UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Caracterização do mutante de desenvolvimento
redA de *Dictyostelium discoideum*

Daniela Carvalho Gonzalez

Dissertação de Mestrado

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

São Paulo, 02 de setembro de 2002

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Caracterização do mutante de desenvolvimento
redA de *Dictyostelium discoideum*

Daniela Carvalho Gonzalez

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

São Paulo setembro de 2002

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

G643c Gonzalez, Daniela Carvalho
Caracterização do mutante de desenvolvimento redA de
Dictyostelium discoideum / Daniela Carvalho Gonzalez. --
São Paulo, 2002.
111p.

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

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

574.88 CDD

“Caracterização do Mutante de Desenvolvimento redA de *Dictyostelium* *discoideum*”

DANIELA CARVALHO GONZALEZ

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

Aprovado por:

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

Prof. Dr. PIO COLEPICOLA NETO
IQ – USP

Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETTO
IB – USP

SÃO PAULO
25 DE NOVEMBRO 2002.

Dedico...

...aos meus pais, Nelson e Lina e aos meus irmãos,
Maximiliano e Alexandre que sempre me apoiaram e
incentivaram com muito amor.

...ao Claudio pelo amor, paciência, ajuda e dedicação em
todos os momentos.

Agradeço...

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

...ao Dr. William Loomis pela cessão do mutante redA.

...à Dr^a. Claudette Klein pela discussões durante este projeto.

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

...ao Prof. Dr. Bayardo Batista Torres não só por acreditar e me incentivar sempre mas principalmente pelo seu enorme coração.

...ao Leonardo pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e também por sua grande amizade.

...às amigas Daniela, Fabiana, Juliana, Michelle e Raquel pela ajuda, carinho e alegrias compartilhadas neste período.

...às amigas Gabriela, Débora, Francine e Vanesa pelo apoio e incentivo mesmo achando tudo isso uma maluquice.

...ao Alexandre pela amizade, apoio técnico e principalmente pela enorme paciência.

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

...aos demais companheiros e amigos de laboratório e do bloco 12, Paulinho, Ana Carolina, Helder, Camila, Ana Claudia, Milton, Apuã, Abimael, Alessandra, Flavia, Rodrigo, Luciana, Karina, Rafaela, Cristina, Tie, Silvia, Luciana, Rita, Sandra, Humberto, Alcides, Alexandre, Prof. Sandro, Lucas, Flavio, Renato, Denise, Adriana, Karen, Ana Paula, Camille, Ricardo, Eduardo, Jefferson e Giuliana.

...a todos que no início de meu trabalho me ajudaram, especialmente Weslei, Luciano, Mara Lúcia, Claudia e Luis Paulo.

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

....à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro a este trabalho.

Abreviaturas

BSA: Albumina de soro bovino
cAMP: 3', 5' monofosfato cíclico de adenosina
cpm: contagem por minuto
CYP: Citocromo P450
D.O.: densidade óptica
Da: Dalton
DMSO: dimetilsulfóxido
dNTP: desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
FAD: flavina adenina dinucleotídeo
FMN: flavina mononucleotídeo
H₄B: 6R-(L-erito 1',2'-diidroxipropil)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
kb: Quilobases
kDa: Quilodalton
Mb: Megabases
MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico
MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCPR: NADPH citocromo P450 redutase
•NO: óxido nítrico
NOS: enzima óxido nítrico sintase
NP-40: Nonidet P-40
pb: pares de bases
PEG: polietileno glicol
pfu: unidades formadoras de placas
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila
REMI: Mutagênese insercional aleatória mediada por enzimas de restrição
Rnase: Ribonuclease A
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SNP: nitroprussiato de sódio
TCA: ácido tricloroacético
Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

Resumo

O mutante *redA* de *Dictyostelium discoideum*, obtido por inativação gênica aleatória, tem crescimento aparentemente normal, porém seu ciclo de desenvolvimento não progride além do estágio de agregados compactos. Neste trabalho relatamos a caracterização deste mutante, cujo gene defeituoso codifica a enzima NADPH citocromo P450 redutase (NCPR). O principal papel desta enzima é transportar elétrons do NADPH para as várias isoformas do citocromo P450. Um cDNA de 2094 pb que codifica a NCPR de *D. discoideum* (DdNCPR) foi isolado através da varredura de uma biblioteca de cDNA com uma sonda derivada de um fragmento do gene inativado no mutante *redA*. A análise da seqüência de aminoácidos deduzida do cDNA DdNCPR revelou que esta codifica uma proteína de 631 aminoácidos com 31% de identidade e 50% de similaridade com a NCPR humana. Verificamos o acúmulo do mRNA da DdNCPR durante fase de crescimento mas durante as fases iniciais do desenvolvimento ocorre significativa diminuição em seus níveis até a formação dos agregados compactos onde o mRNA da NCPR não é detectável. Demonstramos que o gene que codifica a NCPR aparentemente está presente em uma única cópia no genoma de *Dictyostelium*. Ademais, a análise de outras linhagens mutantes nocautes do gene da NCPR confirmaram que a inativação deste gene está diretamente relacionada ao fenótipo exibido pelo mutante *redA*. Contudo, é provável que um ou mais produtos gênicos possam complementar a ausência desta enzima, uma vez que nem a linhagem *redA* nem as outras linhagens nocautes do gene da NCPR apresentaram alteração na taxa de crescimento e, em algumas circunstâncias experimentais, não exibiram qualquer alteração no ciclo de desenvolvimento. Nossos resultados sugerem, ainda que o bloqueio do desenvolvimento eventualmente observado no mutante *redA* pode ser devido a um provável papel da NCPR no metabolismo de DIF-1 (fator indutor de diferenciação-1), que parece desempenhar um papel primordial no controle da diferenciação de células pré-talo e células pré-esporo durante o desenvolvimento de *D. discoideum*.

Abstract

The *Dictyostelium discoideum* redA mutant, obtained by random gene inactivation, exhibits normal growth but has its developmental cycle impaired at tight mound stage. In this study we describe the characterization of this mutant whose defective gene encodes the enzyme NADPH cytochrome P450 reductase (NCPR). NCPR is known to play an essential role in the transfer of reducing equivalents from NADPH to various cytochrome P450 isoforms. We isolated a 2094 bp cDNA that encodes *D. discoideum* NCPR (DdNCPR) by screening a cDNA library using as probe the mutated gene fragment rescued from redA cells. Analysis of the deduced aminoacid sequence of DdNCPR cDNA shows that it encodes a 631 aminoacid protein with 31% of identity and 50% of similarity with human NCPR. *Northern blot* analysis showed that DdNCPR mRNA levels is maximum during growth phase and decreases at early stages of the development. After *slug* stage this mRNA is not detectable. *D. discoideum* has a single copy of NCPR gene and, as shown by analysis of other NCPR knockout mutants, inactivation of this gene is strongly correlated to the redA phenotype. However, redA, as well as the other NCPR knockout strains, do have growth alterations and in some circumstances they do not show the described developmental defects. Thus, it is possible that one or more proteins be able to compensate for the lack of NCPR in these mutants. Our results also suggest that the redA developmental phenotype might play a role of NCPR on the metabolism of DIF-1, a prime candidate for controlling prestalk and prespore cell differentiation during *D. discoideum* development.

ÍNDICE

Abreviaturas	5
Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	11
1.1. A biologia de <i>Dictyostelium discoideum</i>	11
1.2. O mutante redA de <i>D. discoideum</i>	18
1.3. Considerações gerais sobre a enzima NADPH citocromo P450 redutase	22
1.3.1. Outras enzimas que contêm grupos prostéticos FAD e FMN	24
1.3.2. Características do sistema citocromo P450	25
2. Objetivos	27
3. Procedimentos experimentais	28
3.1. Condições de cultivo e manipulação de células de <i>Dictyostelium discoideum</i>	28
3.1.1. Manutenção das culturas	28
3.1.2. Transfecção de DNA em <i>Dictyostelium</i> por eletroporação	29
3.1.3. Transfecção de DNA em <i>Dictyostelium</i> pelo método de precipitados de cálcio	30
3.1.4. Tratamento de células de <i>D. discoideum</i> com SNP (nitroprussiato de sódio)	313
3.1.5. Monitorização da taxa de crescimento de células de <i>D. discoideum</i>	32
3.1.6. Teste de formação de esporos em <i>D. discoideum</i>	32
3.1.7. Minipreparação de DNA genômico de <i>D. discoideum</i>	33
3.1.8. Minipreparação de RNA total de <i>D. discoideum</i>	33

3.1.9. Preparo de extratos celulares de <i>D. discoideum</i> para análise por SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	34
3.2. Procedimentos para manipulação de bactérias	34
3.2.1. Preparo de bactérias competentes para transformação por eletroporação	34
3.2.2. Transformação de bactérias por eletroporação	35
3.3. Procedimentos para manipulação e análise de DNA e RNA	36
3.3.1. Métodos de preparação de plasmídeos	36
3.3.2. Digestão com enzimas de restrição	38
3.3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose	38
3.3.4. Eluição de fragmentos de DNA em papel	38
3.3.5. Varredura da biblioteca de cDNA de <i>D. discoideum</i>	39
3.3.6. Conversão de clones fagomídeos para a forma plasmidial	41
3.3.7. Preparação de sonda radioativa	41
3.3.8. Hibridização de membranas de náilon contendo os fagos adsorvidos	42
3.3.9. Transferência de DNA para membranas de náilon (<i>Southern blot</i>)	43
3.3.10. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído	44
3.3.11. Transferência de RNA para membranas de náilon (<i>Northern blot</i>)	44
3.3.12. Hibridização de <i>Southern blots</i> e <i>Northern blots</i>	44
3.3.13. Seqüenciamento automatizado de DNA	45
3.3.14. Métodos de análise de seqüências de DNA e proteína	46
3.4. Procedimentos para manipulação e análise de proteínas	46
3.4.1. Preparo de extratos de células humanas Hep2 para análise por SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	47
3.4.2. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	47
3.4.3. Transferência eletroforética de proteínas de géis de poliacrilamida para filtros de nitrocelulose (<i>Western blot</i>)	48

3.4.4. Detecção imunológica das proteínas (<i>immunoblot</i>)	48
3.5. Descrição das construções plasmidiais	48
4. Resultados e Discussão	58
4.1. Clonagem e seqüenciamento do cDNA completo da NCPR de <i>D. discoideum</i>	58
4.2. Determinação do número de cópias do gene da NCPR de <i>D. discoideum</i>	67
4.3. Análise dos níveis de expressão do mRNA para NCPR durante o ciclo de vida de <i>D. discoideum</i>	75
4.4. Obtenção e caracterização de novas linhagens nocautes para NCPR para confirmação do fenótipo do mutante redA	76
4.4.1. Verificação dos níveis de expressão do mRNA da NCPR nas linhagens nocautes	81
4.4.2. Avaliação do crescimento e do desenvolvimento nas linhagens nocautes de NCPR	87
4.4.3 Análise da eventual formação precoce de esporos durante o desenvolvimento do mutante redA	88
4.5. Efeito do SNP (nitroprussiato de sódio) no crescimento de <i>D. discoideum</i> e nos níveis de mRNA da NCPR	94
4.6. Avaliação dos níveis de expressão do produto do gene NCPR nas linhagens selvagem e mutantes	97
4.7. Discussão final	100
5. Bibliografia	104
Curriculum Vitae	117

1. Introdução

O processo de diferenciação celular que ocorre durante o desenvolvimento da maioria dos organismos resulta na modificação da estrutura e função de suas células e implica a existência de um programa genético que envolve a expressão ordenada e seletiva de certos genes, além do modo pelo qual os produtos destes genes agem para gerar uma célula com um fenótipo especializado. A combinação de abordagens genéticas, bioquímicas e moleculares tem possibilitado a investigação dos mecanismos que regulam a diferenciação celular e o desenvolvimento em organismos tanto uni como multicelulares. Em particular, organismos com um ciclo de vida curto, de cultivo fácil e que sejam geneticamente tratáveis têm sido os mais adequados para as investigações no campo da biologia do desenvolvimento. Entre estes organismos está o mixomiceto *Dictyostelium discoideum*. As características singulares de seu ciclo de vida e as diversas possibilidades para sua manipulação através das técnicas de genética molecular têm proporcionado avanços na compreensão dos mecanismos que regulam o seu desenvolvimento e que podem também estar relacionados ao controle do desenvolvimento em outros organismos, em especial os metazoários.

1.1. A biologia de *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum é um microorganismo eucariótico que apresenta muitas vantagens experimentais similares às das leveduras, mas, ao contrário das mesmas, é um protozoário e não um fungo (Baldauf & Doolittle, 1997). *Dictyostelium discoideum* serve como um “sistema intermediário” no qual processos que estão ausentes nas leveduras, mas presentes em células de mamíferos, podem ser estudados (Maeda et al., 1997; Kay & Williams, 1999).

A classificação taxonômica de *D. discoideum* tem sido controversa. Pela formação de esporos e do corpo de frutificação, o organismo se assemelha aos fungos, porém plantas e bactérias podem também formar esporos. Sua proximidade com as plantas é reforçada pela presença de celulose no talo de seu corpo de frutificação. *D. discoideum* se aproxima dos protozoários e animais pela motilidade celular exibida por algumas de suas diferentes formas durante o seu ciclo de vida,

enquanto a ingestão de bactérias e sua digestão em vesículas das células amebóides durante a fase de crescimento podem ser comparadas aos macrófagos de mamíferos (Bonner, 1967; Loomis & Smith, 1995; Baldauf & Doolittle, 1997).

A análise comparativa de seqüências de proteínas já conhecidas em *D. discoideum* com equivalentes de outras espécies o posiciona mais próximo dos animais do que dos fungos (Loomis & Smith, 1995). Porém esta classificação pode estar sujeita a erro devido à pequena amostragem comparativa utilizada (Baldauf & Doolittle, 1997). Análises da seqüência do rRNA 18S posicionaram *D. discoideum* como descendente de um ramo que divergiu muito tempo antes da separação do ramo que originou os animais (Cavalier-Smith, 1993). No entanto, é preciso ressaltar que análises envolvendo RNA ribossomal podem ser equivocadas, dado o conteúdo incomum de bases AT do genoma de *D. discoideum* (Loomis & Smith, 1995; Baldauf & Doolittle, 1997).

Atualmente, a classificação mais aceita está baseada no resultado da comparação de seqüências do fator de elongação EF-1 α de diversos membros do grupo dos Mycetozoa, posicionando *D. discoideum* em um ramo que divergiu imediatamente antes da separação do ramo dos fungos e metazoários, porém após o ramo que divergiu para plantas. Estes dados são consistentes com as características bioquímicas exibidas por *D. discoideum* e com análises filogenéticas mais recentes de seqüências de proteínas conservadas codificadas em seu genoma (Loomis & Smith, 1995; Baldauf et al., 1996; Baldauf & Doolittle, 1997; Baldauf et al., 2000; Glöckner et al., 2002).

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

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

Este microorganismo habita lugares úmidos na superfície do solo. No seu ciclo de vida o crescimento e o desenvolvimento se apresentam em fases distintas. Durante a fase de crescimento vegetativo, as amebas de *Dictyostelium discoideum* são células não especializadas, haplóides idênticas que atingem alta densidade celular (10^7 células/mL) cultivadas em suspensão de bactérias ou em meio axênico, com tempos de duplicação variando entre 3 e 8 horas, dependendo das condições de cultivo e da linhagem. As células se dividem por fissão binária e durante o crescimento são quimiotaticamente sensíveis ao ácido fólico. Como esquematizado na figura 1, durante o desenvolvimento, que é disparado pela ausência de nutrientes, as células se agregam e se diferenciam em pelo menos dois tipos distintos: cerca de 70% das células formam esporos, que estão contidos em uma cápsula sustentada através de um talo de celulose formado pelas demais células (vacuolizadas), em uma estrutura denominada corpo de frutificação (Loomis, 1982; Devreotes, 1989; Kessin & Campagne, 1992; Gross, 1994; Mutzel, 1995; Maeda, 1997; Loomis & Soderborn, 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 *Dictyostelium 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: deslocamento em direção às células que iniciaram a secreção de cAMP, síntese e liberação de cAMP na forma de pulsos, atraindo por sua vez outras células mais afastadas. Na migração, as células se tornam adesivas e se encadeiam, formando correntes que se reúnem até constituir um organismo contendo cerca de 10^5 células (Loomis & Soderborn, 1998; Aubry & Firtel, 1999).

O agregado assume então a forma de monte (agregado compacto, *tight mound*) e as células do cume do organismo passam a exibir um padrão de expressão gênica distinto das demais células. As células do cume (aproximadamente 25% do organismo) correspondem às células pré-talo, que se diferenciam posteriormente em células do talo. A maior parte das células restantes corresponde às células pré-esporo, que posteriormente se diferenciarão em esporos. O cume do agregado compacto coordena a distribuição correta das células e as mudanças morfogenéticas que ocorrem no organismo multicelular.

No estágio seguinte do desenvolvimento, o organismo multicelular assume forma mais alongada, e então duas alternativas se apresentam: a culminação ou, em determinadas condições, o estabelecimento de uma forma intermediária denominada pseudoplasmodio (*slug*). O pseudoplasmodio pode se deslocar 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, 1989; Kessin & Campagne, 1992; Gross, 1994; Mutzel, 1995; Maeda, 1997; Loomis & Soderborn, 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 pseudoplasmodio (*slug*). 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, peptídeos (SDF1 e SDF2, *spore differentiation factor*) secretados por células pré-talo controlam a maturação dos esporos (Loomis & Soderborn, 1998; Kay et al., 1999; Aubry & Firtel, 1999). O fator de diferenciação celular DIF-1, mencionado acima, é uma alquilfenona clorada cuja síntese é induzida no estágio de agregados compactos por altas concentrações de cAMP. DIF-1 atua como um indutor da diferenciação de células pré-talo e como um repressor da expressão de genes típicos de células pré-esporos, efeito antagônico ao do cAMP, que regula positivamente a expressão de genes pré-esporos. Apesar do já comprovado papel de DIF-1 na diferenciação de células pré-talo, recentemente foi proposta a existência de um outro indutor de diferenciação celular específico para uma determinada sub-população de células pré-talo (Kay et al., 1999; Thompson & Kay, 2000).

DIF-1 é sintetizado predominantemente em células pré-esporos, a partir da montagem de um esqueleto de 12 carbonos por uma *polyketide synthase*, seguindo-se a cloração dupla da molécula e finalmente metilação. DIF-1 inibe sua própria síntese, reprimindo a expressão da última enzima da via de síntese (metiltransferase). Por outro lado, a inativação de DIF-1 é a etapa chave para garantir níveis adequados deste fator nos diferentes tipos celulares que compõem o organismo em desenvolvimento. A degradação de DIF-1 envolve sua conversão em pelo menos oito metabólitos e a primeira etapa consiste na descloração, gerando o primeiro metabólito DIF-3. DIF-3 é metabolizado por oxidações sucessivas, aparentemente catalisadas por enzimas do sistema citocromo P450. É importante ressaltar que DIF-3 inibe a síntese de DIF-1, aparentemente na etapa de cloração. (Morandini et al., 1995; Kay et al., 1999; Thompson & Kay, 2000; Kay & Thompson, 2001).

O mecanismo de ação de DIF-1 ainda não está elucidado, mas, dado o seu caráter hidrofóbico, é esperado que possa atravessar a membrana e ligar um receptor intracelular, à semelhança dos hormônios esteróides. Uma proteína citossólica capaz de ligar DIF-1 foi identificada. Além disso, proteínas STAT de *Dictyostelium* têm sido consideradas possíveis mediadores da ação de DIF-1 (Insall & Kay, 1990; Kay et al., 1999).

Figura 1: Ciclo de Vida de *Dictyostelium discoideum*. Adaptado de Darnell et al., 1990. O tempo de desenvolvimento, induzido após a carência nutricional, está indicado em horas.

1.2. O mutante *redA* de *D. discoideum*

O estudo de genes envolvidos no desenvolvimento de *D. discoideum* tem sido facilitado graças à possibilidade de manipulação do seu genoma através de ferramentas da genética molecular. Entre estas ferramentas podem ser citadas a recombinação homóloga para o nocaute específico de genes, a mutagênese insercional aleatória mediada por enzimas de restrição (REMI, *Restriction Enzyme Mediated Integration*), a identificação de genes supressores de mutações e a disponibilidade de vetores plasmidiais apropriados para superexpressão de genes e para complementação genética (De Lozanne, 1985; Kuspa & Loomis, 1992; Kuspa et al., 1995; Loomis & Kuspa, 1997).

