-Myc	*TRP1*	Canamicina
pGADT7	Domínio de ativação de GAL4/presa (biblioteca de cDNA)	HA	*LEU2*	Ampicilina
pACT2		HA	*LEU2*	Ampicilina
pCL1	GAL4	---	*LEU2*	Ampicilina
pGADT7-antígenoT	Domínio de ativação de GAL4 /antígeno T	HA	*LEU2*	Ampicilina
pGBKT7-p53	Domínio de ligação de GAL4/p53	c-Myc	*TRP1*	Canamicina
pGBKT7-Lam	Domínio de ligação de GAL4/Lamina C	c-Myc	*TRP1*	Canamicina

[1]Os epitopos HA (hemaglutinina) e c-Myc possibilitam a imunodetecção das proteínas fusionadas expressas nas leveduras transformadas com as respectivas construções.

4.1.2. Varredura das bibliotecas de duplo híbrido com as iscas DdPP1c e DdPP1F269C

Confirmada a ausência de auto-ativação do sistema pelas iscas, realizamos inicialmente a varredura das bibliotecas de cDNA de *D. discoideum* com a isca correspondente a DdPP1c. Para tanto, a linhagem AH109 expressando esta isca foi transformada, separadamente, com DNA plasmidial purificado das bibliotecas VEG01, VEG02, VEG03, DEV01 e DEV02, descritas na figura 7A. Para a avaliação da eficiência da transformação, diluições seriadas (10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}) de cada uma das transformações foram semeadas em meio sem triptofano e leucina e o número de clones foi estimado. Em todas as transformações realizadas obtivemos entre 10^5 e 10^6 clones. Para seleção dos clones positivos para interação com a isca utilizada na varredura, após a transformação as leveduras foram semeadas em meio de cultura sem triptofano, leucina e histidina contendo 10 mM de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT), para eliminação de falsos positivos. Este composto é um inibidor competitivo da imidazol glicerol-fosfato desidratase (codificada pelo gene *HIS3*) e é utilizado para inibir baixos níveis de expressão desta enzima, suprimindo assim o crescimento das leveduras na ausência de histidina quando não ocorre interação (Durfee *et al.*, 1993; Fields & Sternglanz, 1994).

Como resultado das varreduras das cinco bibliotecas com a isca DdPP1c, obtivemos o total de 347 clones que cresceram em meio sem Trp/Leu/His, os quais foram transferidos para membranas de nitrocelulose e para realização do teste da atividade da β-galactosidase. A figura 10 mostra exemplos de colônias positivas para o teste de β-galactosidase de alguns desses clones, sendo que o total de 133 clones apresentou colônias azuis na presença do substrato X-β-Gal. A tabela 3 indica o número de clones positivos em ambas as seleções realizadas (meio sem histidina e presença de colônias azuis no teste da β-galactosidase) resultante das varreduras de cada biblioteca.

Os clones com evidência da ocorrência de interação no sistema de duplo híbrido, isto é, que cresceram em meio sem histidina e apresentaram coloração azul no teste da β-galactosidase foram cultivados em pequena escala para isolamento dos plasmídeos, os quais foram individualmente utilizados para transformação de *E. coli* (cepa Sure). Os clones de bactérias resistentes à ampicilina (marca de seleção do vetor pACT2) foram selecionados e a preparação plasmidial correspondente a cada clone positivo para interação foi analisada por digestão com a enzima de restrição *Bgl*II, para verificação da presença e tamanho do inserto de cDNA clonado no vetor pACT2. Na figura 11, apresentamos um resultado representativo das digestões com *Bgl*II dos clones selecionados, demonstrando as diferenças de tamanho dos insertos excisados. Os plasmídeos que apresentaram insertos foram seqüenciados utilizando-se os primers pACT2 e GAL4AD (ver item 3.4.9). Obtivemos com sucesso as seqüências completas ou parciais de 82 clones, as quais foram

comparadas com a base de genes de *D. discoideum*, utilizando-se o programa BLAST. A tabela 04 lista as identidades dos 31 genes identificados após esta comparação. É importante destacar que os insertos de cDNA das presas obtidas em nossas varreduras nem sempre representam a totalidade da seqüência codificadora do gene correspondente. Além disso, houve vários casos em que alguns dos clones selecionados nas varreduras apresentaram elevada redundância. Por exemplo, 30 dos 82 clones sequenciados correspondem ao cDNA codificador da proteína ribossomal L7a, enquanto que 5 clones correspondem ao cDNA relativo à proteína ribossomal S6. Por outro lado, vários dos clones identificados correspondem a ORFs hipotéticas ainda não anotadas na base de genes de *D. discoideum*. As prováveis identidades destes e dos demais clones considerados como positivos para interação serão discutidas adiante.

Também realizamos a varredura das bibliotecas VEG02 e DEV02 com a isca DdPP1cF269C, seguindo o mesmo procedimento descrito para a isca DdPP1c, exceto pelo fato de que a seleção foi realizada na presença de uma menor concentração (5 mM) de 3AT. Como já mencionado, a proteína DdPP1cF269C corresponde a uma variante da DdPP1c, em que o aminoácido fenilalanina da posição 269 foi substituído por uma cisteína (Andrioli *et al.*, 2003). Esta enzima mutante apresenta características distintas da DdPP1c selvagem, incluindo maior estabilidade, maior atividade de fosforilase fosfatase e maior sensibilidade ao inibidor caliculina A. O resíduo substituído localiza-se em uma região importante da estrutura tridimensional da PP1c, a alça β12-β13 (figura 1). Em todas as PP1c seqüenciadas, esta posição é ocupada por uma cisteína, exceto na PP1c de *D. discoideum* (Andrioli *et al.*, 2003). Análises genéticas e estudos de mutagênese indicam que a alça β12-β13 é essencial na associação da PP1c tanto com as toxinas quanto com os inibidores (Goldberg *et al.*, 1995; MacKintosh *et al.*, 1995; Barford, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Bagu *et al.*, 1997; Connor *et al.*, 1999; Maynes *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2006a).

A eficiência obtida na transformação das leveduras expressando a isca DdPP1cF269C foi semelhante à observada com a isca DdPP1c (10^5 - 10^6 clones). Na expectativa de obter maior número de presas positivas, optamos por reduzir, nessas varreduras, a quantidade de 3AT para 5 mM, visto que concentrações mais altas de 3AT poderiam afetar a viabilidade de células recém-transformadas. Obtivemos 220 clones que cresceram em meio sem Trp/Leu/His, os quais foram então ensaiados para o teste da β-galactosidase, como realizado na varredura com a isca DdPP1c (dados não mostrados). Observamos que 156 clones apresentaram colônias azuis na presença do substrato X-β-Gal, sendo que obtivemos com sucesso a seqüência para 131 destes clones (Tabela 3). Surpreendentemente, a redundância obtida nestas varreduras foi significativa. Como mostrado na tabela 5, a maior parte das seqüências obtidas é relativa aos genes das

proteínas ribossomais L7a e S6, sendo que apenas sete genes podem ser considerados como potenciais candidatos para interação com a isca DdPP1cF269C. Em resumo, a menor estringência (3AT 5 mM) que utilizamos na seleção de clones positivos para interação aparentemente não resultou em um aumento do número de presas. Além disso, a maior parte dos clones considerados positivos quanto à interação com a isca DdPP1c não foi identificada na varredura com a isca DdPP1cF269C. Este resultado possivelmente reflete o fato de esta isca ter sido utilizada na varredura de apenas duas das cinco bibliotecas disponíveis. Entretanto, não podemos desconsiderar a possibilidade de que a substituição do resíduo Phe269 por Cys tenha alterado a capacidade de interação desta isca com determinadas presas. Por outro lado, cinco das sete presas identificadas na varredura com DdPPcF269C foram também identificadas na varredura com a isca DdPP1c (genes *BC4V2_0_02017*, *kinX*, *BEC6V2_0_01091*, *BEC6V2_0_01186* e *mlh3,* Tabelas 4 e 5).

Todas as interações consideradas como positivas e listadas nas tabelas 4 e 5 estão sendo individualmente testadas uma vez mais no ensaio de duplo híbrido em colaboração com os alunos de iniciação científica Renato A. Raposo e Isabel I. Ramos. Para isto, os plasmídeos contendo os cDNAs relativos às presas foram novamente purificados e utilizados na transformação da linhagem AH109 que expressa a isca DdPP1c. A interação está sendo confirmada, mais uma vez, pela ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*. Até o momento, confirmamos a interação com a PP1c no sistema do duplo híbrido para 8 presas (*JC1V2_0_01126*, *ksnD*, *polZ*, *BEC6V2_0_01186*, *JC2V2_0_02330*, *BC4V2_0_02017, mlh3 e JC1V2_0_01698*). A figura 12 mostra a confirmação das interações para as presas *ksnD* e *JC2V2_0_02330*. Os resultados para as demais presas foram similares (dados não apresentados). Além disso, verificamos que nenhuma destas presas interage com a isca correspondente a DdPP4c (dados não mostrados), evidenciando a especificidade destas interações.

Dentre os cDNAs encontrados nas varreduras com a DdPP1c (Tabela 4), destacamos aqueles relativos às ORFs hipotéticas *JC2V2_0_02330*, *JC1V2_0_01126*, *BEC6V2_0_01186 e BC4V2_0_02017* que são fortes candidatas a proteínas que interagem com a PP1c e que ainda não foram caracterizadas. Estes genes são expressos durante o ciclo de vida de *D. discoideum*, dado que para todos eles existem ORFs depositadas no dictyBase.

O cDNA relativo ao gene *ksnD* que codifica para a proteína *Kinesin 4* também foi encontrado nas varreduras e sua interação com a PP1c foi confirmada através dos ensaios de duplo híbrido (figura 12). Em *Drosophila melanogaster*, uma proteína similar às proteínas da família das *kinesin*s e denominada KLP38B (*kinesin-like protein at 38B*) aparentemente interage com a PP1c tanto *in vivo* como *in vitro* (Alphey *et al.*, 1997). Outro cDNA encontrado nas varreduras com a DdPP1c foi o relativo ao gene *gefL*, que codifica a

proteína *Ras guanine nucleotide exchange factor*. Alguns estudos sugerem que a PP1 está envolvida na via de transdução de Ras (Mattingly & Macara, 1996; Mattingly, 1999; Mattingly *et al.*, 1999).

A varredura das bibliotecas com as iscas DdPP1c e DdPP1cF269c (Tabelas 4 e 5) revelou o cDNA que codifica para a proteína KinX (*LISK family protein kinase*). Estudos sugerem que membros da família das LISK (*LIM domain and testis-specific kinase*) de metazoários têm um papel na dinâmica dos filamentos de actina pela fosforilação de proteínas que interagem com actina, tais como a cofilina. Já foi demonstrado que a PP1c, além de estar associada à cofilina, também é responsável pela sua desfosforilação (Ambach *et al.*, 2000; Samstag & Nebl, 2003). Ainda que as quinases LISK encontradas em *D. discoideum* não contenham os domínios LIM (Wetterauer *et al.*, 1995; Wetterauer, 2000) que estão envolvidos em interações protéicas, será interessante investigar se de fato KinX interage com a PP1c em *D.discoideum*.

Outro produto gênico apontado como candidato a proteína que interage com a PP1c que identificamos foi o relativo à *chcA* (cadeia pesada da clatrina), que possui 57% de identidade com a proteína de mamífero (Ruscetti *et al.*, 1994). A clatrina faz parte do envoltório de vesículas envolvidas na endocitose da membrana plasmática, sendo composta de 3 cadeias pesadas de aproximadamente 190 kDa e três cadeias leves de aproximadamente 30 kDa (Kirchhausen, 1999; Kirchhausen, 2000). Em um estudo recente, foi demonstrado que a PP1c está associada à cadeia leve da clatrina (CLb) purificada de cérebro bovino e que esta possivelmente inibe a atividade catalítica da PP1 e também levemente da PP2A (Hiraga *et al.*, 2006). Entretanto, não há relatos que tenham demonstrado interação da PP1c com a cadeia pesada da clatrina como a sugerida por nossas observações.

Como já ressaltado, vários dos candidatos identificados nas varreduras correspondem a ORFs hipotéticas ou hipotéticas conservadas (tabelas 4 e 5) que não apresentam similaridade significativa com proteínas de função conhecida. Entre estas, citamos o gene *JC1V2_0_01698* (DDB0190820), que de acordo com nossas análises apresenta similaridade com o inibidor-3 da PP1c de mamíferos (Zhang *et al.*, 1998) e que em leveduras é denominado Ypi1p (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Este gene foi selecionado para um estudo mais aprofundado, como será apresentado adiante.

Por razões que desconhecemos, as varreduras que realizamos não selecionaram o cDNA que codifica para o inibidor-2 da PP1 de *D. discoideum* (DdI-2), que sabidamente interage com esta proteína *in vivo* e *in vitro* (Souza-Canavez et al., 2007). Uma possibilidade é que o cDNA de DdI-2 não esteja representado nas bibliotecas utilizadas em nossas varreduras.

Finalmente, é importante ressaltar que possivelmente algumas interações identificadas nas varreduras que realizamos resultam de interações da PP1c com domínios protéicos codificados pelas seqüências parciais dos cDNAs representados nas bibliotecas utilizadas. Estas interações não necessariamente refletem uma associação verdadeira da proteína que contém o respectivo domínio com a PP1c. A confirmação da interação da PP1c com a proteína completa irá exigir a clonagem e expressão de cDNA completos e a utilização de outros ensaios, tais como co-imunoprecipitação, a fim de verificarmos a autenticidade das interações detectadas nas varreduras.

Tabela 3: Número de presas positivas obtidas das varreduras realizadas com as iscas DdPP1c, DdPP1cF269C e DdPP4c.

ISCA	BIBLIOTECA	NÚMERO DE PRESAS POSITIVAS PARA CRESCIMENTO EM MEIO SEM HISTIDINA	NÚMERO DE PRESAS POSITIVAS PARA TESTE DA β-GALACTOSIDASE
DdPP1c	VEG01	90	23
DdPP1c	VEG02	75	24
DdPP1c	VEG03	72	32
DdPP1c	DEV01	72	33
DdPP1c	DEV02	38	21
DdPP1cF269C	VEG02	149	96
DdPP1cF269C	DEV01	71	60
DdPP4c	VEG01	36	14
DdPP4c	VEG02	19	2
DdPP4c	VEG03	30	3
DdPP4c	DEV01	24	5

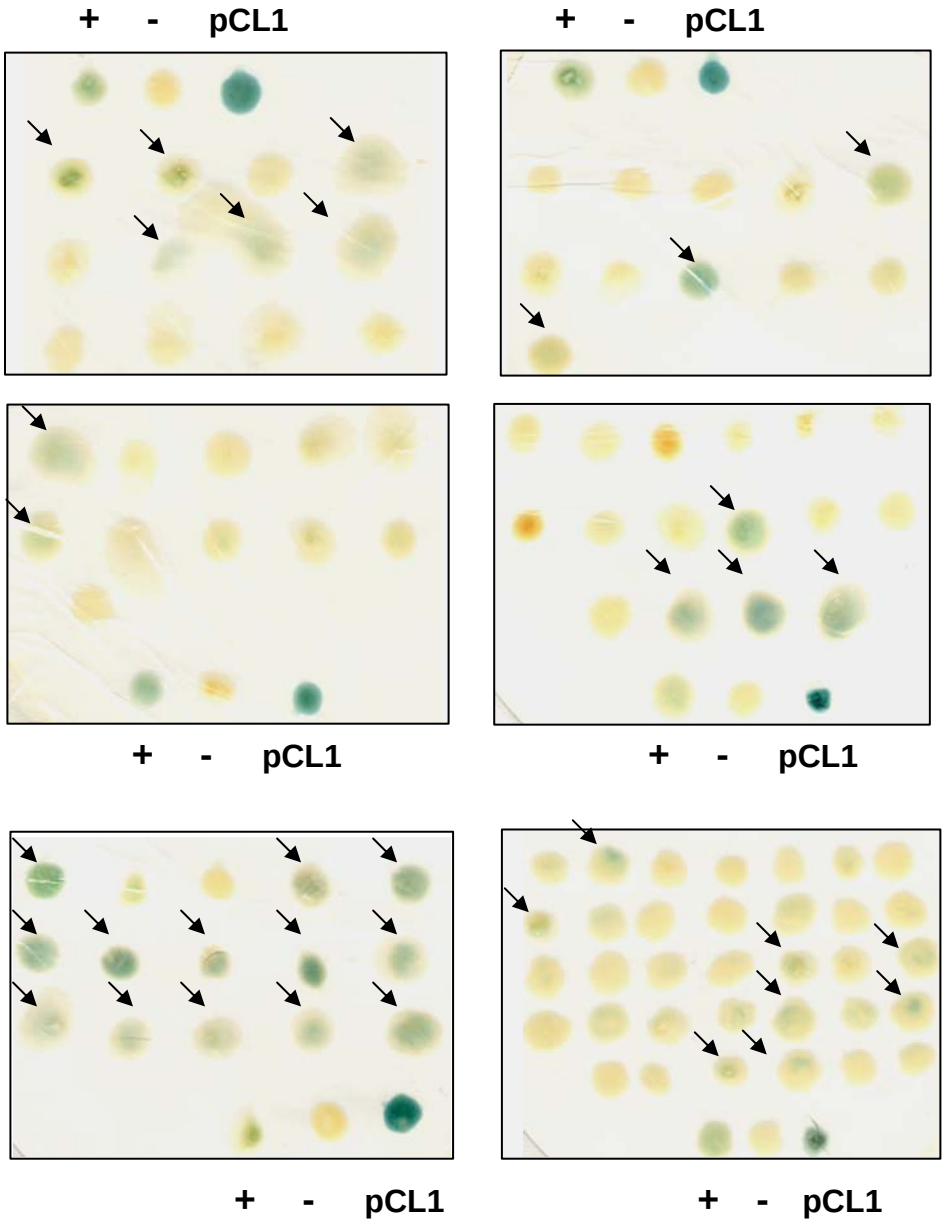


Figura 10: Teste da β-galactosidase para alguns dos clones positivos selecionados em meio sem triptofano, leucina e histidina resultantes da varredura das bibliotecas VEG01, VEG02, VEG03, DEV01 e DEV02 com a isca DdPP1c. A cepa AH109 contendo a isca DdPP1c foi transformada com as bibliotecas separadamente e as possíveis interações foram analisadas pela ativação dos repórteres *HIS3* e *lac*Z. Os transformantes selecionados em meio sem Trp/Leu/His foram transferidos para membrana de nitrocelulose para realização do teste de atividade de β-galactosidase com substrato X-β-Gal. Os controles positivo (+) da interação (p53-AntígenoT), negativo (-) da interação (Lam-AntígenoT) e expressão constitutiva de β-galactosidase (pCL1) estão indicados na figura. As setas mostram alguns dos clones que foram considerados como positivos (coloração azulada) e tiveram o seu DNA plasmidial extraído para posterior sequenciamento.

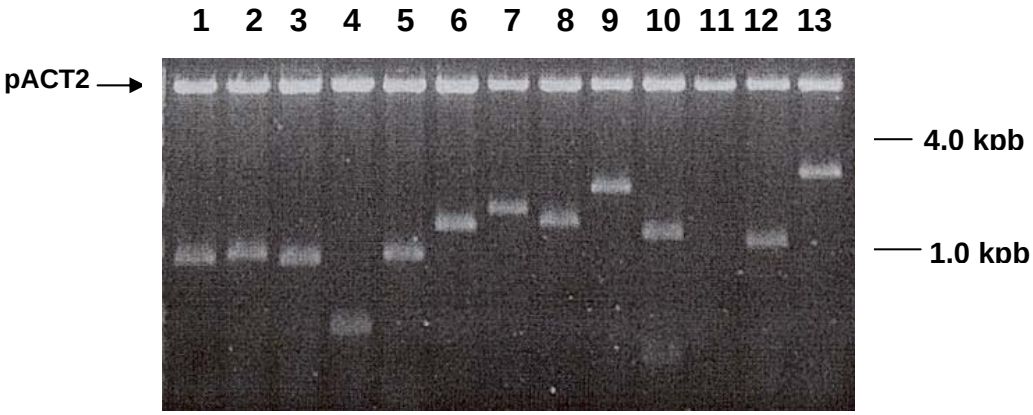


Figura 11: Análise dos plasmídeos isolados de clones selecionados das varreduras com a isca DdPP1c. Plasmídeos isolados de clones de leveduras que apresentaram evidência de interação no sistema de duplo híbrido, isto é, cresceram em meio sem histidina e apresentaram coloração azul no teste da β-galactosidase, foram utilizados na transformação de *E. coli*. Os clones de bactérias resistentes à ampicilina foram selecionados, as preparações plasmidiais correspondentes foram submetidas a digestão com a enzima de restrição *Bgl*II para excisão dos cDNAs clonados e analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A foto apresenta o resultado obtido para alguns dos clones resultantes da varredura das bibliotecas VEG02 e DEV01. O tamanho em kpb de marcadores está indicado à direita. A seta aponta a posição de migração do vetor pACT2 linearizado.

Tabela 4: Lista dos genes em que mapeiam as presas obtidas na varredura das bibliotecas VEG01, VEG02, VEG03, DEV01 e DEV02 com a isca DdPP1c.

Dictybase ID	gene	Número de clones	Produto Gênico[1]
DDB0231339	*rpl7a*	30	60S ribosomal protein L7a
DDB0190281	*JC1V2_0_01126*	5	ORF hipotética
DDB0230023	*rps6*	5	40S ribosomal protein S6
DDB0191404	*ksnD*	4	kinesin 4
DDB0191863	*BEC6V2_0_01091*	4	ORF hipotética
DDB0216865	*polZ*	3	DNA polymerase zeta catalytic subunit
DDB0231259	*rpl9*	3	60S ribosomal protein L9
DDB0185029	*chcA*	2	clathrin heavy chain
DDB0191988	*BEC6V2_0_01186*	2	ORF hipotética
DDB0202465	*JC2V2_0_02330*	2	ORF hipotética
DDB0218538	*mlh3*	2	MutL DNA mismatch repair protein
DDB0167887	*JC2V2_0_01558*	1	ORF hipotética conservada
DDB0168382	*JC2V2_0_00222*	1	ORF hipotética conservada
DDB0185197	*gefL*	1	Ras guanine nucleotide exchange factor
DDB0185218	*ifkA*	1	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) kinase
DDB0187208	*BC4V2_0_02017*	1	ORF hipotética
DDB0187737	*BC5V2_0_00403*	1	ORF hipotética conservada
DDB0188859	*BC5V2_0_01568*	1	ORF hipotética
DDB0190158	*JC1V2_0_00993*	1	ORF hipotética conservada
DDB0190820	*JC1V2_0_01698*	1	ORF hipotética
DDB0191228	*abcF2*	1	ABC transporter-related protein
DDB0191487	*kinX*	1	LISK family protein kinase
DDB0215012	*ctsD*	1	cathepsin D
DDB0216674	*JC1V2_0_01291*	1	ORF hipotética
DDB0218699	*BC4V2_0_01198*	1	ORF hipotética
DDB0219724	*BEC6V2_0_00495*	1	ORF hipotética
DDB0219977	*RPLP0*	1	ribosomal acidic phosphoprotein P0
DDB0230001	*DDB0230001*	1	ORF hipotética conservada
DDB0230012	*fray1*	1	STE20 family protein kinase
DDB0230138	*DDB0230138*	1	ORF hipotética conservada
DDB0231321	*gluS*	1	glutamate-tRNA ligase

[1]Para evitar imprecisão na tradução para a língua portuguesa mantivemos o nome de alguns produtos gênicos na língua inglesa.

Tabela 5: Lista dos genes obtidos na varredura das bibliotecas VEG02 e DEV02 com a isca DdPP1cF269C.

Dictybase ID	gene	Número de clones	Produto Gênico[1]
DDB0231339	*rpl7a*	91	proteina 60S ribossomal L7a
DDB0230023	*rps6*	30	proteina 40S ribossomal S6
DDB0190095	*JC1V2_0_00928*	3	ORF hipotética conservada
DDB0187208	*BC4V2_0_02017*	2	ORF hipotética
DDB0189585	*JC1V2_0_00384*	1	ORF hipotética
DDB0191487	*kinX*	1	LISK family protein kinase
DDB0191863	*BEC6V2_0_01091*	1	ORF hipotética
DDB0191988	*BEC6V2_0_01186*	1	ORF hipotética
DDB0218538	*mlh3*	1	MutL DNA mismatch repair protein

[1]Para evitar imprecisão na tradução para a língua portuguesa mantivemos o nome de alguns produtos gênicos na língua inglesa.

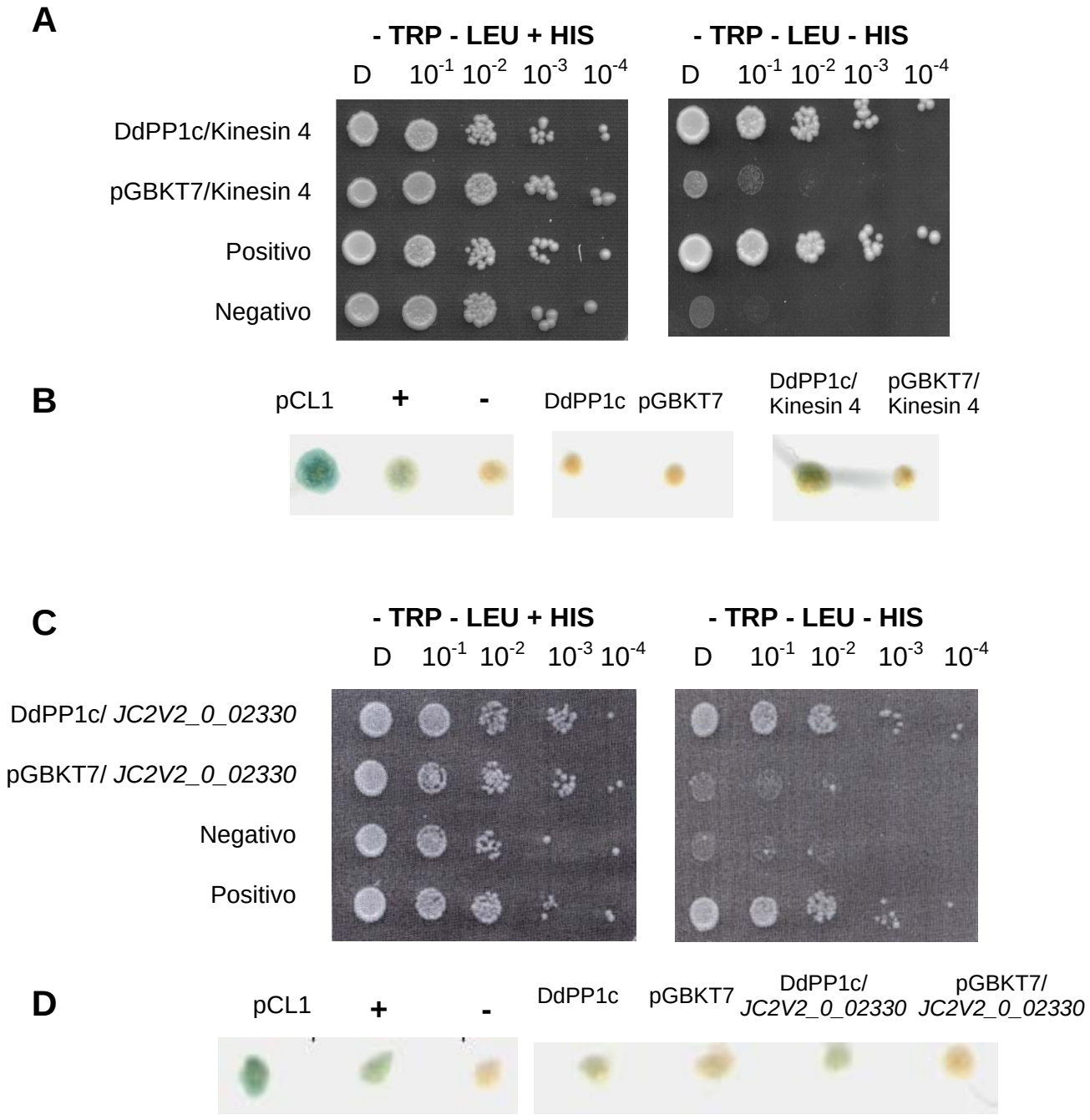


Figura 12: Ensaio para confirmação de interações identificadas na varredura com a isca DdPP1c. A cepa AH109 expressando a isca DdPP1c foi transformada com o pACT2-Kinesin 4 **(A)** ou pACT2-*JC2V2_0_02330* **(C)** derivados de clones positivos identificados nas varreduras. Como controle, estes plasmídeos foram utilizados para transformação da cepa AH109 previamente transformada com o vetor pGBKT7 vazio. Os transformantes contendo os dois plasmídeos foram semeados em meio SD sem Trp e Leu contendo ou não His.em 4 diluições seriadas (10 x a partir da DO_{600nm} = 0,2). As placas foram incubadas a 30°C por 2-3 dias. **B e D.** Os transformantes selecionados no meio requerido para cada linhagem foram transferidos para membrana de nitrocelulose para realização do teste da β-galactosidase com substrato X-β-Gal. Os controles positivo (+) da interação (p53-AntígenoT), negativo (-) da interação (Lam-AntígenoT) e expressão constitutiva de β-galactosidase (pCL1) estão indicados na figura.