Na técnica de REMI (figura 2) as células de *Dictyostelium* são submetidas à eletroporação na presença de um plasmídeo linearizado contendo marcas de seleção (como, por exemplo, resistência ao antibiótico blasticidina) e de uma enzima de restrição cujo sítio de clivagem seja compatível com as extremidades do plasmídeo linearizado e que clive o genoma com alta frequência, promovendo a integração aleatória do plasmídeo em sítios cognatos nos cromossomos. Uma biblioteca de mutantes de *Dictyostelium* resistentes a blasticidina é então obtida e o fenótipo de cada um dos clones pode ser inspecionado. O gene interrompido, flanqueando o sítio de inserção, pode ser resgatado pela digestão do DNA genômico do mutante com determinadas enzimas de restrição, ligação dos fragmentos e seleção do fragmento genômico que contem o plasmídeo integrado através da transformação de bactérias seguida de seleção com ampicilina. O plasmídeo resgatado (*clone out*) carrega portanto uma porção do gene interrompido, e pode ser usado em experimentos de recombinação homóloga para inativação deste gene na linhagem selvagem parental e confirmação do fenótipo originalmente observado no mutante obtido por REMI (Kuspa & Loomis, 1992; Loomis & Kuspa, 1994; Adachi et al., 1994; Kuspa et al., 1995; Loomis & Kuspa, 1997; Kay & Williams, 1999).

Utilizando a técnica de REMI, o laboratório do Dr. William Loomis (University of California, San Diego, EUA) isolou aproximadamente 80 mutantes

de desenvolvimento que estão sendo ou já foram caracterizados (<http://glamdring.ucsd.edu/others/dsmith/REMIgenes2000.html>).

Um destes mutantes, designado redA (DG1047) apresenta crescimento aparentemente normal, mas seu ciclo de desenvolvimento é interrompido no estágio de agregados compactos e acumula um pigmento amarelo durante seu ciclo de desenvolvimento. Este mutante não progride além deste estágio e, portanto, não forma corpos de frutificação típicos da linhagem selvagem parental, neste caso linhagem AX4. Ainda que o processo de excisão do gene nocauteado não tenha permitido a recuperação completa do gene nocauteado pela técnica de REMI, a sua seqüência parcial foi registrada no GenBank com número de acesso AF012946 e revelou que ele deveria codificar uma proteína com similaridade significativa com as enzimas NADPH citocromo P450 redutase e sintase de óxido nítrico.

O fato do gene nocauteado estar incompleto no plasmídeo resgatado do mutante redA e por codificar uma seqüência de aminoácidos que mostrava similaridade com domínios protéicos presentes na enzima óxido nítrico sintase despertou nosso interesse em aprofundar a caracterização deste mutante, com objetivo de confirmar ou descartar o possível envolvimento de uma eventual NOS no fenótipo deste mutante. A hipótese do envolvimento de uma enzima do tipo NOS no fenótipo do mutante redA também estava baseada em observações preliminares de que o mutante redA apresentava uma produção reduzida de óxido nítrico (*NO), Dr^a. Claudette Klein, Saint Louis University, Saint Louis, EUA, comunicação pessoal.

Além do cAMP, também o *NO parece participar da regulação e desenvolvimento em *D. discoideum*. Nos últimos anos, o grupo liderado pela Dra. C. Klein (St. Louis University, EUA) acumulou evidência de que *Dictyostelium discoideum* produz *NO durante o início de seu ciclo de desenvolvimento e também durante a fase de crescimento (Tao et al., 1997). Doadores artificiais de *NO como o SNP (nitroprussiato de sódio) são capazes de inibir a agregação e a diferenciação celular de *D. discoideum* (Tao et al., 1992a; Tao et al., 1996). O mecanismo que medeia a ação reguladora do *NO no ciclo de vida de *D.*

discoideum não foi elucidado, mas aparentemente não envolve alteração nos níveis intracelulares de cGMP (Tao et al., 1992a; 1992b).

Estas observações são relevantes, pois até há poucos anos a sinalização celular mediada pelo NO era atribuída como exclusiva dos metazoários. Mais recentemente, contudo, tanto a produção quanto o papel fisiológico do NO têm sido estudados em outros organismos como bactérias, protozoários, fungos e plantas, além de *Dictyostelium discoideum* (Chen & Rosazza, 1994; Feelisch & Martin, 1995; Paveto et al., 1995; Ninneman & Maier, 1996; Tao et al., 1997; Basu et al., 1997; Durner & Klessig, 1999; Wilken & Huchzermeyer, 1999; Cutrizzolà, 1999).

Ainda que se proponha que a síntese enzimática de NO em microorganismos seja semelhante à observada em mamíferos, é importante observar que a(s) enzima(s) responsável(veis) provavelmente apresenta(m) características distintas das NOS identificadas em metazoários. A suposta enzima presente em *Candida tropicalis*, embora aparentemente utilize L-arginina como substrato, parece não ser estimulada pela adição de FAD, FMN e H_4B [6R-(L-eritro-1',2'-diidroxipropil)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina] (Wilken & Huchzermeyer, 1999).

Em *Dictyostelium discoideum* a produção endógena de NO não é afetada por inibidores competitivos das NOSs típicas de mamíferos, como o NMMA (*N*-monomethyl-L-arginine) mas, por outro lado, é significativamente afetada por inibidores não competitivos, como o L-NIO (*L*- N^5 -iminoethyl ornitine) e DPI (*diphenyleneiodonium chloride*), este último um inibidor genérico para enzimas que requerem FAD (Tao et al., 1997). Genes ou cDNAs codificadores de NOS de microorganismos eucarióticos não foram ainda isolados, conforme pesquisa realizada no GenBank até 30/08/02.

Figura 2: Técnica de mutagênese insercional aleatória mediada por enzimas de restrição (REMI).

1.3. Considerações gerais sobre a enzima NADPH citocromo P450 redutase

A NADPH citocromo P450 redutase (NCPR) é uma flavoproteína que contém os cofatores flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), os quais são essenciais para a sua função. O seu principal papel é transportar elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), via seus grupos prostéticos FMN e FAD, para as várias isoformas do citocromo P450 (Iyanagi & Mason, 1973; Vermilion & Coon, 1978; Vermilion et al., 1981; Porter & Kasper, 1986; Smith et al., 1994; Wang et al., 1997; Poulos, et al., 1998; Döhr et al., 2001).

A NCPR tem também a habilidade de reduzir outros compostos aceptores de elétrons incluindo drogas terapêuticas como a mitomicina C (Vermilion & Coon, 1978) e outros compostos como o ferricianeto de potássio e o citocromo c. Em adição, a NCPR é também doadora de elétrons para as hemeoxigenases (Schatcter et al., 1972; Maines, 1988; Fujii et al., 2001), para o citocromo b₅ (Enoch & Strittmatter, 1979), no metabolismo oxidativo de ácidos graxos, esteróides e prostaglandinas (Enoch & Strittmatter, 1979; Smith et al., 1994; Wang et al., 1997) e na peroxidação lipídica (Svingen et al., 1979; Sevanian et al., 1990).

A enzima NCPR é também muito importante no metabolismo de compostos endógenos. A inativação do único gene para NCPR em *Saccharomyces cerevisiae* resulta em uma linhagem viável que acumula apenas 25% do ergosterol existente na linhagem parental selvagem (Venkateswarlu et al., 1998), o que provavelmente é a causa da hipersensibilidade destas células ao antifúngico cetoconazol (Sutter & Loper, 1989). Recentemente, experimentos de hibridização *in situ* em embriões de camundongos sugerem que a NCPR tenha sua expressão controlada durante a organogênese (Keeney & Waterman, 1999). Ademais, a NCPR também está envolvida no desenvolvimento embrionário de insetos e de camundongos (Horike et al., 2000; Shen et al., 2002).

O seu papel no catabolismo de compostos endógenos também é conhecido. A NCPR atua como um doador de elétrons via NADPH para a enzima hemeoxigenase. Esta é responsável pela catálise da quebra do grupo heme à biliverdina com a liberação de íons ferro II e monóxido de carbono (Maines, 1988;

Halliwell & Gutteridge, 2000; Fujii et al., 2001). Estudo recente sugere que a NCPR modula indiretamente o nível da proteína citocromo P450 via degradação do grupo heme dependente da enzima hemoxygenase (Ding et al., 2001).

A NCPR aceita um par de elétrons do NADPH transferido como íon hidreto. A química de óxido-redução desta coenzima se dá no anel piridínico. O restante da molécula é importante para o correto posicionamento da coenzima no sítio ativo da enzima. O íon hidreto é transferido da posição 4 do anel piridínico para o anel flavínico do FMN que será reduzido. Esse íon hidreto será posteriormente transferido para o FAD, que o transferirá por sua vez para o sistema receptor, como por exemplo as isoformas da enzima citocromo P450. O sistema citocromo P450 usará esses equivalentes reduzidos na hidroxilação de uma variedade de substratos. Os potenciais redox para as meias reações na enzima nativa já foram determinados por titulação potenciométrica (Iyanagi et al., 1974; Vemilion & Coon, 1978; Porter & Kasper, 1986, Wang et al., 1997; Murataliev & Feyereesen, 2000; Paine et al., 2001).

Em geral as NCPRs têm aproximadamente 677-680 aminoácidos e massa molecular de ~78 kDa e podem ser divididas em dois domínios funcionais:

1. Um domínio aminoterminal hidrofóbico (6 kDa) que funciona para ancorar a enzima na membrana do retículo endoplasmático e no envelope nuclear e assegura a interação espacial ideal para a transferência de elétrons entre a redutase e as várias isoformas do citocromo P450 (Kasper, 1971; Black et al., 1982).
2. Um domínio catalítico dividido em subdomínios estruturais. No domínio catalítico, analisando do amino para o carboxiterminal, são encontrados o subdomínio envolvido na ligação do FMN (170 resíduos), seguido de um subdomínio de ~200 resíduos e outro de ~110 resíduos, responsáveis pela ligação do FAD e do NADPH, respectivamente. Sem a âncora hidrofóbica, esse domínio catalítico de 72 kDa é capaz de transferir elétrons para o citocromo c e outros aceptores artificiais de elétrons, mas é incapaz de transferir elétrons para as isoformas do citocromo P450 (Porter & Kasper, 1986; Wang et al., 1997).

Esse arranjo dos domínios é consistente com resultados que mostram que cada domínio pode ser funcionalmente expresso de modo independente (Smith et al., 1994). Comparações de seqüências das diversas NCPRs com outras proteínas revelam uma alta similaridade com duas flavoproteínas distintas. A região aminoterminal da redutase apresenta similaridade com a flavodoxina bacteriana e a porção carboxiterminal da redutase é similar às ferredoxinas NADP⁺ redutases. Estas observações sugerem que a NCPR pode corresponder à fusão de duas proteínas ancestrais (Porter & Kasper, 1986; Porter, 1991; Smith et al., 1994; Hall et al., 2001).

A comparação das seqüências de aminoácidos das NCPRs de diferentes espécies, de leveduras até o homem, revela alta similaridade, indicando a importância evolutiva desta enzima (Shen & Kasper, 1993).

1.3.1. Outras enzimas que contêm grupos prostéticos FAD e FMN

Enzimas que contêm como grupos prostéticos FMN e FAD e doam elétrons via NADPH para o grupo heme pertencem à superfamília FNR (família estrutural de proteínas que têm como característica comum o domínio ferredoxina NADP⁺ redutase). A NCPR pertence a uma subfamília da superfamília FNR (Andrews et al., 1992; Wang et al., 1997).

Em mamíferos, as outras enzimas que pertencem a mesma superfamília FNR são as várias isoformas da NOS. As óxido nítrico sintases de tecidos de vertebrados estão razoavelmente bem caracterizadas, e requerem, além dos cofatores como FAD e FMN, o grupo heme e H₄B em adição ao NADPH como co-substrato (Poulos et al., 1998; Stuehr, 1999).

Tanto as NCPRs quanto as NOSs compartilham significativa similaridade em seus domínios carboxiterminais (aproximadamente 640 aminoácidos), que contêm sítios de ligação para NADPH, FAD e FMN. Por outro lado, as NOSs possuem uma extensão aminoterminal de ~700 aminoácidos, não presente nas NCPRs, e que contém domínios de ligação para H₄B, heme e L-arginina, além de um sítio para ligação de calmodulina presente em algumas isoformas de NOS (Poulos et al., 1998; Stuehr, 1999).

Outros tipos de enzimas que estão incluídas na superfamília FNR são as sulfito redutases, que participam da redução do sulfito a sulfeto encontrada em bactérias, fungos e plantas, mas não em animais (Smith et al., 1994; Crane & Getzoff, 1996); a metionina sintase redutase, que doa elétrons para a enzima metionina sintase, uma enzima chave no metabolismo da metionina (Banerjee, 1997; Leclerc et al., 1998; Hall et al., 2001, Olteanu et al., 2001), e a NR1 (*novel reductase 1*), uma enzima expressa em células tumorais que parece desempenhar algum papel na inativação de drogas anti-tumorais (Paine et al., 2000; Döhr et al., 2001).

1.3.2. Características do sistema citocromo P450

Os citocromos P450 (CYPs) formam uma grande família de proteínas, as quais catalisam a biotransformação oxidativa de substratos endógenos como esteróides e prostaglandinas e exógenos como drogas terapêuticas, compostos carcinogênicos e poluentes orgânicos. Os citocromos P450 são encontrados em todos os organismos, das bactérias aos seres humanos (Graham & Peterson, 1999; Strobel et al., 1999). A NCPR tem importância significativa nesta biotransformação em diferentes organismos uma vez que os dois elétrons requeridos pelo sistema citocromo P450 são doados via NADPH por esta enzima (Murray et al., 1990; Graham & Peterson, 1999; Strobel et al., 1999; Halliwell & Gutteridge, 2000).

A superfamília das CYPs pode ser subdividida em 2 classes, de acordo com o modo de transferência do nucleotídeo de piridina reduzido (NADPH ou NADH) para o grupo heme. As enzimas da classe I requerem uma redutase dependente de FAD e uma ferredoxina e são principalmente encontradas nas membranas mitocondriais de células eucarióticas e na maioria das bactérias. Os citocromos P450 da classe II são enzimas que requerem uma redutase dependente de FAD/FMN para transferência de elétrons do nucleotídeo de piridina reduzido para o seu grupo heme. Os citocromos P450 da classe II são encontrados em leveduras, fungos, plantas e animais, ligados à membrana e localizados na face citoplasmática do retículo endoplasmático. A redutase que atua cataliticamente

estas enzimas é a NCPR (Nelson, 1999; Kirton et al., 2002). Além disso, alguns estudos *in vitro* sugerem que a NCPR controla não somente a atividade, como também os níveis celulares dos citocromos P450 (Ding et al., 2001). Outra alternativa de transferência de elétrons para P450 parece ser o sistema citocromo b_5 /citocromo b_5 redutase. Estudos recentes demonstraram que este sistema estaria envolvido como um componente no ciclo de transferência de elétrons para algumas isoformas dos citocromos P450, sendo capaz de transferir os dois elétrons requeridos pelo P450 (Lamb et al., 1999). Por outro lado, o citocromo b_5 intacto ou seu domínio carboxiterminal hidrofóbico é capaz de estimular a atividade de certas isoformas de P450 de modo dependente da NCPR (Yamazaki et al., 1999; Yamazaki et al., 2001; Gilep et al., 2001).

2. Objetivos

Neste trabalho tivemos como objetivo principal caracterizar o mutante de desenvolvimento redA (DG 1047) de *Dictyostelium discoideum* obtido pela técnica de REMI. O gene defeituoso deste mutante foi isolado e o cDNA correspondente foi clonado e seqüenciado. Através da comparação de seqüências identificamos que o gene mutado codifica a enzima NADPH citocromo P450 redutase (NCPR). O fenótipo do mutante redA e de outros mutantes gerados pela inativação do gene da NCPR por recombinação homóloga foi investigado. Tivemos também como objetivo a análise do perfil da expressão do mRNA que codifica a NCPR ao longo do desenvolvimento de *D. discoideum*.

3. Procedimentos Experimentais

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

Em nossos experimentos utilizamos as linhagens axênicas *D. discoideum* denominadas AX4 e DG1047 (mutante *redA*) cedidas pelo Dr. William Loomis (University of California, San Diego, EUA), além de linhagens obtidas neste trabalho.

3.1.1. Manutenção das culturas

Estoques das linhagens axênicas de *Dictyostelium discoideum* foram cultivados em placas de meio SM [peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,1% (p/v), MgSO_4 0,1% (p/v), dextrose 0,2% (p/v), agar 2% (p/v) e KH_2PO_4 20 mM, pH 6,8] como descrito por Sussman (1987). Para iniciar uma cultura, 0,2 mL de uma suspensão de bactérias *Klebsiella aerogenes* dissolvidas em LB ou SM líquido (sem agar) foram misturados com uma pequena porção de corpos de frutificação maduros de *Dictyostelium*. Os corpos de frutificação de *Dictyostelium* foram espalhados com a alça de vidro. As placas foram mantidas a 22°C até a formação de novos corpos de frutificação e guardadas a 4°C por 15 dias, quando um novo estoque era refeito.

Estoques de células também foram mantidos a -80°C. Para tal, o sedimento de 5×10^7 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) e KH_2PO_4 20 mM, pH 6,8] 90% (v/v) e DMSO 10% (v/v) e em seguida congelado em gelo seco e imediatamente armazenado a -80°C.

Para iniciar uma cultura a partir de células congeladas, células de *Dictyostelium* foram descongeladas na presença de 500 mL de uma suspensão de bactérias *K. aerogenes*. A suspensão obtida foi semeada em meio SM, como descrito anteriormente. Esses estoques de células congeladas foram utilizados periodicamente como fonte de material para dar início a novas culturas em meio de crescimento sólido.

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

Para obtenção de células em diferentes fases de desenvolvimento, células provenientes de culturas em meio axênico HL-5 foram submetidas a carência nutricional sobre filtros de nitrocelulose Millipore de cor preta na porosidade de 0.45 mm e com 47 mm de diâmetro, como descrito por Sussman (1987). Esses filtros foram fervidos em água destilada por 10 minutos, por três vezes, e colocados sobre pré-filtros (Schleicher & Schuel n^o 8 47 mm) embebidos em tampão Sorensen (KH_2PO_4 20 mM, pH 6,4). Alíquotas contendo 10^8 células suspensas em 1,0 mL de tampão Sorensen foram espalhadas uniformemente sobre os filtros e incubadas em câmara úmida a 22°C. Nessas condições, obtínhamos o desenvolvimento sincrônico e completo, até formação do corpo de frutificação maduro, após período médio de 24 horas, a 22°C. Os estágios de desenvolvimento foram monitorizados por observação na lupa e células de diversas fases do ciclo de vida foram ressuspensas em 1,0 mL de tampão Sorensen e imediatamente processadas de acordo com o experimento planejado.

3.1.2. Transfecção de DNA em *Dictyostelium* por eletroporação

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

Aproximadamente 10^7 células da linhagem AX4 em fase de crescimento exponencial mantidas previamente por 15 minutos no gelo foram concentradas por centrifugação e ressuspensas em 1 mL de tampão de eletroporação (NaH_2PO_4 10 mM, pH 6,1 e sucrose 1,5 mM). 800 μL desta suspensão foram transferidos para uma cubeta gelada (gene pulser cuvette 0,4 cm, BIO-RAD) e foram adicionados aproximadamente 40 μg do cDNA de interesse interrompido pelo cassete de resistência à blasticidina. Em seguida, as células foram submetidas a eletroporação no aparelho Electro Cell Manipulator (BTX) nas seguintes condições: 1,1 kV, 300 μs e 3 μF . Após a descarga elétrica, foram acrescentados imediatamente 10 μL de uma solução de MgCl_2 100 mM e CaCl_2 100 mM, mantendo-se a cubeta no gelo por 5 minutos. 2×10^6 células foram transferidas para placas de cultura de tecidos e após 10 minutos foram adicionados 10 μL 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, os clones resistentes à droga foram recuperados pipetando-se repetidamente o meio de cultura e submetidos a plaqueamento em diluições apropriadas para isolamento de clones em meio sólido SM.

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

Com o objetivo de obter a expressão constitutiva da NCPR em *D. discoideum* subclonamos o cDNA da NCPR no vetor de expressão pCytXNeoR gerando a construção plasmidial pCytXNeoR_DdNCPR (para detalhes desta construção plasmidial ver item 3.5).

Cerca de 2×10^7 células da linhagem selvagem AX4 e do mutante DG1047 em fase de crescimento exponencial em meio líquido foram depositadas em uma placa de cultura de tecidos e mantidas em repouso por duas horas. O meio de cultura foi removido e substituído por 10 μL de HL-5 contendo MES 10 mM, pH 7,0 como tampão. Esta solução foi removida após 25 minutos e um precipitado de DNA- CaCl_2 foi gotejado no centro da placa, espalhando-o delicadamente. Este

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

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

3.1.4. Tratamento de células de *D. discoideum* com SNP (nitroprussiato de sódio)

Estoques das linhagens axênicas AX4 e DG1047 (mutante *redA*) de *Dictyostelium discoideum* foram cultivados em placas SM. As células plaqueadas

foram monitorizadas quanto ao início do período de desenvolvimento. Nesta ocasião, foram transferidas para um frasco contendo 50 mL de meio de cultura HL-5 sob agitação de 200 rpm a 22°C. Essas culturas foram mantidas com uma densidade celular entre 2 e 6x10⁶ células/mL (crescimento exponencial).

Estas células foram então diluídas para concentração inicial de 1x10⁶ células/mL. Foi preparada solução de 500 µM de SNP (Na₂Fe(CN)₅NO.2H₂O - nitroprussiato de sódio) e a mesma foi adicionada ou não aos frascos contendo células. Em diferentes tempos (0, 4, 8, 12 e 24 horas), alíquotas de células foram recolhidas para contagem em câmara de Neubauer, bem como para extração de RNA total.

3.1.5. Monitorização da taxa de crescimento de células de *D. discoideum*

As linhagens a serem analisadas cultivadas em placas de meio SM foram monitorizadas quanto ao início do desenvolvimento (fase de agregação) e nesta ocasião foram transferidas para um frasco contendo 50 mL de meio de cultura HL-5 e mantidas a 22°C sob agitação a 200 rpm. Essas culturas foram cultivadas até atingir densidade celular entre 2 e 6 x 10⁶ células/mL (crescimento exponencial) e em seguida foram então diluídas para concentração de 5x10⁵ células/mL. Em diferentes tempos (0, 4, 8, 12, 24 e 48 horas), alíquotas foram recolhidas para contagem do número de células em câmara de Neubauer. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes com a contagem do número de células sempre realizada em duplicata.

3.1.6. Teste de formação de esporos em *D. discoideum*

Células das linhagens em estudo foram submetidas a carência em filtros e nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20, 24 e 48 horas foram coletadas e lavadas por 3 vezes com tampão Sorensen 20 mM, pH 6,4. Após as lavagens, as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de NP40 0,1% (v/v), EDTA (20 mM) e tampão Sorensen 20 mM, pH 6,4, e em seguida aquecido a 45 °C por 45 minutos. Após esse período as células foram lavadas por 2 vezes em tampão Sorensen (20 mM, pH 6,4) e ressuspensas em 1 mL de meio SM. O número de

esporos (células que resistiram ao aquecimento) foi avaliado pela contagem em câmara de Neubauer e o volume ajustado para que 100 esporos fossem semeados por placa de meio SM. Como controle positivo destes experimentos foram utilizadas células de linhagem selvagem AX4 após 5 dias de carenciamento, para garantia da obtenção de corpos de frutificação com esporos viáveis.

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

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

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

Cultura de células de *D. discoideum* em meio líquido foi centrifugada para obtenção de precipitados de 2×10^7 células. Os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de Trizolâ (Life Technologies, Gibco BRL) e agitados para ressuspensão total. Foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente

foram adicionados a 0,2 volumes de CHCl₃. O tubo foi agitado vigorosamente e incubado por mais 3 minutos à temperatura ambiente.

O tubo foi centrifugado por 15 minutos a 4°C a 14000 rpm. A fase aquosa foi retirada e transferida para outro tubo. A esta fase foi adicionado meio volume de isopropanol seguido de incubação por 10 minutos. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 4°C a 14000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com igual volume de etanol 75% (v/v) por centrifugação nas mesmas condições acima. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco em speed vac (Eppendorf concentrator 5301) por 5 minutos. O precipitado de RNA foi ressuspenso em 50 mL de H₂O livre de RNase e a amostra foi aquecida por 10 minutos a 65°C. Após a ressuspensão a concentração final do RNA total foi estimada pela medida da absorbância a 260 nm, onde D.O. 260nm = 1 equivale a 40 mg de RNA/mL, e a sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

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

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

3.2. Procedimentos para manipulação de bactérias

3.2.1. Preparo de bactérias competentes para transformação por eletroporação

Bactérias *Escherichia coli* linhagem XL1 Blue {supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac- F'[proAB+ lacq lacZDM15 Tn10(tetr)]} ou linhagem Sure {e14-(McrA-) D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB rscJ sbcC umuC.Tn5 (Kanr) uvrC [F'proAB lacqZ DM15 Tn10 (Tetr)]c}

foram estriadas em placas de meio LB sólido [triptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v) e agar 1,5% (p/v), pH 7,5] seguindo-se incubação a 37°C por uma noite. Posteriormente, uma colônia foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido e crescida a 37°C por uma noite a 225 rpm. Aproximadamente 5,0 mL desta cultura (pré-inóculo) foram transferidos para 500 mL de meio LB líquido fresco seguindo-se crescimento por 2 a 3 horas nas mesmas condições anteriores, até que a D.O. 600nm atingisse ~0,5. As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis, incubadas em gelo/água por 15 minutos e posteriormente coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos, a 4°C (Rotor SS-34, SORVALL). O sedimento foi ressuspensão em 250 mL de água destilada estéril e gelada e centrifugado nas condições anteriores. A etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes, as células ressuspensas em 50 mL de glicerol 10% (v/v) gelado e submetidas a centrifugação novamente. Por fim, as bactérias foram ressuspensas em 1000 mL de glicerol 10% (v/v), distribuídas em pequenos volumes de 45 mL em tubos estéreis, imediatamente congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a -80°C.

3.2.2. Transformação de bactérias por eletroporação

Aproximadamente 0,2 mg do DNA plasmidial foram adicionados a 45 mL de bactérias competentes e a mistura foi transferida para uma cubeta (gene pulser cuvette 0,2 cm, BIO-RAD) previamente resfriada. Em seguida as células foram submetidas a eletroporação (Electro Cell Manipulator, BTX) nas seguintes condições: 2500 V, 50 mF e 129 W. Imediatamente, foi adicionado 1 mL de meio LB sendo a suspensão bacteriana transferida para tubo de cultura e incubada a 37°C por 1 hora a 200 rpm. Após essa recuperação, 100 mL, 200 mL e 300 mL de cultura foram semeados em placas de meio LB sólido contendo carbenicilina 100 mg/mL. Algumas colônias transformantes foram inoculadas em meio LB líquido contendo carbenicilina 100 mg/mL para minipreparação de plasmídeos e posterior análise quanto à presença das construções plasmidiais de interesse.

3.3. Procedimentos para manipulação e análise de DNA e RNA

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

3.3.1. Métodos de preparação de plasmídeos

Minipreparação pelo método de lise alcalina

As bactérias foram crescidas em 1,5 mL de LB contendo carbenicilina 100 mg/mL a 37°C por uma noite a 225 rpm e então submetidas a centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 100 mL de solução GET/RNase (TrisHCl 25 mM, pH 8,0, glicose 0,5 M, EDTA 10 mM e ribonuclease A 150 mg/mL) foram adicionados para ressuspensão do sedimento de bactérias. Em seguida, foram adicionados 200 mL de solução de lise [SDS 1% (p/v) e NaOH 0,2 M] recém preparada misturando-se delicadamente por inversão até completa homogeneização. A suspensão foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se adição de 200 mL de solução de neutralização (acetato de potássio 5 M, pH 4,8). Após mistura da suspensão por inversão suave do tubo, seguiu-se incubação por 20 a 30 minutos a 4°C e centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. Do sobrenadante obtido foram tomados 400 mL e adicionados a 300 mL de isopropanol em um novo tubo. Após centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 mL de etanol 70% (v/v) nas mesmas condições de centrifugação anteriores. O precipitado foi seco em speed vac (Eppendorf concentrator 5301), ressuspenso em 25 mL de Tris 10 mM, pH 8,0 e mantido a -20°C.

Preparação em larga escala

Para obtenção de plasmídeos em grande quantidade foram utilizados 500 mL de cultura de clones transformantes de *E. coli* XL1 Blue ou Sure. Para 500 mL

de meio LB fresco contendo antibiótico carbenicilina 100 mg/mL foram adicionados 500 mL de pré-inóculo (3 mL de cultura em meio LB por uma noite), seguindo-se incubação a 37°C a 225 rpm por uma noite. A cultura foi submetida a centrifugação a 6500 rpm por 10 minutos a 4°C em rotor GSA (SORVALL). O sobrenadante foi completamente removido e o sedimento ressuspenso em 15 mL de solução I (Tris 20 mM, pH 8,0, glicose 50 mM e EDTA 10 mM) acrescida de 75 mg de lisozima. Foram adicionados 30 mL de solução II [NaOH 0,2 M 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) e após mistura a suspensão foi submetida a centrifugação a 6500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido em uma nova garrafa por filtração em gaze, acrescido de 36 mL de isopropanol e submetido a centrifugação a 6500 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado em estufa a 37°C para completa evaporação de isopropanol. O DNA foi ressuspenso em 2,5 mL de TE (Tris 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM) e transferido para um tubo de vidro de 15 mL. As proteínas foram precipitadas pela adição de acetato de amônio 2,5 M e incubação em gelo por 20 minutos. A mistura foi submetida a centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C, em rotor SS34 (SORVALL) e o sobrenadante transferido para outro tubo de vidro. O DNA foi precipitado com 2 vezes o volume de etanol 100% e incubado em gelo por 20 minutos. O etanol foi removido por centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C em rotor SS34 e o precipitado incubado a 37°C, até secagem. Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em TE contendo RNase 10 mg/mL e incubado a 37°C por 15 minutos. Após adição de NaCl para 1,5 mM e ¼ do volume de PEG/NaCl [PEG 6000-8000 30% (p/v) e NaCl 1,5M] a mistura foi incubada a 4°C por uma noite. O DNA precipitado foi coletado por centrifugação a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C (rotor SS34, SORVALL) e em seguida ressuspenso em 50 mL de água. 50 mL de tampão PK 2X [Tris 20 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, pH 8,0 e SDS 1% (p/v)] e proteinase K para concentração final 500 mg/mL foram adicionados e a mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Uma extração com igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) foi realizada seguida por uma extração com igual

volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v). O DNA foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de acetato de potássio 3 M, pH 5,5 juntamente com 2,2 volumes de etanol 100% seguindo-se centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) por centrifugação nas condições anteriores e, após aspiração do etanol, o DNA foi seco em speed vac (Eppendorf concentrator 5301) e finalmente ressuspenso em 50 mL de TE. A determinação da quantidade de DNA foi feita pela medida da absorbância a 260nm, onde D.O. 260nm = 1 equivale a 50 mg de DNA fita dupla/mL.

3.3.2. Digestão com enzimas de restrição

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

3.3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A amostra de DNA a ser analisada foi misturada com 0,1 volume de tampão de amostra [azul de bromofenol 0,25% (p/v) e sacarose 40% (p/v)] e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 0,7% ou 0,8% (p/v) contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídeo, a 80-90 Volts em TBE (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM, pH 8,0). A corrida foi interrompida após o corante percorrer aproximadamente 4/5 da distância entre o local da aplicação e o limite inferior do gel. O gel foi fotografado sob luz ultravioleta e os tamanhos dos fragmentos foram estimados mediante comparação com a mobilidade de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos.

3.3.4. Eluição de fragmentos de DNA em papel

Foi realizada eletroforese em gel de agarose até a separação dos fragmentos de DNA. O gel foi fotografado e um pequeno corte foi feito entre as bandas de DNA de modo a permitir a introdução de um pedaço de 2,5 cm de

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

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

Utilizamos uma biblioteca de cDNA em vetor Uni-Zap-XR (Stratagene®) de *D. discoideum* obtida a partir de mRNA da fase vegetativa gentilmente cedida pelo Dr. Hudson Freeze (Birmingham Institute, San Diego, California). Seu título era de $1,6 \times 10^{10}$ p.f.u./mL. As bactérias (XL-1 Blue) a serem infectadas com os bacteriófagos (fagomídeos) foram cultivadas em placas contendo meio LB sólido e 15 mg/mL de tetraciclina a 37°C por uma noite. Bactérias de colônias isoladas foram removidas e utilizadas em um novo inóculo em 50 mL de meio contendo 10% (v/v) de $MgSO_4$ 100 mM e 10% (v/v) de maltose 2% (p/v). Estas culturas foram mantidas sob agitação a 37°C até atingirem D.O. 600 = 0,9. As bactérias foram então recolhidas por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos, a 4°C e ressuspensas em 25 mL de uma solução de $MgSO_4$ 10 mM. Desta suspensão

foram retiradas alíquotas de 200 mL, que foram misturadas a uma diluição apropriada da solução contendo os bacteriófagos recombinantes (a varredura inicial foi realizada em duas placas contendo $1,0 \times 10^5$ p.f.u. cada). As misturas assim obtidas foram incubadas a 37°C por 20 minutos para a adsorção dos bacteriófagos às bactérias e a seguir foram misturadas a 3,0 mL de meio NZY I-top agarose {NZY líquido [extrato de levedura 0,5% (p/v), NZ amina (caseína hidroxilase), NaCl 0,5% (p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2% (p/v) e agar 1,5% (p/v)] e agarose 0,7% (p/v)} fundido e mantido a 45°C. O meio NZY I-top agarose contendo as bactérias com bacteriófagos adsorvidos foi imediatamente espalhado sobre placas de Petri contendo meio NZY sólido (NZY líquido com 2% de agar). Estas placas foram mantidas em estufa a 37°C por aproximadamente 8 horas para obtenção de placas de lise não confluentes.

Em seguida ao aparecimento das placas de lise, membranas de náilon de tamanho exato foram colocadas sobre a superfície do meio sólido e o DNA dos fagos foi transferido por adsorção direta por 2 minutos. Réplicas das membranas foram obtidas após transferência dos fagos por 5 minutos. As membranas foram deixadas para secar à temperatura ambiente e em seguida foram colocadas sucessivamente, com a face contendo bacteriófagos adsorvidos voltada para cima, sobre papéis de filtro Whatman 3MM levemente embebidos nas soluções de desnaturação (NaOH 0,5M e NaCl 1,5M) e neutralização (Tris.HCl 0,5M, pH 8,0; NaCl 1,5M) por 6 minutos, em cada um dos tratamentos. Em seguida, as membranas foram tratadas da mesma forma por duas vezes de 2 minutos cada em papéis embebidos em SSC 2X (SSC 10X corresponde a: NaCl 3M e citrato trissódico 0,3 M). As membranas foram secas e expostas por 7 min à luz UV para fixação covalente do DNA e armazenadas para posterior hibridização com sonda de DNA radioativa.

Após a varredura com sonda radioativa, e de acordo com o resultado dos autorradiogramas, as regiões da placa contendo os clones de bacteriófagos de interesse foram removidas e transferidas para tubos contendo tampão SM [NaCl 10 mM, MgSO_4 15 mM, Tris.HCl 25 mM e gelatina 0,005% (p/v)], seguindo-se armazenagem a 4°C. Os bacteriófagos assim isolados foram novamente

plaqueados transferidos para membranas de náilon e hibridizados nas mesmas condições para realização de varreduras secundária e terciária, até completa purificação dos clones de bacteriófagos (fagomídeos) de interesse.

3.3.6. Conversão de clones fagomídeos para a forma plasmidial

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

Para excisão, o sedimento obtido a partir de 50 mL de uma cultura de XL-1 blue MRF' obtida após crescimento por 16h. em meio LB com 0,2% maltose foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, ressuspenso em 200 mL de MgSO₄ 10mM e incubado com 200 mL da mistura de bacteriófagos (contendo acima de 10⁵ p.f.u.) e com 1mL de um bacteriófago auxiliador (contendo acima de 10⁶ p.f.u.). Esta mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos e em seguida foram adicionados 3,0 mL de LB. Os tubos foram incubados a 37°C sob agitação por 3 horas. A seguir a mistura foi aquecida a 68°C por 20 minutos e centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi decantado e mantido a 4°C. 1 mL desta suspensão foi adicionado a 200 mL de uma suspensão de bactérias SOLRTM (sedimento obtido a partir de 50 mL de uma cultura de SOLRTM obtida após crescimento por 16h. em meio LB com 0,2% maltose e centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos, ressuspenso em 200 mL de MgSO₄ 10mM). A mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos e plaqueada em meio LB sólido contendo 100 mg/mL de carbenicilina. As colônias assim obtidas contêm o plasmídeo pBluescriptS/K contendo o cDNA correspondente ao clone isolado após as varreduras da biblioteca de cDNA construída no vetor Uni-Zap-XR.

3.3.7. Preparação de sonda radioativa

A marcação da sonda de DNA foi feita com o kit Random Primers DNA Labeling System (GIBCO-BRL) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, utilizando 50 mCi de [α 32P] dATP e/ou [α 32P] dCTP. Utilizamos 25

mL de uma solução contendo de 50ng a 100ng de DNA diluído em água (em geral fragmento de DNA purificado por eletroforese em gel de agarose) e que foi sempre previamente desnaturado por fervura durante 5 min de e resfriamento rápido em gelo antes da reação de marcação.

Para purificação da sonda radioativa, um pouco de lã de vidro foi empacotado no fundo de uma seringa de 1 mL sem agulha que foi em seguida apoiada num tubo cônico de 15 mL e preenchida com 0,9 mL de resina Sephadex G-50 previamente equilibrada em TE. A resina foi lavada com 5 a 10 mL de STE (Tris.HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 10 mM e EDTA 10 mM, pH 8,0) por centrifugação a 2500 rpm por 3 minutos, à temperatura ambiente. Foram então adicionados 50 mL 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 mL da sonda purificada e não purificada foram adsorvidas em pedaços de 1 x 1 cm papel de filtro (em cada). Um pedaço contendo a sonda não purificada e outro contendo a sonda purificada foram tratados com 25 mL de TCA 10% (v/v), a 4°C por 10 min, por duas vezes. Em seguida os papéis foram lavados com etanol e depois de secos, a radioatividade foi medida em contador de cintilação líquida e comparada com os papéis contendo as mesmas amostras mas não submetidos ao tratamento com TCA. Em geral, a atividade específica das sondas preparadas estava na faixa de 5×10^8 a 10^9 cpm/mg de DNA.

3.3.8. Hibridização de membranas de náilon contendo os fagos adsorvidos

A membrana (blot para varredura da biblioteca de cDNA) foi apoiada sobre uma tela de nylon e então colocada na garrafa de hibridização contendo solução de hibridização [Denhardtts 5X, SSPE 6X, SDS 0,1% (p/v) e DNA de timo de bezerro 125 mg/mL]. A solução de Denhardtts corresponde a: Ficoll 1% (p/v), Polivinilpirrolidona 1% (p/v) e BSA fração V 1% (p/v) e a solução de SSPE 20X corresponde a: NaCl 3 M, NaH_2PO_4 0,2 M, pH 7,4 e EDTA 20 mM. Esta pré-hibridização foi realizada a 68°C por pelo menos 2 horas. Após este tempo a sonda radioativa foi acrescida à solução de hibridização seguindo-se incubação

por no mínimo 12-16 horas a 68°C. Após hibridização foram realizadas lavagens sucessivas da membrana com SSC 6X, 4X, 2X e 2X, nesta ordem, por 20 minutos cada, à temperatura ambiente e sob agitação branda. Após secagem ao ar a membrana foi envolvida em filme plástico para exposição a filme de raios-X e armazenada a -80°C, por períodos variados.

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

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

A etapa seguinte consistiu na montagem de uma pilha sobre uma placa de sustentação de acrílico contendo na ordem: uma tira de papel Whatman 3MM sobre a placa, dobrado de modo a tocar a superfície interna da cuba; o gel com a face superior voltada para este papel; a membrana de náilon (Hybond-Nâ, Amersham); papel Whatman 3MM previamente umedecido em SSC 2X; três papéis Whatman secos; pilha de jornal cortado; placa de vidro; peso de 500 g. Esta pilha foi colocada dentro de uma cuba contendo SSC 10X (NaCl 3 M e citrato trissódico 0,3 M). A transferência foi realizada por 16 horas, à temperatura ambiente.

Alternativamente, a transferência para membrana de náilon foi realizada por 1 hora no sistema de transferência por pressão (Posi Blotâ 30-30 Pressure Blotter and Pressure Control Station, Stratagene) seguindo as instruções do fabricante. Após a transferência, a membrana foi marcada com caneta na região de aplicação das amostras, e a fixação do DNA à membrana foi feita por exposição à luz ultravioleta por 7 minutos diretamente no transiluminador ou no aparelho UV Stratalinker 1800, (Stratagene®) de acordo com as instruções do fabricante. As

membranas foram imediatamente utilizadas para hibridização ou embaladas em filme plástico e armazenadas.