4.1.3. Varredura das bibliotecas de duplo híbrido com a isca DdPP4c.

Utilizando os mesmos procedimentos descritos anteriormente, também realizamos a transformação da linhagem AH109 contendo a isca DdPP4c com DNA plasmidial purificado das bibliotecas VEG01, VEG02, VEG03 e DEV01 descritas na figura 7A. A seleção dos clones positivos para interação foi feita em meio sem Trp/Leu/His na presença de 10 mM de 3AT. Como resultado das varreduras das quatro bibliotecas com a isca DdPP4c, obtivemos o total de 109 clones que cresceram em meio sem Trp/Leu/His, os quais foram transferidos para membranas de nitrocelulose e para realização do teste da β-galactosidase. A tabela 3 indica o número de clones positivos em ambas as seleções realizadas (meio sem histidina e com presença de colônias azuis no teste da β-galactosidase). Contabilizamos 24 clones que apresentaram colônias azuis na presença do substrato X-β-Gal, sendo que obtivemos com sucesso a seqüência para 20 destes clones. A tabela 6 lista as identidades dos genes identificados após a comparação das seqüências obtidas com a base de genes de *D. discoideum*. Ainda que tenhamos observado a redundância de uma das presas (*vatE*), representada por nove clones positivos, sua identidade não está relacionada com as presas redundantes nas varreduras realizadas com as iscas DdPP1c e DdPP1cF269C. Além disso, nenhuma das demais presas selecionadas nesta varredura é coincidente com as presas identificadas nas varreduras com iscas relativas a PP1c.

Como podemos observar na tabela 6, o número de clones recuperados das varreduras com a isca DdPP4c foi bem menor do que com as iscas DdPP1c e DdPP1cF269C. Dentre os produtos gênicos que encontramos, destacamos o hspK (*heat shock protein Hsp20 domain-containing protein*) e a ORF hipotética *JC3V2_0_02512*, que aparentemente codifica para uma proteína similar a TCTP (*Translationally controlled tumor protein homolog*). Proteínas que interagem com a PP4c em outros organismos, tais como a subunidade R3 (Gingras *et al.*, 2005) ou a subunidade reguladora alfa 4 (Di Como & Arndt, 1996; Murata *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998) não foram encontradas em nossas varreduras, ainda que o genoma de *D. discoideum* codifique para ortólogos destas proteínas, como será discutido no item 4.2.3. adiante. Isto poderia ser explicado pelo fato de que a PP4c existe como um complexo e provavelmente a ligação com a subunidade R1 (que apresenta similaridade com a subunidade do tipo A da PP2A) possa facilitar a interação com uma terceira subunidade, como observado para a PP2A (Kloeker & Wadzinski, 1999; Janssens & Goris, 2001; Carnegie *et al.*, 2003).

Tabela 06: Lista dos genes obtidos na varredura das bibliotecas VEG01, VEG02, VEG03, DEV01 e DEV02 com a isca DdPP4c.

Dictybase ID	gene	Número de clones	Produto Gênico[1]
DDB0185070	*vatE*	9	vacuolar H+-ATPase E subunit
DDB0185227	*vatD*	3	vacuolar ATPase subunit DVA41
DDB0232129	*hspK*	1	heat shock protein Hsp20 domain-containing protein
DDB0231269	*ValS1*	1	valyl tRNA synthetase
DDB0219824	*CSN6*	1	Mov34/MPN/PAD-1 family protein
DDB0217179	*JC2V2_0_01218*	1	ORF hipotética
DDB0215341	*tipD*	1	homolog of mouse apg16L
DDB0204992	*JC3V2_0_02512*	1	ORF hipotética conservada
DDB0168199	*JC2V2_0_01176*	1	ORF hipotética
DDB0167402	*JC2V2_0_02078*	1	ORF hipotética conservada

[1]Para evitar imprecisão na tradução para a língua portuguesa mantivemos o nome de alguns produtos gênicos na língua inglesa.

4.1.4. Caracterização de DdI-3, um ortólogo do inibidor-3 da PP1c em *D. discoideum*

Como relatado anteriormente, quando a DdPP1c foi utilizada como isca na varredura das bibliotecas de cDNA de *D. discoideum*, identificamos entre as ORFs hipotéticas o gene *JC1V2_0_01698* (DDB0190820), que apresentou similaridade com o inibidor-3 da PP1c de mamíferos (Zhang *et al.*, 1998) e que em leveduras é denominado Ypi1p (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).

A interação da presa *JC1V2_0_01698* com a DdPP1c foi confirmada através dos ensaios de duplo híbrido mostrados na figura 13, na qual também demonstramos a ausência de auto-ativação do sistema por este gene, independente de interação. Para estes ensaios, a cepa AH109 de *S. cerevisiae* foi transformada com a construção pGBKT7-DdPP1c e seqüencialmente com a construção pACT2-*JC1V2_0_01698* recuperada da varredura das bibliotecas, sendo ensaiada a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*. Como controle, a mesma cepa foi transformada apenas com pACT2-*JC1V2_0_01698* ou com o vetor pGBKT7 vazio. Os clones foram então selecionados em meio sem Trp (para pGBKT7), em meio sem Leu (para pACT2-*JC1V2_0_01698*) ou em meio sem Trp e Leu (para pGBKT7-DdPP1c e pACT2-*JC1V2_0_01698*) e replicados em meio sem Trp/Leu contendo ou não His. Como pode ser visto na figura 13, nenhum dos clones expressando apenas a DdPP1c ou o hipotético inibidor-3 cresceu na ausência de histidina e nem apresentou colônias azuis na presença de X-β-Gal, demostrando que a presa *JC1V2_0_01698* não é capaz de ativar sozinha os repórteres *HIS3* e *lacZ*. Como esperado, observamos que as leveduras co-expressando as duas proteínas de fusão (DdPP1c e o produto de *JC1V2_0_01698*) cresceram em meio sem histidina e apresentaram coloração azul no teste da β-galactosidase, validando a ocorrência da interação.

De acordo com as informações disponíveis no dictyBase (http://dictybase.org), o gene *JC1V2_0_01698* está localizado no cromossomo 1, sendo sua seqüência codificadora composta por dois exons de 226 pb e 166 pb separados por um intron de 202 pb, como esquematizado na figura 14A. A seqüência de nucleotídeos dos exons e do intron, bem como a seqüência de aminoácidos deduzida a partir da porção codificadora deste gene, está apresentada na figura 14B. Vale ressaltar que duas ESTs oriundas de bibliotecas de cDNA de *D. discoideum* da fase de pseudoplasmódio (Urushihara, 2002) mapeiam neste lócus gênico e confirmam a estrutura predita para o gene *JC1V2_0_01698* (figura 14A). Dados derivados de análise de expressão gênica através de microarranjos de DNA, disponíveis no dictyBase, sugerem que este gene é expresso constitutivamente em *D. discoideum*, corroborando dados obtidos por RT-qPCR obtidos em nosso laboratório (L. F. Martins, observações não publicadas).

Tendo em vista que *JC1V2_0_01698* codifica para o segundo inibidor de fosfatase identificado em *D. discoideum* (ver adiante), passamos então a designá-lo *dpiB* e o produto protéico corrrespondente foi denominado DdI-3 em analogia ao I-3 humano. A fase aberta de leitura do mRNA de DdI-3 possui 393 pares de bases que codificam, teoricamente, uma proteína de 130 aminoácidos, cuja massa molecular calculada é de 14.667 Da e o pI teórico corresponde a 6,79. DdI-3 apresenta 24% de identidade e 72% de similaridade com Ypi1p de *S. cerevisiae*, sendo que o valor de identidade aumenta para 44% se considerarmos a comparação apenas entre as porções centrais destas duas proteínas. A figura 15A mostra o alinhamento da seqüência de aminoácidos de DdI-3 com Ypi1p e I-3 humano, com a indicação da seqüência que corresponde ao motivo consenso **[R/K]-X_1-[V/I]-X_2-[F/W]** conservado na maioria das proteínas que interagem com a PP1c (Egloff *et al.*, 1997; Zhao & Lee, 1997; Aggen *et al.*, 2000; Cohen, 2002; Wakula *et al.*, 2003; Terrak *et al.*, 2004; Ceulemans & Bollen, 2006; Meiselbach *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que o resíduo de triptofano presente neste motivo, destacado na figura 15A, é essencial para a atividade, dado que sua substituição por alanina na proteína Ypi1p abole sua atividade inibidora de PP1c (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).

É importante destacar que proteínas hipotéticas ortólogas de Ypi1p estão codificadas nos genomas de diversos eucariotos e o alinhamento de suas seqüências define um domínio conservado (pfam07491.1) listado no CDD (*Conserved Domain Database*) (Marchler-Bauer *et al.*, 2007) e que está apresentado na figura 15B (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Entretanto, a caracterização bioquímica e funcional está descrita apenas para proteínas de *S. cerevisiae* e *H. sapiens* (Zhang *et al.*, 1998; Garcia-Gimeno *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Pedelini *et al.*, 2007).

Assim como Ypi1p e I-3 humano, DdI-3 apresenta conteúdo elevado de aminoácidos hidrofílicos (Asp + Glu = 16,2%; Ser + Thr = 22,3%; Lys + Arg = 15,4%). Entretanto, não identificamos motivos que indiquem que DdI-3 se localiza no núcleo ou nucléolo. Em células humanas da linhagem HEK293, I-3 co-localiza com distintas isoformas da PP1c no nucléolo e centrossomos graças à presença de uma seqüência de localização nuclear (33RKRK36) em sua porção aminoterminal e uma seqüência de localização nucleolar (94HRKGRRR100) em sua porção carboxiterminal (Huang *et al.*, 2005). Ademais, recentemente, foi demonstrado que Ypi1p é importante para a localização nuclear da PP1c em leveduras (Pedelini *et al.*, 2007).

A deleção de Ypi1p em *S. cerevisiae* é letal, sugerindo um importante papel deste inibidor na fisiologia desta levedura. Além disso, células que superexpressam Ypi1p apresentaram diferentes fenótipos, como decaimento do conteúdo de glicogênio celular, resultado consistente com o papel inibitório da atividade de PP1c exibido por esta proteína (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).

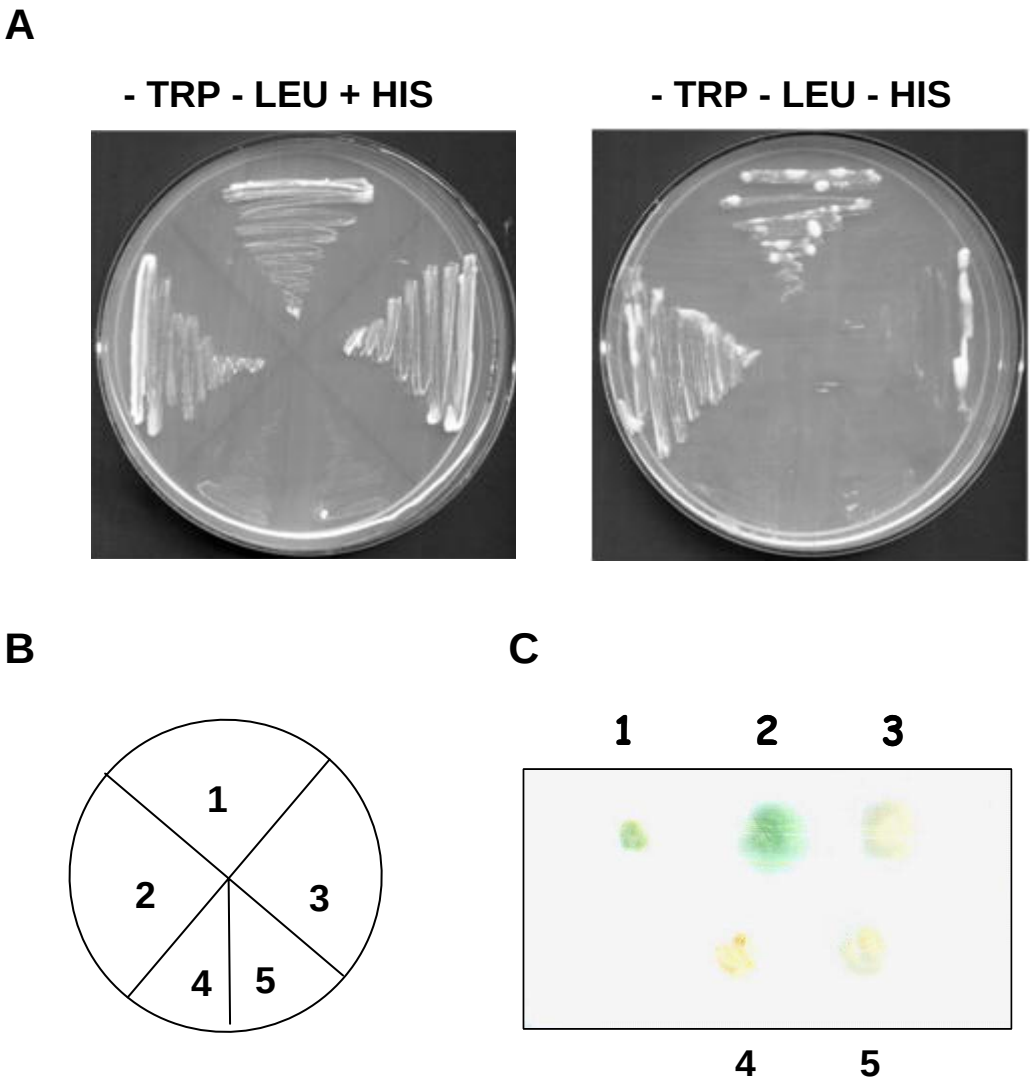
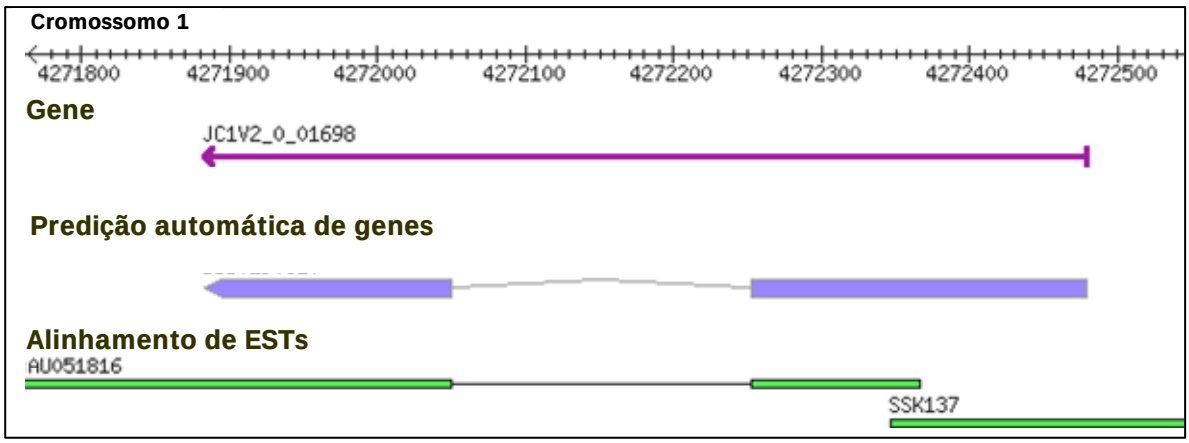


Figura 13: Ensaio para confirmação de interação entre a presa *JC1V2_0_01698* e a isca DdPP1c. (A) A cepa AH109 transformada com o vetor pGBKT7_DdPP1c (clone 4) foi sequencialmente transformada com a construção pACT2-*JC1V2_0_01698*, derivada da varredura da biblioteca, gerando a linhagem indicada como clone 1. A cepa AH109 transformada apenas com pACT2-*JC1V2_0_01698* corresponde ao clone 5. Os clones 2 e 3 representam respectivamente os controles positivo (p53-AntígenoT) e negativo (Lam-AntígenoT) da interação. Os transformantes selecionados no meio requerido para cada linhagem foram semeados em meio SD sem Trp/Leu contendo ou não His **(A)** ou transferidos para membrana de nitrocelulose para realização do teste da β-galactosidase com substrato X-β-Gal **(C)**.

A



B

```
ATGCACACAACAAGATCACCAACTTTAGCAAGTTCACCAACTACAACAACAACGACAACA
 M  H  T  T  R  S  P  T  L  A  S  S  P  T  T  T  T  T  T  T
ACAACTCTTCTTCAAACTGAAAGTAGTGGCAGTACTAATAGTGGTCCAAATTCTCCACCA
 T  T  L  L  Q  T  E  S  S  G  S  T  N  S  G  P  N  S  P  P
ACATTAAGACTTGTTCTTGGAAAACCACCAAAAAAAGATAAAAAGAGAGTTCAATGGAAT
 T  L  R  L  V  L  G  K  P  P  K  K  D  K  K  R  V  Q  W  N
GAAGGGATTGTAGATAACGAAAATTTATCAAAAAAAAAATCAAAAAgtatgtttatttat
 E  G  I  V  D  N  E  N  L  S  K  K  K  S  K
ttaaatgttataataggaataaaggtcctattatatatatatatatatatttttttttt
ttatgtgttcatctttattgttgatgtcatttaaataataaataataataataataaat
aataataaaaaataaaaacaaaactataagtcaaagactaatatttttttatttttatttt
ctaaataagAATGTTGTATCTTTCATAAAAAGAAACCTTATGATGAAAGTAGTGATGAAG
          K  C  C  I  F  H  K  K  K  P  Y  D  E  S  S  D  E
TGAAGACGAACATAGAGCTATAAAACAAAAACCAAAACAAAACGAAGAGTGCGAATGTG
 S  E  D  E  H  R  A  I  K  Q  K  P  K  Q  N  E  E  C  E  C
AACATGAACATGGTGATCATAAT GACCATGGTCATGAAGAAAATCATTCTCATTAA
 E  H  E  H  G  D  H  N  D  H  G  H  E  E  N  H  S  H  -
```

Figura 14: Estrutura e seqüência do gene *JC1V2_0_01698* (*dpiB*). A. Esquema modificado da página do dictyBase (http://dictybase.org) que descreve a estrutura do gene *JC1V2_0_01698* (*dpiB*) localizado no cromossomo 1 de *D. discoideum*. A predição automática de genes indica a existência de dois exons (setas grossas em roxo) separados por um íntron (traço fino) que compõem a seqüência codificadora denominada DDB0190820. A orientação das setas indica o sentido da transcrição do gene. As ESTs que alinham com este gene estão indicadas por traços verdes. **B.** Seqüência de nucleotídeos dos exons de *dpiB* (em negrito) e do íntron com os códons de iniciação e terminação sublinhados. A seqüência de aminoácidos deduzida está indicada.

A

```
Hs -----MAEAGAGLSETVTETTVTVTTEPE-------NRSLTIKLRKRKP----EKKVEWT 44
Dd MHTTRSPTLASSPTTTTTTTTTLLQTESSGSTNSGPNSPPTLRLVLGKPPKKDKKRVQWN 60
Sc -MSGNQMAMGSEQQQTVGSRTVSVEEVPAVLQLRATQDPPRSQEAMPTR-----HNVRWE 54
            .:    *.   *. :   .        : .   :    .      :.*.*

Hs SDTVDNEHMGRRSSKCCCIYEKPR----------------AFGESSTESDEEEEEGCGHT 88
Dd EGIVDNENLSKKKSKKCCIFHKKK----------------PYDESSDESEDE-------- 96
Sc ENVIDNENMNKKKTKICCIFHPQNEDEEECNHHSDDDGSSSSGSSSSESENEKDLDFNER 114
   .. :***::.::.:* ***:.  .                 . ..** **::*

Hs HCVRGHRKGRRRATL-GPTPTTPPQPPDPSQPPPGPMQH-- 126
Dd -----HRAIKQKPKQ-NEECECEHEHGDHNDHGHEENHSH- 130
Sc RQRRLERRHRKLEKKRSYSPNAYEIQPDYSEYRRKQQEKKD 155
```

B

```
1-  gi 75020323  28 VLHLS.[ 8].SERRHVVWATETVDNEGMGKKKSKCCCIYK.[1].PKNWQDSS.[2].SDSDCE 87
2-  gi 74625244  34 ILRLR.[ 3].SNGRSVQWRSDVVDNEGLGRKKSKVCCIYH.[1].PKGVDESS.[2].SSSSSD 88
3-  gi 3219951   35 VLHLQ.[ 1].EPVRRVRWTVSTVDNEHMNKKKSKVCCIFH.[1].QRKFDESS.[2].SDSDSD 87
4-  gi 75160435  31 VLRLN      RKKKKVSWKDGTVDNEFMQKKSSKKCCIFH.[1].QKPFDEDD     SEEEDD 80
5-  gi 74739598  29 TIKLR.[ 2].KPEKKVEWTSDTVDNEHMGRRSSKCCCIYE.[1].PRAFGESS.[2].SDEEEE 82
6-  gi 74869925  39 LLRLE.[ 2].RNERRVAFHAGIIDNEHLNRKKSKCCCIYK.[1].PLAFGESS.[2].DDEDCE 92
7-  gi 74870551  59 CLRLA.[ 4].ITERHVHFHAGVIDNEHMNRRKSKCCCIYR.[1].PHPFGESS.[2].TDDECE 114
8-  gi 74959424  26 VLRLR.[ 2].PSPPHVTWAEGVVDNEHMGRLKSNCCCIYV.[1].PRQWDDPS.[2].EPNEYE 79
9-  gi 1176907   20 VLRLR.[ 2].VERPRVTWGAGVIDNEHMGRLKSNCCCIYT.[1].PRVWDDPS.[2].EPEEHE 73
10- gi 1175975   29 VLQLR.[12].PTRHNVRWEENVIDNENMNKKKTKICCIFH     PQNEDEEE.[2].HHSDDD 91
```

Figura 15: Comparação das seqüências de aminoácidos de inibidores do tipo 3. A. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de I-3 de *Homo sapiens* (Hs, CAC16920), de *D. discoideum* (Dd, XP_646558) e de Ypi1p de *Sacharomyces cerevisiae* (Sc, BAA09242) com seus respectivos números de acesso no GenBank. A numeração à direita corresponde à posição do resíduo na seqüência. As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W. (*) indica resíduos idênticos, (:) indica substituição conservativa e (.) indica substituição semi-conservativa. A seqüência correspondente ao motivo consenso [R/K]-X1-[V/I]-X2-[F/W] conservado na maioria das proteínas que interagem com a PP1c está indicado por um traço, com o resíduo de triptofano destacado em negrito. Alguns resíduos estão coloridos em azul e vermelho para facilitar sua identificação nas seqüências 5 e 10 do alinhamento mostrado na parte B da figura. **B.** Alinhamento da região conservada em ortólogos de Ypi1p identificados nos genomas de vários organismos e que compõem o domínio pfam07491.1 listado no CDD (*Conserved Domain Database*, Marchler-Bauer et al, 2007). As seqüências alinhadas correspondem a regiões de ortólogos de I-3 de de acordo com a numeração à esquerda: *Caenorhabditis elegans* (1, 8 e 9), *Neurospora crassa* (2) *Schizosaccharomyces pombe* (3), *Arabidopsis thaliana* (4), *H. sapiens* (5), *Drosophila melanogaster* (6 e 7) e *S. cerevisiae* (10). A numeração na cor verde corresponde a posição do resíduo na seqüência da proteína.

Para confirmarmos se DdI-3 também apresenta atividade inibitória da PP1c, optamos por obter a proteína recombinante correspondente em bactérias para então testar sua atividade. Inicialmente obtivemos o cDNA de DdI-3 a partir de RNA total de células de *D. discoideum* da fase de crescimento e realizamos a amplificação por PCR da seqüência codificadora de DdI-3 com os oligonucleotídeos DdI-3F e DdI-3R (item 3.4.9). A amplificação gerou um único fragmento de DNA com o tamanho esperado de aproximadamente 400 pb, o qual foi clonado no vetor pCR2.1 (figura 6). O seqüenciamento de um dos clones resultantes confirmou a seqüência de nucleotídeos previamente mostrada na figura 14B. Por outro lado, a amplificação a partir do DNA genômico de *D. discoideum* gerou um fragmento de aproximadamente 600 pb, confirmando a presença do intron que interrompe a seqüência codificadora deste gene (dados não mostrados).

O cDNA de DdI-3 foi excisado da construção pCR2.1-DdI-3 com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RV e subclonado no vetor de expressão pAE (Ramos *et al.*, 2004) previamente linearizado com *Bam*HI e *Pvu*II, gerando a construção pAE-DdI-3 (figura 6). Na figura 16 mostramos resultado de digestões de alguns clones com as enzimas *Hind*III, que lineariza a construção, e com *Eco*RI, que libera o inserto, indicando o sucesso da clonagem, o que também foi confirmado por seqüenciamento de DNA. A proteína expressa a partir do vetor pAE possui uma cauda aminoterminal com seis resíduos de histidina que possibilita sua purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

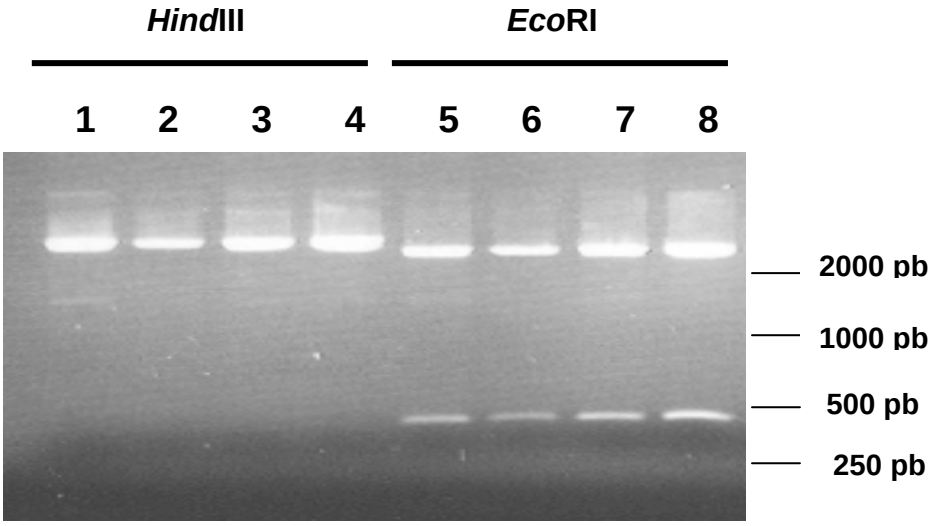


Figura 16: Caracterização da construção pAE-DdI-3 por enzimas de restrição. O inserto excisado da construção pCR2.1_DdI-3 com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RV foi ligado ao vetor pAE linearizado com *Bam*HI e *Pvu*II e a reação de ligação foi utilizada na transformação de *E.coli* cepa Sure. Os plasmídeos de alguns clones foram digeridos com as enzimas *Hind*III (canaletas 1, 2, 3 e 4) e *Eco*RI (canaletas 5, 6, 7 e 8). Dois destes clones foram seqüenciados para verificação da autenticidade da sequência de DdI-3 e da orientação da clonagem.

A construção pAE-DdI-3 foi então utilizada para transformação da cepa bacteriana BL21(DE3)pLysS (Stratagene). Optamos por utilizar esta cepa tendo em vista que ela apresenta pouco ou nenhum vazamento de expressão da proteína recombinante na ausência do indutor IPTG. Além disso, esta cepa também foi bastante adequada para expressão de DdI-2 um outro inibidor da PP1c de *D. discoideum* (Sousa-Canavez *et al.*, 2007). Após a transformação, 10 colônias foram selecionadas para crescimento e indução com IPTG 1 mM por 3 horas a 37°C. Na figura 17A mostramos o resultado da indução de dois clones selecionados, sendo que a proteína DdI-3 recombinante foi claramente induzida nestas condições. Com o objetivo de avaliar a solubilidade desta proteína recombinante, novas culturas foram induzidas com IPTG em três diferentes temperaturas (25°C, 30°C e 37°C), e após 3 horas as bactérias foram lisadas por sonicação e as frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação. O resultado apresentado na figura 17B mostra que rDdI-3 foi recuperada na fração solúvel do extrato de bactérias em todas as temperaturas de incubação. Os extratos obtidos a partir de células induzidas a 37ºC foram então utilizados para purificação da proteína.

Como pode ser observado na figura 17, rDdI-3 migra em SDS-PAGE como um polipeptídeo com massa molecular de cerca de 36 kDa, embora a massa molecular estimada para esta proteína seja de aproximadamente 15 kDa. Esta migração anômala em SDS-PAGE também é observada para I-3 de humano e Ypi1p, e provavelmente é conseqüência do alto conteúdo de aminoácidos hidrofílicos nestas proteínas que resulta em menor ligação de moléculas de SDS e menor mobilidade na eletroforese (Zhang *et al.*, 1998; Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).

Tendo em vista o sucesso na obtenção da proteína DdI-3 recombinante solúvel, seguimos com sua purificação. Em resumo, a fração solúvel do lisado bacteriano, proveniente da cultura induzida a 37ºC, foi submetida a cromatografia de afinidade em Ni^{+2}-NTA-agarose. Após aplicação do lisado bacteriano (figura 18, canaleta 1) à resina, executaram-se coleta do material não adsorvido (figura 18, canaleta 2) e lavagens (figura 18, canaletas 3 a 7). O material adsorvido foi eluído com tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (Figura 18, canaletas 8 a 13). A proteína rDdI-3 começou a ser eluída em 50 mM, porém o maior nível de eluição foi atingido com 100 mM de imidazol. Concluímos que a purificação a partir da fração solúvel de bactérias induzidas a 37ºC resultou em um grau de purificação satisfatório e que a quantidade purificada (aproximadamente 100 ug) seria suficiente para avaliar seu efeito na inibição da atividade da PP1c.

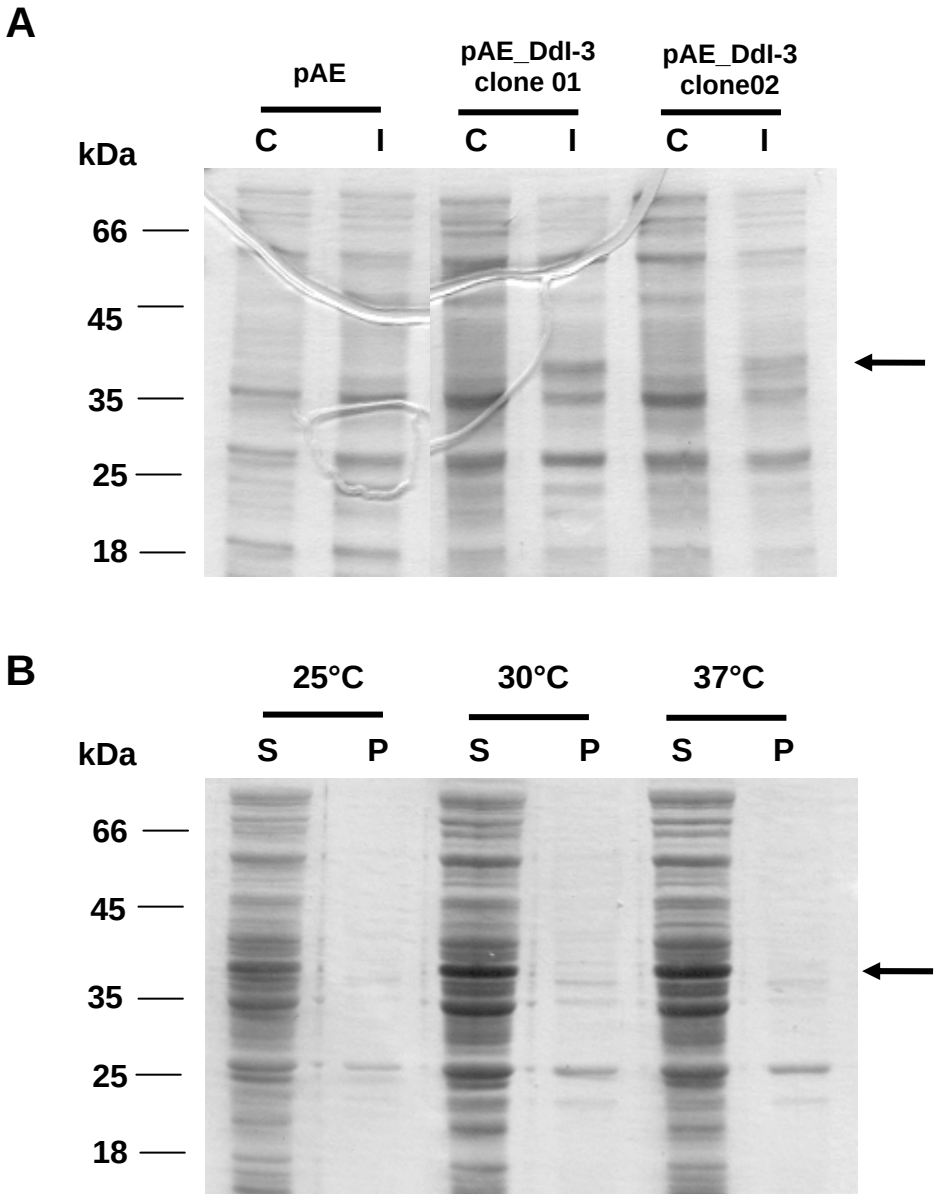


Figura 17: Expressão do DdI-3 recombinante. A. A cultura de bactérias BL21(DE3)pLysS transformada com a construção pAE-DdI-3 (clones 1 e 2) crescida a 37°C, por uma noite, foi diluída 1:20 em meio fresco até DO_{600nm} atingir 0,4. Neste momento, foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 3 horas. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controles não induzidas (C) e de culturas induzidas com IPTG (I) a 37°C foram separados em SDS-PAGE 10%. **B.** Para avaliação da solubilidade de DdI-3 recombinante, a cultura de bactérias BL21(DE3)pLysS correspondente a um dos clones obtidos da transformação com pAE-DdI-3 foi crescida por uma noite e diluída 1:20 em meio fresco até DO_{600nm} atingir 0,4. Neste momento, foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 3 horas nas temperaturas indicadas. Os sedimentos das culturas de bactéria induzidas a 25°C, 30°C e 37ºC foram suspensos em tampão, sonicados e centrifugados. O sobrenadante (S) foi reservado e o precipitado (P) ressuspenso no mesmo tampão e então, uma alíquota de cada amostra foi aplicada em gel SDS-PAGE10%. Os géis em A e B foram corados com Coomassie Blue. A seta indica o polipeptídeo de aproximadamente 36 kDa correspondente à proteína recombinante induzida.

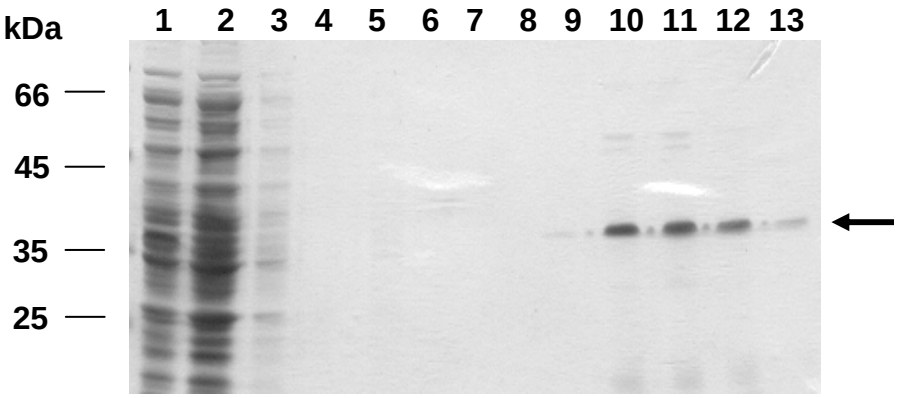


Figura 18: Purificação de DdI-3 recombinante. O rDdI-3 foi purificado por cromatografia de afinidade em Ni^{+2}-NTA-agarose a partir de culturas induzidas com IPTG a 37°C por 3 horas. A fração solúvel do lisado bacteriano (canaleta 1) foi incubada com a resina Ni^{+2}-NTA agarose por 1 hora a 4°C. A canaleta 2 mostra a fração não adsorvida à resina e as canaletas 3 a 7 referem-se as lavagens desta resina com o mesmo tampão utilizado na lise das bactérias. As eluições foram feitas com 25, 50, 75, 100, 150 e 300 mM de imidazol (canaletas 8 a 13). As amostras foram separadas em gel de SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue. A seta indica o polipeptídeo de aproximadamente 36 kDa que corresponde ao rDdI-3.

A atividade de DdI-3 recombinante foi testada frente às enzimas DdPP1c, DdPP1cF269C e PP1c de músculo esquelético de coelho recombinantes expressas em bactérias. Para obtenção de DdPP1c e DdPP1cF269C recombinantes, utilizamos construções plasmidiais baseadas no vetor pTricHisA contendo as regiões codificadoras de seus respectivos cDNAs (Andrioli *et al.*, 2003) na transformação da bactéria BL21(DE3), seguido de indução das respectivas enzimas com IPTG. A atividade de fosfatase das enzimas recombinantes foi medida diretamente na fração solúvel dos lisados bacterianos, sem prévia purificação. Isto se faz necessário devido aos baixos níveis de expressão e impossibilidade de purificação destas enzimas em suas formas ativas (Zhang *et al.*, 1992a; Zapella *et al.*, 1996; Andrioli *et al.*, 2003; Sousa-Canavez *et al.*, 2007). Já a proteína PP1c de músculo esquelético de coelho recombinante (New England Biolabs) que utilizamos é comercializada purificada, mas apresenta baixa estabilidade (dados não mostrados).

A atividade de fosfatase da três enzimas recombinantes foi medida na presença ou ausência de rDdI-3, utilizando-se como substrato fosforilase *a* marcada radioativamente com [^{32}P] em seu resíduo de Serina-14, pela fosforilação *in vitro* com fosforilase quinase (Shenolikar & Ingebritsen, 1984). A figura 19 mostra o perfil de inibição da atividade de fosforilase fosfatase destas enzimas por diferentes concentrações de rDdI-3. Observamos que a rDdPP1c tem 50% de sua atividade inibida por cerca de 0,55 nM de rDdI-3, enquanto que rDdPP1cF269C e rPP1c de músculo esquelético de coelho tiveram 50% de sua atividade inibida por cerca de 2,5 nM e 1,3 nM de rDdI-3, respectivamente. Estes resultados sugerem que o rDdI-3 é aproximadamente 5 vezes mais potente na inibição de DdPP1c do que na inibição da variante mutante desta enzima, DdPP1cF269C. Além disso, rDdI-3 também é 2,5 vezes menos eficaz em inibir a rPP1c de coelho.

Nossos dados indicam também que rDdI-3 é 50 vezes mais potente frente a rDdPP1c do que o inibidor rDdI-2, visto que cerca de 30 nM deste inibidor inibem 50% da atividade de rDdPP1c (Sousa-Canavez *et al.*, 2007). A clara atividade inibidora de DdI-3 contra DdPP1c reforça sua classificação como ortólogo do I-3 em *D. discoideum*. Aparentemente, este novo inibidor de PP1c descrito em *D. discoideum* é tão potente quanto o I-3 de mamíferos que apresenta IC_{50} de 1 nM frente a PP1c de coelho (Zhang *et al.*, 1998). Futuros experimentos serão necessários para definirmos a importância fisiológica relativa de DdI-2 e DdI-3 na modulação da atividade de PP1c *in vivo*.

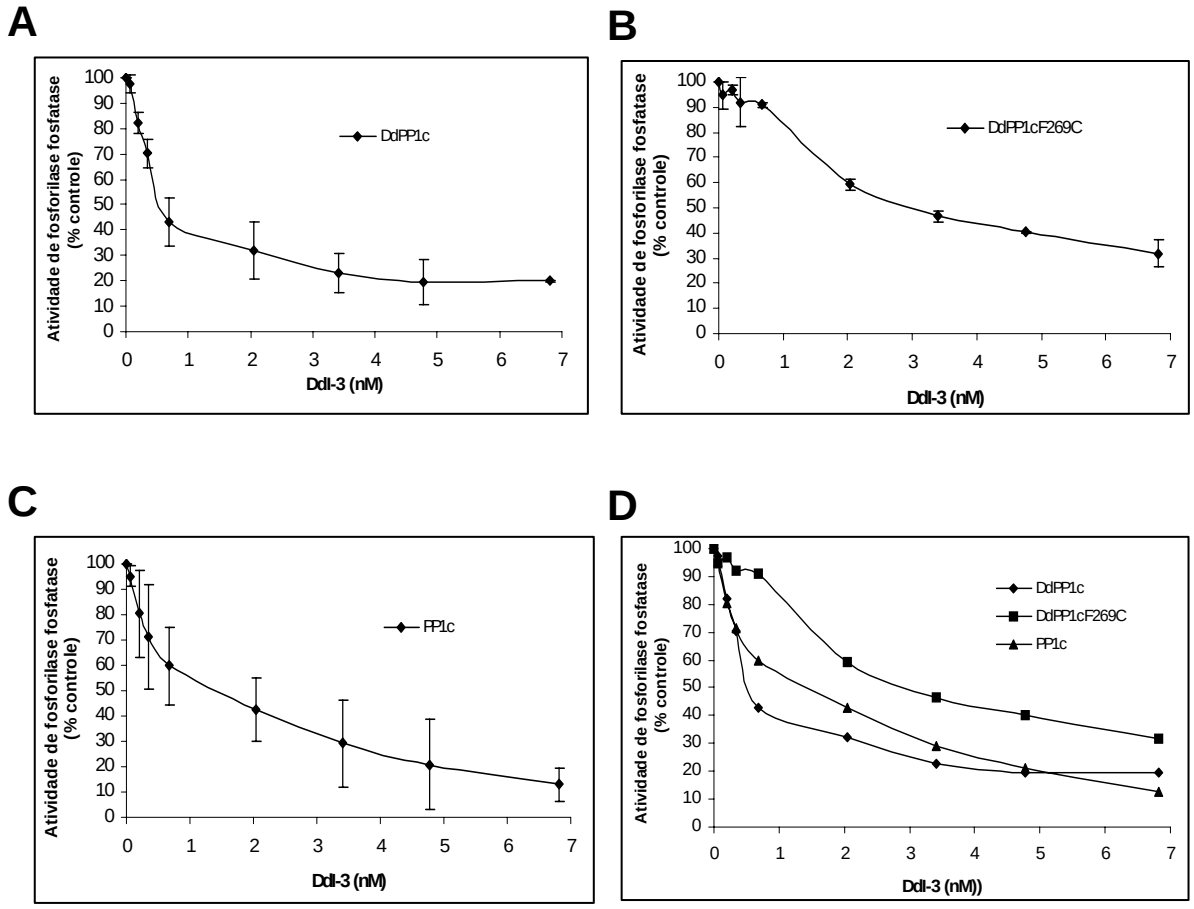


Figura 19: Inibição da atividade de fosforilase fosfatase de rDdPP1c, rDdPP1cF269C e rPP1c de coelho por rDdI-3. O sobrenadante do lisado bacteriano dos clones expressando a DdPP1c **(A)** e DdPP1cF269C **(B)** foram incubados por 10 minutos a 30°C com concentrações crescentes de rDdI-3 e, em seguida ensaiados para atividade de fosforilase fosfatase durante 10 minutos a 30°C. O mesmo ensaio foi realizado com rPP1c comercial **(C)**. A atividade das PP1c é expressa como a porcentagem da atividade máxima obtida na ausência do inibidor e está na faixa de 1-3 mU em todos os ensaios. Os gráficos mostram a média de três experimentos independentes com os respectivos desvios-padrões. **D.** Interposição das três curvas (A, B e C) sem os respectivos desvios-padrões.

4.2. Catálogo das proteínas fosfatases de *Dictyostelim discoideum*

Com o objetivo de construir um catálogo (***The Dictyostelim Phosphatome***) que incluirá todas as proteínas fosfatases e suas subunidades reguladoras codificadas no genoma de *D. discoideum*, realizamos buscas por similaridade com ortólogos destas proteínas para identificação de genes ainda não identificados ou anotados e que potencialmente poderiam ser classificados nestas famílias de proteínas. Como detalhado no item 3.6, recuperamos do GenBank um conjunto de 962 seqüências protéicas (*driver sequences*) que apresentaram relação com o termo "proteínas fosfatases", oriundas das espécies *Homo sapiens, Drosophila melanogaster, Mus musculus, Caenorhabditis elegans, Saccharomyces cerevisiae, Arabidopsis thaliana* e *Plasmodium falciparum*. Este conjunto foi então utilizado para interrogar a base de dados dos genes mapeados no genoma de *D. discoideum*, possibilitando a identificação de 1274 CDS com alguma similaridade com uma ou mais seqüências do conjunto de *driver sequences.*

Este conjunto de 1274 CDS foi então manualmente examinado e as seqüências de *D. discoideum* com similaridades a subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases foram classificadas em categorias pré-definidas na base de dados, tais como PTP (PTP, DSP, Cdc25, LMW), PPM (PP2C), PPP (PP1, PP2A, PP4, PP6, PP2B, PP5 e PP7) e fosfatase FCP, conforme a representação mostrada na figura 20. Do conjunto inicial de 1274 CDS, classificamos o total de 95 CDS. Além destas, também incluímos no catálogo algumas CDS que identificamos na base de genes de *D. discoideum* através de pesquisa por similaridade, usando o programa BLAST, com ortólogos de subunidades reguladoras menos conservadas evolutivamente, e que eventualmente teriam sido excluídas da análise automática. Serão também incluídas neste catálogo potenciais subunidades reguladoras à medida que sejam identificadas por outras metodologias. Por exemplo, já incluímos no catálogo as CDS que codificam DdI-2 (Sousa-Canavez *et al.*, 2007) e DdI-3 (item 4.1.4) que interagem e inibem a PP1c.

As tabelas 7 a 9 listam as 101 CDS já incluídas no catálogo. Várias delas já se encontravam anotadas na base de genes de *D. discoideum,* sendo que algumas destas já foram caracterizadas funcional e/ou bioquimicamente. Observamos, entretanto, que várias das CDS com similaridades significativas aos ortólogos correspondentes estão anotadas como ORFs hipotéticas no genoma de *D. discoideum* e correspondem a potenciais subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases, como será detalhado a seguir.

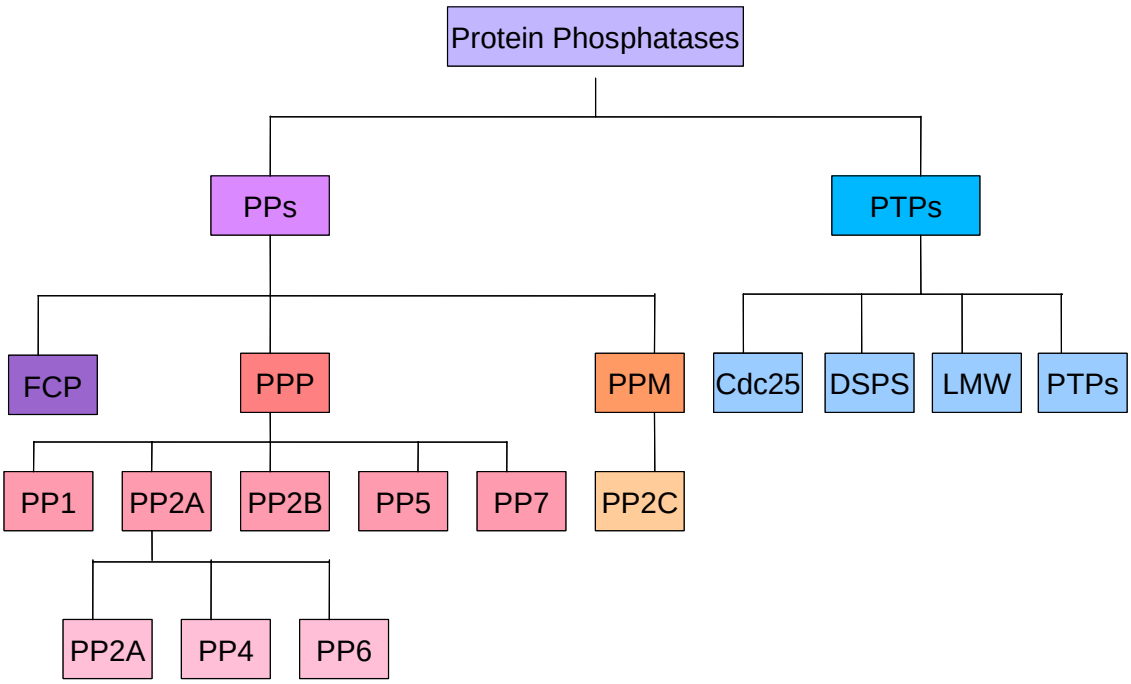


Figura 20: Grafo representando as categorias das proteínas fosfatases em *D. discoideum*. As CDS (genes) de *D. discoideum* com similaridades a subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases foram classificadas de acordo com as categorias: PTP (PTP, DSP, cdc25, LMW), PPM (PP2C), PPP (PP1, PP2A, PP4, PP6, PP2B, PP5 e PP7) e fosfatase FCP.

Tabela 7: Proteínas fosfatases de *D. discoideum* - Grupo PTP

	Dictybase ID	gene	Produto Gênico
PTP clássica	DDB0168234	*JC2V2_0_00884*	ORF hipotética conservada (PRL-1 protein)
	DDB0184168	*BEC6V2_0_00404*	ORF hipotética (Protein tyrosine phosphatase)
	DDB0185117	*ptpA1 ou PTP1*	protein-tyrosine phosphatase 1
	DDB0186743	*BC4V2_0_01500*	ORF hipotética
	DDB0191697	*BEC6V2_0_00936*	ORF hipotética
	DDB0206359	*JC3V2_0_01110*	ORF hipotética
	DDB0214985	*ptpB* ou *DdPTPa*	phosphotyrosine phosphatase ptp2
	DDB0214986	*ptpC* ou *PTP3*	phosphotyrosine phosphatase ptp3
	DDB0216926	*JC2V2_0_00372*	ORF hipotética (similar to ptp3)
	DDB0217132	*JC2V2_0_01099*	ORF hipotética (similar to ptp3)
	DDB0217133	*JC2V2_0_01100*	ORF hipotética (similar to ptp3)
	DDB0217134	*JC2V2_0_01101*	ORF hipotética (similar to ptp3)
	DDB0217254[a]	*JC2V2_0_01293*	ORF hipotética (similar to ptp3)
	DDB0217255[a]	*JC2V2_0_01294*	ORF hipotética (similar to ptp3)
	DDB0217256[a]	*JC2V2_0_01295*	ORF hipotética (similar to ptp3)
	DDB0217322[a]	*JC2V2_0_01361*	ORF hipotética (Protein-tyrosine phosphatase 1)
	DDB0217348[a]	*JC2V2_0_01387*	ORF hipotética (similar to ptp3)
	DDB0217695	*DDB0217695*	ORF hipotética
	DDB0217718	*JC2V2_0_02369*	ORF hipotética (similar to ptp3)
	DDB0229881	*cnrN*	putative countin receptor Cnr15, putative protein phosphatase
	DDB0232939	*DG1060*	putative tyrosine phosphatase family protein
Cdc25	DDB0191424	*cdc25*	tyrosine phosphatase, rhodanese-like domain-containing protein
LMW	DDB0189318	*JC1V2_0_00107*	ORF hipotética

[a]segunda cópia de genes idênticos localizados em uma região genômica duplicada nas linhagens AX3 e AX4 de *D. discoideum*. A denominação entre parênteses corresponde as similaridades automaticamente registradas para estes genes e indicadas no dictyBase (www.dictybase.org).

Tabela 7: Proteínas fosfatases de *D. discoideum* - Família PTP (continuação)

	Dictybase ID	Gene	Produto Gênico
DSP	DDB0168105	*JC2V2_0_01077*	ORF hipotética
	DDB0168530	*JC2V2_0_00382*	ORF hipotética
	DDB0185057	*Plip*	phosphatidylinositol phosphatase
	DDB0185495	*BC4V2_0_00253*	ORF hipotética
	DDB0186027	*BC4V2_0_00782*	ORF hipotética
	DDB0186499	*BC4V2_0_01259*	ORF hipotética
	DDB0186665	*BC4V2_0_01422*	ORF hipotética
	DDB0190143	*JC1V2_0_00978*	ORF hipotética
	DDB0190237	*JC1V2_0_01080*	ORF hipotética
	DDB0190671	*JC1V2_0_01543*	ORF hipotética
	DDB0191093	*pteN*	PI3 phosphatase PTEN homolog
	DDB0191336	*mkpA ou DG1121*	MAP kinase phosphatase
	DDB0191668	*BEC6V2_0_00903*	ORF hipotética
	DDB0191855	*BEC6V2_0_01085*	ORF hipotética
	DDB0201902	*JC1V2_0_01542*	ORF hipotética
	DDB0202886	*JC2V2_0_00022*	ORF hipotética
	DDB0204242	*JC3V2_0_02002*	ORF hipotética
	DDB0205052	*JC3V2_0_02062*	ORF hipotética
	DDB0205364	*JC3V2_0_00271*	ORF hipotética (Myotubularin related protein 6)
	DDB0205459	*JC3V2_0_00361*	ORF hipotética
	DDB0217278[a]	*JC2V2_0_01317*	ORF hipotética
	DDB0218761	*BC4V2_0_01524*	ORF hipotética (similar to PTEN)
	DDB0219484	*BC5V2_0_01284*	ORF hipotética conservada
	DDB0231326	*geneDDB0231326*	ORF hipotética
	DDB0231579	*geneDDB0231579*	ORF hipotética
	DDB0233769	*geneDDB0233769*	ORF hipotética (putative tyrosine phosphatase)

[a]segunda cópia de genes idênticos localizados em uma região genômica duplicada nas linhagens AX3 e AX4 de *D. discoideum*. A denominação entre parênteses corresponde as similaridades automaticamente registradas para estes genes e indicadas no dictyBase (www.dictybase.org).