3.3.10. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído

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

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

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

3.3.12. Hibridização de *Southern blots* e *Northern blots*

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

solução de lavagem (SSPE 0,5X, NaCl 3 M, NaH₂PO₄ 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.

3.3.13. Seqüenciamento automatizado de DNA

O seqüenciamento foi realizado no aparelho “ABI 377 DNA Sequencer” da Applied Biosystems de acordo com as instruções do fabricante. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se 4 uL da mistura de reação Big Dye Terminator mix (Perkin Elmer), 200-500 ng de DNA, 20 pmol de oligonucleotídeo, Tris base 40 mM, pH 9,0 e MgCl₂ 1 mM em um volume final de 20 µL. A reação foi incubada por 5 min a 95°C e em seguida submetida a 30 ciclos (95°C, por 30 segundos/ 50°C, por 10 segundos/ 60°C, por 4 minutos). Em seguida, o DNA foi purificado por precipitação com etanol, de acordo com as instruções do fabricante do kit, e ressuspenso em tampão para aplicação no gel do seqüenciador automático.

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

NCPR1	5'GAT GGT GTT CCA CCA ACC3'
NCPR2	5'GGT TAA ACG TGT ACT CAC3'
NCPR3	5'CCA GTA CCT GGA CCA ACC3'

3.3.14. Métodos de análise de seqüências de DNA e proteína

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

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

NCBI (National Center for Biotechnology Information): www.ncbi.nlm.nih.gov

Expasy Molecular Biology Server www.expasy.ch/

EMBL (European Molecular Biology Laboratory) www.embl-heidelberg.de/Services/index.html

Biomedical Computing Facility (Baylor College of Medicine) <http://bcf.bcm.tmc.edu/genomic.html>

European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/>

Para pesquisa de similaridade de seqüências de DNA ou de proteínas utilizamos a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1990) em bancos de dados públicos como o GenBank do NCBI (ver acima). Para o alinhamento de seqüências de aminoácidos utilizamos o programa ClustalX ou ClustalW (Higgins et al., 1994; Jeanmougin et al., 1998). Para o planejamento de primers utilizamos o programa PRIMER3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

3.4. Procedimentos para manipulação e análise de proteínas

3.4.1. Preparo de extratos de células humanas Hep2 para análise por SDS-PAGE e Western blot

Culturas de células humanas epiteliais Hep2 em placas de cultura de tecido (100 mm) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Armando Moraes Ventura (ICB-USP). Para preparação dos extratos protéicos, o meio foi removido, as células foram lavadas com 10 mL de tampão PBS 1X (NaH_2PO_4 9,1 mM, Na_2HPO_4 1,7 mM e NaCl 150 mM] à temperatura ambiente e em seguida foi adicionado 1 mL de tampão RIPA [PBS 1X, NP40 1% (v/v), deoxicolato de sódio 0,5% (p/v) e SDS 0,1% (p/v)] gelado contendo 10 μL de PMSF (10 mg/mL em isopropanol) gelado para lise das células. As células foram raspadas das placas e transferidas para um tubo de microcentrífuga. Essa solução foi passada por seringa (21 gauge) até completa fluidez e foi então incubada durante 30 minutos em gelo. A seguir, a solução foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para outro tubo. As proteínas totais da solução foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) segundo as instruções do kit Bio-Rad protein Assay, Bio-Rad, sendo usado como padrão BSA.

Um volume de 20 μL de solução (20 μg de proteínas totais) foram misturados com igual volume de tampão de eletroforese para SDS-PAGE concentrado 2X [Tris.HCl 50 mM, pH 6,8, DTT 25 mM, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v) e azul de bromofenol (80 g/ml)], seguida de fervura por 5 minutos e adição de 1 μL de DTT 1 M.

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

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

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

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

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

3.4.4. Detecção imunológica das proteínas (immunoblot)

A membrana de nitrocelulose obtida após a transferência das proteínas do gel foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação lenta, em Blotto A [TBS 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM e azida 0,02% (v/v)), leite em pó desnatado 5%(v/v) e Tween-20 0,05% (v/v)]. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo comercial policlonal (200 g/mL) contra NCPR preparado em cabras (Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:400 em Blotto A sob agitação suave, à temperatura ambiente, por uma noite. A membrana foi lavada 6 vezes por 10 minutos cada com TBS 1X contendo 0,05% Tween-20 (v/v) e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase 1:5000 em Blotto B [TBS1X (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e NaCl 150 mM), leite em pó desnatado 5% (v/v) e Tween-20 0,05% (v/v)].

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

3.5. Descrição das construções plasmidiais

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

pft70

Corresponde ao plasmídeo resgatado do mutante *redA* e nos foi cedido pelo Dr. William Loomis (University of California, San Diego, EUA). O fragmento de DNA genômico resgatado está clonado no vetor pGEM3 (Promega) modificado pela inserção de um cassete de resistência à blasticidina BSR3 como descrito em Kuspa & Loomis, 1992. A digestão do pft70 com *HindIII* e *SmaI* libera um inserto de 1,8 kbp (observado na figura 4) que corresponde à sequência parcial do gene da NCPR.

pBS_DdNCPR

A construção pBS_DdNCPR (clone 2B, figura 3B) que contém o cDNA completo da NCPR clonado no vetor pBluescriptS/K foi obtida após varredura da biblioteca de cDNA e excisão do plasmídeo como descrito nos itens 3.3.7.. A figura 5 mostra que a digestão com *SmaI* e *KpnI* libera um inserto que contém todo o cDNA de ~2 kbp da NCPR (na canaleta 1).

pBS_DdNCPR-KO

O cDNA da NCPR da construção pBS_DdNCPR foi interrompido com a inserção de um cassete de expressão para a resistência ao antibiótico blasticidina (BsR). Essa marca de resistência possibilitou selecionar clones de *D. discoideum* resistentes a esse antibiótico, ou seja, que tivessem a cópia do cDNA alterada integrada no genoma após a transfecção. Para obtenção da construção pBS_DdNCPR-KO (figura 3B), o cDNA da NCPR (2094 bp), clonado no vetor pBluescriptS/K, foi digerido com a enzima *EcoRV*, linearizando a construção, conforme observado na figura 5, canaleta 2. O sítio para *EcoRV* está na posição 1205 bp no cDNA da NCPR. O cassete contendo o gene de resistência à blasticidina (BsR) foi excisado do vetor pBsR519 (Putz & Zeng, 1998) também

pela enzima *EcoRV*, liberando um fragmento de ~1,4 kbp, conforme observado na figura 6, canaleta 1.

O clone 2B linearizado com *EcoRV* foi então desfosforilado com enzima fosfatase alcalina antes da ligação com o cassete BsR. Após a reação com DNA ligase e transformação de bactérias competentes SURE, os clones positivos tiveram seu DNA plasmidial analisado para verificar o sucesso da clonagem. Um dos clones contendo a inserção do cassete BsR foi escolhido (clone 21). O cDNA modificado pôde ser liberado do clone 21 com as enzimas *SmaI* e *KpnI* originando um fragmento de ~3,4 kbp (figura 7, canaleta 1). Esse inserto foi utilizado para transfecção de *D. discoideum* como descrito no item 3.1.2 para inativação do gene da NCPR e geração de linhagens nocautes (Knock Outs, KO).

pCytXNeoR_DdNCPR

O cDNA da NCPR foi excisado do pBS_DdNCPR pela digestão com as enzimas de restrição *SmaI* e *KpnI*, que liberam um fragmento de 2,0 kbp (figura 5, canaleta 1). Para a criação de sítios para *EcoRI* nas extremidades 3' e 5' desse cDNA, o inserto teve as extremidades aparadas com a enzima Klenow DNA acrescida de tampão 10X blunting/kinase do kit Sure Clone Ligation™ da Amersham Pharmacia Biotech. A etapa seguinte foi a clonagem no sítio *EcoRV* do vetor pBsR519, que é flanqueado por sítios para *EcoRI*. A excisão do inserto desta construção permitiu a obtenção do cDNA com extremidades para *EcoRI*, para subclonagem no sítio *EcoRI* do vetor pCytXNeoR. O vetor pCytXNeoR foi previamente linearizado com *EcoRI* e desfosforilado, sendo a clonagem do cDNA da NCPR possível em ambas as orientações.

Como mostrado na figura 3C, o cDNA de interesse, quando clonado neste vetor, é expresso sob o controle do promotor da citocromo 5 oxidase (CytO5P). Este promotor dirige transcrição constitutiva (da Silva A.M., dados não publicados). O vetor possui uma marca de resistência para o antibiótico geneticina, possibilitando a seleção de células de *D. discoideum* transfectadas com esse vetor. Além disso, o vetor pCytXNeoR pode ser replicado em bactérias

(oriC) e as células transformadas podem ser selecionadas com o antibiótico ampicilina (ampr), que é outra marca de resistência conferida pelo plasmídeo.

Os clones positivos tiveram seu DNA plasmidial analisado por digestão com *Hind*III para verificar o sucesso e a orientação da clonagem. Aqueles que continham o gene da NCPR clonado na direção senso (clone 8), observado na canaleta 8 da figura 8 e antisenso (clone 3), observado na canaleta 3 da figura 8 foram escolhidos e utilizados para transfecção de DNA em *Dictyostelium* pelo método de precipitados de cálcio, como descrito no item 3.1.3.

Figura 3: Esquema das construções plasmidiais

A. pft70. Plasmídeo resgatado do mutante *redA* clonado no vetor pGEM3 modificado pela inserção de um cassete de resistência à blasticidina (BSR3). O inserto de 1,8 kbp corresponde à sequência parcial do gene da NCPR. **B. pBS_DdNCPR (clone 2B).** cDNA da NCPR de *Dictyostelium discoideum* clonado nos sítios das enzimas *SmaI* e *KpnI* do vetor pBluescriptS/K (pBS). Estão indicados sítios para algumas enzimas de restrição que clivam o cDNA. **C. pBS_DdNCPR-KO (clone 21).** O cDNA da NCPR de *Dictyostelium discoideum* clonado em vetor pBluescriptS/K (pBS) foi interrompido pela inserção do cassete de resistência (BSR) ao antibiótico blasticidina no sítio para *EcoRV*. **D. pCytXNeoR_DdNCPR.** cDNA da NCPR de *Dictyostelium discoideum* clonado em vetor pCytXNeoR, construção para expressão constitutiva da NCPR. O vetor pCytXNeoR permite a expressão do cDNA da NCPR sob o controle do promotor da citocromo oxidase (CytO5P) e do terminador da actina (A8T). A resistência à geneticina é conferida pelo cassete Tn903. O sítio para clonagem do cDNA é o sítio de *EcoRI*.

Figura 4: Digestão do plasmídeo pft70 para excisão do inserto correspondente ao gene nocauteado no mutante redA. O plasmídeo pft70 (*clone out* do mutante redA) foi digerido com as enzimas de restrição *Sma*I e *Hind*III para liberação de um fragmento de ~1,8 kbp (canaletas 4 e 5). Plasmídeo pft70 não digerido (canaletas 2 e 3). O marcador de tamanho (1 kpb DNA *ladder*) pode ser observado na canaleta 1 e o tamanho de alguns fragmentos em kpb estão indicados à esquerda. A figura mostra a foto de um gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Figura 5: Digestão da construção pBS_DdNCPR com *EcoRV*. A construção pBS_DdNCPR (clone 2B) foi digerida com as enzimas de restrição *SmaI* e *KpnI* liberando um inserto que contém todo o cDNA da NCPR de ~2 kbp (na canaleta 1). Na canaleta 2 o mesmo clone 2B foi linearizado com a enzima *EcoRV*, gerando um fragmento de ~5 kbp. O marcador de tamanho (1 kbp DNA *ladder*) foi aplicado na canaleta 3, e o tamanho de alguns fragmentos em kpb está indicado à direita. A figura mostra foto do gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Figura 6: Excisão do cassete BsR do plasmídeo pBsR519. O vetor pBsR519 contendo o gene de resistência à blasticidina (BsR) foi digerido com a enzima de restrição *EcoRV* liberando um fragmento de ~1,4 kbp (canaleta 1). Este fragmento BsR foi purificado e inserido no sítio de *EcoRV* cDNA da NCPR para obtenção da construção pBS_DdNCPR-KO). O vetor pBsR519 não digerido é apresentado na canaleta 3. O marcador de tamanho (1 kbp DNA *ladder*) pode ser observado na canaleta 2 e o tamanho de alguns fragmentos em kpb está indicado à direita. A figura mostra a foto de um gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Figura 7: Análise da construção pBS_DdNCPR-KO com enzimas de restrição. A construção pBS_DdNCPR-KO para nocaute do gene da NCPR foi digerida com as enzimas de restrição *Sma*I e *Kpn*I, liberando um fragmento de ~3,4 kbp (canaleta 1), que corresponde ao cDNA da NCPR interrompido pelo cassete de resistência à blasticidina previamente excisado do pBsR519. O marcador de tamanho (1 kbp DNA *ladder*) pode ser observado na canaleta 3 e o tamanho de alguns fragmentos em kpb está indicado à direita. A figura mostra a foto de um gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo.

Figura 8: Obtenção da construção pCytXNeoR_DdNCPR. Os plasmídeos dos clones positivos para construção de pCytXNeoR_DdNCPR (construção para obtenção de expressão constitutiva da NCPR) foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII*. Existem duas possibilidades de inserção do cDNA da NCPR no vetor pCytXNeoR. O vetor contendo o inserto do cDNA da NCPR clonado no sentido senso liberaria 3 bandas (3800bp, 3000bp e 800bp) quando digerido com *HindIII*, e o vetor com o cDNA clonado no sentido oposto (antisense) liberaria 3 bandas (3800bp, 2400bp e 1400bp) quando digerido com *HindIII*. Nas canaletas 2 e 8 temos o vetor clonado no sentido senso; tanto o clone 8 (senso), quanto o clone 3 (antisense) foram utilizados no experimento de transfecção de *Dictyostelium* por precipitados de cálcio. O marcador de tamanho (1 kbp DNA *ladder*) pode ser observado na canaleta 13 e o tamanho de alguns fragmentos em kpb está indicado à direita. A figura mostra a foto de um gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

4. Resultados e Discussão

Como descrito anteriormente, o mutante redA (DG1047) é um mutante de desenvolvimento obtido pela técnica denominada REMI que faz parte da coleção de mutantes obtidos pelo Dr. William Loomis (University of California, San Diego, EUA). Durante o seu desenvolvimento os agregados formados apresentam cor amarela intensa. A análise preliminar do fenótipo deste mutante indicou que seu crescimento era aparentemente normal, mas seu ciclo de desenvolvimento não progride além do estágio de agregados compactos, sendo que não ocorre a formação de corpos de frutificação típicos da linhagem selvagem parental AX4. Aparentemente, esta linhagem mutante apresenta a característica adicional de produzir níveis reduzidos de óxido nítrico (Dra. Claudette Klein, Saint Louis University, Saint Louis, EUA, comunicação pessoal). Como será detalhado a seguir, nós caracterizamos o mutante redA com o objetivo de investigar a relação entre o produto do gene nocauteado e o fenótipo observado.

4.1. Clonagem e seqüenciamento do cDNA completo da NCPR de *D. discoideum*

Para o isolamento do cDNA completo correspondente ao gene nocauteado no mutante redA, fizemos a varredura de uma biblioteca de cDNA de células da fase de crescimento de *D. discoideum* construída no vetor IZAP (Stratagene). Como sonda utilizamos o fragmento de DNA de 1,8 kbp correspondente ao gene nocauteado excisado do plasmídeo ptf70 pela sua digestão com as enzimas *Sma*I e *Hind*III (figuras 3A e 4).

Como descrito anteriormente (item 3.5.), o plasmídeo ptf70 (clone out do mutante redA) foi resgatado pela digestão do DNA cromossomal do mutante redA com a enzima *Hind*III e o seqüenciamento parcial do gene que foi nocauteado neste mutante revelou que ele deveria codificar uma proteína com similaridade significativa com as enzimas NADPH citocromo P450 redutase (NCPR) e de óxido nítrico sintase (NOS). Esta seqüência foi registrada pelo Dr. William Loomis no GenBank com número de acesso AF012946. Ao analisarmos esta seqüência

verificamos que provavelmente se tratava do gene da NCPR, porém ela não continha a porção que codifica o carboxiterminal desta enzima, revelando que o processo de excisão do gene mutado (clone out) não permitiu a recuperação completa do gene interrompido pela técnica de REMI, justificando assim a clonagem completa do cDNA da NCPR.

Após varredura terciária da biblioteca, isolamos 20 clones comprovadamente positivos e puros (dados não mostrados). Os cDNAs clonados foram então recuperados no vetor pBluescriptS/K após conversão dos bacteriófagos para a forma plasmidial e as seqüências das suas extremidades 5' e 3' foram determinadas, revelando que todos eram relativos à NCPR de *D. discoideum*. O clone contendo o cDNA de maior tamanho foi escolhido para determinação completa da sua seqüência em ambas as fitas e foi denominado pBS_DdNCPR (observado na figura 3B e figura 5, canaleta 1).

A figura 9 mostra a seqüência de bases do cDNA DdNCPR de 2094 pb que possui uma fase aberta de leitura completa codificando uma proteína de 631 aminoácidos, além de seqüências não traduzidas tanto na extremidade 5' como 3'. A massa molecular calculada para a proteína codificada pelo cDNA DdNCPR é 71.146,49 enquanto o pl teórico corresponde a 6,22. Utilizamos diferentes programas na tentativa de identificar a existência do peptídeo sinal aminoterminal desta proteína. Contudo, apenas o programa Signal P (Nielsen et al., 1997) identificou a existência de um peptídeo sinal hidrofóbico (aminoácidos 1 a 20), que indica alguma característica peculiar de seqüências deste tipo em proteínas de *D. discoideum*. A presença deste segmento hidrofóbico sugere que a NCPR de *D. discoideum* esteja ancorada a membrana do retículo endoplasmático, ainda que o segmento N-terminal hidrofóbico de NCPRs de outros organismos tenha aproximadamente 56 aminoácidos (Black et al., 1982; Wang et al., 1997).

Como esperado, a seqüência deste cDNA apresenta identidade com a seqüência do clone out do mutante redA (GenBank AF012946), exceto pelos fatos de que o cDNA que isolamos possui a extremidade 3' intacta, ao contrário do clone out redA originalmente isolado, e de que a seqüência originalmente

depositada tem um erro que acarreta uma mudança de fase de leitura, como mostra o alinhamento (figura 10).

Recentemente, seqüências parciais de cDNAs que apresentam identidade com regiões do cDNA da NCPR de *D. discoideum* foram depositadas no GenBank. Estas seqüências de tamanho entre 400-600pb (números de acesso no GenBank AU269939, AU269938 e BJ440107) são oriundas do projeto de seqüenciamento de ESTs (Expressed Sequence Tags) de *D. discoideum* que está sendo realizado por grupos japoneses no Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba e no Center For Genetic Resource Information no National Institute of Genetics.

A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida do cDNA DdNCPR com seqüências depositadas no GenBank confirmou que ele codifica uma proteína com 31% de identidade e 50% de similaridade com a NCPR humana. A figura 11 mostra o alinhamento da seqüência da aminoácidos da NCPR de *D. discoideum* com NCPRs de outros organismos, demonstrando a significativa conservação desta enzima evolutivamente. A análise deste alinhamento nos permitiu identificação dos domínios funcionais envolvidos na ligação dos cofatores FMN, FAD, do NADPH e na ligação com o citocromo P450, que também estão conservados na NCPR de *D. discoideum*.

Como já mencionamos, os domínios de ligação para a NADPH, FAD e FMN são conservados nas diferentes NCPRs, sendo que possivelmente este domínios tenham sido originados da fusão dos genes de duas flavoproteínas ancestrais (Porter & Kasper, 1986; Smith et al., 1994; Hall et al., 2001).

As três regiões designadas FMN1, FMN2 e FMN3 (indicadas na figura 11) são identificadas como domínios de ligação ao FMN (van den Brink et al., 1995; Sem & Kasper, 1998; Yadav & Loper, 2000) a partir da análise do alinhamento múltiplo de NCPRs conhecidas. O quarto resíduo de aminoácido na região consenso FMN é uma treonina em *D. discoideum* semelhante ao encontrado em plantas, embora uma serina seja encontrada em fungos e animais.