Tabela 8: Proteínas fosfatases de *D. discoideum* - Famílias PPM e FCP

	Dictybase ID	gene	Produto Gênico
PPM (PP2C)	DDB0186637	*BC4V2_0_01395*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like)
	DDB0187791	*BC5V2_0_00457*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like)
	DDB0188712	*BC5V2_0_01416*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like)
	DDB0184272	*BEC6V2_0_00513*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like)
	DDB0233522	*geneDDB0233522*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like domain-containing protein)
	DDB0233723	*geneDDB0233723*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like domain-containing protein)
	DDB0233767	*geneDDB0233767*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like domain-containing protein)
	DDB0234189	*geneDDB0234189*	ORF hipotética (putative protein phosphatase 2C)
	DDB0235260	*geneDDB0235260*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C)
	DDB0190861	*JC1V2_0_01740*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like)
	DDB0205778	*JC3V2_0_00812*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like)
	DDB0168928	*JC2V2_0_00798*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like)
	DDB0167523	*JC2V2_0_01949*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like)
	DDB0185064	*spnA* ou *Spalten*	protein serine/threonine phosphatase (protein phosphatase 2C-like)
	DDB0167148	*JC2V2_0_02343*	ORF hipotética (protein phosphatase 2C-like)
FCP	DDB0168463	*JC2V2_0_00312*	ORF hipotética (Putative TFIIF-interacting component of the C-terminal terminal domain phosphatese)
	DDB0186834	*BC4V2_0_01617*	ORF hipotética
	DDB0186835	*BC4V2_0_01618*	ORF hipotética
	DDB0188064	*BC5V2_0_00739*	ORF hipotética
	DDB0219547	*BC5V2_0_01518*	ORF hipotética
	DDB0229894	*fcpA ou DG1148*	putative CTD phosphatase

A denominação entre parênteses corresponde a similaridades automaticamente registradas para estes genes e indicadas no dictyBase ou verificadas em nossas análises.

Tabela 9: Proteínas fosfatases de *D. discoideum* - Família PPP

	Dictybase ID	gene	Produto Gênico
PPP	DDB0185058	*pppB ou DdPP1c*	protein phosphatase 1, catalytic subunit
	DDB0201559	*Unc104* ou *KIF1*	kinesin Unc104/KIF1a homolog
	DDB0191475	*pprA*	Yeast SDS22 homolog (Protein phosphatase 1, regulatory subunit 7).
	DDB0191132	*aarA*	aardvark
	DDB0233418	*dpiA* ou *DdI-2*	protein phosphatase inhibitor 2
	DDB0190820	*JC1V2_0_01698*	ORF hipotética (DdI-3)
	DDB0191263	*pinA*	ORF hipotética
	DDB0191299	*pho2A* ou *PP2A*	protein phosphatase 2A catalytic subunit
	DDB0186748	*BC4V2_0_01506*	ORF hipotética
	DDB0237532	*ppp2r4 ou PTPA*	serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B'
	DDB0219848	*BEC6V2_0_01123*	ORF hipotética (Protein phosphatase 2A regulatory subunit PR55)
	DDB0191428	*phr2AB*	protein phosphatase 2A subunit B
	DDB0191258	*pppA*	protein phosphatase 2A subunit A
	DDB0237533	*geneDDB0237533*	ORF hipotética (putative phosphotyrosyl phosphatase activator)
	DDB0206306	*JC3V2_0_00995*	ORF hipotética (PP2A B'' subunit PR48)
	DDB0205219	*JC3V2_0_01323*	ORF hipotética (Protein phosphatase 2A regulatory B subunit (B56 family))
	DDB0185222	*pppC*	protein phosphatase 4 catalytic subunit
	DDB0234188	*geneDDB0234188*	ORF hipotética (PP4-like)
	DDB0232046	*smkA*	EVH1 domain-containing protein
	DDB0205957	*JC3V2_0_00910*	ORF hipotética (TAP42-like family)
	DDB0168233	*JC2V2_0_00885*	ORF hipotética
	DDB0185210	*pppD*	protein phosphatase 6 catalytic subunit
	DDB0201567	*limD*	LIM domain-containing protein
	DDB0205616	*JC3V2_0_01835*	ORF hipotética (HEAT repeat)
	DDB0189736	*JC1V2_0_00546*	ORF hipotética (SIT4 phosphatase-associated protein)
	DDB0185021	*canA*	calcineurin A
	DDB0205063	*JC3V2_0_02072*	ORF hipotética (similar to protein phosphatase calcineurin A)
	DDB0191204	*cnbA*	calcineurin B
	DDB0235276	*cnbB*	putative calcineurin B
	DDB0185382	*BC4V2_0_00119*	ORF hipotética (Protein phosphatase 5, catalytic subunit)
	DDB0191163	*hspD* ou *hsp90*	heat shock cognate protein

A denominação entre parênteses corresponde a similaridades automaticamente registradas para estes genes e indicadas no dictyBase ou verificadas em nossas análises.

4.2.1.Tirosina fosfatases (PTP)

No grupo das PTPs, identificamos 21 CDS que codificam proteínas que classificamos como PTPs clássicas, sendo que 5 destas correspondem a duplicações verificadas no genoma das linhagens AX3 e AX4 de *D. discoideum* (Tabela 7). A função de algumas destas PTPs clássicas já foi investigada, como por exemplo a PTP1 (DDB0185117) e a PTP2 (DDB0214985). O nocaute do gene que codifica para PTP1 resultou em células com desenvolvimento rápido, diminuição na proporção de células pré-esporos e aumento de células pré-talo tipo O (Ramalingam *et al.*, 1993). Além disso, o nocaute do gene que codifica para PTP2 também afetou o desenvolvimento normal de *D. discoideum* (Howard *et al.*, 1994). A expressão da PTP3 é aumentada em resposta a estresse osmótico, sugerindo um envolvimento desta enzima neste processo (Gamper *et al.*, 1999). As demais CDS que categorizamos como PTP clássicas não foram caracterizadas em *D. discoideum*.

O genoma de *D. discoideum* codifica para um único membro (DDB0191424) da subfamília da Cdc25, a qual foi previamente descrita como uma proteína que é fosforilada em células vegetativas e desfosforilada na fase de desenvolvimento de *D. discoideum* (Mayanagi *et al.*, 2004). Também a subfamília das LMWs está aparentemente representada em *D. discoideum* por um único gene (*JC1V2_0_00107*) que codifica uma CDS anotada como hipotética, com massa molecular predita de 20,4 kDa e que apresenta aproximadamente 55% de similaridade com enzimas desta família descritas em mamíferos.

Identificamos 26 CDS da subfamília das DSPs no genoma da linhagem AX4 de *D. discoideum*, sendo que uma (*JC2V2_0_01317*) está duplicada no genoma das linhagens AX3 e AX4 de *D. discoideum* (Tabela 7). A subfamília das DSPs inclui as fosfatases conhecidas como PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), que desfosforilam principalmente fosfatidilinositol-fosfato e que, em *D. discoideum*, participam da via de sinalização que controla a quimiotaxia (Merlot *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007). As demais ORFs que classficamos como DSPs ainda não foram caracterizadas; contudo vale ressaltar que a mutagênese insercional na linhagem AX4 de *D. discoideum* do gene *mkpA* (que codifica uma MAP quinase fosfatase) apresenta fenótipo alterado com a interrupção do desenvolvimento na fase da agregação (Kuspa & Loomis, 1992).

4.2.2. Serina treonina fosfatases da família PPM

O genoma de *D. discoideum* codifica para 15 CDS que classificamos na família PPM, pois apresentam similaridade com a PP2C. Destes, apenas o gene *spnA* (DDB0185064) já foi caracterizado. O gene *spnA* codifica uma proteína bimodular com um domínio N-terminal que apresenta similaridade com o domínio de ligação de GTP da

subunidade Gα das proteínas G heterotriméricas e um domínio C-terminal que tem similaridade com a PP2C, o qual é essencial para a função desta proteína. A inativação de *spnA* afeta drasticamente o desenvolvimento de *D. discoideum*, causando a interrupção na fase de agregados compactos, abolindo completamente a diferenciação de células pré-esporo e pré-talo (Aubry & Firtel, 1998). Vale ressaltar a redundância de genes codificadores para PP2C no genoma de *D. discoideum*. O genoma de *S. cerevisiae* codifica sete genes que codificam enzimas da subfamília da PP2C, as quais estão envolvidas no processamento de RNA, regulação do ciclo celular e resposta a diversos estresses, entre outros processos (Ota & Mapes, 2006). Em plantas, os genes da PP2C estão presentes em diversas cópias e desempenham papel crucial na resposta a estresses bióticos e abióticos (Schweighofer *et al.*, 2004).

4.2.3. Fosfatases FCP

Como listado na tabela 8, identificamos no genoma de *D. discoideum* 6 genes que potencialmente codificam para as fosfatases FCPs. Um destes genes, o *fcpA*, codifica para uma CTD fosfatase putativa e aparentemente está envolvido no desenvolvimento de *D. discoideum*. O mutante insercional DG1148 (*fcpA*$^-$) apresenta fenótipo alterado com morfologia aberrante dos corpos de frutificação em *D. discoideum* (Kuspa & Loomis, 1992).

4.2.4. Serina treonina fosfatases da família PPP

Até o momento, categorizamos 31 CDS na família PPP, incluindo subunidades catalíticas e reguladoras destas enzimas (Tabela 9), sendo que algumas destas já foram caracterizadas em *D. discoideum* (Dammann *et al.*, 1996; Murphy & Egelhoff, 1999; Murphy *et al.*, 1999; Andrioli *et al.*, 2003; Fiorini, 2003; Boeckeler *et al.*, 2006; Mendoza *et al.*, 2007; Sousa-Canavez *et al.*, 2007). Não foram identificadas ORFs com similaridade com a PP7 nas buscas que realizamos. Como mencionado, essa fosfatase parece ser característica de plantas (Andreeva *et al.*, 1997; Andreeva *et al.*, 1998; Kutuzov *et al.*, 1998; Andreeva & Kutuzov, 1999).

Entre genes que potencialmente codificam subunidades reguladoras da subunidade catalítica da PP1 (DdPP1c), identificamos o gene *pprA*, que codifica para a proteína SDS22, ortóloga à subunidade reguladora 7 da PP1 de *Schizosaccharomyces pombe* (Ohkura & Yanagida, 1991), além dos já mencionados *dpiA*, que codifica para o inibidor do tipo 2 de *D. discoideum* (Sousa-Canavez *et al.*, 2007) e *dpiB*, que codifica um ortólogo do inibidor do tipo-3 de humano (este trabalho). Identificamos ainda o gene *pinA*, que codifica para a proteína PinA cuja porção amino-terminal apresenta cerca de 58% de similaridade com o inibidor nuclear da PP1 (NIPP-1, dados não mostrados).

Candidatos para subunidades reguladoras da PP2A também foram encontrados em nossas análises. Como relatado na introdução, o heterodímero da PP2A é formado pela subunidade catalítica de 36 kDa (PP2Ac) e pela subunidade estrutural denominada A, que apresenta massa molecular de 65 kDa. Além disso, este heterodímero A/C interage com a(s) subunidade(s) reguladora(s) B variáveis. O gene *pppA* (DDB0191258) codifica para uma proteína ortóloga à subunidade A da PP2A de mamífero, a qual possui motivos repetitivos do tipo HEAT (*Huntingtin-Elongation A subunit-TOR*). A subunidade A da PP2A é muito conservada evolutivamente e apresenta uma estrutura com 15 destas repetições (Groves *et al.*, 1999). Muitas subfamílias da subunidade B (por ex. B, B0, B00 e B000, cada uma contendo múltiplos membros) já foram identificadas em outros organismos; diversos estudos sugerem que as distintas subunidades B influenciam a especificidade ao substrato, a atividade enzimática e a localização subcelular da PP2A. Estima-se que existam aproximadamente 75 diferentes tipos de holoenzimas em mamíferos (Janssens & Goris, 2001; Palanivel *et al.*, 2004). Nossas análises revelaram alguns genes preditos para as subunidades B, tais como *ppp2r4regB'* (DDB0237532), *phr2AB* (DDB0191428) e *pp2AB56* (DDB0205219), entre outros anotados como proteínas hipotéticas.

Além dos genes *canA* (DDB0185021), que codifica para a subunidade catalítica, e *cnbA* (DDB0191204), que codifica para a subunidade reguladora da PP2B (calcineurina), o genoma de *D. discoideum* codifica para duas outras ORFs (DDB0235276 e DDB0205063) com similaridade a esta classe de enzimas. Em *D. discoideum*, a calcineurina parece 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).

Identificamos dois genes (*pppC* e *geneDDB0234188*) que codificam para a PP4c no genoma de *D. discoideum.* Como mostrado na figura 21, o gene *pppC*, localizado no cromossomo 2, é expresso constitutivamente ao longo do ciclo de vida de *D. discoideum*, corroborando observações preliminares obtidas em nosso laboratório (Fiorini, 2003). Recentemente foi demonstrado que PP4c regula o desenvolvimento, a quimiotaxia e a expressão de diversos genes em *D. discoideum* (Mendoza *et al.*, 2007).

A ORF *geneDDB0234188* localiza-se no cromossomo 4 e apresenta 76% de similaridade e 57% de identidade com a PP4c de *D. discoideum*, como pode ser observado na figura 22. Aparentemente, este gene (*geneDDB023418)* é transcrito em níveis semelhantes ao gene *pppC* no crescimento e ao longo do desenvolvimento de *D. discoideum* (L. F. Martins, dados não publicados).

Candidatos para subunidades reguladoras da PP4c também foram revelados em nossas análises, tais como o *JC3V2_0_00910*, que codifica para uma proteína ortóloga à alfa4 e o gene *DDB0205616*, que codifica para uma proteína ortóloga R1. O provável

ortólogo da subunidade R1 (DDB0205616) apresenta também os motivos repetidos do tipo HEAT, encontrados ainda na subunidade A da PP2A. O ortólogo à subunidade R3 em *D. discoideum* (DDB0232046) é codificado pelo gene *smkA*, primeiramente identificado como um supressor do mutante nulo *mek1*$^-$, que apresenta um fenótipo alterado na quimiotaxia e defeitos na citocinese de *D. discoideum* (Mendoza *et al.*, 2005). O produto gênico de *smkA*, SMEK (*EVH1 domain-containing protein*), é altamente conservado entre as espécies e contém um domínio EVH1 cuja função ainda é desconhecida. SMEK está localizada no córtex celular durante o crescimento e é translocada para o núcleo durante o desenvolvimento (Mendoza *et al.*, 2005).

O produto gênico ortólogo à subunidade reguladora alfa4 (DDB0205957) apresenta um motivo *TAP42-like*. Em células humanas, alfa4 apresenta 37% de similaridade com Tap42 (ortóloga à alfa4 em *S. cerevisiae*). Tap42 já havia sido descrita como uma proteína que se associa com PP2A e Sit4 (ortóloga à PP6 em leveduras) e compreende um componente regulatório na via de sinalização sensível a Tor (Chen *et al.*, 1998). Experimentos usando o sistema de duplo híbrido em leveduras demonstraram que alfa4 se associa constitutivamente às subunidades catalíticas das PP4, PP6 e ambas as isoformas da PP2A de rato, sendo que essas interações foram confirmadas também por ligação direta (Chen *et al.*, 1998). Aparentemente, a associação envolve os 50 primeiros aminoácidos do N-terminal destas fosfatases e não requerem a fosforilação de alfa4.

O gene *pppD* (DDB0185210), que codifica para um ortólogo da subunidade catalítica da PP6 de *D. discoideum* (Tabela 9), foi também classificado na família PPP. Este gene também é constitutivamente expresso, apresentando uma ligeira variação em seus níveis ao longo do desenvolvimento, como mostra a análise realizada através da hibridização de *Northern blots* com sonda de DNA preparada a partir do cDNA da PP6c (figura 23). Em humanos, a expressão das três isoformas do mRNA para a PP6 é encontrada em altos níveis no testículo, coração e músculo esquelético e aparentemente estas isoformas também estão envolvidas com a regulação do ciclo celular (Bastians & Ponstingl, 1996). Níveis de expressão diferenciais do mRNA foram relatados para a PP6c em extratos de diferentes tecidos em ratos (Kloeker *et al.*, 2003).

Além da existência de um gene para PP6c no genoma de *D. discoideum*, também identificamos genes que codificam potenciais candidatos para subunidades reguladoras desta enzima. A ORF DDB0189736 apresenta similaridade com a subunidade reguladora R1 da PP6 (Stefansson & Brautigan, 2006), a qual possui o motivo SAP (*Sit4-associated proteins*). Deleção das proteínas que apresentam este motivo em *S. cerevisiae* produz o mesmo fenótipo da deleção da Sit4, que é ortóloga à PP6 de mamífero, indicando que as funções da Sit4 e das SAPs dependem uma das outras (Luke *et al.*, 1996).

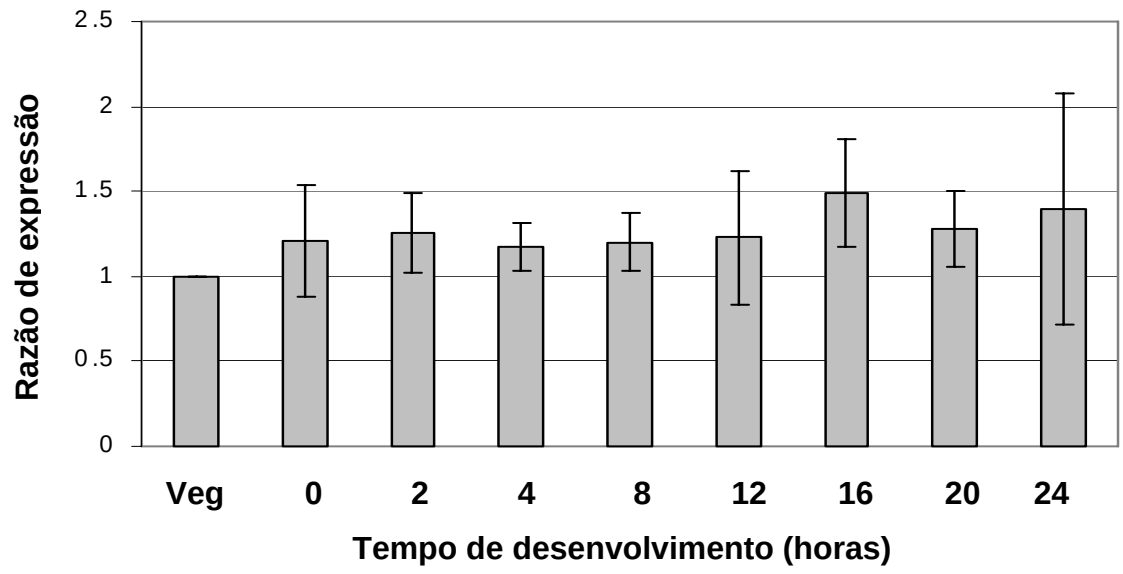


Figura 21: Análise do nível de expressão do mRNA da DdPP4c no crescimento e ao longo do desenvolvimento de *D. discoideum*. Células da linhagem AX-4 em fase de crescimento exponencial em meio HL5 (VEG) foram submetidas à carência nutricional em filtros para indução do desenvolvimento. As células foram coletadas imediatamente após a lavagem (0h), início da fase de agregação (2h), fase de agregação (4h), formação de agregados compactos (8h), após agregação (12h), início da culminação (16h), culminação em estágio mais avançado (20h) e formação completa de corpos de frutificação (24h). O RNA total foi isolado e submetido a RT-qPCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificação da seqüência relativa a DdPP4c. Oligonucleotideos especificos para um segmento do gene que codifica para a caseína quinase II (CKII) de *D. discoideum* foram usados como controle para normalizar a quantidade de RNA total (cDNA) por amostra. A razão de expressão em cada amostra, em relação às células da fase de crescimento, foi calculada a partir de dois experimentos independentes com ensaios realizados em duplicata.

```
DDB0234188      MNTSTFNLDHCIEKLQKCEILPESTIKEITDKMKELLISESNVQEIRSPVTVVGDVHGQF 60
DdPP4           MSS---DLDRQIEQLKRCEIIKESEVRALCSKAREILLEEGNVQRVDSPVTICGDIHGQF 57
                *.:   :**: **:*::***: ** :: : .* :*:*:.*.***.: ****: **:****

DDB0234188      YDVLEIFKIGGQCPDTNYLFLGDYVDRGYHSVETISLLTCLKLRYPSRITLLRGNHESRQ 120
DdPP4           YDLKELFKVGGDCPQTNYLFMGDFVDRGFYSVETFLLLLALKVRYPDRITLIRGNHESRQ 117
                **: *:**:**:**:*****:**:****::****: ** .**:***.****:********

DDB0234188      ITQVYGFYGECMRKYGNPTVWKYFTEMFDYLSVAAIIDEAIYCVHGGLSPSALSIDQIKV 180
DdPP4           ITQVYGFYEECVRKYGSVTVWKYCTEIFDYLSLSALVDGKIFCVHGGLSPSINTLDQIRA 177
                ******** **:****. ***** **:*****::*::*  *:*********  ::***:.

DDB0234188      LDRFQEVPNEGALSDILWSDPDPDREGFVESQRGAGYSYGKDVTLRFLQNNKMQHIIRAH 240
DdPP4           IDRKQEVPHEGPMCDLMWSDPE-DIPGWNGSPRGAGFLFGEDVVQKFNHDNNLEFICRAH 236
                :** ****:**.:.*::****: *  *:  * ****: :*:**. :* ::*:::.* ***

DDB0234188      QLCMDGYQTLFDNKLSTVWSAPNYCNRCGNMASIVEVNEKLERYFNTYAAAPQSLSNKPT 300
DdPP4           QLVMEGFKYMFNETLVTVWSAPNYCYRCGNVAAILQLDENLKKNFAIFEAAPQESRGAP- 295
                ** *:*:: :*::.* ******** ****:*:*::::*:*:: *  : ****.  . *

DDB0234188      LDTNKELPDYFL 312
DdPP4           --AKKPAPEYFL 305
                  ::*  *:***
```

Figura 22: Alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida da DdPP4c com a proteína hipotética DDB0234188. As seqüências da DdPP4c e da proteína hipotética DDB0234188 foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W. (*) indica resíduos idênticos, (:) indica substituição conservativa e (.) indica substituição semi-conservativa. Os motivos conservados (-GDxHG-, -GDxVxRG-, -GNH-) encontrados em todos os membros da família PPP estão em negrito e sublinhados.

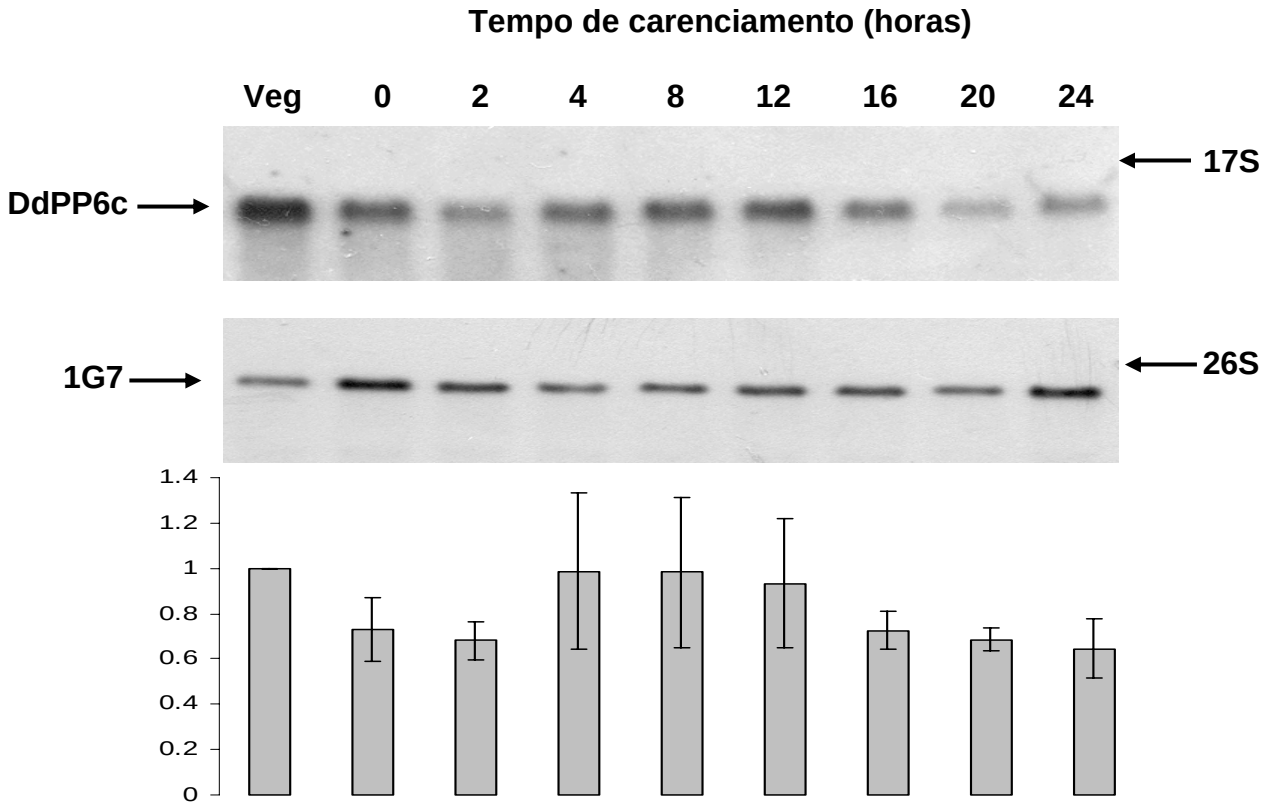


Figura 23: Análise do nível de expressão do mRNA da DdPP6c no crescimento e ao longo do desenvolvimento de *D. discoideum*. Células da linhagem AX-4 em fase de crescimento exponencial em meio HL5 (VEG) foram submetidas à carência nutricional em filtros para indução do desenvolvimento. As células foram coletadas imediatamente após a lavagem (0h), início da fase de agregação (2h), fase de agregação (4h), formação de agregados compactos (8h), após agregação (12h), início da culminação (16h), culminação em estágio mais avançado (20h) e formação completa de corpos de frutificação (24h). O RNA total foi isolado e aproximadamente 20μg foi submetido à eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes. Após transferência para membrana de náilon, *Northern blots* idênticos foram hibridizados com sondas radioativas preparadas a partir do cDNA da DdPP6c ou gene 1G7. A figura corresponde a porções relevantes de autorradiogramas obtidos após exposição das membranas a filmes de raios-X. As posições de migração dos rRNAs estão indicadas à direita e dos respectivos mRNAs à esquerda. A quantificação foi feita pelo programa ImageQuant 5.1 que conta o número de pixels dos autorradiogramas. O gráfico mostra a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes após normalização em relação ao gene 1G7.

Finalmente, citamos o ortólogo da PP5, o qual é codificado pelo gene *BC4V2_0_00119* (Tabela 9). Além disso, como esperado, o genoma de *D. discoideum* codifica o gene da Hsp90 (*hspD*), uma proteína que entre várias funções também se associa a PP5c, modulando sua atividade (Silverstein *et al.*, 1997; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005; Cliff *et al.*, 2006).

A figura 24 apresenta a seqüência completa da porção codificadora (1545 pb codificando 514 aminoácidos) que determinamos a partir de um clone de cDNA da DdPP5 (SSI675) que nos foi cedido pelo grupo japonês que realizou o projeto de seqüenciamento de ESTs deste microorganismo (*Dictyostelim* cDNA project/University of Tsukuba, Japão) (Morio *et al.*, 1998). Este cDNA contém 1636 pb, dos quais 13 na região 5´ e 78 na região 3´ não codificadora (dados não mostrados). A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida do cDNA DdPP5c com seqüências depositadas no GenBank confirmou que ele codifica uma proteína com 66% de identidade e 49% de similaridade com a PP5 humana. A figura 25 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácidos da PP5c de *D. discoideum* com PP5c de outros organismos, demonstrando a significativa conservação evolutiva desta enzima. Geralmente, as PP5c possuem 3 domínios TPRs (Chaudhuri, 2001; Lindenthal & Klinkert, 2002), embora já tenham sido relatados 4 motivos TPRs, como em *Plasmodium falciparum* (Dobson *et al.*, 2001). A DdPP5c possui 3 motivos TPRs, como indicado na figura 25. O motivo TPR está presente em uma ampla variedade de proteínas e medeia interações entre proteínas. Como apresentado na introdução, este domínio consiste em 3 a 16 repetições em série de 34 resíduos de aminoácidos. Já foi demonstrado que a atividade de fosfatase da PP5 é suprimida pela interação do domínio TPR com o subdomínio C-terminal (Sinclair *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2003).