Como também indicado na figura 11, os três domínios de ligação ao FAD (FAD1, FAD2 e FAD3, van den Brink et al., 1995; Yadav & Loper, 2000) são

aparentemente conservados na NCPR de *D. discoideum*. Vale ressaltar que a seqüência G-D-H (posições 284-286, na DdNCPR), aceita como assinatura do domínio FAD1, corresponde em *D. discoideum* a G-D-A. No domínio FAD2 da DdNCPR o motivo P/A-R-Y-Y-S-I-S/A-S-x (resíduos 417-426) é conservado. O mesmo é observado para o motivo G-V/I-x-T/S-N/T (resíduos 451-455) do domínio FAD3.

As três regiões de ligação ao NADPH (NADPH1, NADPH2 e NADPH3) com suas distintas características estruturais também estão presentes na NCPR de *D. discoideum*. A região NADPH2 (posições 548-563) contém os três resíduos (Ser-550, Arg-551 e Lys-556) que estão envolvidos na ligação da enzima ao fosfato do NADP e são características de proteínas que ligam NADPH e não NADH. Foi proposto que a Arg-551 é crítica na distinção entre NADPH e NADH (Sem & Kasper, 1993, Shen et al., 1999).

Através de estudos utilizando mutações sítio-dirigidas na NCPR de ratos foi sugerido o envolvimento de duas regiões consenso na ligação ao citocromo P450, P450 1 e P450 2, como indicado na figura 11 (Shen & Kasper, 1995). Estas regiões podem ser observadas na seqüência da NCPR de *Dictyostelium* ressaltando a presença de aminoácidos ácidos na região P450 1 (resíduos 103-119), sendo que o resíduo de ácido aspártico (Asp 108) é conservado na NCPR de todos os organismos onde gene codificador desta enzima já foi isolado.

A região carboxiterminal da NCPR apresenta um motivo conservado G/K/N-R-Y-x-x-D-V/T-W, que também está presente na NCPR de *D. discoideum* (resíduos 623 a 630). NCPRs de algumas espécies possuem um resíduo de serina adicional em seu carboxiterminal, como metazoários e em alguns fungos filamentosos (*A. niger*, por exemplo). Contudo, este resíduo está ausente em leveduras e plantas e é substituído por um resíduo de fenilalanina em *D. discoideum* (figura 11).

```

ttttttttgttaaattttaaaataaaatgaaatcagtaattttaaaaccaaaaaat
M K S V I L K P K N
ttagtattattaggtgctggtgtaacaacaacttattatttatataaaatttttttcagca
L V L L G A G V T T T Y Y L Y K F F S A
ccatcagtttcaaaagatgaaggtgataaatttggatttaatgcaccagatccagcagct
P S V S K D E G D K F G F N A P D P A A
ttagctagagcagctgttaaagagaaaaaagaaagatttgtaaaacatcagataatggt
L A R A A V K E K K E R F V K P S D N V
tgtccaattttaatttttatatggaactgaatatggtttatcagcagaggttgccaaaaaa
C P I L I L Y G T E Y G L S A E V A K K
ttggaagaatcaatcaatagcaaatagaaggtttttgggcacgtattatcgataatggaa
L E E S I N S K L E G F W A R I I D M E
gagtacgagattattgaatttgaaaaagaacaaatagtcctcattattacatcaacctat
E Y E I I E F E K E Q I V L I I T S T Y
ggtgatggtgtttccaccaaccactgcccgtccattctttgattatttagaagcaaatcgt
G D G V P P T T A R P F F D Y L E A N R
ttaaactctttcacatattcaatttagtgttttagcattgggtgatcggttttatccacat
L N L S H I Q F S V L A L G D R S Y P H
tatgtgagcgtgtgtaaaacttttgataaacaatttgaagagatgggtgccaagagattt
Y C A A G K T L D K Q F E E M G A K R F
agagatcgattgaagttgatcaagaagattggacttgtttcgatcggttatattgatacc
R D R I E V D Q E D W T C F D R Y I D T
gtgtgtggttttagttccaacttgggtggagttgaaaaacgtgaagggtcaagattacctc
V C G L V P T L G G V E K R E G Q D Y L
tatgaaaaggcaaaacttttcgcactctctcaaggtaaatacaataaaaaaagaaaccatac
Y E K A K L F A L S Q G K Y N K K K P Y
tctagtaaaactcttggttaaactgtgtactcactaaagggtgataaagggtgatttcattta
S S K L L V K R V L T K G D K V G I H L
gagtttgaattgggtgatagtgaactcaagtacgtgccaggtgatgcttttagctatcctt
E F E L G D S E L K Y V P G D A L A I L
ccagataatgctgcacccgaggtttctgcaattatctcactcttaaaattatcacatctc
P D N A A S E V S A I I S L L K L S P S
ttcaaagtttcaactccaggttggcattatcaagaggggtgaacaaccaaatccatctcaa
F K V S T P G W H Y Q E G E Q P N P S Q
atcaccttactcatatcttaaccaaattgttttgatattcataattgtaaaccagaatta
I T L T H I L T K C F D I H N C K P E L
ttacaactccttaaagataaatgttaaaaatcaacaagaaaaagagaaattaacaaatctc
L Q L L K D N V K N Q Q E K E K L T N L
ttggctcaagggtactggttaaatcaataacacaattggttgaatttttagaaaaatcatcat
L A Q G T G K S N T Q L V E F L E N H
ttaatcgatatcttaaagatgttttcttctgctcgtccaccaatcgatgatttattagct
L I D I L K M F S S A R P P I D D L L A
caattagcaaaattattaccacgttactatagtattgcttcttcaatgagtgaataaaa
Q L A K L L P R Y Y S I A S S M S E N K
ttggcagtttcttatgtgttgccgttgttaaatatgatcttcatggttagtgaacgtggt
L A V S L C V A V V K Y D L H G S E R V
ggtatcgcttcaactcatatggccgatcgatgaatggttggtgatcggtgttcaatcttt
G I A S T H M A D R M N V G D R V S I F
ataaacaataatccagatttccgtttaccagaggatccaacaactccaatactcatggtt
I N N N P D F R L P E D P T T P I L M V
ggtccaggtactggtattgctccattcggttagtttcattcaagaaagaaaagcactcggt
G P G T G I A P F V S F I Q E R K A L G
catactggtgaaaatcatctctatttttggttgctgctggtctgatgaagatttcttttac
H T G E N H L Y F G C R R S D E D F L Y
tccaaagagttacaacaatatcataacgatggtttaattaaactctacactgctttctct
S K E L Q Q Y H N D G L I K L Y T A F S
cgtgaaacctctcaaaaagtttacgttcaaaaatcgctctccttgaaaatagtcaacaaatt
R E T S Q K V Y V Q N R L L E N S Q Q I
tgtgatctcatcaatgctggtggtcatatttacatttgggtgatgctaaatcaatggct
C D L I N A G G H I Y I C G D A K S M A
ccacaagttcatgaacactttctctcatcatcactaaacatatgtcaattgatgaagct
P Q V H E T L S L I I T K H M S I D E A
gatgctcaagctttacttcacaaattagaaaaagaaaaacggttatcaaaaagatgtttgg
D A Q A L L H K L E K E K R Y Q K D V W
ttttaaatttttaattttaaaaaataaaaaaaacaaaaaaatatgttttttttttaa
F
aagttaaaaattttatattaaaaataaaataaaattgcaattaaacaaaataaaatattttc
ttttaaaaataaagattttaaaataaaatataattataaaacaaaaaaacaaaaaa

```

2094

Figura 9: Seqüência completa do cDNA do clone pBS_DdNCPR. Os prováveis códons de iniciação e terminação estão sublinhados. A seqüência de aminoácidos deduzida da porção codificadora também está apresentada. O número total de bases está indicado à direita. A seqüência do cDNA DdNCPR será oportunamente depositada no *GenBank*.


```

DdNCPR
redA      -----
          NNANNAATATTATTTGTGAGCCAAAAAATAATGATTGGATATTTTTTTTTTTTTTTT

DdNCPR
redA      -----
          AATTATTTTGTAAAACCAAATAAAATAAAATTTTGTGAAAAAAATTTTATTTTAT

DdNCPR
redA      -----
          TTTTAATTTTATTTTAATTTTTTTTTTTTTTCTACTAAAAGTGATCAAAATGATCACGAAT

DdNCPR
redA      -----
          CCCAAAGATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAAGTTTCGTTTGTGTTTT

DdNCPR
redA      -----
          TTAATAAAAACTATTATTATAAATAATTTAGTTGTTGTATTTTAAAAAATAAAAAA

DdNCPR
redA      -----TTTTTTTTGTAAATTTTAAAAATAAAATGAAA
          AAAAAATATCTAATCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAAATTTTAAAAATAAAATGAAA
                      *****

DdNCPR
redA      TCAGTAATTTTAAAACCAAAAAATTTAGTATTATTAGGTGCTGGTGTAACAACAACCTTAT
          TCAGTAATTTTAAAACCAAAAAATTTAGTATTATTAGGTGCTGGTGTAACAACAACCTTAT
          *****

DdNCPR
redA      TATTTATATAAAATTTTTTTCAGCACCATCAGTTTCAAAAGATGAAGGTGATAAAATTTGGA
          TATTTATATAAAATTTTTTTCAGCACCATCAGTTTCAAAAGATGAAGGTGATAAAATTTGGA
          *****

DdNCPR
redA      TTTAATGCACCAGATCCAGCAGCTTTAGCTAGAGCAGCTGTAAAGAGAAAAAGAAAGA
          TTTAATGCACCAGATCCAGCAGCTTTAGCTAGAGCAGCTGTAAAGAGAAAAAGAAAGA
          *****

DdNCPR
redA      TTTGTAAAACCATCAGATAATGTTTGTCCAATTTAATTTTATATGGAACCTGAATATGGT
          TTTGTAAAACCATCAGATAATGTTTGTCCAATTTAATTTTATATGGAACCTGAATATGGT
          *****

DdNCPR
redA      TTATCAGCAGAGGTTGCCAAAAAATTTGAAGAATCAATCAATAGCAAATTAGAAGGTTTT
          TTATCAGCAGAGGTTGCCAAAAAATTTGAAGAATCAATCAATAGCAAATTAGAAGGTTTT
          *****

DdNCPR
redA      TGGGCACGTATTATCGATATGGAAGAGTACGAGATTATTGAATTTGAAAAAGAACAAATA
          TGGGCACGTATTATCGATATGGAAGAGTACGAGATTATTGAATTTGAAAAAGAACAAATA
          *****

DdNCPR
redA      GTCCTCATTATTACATCAACCTATGGTGATGGTGTTCACCAACCACTGCCCGTCCATTC
          GTCCTCATTATTACATCAACCTATGGTGATGGTGTTCACCAACCACTGCCCGTCCATTC
          *****

DdNCPR
redA      TTTGATTATTTAGAAGCAAATCGTTTAAATCTTTCACATATTCAATTTAGTGTTTAGCA
          TTTGATTATTTAGAAGCAAATCGTTTAAATCTTTCACATATTCAATTTAGTGTTTAGCA
          *****

DdNCPR
redA      TTGGGTGATCGTTCTTATCCACATTATTGTGCAGCTGGTAAAACTTTGGATAAAACAATTT
          TTGGGTGATCGTTCTTATCCACATTATTGTGCAGCTGGTAAAACTTTGGATAAAACAATTT
          *****

DdNCPR
redA      GAAGAGATGGGTGCCAAGAGATTAGAGATCGTATTGAAGTTGATCAAGAAGATTGGACT
          GAAGAGATGGGTGCCAAGAGATTAGAGATCGTATTGAAGTTGATCAAGAAGATTGGACT
          *****

DdNCPR
redA      TGTTCGATCGTTATATTGATACCGTGTGTGGTTAGTTCCAACATTGGGTGGAGTTGAA
          TGTTCGATCGTTATATTGATACCGTGTGTGGTTAGTTCCAACATTGGGTGGAGTTGAA
          *****

DdNCPR
redA      AAACGTGAAGGTCAAGATTACCTCTATGAAAAGGCAAACTTTTCGCACTCTCTCAAGGT
          AAACGTGAAGGTCAAGATTACCTCTATGAAAAGGCAAACTTTTCGCACTCTCTCAAGGT
          *****

DdNCPR
redA      AAATACAATAAAAAGAAACCATACTCTAGTAAACTCTTGGTTAAACGTGTACTCACTAAA
          AAATACAATAAAAAGAAACCATACTCTAGTAAACTCTTGGTTAAACGTGTACTCACTAAA
          *****

DdNCPR
redA      GGTGATAAAGTTGGTATTCATTTAGAGTTGAATGGGTGATAGTGAACCTCAAGTACGTG
          GGTGATAAAGTTGGTATTCATTTAGAGTTGAATGGGTGATAGTGAACCTCAAGTACGTG
          *****

DdNCPR
redA      CCAGGTGATGCTTTAGCTATCCTTCCAGATAATGCTGCATCCGAGGTTTCTGCAATTATC
          CCAGGTGATGCTTTAGCTATCCTTCCAGATAATGCTGCATCCGAGGTTTCTGCAATTATC
          *****

DdNCPR
redA      TCACTCTTAAAAATTATCACCATCTTTCAAAGTTTCAACTCCAGGTTGGCATTATCAAGAG
          TCACTCTTAAAAATTATCACCATCTTTCAAAGTTTCAACTCCAGGTTGGCATTATCAAGAG
          *****

```

Figura 10...

DdNCPR	GGTGAACAACCAAATCCATCTCAAATCACCTTACTCATATCTTAACCAAATGTTTGGAT
redA	GGTGAACAACCAAATCCATCTCAAATCACCTTACTCATATCTTAACCAAATGTTTGGAT

DdNCPR	ATTCATAATTGTAAACCAGAATTATTACAACCTCTTAAAGATAATGTTAAAAATCAACAA
redA	ATTCATAATTGTAAACCAGAATTATTACAACCTCTTAAAGATAATGTTAAAAATCAACAA

DdNCPR	GAAAAAGAGAAATTAACAAATCTCTGGCTCAAGGTACTGGTAAATCAAATACACAATTG
redA	GAAAAAGAGAAATTAACAAATCTCTGGCTCAAGGTACTGGTAAATCAAATACACAATTG

DdNCPR	GTTGAATTTTGTAGAAATCATCATTTAATCGATATCTTAAAGATGTTTCTTCTGCTCGT
redA	GTTGAATTTTGTAGAAATCATCATTTAATCGATATCTTAAAGATGTTTCTTCTGCTCGT

DdNCPR	CCACCAATCGATGATTTATTAGCTCAATTAGCAAAATTATTACCACGTTACTATAGTATT
redA	CCACCAATCGATGATTTATTAGCTCAATTAGCAAAATTATTACCACGTTACTATAGTATT

DdNCPR	GCTTCTTCAATGAGTGAAAAATAATTGGCAGTTTCCTTATGTGTGCGGTGTTAAATAT
redA	GCTTCTTCAATGAGTGAAAAATAATTGGCAGTTTCCTTATGTGTGCGGTGTTAAATAT

DdNCPR	GATCTTCATGGTAGTGAAACGTGTGGTATCGCTTCAACTCATATGGCCGATCGTATGAAT
redA	GATCTTCATGGTAGTGAAACGTGTGGTATCGCTTCAACTCATATGGCCGATCGTATGAAT

DdNCPR	GTTGGTGATCGTGTTCATCTTTATAAACAATAATCCAGATTTCGGTTTACCAGAGGAT
redA	GTTGGTGATCGTGTTCATCTTTATAAACAATAATCCAGATTTCGGTTTACCAGAGGAT

DdNCPR	CCAACAACCTCCAATACTCATGGTTGGTCCAGGTACTGGTATTGCTCCATTCGTTAGTTTC
redA	CCAACAACCTCCAATACTCATGGTTGGTCCAGGTACTGGTATTGCTCCATTCGTTAGTTTC

DdNCPR	ATTCAAGAAAGAAAGCACTCGGTCATACTGGTGAAATCATCTCTATTTTGGTTGTCTGT
redA	ATTCAAGAAAGAAAGCACTCGGTCATACTGGTGAAATCATCTCTATTTTGGTTGTCTGT

DdNCPR	CGTTCTGATGAAGATTTCCTTTACTCCAAAGAGTTACAACAATATCATAACGATGGTTTA
redA	CGTTCTGATGAAGATTTCCTTTACTCCAAAGAGTTACAACAATATCATAACGATGGTTTA

DdNCPR	ATTAAACTCTACACTGCTTTCTCTCGTGAAACCTCTCAAAAAGTTTACGTTCAAATCGT
redA	ATTAAACTCTACACTGCTTTCTCTCGTGAAACCTCTCAAAAAGTTTACGTTCAAATCGT

DdNCPR	CTCCTTGAAAATAGTCAACAAATTGTGATCTCATCAATGCTGGTGGTCATATTACATT
redA	CTCCTTGAAAATAGTCAACAAATTGTGATCTCATCAATGCTGGTGGTCATATTACATT

DdNCPR	TGTGGTGATGCTAAATCAATGGCTCCACAAGTTCATGAAACACTTTCTCTCATCATCACT
redA	TGTGGTGATGCTAAATCAATGGCTCCACAAGTTCATGAAACACTTTCTCTCATCATCACT

DdNCPR	AAACATATGTCAATTGATGAAGCTGATGCTCAAGCTTTACTTCACAAATTAGAAAAAGAA
redA	AAACATATGTCAATTGATGAAGCTGATGCTCAAGCTT-----

DdNCPR	AAACGTTATCAAAAAGATGTTTGGTTTAAATTTAAATTTTAAAAAATAAAAAAAAC
redA	-----
DdNCPR	AAAAAAATATGTTTTTTTTTAAAAAGTTAAAAATTTATATTAATAAATAAAATTGC
redA	-----
DdNCPR	AATTAACAAAATAAAATATTTTCTTTTAAATAAAGATTTAAATAAAATATAATTATA
redA	-----
DdNCPR	AAACAAAAAATAAAAAA
redA	-----

Figura 10. Alinhamento da sequência do cDNA para NCPR de *Dictyostelium* (DdNCPR; 2094bp) e o gene redA (redA, 2196bp GeneBank AF012946). As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W. O erro verificado na seqüência depositada no GenBank está sombreado. Os códons de iniciação e terminação estão sublinhados.

Homo	-----MGDSHVDTSSTVSEAV-----AEEVSLFSMTDMILFSLIVGLLTYWFLFRKKK	48			
Mouse	-----MGDSHEDTSATVPEAV-----AEEVSLFSTTDIVLFLSLIVGLVLTYYWFIKKKK	48			
Drosophila	-----MASEQTIDGAAAIIPSGG-----GDEP-FLGLLDVALLAVLIGGVTFYFLRTRKK	48			
Arabidopsis	MSSSSSSSTSMIDLMAAIKKEPVIIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSI	60			
Saccharomyces	-----MPFGIDNTDFTVLAGLVLAALLVYKRNISK	30			
Dictyostelium	-----MKSIVLKPKNLVLLGAGVTTTYYLYKFFSAP	31			
	: . :				
	FMN1				
Homo	EEVP----EFTKIQTLTSSVRESSFVEKMK-----KTGRN-IIVFYGSQTGTAE	92			
Mouse	EEIP----EFSKIQTAPPVKESFVEKMK-----KTGRN-IIVFYGSQTGTAE	92			
Drosophila	EEEETRSYSIQPTTVCTTSASDNSFIKKLK-----ASGRS-LVVFYGSQTGTGE	96			
Arabidopsis	AVLIG--CIVMLVWRRSGSGNSKVEPLKPLVIKPREEEIDDGRKKVTIFFGTGTGTAE	117			
Saccharomyces	ELLSMS---DDGDIATVSSGNRDIAQVV TEN-----NKNYLVLVYASQTGTAE	73			
Dictyostelium	SVSKDEGDKFGFNAPDPAALARAFAVKEKKEKRFVKP-----SDNVCPILILYGTGYGLSA	85			
	. : : : : *				
	<table> <tr> <th>FMN1</th><th>P450 1</th><th>FMN2</th></tr> </table>		FMN1	P450 1	FMN2
FMN1	P450 1	FMN2			
Homo	EFANRLSKDAHRYGMRG--MSADPEEYDLADLSSLPEIDN-ALVVFCMATYEGGDPTDNA	149			
Mouse	EFANRLSKDAHRYGMRG--MSADPEEYDLADLSSLPEIDK-SLVVFCMATYEGGDPTDNA	149			
Drosophila	EFAGRLAKEGIRYRLKG--MVADPEECDMEELLQLKDTDN-SLAVFCLATYEGGDPTDNA	153			
Arabidopsis	GFAKALGEEAKARYEKTRFKIVDLDDYAADDDEYEELKKEDVAFFFLATYGDGEPTDNA	177			
Saccharomyces	DYAKKFSKELVAKFNLN-VMCADVENYDFESLNDVPVIVS-----IFISTYEGGDFPDGA	127			
Dictyostelium	EVAKKLEESINSKLEGFWARIIDMEEYEIIEFEKE-----QIVLIITSTYGDGVPPTTA	139			
	* : : . * : . : : * : *				
	FMN3				
Homo	QDFYDWLQETDVD---LSGVKFAVFGGLGNKTYEHFNAMGKYVDKRLEQLGAQRIFELGLG	206			
Mouse	QDFYDWLQETDVD---LTGVKFAVFGGLGNKTYEHFNAMGKYVDQRLEQLGAQRIFELGLG	206			
Drosophila	MEFYEWITSGDVD---LSGLNYAVFGLGNKTYEHYNKVAIYVDKRLEELGANRVFLGLG	210			
Arabidopsis	ARFYKWFTGNDRGEWLKNLKYGVFGLGNRQYEHFNKVAKVDDILVEQQAQRLVQVGLG	237			
Saccharomyces	VNFEDFICNAEAG--ALSNLRYNMFGLNSTYEFNGAAKKAEEKHLSAAGAIRLGLKLEA	185			
Dictyostelium	RPFFDYLEANRLN--LSHTIQFSVLALGDRSYPHYCAAGKTLDKQFEEMGAKRFRDRIEV	196			
	* . : : * . : : : . * : . : : * * * .				
	P450 2				
Homo	DD-DGNLEEDFITWREQFWPAVCEHFGVEATGEESSIRQYELVVHTDIDAQVYMGEMGR	265			
Mouse	DD-DGNLEEDFITWREQFWPAVCEHFGVEATGEESSIRQYELVVHEDMDTAKVYTGEEMGR	265			
Drosophila	DD-DANIEDDFITWKDRFWPAVCDHFGIEGGGEEVLIRQYRLLEQPDVQPDRIYTGGEIAR	269			
Arabidopsis	DD-DQCIEDDFTAWREALWPELDTILREEGDTAVATPYTAADVLYRVSIDHSEDAKFNDI	296			
Saccharomyces	DDGAGTTDEDYMAWKDSILEVLKDELHLDEQEAQFTSQFYQTVLNEITDSMSLGEPSAHY	245			
Dictyostelium	DQEDWTCFDRIYIDTVCGLVPTLGVEKREGQD-----YLYEKAK	235			
	* : : : : : :				
	FAD1				
Homo	LKSYENQK-----PPFDAKNPFLAAVTTNRKLNQ-GTERHLMHLELDISDSKIRYESG	317			
Mouse	LKSYENQK-----PPFDAKNPFLAAVTTNRKLNQ-GTERHLMHLELDISDSKIRYESG	317			
Drosophila	LHSIQNQK-----PPFDAKNPFLAPIKVNRELHK-GGGRSCMHIELSIEGSKMRYDAG	321			
Arabidopsis	TLANGNGY-----TVFDAQHPYKANVAVKRELHTPESDRSCIHLEFDIAGSGLTMKLG	349			
Saccharomyces	LPSHQLNRNADGIQLGPFDLSPQYIPIVKSRELFS-SNDRNCIHSEFDLSGSNLIKYSTG	304			
Dictyostelium	LFALSQGK-----YNKKKPYSSKLLVKRVLTG--GDKVGIHLEFELGDSSELKYVPG	284			
	: : : . * : : * * : : *				
	<table> <tr> <th>FMN1</th><th>P450 1</th><th>FMN2</th></tr> </table>		FMN1	P450 1	FMN2
FMN1	P450 1	FMN2			
Homo	DHVAVYPANDSALVNQLGKILGADLDVVMSSLNNLDEE-----SNKKHPFPCPTSYRTALT	372			
Mouse	DHVAVYPANDSTLVNQIGEILGADLDVIMSSLNNLDEE-----SNKKHPFPCPTTYRTALT	372			
Drosophila	DHVAMFPVNDKSLVEKLGQLCNADLDTVFLINTD TD-----SSKKHPFPCPTTYRTALT	376			
Arabidopsis	DHVGVLCDNLSETVDEALRLDMSPD TYFSLHAEKEDGTPISSSLPPPPF-PCNLRTALT	408			
Saccharomyces	DHLAVWPSNPLEKVEQFLSIFNLDPETIFDLKPLDPT-----VKVPFPTPTTIGAAIK	357			
Dictyostelium	DALAILPDNAASEVSAIISLLKLSFSFKVSTPGWHYQ-----EGEQPNPSQITLTHILT	338			
	* . : : * * : : * * . :				

Figura 11...

Homo	YYLDITNPRTNVLYELAQYASEPSEQEELLRKMASSSGEGKELYLSWVVEARRHILAILQ	432
Mouse	YYLDITNPRTNVLYELAQYASEPSEQEHLHKMASSSGEGKELYLSWVVEARRHILAILQ	432
Drosophila	HYLEITAIPTTHILKELAEYCTDEKEKELRSMASISPEGKEKYQSWIQDACRNIHVHILE	436
Arabidopsis	RYACLLSSPKKSALVALAAHASDPTAEERLKHLS--PAGKDEYSKWVVESQRSLLLEVMA	466
Saccharomyces	HYLEITGPVSRQLFSSLIQFAPNADVKEKLTLLSKDKDQFAVEITSKYFNIADALKYLS	417
Dictyostelium	KCFDIHN-CKPELLQLLDNVKNQQEKEKLTNLLAQGTGKSNTQLVEFLEN-HHLIDILK	396
	: : * : * * . : : :	
	FAD2	
Homo	DCPSLRPPIDHLC-LLPRLQARYYSIASSSKVHPNSVHICAVVVEYETK---AGRINKG	488
Mouse	DYPSLRPPIDHLC-LLPRLQARYYSIASSSKVHPNSVHICAVAVEYEAK---SGRVNKG	488
Drosophila	DIKSCRPPIDHVCE-LLPRLQPRYYSISSAKLHPTDVHVTAVLVEYKTP---TGRINKG	492
Arabidopsis	EFPSAKPPLGVFFAGVAPRLQPRFYSISSSPKIAETRIHVTCALVYEKMP---TGRIRHK	523
Saccharomyces	GAKWDTVPMQFLVE-SVPQMTPRYYSISSSSLSEKQTVHVTISIVENFPNPDPDAPPVVG	476
Dictyostelium	MFSSARPPIDDLA-QLAKLLPRYYSIASSMSENKLAVSLCVAVVKYDLH---GSEVRG	451
	: . .:: .:***:** : :	
	FAD3 NADPH1	
Homo	VATNWLRAKEP-----AGENGGRALVPMFVRKS-QFRLPFKATTP	527
Mouse	VATSWLRTKEP-----AGENGRRALVPMFVRKS-QFRLPFKPTTP	527
Drosophila	VATTYLKNKQP-----QGSE--EVKVPVFIRKS-QFRLPTKPEP	529
Arabidopsis	VCSTWMKNAPVY-----EKSEKFLGRPIFVRQS-NFKLPSPDSKVP	563
Saccharomyces	VTTNLLRNIIQLAQNNVNIAETNLPVHYDLNGPRKLFANYKLPVHVRRS-NFRLPSNPSTP	535
Dictyostelium	IASTHMADRMN-----VGDRVSI FINNNPDFRLPEDPTTP	486
	: : : .:::.. :*** .. *	
Homo	VIMVGPGTGVAPFIGFIQERAWLRQQKE-----VGETLLYYGCRRSDEDYLYREELAQ	581
Mouse	VIMVGPGTGVAPFMGFIQERAWLRQQKE-----VGETLLYYGCRRSDEDYLYREELAR	581
Drosophila	IIMVGPGTGLAPFRGFIQERQFLRDEGKT-----VGESILYFGCRKRSEDIYIESELEE	583
Arabidopsis	IIMIGPGTGLAPFRGFLQERLALVESGVE-----LGPSVLFFGCRNRRMDFIYEELQR	617
Saccharomyces	VIMIGPGTGVAPFRGFIREVAFLESQKKGGNNVSLGKHILFYGSRN-TDDFLYQDEWPE	594
Dictyostelium	ILMVGPGTGIAPFVSFIQERKALGHTGEN-----HLYFGCRRSDEDFLYSKELQQ	536
	::*:***:*** .:::** : . *::*,* .::* .*	
	NADPH2 NADPH3	
Homo	FHR--DGALTQLNVAFSREQSHKVYVQHLLKQDREHLWKLI-EGGAHIYVCGDARNMARD	638
Mouse	FKH--DGALTQLNVAFSREQAHKVYVQHLLKRDKEHLWKLIHEGGAHIYVCGDARNMAKD	639
Drosophila	WVK--KGTLN-LKAAFSRDQGVVYVQHLEQDADLIWNVIGENKGFYICGDAKNMAVD	640
Arabidopsis	FVE--SGALAELSVAFSREGPTKEVYVQHKKMMDKASDIWNMISQ-AYLYVCGDAKGMARD	674
Saccharomyces	YAKKLDGSFEMVVAHSRLPNTKKVYVQDKLDYEDQVFEMINNG-AFIYVCGDAKGMMAQ	653
Dictyostelium	YHN--DGLIKLYTAFSRETSQKVYVQNRLLENSQQICDLINAG-GHIYICGDAKSMAPQ	592
	: . : : . * ** . : : .:* . .:***:***	
Homo	VQNTFYDIVAELGAMEHAQAVDYIKKLMTKGRYSLDVWS	677
Mouse	VQNTFYDIVAEFGPMEHTQAVDYVKKLMTKGRYSLDVWS	678
Drosophila	VRNIVKILSTKGNMSEADAVQYIKKMEAQKRYSDVWS	679
Arabidopsis	VHRSLHTIAQEQGSMDSTKAEGFVKNLQTSGRYLQDVW-	712
Saccharomyces	VSTALVGILSRGKSITTEATELIKMLKTSGRYQEDVW-	691
Dictyostelium	VHETLSLIITKHMSIDEADAQALLHKLEKEKRYQKDVWF	631
	* : * : .* :: : . ** **	

Figura 11. Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas para algumas NCPRs. Alinhamento das seqüências de cDNA para NCPRs de: *Dictyostelium discoideum* (Dictyostelium DdNCPR), *Homo sapiens* (Homo, P16435), *Mus musculus* (Mouse, P37040), *D. melanogaster* (Drosophila, CAA63639.1), *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis, CAB58576.1), *S. cerevisiae* (Saccharomyces, P16603) com seus respectivos números de acesso no GenBank. As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W. (*) indica resíduos idênticos, (:) indica substituição conservativa e (.) indica substituição semi-conservativa. Os domínios conservados descritos no texto estão indicados.

4.2. Determinação do número de cópias do gene da NCPR de *D. discoideum*

Para investigarmos o número de cópias do gene da NCPR no genoma de *Dictyostelium*, o DNA total de células vegetativas foi purificado e submetido a digestão com diferentes enzimas de restrição para subsequente hibridização, através da técnica de *Southern blot*, tanto com uma sonda derivada do cDNA completo da DdNCPR como com uma sonda derivada de um fragmento interno de 855 pb (NCPR1) deste cDNA (figura 12A). Foram utilizadas tanto enzimas com sítios de clivagens preditos na sequência do cDNA DdNCPR (*HincII*, *EcoRV*, *BamHI* e *HindIII*, sítios únicos e *Clal*, três sítios) como enzimas que supostamente não clivam o cDNA (*EcoRI*, *BglII*, *SstI*, *SmaI*, *XhoI* e *KpnI*). A figura 12A apresenta um esquema da posição relativa de alguns sítios de restrição encontrados no cDNA DdNCPR.

Inicialmente, hibridizamos o *Southern blot* preparado a partir do DNA digerido com enzimas *Clal*, *HincII* e *EcoRV* ou com algumas das enzimas que não clivam o cDNA (figura 13A) com uma sonda preparada a partir do cDNA completo da DdNCPR. A análise do padrão de bandas obtida com a digestão das enzimas *HincII* e *EcoRV* (sítios únicos no gene e que, portanto, levariam ao aparecimento de duas bandas) sugere a existência de uma única cópia para o gene da NCPR. Na canaleta correspondente à digestão com *Clal* deveríamos observar, além do fragmento maior, um fragmento de 855 bp (figura 13A, canaletas 1 a 3). Contudo, neste gel este fragmento foi perdido, devido a um tempo maior de eletroforese.

Como esperado, a digestão com enzimas *EcoRI*, *BglII*, *SstI* e *XhoI*, que supostamente não clivam o cDNA DdNCPR (figura 13A, canaletas 4 a 7 e canaleta 9) não mostrou bandas de tamanho menor que o cDNA. Porém o aparecimento de três bandas sugere que a digestão do DNA com estas enzimas não foi completa, ou que eventualmente teríamos outras cópias do gene da NCPR. Esta última hipótese parece não ser correta, visto que a digestão do DNA com a combinação das enzimas *EcoRI* e *XhoI* resultou no aparecimento de apenas um fragmento de 5 kb que foi reconhecido pela sonda utilizada (figura 13A, canaleta 8).

O blot mostrado na figura 13A foi lavado para retirada da sonda correspondente ao cDNA DdNCPR completo e em seguida hibridizado com a sonda de 855 pb (NCPR1). Esta sonda corresponde a um segmento localizado entre dois sítios *Clal* na região de 347 pb até 1202 pb do cDNA DdNCPR (figura 12A) e compreende uma parte da região de ligação de FMN e FAD e, portanto, seria mais específica na detecção do gene de NCPR. Esta sonda foi utilizada na tentativa de eliminar ou minimizar a possibilidade de hibridização cruzada com seqüências de genes que possuem domínios similares ao do gene da NCPR, isto é, que apresentam grupamento FAD/NADPH. Como esperado, esta sonda não hibridizou com o fragmento de maior tamanho resultante da digestão do DNA com *Clal* (figura 13B, canaleta 1). Contudo, como esta nova sonda deveria hibridizar apenas com a região entre 347 e 1202 do gene da NCPR, não esperávamos o aparecimento de duas bandas nas canaletas correspondentes às digestões com as enzimas *HincII* e *EcoRV* (figura 13B, canaletas 2 e 3).

Outro *Southern blot* foi então preparado para ser hibridizado com a sonda NCPR1, no qual o DNA total de *D. discoideum* foi digerido com as enzimas com sítios preditos na seqüência do cDNA da NCPR (*Clal*, *EcoRV*, *HincII*, *BamHI*, *HindIII*) e também com enzimas que supostamente não clivariam o cDNA (*EcoRI*, *BglII*, *XhoI*, *SmaI* e *KpnI*). O padrão de bandas obtido e mostrado na figura 14 reforça a hipótese da existência de um único gene para NCPR. As digestões com as enzimas *Clal*, *EcoRV*, *HincII*, *BamHI*, *HindIII* (figura 14, canaletas 1 a 5) resultaram no aparecimento de apenas um fragmento que hibridizou predominantemente com a sonda de 855 bp, o mesmo sendo observado nas digestões com as enzimas que não clivam o cDNA (figura 14, canaletas 6 a 9 e 15). O resultado das digestões duplas reforça ainda mais a hipótese da existência de um único gene de NCPR (figura 14, canaletas 10 a 14).

Contudo, não podemos ainda descartar completamente a possibilidade da existência de mais de uma cópia do gene da NCPR no genoma de *D. discoideum*. Como pode ser observado tanto na figura 13B como na figura 14, bandas adicionais de tamanho menor são detectadas pela sonda após digestão do DNA

com as enzimas *HincII* e *EcoRV*, porém com intensidade menor que a banda predominante na faixa dos 5 kb.

Com o objetivo de investigar a existência de cópia adicional do gene da NCPR, também pesquisamos bases de dados públicas que armazenam seqüências de DNA geradas por um consórcio internacional de laboratórios envolvidos no seqüenciamento do genoma de *D. discoideum*. Até o momento, apenas a seqüência do cromossomo 2 foi completamente decifrada (Glöckner et al., 2002), sendo que o seqüenciamento dos demais cromossomos está em andamento (<http://genome.imb-jena.de/Dictyostelium/>). Nestas buscas localizamos um segmento de DNA genômico de 2803 bases (contig 5009) resultante da montagem de seqüências menores derivadas de bibliotecas específicas do cromossomo 6, e que contém praticamente a seqüência completa do cDNA DdNCPR. O alinhamento mostrado na figura 15B demonstra a identidade entre as duas seqüências.

Ainda que a seqüência do genoma de *D. discoideum* não esteja completamente determinada e analisada, a estimativa é que as seqüências já obtidas representem mais de 80% de seu genoma. Portanto, o fato de termos localizado apenas um contig que represente o gene da NCPR é mais uma indicação de que o genoma de *Dictyostelium* contém apenas uma cópia do gene da NCPR.

Em vários outros organismos o gene da NCPR também está presente como cópia única. O genoma de *Drosophila melanogaster* codifica apenas um gene para NCPR (Hovemann et al., 1997); células humanas expressam apenas um tipo de transcrito derivado de um único gene localizado no cromossomo 7 (Shephard et al., 1989), e em camundongos a expressão do único gene da NCPR ocorre já nos estágios iniciais da embriogênese (Shen et al., 2002). *S. cerevisiae* e fungos filamentosos também possuem apenas uma cópia do gene de NCPR (Sutter & Loper, 1989; van den Brink et al., 1995; Yadav & Loper, 2000). Por outro lado, plantas superiores freqüentemente possuem múltiplas cópias de NCPR (Benveniste et al., 1991; Mizutani & Ohta, 1998).

Figura 12: Posição dos sítios de clivagem de algumas enzimas de restrição no cDNA DdNCPR e obtenção da sonda NCPR1. **A.** Esquema do cDNA da NCPR de *D. discoideum* com alguns sítios de restrição e com indicação da posição de domínios funcionais da enzima. **B.** O plasmídeo pBS_DdNCPR foi digerido com a enzima de restrição *Clal* liberando um fragmento de 855 bp denominado NCPR1 (canaletas 2 e 3). O marcador de tamanho molecular (1 kbp DNA ladder) foi aplicado na canaleta 1 e o tamanho de alguns fragmentos em kpb estão indicados à esquerda. A figura mostra foto do gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Figura 13: Southern blot de DNA total da linhagem selvagem AX4 hibridizado contra sonda do cDNA DdNCPR e NCPR1. O DNA total de *D. discoideum* clivado com diferentes enzimas de restrição foi separado em gel de agarose 0,8% e submetido a Southern blot: *Clal* (1), *HincII* (2), *EcoRV* (3), *EcoRI* (4), *EcoRI* (5), *BglII* (6), *SstI* (7), *EcoRI* e *XhoI* (8) e *XhoI* (9). **(A)** Hibridização contra a sonda do cDNA da DdNCPR. **(B)** Hibridização contra a sonda NCPR1 de 855pb. A figura mostra porções relevantes de autorradiogramas obtidos após exposição das membranas a filmes de raios-X. As posições de migração de alguns fragmentos do marcador de tamanho (1 kbp DNA ladder) estão indicadas à direita.