Com o intuito de investigar o papel que PP5c desempenha em *D. discoideum*, planejamos o nocaute deste gene pela substituição do gene selvagem com o cDNA inativado por inserção de um segmento de DNA carregando resistência ao antibiótico blastidicina (Puta & Zeng, 1998; Eichinger *et al.*, 1999). Inicialmente, verificamos através de *Southern blot* que o gene da PP5 estava presente em cópia única no genoma de *D. discoideum* (dados não apresentados), observação posteriormente confirmada com o seqüenciamento completo de seu genoma (Eichinger *et al.*, 2005). Em outros organismos como *H. sapiens*, *Trypanosoma brucei* e *D. melanogaster*, o gene da PP5 também se apresenta com cópia única (Xu *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2000; Chaudhuri, 2001).

Investigamos também o perfil de expressão do mRNA da DdPP5c. Como mostrado (figura 26), o gene é expresso durante a fase de crescimento, na qual atinge níveis máximos e, durante todo o desenvolvimento, sua expressão é mantida em níveis reduzidos. Em *S. cerevisiae* (Jeong *et al.*, 2003), a proteína Ser/Thr phosphatase T1

(ortóloga à PP5 de mamíferos) tem também níveis aumentados no início da fase logarítmica de crescimento. Em *Drosophila*, tanto o mRNA quanto a proteína são mais expressos na fase embrionária do que nos estágios mais adiantados do desenvolvimento (Brown *et al.*, 2000).

Como relatado anteriormente, na tentativa de obter linhagens no qual o gene da DdPP5c estivesse nocauteado, utilizamos a construção DdPP5c-KO (figura 3C) na eletroporação de células da linhagem selvagem AX4 de *D. discoideum*. Aproximadamente 100 clones transfectantes resistentes a blasticidina foram semeados em condições que permitiam inspeção visual de sua progressão no desenvolvimento, sendo que não observamos nenhum clone com fenótipo alterado. O DNA genômico destes clones foi analisado por *Southern blot* e por PCR para verificação da eventual ocorrência de recombinação homóloga e conseqüente substituição da cópia nativa do gene pela cópia alterada (dados não mostrados). Não identificamos nenhum clone que mostrasse evidência da ocorrência de recombinação homóloga, o que sugere que o nocaute da DdPP5c seja letal em *D. discoideum*. Até hoje não foi reportado nenhum estudo no qual o gene PP5c tenha sido nocauteado. Entretanto, efeitos antiproliferativos e atraso no ciclo celular foram observados em células nas quais a expressão do gene da PP5 foi parcialmente silenciada por RNA antisenso ou RNAi (Zuo *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 2004; Messner *et al.*, 2006).

Tendo em vista estas observações, uma possibilidade para investigarmos o papel da PP5c e outras fosfatases em *D. discoideum* será a utilização de técnicas de silenciamento gênico através de RNAi.

```
atgacaaaagttgaaactcttgaatttccaagaagaaaaaaggaatcaaatgaaaattca
 M  T  K  V  E  T  L  E  F  P  R  R  K  K  E  S  N  E  N  S
accttatcacaaccagatgcagcagctgaattaaataaagatgacaaagaaactgaccct
 T  L  S  Q  P  D  A  A  A  E  L  N  K  D  D  K  E  T  D  P
tcaacactttcaaaagaagaatgtattaaaaaatctgatgaatataaagcaattgcaaat
 S  T  L  S  K  E  E  C  I  K  K  S  D  E  Y  K  A  I  A  N
aaacattttagtgaacaaaaatatgatttagcagcagaagtttatacaaaagcaattaaa
 K  H  F  S  E  Q  K  Y  D  L  A  A  E  V  Y  T  K  A  I  K
tatcatccaacagcaattttatattcaaatagatcattttcaaattttaagaatgagtta
 Y  H  P  T  A  I  L  Y  S  N  R  S  F  S  N  F  K  N  E  L
tatgtaaatgcattacaagatgctcaaacctctcatgaaatggatccaacttacataaaa
 Y  V  N  A  L  Q  D  A  Q  T  S  H  E  M  D  P  T  Y  I  K
gcatattatcgtttaggtagtgcacatttagcattaagaaattttgaagaagcaaaacac
 A  Y  Y  R  L  G  S  A  H  L  A  L  R  N  F  E  E  A  K  H
tttttcaaagaactcttaacaaagaatccaaaagaaaatgatgcaaagattaaattaaat
 F  F  K  E  L  L  T  K  N  P  K  E  N  D  A  K  I  K  L  N
ctttgtaataatttaattaaagcaaaattatttgaagatgcaattttaattacacctgaa
 L  C  N  N  L  I  K  A  K  L  F  E  D  A  I  L  I  T  P  E
tcatattttaaagaattagatattaattcaatgaatgttgaagaatcatataaaggacca
 S  Y  F  K  E  L  D  I  N  S  M  N  V  E  E  S  Y  K  G  P
aaatttgaaagtgaaaagattacaattgaatttgttaatgaaatgattgaatggatgaaa
 K  F  E  S  E  K  I  T  I  E  F  V  N  E  M  I  E  W  M  K
ggacaaaagagtgtacataagaaatatgtttgtaagatattgaaacaatcatttgagatg
 G  Q  K  S  V  H  K  K  Y  V  C  K  I  L  K  Q  S  F  E  M
atgaaagagttaccaacattggtggatattgatcatgatacaacaatgaatataacgatt
 M  K  E  L  P  T  L  V  D  I  D  H  D  T  T  M  N  I  T  I
tgtggtgatacacatggtcaattctatgatcttttgaatatatttaagattaatggatca
 C  G  D  T  H  G  Q  F  Y  D  L  L  N  I  F  K  I  N  G  S
ccatcagaggagaaaccatacctttcaatggcgactttgtggatagggtagttttagt
 P  S  E  E  K  P  Y  L  F  N  G  D  F  V  D  R  G  S  F  S
tttgaaattatcatcactctattggcttataaattattgtacccaaatcatatgcatttg
 F  E  I  I  I  T  L  L  A  Y  K  L  L  Y  P  N  H  M  H  L
acaaggggtaaccatgagacaaccgatatgaatcgtttctatggtttccaaggcgaagtg
 T  R  G  N  H  E  T  T  D  M  N  R  F  Y  G  F  Q  G  E  V
gttgcaaaatacagtgagatggtattcgatctattctcagagttgttcaattggttccca
 V  A  K  Y  S  E  M  V  F  D  L  F  S  E  L  F  N  W  F  P
ttggcattcgtgttggatgaatcgtttatggtggtacatggtggtttgtttggtaaggat
 L  A  F  V  L  D  E  S  F  M  V  V  H  G  G  L  F  G  K  D
ggtgtcacacttgacgatattagaaagattaaacgtaatgcaccagatccaaaagataat
 G  V  T  L  D  D  I  R  K  I  K  R  N  A  P  D  P  K  D  N
gaattggttcaatgcttactttggtctgatcctcaatcaaatcctggtattgctccttct
 E  L  V  Q  C  L  L  W  S  D  P  Q  S  N  P  G  I  A  P  S
tcaagaggtgtaggtgtttactttggacctgatgtcaccagacgtttcctcaaggaaaat
 S  R  G  V  G  V  Y  F  G  P  D  V  T  R  R  F  L  K  E  N
aatctatcaactatcattagatctcatgaagttaaagaaaaaggttatcaaatcgatgat
 N  L  S  T  I  I  R  S  H  E  V  K  E  K  G  Y  Q  I  D  D
gatggttctctcatcactgttttctctgctccaaattattgtgatcaatctggtaatctt
 D  G  S  L  I  T  V  F  S  A  P  N  Y  C  D  Q  S  G  N  L
ggctcatttataaatataactgaagataaaattaaaattacaacttttgaagctgttgaa
 G  S  F  I  N  I  T  E  D  K  I  K  I  T  T  F  E  A  V  E
Catccgaatataccaccaatgcattatgccaaaaaatatttctaa  1545 pb
 H  P  N  I  P  P  M  H  Y  A  K  K  Y  F  -    514 aa
```

Figura 24: Seqüência da porção codificadora do cDNA da DdPP5c. A seqüência foi obtida a partir do clone pBS_DdPP5c oriundo de bibliotecas de cDNA utilizadas no projeto de seqüenciamento de ESTs de *D. discoideum.* Os prováveis códons de iniciação e terminação estão sublinhados. A seqüência de aminoácidos deduzida da porção codificadora também está apresentada. Os números no final das seqüências indicam o número de nucleotídeos (pb) e de aminoácidos (aa).

```
                                                                  TRP1
                                                                 ------>
Hs          ---MAMAEGERTECAEPPRD-------------EPPADG--------ALKRAEELKTQAN 36
Mm          ---MAMAEGERTECAETPRD-------------EPPADG--------ALKRAEELKTQAN 36
Dm          ---MSSSELEVQKAADCQQEAKVPASVEITGSKQPEEDTNARTKAELDFAAAEQYKNQGN 57
Dd          MTKVETLEFPRRKKESNENSTLSQPDAAAELNKDDKETDPSTLSKEECIKKSDEYKAIAN 60
Sc          ---MSTPTAADR-----------------------------------AKALERKNEGN 20
               :                                            : : *  .*

                     TRP1                      TRP2
            ------------------------> ------------------------------>
Hs          DYFKAKDYENAIKFYSQAIELNPSNAIYYGNRSLAYLRTECYGYALGDATRAIELDKKYI 96
Mm          DYFKAKDYENAIKFYSQAIELNPGNAIYYGNRSLAYLRTECYGYALGDATRAIELDKKYI 96
Dm          EMLKTKEFSKAIDMYTKAIELHPNSAIYYANRSLAHLRQESFGFALQDGVSAVKADPAYL 117
Dd          KHFSEQKYDLAAEVYTKAIKYHP-TAILYSNRSFSNFKNELYVNALQDAQTSHEMDPTYI 119
Sc          VFVKEKHFLKAIEKYTEAIDLDSTQSIYFSNRAFAHFKVDNFQSALNDCDEAIKLDPKNI 80
              .. :.:  * . *::**. ..  :* :.**::: :: : :  ** *   : : *   :

                     TRP3
            ------------------------>
Hs          KGYYRRAASNMALGKFRAALRDYETVVKVKPHDKDAKMKYQECNKIVKQKAFERAIAGDE 156
Mm          KGYYRRAASNMALGKFRAALRDYETVVKVKPNDKDAKMKYQECSKIVKQKAFERAIAGDE 156
Dm          KGYYRRAAAHMSLGKFKQALCDFEFVAKCRPNDKDAKLKFTECNKIVKMRAFERAIAVDK 177
Dd          KAYYRLGSAHLALRNFEEAKHFFKELLTKNPKENDAKIKLNLCNNLIKAKLFEDAILIT- 178
Sc          KAYHRRALSCMALLEFKKARKDLNVLLKAKPNDPAATKALLTCDRFIREERFRKAIGGAE 140
            *.*:* . : ::* :*. *    : : . .*::  *.     *..::: . *. **


Hs          HKRSVVDS--LDIESMTIED---EYSGPKLE-----DGK----------VTISFMKELM- 195
Mm          HRRSVVDS--LDIESMTIED---EYSGPKLE-----DGK----------VTITFMKDLM- 195
Dm          PEKTLSEMY-SDMENITIED---DYKGPQLE-----DGK----------VTLKFMKELM- 217
Dd          PESYFKEL---DINSMNVEE---SYKGPKFE-----SEK----------ITIEFVNEMI- 216
Sc          NEAKISLCQTLNLSSFDANADLANYEGPKLEFEQLYDDKNAFKGAKIKNMSQEFISKMVN 200
             .  .      ::..:  :    .*.**::*     . *          ::  *:..::


Hs          QWYKDQKKLHRKCAYQILVQVKEVLSKLSTLVETTLKET--EKITVCGDTHGQFYDLLNI 253
Mm          QWYKDQKKLHRKCAYQILVQVKEVLCKLSTLVETTLKET--EKITVCGDTHGQFYDLLNI 253
Dm          EHYKAQKRLHRKFAYKILCEIDTYMRAQPSLVDITVPDE--EKFTICGDIHGQFYDLMNI 275
Dd          EWMKGQKSVHKKYVCKILKQSFEMMKELPTLVDIDHDTT--MNITICGDTHGQFYDLLNI 274
Sc          DLFLKGKYLPKKYVAAIISHADTLFRQEPSMVELENNSTPDVKISVCGDTHGQFYDVLNL 260
            :     * : :* .  *: .    :   .::*:         :::*** ******::*:


Hs          FELNGLPSETNPYIFNGDFVDRGSFSVEVILTLFGFKLLYPDHFHLLRGNHETDNMNQIY 313
Mm          FELNGLPSETNPYIFNGDFVDRGSFSVEVILTLFGFKLLYPDHFHLLRGNHETDNMNQIY 313
Dm          FEINGLPSEKNPYLFNGDFVDRGSFSVECIFTLFGFKLLYPNHFFLARGNHESINMNQMY 335
Dd          FKINGSPSEEKPYLFNGDFVDRGSFSFEIIITLLAYKLLYPNHMHLTRGNHETTDMNRFY 334
Sc          FRKFGKVGPKHTYLFNGDFVDRGSWSCEVALLFYCLKILHPNNFFLNRGNHESDNMNKIY 320
            *.  *  .  :.*:**********:* *  : :   *:*:*:::.* *****: :**::*


Hs          GFEGEVKAKYTAQMYELFSEVFEWLPLAQCINGKVLIMHGGLFSEDGVTLDDIRKIERNR 373
Mm          GFEGEVKAKYTAQMYELFSEVFEWLPLAQCINGKVLIMHGGLFSEDGVTLDDIRKIERNR 373
Dm          GFTGEVTAKYTSAMADIFTQVFNWLPLCHCINQKILVMHGGLFSTEDVTLDHIRRIERNC 395
Dd          GFQGEVVAKYSEMVFDLFSELFNWFPLAFVLDESFMVVHGGLFGKDGVTLDDIRKIKRNA 394
Sc          GFEDECKYKYSQRIFNMFAQSFESLPLATLINNDYLVMHGGLPSDPSATLSDFKNIDRFA 380
            ** .*   **:  : ::*:: *: :**.  :: . :::**** .  ..**..::.*.*
```

Figura 25, continua na próxima página

```
Hs              -QPPDSGPMCDLLWSDPQPQNGRSISKRGVSCQFGPDVTKAFLEENNLDYIIRSHEVKAE 432
Mm              -QPPDSGPMCDLLWSDPQPQNGRSVSKRGVSCQFGPDVTKAFLEENQLDYIIRSHEVKAE 432
Dm              -QPPEEGLMCELLWSDPQQWMGLGQSKRGVGIQFGPDVTEKFCKDNNLDYIIRSHEVKDM 454
Dd              PDPKDNELVQCLLWSDPQSNPGIAPSSRGVGVYFGPDVTRRFLKENNLSTIIRSHEVKEK 454
Sc              -QPPRDGAFMELLWADPQEANGMGPSQRGLGHAFGPDITDRFLRNNKLRKIFRSHELRMG 439
                 :*  .  .  ***:***   * . *.**:.  ****:*  * .:*:*  *:****::

Hs              GYEVAHGGRCVTVFSAPNYCDQMGNKASYIHLQ----------GSDLRPQFHQFTAVPHP 482
Mm              GYEVAHGGRCVTVFSAPNYCDQMGNKASYIHLQ----------GSDLRPQFHQFTAVPHP 482
Dm              GYEVAHNGKCITVFSAPNYCDTMGNMGAFITIT----------GNNLKPNYKSFEAVPHP 504
Dd              GYQIDDDGSLITVFSAPNYCDQSGNLGSFINIT----------EDKIK--ITTFEAVEHP 502
Sc              GVQFEQKGKLMTVFSAPNYCDSQGNLGGVIHVVPGHGILQAGRNDDQNLIIETFEAVEHP 499
                * :. . *  :**********  ** .. * :            .. .     * ** **

Hs              NVKPMAYANTLLQLGMM 499
Mm              NVKPMAYANTLLQLGMM 499
Dm              DVKPMAYANSLMNWLA- 520
Dd              NIPPMHYAKKYF----- 514
Sc              DIKPMAYSNGGFGL--- 513
                :: ** *::  :
```

Figura 25: Alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida da DdPP5c com PP5c de outros organismos. As seqüências da PP5c de *Homo sapiens* (Hs, NP_006238), *Drosophila melanogaster* (Dm, CAB99478), *Mus musculus* (Mm, AAB70573), *Dictyostelium discoideum* (Dd, DDB0185382) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc, NP_011639), com seus respectivos números de acesso no GenBank, foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W. (*) indica resíduos idênticos, (:) indica substituição conservativa e (.) indica substituição semi-conservativa. Os motifos TPRs estão indicados por flechas e os motivos conservados (-GDxHG-, -GDxVxRG-, -GNH-) encontrados em todos os membros da família PPP estão sublinhados.

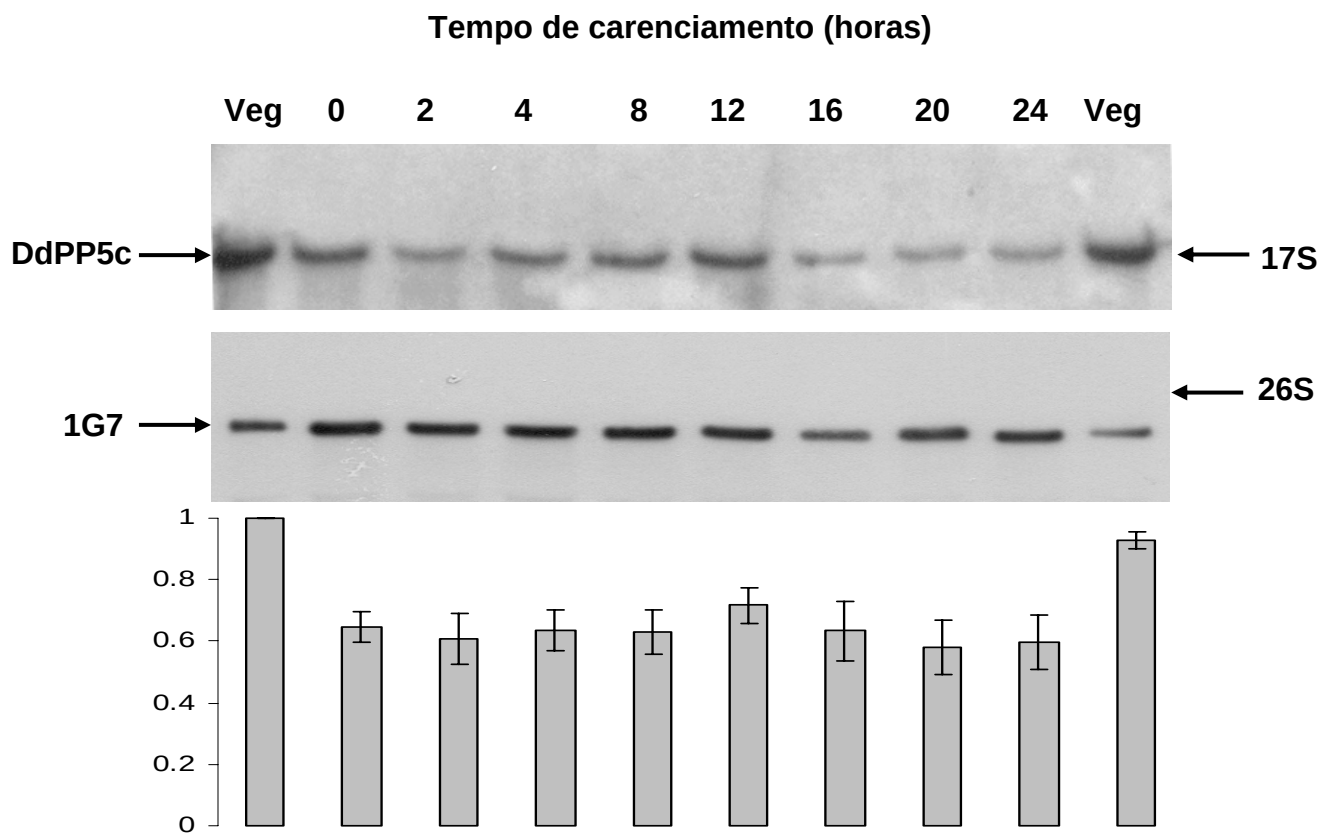


Figura 26: Análise do nível de expressão do mRNA da DdPP5c no crescimento e ao longo do desenvolvimento de *D. discoideum*. Células da linhagem AX-4 em fase de crescimento exponencial em meio HL5 (VEG) foram submetidas à carência nutricional em filtros para indução do desenvolvimento. As células foram coletadas imediatamente após a lavagem (0h), início da fase de agregação (2h), fase de agregação (4h), formação de agregados compactos (8h), após agregação (12h), início da culminação (16h), culminação em estágio mais avançado (20h) e formação completa de corpos de frutificação (24h). O RNA total foi isolado e aproximadamente 20μg foi submetido a eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes. Após transferência para membrana de náilon, *Northern blots* idênticos foram hibridizados com sondas radioativas preparadas a partir do cDNA DdPP5c ou gene 1G7. A figura corresponde a porções relevantes de autorradiogramas obtidos após exposição das membranas a filmes de raios-X. As posições de migração dos rRNAs estão indicadas à direita e dos respectivos mRNAs à esquerda. A quantificação foi feita pelo programa ImageQuant 5.1 que conta o número de pixels dos autorradiogramas. O gráfico mostra a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes após normalização em relação ao gene 1G7.

5. Conclusão e perspectivas

Utilizando ensaios no sistema de duplo híbrido em leveduras, identificamos proteínas que interagem com as subunidades catalíticas das serina/treonina fosfatases do tipo 1 (DdPP1c) e do tipo 4 (DdPP4c) de *D. discoideum* e que são potenciais candidatas a subunidades reguladoras destas enzimas neste organismo. Varreduras de bibliotecas de cDNA das fases de crescimento e desenvolvimento da linhagem AX4 de *D. discoideum* com as iscas DdPP1c e a variante mutante da da DdPP1c (DdPP1cF269C) possibilitaram a identificação de pelo menos 30 genes com evidência de interação com PP1c neste ensaio. A varredura das bibliotecas com a isca DdPP4 propiciou a identificação de 10 potenciais genes candidatos com evidência de interação com a PP4c neste tipo de ensaio. Vários dos candidatos identificados nas varreduras correspondem a ORFs hipotéticas ou hipotéticas conservadas (tabelas 4 a 6) que não apresentam similaridade significativa com proteínas de função conhecida. A especificidade de várias das interações identificadas já foi confirmada em ensaios independentes no sistema de duplo híbrido (R. A. Raposo e I. Irino, dados não publicados). Entretanto, outras metodologias deverão ser futuramente empregadas para melhor caracterização destes complexos protéicos.

Entre essas, citamos o gene *JC1V2_0_01698* (DDB0190820) que, de acordo com nossas análises, apresenta certa similaridade com o inibidor-3 da PP1c de mamíferos (Zhang *et al.*, 1998) e que em leveduras é denominado Ypi1p (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Demonstramos que o produto deste gene, que denominamos *dpiB*, codifica de fato uma proteína inibidora da PP1c (DdI-3), uma vez que seu produto recombinante, obtido pela expressão do cDNA correspondente em bactérias, foi capaz de inibir a atividade de fosforilase fosfatase da DdPP1c recombinante *in vitro*. rDdI-3 migra em SDS-PAGE como um polipeptídeo com massa molecular de cerca de 36 kDa, embora a massa molecular estimada para esta proteína seja de aproximadamente 15 kDa. Esta migração anômala em SDS-PAGE também é observada para I-3 de humano e Ypi1p, e provavelmente é conseqüência do alto conteúdo de aminoácidos hidrofílicos nestas proteínas que resulta em menor ligação de moléculas de SDS e menor mobilidade na eletroforese (Zhang *et al.*, 1998; Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Os ensaios de atividade de rDdI-3 frente a rDdPP1c mostraram que este inibidor é 50 vezes mais potente do que o inibidor rDdI-2, um ortólogo de I-2 de mamíferos que identificamos no genoma de *D. discoideum* (Sousa-Canavez *et al.*, 2007). A evidente atividade inibidora de DdI-3 contra DdPP1c reforça sua classificação como ortólogo do I-3 em *D. discoideum*. Aparentemente, este novo inibidor de PP1c que descrevemos em *D. discoideum* é tão potente quanto o I-3 de mamíferos, o qual apresenta IC_{50} de 1 nM frente a PP1c de coelho (Zhang *et al.*, 1998). Futuros

experimentos serão necessários para definirmos a importância fisiológica relativa de DdI-2 e DdI-3 na modulação da atividade de PP1c *in vivo*.

Iniciamos a construção do catálogo (***The Dictyostelium Phosphatome***) que irá conter todas as proteínas fosfatases e suas subunidades reguladoras codificadas no genoma de *D. discoideum*. Com base em buscas por similaridades com seqüências destas classes de proteínas existentes em outros organismos, identificamos potenciais ortólogos no genoma de *D. discoideum.* A estes somamos alguns genes identificados nas varreduras das bibliotecas de duplo híbrido. Até o momento, 101 genes foram catalogados e classificados nas diferentes famílias das proteínas fosfatases, sendo 16 na família das PTP clássicas, 26 na família das DSP, 15 na família das PPM e 31 na família PPP, os quais correspondem a subunidades catalíticas ou reguladoras. Entre as subunidades catalíticas, catalogamos os genes codificadores da DdPP4c, DdPP5c e DdPP6c, sendo que os dois últimos estão presentes em cópia única no genoma de *D. discoideum*. Os níveis de mRNA relativos a DdPP4c, DdPP5c e DdPP6c, determinados por *Northern blots* e/ou RT-qPCR, indicaram que eles são expressos constitutivamente no crescimento e ao longo do desenvolvimento de *D. discoideum*.

O perfil de expressão de vários dos genes identificados neste trabalho está sendo investigado no crescimento e nas diferentes fases desenvolvimento de *D. discoideum*, bem como em resposta a diversos tipos de estresses (L. F. Martins, dados não publicados). Esperamos, com esta abordagem, obter pistas adicionais da função de algumas destas potenciais subunidades catalíticas e reguladoras em *D. discoideum*. Tendo em vista que não fomos bem sucedidos na tentativa de nocautear o gene DdPP5c, o qual é provavelmente essencial, passaremos a utilizar outras abordagens para silenciamento da expressão gênica com o intuito de investigar os processos biológicos os quais essa classe de proteínas participa.

6. Referência

Adler, K., Gerisch, G., von Hugo, U., Lupas, A. & Schweiger, A. (1996) Classification of tyrosine kinases from *Dictyostelium discoideum* with two distinct, complete or incomplete catalytic domains. *FEBS Lett*, **395**, 286-292.

Aggen, J.B., Nairn, A.C. & Chamberlin, R. (2000) Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol*, **7**, R13-23.

Ajuh, P.M., Browne, G.J., Hawkes, N.A., Cohen, P.T., Roberts, S.G. & Lamond, A.I. (2000) Association of a protein phosphatase 1 activity with the human factor C1 (HCF) complex. *Nucleic Acids Res*, **28**, 678-686.

Alessi, D.R., Street, A.J., Cohen, P. & Cohen, P.T. (1993) Inhibitor-2 functions like a chaperone to fold three expressed isoforms of mammalian protein phosphatase-1 into a conformation with the specificity and regulatory properties of the native enzyme. *Eur J Biochem*, **213**, 1055-1066.

Alex, L.A., Borkovich, K.A. & Simon, M.I. (1996) Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3416-3421.

Alex, L.A., Korch, C., Selitrennikoff, C.P. & Simon, M.I. (1998) COS1, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen Candida albicans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7069-7073.

Alex, L.A. & Simon, M.I. (1994) Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet*, **10**, 133-138.

Ali, A., Zhang, J., Bao, S., Liu, I., Otterness, D., Dean, N.M., Abraham, R.T. & Wang, X.F. (2004) Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes Dev*, **18**, 249-254.

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. & Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, **117**, 699-711.

Alphey, L., Parker, L., Hawcroft, G., Guo, Y., Kaiser, K. & Morgan, G. (1997) KLP38B: a mitotic kinesin-related protein that binds PP1. *J Cell Biol*, **138**, 395-409.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.