Figura 14: Southern blot de DNA total da linhagem selvagem AX4 hibridizado contra sonda do cDNA NCPR1. O DNA total de *D. discoideum* clivado com diferentes enzimas de restrição foi separado em gel de agarose 0,8%, submetido a *Southern blot* e hibridizado contra sonda preparada a partir do fragmento de 855bp (NCPR1): *Clal* (1), *EcoRV* (2), *HincII* (3), *BamHI* (4), *HindIII* (5), *EcoRI* (6), *BglII* (7), *XhoI* (8), *SmaI* (9), *EcoRV* e *BamHI* (10), *BamHI* e *HindIII* (11), *EcoRV* e *HindIII* (12), *EcoRV* e *SmaI* (13), *EcoRV* e *KpnI* (14), *KpnI* (15). A figura mostra o autorradiograma obtido após exposição da membrana a filmes de raios-X. As posições de migração de alguns fragmentos do marcador de tamanho (1 kbp DNA ladder) estão indicadas à direita.

```

NCPR : 1      tttttttttgtaaattttaaaataaaatgaaatcagtaattttaaaacaaaaaatttag 60
              |||
Ctg : 2377    tttttttttgtaaattttaaaataaaatgaaatcagtaattttaaaacaaaaaatttag 2318

NCPR : 61      tattattaggtgctggtgtaacaacaacttattatttatataaaattttttcagcaccat 120
              |||
Ctg : 2317    tattattaggtgctggtgtaacaacaacttattatttatataaaattttttcagcaccat 2258

NCPR : 121     cagtttcaaaagatgaaggtgataaatgttgatttaaatgcaccagatccagcagcttttag 180
              |||
Ctg : 2257    cagtttcaaaagatgaaggtgataaatgttgatttaaatgcaccagatccagcagcttttag 2198

NCPR : 181     ctagagcagctgttaaagagaaaaaagaaagatttgtaaaaccatcagataatgtttgtc 240
              |||
Ctg : 2197    ctagagcagctgttaaagagaaaaaagaaagatttgtaaaaccatcagataatgtttgtc 2138

NCPR : 241     caattttaattttatatggaactgaatatggtttatcagcagaggttgccaaaaaattgg 300
              |||
Ctg : 2137    caattttaattttatatggaactgaatatggtttatcagcagaggttgccaaaaaattgg 2078

NCPR : 301     aagaatcaatcaatagcaaattagaagggttttgggcacgtattatcgatatggaagagt 360
              |||
Ctg : 2077    aagaatcaatcaatagcaaattagaagggttttgggcacgtattatcgatatggaagagt 2018

NCPR : 361     acgagattattgaatttgaaaagaacaaatagtcctcattattacatcaacctatggtg 420
              |||
Ctg : 2017    acgagattattgaatttgaaaagaacaaatagtcctcattattacatcaacctatggtg 1958

NCPR : 421     atggtgttccaccaaccactgcccgtccattctttgattatttagaagcaaatcgtttaa 480
              |||
Ctg : 1957    atggtgttccaccaaccactgcccgtccattctttgattatttagaagcaaatcgtttaa 1898

NCPR : 481     atctttcacatattcaatttagtggttttagcattgggtgatcggttcttatccacattatt 540
              |||
Ctg : 1897    atctttcacatattcaatttagtggttttagcattgggtgatcggttcttatccacattatt 1838

NCPR : 541     gtgcagctggttaaaacttttgataaacaattgaagagatgggtgccaagagatttagag 600
              |||
Ctg : 1837    gtgcagctggttaaaacttttgataaacaattgaagagatgggtgccaagagatttagag 1778

NCPR : 601     atcgtattgaagttgatcaagaagattggacttggttcgatcggttatattgataccgtgt 660
              |||
Ctg : 1777    atcgtattgaagttgatcaagaagattggacttggttcgatcggttatattgataccgtgt 1718

NCPR : 661     gtggttttagttccaacattgggtggagtgtgaaaacgtgaagggtcaagattacctctatg 720
              |||
Ctg : 1717    gtggttttagttccaacattgggtggagtgtgaaaacgtgaagggtcaagattacctctatg 1658

NCPR : 721     aaaaggcaaaacttttcgcactctctcaaggtaaatacaataaaaaaagaaaccataactcta 780
              |||
Ctg : 1657    aaaaggcaaaacttttcgcactctctcaaggtaaatacaataaaaaaagaaaccataactcta 1598

NCPR : 781     gtaaactcttggttaaacgtgtactcactaaagggtgataaagttggtattcatttagagt 840
              |||
Ctg : 1597    gtaaactcttggttaaacgtgtactcactaaagggtgataaagttggtattcatttagagt 1538

NCPR : 841     ttgaattgggtgatagtgaaactcaagtacgtgccaggtgatgcttttagctatccttccag 900
              |||
Ctg : 1537    ttgaattgggtgatagtgaaactcaagtacgtgccaggtgatgcttttagctatccttccag 1478

NCPR : 901     ataatgctgcatccgaggtttctgcaattatctcactcttaaaattatcaccatctttca 960
              |||
Ctg : 1477    ataatgctgcatccgaggtttctgcaattatctcactcttaaaattatcaccatctttca 1418

NCPR : 961     aagtttcaactccaggttggcattatcaagaggggtgaacaaccaaattccatctcaaatca 1020
              |||
Ctg : 1417    aagtttcaactccaggttggcattatcaagaggggtgaacaaccaaattccatctcaaatca 1358

NCPR : 1021    cccttactcatatcttaaccaaattgttttgatattcataattgtaaaccagaattattac 1080
              |||
Ctg : 1357    cccttactcatatcttaaccaaattgttttgatattcataattgtaaaccagaattattac 1298

```

Figura 15...

```

NCPR : 1081 aactccttaagataatgttaaaaatcaacaagaaaagagaaattaacaaatctcttgg 1140
          |||
Ctg : 1297 aactccttaagataatgttaaaaatcaacaagaaaagagaaattaacaaatctcttgg 1238
          |||

NCPR : 1141 ctcaagggtactggtaaatcaatacacaaattggtgaatttttagaaaatcatcatttaa 1200
          |||
Ctg : 1237 ctcaagggtactggtaaatcaatacacaaattggtgaatttttagaaaatcatcatttaa 1178
          |||

NCPR : 1201 tcgatatcttaagatgttttcttctgctcgtccaccaatcgatgatttattagctcaat 1260
          |||
Ctg : 1177 tcgatatcttaagatgttttcttctgctcgtccaccaatcgatgatttattagctcaat 1118
          |||

NCPR : 1261 tagcaaaattattaccacgttactatagattgttcttcaatgagtgaataaaattgg 1320
          |||
Ctg : 1117 tagcaaaattattaccacgttactatagattgttcttcaatgagtgaataaaattgg 1058
          |||

NCPR : 1321 cagtttccttatgtgttgccgttgtaaatatgatcttcatggtagtgaacgtgttggtgta 1380
          |||
Ctg : 1057 cagtttccttatgtgttgccgttgtaaatatgatcttcatggtagtgaacgtgttggtgta 998
          |||

NCPR : 1381 tcgcttcaactcatatggccgatcgatgaatgttggtgatcgtgttcaatctttataa 1440
          |||
Ctg : 997 tcgcttcaactcatatggccgatcgatgaatgttggtgatcgtgttcaatctttataa 938
          |||

NCPR : 1441 acaataatccagatttccgtttaccagaggatccaacaactccaatactcatggttggtc 1500
          |||
Ctg : 937 acaataatccagatttccgtttaccagaggatccaacaactccaatactcatggttggtc 878
NCPR : 1501 caggtactggtattgctccattcggttagttcattcaagaaagaaaagcactcggtcata 1560
          |||
Ctg : 877 caggtactggtattgctccattcggttagttcattcaagaaagaaaagcactcggtcata 818
          |||

NCPR : 1561 ctgggtgaaaatcatctctattttggttgctcgttctgatgaagatttcctttactcca 1620
          |||
Ctg : 817 ctgggtgaaaatcatctctattttggttgctcgttctgatgaagatttcctttactcca 758
          |||

NCPR : 1621 aagagttacaacaatatcataacgatggtttaattaactctacactgctttctctcgtg 1680
          |||
Ctg : 757 aagagttacaacaatatcataacgatggtttaattaactctacactgctttctctcgtg 698
          |||

NCPR : 1681 aaacctctcaaaaagtttacgttcaaaatcgtctccttgaaaatagtaacaaatttggtg 1740
          |||
Ctg : 697 aaacctctcaaaaagtttacgttcaaaatcgtctccttgaaaatagtaacaaatttggtg 638
          |||

NCPR : 1741 atctcatcaatgctggtggtcatatttacatttggtgatgctaaatcaatgggtccac 1800
          |||
Ctg : 637 atctcatcaatgctggtggtcatatttacatttggtgatgctaaatcaatgggtccac 578
          |||

NCPR : 1801 aagttcatgaaacactttctctcatcatcactaaacatatgtcaattgatgaagctgatg 1860
          |||
Ctg : 577 aagttcatgaaacactttctctcatcatcactaaacatatgtcaattgatgaagctgatg 518
          |||

NCPR : 1861 ctcaagctttacttcacaaattagaaaaagaaaacgttatcaaaaagatggttggtttt 1920
          |||
Ctg : 517 ctcaagctttacttcacaaattagaaaaagaaaacgttatcaaaaagatggttggtttt 458
          |||

NCPR : 1921 aaattttaaattttaaaaaataaaaaaaacaaaaaaatagtttttttttaaaaagt 1980
          |||
Ctg : 457 aaattttaaattttaaaaaataaaaaaaacaaaaaaatagtttttttttaaaaagt 398
          |||

NCPR : 1981 taaaaatttatattaaaaataaaattgcaattaaacaaaataaaatattttctttt 2040
          |||
Ctg : 397 taaaaatttttattaaaaataaaattgcaattaaacaaaataaaatattttctttt 338
          |||

NCPR : 2041 aaaataagattttaaaataaaatataattataaaac 2076
          |||
Ctg : 337 taaataagattttaaaataaaatataattataaaac 302
          |||

```

Figura 15: Alinhamento de seqüências. Alinhamento da seqüência do contig 5009 (ctg) e a seqüência de nucleotídeos do cDNA DdNCPR.

4.3. Análise dos níveis de expressão do mRNA para NCPR durante o ciclo de vida de *D. discoideum*

Os níveis de expressão do mRNA para DdNCPR durante o crescimento e o desenvolvimento de *D. discoideum* foram analisados através de *Northern blots* preparados com RNA total e hibridizados com uma sonda sintetizada a partir do cDNA completo da NCPR. Como pode ser observado na figura 16A, os níveis do mRNA da NCPR diminuem significativamente ao longo do desenvolvimento, desaparecendo completamente após a fase de agregados compactos (mounds). Além da observação dos fenótipos típicos de cada fase do desenvolvimento, utilizamos como controle da sua progressão a detecção dos níveis do mRNA da gp80 (figura 16B). A gp80 é uma proteína de adesão celular de *D. discoideum*, cujo mRNA tem expressão máxima durante a fase de agregação, diminuindo dramaticamente após a formação do slug e retornando em níveis bem menores no final da culminação (da Silva & Klein, 1990).

Para uma observação mais detalhada do decaimento do mRNA da NCPR, isolamos RNA total de células coletadas em intervalos menores na fase inicial do desenvolvimento em filtros. Como mostram os *Northern blots* apresentados na figura 17A e B, os níveis da NCPR detectados tanto com a sonda preparada a partir do cDNA intacto como com a sonda que representa a porção aminoterminal do cDNA (sonda NCPR1 de 855bp, figura 12A) apresentam um decaimento bastante pronunciado assim que as células da fase de crescimento são submetidas a carência nutricional (comparar a canaleta veg com as demais, figura 17A e B). Como controle da quantidade de RNA total aplicada nos géis, os *Northern blots* foram hibridizados com uma sonda preparada a partir do gene 1G7 (figura 17C), que tem expressão constitutiva em *D. discoideum* (Early & Williams, 1988). A figura 17D mostra os níveis do mRNA da gp80 com controle da progressão do desenvolvimento.

É interessante observar que os níveis de expressão do mRNA da DdNCPR são aparentemente menores que os níveis de expressão dos genes 1G7 e gp80, uma vez que, apesar das atividades específicas das sondas utilizadas serem semelhantes, o tempo de exposição dos *Northern blots* hibridizados contra sondas

para NCPR foram significativamente maiores (3 a 7 dias) do que aqueles hibridizados contra sondas para 1G7 e gp80 (6 e 24 horas, respectivamente).

A expressão diferencial para o gene da NCPR já foi relatada em outros organismos. Por exemplo, em *Drosophila melanogaster* o gene da NCPR apresenta expressão aumentada na antena de adultos e em embriões (Hovemann et al., 1997). O mRNA da NCPR tem um padrão de expressão distinto durante o desenvolvimento de diversos tecidos e órgãos em ratos e camundongos, sendo que esta expressão não é coordenada com a expressão dos genes dos CYPs (Simmons & Kasper, 1989; Keeney & Waterman, 1999; O'Leary & Kasper, 2000). É interessante ressaltar que o gene da NCPR já é expresso nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário, sugerindo que processos dependentes desta enzima sejam importantes nesta fase da embriogênese (Filler & Lew, 1981; Stromstedt et al., 1996; Keeney & Waterman, 1999; Horike et al., 2000; Shen et al., 2002).

4.4. Obtenção e caracterização de novas linhagens nocautes para NCPR para confirmação do fenótipo do mutante redA

Como descrito anteriormente, o mutante redA apresenta crescimento aparentemente normal mas tem seu desenvolvimento interrompido na fase de agregados compactos acumulando um pigmento amarelo. Com o intuito de confirmar se o fenótipo do mutante redA obtido pela técnica de REMI está relacionado à inativação do gene que codifica para a NCPR, nos propusemos a isolar outras linhagens de *D. discoideum*, onde o gene da NCPR seria substituído, através de recombinação homóloga (gene replacement), pelo cDNA completo da NCPR interrompido por um segmento de DNA (cassete) que codifica resistência para o antibiótico blastidicina.

Para obtenção destas linhagens nocautes utilizamos a construção DdNCPR-KO (figura 3C) e, como controle, o próprio plasmídeo plasmídeo ptf70 (clone out do mutante redA) na eletroporação de células da linhagem selvagem AX4 de *Dictyostelium discoideum*. Os clones transfectantes resistentes à blastidicina foram plaqueados em condições que permitiam inspeção de sua

progressão no desenvolvimento, e tiveram seu DNA total analisado por *Southern blot* para verificação da eventual ocorrência de recombinação homóloga e conseqüente substituição da cópia nativa do gene pela cópia alterada.

A figura 18 mostra o *Southern blot* de DNA total isolado das linhagens selvagem AX4, mutante redA e mutantes obtidos no experimento de gene replacement que foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRV* e hibridizado com a sonda preparada a partir do cDNA da DdNCPR. Uma vez que o cDNA da NCPR supostamente apresenta um único sítio para a enzima *EcoRV* (figura 12A), a digestão do DNA cromossomal da linhagem selvagem com esta enzima resulta, como esperado, em dois fragmentos de tamanhos de aproximadamente 5 kbp e 2,5 kbp (figura 18, canaleta 1).

Assumindo a existência de um único gene para NCPR, a substituição do gene nativo pelo cDNA interrompido DdNCPR-KO levaria ao desaparecimento do fragmento de menor tamanho de 2,5 kbp, uma vez que o sítio para *EcoRV* é perdido com a inserção do cassete BsR (figura 3C) neste sítio. A figura 18 (canaletas 9 a 14) mostra fragmento de DNA genômico dos clones em que parece ter ocorrido recombinação homóloga e que contém o cDNA interrompido tem coincidentemente tamanho aproximado de 5 kbp.

O desaparecimento da banda de 2,5 kbp também seria esperado para os clones resultantes de recombinação homóloga com o pft70 (figura 18, canaletas 3 a 7), que, como esperado, apresentam perfil de bandas semelhante ao observado para o mutante redA (DG1047) (figura 18, canaleta 2). Esta interpretação parece ser a correta, uma vez que as bandas de tamanho maior que 5 kbp que hibridizaram com a sonda parecem corresponder à digestão incompleta do DNA total. Além disso, dos clones resistentes à blasticidina mostrados na figura 18, apenas o clone A2003 (canaleta 8) parece não ter sofrido recombinação homóloga.

Figura 16: Análise dos níveis de mRNA da NCPR ao longo do desenvolvimento da linhagem selvagem AX4 de *D. discoideum*. Aproximadamente 20µg de RNA total isolado das células nas diferentes fases do desenvolvimento foi submetido a *Northern blots* que foram hibridizados com sondas radioativas preparadas a partir do cDNA DdNCPR (A) ou cDNA da gp80 (B). Células obtidas após crescimento em meio HL5 foram lavadas com tampão Sorensen e submetidas à carência em filtros e coletadas nos tempos indicados: início do carenciamento (0h), início da fase de agregação (2h), fase de agregação (4h), formação de agregados compactos (*mounds*) (8h), após agregação (12h), início da culminação (16h), culminação em estágio mais avançado (20h) e formação completa de corpos de frutificação (24h). 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.

Carenciamento em filtros - linhagem AX4

Figura 17: Análise dos níveis de mRNA da NCPR durante o desenvolvimento da linhagem selvagem AX4 de *D. discoideum*. Aproximadamente 20µg de RNA total isolado das células nas diferentes fases do desenvolvimento foi submetido a *Northern blots* que foram hibridizados com sondas radioativas preparadas a partir do cDNA DdNCPR (A), do fragmento NCPR1 (B), do gene 1G7 (C) ou do cDNA da gp80 (D). Células obtidas após crescimento em meio HL5 (veg) foram lavadas com tampão Sorensen e submetidas a carência em filtros e coletadas em intervalos mais curtos nos tempos indicados: início do carenciamento (0h, 1/2h e 1h), início da fase de agregação (2h), fase de agregação (4h), formação de agregados compactos (*mounds*) (7h), culminação em estágio mais avançado (20h) e formação completa de corpos de frutificação (24h). A figura corresponde a porções relevantes de autorradiogramas obtidos após exposição das membranas a filmes de raios-X por 3 dias (NCPR), 7 dias (NCPR1), 6 horas (1G7) e 24 horas (gp80) a -80°C. A membrana mostrada no painel B corresponde a membrana mostrada no painel C, e que foi re-bridizada com a sonda NCPR1, sendo que o sinal relativo ao mRNA de 1G7 ainda exibe um sinal mais fraco. As posições de migração dos rRNAs estão indicadas à direita.

Figura 18: *Southern blot* de DNA genômico total de clones transfectantes resistentes a blasticidina para verificação da ocorrência de recombinação homóloga. O DNA total isolado de linhagens selvagem e mutantes de *D. discoideum* foi clivado com a enzima de restrição *EcoRV*, separado em gel de agarose 0,8%, submetido a *Southern blot* e hibridizado contra sonda radioativa do cDNA da DdNCPR. Linhagem selvagem AX4 (1), mutante *redA* (2), clones resistentes resultantes da eletroporação com *pft70*: A501(3), A502 (4), A503 (5), A2001 (6), A2002 (7), A2003 (8), clones resistentes resultantes da eletroporação com DdNCPR-KO: F101 (9), F102 (10), F103 (11), F104(12), F105 (13), F106 (14). A figura mostra o autorradiograma obtido após exposição da membrana a filmes de raios-X. A quantidade de DNA aplicado na canaleta 10 (F102) foi maior que nas demais canaletas. As posições de migração de alguns fragmentos do marcador de tamanho (1 kbp DNA *ladder*) estão indicadas à direita

4.4.1. Verificação dos níveis de expressão do mRNA da NCPR nas linhagens nocautes

Com objetivo de confirmarmos se, como esperado, as linhagens que tiveram o gene de NCPR nocauteado não expressavam o mRNA correspondente, analisamos o RNA total isolado destas linhagens através de *Northern blots* hibridizados com sondas derivadas tanto do cDNA completo da NCPR como do fragmento de 855bp (sonda NCPR1, figura 12A) e do inserto de 1,8 kbp do plasmídeo pft70.

Como pode ser observados nas figuras 19 e 20, células da fase de crescimento do mutante *redA* não expressam o mRNA da NCPR (canaleta 2). O mesmo é observado para as linhagens nocautes obtidas com o plasmídeo pft70 (linhagens A501 e A200, figura 19, canaletas 3 e 4, respectivamente; linhagens A502, A503 e A2002, figura 20, canaletas 3 a 5, respectivamente). Contudo, em alguns experimentos (ver adiante), observamos nestas linhagens mutantes uma banda com intensidade significativamente menor, correspondente a um mRNA de mesmo tamanho do mRNA da NCPR e que é reconhecido pela sonda do cDNA da NCPR. É possível que este mRNA, transcrito em níveis baixos nestas linhagens nocautes, seja derivado do gene nocauteado e esteja sendo expresso em fusão com parte do cassete de resistência *BsR* inserido. Por outro lado, ainda que nossos resultados tenham sugerido fortemente a existência de uma única cópia do gene da NCPR, a detecção deste mRNA que hibridiza com a sonda de NCPR nestas linhagens nocautes poderia indicar que existe mais de uma cópia deste gene no genoma de *D. discoideum*.

As linhagens nocautes obtidas a partir da construção DdNCPR-KO expressam um mRNA de tamanho menor (truncado), que é reconhecido pela sonda de NCPR. É interessante notar que este mRNA truncado é aparentemente mais estável que o mRNA selvagem, dado seu maior acúmulo, como mostrado na figura 19 (linhagens F101, F103 e F105, canaletas 5 a 7, respectivamente) e na figura 20 (linhagens F102, F104 e F106, canaletas 6 a 8, respectivamente).

O resultado da hibridização dos *Northern blots* mostrados nas figuras 19 e 20 com sondas derivadas do inserto de 1,8 kbp do plasmídeo pft70 e do fragmento

NCPR1 confirmam os dados obtidos. Como exemplo, mostramos a hibridização de um dos Northernblots com a sonda NCPR1 (figura 19B).

A expressão do mRNA da NCPR nas linhagens mutantes para este gene foi reexaminada em um outro experimento, no qual foi extraído RNA total de células da fase de crescimento e células colhidas imediatamente após remoção do meio de cultivo HL-5 por lavagem com tampão Sorensen gelado. Como pode ser observado na figura 21, foi possível detectar com a sonda NCPR1 níveis insignificantes de um mRNA de tamanho equivalente ao mRNA da NCPR na linhagem redA (canaletas 3 e 4) e na linhagem A2002 (canaletas 5 e 6), derivada da recombinação homóloga com o plasmídeo pft70. Como já observado anteriormente, a linhagem F102, derivada da recombinação homóloga com a construção DdNCPR-KO, não está expressando mRNA truncado em altas quantidades, como observado anteriormente (canaletas 7 e 8).