Ambach, A., Saunus, J., Konstandin, M., Wesselborg, S., Meuer, S.C. & Samstag, Y. (2000) The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol*, **30**, 3422-3431.

Andersen, J.N., Del Vecchio, R.L., Kannan, N., Gergel, J., Neuwald, A.F. & Tonks, N.K. (2005) Computational analysis of protein tyrosine phosphatases: practical guide to bioinformatics and data resources. *Methods*, **35**, 90-114.

Andersen, J.N., Mortensen, O.H., Peters, G.H., Drake, P.G., Iversen, L.F., Olsen, O.H., Jansen, P.G., Andersen, H.S., Tonks, N.K. & Moller, N.P. (2001) Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol*, **21**, 7117-7136.

Andreeva, A.V., Evans, D.E., Hawes, C.R., Bennett, N. & Kutuzov, M.A. (1998) PP7, a plant phosphatase representing a novel evolutionary branch of eukaryotic protein Ser/Thr phosphatases. *Biochem Mol Biol Int*, **44**, 703-715.

Andreeva, A.V., Hawes, C.R., Evans, D.E., Bennet, N. & Kutuzov, M.A. (1997) [Genes of plant Ser/Thr protein phosphatases: detection of sequences related to PPT/rdgC]. *Bioorg Khim*, **23**, 486-491.

Andreeva, A.V. & Kutuzov, M.A. (1999) RdgC/PP5-related phosphatases: novel components in signal transduction. *Cell Signal*, **11**, 555-562.

Andreeva, A.V. & Kutuzov, M.A. (2001) Nuclear localization of the plant protein Ser/Thr phosphatase PP7. *Mol Cell Biol Res Commun*, **4**, 345-352.

Andreeva, A.V., Solov'eva, O.V., Kakuev, D.L. & Kutuzov, M.A. (2001) Purification of plant protein phosphatase PP7 and evidence for its redox regulation. *Arch Biochem Biophys*, **396**, 65-70.

Andrioli, L.P., Souza, G.M. & da Silva, A.M. (2006) Staurosporine induces tyrosine phosphorylation in *Dictyostelium discoideum* proteins. *Cell Biochem Funct*.

Andrioli, L.P., Zaini, P.A., Viviani, W. & Da Silva, A.M. (2003) *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase-1 catalytic subunit exhibits distinct biochemical properties. *Biochem J*, **373**, 703-711.

Araki, T., Tsujioka, M., Abe, T., Fukuzawa, M., Meima, M., Schaap, P., Morio, T., Urushihara, H., Katoh, M., Maeda, M., Tanaka, Y., Takeuchi, I. & Williams, J.G. (2003) A STAT-regulated, stress-induced signalling pathway in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*, **116**, 2907-2915.

Aramburu, J., Heitman, J. & Crabtree, G.R. (2004) Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep*, **5**, 343-348.

Archambault, J., Chambers, R.S., Kobor, M.S., Ho, Y., Cartier, M., Bolotin, D., Andrews, B., Kane, C.M. & Greenblatt, J. (1997) An essential component of a C-terminal domain phosphatase that interacts with transcription factor IIF in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14300-14305.

Archambault, J., Pan, G., Dahmus, G.K., Cartier, M., Marshall, N., Zhang, S., Dahmus, M.E. & Greenblatt, J. (1998) FCP1, the RAP74-interacting subunit of a human protein phosphatase that dephosphorylates the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase IIO. *J Biol Chem*, **273**, 27593-27601.

Arndt, K.T., Styles, C.A. & Fink, G.R. (1989) A suppressor of a HIS4 transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell*, **56**, 527-537.

Arroyo, J.D. & Hahn, W.C. (2005) Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene*, **24**, 7746-7755.

Aubry, L. & Firtel, R. (1999) Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 469-517.

Aubry, L. & Firtel, R.A. (1998) Spalten, a protein containing Galpha-protein-like and PP2C domains, is essential for cell-type differentiation in *Dictyostelium*. *Genes Dev*, **12**, 1525-1538.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*.

Ayllon, V., Martinez, A.C., Garcia, A., Cayla, X. & Rebollo, A. (2000) Protein phosphatase 1alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *Embo J*, **19**, 2237-2246.

Bagu, J.R., Sykes, B.D., Craig, M.M. & Holmes, C.F. (1997) A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1. Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A. *J Biol Chem*, **272**, 5087-5097.

Bahl, R., Bradley, K.C., Thompson, K.J., Swain, R.A., Rossie, S. & Meisel, R.L. (2001) Localization of protein Ser/Thr phosphatase 5 in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **90**, 101-109.

Bai, C. & Elledge, S.J. (1997) Gene identification using the yeast two-hybrid system. *Methods Enzymol*, **283**, 141-156.

Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I. & Doolittle, W.F. (2000) A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, **290**, 972-977.

Barford, D. (1995) Protein phosphatases. *Curr Opin Struct Biol*, **5**, 728-734.

Barford, D. (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci*, **21**, 407-412.

Barford, D. & Keller, J.C. (1994) Co-crystallization of the catalytic subunit of the serine/threonine specific protein phosphatase 1 from human in complex with microcystin LR. *J Mol Biol*, **235**, 763-766.

Barker, H.M., Brewis, N.D., Street, A.J., Spurr, N.K. & Cohen, P.T. (1994) Three genes for protein phosphatase 1 map to different human chromosomes: sequence, expression and gene localisation of protein serine/threonine phosphatase 1 beta (PPP1CB). *Biochim Biophys Acta*, **1220**, 212-218.

Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. & Fields, S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, **14**, 920-924.

Bartel, P.L. & Fields, S. (1995) Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol*, **254**, 241-263.

Barton, G.J., Cohen, P.T. & Barford, D. (1994) Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from Escherichia coli suggests homology to the protein phosphatases. *Eur J Biochem*, **220**, 225-237.

Bastians, H. & Ponstingl, H. (1996) The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J Cell Sci*, **109 (Pt 12)**, 2865-2874.

Baudouin, E., Meskiene, I. & Hirt, H. (1999) Short communication: unsaturated fatty acids inhibit MP2C, a protein phosphatase 2C involved in the wound-induced MAP kinase pathway regulation. *Plant J*, **20**, 343-348.

Bennett, D. & Alphey, L. (2006) Yeast Two-Hybrid Screens to Identify *Drosophila* PP1-Binding Proteins. *Methods Mol Biol*, **365**, 155-180.

Bennett, D., Lyulcheva, E. & Alphey, L. (2006) Towards a comprehensive analysis of the protein phosphatase 1 interactome in *Drosophila*. *J Mol Biol*, **364**, 196-212.

Berndt, A., Luo, X., Bohmer, F.D. & Kosmehl, H. (1999) Expression of the transmembrane protein tyrosine phosphatase RPTPalpha in human oral squamous cell carcinoma. *Histochem Cell Biol*, **111**, 399-403.

Besant, P.G. & Attwood, P.V. (2005) Mammalian histidine kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1754**, 281-290.

Beullens, M. & Bollen, M. (2002) The protein phosphatase-1 regulator NIPP1 is also a splicing factor involved in a late step of spliceosome assembly. *J Biol Chem*, **277**, 19855-19860.

Beullens, M., Stalmans, W. & Bollen, M. (1996) Characterization of a ribosomal inhibitory polypeptide of protein phosphatase-1 from rat liver. *Eur J Biochem*, **239**, 183-189.

Beullens, M., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Connor, J., Shenolikar, S., Stalmans, W. & Bollen, M. (1999) Molecular determinants of nuclear protein phosphatase-1 regulation by NIPP-1. *J Biol Chem*, **274**, 14053-14061.

Boeckeler, K., Tischendorf, G., Mutzel, R. & 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.

Bolanos-Garcia, V.M., Beaufils, S., Renault, A., Grossmann, J.G., Brewerton, S., Lee, M., Venkitaraman, A. & Blundell, T.L. (2005) The conserved N-terminal region of the mitotic checkpoint protein BUBR1: a putative TPR motif of high surface activity. *Biophys J*, **89**, 2640-2649.

Bollen, M. (2001) Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci*, **26**, 426-431.

Borthwick, E.B., Zeke, T., Prescott, A.R. & Cohen, P.T. (2001) Nuclear localization of protein phosphatase 5 is dependent on the carboxy-terminal region. *FEBS Lett*, **491**, 279-284.

Boutros, R., Dozier, C. & Ducommun, B. (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 185-191.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

Brewis, N.D. & Cohen, P.T. (1992) Protein phosphatase X has been highly conserved during mammalian evolution. *Biochim Biophys Acta*, **1171**, 231-233.

Brewis, N.D., Street, A.J., Prescott, A.R. & Cohen, P.T. (1993) PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *Embo J*, **12**, 987-996.

Brichese, L. & Valette, A. (2002) PP1 phosphatase is involved in Bcl-2 dephosphorylation after prolonged mitotic arrest induced by paclitaxel. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 504-508.

Brinker, A., Scheufler, C., Von Der Mulbe, F., Fleckenstein, B., Herrmann, C., Jung, G., Moarefi, I. & Hartl, F.U. (2002) Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes. *J Biol Chem*, **277**, 19265-19275.

Bromberg, J. & Darnell, J.E., Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, **19**, 2468-2473.

Brondello, J.M., Brunet, A., Pouyssegur, J. & McKenzie, F.R. (1997) The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J Biol Chem*, **272**, 1368-1376.

Brown, L., Borthwick, E.B. & Cohen, P.T. (2000) *Drosophila* protein phosphatase 5 is encoded by a single gene that is most highly expressed during embryonic development. *Biochim Biophys Acta*, **1492**, 470-476.

Brychzy, A., Rein, T., Winklhofer, K.F., Hartl, F.U., Young, J.C. & Obermann, W.M. (2003) Cofactor Tpr2 combines two TPR domains and a J domain to regulate the Hsp70/Hsp90 chaperone system. *Embo J*, **22**, 3613-3623.

Burnett, G. & Kennedy, E.P. (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem*, **211**, 969-980.

Busam, R.D., Thorsell, A.G., Flores, A., Hammarstrom, M., Persson, C. & Hallberg, B.M. (2006) First structure of a eukaryotic phosphohistidine phosphatase. *J Biol Chem*, **281**, 33830-33834.

Campos, M., Fadden, P., Alms, G., Qian, Z. & Haystead, T.A. (1996) Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography. *J Biol Chem*, **271**, 28478-28484.

Camps, M., Nichols, A. & Arkinstall, S. (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J*, **14**, 6-16.

Carnegie, G.K., Sleeman, J.E., Morrice, N., Hastie, C.J., Peggie, M.W., Philp, A., Lamond, A.I. & Cohen, P.T. (2003) Protein phosphatase 4 interacts with the Survival of Motor Neurons complex and enhances the temporal localisation of snRNPs. *J Cell Sci*, **116**, 1905-1913.

Cegielska, A., Shaffer, S., Derua, R., Goris, J. & Virshup, D.M. (1994) Different oligomeric forms of protein phosphatase 2A activate and inhibit simian virus 40 DNA replication. *Mol Cell Biol*, **14**, 4616-4623.

Ceulemans, H. & Bollen, M. (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev*, **84**, 1-39.

Ceulemans, H. & Bollen, M. (2006) A tighter RVxF motif makes a finer Sift. *Chem Biol*, **13**, 6-8.

Ceulemans, H., Stalmans, W. & Bollen, M. (2002) Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays*, **24**, 371-381.

Chambers, R.S. & Kane, C.M. (1996) Purification and characterization of an RNA polymerase II phosphatase from yeast. *J Biol Chem*, **271**, 24498-24504.

Chambers, R.S., Wang, B.Q., Burton, Z.F. & Dahmus, M.E. (1995) The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB. *J Biol Chem*, **270**, 14962-14969.

Charbonneau, H., Tonks, N.K., Kumar, S., Diltz, C.D., Harrylock, M., Cool, D.E., Krebs, E.G., Fischer, E.H. & Walsh, K.A. (1989) Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5252-5256.

Chaudhuri, M. (2001) Cloning and characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase type 5 from Trypanosoma brucei. *Gene*, **266**, 1-13.

Chen, J., Peterson, R.T. & Schreiber, S.L. (1998) Alpha 4 associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 827-832.

Chen, L., Iijima, M., Tang, M., Landree, M.A., Huang, Y.E., Xiong, Y., Iglesias, P.A. & Devreotes, P.N. (2007) PLA2 and PI3K/PTEN pathways act in parallel to mediate chemotaxis. *Dev Cell*, **12**, 603-614.

Chen, M.S., Hurov, J., White, L.S., Woodford-Thomas, T. & Piwnica-Worms, H. (2001) Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. *Mol Cell Biol*, **21**, 3853-3861.

Chen, M.S., Silverstein, A.M., Pratt, W.B. & Chinkers, M. (1996) The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *J Biol Chem*, **271**, 32315-32320.

Chen, M.X. & Cohen, P.T. (1997) Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. *FEBS Lett*, **400**, 136-140.

Chen, M.X., McPartlin, A.E., Brown, L., Chen, Y.H., Barker, H.M. & Cohen, P.T. (1994a) A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *Embo J*, **13**, 4278-4290.

Chen, P., Hutter, D., Liu, P. & Liu, Y. (2002) A mammalian expression system for rapid production and purification of active MAP kinase phosphatases. *Protein Expr Purif*, **24**, 481-488.

Chen, Y.H., Hansen, L., Chen, M.X., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Cohen, P.T. & Pedersen, O. (1994b) 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**, 1234-1241.

Cheng, A., Ross, K.E., Kaldis, P. & Solomon, M.J. (1999a) Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev*, **13**, 2946-2957.

Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M. & Sherr, C.J. (1999b) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J*, **18**, 1571-1583.

Chiarugi, P., Cirri, P., Taddei, M.L., Giannoni, E., Fiaschi, T., Buricchi, F., Camici, G., Raugei, G. & Ramponi, G. (2002) Insight into the role of low molecular weight phosphotyrosine phosphatase (LMW-PTP) on platelet-derived growth factor receptor (PDGF-r) signaling. LMW-PTP controls PDGF-r kinase activity through TYR-857 dephosphorylation. *J Biol Chem*, **277**, 37331-37338.

Chiarugi, P., Fiaschi, T., Taddei, M.L., Talini, D., Giannoni, E., Raugei, G. & Ramponi, G. (2001) Two vicinal cysteines confer a peculiar redox regulation to low molecular weight protein tyrosine phosphatase in response to platelet-derived growth factor receptor stimulation. *J Biol Chem*, **276**, 33478-33487.

Chinkers, M. (2001) Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol Metab*, **12**, 28-32.

Chisholm, R.L., Gaudet, P., Just, E.M., Pilcher, K.E., Fey, P., Merchant, S.N. & Kibbe, W.A. (2006) dictyBase, the model organism database for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res*, **34**, D423-427.

Cho, U.S. & Xu, W. (2007) Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature*, **445**, 53-57.
Chu, Y., Lee, E.Y. & Schlender, K.K. (1996) Activation of protein phosphatase 1. Formation of a metalloenzyme. *J Biol Chem*, **271**, 2574-2577.
Chung, S., McLean, M.R. & Rymond, B.C. (1999) Yeast ortholog of the *Drosophila* crooked neck protein promotes spliceosome assembly through stable U4/U6.U5 snRNP addition. *Rna*, **5**, 1042-1054.
Clark, A.R. (2003) MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids? *J Endocrinol*, **178**, 5-12.
Cliff, M.J., Harris, R., Barford, D., Ladbury, J.E. & Williams, M.A. (2006) Conformational diversity in the TPR domain-mediated interaction of protein phosphatase 5 with Hsp90. *Structure*, **14**, 415-426.
Clotet, J., Gari, E., Aldea, M. & Arino, J. (1999) The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol Cell Biol*, **19**, 2408-2415.
Clucas, C., Cabello, J., Bussing, I., Schnabel, R. & Johnstone, I.L. (2002) Oncogenic potential of a C.elegans cdc25 gene is demonstrated by a gain-of-function allele. *Embo J*, **21**, 665-674.
Coghlan, V.M., Perrino, B.A., Howard, M., Langeberg, L.K., Hicks, J.B., Gallatin, W.M. & Scott, J.D. (1995) Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science*, **267**, 108-111.
Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem*, **58**, 453-508.
Cohen, P. (1990) The structure and regulation of protein phosphatases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **24**, 230-235.
Cohen, P., Schelling, D.L. & Stark, M.J. (1989) Remarkable similarities between yeast and mammalian protein phosphatases. *FEBS Lett*, **250**, 601-606.
Cohen, P.T. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci*, **22**, 245-251.
Cohen, P.T. (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci*, **115**, 241-256.
Cohen, P.T., Brewis, N.D., Hughes, V. & Mann, D.J. (1990) Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett*, **268**, 355-359.
Cohen, P.T., Philp, A. & Vazquez-Martin, C. (2005) Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions. *FEBS Lett*, **579**, 3278-3286.
Connor, J.H., Kleeman, T., Barik, S., Honkanen, R.E. & Shenolikar, S. (1999) Importance of the beta12-beta13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors. *J Biol Chem*, **274**, 22366-22372.
Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Walsh, K.A., Fischer, E.H. & Krebs, E.G. (1989) cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5257-5261.
Corbin, J.D., Reimann, E.M., Walsh, D.A. & Krebs, E.G. (1970) Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle cyclic adenosine 3',5'- monophosphate-stimulated protein kinase. *J Biol Chem*, **245**, 4849-4851.
D'Andrea, L.D. & Regan, L. (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci*, **28**, 655-662.
da Cruz e Silva, O.B., da Cruz e Silva, E.F. & Cohen, P.T. (1988) Identification of a novel protein phosphatase catalytic subunit by cDNA cloning. *FEBS Lett*, **242**, 106-110.
Dammann, H., Hellstern, S., Husain, Q. & Mutzel, R. (1996) Primary structure, expression and developmental regulation of a *Dictyostelium* calcineurin A homologue. *Eur J Biochem*, **238**, 391-399.
Darnell, J.E., Jr. (1997) Phosphotyrosine signaling and the single cell:metazoan boundary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11767-11769.
Darnell, J.E., Lodish, H. & Baltimore, D. (1990) *Molecular cell biology*, New York.
Das, A.K., Cohen, P.W. & Barford, D. (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *Embo J*, **17**, 1192-1199.
Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T. & Barford, D. (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 A resolution. *Embo J*, **15**, 6798-6809.
de la Fuente van Bentem, S., Vossen, J.H., de Vries, K.J., van Wees, S., Tameling, W.I., Dekker, H.L., de Koster, C.G., Haring, M.A., Takken, F.L. & Cornelissen, B.J. (2005) Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. *Plant J*, **43**, 284-298.

De Smedt, A.C., Van Den Heuvel, R.L., Zwi Berneman, N. & Schoeters, G.E. (2001) Modulation of phenotype, cytokine production and stimulatory function of CD34+-derived DC by NiCl(2) and SDS. *Toxicol In Vitro*, **15**, 319-325.

Dean, D.A., Urban, G., Aragon, I.V., Swingle, M., Miller, B., Rusconi, S., Bueno, M., Dean, N.M. & Honkanen, R.E. (2001) Serine/threonine protein phosphatase 5 (PP5) participates in the regulation of glucocorticoid receptor nucleocytoplasmic shuttling. *BMC Cell Biol*, **2**, 6.

Denu, J.M. & Dixon, J.E. (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol*, **2**, 633-641.

Denu, J.M., Stuckey, J.A., Saper, M.A. & Dixon, J.E. (1996) Form and function in protein dephosphorylation. *Cell*, **87**, 361-364.

Devreotes, P. (1989a) Cell-cell interactions in *Dictyostelium* development. *Trends Genet*, **5**, 242-245.

Devreotes, P. (1989b) *Dictyostelium discoideum*: a model system for cell-cell interactions in development. *Science*, **245**, 1054-1058.

Di Como, C.J. & Arndt, K.T. (1996) Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev*, **10**, 1904-1916.

Dobson, S., Bracchi, V., Chakrabarti, D. & Barik, S. (2001) Characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase (PfPPJ) from the malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, **115**, 29-39.

Dombradi, V., Axton, J.M., Brewis, N.D., da Cruz e Silva, E.F., Alphey, L. & Cohen, P.T. (1990) *Drosophila* contains three genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1. *Eur J Biochem*, **194**, 739-745.

Draetta, G. & Eckstein, J. (1997) Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*, **1332**, M53-63.

Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. & Elledge, S.J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev*, **7**, 555-569.

Early, A., Gamper, M., Moniakis, J., Kim, E., Hunter, T., Williams, J.G. & Firtel, R.A. (2001) Protein tyrosine phosphatase PTP1 negatively regulates *Dictyostelium* STATa and is required for proper cell-type proportioning. *Dev Biol*, **232**, 233-245.

Egelhoff, T.T., Titus, M.A., Manstein, D.J., Ruppel, K.M. & Spudich, J.A. (1991) Molecular genetic tools for study of the cytoskeleton in *Dictyostelium*. *Methods Enzymol*, **196**, 319-334.

Egloff, M.P., Cohen, P.T., Reinemer, P. & Barford, D. (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol*, **254**, 942-959.

Egloff, M.P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P.T., Cohen, P. & Barford, D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J*, **16**, 1876-1887.

Eichinger, L., Lee, S.S. & Schleicher, M. (1999) *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech*, **47**, 124-134.

Eichinger, L. & Noegel, A.A. (2003) Crawling into a new era-the *Dictyostelium* genome project. *Embo J*, **22**, 1941-1946.

Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M.A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., *et al.* (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **435**, 43-57.

Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L. & Kennedy, B.P. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, **283**, 1544-1548.

England, P.J. (1975) Correlation between contraction and phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin in perfused rat heart. *FEBS Lett*, **50**, 57-60.

Espanel, X. & van Huijsduijnen, R.H. (2005) Applying the SPOT peptide synthesis procedure to the study of protein tyrosine phosphatase substrate specificity: probing for the heavenly match in vitro. *Methods*, **35**, 64-72.

Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K. & Morita, F. (1995) A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem (Tokyo)*, **118**, 1104-1107.

Farooq, A. & Zhou, M.M. (2004) Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal*, **16**, 769-779.

Fauman, E.B. & Saper, M.A. (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem Sci*, **21**, 413-417.

Faux, M.C. & Scott, J.D. (1996) More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem Sci*, **21**, 312-315.

Favre, B., Zolnierowicz, S., Turowski, P. & Hemmings, B.A. (1994) The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *J Biol Chem*, **269**, 16311-16317.

Fernandez-Sarabia, M.J., Sutton, A., Zhong, T. & Arndt, K.T. (1992) SIT4 protein phosphatase is required for the normal accumulation of SWI4, CLN1, CLN2, and HCS26 RNAs during late G1. *Genes Dev*, **6**, 2417-2428.

Fernandez, J.J., Candenas, M.L., Souto, M.L., Trujillo, M.M. & Norte, M. (2002) Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr Med Chem*, **9**, 229-262.

Fiaschi, T., Chiarugi, P., Buricchi, F., Giannoni, E., Taddei, M.L., Talini, D., Cozzi, G., Zecchi-Orlandini, S., Raugei, G. & Ramponi, G. (2001) Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase is involved in growth inhibition during cell differentiation. *J Biol Chem*, **276**, 49156-49163.

Fields, S. & Bartel, P.L. (2001) The two-hybrid system. A personal view. *Methods Mol Biol*, **177**, 3-8.

Fields, S. & Sternglanz, R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*, **10**, 286-292.

Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L. & Bateman, A. (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res*, **34**, D247-251.

Fiorini, L.C. (2003) Identificação de genes codificadores de serina/treonina fosfatases em *Dictyostelium discoideum* e caracterização funcional da proteína fosfatase de tipo 4 (PP4). *Departamento de Bioquímica*. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 112.

Fischer, E.H., Graves, D.J., Crittenden, E.R. & Krebs, E.G. (1959) Structure of the site phosphorylated in the phosphorylase b to a reaction. *J Biol Chem*, **234**, 1698-1704.

Fischer, E.H. & Krebs, E.G. (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem*, **216**, 121-132.

Fjeld, C.C. & Denu, J.M. (1999) Kinetic analysis of human serine/threonine protein phosphatase 2Calpha. *J Biol Chem*, **274**, 20336-20343.

Fukuda, H., Tsuchiya, N., Hara-Fujita, K., Takagi, S., Nagao, M. & Nakagama, H. (2006) Induction of abnormal nuclear shapes in two distinct modes by overexpression of serine/threonine protein phosphatase 5 in Hela cells. *J Cell Biochem*.

Fukuzawa, M., Araki, T., Adrian, I. & Williams, J.G. (2001) Tyrosine phosphorylation-independent nuclear translocation of a *Dictyostelium* STAT in response to DIF signaling. *Mol Cell*, **7**, 779-788.

Galaktionov, K., Lee, A.K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M. & Beach, D. (1995) CDC25 phosphatases as potential human oncogenes. *Science*, **269**, 1575-1577.

Gamper, M., Howard, P.K., Hunter, T. & Firtel, R.A. (1996) Multiple roles of the novel protein tyrosine phosphatase PTP3 during *Dictyostelium* growth and development. *Mol Cell Biol*, **16**, 2431-2444.

Gamper, M., Kim, E., Howard, P.K., Ma, H., Hunter, T. & Firtel, R.A. (1999) Regulation of *Dictyostelium* protein-tyrosine phosphatase-3 (PTP3) through osmotic shock and stress stimulation and identification of pp130 as a PTP3 substrate. *J Biol Chem*, **274**, 12129-12138.

Garcia-Gimeno, M.A., Munoz, I., Arino, J. & Sanz, P. (2003) Molecular characterization of Ypi1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J Biol Chem*, **278**, 47744-47752.

Garcia, A., Cayla, X., Guergnon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M.P., Fleischer, A. & Rebollo, A. (2003) Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie*, **85**, 721-726.

Gauss, C.M., Sheppeck, J.E., 2nd, Nairn, A.C. & Chamberlin, R. (1997) A molecular modeling analysis of the binding interactions between the okadaic acid class of natural product inhibitors and the Ser-Thr phosphatases, PP1 and PP2A. *Bioorg Med Chem*, **5**, 1751-1773.

Gietz, R.D. & Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, **350**, 87-96.

Ginger, R.S., Dalton, E.C., Ryves, W.J., Fukuzawa, M., Williams, J.G. & Harwood, A.J. (2000) Glycogen synthase kinase-3 enhances nuclear export of a *Dictyostelium* STAT protein. *Embo J*, **19**, 5483-5491.

Gingras, A.C., Caballero, M., Zarske, M., Sanchez, A., Hazbun, T.R., Fields, S., Sonenberg, N., Hafen, E., Raught, B. & Aebersold, R. (2005) A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 1725-1740.

Glockner, G., Eichinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J.A., Bankier, A.T., Dear, P.H., Lehmann, R., Baumgart, C., Parra, G., Abril, J.F., Guigo, R., Kumpf, K., Tunggal, B., Cox, E., Quail, M.A., Platzer, M., Rosenthal, A. & Noegel, A.A. (2002) Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **418**, 79-85.

Goldberg, J., Huang, H.B., Kwon, Y.G., Greengard, P., Nairn, A.C. & Kuriyan, J. (1995) Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*, **376**, 745-753.

Goldberg, J.M., Manning, G., Liu, A., Fey, P., Pilcher, K.E., Xu, Y. & Smith, J.L. (2006) The *Dictyostelium* kinome--analysis of the protein kinases from a simple model organism. *PLoS Genet*, **2**, e38.

Goldberg, Y. (1999) Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem Pharmacol*, **57**, 321-328.

Gong, C.X., Liu, F., Wu, G., Rossie, S., Wegiel, J., Li, L., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2004) Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. *J Neurochem*, **88**, 298-310.

Goshima, G., Iwasaki, O., Obuse, C. & Yanagida, M. (2003) The role of Ppe1/PP6 phosphatase for equal chromosome segregation in fission yeast kinetochore. *Embo J*, **22**, 2752-2763.

Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K. & Navia, M.A. (1995) X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, **82**, 507-522.

Gross, J.D. (1994) Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiol Rev*, **58**, 330-351.

Groves, M.R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B.A. & Barford, D. (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell*, **96**, 99-110.

Hahn, J.S. (2005) Regulation of Nod1 by Hsp90 chaperone complex. *FEBS Lett*, **579**, 4513-4519.

Hanks, S.K. & Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J*, **9**, 576-596.

Hanks, S.K. & Quinn, A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol*, **200**, 38-62.

Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.

Hastie, C.J., Carnegie, G.K., Morrice, N. & Cohen, P.T. (2000) A novel 50 kDa protein forms complexes with protein phosphatase 4 and is located at centrosomal microtubule organizing centres. *Biochem J*, **347 Pt 3**, 845-855.

Hastie, C.J. & Cohen, P.T. (1998) Purification of protein phosphatase 4 catalytic subunit: inhibition by the antitumour drug fostriecin and other tumour suppressors and promoters. *FEBS Lett*, **431**, 357-361.

Hausmann, S., Erdjument-Bromage, H. & Shuman, S. (2004) *Schizosaccharomyces pombe* carboxyl-terminal domain (CTD) phosphatase Fcp1: distributive mechanism, minimal CTD substrate, and active site mapping. *J Biol Chem*, **279**, 10892-10900.

Hausmann, S. & Shuman, S. (2002) Characterization of the CTD phosphatase Fcp1 from fission yeast. Preferential dephosphorylation of serine 2 versus serine 5. *J Biol Chem*, **277**, 21213-21220.

Hausmann, S. & Shuman, S. (2003) Defining the active site of *Schizosaccharomyces pombe* C-terminal domain phosphatase Fcp1. *J Biol Chem*, **278**, 13627-13632.

Hayashi, N., Nomura, T., Sakumoto, N., Mukai, Y., Kaneko, Y., Harashima, S. & Murakami, S. (2005) The SIT4 gene, which encodes protein phosphatase 2A, is required for telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **47**, 359-367.

Hellstern, S., Dammann, H., Husain, Q. & Mutzel, R. (1997) Overexpression, purification and characterization of *Dictyostelium* calcineurin A. *Res Microbiol*, **148**, 335-343.

Helps, N.R., Barker, H.M., Elledge, S.J. & Cohen, P.T. (1995) Protein phosphatase 1 interacts with p53BP2, a protein which binds to the tumour suppressor p53. *FEBS Lett*, **377**, 295-300.

Helps, N.R., Brewis, N.D., Lineruth, K., Davis, T., Kaiser, K. & Cohen, P.T. (1998) Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci*, **111 (Pt 10)**, 1331-1340.

Helps, N.R., Luo, X., Barker, H.M. & Cohen, P.T. (2000) NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J*, **349**, 509-518.

Hemmings, B.A., Adams-Pearson, C., Maurer, F., Muller, P., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J. & Stone, S.R. (1990a) alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry*, **29**, 3166-3173.

Hemmings, H.C., Jr., Nairn, A.C., Elliott, J.I. & Greengard, P. (1990b) Synthetic peptide analogs of DARPP-32 (Mr 32,000 dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein), an inhibitor of protein phosphatase-1. Phosphorylation, dephosphorylation, and inhibitory activity. *J Biol Chem*, **265**, 20369-20376.

Hendrix, P., Turowski, P., Mayer-Jaekel, R.E., Goris, J., Hofsteenge, J., Merlevede, W. & Hemmings, B.A. (1993) Analysis of subunit isoforms in protein phosphatase 2A holoenzymes from rabbit and Xenopus. *J Biol Chem*, **268**, 7330-7337.

Higgins, D.G. (1994) CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. *Methods Mol Biol*, **25**, 307-318.

Hiraga, A., Morrice, N., Honda, E., Tamura, S. & Munakata, H. (2006) Clathrin light chain b is capable of affecting potently a major protein phosphatase from microtubules (MT-PP1). *FEBS Lett*, **580**, 1425-1430.

Hirano, K., Erdodi, F., Patton, J.G. & Hartshorne, D.J. (1996) Interaction of protein phosphatase type 1 with a splicing factor. *FEBS Lett*, **389**, 191-194.

Hirano, K., Ito, M. & Hartshorne, D.J. (1995) Interaction of the ribosomal protein, L5, with protein phosphatase type 1. *J Biol Chem*, **270**, 19786-19790.

Holmes, N. (2006) CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology*, **117**, 145-155.

Honkanen, R.E. & Golden, T. (2002) Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Curr Med Chem*, **9**, 2055-2075.

Horn, F. & Gross, J. (1996) A role for calcineurin in *Dictyostelium discoideum* development. *Differentiation*, **60**, 269-275.

Howard, P.K., Gamper, M., Hunter, T. & Firtel, R.A. (1994) Regulation by protein-tyrosine phosphatase PTP2 is distinct from that by PTP1 during *Dictyostelium* growth and development. *Mol Cell Biol*, **14**, 5154-5164.

Howard, P.K., Sefton, B.M. & Firtel, R.A. (1992) Analysis of a spatially regulated phosphotyrosine phosphatase identifies tyrosine phosphorylation as a key regulatory pathway in *Dictyostelium*. *Cell*, **71**, 637-647.

Howard, P.K., Sefton, B.M. & Firtel, R.A. (1993) Tyrosine phosphorylation of actin in *Dictyostelium* associated with cell-shape changes. *Science*, **259**, 241-244.

Hu, M.C., Tang-Oxley, Q., Qiu, W.R., Wang, Y.P., Mihindukulasuriya, K.A., Afshar, R. & Tan, T.H. (1998) Protein phosphatase X interacts with c-Rel and stimulates c-Rel/nuclear factor kappaB activity. *J Biol Chem*, **273**, 33561-33565.

Huang, H.S., Pozarowski, P., Gao, Y., Darzynkiewicz, Z. & 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.

Huang, Z., Somanath, P., Chakrabarti, R., Eddy, E.M. & Vijayaraghavan, S. (2004) Changes in Intracellular Distribution and Activity of Protein Phosphatase PP1{gamma}2 and Its Regulating Proteins in Spermatozoa Lacking AKAP4. *Biol Reprod*.

Hubbard, M.J. & Cohen, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci*, **18**, 172-177.

Hunter, T. (1987) A thousand and one protein kinases. *Cell*, **50**, 823-829.

Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236.

Hunter, T. & Plowman, G.D. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci*, **22**, 18-22.

Hunter, T. & Sefton, B.M. (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1311-1315.

Ingebritsen, T.S. & Cohen, P. (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem*, **132**, 255-261.

Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. & Fields, S. (1993) Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, **8**, 1693-1696.

Jablonowski, D., Butler, A.R., Fichtner, L., Gardiner, D., Schaffrath, R. & Stark, M.J. (2001) Sit4p protein phosphatase is required for sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to Kluyveromyces lactis zymocin. *Genetics*, **159**, 1479-1489.

Janssens, V. & Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, **353**, 417-439.

Janssens, V., Van Hoof, C., Merlevede, W. & Goris, J. (1998) PTPA regulating PP2A as a dual specificity phosphatase. *Methods Mol Biol*, **93**, 103-115.
Jeong, J.Y., Johns, J., Sinclair, C., Park, J.M. & Rossie, S. (2003) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* protein Ser/Thr phosphatase T1 and comparison to its mammalian homolog PP5. *BMC Cell Biol*, **4**, 3.
Jia, Z. (1997) Protein phosphatases: structures and implications. *Biochem Cell Biol*, **75**, 17-26.
Jia, Z., Ye, Q., Dinaut, A.N., Wang, Q., Waddleton, D., Payette, P., Ramachandran, C., Kennedy, B., Hum, G. & Taylor, S.D. (2001) Structure of protein tyrosine phosphatase 1B in complex with inhibitors bearing two phosphotyrosine mimetics. *J Med Chem*, **44**, 4584-4594.
Jiang, Y. (2006) Regulation of the cell cycle by protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**, 440-449.
Kamenski, T., Heilmeier, S., Meinhart, A. & Cramer, P. (2004) Structure and mechanism of RNA polymerase II CTD phosphatases. *Mol Cell*, **15**, 399-407.
Kamibayashi, C., Estes, R., Lickteig, R.L., Yang, S.I., Craft, C. & Mumby, M.C. (1994) Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits. *J Biol Chem*, **269**, 20139-20148.
Kang, H., Sayner, S.L., Gross, K.L., Russell, L.C. & Chinkers, M. (2001) Identification of amino acids in the tetratricopeptide repeat and C-terminal domains of protein phosphatase 5 involved in autoinhibition and lipid activation. *Biochemistry*, **40**, 10485-10490.
Kashishian, A., Howard, M., Loh, C., Gallatin, W.M., Hoekstra, M.F. & Lai, Y. (1998) AKAP79 inhibits calcineurin through a site distinct from the immunophilin-binding region. *J Biol Chem*, **273**, 27412-27419.
Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M. & Cato, A.C. (2001) Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo J*, **20**, 7108-7116.
Katagiri, T., Ogimoto, M., Hasegawa, K., Arimura, Y., Mitomo, K., Okada, M., Clark, M.R., Mizuno, K. & Yakura, H. (1999) CD45 negatively regulates lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells. *J Immunol*, **163**, 1321-1326.
Katagiri, T., Ogimoto, M., Hasegawa, K., Mizuno, K. & Yakura, H. (1995) Selective regulation of Lyn tyrosine kinase by CD45 in immature B cells. *J Biol Chem*, **270**, 27987-27990.
Kavakli, I.H. & Sancar, A. (2002) Circadian photoreception in humans and mice. *Mol Interv*, **2**, 484-492.
Kawata, T., Shevchenko, A., Fukuzawa, M., Jermyn, K.A., Totty, N.F., Zhukovskaya, N.V., Sterling, A.E., Mann, M. & Williams, J.G. (1997) SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Cell*, **89**, 909-916.
Kay, R.R. & Williams, J.G. (1999) The *Dictyostelium* genome project: an invitation to species hopping. *Trends Genet*, **15**, 294-297.
Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S. & Gribskov, M. (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiol*, **129**, 908-925.
Kessin, R.H. & Campagne, M.v.L. (1992) The development of a social amoeba. *American Scientist*, **80**, 556-565.
Khandelwal, R.L. & Pugazhenthi, S. (1995) In vivo effects of vanadate on hepatic glycogen metabolizing and lipogenic enzymes in insulin-dependent and insulin-resistant diabetic animals. *Mol Cell Biochem*, **153**, 87-94.
Kim, L., Liu, J. & Kimmel, A.R. (1999) The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell*, **99**, 399-408.
Kimmel, A.R. & Firtel, R.A. (2004) Breaking symmetries: regulation of *Dictyostelium* development through chemoattractant and morphogen signal-response. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 540-549.
Kimura, M. & Ishihama, A. (2004) Tfg3, a subunit of the general transcription factor TFIIF in *Schizosaccharomyces pombe*, functions under stress conditions. *Nucleic Acids Res*, **32**, 6706-6715.
Kirchhausen, T. (1999) Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 705-732.
Kirchhausen, T. (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem*, **69**, 699-727.
Kita, A., Matsunaga, S., Takai, A., Kataiwa, H., Wakimoto, T., Fusetani, N., Isobe, M. & Miki, K. (2002) Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Structure (Camb)*, **10**, 715-724.
Klee, C.B., Crouch, T.H. & Krinks, M.H. (1979) Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 6270-6273.

Klee, C.B. & Krinks, M.H. (1978) Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry*, **17**, 120-126.
Klee, C.B., Ren, H. & Wang, X. (1998) Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem*, **273**, 13367-13370.
Kloeker, S., Bryant, J.C., Strack, S., Colbran, R.J. & Wadzinski, B.E. (1997) Carboxymethylation of nuclear protein serine/threonine phosphatase X. *Biochem J*, **327 (Pt 2)**, 481-486.
Kloeker, S., Reed, R., McConnell, J.L., Chang, D., Tran, K., Westphal, R.S., Law, B.K., Colbran, R.J., Kamoun, M., Campbell, K.S. & Wadzinski, B.E. (2003) Parallel purification of three catalytic subunits of the protein serine/threonine phosphatase 2A family (PP2A(C), PP4(C), and PP6(C)) and analysis of the interaction of PP2A(C) with alpha4 protein. *Protein Expr Purif*, **31**, 19-33.
Kloeker, S. & Wadzinski, B.E. (1999) Purification and identification of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase 4. *J Biol Chem*, **274**, 5339-5347.
Klumpp, S. & Krieglstein, J. (2002) Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem*, **269**, 1067-1071.
Klumpp, S. & Krieglstein, J. (2005) Reversible phosphorylation of histidine residues in vertebrate proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1754**, 291-295.
Klumpp, S., Selke, D., Fischer, D., Baumann, A., Muller, F. & Thanos, S. (1998a) Protein phosphatase type-2C isozymes present in vertebrate retinae: purification, characterization, and localization in photoreceptors. *J Neurosci Res*, **51**, 328-338.
Klumpp, S., Selke, D. & Hermesmeier, J. (1998b) Protein phosphatase type 2C active at physiological Mg2+: stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS Lett*, **437**, 229-232.
Klumpp, S., Thissen, M.C. & Krieglstein, J. (2006) Protein phosphatases types 2Calpha and 2Cbeta in apoptosis. *Biochem Soc Trans*, **34**, 1370-1375.
Kobor, M.S., Archambault, J., Lester, W., Holstege, F.C., Gileadi, O., Jansma, D.B., Jennings, E.G., Kouyoumdjian, F., Davidson, A.R., Young, R.A. & Greenblatt, J. (1999) An unusual eukaryotic protein phosphatase required for transcription by RNA polymerase II and CTD dephosphorylation in S. cerevisiae. *Mol Cell*, **4**, 55-62.
Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheyas, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J. & Laz, T.M. (2002) Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0043.
Krejsa, C.M., Nadler, S.G., Esselstyn, J.M., Kavanagh, T.J., Ledbetter, J.A. & Schieven, G.L. (1997) Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF-kappaB. *J Biol Chem*, **272**, 11541-11549.
Kreppel, L., Fey, P., Gaudet, P., Just, E., Kibbe, W.A., Chisholm, R.L. & Kimmel, A.R. (2004) dictyBase: a new *Dictyostelium discoideum* genome database. *Nucleic Acids Res*, **32**, D332-333.
Kristjansdottir, K. & Rudolph, J. (2004) Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem Biol*, **11**, 1043-1051.
Kuspa, A. & Loomis, W.F. (1992) Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8803-8807.
Kuspa, A. & Loomis, W.F. (2006) The Genome of *Dictyostelium discoideum*. *Methods Mol Biol*, **346**, 15-30.
Kuspa, A., Sucgang, R. & Shaulsky, G. (2001) The promise of a protist: the *Dictyostelium* genome project. *Funct Integr Genomics*, **1**, 279-293.
Kutuzov, M.A. & Andreeva, A.V. (2001) Noncompetitive inhibition of plant protein Ser/Thr phosphatase PP7 by phosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 93-96.
Kutuzov, M.A., Bennett, N. & Andreeva, A.V. (2001) Interaction of plant protein Ser/Thr phosphatase PP7 with calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 634-640.
Kutuzov, M.A., Evans, D.E. & Andreeva, A.V. (1998) Expression and characterization of PP7, a novel plant protein Ser/Thr phosphatase distantly related to RdgC/PPEF and PP5. *FEBS Lett*, **440**, 147-152.
Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
Lai, M.M., Burnett, P.E., Wolosker, H., Blackshaw, S. & Snyder, S.H. (1998) Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem*, **273**, 18325-18331.
Langan, T.A. (1969) Phosphorylation of liver histone following the administration of glucagon and insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **64**, 1276-1283.
Leube, M.P., Grill, E. & Amrhein, N. (1998) ABI1 of Arabidopsis is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration. *FEBS Lett*, **424**, 100-104.

Leung-Hagesteijn, C., Mahendra, A., Naruszewicz, I. & Hannigan, G.E. (2001) Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1. *Embo J*, **20**, 2160-2170.

Li, B. & Fields, S. (1993) Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *Faseb J*, **7**, 957-963.

Li, L. & Dixon, J.E. (2000) Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Semin Immunol*, **12**, 75-84.

Li, Q.H. & Yang, H.Q. (2006) Cryptochrome Signaling in Plants. *Photochem Photobiol*.

Lin, Q., Buckler, E.S.t., Muse, S.V. & Walker, J.C. (1999) Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases. *Mol Phylogenet Evol*, **12**, 57-66.

Lincoln, A.J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R.M., Palko, M.E., De Miguel, M.P., Tessarollo, L. & Donovan, P.J. (2002) Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet*, **30**, 446-449.

Lindenthal, C. & Klinkert, M.Q. (2002) Identification and biochemical characterisation of a protein phosphatase 5 homologue from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, **120**, 257-268.

Linn, T.C., Pettit, F.H. & Reed, L.J. (1969) Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **62**, 234-241.

Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Rossie, S. & Gong, C.X. (2005) Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **280**, 1790-1796.

Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. & Gong, C.X. (2002) Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience*, **115**, 829-837.

Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. & Schreiber, S.L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, **66**, 807-815.

Livak, K.J. & 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**, 402-408.

Ljungstrom, O., Berglund, L., Hjelmquist, G., Humble, E. & Engstrom, L. (1974) Cyclic 3',5'-AMP-stimulated and non-stimulated phosphorylation of protein fractions from rat-liver cell sap on incubation with (gamma-32P)ATP. *Ups J Med Sci*, **79**, 129-137.

Loomis, W. (1982) *Development in Dictyostelium discoideum*, NY.

Loomis, W.F. (1996) Genetic networks that regulate development in *Dictyostelium* cells. *Microbiol Rev*, **60**, 135-150.

Loomis, W.F. (1998) Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 684-694.

Loomis, W.F. (2006) The *Dictyostelium* genome. *Curr Issues Mol Biol*, **8**, 63-73.

Luke, M.M., Della Seta, F., Di Como, C.J., Sugimoto, H., Kobayashi, R. & Arndt, K.T. (1996) The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol Cell Biol*, **16**, 2744-2755.

Ma, Z.Q., Chua, S.S., DeMayo, F.J. & Tsai, S.Y. (1999) Induction of mammary gland hyperplasia in transgenic mice over-expressing human Cdc25B. *Oncogene*, **18**, 4564-4576.

MacKeigan, J.P., Murphy, L.O. & Blenis, J. (2005) Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol*, **7**, 591-600.

MacKelvie, S.H., Andrews, P.D. & Stark, M.J. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* gene SDS22 encodes a potential regulator of the mitotic function of yeast type 1 protein phosphatase. *Mol Cell Biol*, **15**, 3777-3785.

MacKintosh, C. & MacKintosh, R.W. (1994) Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends Biochem Sci*, **19**, 444-448.

MacKintosh, R.W., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T., Cohen, P. & MacKintosh, C. (1995) The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett*, **371**, 236-240.

MacMillan, L.B., Bass, M.A., Cheng, N., Howard, E.F., Tamura, M., Strack, S., Wadzinski, B.E. & Colbran, R.J. (1999) Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. *J Biol Chem*, **274**, 35845-35854.

Maeda, M. & Takeuchi, I. (1997) [*Dictyostelium*]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **42**, 2914-2919.

Manlandro, C.M., Haydon, D.H. & Rosenwald, A.G. (2005) Ability of Sit4p to promote K+ efflux via Nha1p is modulated by Sap155p and Sap185p. *Eukaryot Cell*, **4**, 1041-1049.

Mann, D.J., Dombradi, V. & Cohen, P.T. (1993) *Drosophila* protein phosphatase V functionally complements a SIT4 mutant in *Saccharomyces cerevisiae* and its amino-terminal region can confer this complementation to a heterologous phosphatase catalytic domain. *Embo J*, **12**, 4833-4842.

Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D*., et al.* (2007) CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res*, **35**, D237-240.

Martin, H., Flandez, M., Nombela, C. & Molina, M. (2005) Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol*, **58**, 6-16.

Masuda, C.A., Ramirez, J., Pena, A. & Montero-Lomeli, M. (2000) Regulation of monovalent ion homeostasis and pH by the Ser-Thr protein phosphatase SIT4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **275**, 30957-30961.

Matthews, H.R. (1995) Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol Ther*, **67**, 323-350.

Mattingly, R.R. (1999) Phosphorylation of serine 916 of Ras-GRF1 contributes to the activation of exchange factor activity by muscarinic receptors. *J Biol Chem*, **274**, 37379-37384.

Mattingly, R.R. & Macara, I.G. (1996) Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-protein beta gamma subunits. *Nature*, **382**, 268-272.

Mattingly, R.R., Saini, V. & Macara, I.G. (1999) Activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by lysophosphatidic acid. *Cell Signal*, **11**, 603-610.

Mayanagi, T., Maeda, Y., Hirose, S., Arakane, T., Araki, T. & Amagai, A. (2004) Cloning, sequencing, and expression of the genomic DNA encoding the protein phosphatase cdc25 in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genes Evol*, **214**, 510-514.

Mayer-Jaekel, R.E. & Hemmings, B.A. (1994) Protein phosphatase 2A--a 'menage a trois'. *Trends Cell Biol*, **4**, 287-291.

Maynes, J.T., Bateman, K.S., Cherney, M.M., Das, A.K., Luu, H.A., Holmes, C.F. & James, M.N. (2001) Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, **276**, 44078-44082.

McCain, D.F., Catrina, I.E., Hengge, A.C. & Zhang, Z.Y. (2002) The catalytic mechanism of Cdc25A phosphatase. *J Biol Chem*, **277**, 11190-11200.

Meiselbach, H., Sticht, H. & 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.

Mendoza, M.C., Booth, E.O., Shaulsky, G. & Firtel, R.A. (2007) MEK1 and Protein Phosphatase 4 Coordinate *Dictyostelium* Development and Chemotaxis. *Mol Cell Biol*.

Mendoza, M.C., Du, F., Iranfar, N., Tang, N., Ma, H., Loomis, W.F. & Firtel, R.A. (2005) Loss of SMEK, a novel, conserved protein, suppresses MEK1 null cell polarity, chemotaxis, and gene expression defects. *Mol Cell Biol*, **25**, 7839-7853.

Merlot, S., Meili, R., Pagliarini, D.J., Maehama, T., Dixon, J.E. & Firtel, R.A. (2003) A PTEN-related 5-phosphatidylinositol phosphatase localized in the Golgi. *J Biol Chem*, **278**, 39866-39873.

Meskiene, I., Bogre, L., Glaser, W., Balog, J., Brandstotter, M., Zwerger, K., Ammerer, G. & Hirt, H. (1998) MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1938-1943.

Messner, D.J., Romeo, C., Boynton, A. & Rossie, S. (2006) Inhibition of PP2A, but not PP5, mediates p53 activation by low levels of okadaic acid in rat liver epithelial cells. *J Cell Biochem*, **99**, 241-255.

Mihindukulasuriya, K.A., Zhou, G., Qin, J. & Tan, T.H. (2004) Protein phosphatase 4 interacts with and down-regulates insulin receptor substrate 4 following tumor necrosis factor-alpha stimulation. *J Biol Chem*, **279**, 46588-46594.

Mizuno, T. (1998) His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J Biochem (Tokyo)*, **123**, 555-563.

Molkentin, J.D. (2000) Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res*, **87**, 731-738.

Moniakis, J., Funamoto, S., Fukuzawa, M., Meisenhelder, J., Araki, T., Abe, T., Meili, R., Hunter, T., Williams, J. & Firtel, R.A. (2001) An SH2-domain-containing kinase negatively regulates the phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *Genes Dev*, **15**, 687-698.

Moorhead, G., MacKintosh, R.W., Morrice, N., Gallagher, T. & MacKintosh, C. (1994) Purification of type 1 protein (serine/threonine) phosphatases by microcystin-Sepharose affinity chromatography. *FEBS Lett*, **356**, 46-50.

Morio, T., Urushihara, H., Saito, T., Ugawa, Y., Mizuno, H., Yoshida, M., Yoshino, R., Mitra, B.N., Pi, M., Sato, T., Takemoto, K., Yasukawa, H., Williams, J., Maeda, M., Takeuchi, I., Ochiai, H. & Tanaka, Y. (1998) The *Dictyostelium* developmental cDNA project: generation and analysis of expressed sequence tags from the first-finger stage of development. *DNA Res*, **5**, 335-340.

Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H. & Ichijo, H. (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *Embo J*, **20**, 6028-6036.

Mosinger, B., Jr., Tillmann, U., Westphal, H. & Tremblay, M.L. (1992) Cloning and characterization of a mouse cDNA encoding a cytoplasmic protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 499-503.

Mulder, N.J., Apweiler, R., Attwood, T.K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Buillard, V., Cerutti, L., Copley, R.*, et al.* (2007) New developments in the InterPro database. *Nucleic Acids Res*, **35**, D224-228.

Mumby, M. (2007) The 3D structure of protein phosphatase 2A: new insights into a ubiquitous regulator of cell signaling. *ACS Chem Biol*, **2**, 99-103.

Murata, K., Wu, J. & Brautigan, D.L. (1997) B cell receptor-associated protein alpha4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10624-10629.

Murphy, M.B. & Egelhoff, T.T. (1999) Biochemical characterization of a *Dictyostelium* myosin II heavy-chain phosphatase that promotes filament assembly. *Eur J Biochem*, **264**, 582-590.

Murphy, M.B., Levi, S.K. & Egelhoff, T.T. (1999) Molecular characterization and immunolocalization of *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase 2A. *FEBS Lett*, **456**, 7-12.

Nagata, T., Suzuki, T., Ohta, Y., Flajnik, M.F. & Kasahara, M. (2002) The leukocyte common antigen (CD45) of the Pacific hagfish, Eptatretus stoutii: implications for the primordial function of CD45. *Immunogenetics*, **54**, 286-291.

Nakai, M., Watanabe, H., Fujiwara, C., Kakegawa, H., Satoh, T., Takada, J., Matsushita, R. & Sakurai, H. (1995) Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *Biol Pharm Bull*, **18**, 719-725.

Namgaladze, D., Hofer, H.W. & Ullrich, V. (2002) Redox control of calcineurin by targeting the binuclear Fe(2+)-Zn(2+) center at the enzyme active site. *J Biol Chem*, **277**, 5962-5969.

Nanahoshi, M., Tsujishita, Y., Tokunaga, C., Inui, S., Sakaguchi, N., Hara, K. & Yonezawa, K. (1999) Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases. *FEBS Lett*, **446**, 108-112.

Nimmo, G.A. & Cohen, P. (1978) The regulation of glycogen metabolism. Purification and characterisation of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **87**, 341-351.

Nuckolls, G.H., Osherov, N., Loomis, W.F. & Spudich, J.A. (1996) The *Dictyostelium* dual-specificity kinase splA is essential for spore differentiation. *Development*, **122**, 3295-3305.

Oehme, F. & Schuster, S.C. (2001) Osmotic stress-dependent serine phosphorylation of the histidine kinase homologue DokA. *BMC Biochem*, **2**, 2.

Ohkura, H. & Yanagida, M. (1991) S. pombe gene sds22+ essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1. *Cell*, **64**, 149-157.

Ollendorff, V. & Donoghue, D.J. (1997) The serine/threonine phosphatase PP5 interacts with CDC16 and CDC27, two tetratricopeptide repeat-containing subunits of the anaphase-promoting complex. *J Biol Chem*, **272**, 32011-32018.

Ota, I.M. & Mapes, J. (2006) Targeting of PP2C in Budding Yeast. *Methods Mol Biol*, **365**, 309-322.

Palanivel, R., Veluthakal, R. & Kowluru, A. (2004) Regulation by glucose and calcium of the carboxylmethylation of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A in insulin-secreting INS-1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **286**, E1032-1041.

Park, I.K., Roach, P., Bondor, J., Fox, S.P. & DePaoli-Roach, A.A. (1994) Molecular mechanism of the synergistic phosphorylation of phosphatase inhibitor-2. Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of inhibitor-2. *J Biol Chem*, **269**, 944-954.

Pawson, T. (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*, **116**, 191-203.

Pawson, T. & Scott, J.D. (2005) Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci*, **30**, 286-290.

Pedelini, L., Marquina, M., Arino, J., Casamayor, A., Sanz, L., Bollen, M., Sanz, P. & 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**, 3282-3292.

Peggie, M.W., MacKelvie, S.H., Bloecher, A., Knatko, E.V., Tatchell, K. & Stark, M.J. (2002) Essential functions of Sds22p in chromosome stability and nuclear localization of PP1. *J Cell Sci*, **115**, 195-206.

Perdiguero, E. & Nebreda, A.R. (2004) Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G2/M transition. *Cell Cycle*, **3**, 733-737.

Pinsky, B.A., Kotwaliwale, C.V., Tatsutani, S.Y., Breed, C.A. & Biggins, S. (2006) Glc7/protein phosphatase 1 regulatory subunits can oppose the Ipl1/aurora protein kinase by redistributing Glc7. *Mol Cell Biol*, **26**, 2648-2660.

Posas, F., Clotet, J. & Arino, J. (1991) *Saccharomyces cerevisiae* gene SIT4 is involved in the control of glycogen metabolism. *FEBS Lett*, **279**, 341-345.

Puta, F. & Zeng, C. (1998) Blasticidin resistance cassette in symmetrical polylinkers for insertional inactivation of genes in *Dictyostelium*. *Folia Biol (Praha)*, **44**, 185-188.

Ramalingam, R., Shaw, D.R. & Ennis, H.L. (1993) Cloning and functional expression of a *Dictyostelium discoideum* protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem*, **268**, 22680-22685.

Ramos, C.R., Abreu, P.A., Nascimento, A.L. & Ho, P.L. (2004) A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*, **37**, 1103-1109.

Ramponi, G. & Stefani, M. (1997a) Structural, catalytic, and functional properties of low M(r), phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 279-292.

Ramponi, G. & Stefani, M. (1997b) Structure and function of the low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. *Biochim Biophys Acta*, **1341**, 137-156.

Ramsey, A.J. & Chinkers, M. (2002) Identification of potential physiological activators of protein phosphatase 5. *Biochemistry*, **41**, 5625-5632.

Rivero, F. & Maniak, M. (2006) Quantitative and microscopic methods for studying the endocytic pathway. *Methods Mol Biol*, **346**, 423-438.

Rohde, J.R., Campbell, S., Zurita-Martinez, S.A., Cutler, N.S., Ashe, M. & Cardenas, M.E. (2004) TOR controls transcriptional and translational programs via Sap-Sit4 protein phosphatase signaling effectors. *Mol Cell Biol*, **24**, 8332-8341.

Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, **132**, 365-386.

Rubin, E., Tamrakar, S. & Ludlow, J.W. (1998) Protein phosphatase type 1, the product of the retinoblastoma susceptibility gene, and cell cycle control. *Front Biosci*, **3**, D1209-1219.

Ruediger, R., Pham, H.T. & Walter, G. (2001a) Alterations in protein phosphatase 2A subunit interaction in human carcinomas of the lung and colon with mutations in the A beta subunit gene. *Oncogene*, **20**, 1892-1899.

Ruediger, R., Pham, H.T. & Walter, G. (2001b) Disruption of protein phosphatase 2A subunit interaction in human cancers with mutations in the A alpha subunit gene. *Oncogene*, **20**, 10-15.

Ruscetti, T., Cardelli, J.A., Niswonger, M.L. & O'Halloran, T.J. (1994) Clathrin heavy chain functions in sorting and secretion of lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol*, **126**, 343-352.

Rusnak, F. & Mertz, P. (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*, **80**, 1483-1521.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniats, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniats, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York.

Samstag, Y. & Nebl, G. (2003) Interaction of cofilin with the serine phosphatases PP1 and PP2A in normal and neoplastic human T lymphocytes. *Adv Enzyme Regul*, **43**, 197-211.

Sasaki, K., Shima, H., Kitagawa, Y., Irino, S., Sugimura, T. & Nagao, M. (1990) Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, **81**, 1272-1280.

Schilde, C., Araki, T., Williams, H., Harwood, A. & Williams, J.G. (2004) GSK3 is a multifunctional regulator of *Dictyostelium* development. *Development*, **131**, 4555-4565.

Schwarz, S., Hufnagel, B., Dworak, M., Klumpp, S. & Krieglstein, J. (2006) Protein phosphatase type 2Calpha and 2Cbeta are involved in fatty acid-induced apoptosis of neuronal and endothelial cells. *Apoptosis*, **11**, 1111-1119.

Schweiger, A., Mihalache, O., Muhr, A. & Adrian, I. (1990) Phosphotyrosine-containing proteins in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett*, **268**, 199-202.

Schweighofer, A., Hirt, H. & Meskiene, I. (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci*, **9**, 236-243.

Seely, B.L., Staubs, P.A., Reichart, D.R., Berhanu, P., Milarski, K.L., Saltiel, A.R., Kusari, J. & Olefsky, J.M. (1996) Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes*, **45**, 1379-1385.

Selitrennikoff, C.P., Alex, L., Miller, T.K., Clemons, K.V., Simon, M.I. & Stevens, D.A. (2001) COS-I, a putative two-component histidine kinase of Candida albicans, is an in vivo virulence factor. *Med Mycol*, **39**, 69-74.

Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T.C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G.C. & Lin, C. (2002) Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature*, **417**, 763-767.

Shechter, Y. & Shisheva, A. (1993) Vanadium salts and the future treatment of diabetes. *Endeavour*, **17**, 27-31.

Shenolikar, S. (1994) Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 55-86.

Shenolikar, S. & Ingebritsen, T.S. (1984) Protein (serine and threonine) phosphate phosphatases. *Methods Enzymol*, **107**, 102-129.

Shenolikar, S. & Nairn, A.C. (1991) Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **23**, 1-121.

Sheppeck, J.E., 2nd, Gauss, C.M. & Chamberlin, A.R. (1997) Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg Med Chem*, **5**, 1739-1750.

Shimanuki, M., Kinoshita, N., Ohkura, H., Yoshida, T., Toda, T. & Yanagida, M. (1993) Isolation and characterization of the fission yeast protein phosphatase gene ppe1+ involved in cell shape control and mitosis. *Mol Biol Cell*, **4**, 303-313.

Shimizu, H., Ito, M., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., Naka, M., Tanaka, T., Hirano, K., Hartshorne, D.J. & et al. (1994) Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **269**, 30407-30411.

Shin, S.Y., Choo, S.M., Kim, D., Baek, S.J., Wolkenhauer, O. & Cho, K.H. (2006) Switching feedback mechanisms realize the dual role of MCIP in the regulation of calcineurin activity. *FEBS Lett*, **580**, 5965-5973.

Shiozuka, K., Watanabe, Y., Ikeda, T., Hashimoto, S. & Kawashima, H. (1995) Cloning and expression of PCPTP1 encoding protein tyrosine phosphatase. *Gene*, **162**, 279-284.

Shirato, H., Shima, H., Sakashita, G., Nakano, T., Ito, M., Lee, E.Y. & Kikuchi, K. (2000) Identification and characterization of a novel protein inhibitor of type 1 protein phosphatase. *Biochemistry*, **39**, 13848-13855.

Shirra, M.K., Rogers, S.E., Alexander, D.E. & Arndt, K.M. (2005) The Snf1 protein kinase and Sit4 protein phosphatase have opposing functions in regulating TATA-binding protein association with the *Saccharomyces cerevisiae* INO1 promoter. *Genetics*, **169**, 1957-1972.

Shisheva, A. & Shechter, Y. (1993) Mechanism of pervanadate stimulation and potentiation of insulin-activated glucose transport in rat adipocytes: dissociation from vanadate effect. *Endocrinology*, **133**, 1562-1568.

Shui, J.W., Hu, M.C. & Tan, T.H. (2007) Conditional knockout mice reveal an essential role of protein phosphatase 4 in thymocyte development and pre-T-cell receptor signaling. *Mol Cell Biol*, **27**, 79-91.

Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Chen, M.S., Owens-Grillo, J.K., Chinkers, M. & Pratt, W.B. (1997) Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem*, **272**, 16224-16230.

Sinclair, C., Borchers, C., Parker, C., Tomer, K., Charbonneau, H. & Rossie, S. (1999) The tetratricopeptide repeat domain and a C-terminal region control the activity of Ser/Thr protein phosphatase 5. *J Biol Chem*, **274**, 23666-23672.

Singleton, C.K., Zinda, M.J., Mykytka, B. & Yang, P. (1998) The histidine kinase dhkC regulates the choice between migrating slugs and terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol*, **203**, 345-357.

Skinner, J., Sinclair, C., Romeo, C., Armstrong, D., Charbonneau, H. & Rossie, S. (1997) Purification of a fatty acid-stimulated protein-serine/threonine phosphatase from bovine brain and its identification as a homolog of protein phosphatase 5. *J Biol Chem*, **272**, 22464-22471.

Skinner, J.A. & Saltiel, A.R. (2001) Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targetting subunit of protein phosphatase 1. *Biochem J*, **356**, 257-267.

Smith, R.D. & Walker, J.C. (1993) Expression of multiple type 1 phosphoprotein phosphatases in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol*, **21**, 307-316.

Smith, R.L., Redd, M.J. & Johnson, A.D. (1995) The tetratricopeptide repeats of Ssn6 interact with the homeo domain of alpha 2. *Genes Dev*, **9**, 2903-2910.

Soderbom, F. & Loomis, W.F. (1998) Cell-cell signaling during *Dictyostelium* development. *Trends Microbiol*, **6**, 402-406.

Sontag, J.M. & Sontag, E. (2006) Regulation of cell adhesion by PP2A and SV40 small tumor antigen: an important link to cell transformation. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2979-2991.

Sousa-Canavez, J.M. (2005) Caracterização molecular da proteína DdI-2 e mapeamento de seus domínios de interação com a proteína fosfatase do tipo-1 de *Dictyostelium discoideum*. *Instituto de Quimica*. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 155.

Sousa-Canavez, J.M., Beton, D., Gonzalez-Kristeller, D.C. & da Silva, A.M. (2007) Identification and domain mapping of *Dictyostelium discoideum* type-1 protein phosphatase inhibitor-2. *Biochimie*.

Souza, G.M., da Silva, A.M. & Kuspa, A. (1999) Starvation promotes *Dictyostelium* development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway. *Development*, **126**, 3263-3274.

Souza, G.M., Lu, S. & Kuspa, A. (1998) YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. *Development*, **125**, 2291-2302.

Spudich, A. (1987) Isolation of the actin cytoskeleton from amoeboid cells of *Dictyostelium*. *Methods Cell Biol*, **28**, 209-214.

Steen, R.L., Beullens, M., Landsverk, H.B., Bollen, M. & Collas, P. (2003) AKAP149 is a novel PP1 specifier required to maintain nuclear envelope integrity in G1 phase. *J Cell Sci*, **116**, 2237-2246.

Stefansson, B. & Brautigan, D.L. (2006) Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets IkappaBepsilon. *J Biol Chem*, **281**, 22624-22634.

Strmecki, L., Bloomfield, G., Araki, T., Dalton, E., Skelton, J., Schilde, C., Harwood, A., Williams, J.G., Ivens, A. & Pears, C. (2007) Proteomic and microarray analyses of the *Dictyostelium* Zak1-GSK-3 signaling pathway reveal a role in early development. *Eukaryot Cell*, **6**, 245-252.

Sumiyoshi, E., Sugimoto, A. & Yamamoto, M. (2002) Protein phosphatase 4 is required for centrosome maturation in mitosis and sperm meiosis in C. elegans. *J Cell Sci*, **115**, 1403-1410.

Sun, L., Youn, H.D., Loh, C., Stolow, M., He, W. & Liu, J.O. (1998) Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*, **8**, 703-711.

Sussman, M. (1987) Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol*, **28**, 9-29.

Sutherland, E.W. & Wosilait, W.D. (1956) The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. I. Liver phosphorylase; preparation and properties. *J Biol Chem*, **218**, 459-468.

Sutoh, K. (1993) A transformation vector for *Dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr. *Plasmid*, **30**, 150-154.

Sutton, A., Lin, F. & Arndt, K.T. (1991) The SIT4 protein phosphatase is required in late G1 for progression into S phase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **56**, 75-81.

Suzuki, I., Kanesaki, Y., Hayashi, H., Hall, J.J., Simon, W.J., Slabas, A.R. & Murata, N. (2005) The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in synechocystis. *Plant Physiol*, **138**, 1409-1421.

Swanson, R.V., Schuster, S.C. & Simon, M.I. (1993) Expression of CheA fragments which define domains encoding kinase, phosphotransfer, and CheY binding activities. *Biochemistry*, **32**, 7623-7629.

Szoor, B., Dombradi, V., Gergely, P. & Feher, Z. (1997) Purification and characterization of the catalytic subunit of protein phosphatase 1 from *Neurospora crassa*. *Acta Biol Hung*, **48**, 289-302.

Tada, M., Kirchberger, M.A. & Katz, A.M. (1975) Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **250**, 2640-2647.

Taminato, A., Bagattini, R., Gorjao, R., Chen, G., Kuspa, A. & Souza, G.M. (2002) Role for YakA, cAMP, and protein kinase A in regulation of stress responses of *Dictyostelium discoideum* cells. *Mol Biol Cell*, **13**, 2266-2275.

Tamura, H., Fukada, M., Fujikawa, A. & Noda, M. (2006) Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is involved in hippocampus-dependent memory formation through dephosphorylation at Y1105 on p190 RhoGAP. *Neurosci Lett*, **399**, 33-38.

Tan, J.L. & Spudich, J.A. (1990) Developmentally regulated protein-tyrosine kinase genes in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol*, **10**, 3578-3583.
Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T. & Dominguez, R. (2004) Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature*, **429**, 780-784.
Terry-Lorenzo, R.T., Carmody, L.C., Voltz, J.W., Connor, J.H., Li, S., Smith, F.D., Milgram, S.L., Colbran, R.J. & Shenolikar, S. (2002) The neuronal actin-binding proteins, neurabin I and neurabin II, recruit specific isoforms of protein phosphatase-1 catalytic subunits. *J Biol Chem*, **277**, 27716-27724.
Thomason, P.A., Sawai, S., Stock, J.B. & Cox, E.C. (2006) The histidine kinase homologue DhkK/Sombrero controls morphogenesis in *Dictyostelium*. *Dev Biol*, **292**, 358-370.
Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
Tomaska, L. (2000) Mitochondrial protein phosphorylation: lessons from yeasts. *Gene*, **255**, 59-64.
Tong, Y., Quirion, R. & Shen, S.H. (1998) Cloning and characterization of a novel mammalian PP2C isozyme. *J Biol Chem*, **273**, 35282-35290.
Tonks, N.K. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 833-846.
Tonks, N.K. & Neel, B.G. (2001) Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 182-195.
Trinkle-Mulcahy, L. & Lamond, A.I. (2006) Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 623-631.
Tu, J. & Carlson, M. (1994) The GLC7 type 1 protein phosphatase is required for glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **14**, 6789-6796.
Turowski, P., Fernandez, A., Favre, B., Lamb, N.J. & Hemmings, B.A. (1995) Differential methylation and altered conformation of cytoplasmic and nuclear forms of protein phosphatase 2A during cell cycle progression. *J Cell Biol*, **129**, 397-410.
Udho, E., Tedesco, V.C., Zygmunt, A. & Krucher, N.A. (2002) PNUTS (phosphatase nuclear targeting subunit) inhibits retinoblastoma-directed PP1 activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 463-467.
Urban, G., Golden, T., Aragon, I.V., Scammell, J.G., Dean, N.M. & Honkanen, R.E. (2001) Identification of an estrogen-inducible phosphatase (PP5) that converts MCF-7 human breast carcinoma cells into an estrogen-independent phenotype when expressed constitutively. *J Biol Chem*, **276**, 27638-27646.
Urushihara, H. (2002) Functional genomics of the social amoebae, *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cells*, **13**, 1-4.
van der Schalie, E. & Green, C.B. (2005) Cryptochromes. *Curr Biol*, **15**, R785.
Van Eynde, A., Wera, S., Beullens, M., Torrekens, S., Van Leuven, F., Stalmans, W. & Bollen, M. (1995) Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing. *J Biol Chem*, **270**, 28068-28074.
Vereshchagina, N., Bennett, D., Szoor, B., Kirchner, J., Gross, S., Vissi, E., White-Cooper, H. & Alphey, L. (2004) The essential role of PP1beta in *Drosophila* is to regulate nonmuscle myosin. *Mol Biol Cell*, **15**, 4395-4405.
Veron, M., Mutzel, R., Lacombe, M.L., Simon, M.N. & Wallet, V. (1988) cAMP-dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genet*, **9**, 247-258.
Villafranca, J.E., Kissinger, C.R. & Parge, H.E. (1996) Protein serine/threonine phosphatases. *Curr Opin Biotechnol*, **7**, 397-402.
Wakula, P., Beullens, M., Ceulemans, H., Stalmans, W. & Bollen, M. (2003) Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, **278**, 18817-18823.
Walton, K.M. & Dixon, J.E. (1993) Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem*, **62**, 101-120.
Wang, H. & Jiang, Y. (2003) The Tap42-protein phosphatase type 2A catalytic subunit complex is required for cell cycle-dependent distribution of actin in yeast. *Mol Cell Biol*, **23**, 3116-3125.
Wang, H., Wang, X. & Jiang, Y. (2003a) Interaction with Tap42 is required for the essential function of Sit4 and type 2A phosphatases. *Mol Biol Cell*, **14**, 4342-4351.
Wang, N., Soderbom, F., Anjard, C., Shaulsky, G. & Loomis, W.F. (1999) SDF-2 induction of terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum* is mediated by the membrane-spanning sensor kinase DhkA. *Mol Cell Biol*, **19**, 4750-4756.
Wang, W.Q., Sun, J.P. & Zhang, Z.Y. (2003b) An overview of the protein tyrosine phosphatase superfamily. *Curr Top Med Chem*, **3**, 739-748.

Wang, X., Culotta, V.C. & Klee, C.B. (1996) Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature*, **383**, 434-437.
Warmka, J., Hanneman, J., Lee, J., Amin, D. & Ota, I. (2001) Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol*, **21**, 51-60.
Wera, S. & Hemmings, B.A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J*, **311 (Pt 1)**, 17-29.
Wetterauer, B.W. (2000) Protein kinases from *Dictyostelium discoideum* with similarity to LIM kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1480**, 377-383.
Wetterauer, B.W., Hamker, U., von Haeseler, A., MacWilliams, H.K., Simon, M.N. & Veron, M. (1995) A protein kinase from *Dictyostelium discoideum* with an unusual acidic repeat domain. *Biochim Biophys Acta*, **1265**, 97-101.
Winnefeld, M., Rommelaere, J. & Cziepluch, C. (2004) The human small glutamine-rich TPR-containing protein is required for progress through cell division. *Exp Cell Res*, **293**, 43-57.
Wishart, M.J. & Dixon, J.E. (1998) Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains. *Trends Biochem Sci*, **23**, 301-306.
Wishart, M.J. & Dixon, J.E. (2002) The archetype STYX/dead-phosphatase complexes with a spermatid mRNA-binding protein and is essential for normal sperm production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2112-2117.
Woods, R.A. & Gietz, R.D. (2001) High-efficiency transformation of plasmid DNA into yeast. *Methods Mol Biol*, **177**, 85-97.
Wu, D.Y., Tkachuck, D.C., Roberson, R.S. & Schubach, W.H. (2002) The human SNF5/INI1 protein facilitates the function of the growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) and modulates GADD34-bound protein phosphatase-1 activity. *J Biol Chem*, **277**, 27706-27715.
Xie, X., Xue, C., Huang, W. & Wei, Q. (2006a) The beta12-beta13 loop of protein phosphatase-1 is involved in activity regulation. *IUBMB Life*, **58**, 487-492.
Xie, X.J., Xue, C.Z., Huang, W., Yu, D.Y. & Wei, Q. (2006b) The beta12-beta13 loop is a key regulatory element for the activity and properties of the catalytic domain of protein phosphatase 1 and 2B. *Biol Chem*, **387**, 1461-1467.
Xing, Y., Xu, Y., Chen, Y., Jeffrey, P.D., Chao, Y., Lin, Z., Li, Z., Strack, S., Stock, J.B. & Shi, Y. (2006) Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*, **127**, 341-353.
Xu, X., Lagercrantz, J., Zickert, P., Bajalica-Lagercrantz, S. & Zetterberg, A. (1996) Chromosomal localization and 5' sequence of the human protein serine/threonine phosphatase 5' gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **218**, 514-517.
Xu, X., Yamamoto, H., Sakon, M., Yasui, M., Ngan, C.Y., Fukunaga, H., Morita, T., Ogawa, M., Nagano, H., Nakamori, S., Sekimoto, M., Matsuura, N. & Monden, M. (2003) Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res*, **9**, 1764-1772.
Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J.W., Strack, S., Jeffrey, P.D. & Shi, Y. (2006) Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell*, **127**, 1239-1251.
Yanagi, S., Sugawara, H., Kurosaki, M., Sabe, H., Yamamura, H. & Kurosaki, T. (1996) CD45 modulates phosphorylation of both autophosphorylation and negative regulatory tyrosines of Lyn in B cells. *J Biol Chem*, **271**, 30487-30492.
Yang, J., Hurley, T.D. & DePaoli-Roach, A.A. (2000) Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif. *J Biol Chem*, **275**, 22635-22644.
Yang, J., Roe, S.M., Cliff, M.J., Williams, M.A., Ladbury, J.E., Cohen, P.T. & Barford, D. (2005) Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *Embo J*, **24**, 1-10.
Yao, Y., Slosberg, E.D., Wang, L., Hibshoosh, H., Zhang, Y.J., Xing, W.Q., Santella, R.M. & Weinstein, I.B. (1999) Increased susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors in MMTV-Cdc25B transgenic mice. *Oncogene*, **18**, 5159-5166.
Ye, Q. & Worman, H.J. (1995) Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp Cell Res*, **219**, 292-298.
Yeo, M., Lin, P.S., Dahmus, M.E. & Gill, G.N. (2003) A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates serine 5. *J Biol Chem*, **278**, 26078-26085.
Young, C., Mapes, J., Hanneman, J., Al-Zarban, S. & Ota, I. (2002) Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryot Cell*, **1**, 1032-1040.

Yuvaniyama, J., Denu, J.M., Dixon, J.E. & Saper, M.A. (1996) Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR. *Science*, **272**, 1328-1331.
Zapella, P.D. (2001) Caracterização de algumas componentes envolvidos na desfosforilação de proteínas fosforiladas em resíduos de serina e treonina em *Neurospora crassa*. *Instituto de Química*. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 176.
Zapella, P.D., da-Silva, A.M., da-Costa-Maia, J.C. & Terenzi, H.F. (1996) Serine/threonine protein phosphatases and a protein phosphatase 1 inhibitor from *Neurospora crassa*. *Braz J Med Biol Res*, **29**, 599-604.
Zeke, T., Morrice, N., Vazquez-Martin, C. & Cohen, P.T. (2005) Human protein phosphatase 5 dissociates from heat-shock proteins and is proteolytically activated in response to arachidonic acid and the microtubule-depolymerizing drug nocodazole. *Biochem J*, **385**, 45-56.
Zhang, A.J., Bai, G., Deans-Zirattu, S., Browner, M.F. & Lee, E.Y. (1992a) Expression of the catalytic subunit of phosphorylase phosphatase (protein phosphatase-1) in Escherichia coli. *J Biol Chem*, **267**, 1484-1490.
Zhang, J., Bao, S., Furumai, R., Kucera, K.S., Ali, A., Dean, N.M. & Wang, X.F. (2005a) Protein phosphatase 5 is required for ATR-mediated checkpoint activation. *Mol Cell Biol*, **25**, 9910-9919.
Zhang, J., Zhang, L., Zhao, S. & Lee, E.Y. (1998) Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. *Biochemistry*, **37**, 16728-16734.
Zhang, L., Zhang, Z., Long, F. & Lee, E.Y. (1996) Tyrosine-272 is involved in the inhibition of protein phosphatase-1 by multiple toxins. *Biochemistry*, **35**, 1606-1611.
Zhang, X., Ozawa, Y., Lee, H., Wen, Y.D., Tan, T.H., Wadzinski, B.E. & Seto, E. (2005b) Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes Dev*, **19**, 827-839.
Zhang, Z., Bai, G. & Lee, E.Y. (1992b) PCR cloning of the cDNA of rabbit skeletal muscle protein phosphatase inhibitor-2. *Biochem Biophys Res Commun*, **186**, 1168-1170.
Zhang, Z.Y., Clemens, J.C., Schubert, H.L., Stuckey, J.A., Fischer, M.W., Hume, D.M., Saper, M.A. & Dixon, J.E. (1992c) Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant Yersinia protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem*, **267**, 23759-23766.
Zhao, S. & Lee, E.Y. (1997) Targeting of the catalytic subunit of protein phosphatase-1 to the glycolytic enzyme phosphofructokinase. *Biochemistry*, **36**, 8318-8324.
Zhao, S. & Sancar, A. (1997) Human blue-light photoreceptor hCRY2 specifically interacts with protein serine/threonine phosphatase 5 and modulates its activity. *Photochem Photobiol*, **66**, 727-731.
Zhou, G., Mihindukulasuriya, K.A., MacCorkle-Chosnek, R.A., Van Hooser, A., Hu, M.C., Brinkley, B.R. & Tan, T.H. (2002) Protein phosphatase 4 is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, **277**, 6391-6398.
Zhukovskaya, N.V., Fukuzawa, M., Tsujioka, M., Jermyn, K.A., Kawata, T., Abe, T., Zvelebil, M. & Williams, J.G. (2004) Dd-STATb, a *Dictyostelium* STAT protein with a highly aberrant SH2 domain, functions as a regulator of gene expression during growth and early development. *Development*, **131**, 447-458.
Zinda, M.J. & Singleton, C.K. (1998) The hybrid histidine kinase dhkB regulates spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol*, **196**, 171-183.
Zuo, Z., Dean, N.M. & Honkanen, R.E. (1998) Serine/threonine protein phosphatase type 5 acts upstream of p53 to regulate the induction of p21(WAF1/Cip1) and mediate growth arrest. *J Biol Chem*, **273**, 12250-12258.
Zuo, Z., Urban, G., Scammell, J.G., Dean, N.M., McLean, T.K., Aragon, I. & Honkanen, R.E. (1999) Ser/Thr protein phosphatase type 5 (PP5) is a negative regulator of glucocorticoid receptor-mediated growth arrest. *Biochemistry*, **38**, 8849-8857.

Anexos

Súmula Curricular

ANEXOS

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Daniela Carvalho Gonzalez Kristeller

Nascida em São Paulo em 06 de março de 1974

EDUCAÇÃO

2000 - 2002 Mestrado em Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Caracterização do mutante de desenvolvimento *redA*$^{-}$ de *D. discoideum*
Orientadora: Dr$^{a.}$ Aline Maria da Silva
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

1993 - 1999 Graduação em Química Bacharelado com Opção Industrial.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2005 Estágio de Doutoramento (Doutorado sanduíche)
Março de 2005 à Outubro de 2005 - Baylor College of Medicine-Texas Medical Center, Houston, USA.
Co-orientador: Dr. Adam Kuspa
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior

OCUPAÇÃO

2002 - 2006 Bolsista de Doutorado CNPq e CAPES.

2000 - 2002 Bolsista de Mestrado CNPq e FAPESP.

1997 - 1999 Danone S.A. Estágio em período integral no desenvolvimento de novos produtos (lácteos e biscoitos), setores de pesquisa e desenvolvimento, análise sensorial e garantia de qualidade.

PUBLICAÇÕES

Sousa-Canavez, J. M., Beton, D., **Gonzalez-Kristeller, Daniela Carvalho**, da-Silva, A. M.. Identification and domain mapping of *Dictyostelium discoideum* type-1 protein phosphatase inhibitor-2. Biochimie, 2007. May;89(5):692-701.

Gonzalez-Kristeller, Daniela Carvalho, Susin, M., De Marco, R., Pavanelli, D. D., Siviero, F., De Paula, E., Macedo, D. V., Torres, B. B. et al. Bioquímica do Envelhecimento, 2001. Desenvolvimento de material didático disponível no site: http://www.sbbq.org.br/revista/mtdidaticos/Env.pdf