Os níveis insignificantes ou praticamente indetectáveis do mRNA expresso no mutante redA e que é reconhecido pela sonda do cDNA da NCPR não são alterados durante o desenvolvimento desta linhagem. Como mostrado na figura 22A, células de diferentes fases do desenvolvimento do mutante redA não exibiram, neste experimento, níveis detectáveis do mRNA reconhecido pela sonda NCPR1. Por outro lado, apesar do desenvolvimento estar afetado nesta linhagem, a expressão do gene da proteína de adesão gp80 é corretamente induzida na fase de agregação, mas a diminuição de seus níveis ocorre com um atraso de 3 horas em comparação ao verificado para a linhagem selvagem AX4 (comparar figuras 17D e 22 C).

Figura 19: Análise dos níveis de mRNA da NCPR nas linhagens nocautes do gene da NCPR. Aproximadamente 20µg de RNA total isolado de células em fase crescimento foi submetido a *Northern blots* que foram hibridizados com sondas radioativas preparadas a partir do cDNA DdNCPR (A), do fragmento NCPR1 (B) ou do gene 1G7 (C). Linhagem selvagem AX4 (1), mutante redA (2), mutantes obtidos com o inserto pft70: A501 (3), A2001 (4) e mutantes obtidos com DdNCPR-KO: F101 (5), F103 (6) e F105 (7). A figura corresponde a porções relevantes de autorradiogramas obtidos após exposição das membranas a filmes de raios-X. A membrana mostrada no painel B corresponde a membrana mostrada no painel C, e que foi re-bridizada com a sonda NCPR1, sendo que o mRNA de 1G7 ainda exibe sinal. As posições de migração dos rRNAs estão indicadas à direita. A seta mais grossa à direita aponta o mRNA truncado expresso nas linhagens mutantes F101, F103 e F105.

Figura 20 : Análise dos níveis de mRNA da NCPR nas linhagens nocautes do gene da NCPR. Aproximadamente 20µg de RNA total isolado de células em fase crescimento foi submetido a *Northern blots* que foram hibridizados com sondas radioativas preparadas a partir do cDNA DdNCPR (A) ou do gene 1G7 (B). Linhagens selvagem AX4 (1), mutante redA (2), mutantes obtidos com o inserto pft70: A502 (3), A503 (3) e A2002 (5) e mutantes obtidos com DdNCPR-KO: F102 (6), F104 (7) e F106 (8). A figura corresponde a porções relevantes de autorradiogramas obtidos após exposição das membranas a filmes de raios-X. A membrana mostrada no painel B corresponde a membrana mostrada no painel A, e que foi re-bridizada com a sonda de 1G7. As posições de migração dos rRNAs estão indicadas à direita. A seta mais grossa à direita aponta o mRNA truncado expresso nas linhagens mutantes F102, F104 e F106.

Figura 21: Análise dos níveis de mRNA da NCPR nas linhagens nocautes do gene da NCPR. Aproximadamente 20 μ g de RNA total isolado de células em fase crescimento (canaletas ímpares) e de células após remoção do meio de cultivo e lavagem com tampão Sorensen (canaletas pares) foi submetido a *Northern blots* que foram hibridizados com sondas radioativas preparadas a partir do fragmento NCPR1 (A) ou do gene 1G7 (B). Linhagens selvagem AX4 (1 e 2; 9 e 10), redA (3 e 4), A2002 (5 e 6) e F102 (7 e 8). A figura corresponde a porções relevantes de autorradiogramas obtidos após exposição das membranas a filmes de raios-X. A membrana mostrada no painel B corresponde a membrana mostrada no painel A, e que foi re-bridizada com a sonda de 1G7. As posições de migração dos rRNA estão indicadas à direita.

Carenciamento em filtros - linhagem redA

Figura 22: Análise dos níveis de mRNA da NCPR durante o desenvolvimento da linhagem mutante redA. Aproximadamente 20 µg de RNA total isolado das células nas diferentes fases do desenvolvimento foi submetido a *Northern blots* que foram hibridizados com sondas radioativas preparadas a partir do fragmento NCPR1 (A), do gene 1G7 (B) ou do cDNA da gp80 (C). Células obtidas após crescimento em meio HL5 (veg) foram lavadas com tampão Sorensen e submetidas à carência em filtros e coletadas em intervalos mais curtos nos tempos indicados: início do carenciamento (0h, 1/2h e 1h), início da fase de agregação (2h), fase de agregação (4h), formação de agregados compactos (*mounds*) (7h), culminação em estágio mais avançado (20h) e formação de corpos de frutificação (24h). A figura corresponde a porções relevantes de autorradiogramas obtidos após exposição das membranas a filmes de raios-X por 7 dias (NCPR1), 16 horas (1G7) e 24 horas (gp80) a -80°C. As posições de migração dos rRNAs estão indicadas à direita.

4.4.2. Avaliação do crescimento e do desenvolvimento nas linhagens nocautes de NCPR

Observações preliminares do crescimento do mutante *redA* sugeriam que seu crescimento não diferia da linhagem selvagem AX4. Para confirmarmos estes dados preliminares comparamos as curvas de crescimento da linhagem selvagem AX4 com as curvas do mutante *redA* e de alguns mutantes nocautes (*redA*, A2002 e F102). Nos experimentos mostrados na figura 23, a cultura das células foi iniciada com 5×10^5 células/mL e, em tempos determinados (0, 4, 8, 12, 36 e 48 horas), alíquotas foram retiradas e contadas. Não observamos diferenças significativas nas curvas de crescimento entre as linhagens selvagem e mutantes.

Por outro lado, como já discutido, o mutante *redA* apresenta desenvolvimento interrompido na fase de agregados compactos, além de acumular um pigmento amarelo. Com o objetivo de confirmar estas observações, monitoramos o desenvolvimento em filtros das linhagens mutantes paralelamente à linhagem selvagem AX4; os fenótipos observados nas diferentes fases do desenvolvimento estão mostrados na figura 24. O desenvolvimento dos mutantes mostrou-se um pouco atrasado em relação à linhagem selvagem AX4 e tanto o mutante *redA* (figura 24B) quanto os mutantes obtidos pela recombinação homóloga com *pft70* (A2002, figura 24C; A501, A502, A503 e A2001, dados não apresentados) apresentaram alterações em seu fenótipo. Uma parte das células forma corpos de frutificação, enquanto a outra parte tem o seu desenvolvimento interrompido na fase de agregados compactos acumulando um pigmento amarelo.

Esta alteração de desenvolvimento torna-se menos evidente após repiques sucessivos das culturas. Quando estes mutantes são descongelados e plaqueados em placas de meio SM pela primeira vez, os corpos de frutificação não aparecem, formando apenas agregados amarelados. Estes dados sugerem que o nocaute do gene da NCPR está diretamente relacionado com o fenótipo observado; contudo, como se trata de um fenótipo mutante não estável, é provável que o produto de um ou mais genes compense a inativação gênica realizada, após manutenção do cultivo por tempos prolongados como será discutido adiante (ver discussão final, item 4.7.).

Por outro lado, os mutantes obtidos pela recombinação homóloga com a construção DdNCPR-KO (F102, figura 24D; F101, F103, F104, F105 e F106, dados não apresentados) formam sempre corpos de frutificação semelhantes aos da linhagem selvagem AX4. Não temos nenhuma explicação direta para estas observações, mas é possível especular que o mRNA truncado expresso nas linhagens mutantes F101 a F106 origina uma proteína parcialmente funcional, evitando assim o aparecimento do fenótipo mutante típico da linhagem redA. Esta proteína truncada manteria o domínio de interação com P450 e o domínio de ligação de FMN.

Dados adicionais visando a confirmação do envolvimento da NCPR com o fenótipo do mutante redA poderiam ser obtidos a partir de experimentos de complementação genética do mutante redA com o cDNA da NCPR. O cDNA da NCPR foi clonado no vetor de expressão pCytXNeoR, conforme descrito no item 3.5., uma vez que este vetor é adequado para expressão constitutiva de cDNAs de interesse sob controle do promotor CytO5 (Rizzuto et al., 1993). Contudo, não obtivemos sucesso nos experimentos de transfecção de DNA com esta construção. Tampouco pudemos avaliar o efeito da expressão constitutiva da NCPR durante o desenvolvimento da linhagem selvagem.

Nossos dados confirmaram que o gene nocauteado no mutante redA corresponde à NCPR, descartando a hipótese inicial de que o gene nocauteado poderia codificar uma enzima da família das NOSs. Portanto, a observação preliminar de que o mutante redA produz níveis reduzidos de NO em relação a linhagem selvagem (Dra. C. Klein, comunicação pessoal), não pode ser ainda explicada ao nível molecular. Experimentos futuros de medida dos níveis de NO através de metodologias mais precisas são necessários para que possamos relacionar ou descartar o envolvimento da NCPR nos mecanismos de síntese de NO em *Dictyostelium discoideum*.

4.4.3 Análise da eventual formação precoce de esporos durante o desenvolvimento do mutante redA

A intensa da cor amarelada verificada nos agregados compactos formados pela linhagem mutante redA poderia ser devido à formação e acúmulo precoce de esporos durante o seu desenvolvimento. Para testarmos esta hipótese, submetemos tanto corpos de frutificação maduros da linhagem selvagem AX4 como células em diferentes fases do desenvolvimento da linhagem mutante redA a um tratamento com detergente a quente como descrito no item 3.1.6. Esporos resistem a este tratamento e são viáveis quando plaqueados em meio SM.

Como esperado, os corpos de frutificação da linhagem AX4 resistiram ao tratamento e liberaram esporos com 100% de viabilidade, após semeadura em placas de meio SM. Em contraste, as células do mutante redA coletadas após diferentes intervalos de carenciamento em filtro não liberaram esporos viáveis ou não, após o tratamento com detergente. É importante destacar que, neste experimento, o desenvolvimento do mutante redA não progrediu além da fase de agregados compactos mesmo após 48 horas de carenciamento (figura 25), mas os fenótipos exibiram a cor amarela característica. Estes dados nos levam a concluir que a cor amarela intensa exibida pelo mutante redA não se deve à presença precoce de esporos durante o seu desenvolvimento. Assim, é provável que a cor amarela exibida se deva ao acúmulo de algum intermediário não metabolizável em virtude da ausência da NCPR.

Figura 23: Curvas de crescimento da linhagem selvagem AX4 e das linhagens mutantes *redA*, A2002 e F102 de *D. discoideum*. Células das linhagens selvagem AX4 e mutantes DG1047 (*redA*), A2002 (nocaute com *pft70*) e F102 (nocaute com *DdNCPR-KO*) foram diluídas para aproximadamente 5×10^5 células/mL em meio HL-5 e incubadas sob agitação a 22°C. Aliquotas de células foram recolhidas para contagem em diferentes tempos (0, 4, 8, 12, 24, 32 e 48 horas). A concentração de células (C) no tempo indicado foi dividida pela concentração no tempo zero (C_i). A razão C/ C_i e o tempo em horas estão indicados nos eixos y e x, respectivamente. Os desvios-padrão foram calculados a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata.

AX4

Tempo (horas)

0

8

16

18

20

24

A

redA

Tempo (horas)

0

8

16

18

20

24

B

Figura 24...

A2002

Tempo (horas)

0

8

16

18

20

24

C

F102

Tempo (horas)

0

8

16

18

20

24

D

Figura 24: Desenvolvimento das linhagens selvagem e mutantes de *D. discoideum*. Células em fase de crescimento foram submetidas à carência nutricional em filtros e o desenvolvimento foi monitorizado em lupa e os diferentes estágios foram fotografados. Linhagem selvagem AX4 (A) e linhagens mutantes redA (B), A2002 (C) e F102 (D).

redA (DG1047)

Tempo (horas)

16

20

24

48

Figura 25: Obtenção de células para o teste de formação de esporos. Células em fase de crescimento do mutante redA foram submetidas à carência nutricional em filtros e o desenvolvimento foi monitorizado em lupa e em diferentes estágios foram coletados para realização do teste de formação de esporos.

4.5. Efeito do SNP (nitroprussiato de sódio) no crescimento de *D. discoideum* e nos níveis de mRNA da NCPR

Resultados preliminares obtidos através de análise de microarrays de DNA de *D. discoideum* (Dra. Glaucia Mendes Sousa IQ-USP, observações não publicadas) nos incentivaram a pesquisar a relação entre a enzima NCPR e o estresse nitrosativo induzido por SNP. Aparentemente, o tratamento com SNP de células em fase de crescimento da linhagem selvagem AX4, aumentava a expressão do gene que codifica para a NCPR.

Assim, submetemos tanto células vegetativas da linhagem AX4 como do mutante *redA* ao tratamento com solução 500 μ M de SNP e, após diferentes intervalos, as células foram recolhidas para contagem e para extração de RNA total. Como pode ser observado na figura 26, o SNP inibe o crescimento celular de ambas as linhagens. Estes dados concordam com observações recentes de que o SNP nesta concentração inibe o crescimento da linhagem AX4 (Taminato et al, 2002) e indicam que o mutante *redA* é tão suscetível quanto a linhagem selvagem aos efeitos do SNP.

Por outro lado, as análises através de *Northern blots* mostraram que os níveis do mRNA da NCPR não apresentaram alteração significativa em resposta ao tratamento com SNP (figura 27), não confirmando portanto os dados preliminares obtidos das análises dos microarrays de DNA acima mencionados. Como controle da eficácia do tratamento com SNP, avaliamos em paralelo (dados não mostrados) os níveis de expressão do gene da PAP (Platelet Derived Growth Factor associated protein, Fischer & Schubert, 1996), cuja sonda nos foi gentilmente cedida pela Dra. Glaucia Mendes Sousa (IQUSP) e que tem expressão diferencial quando a célula é submetida a estresse por SNP (Glaucia Mendes Sousa, comunicação pessoal).

O tratamento do mutante *redA* com SNP também não causou alteração significativa nos baixos níveis do mRNA que apresenta hibridização cruzada com a sonda para NCPR (dados não apresentados).

Figura 26: Efeito do SNP (nitroprussiato de sódio) no crescimento de células da linhagem selvagem AX4 e do mutante *redA*. Células das linhagens selvagem AX4 e do mutante DG1047 (*redA*) foram diluídas para aproximadamente 1×10^6 células/mL em meio HL-5 e incubadas sob agitação a 22°C na presença ou ausência de SNP (solução 500 μ M). Aliquotas de células foram recolhidas para contagem em diferentes tempos (0, 4, 8, 12 e 24 horas). A concentração de células (C) no tempo indicado foi dividida pela concentração no tempo zero (C_i). A razão C/ C_i e o tempo em horas estão indicados nos eixos y. e x, respectivamente. Os desvios-padrão foram calculados a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Figura 27: Efeito do SNP (nitroprussiato de sódio) na expressão do mRNA da NCPR em células da linhagem selvagem AX4. Células das linhagens selvagem AX4 foram diluídas para 1×10^6 células/mL em meio HL-5 e incubadas sob agitação a 22°C na presença ou ausência de SNP (solução 500 μ M). Aliquotas de células foram recolhidas em diferentes tempos (0, 4, 8, 12 e 24 horas) e aproximadamente 20 μ g do RNA total isolado foi submetido a *Northern blots*. Estes *Northern blots* foram hibridizados contra sondas radioativas preparadas a partir do cDNA DdNCPR (A) ou do gene 1G7 (B). A figura corresponde a porções relevantes de autorradiogramas obtidos após exposição das membranas a filmes de raios-X por 5 dias (NCPR) e 2 horas (1G7) a -80°C. As posições de migração dos rRNAs estão indicadas à direita.

4.6. Avaliação dos níveis de expressão do produto do gene NCPR nas linhagens selvagem e mutantes

Para examinar os níveis de expressão da proteína NCPR na linhagem selvagem AX4 e nos mutantes nocautes de NCPR utilizamos um anticorpo comercial contra o peptídeo carboxiterminal da NCPR humana (Santa Cruz Biotechnology) para detecção do polipeptídeo em *Western blots*.

O extrato proteico total preparado de células da fase de crescimento das linhagens selvagem AX4 e mutantes (redA, A2002 e F102) foi submetido a SDS-PAGE e corado com Coomassie-blue (figura 28A) para avaliação da equivalência da quantidade de proteínas aplicada no gel. Géis idênticos foram submetidos a transferência eletroforética para membranas de nitrocelulose, que em seguida foram incubadas com anticorpo anti-NCPR obtido em cabra. Como controle positivo da reação deste anticorpo, utilizamos extrato proteico de células humanas epiteliais Hep2. Como pode ser observado na figura 28B, o anticorpo reconheceu especificamente, e em todos os extratos proteicos analisados, um polipeptídeo com massa molecular estimada de aproximadamente 97 kDa. A massa molecular da NCPR de *D. discoideum* esperada pela sua sequência de aminoácidos deduzida do cDNA seria ~70 kDa. Este resultado nos surpreendeu, visto que esperávamos reação negativa para as linhagens nocaute de NCPR, e apesar de a reação ser menos intensa, o anticorpo anti-NCPR detectou um polipeptídeo nas linhagens nocaute.

Como controle da especificidade da reação apresentada na figura 28B, *Western blots* idênticos foram incubados apenas com o anticorpo secundário (anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase, figura 28C) ou com o anti-NCPR na presença de um peptídeo competidor e que foi utilizado na geração do anticorpo (não mostrado). Em nenhum destes experimentos a banda de 97 kDa foi detectada, demonstrando a especificidade do anticorpo utilizado no reconhecimento deste peptídeo.

Ao contrário do que discutimos até o momento, os dados obtidos com o anticorpo anti-NCPR sugerem a existência de mais de uma cópia do gene da NCPR. Alternativamente, o anticorpo estaria detectando um polipeptídeo com

carboxiterminal similar à NCPR. Esta hipótese não deve ser descartada, visto que o polipeptídeo detectado não apresentou a massa molecular esperada para NCPR. É importante ressaltar que as NCPRs de diversos organismos, quando purificadas ou expressas em sistemas heterólogos, migram como proteínas de 70-78 kDa em SDS-PAGE (Mizutani & Ohta, 1998; Horike et al., 2000; Ding et al., 2001; Gilep et al., 2001; Shen et al., 2002). Portanto, experimentos adicionais são necessários para esclarecermos esta questão. Entre estes experimentos está a comparação dos níveis de atividade enzimática da NCPR nas linhagens selvagens e mutantes ensaiadas em extratos proteicos totais de *D. discoideum* em ensaios de redução de citocromo c de modo dependente de NADPH (Shen et al., 1989). Outra alternativa seria a utilização de outros anticorpos anti-NCPR na tentativa de detectar esta proteína de modo inequívoco.

Figura 28: Avaliação da expressão da NCPR da detecção com anticorpo anti-NCPR. (A) No gel SDS-PAGE 10% corado com Comassie blue foram aplicadas amostras de extrato total correspondente a 1×10^6 células de *D. discoideum* das linhagens selvagem AX4 e mutantes redA (DG1047), A2002 (nockout obtido com pft70) e F102 (nockout obtido com DdNCPR-KO), além de extrato total preparado de células epiteliais humanas (Hep2). Géis idênticos foram transferidos para membranas de nitrocelulose que em seguida foram incubadas com anticorpo comercial anti-NCPR obtido de cabra (B) ou somente anticorpo secundário (C). A detecção dos complexos antígeno-anticorpo foi realizada com o *kit* ECL (*Amersham Biosciences*). A mobilidade eletroforética dos padrões de peso molecular (em kDa) estão indicadas à esquerda. A seta aponta o polipeptídeo de ~97kDa reconhecido pelo anticorpo anti-NCPR.

4.7. Discussão final

A NADPH citocromo P450 redutase (NCPR) é uma enzima que tem como papel principal transportar elétrons do NADPH para as várias isoformas do citocromo P450 (Vermilion et al., 1981; Smith et al., 1994; Wang et al., 1997; Poulos, et al., 1998; Döhr et al., 2001). Apesar da existência de vários genes que codificam as distintas isoformas de citocromo P450, na maioria dos organismos a NCPR é codificada por um único gene (Shephard et al. 1989; Sutter & Loper, 1989; Van den Brink et al., 1995; Hovemann et al., 1997; Nelson, 1999; Yadav & Loper, 2000). Esta observação se confirma em *D. discoideum*. A análise da sequência completa do cromossomo 2 de *D. discoideum* revela a existência de 11 genes que codificam isoenzimas de citocromo P450 (Glöckner et al., 2002). Além disso, em uma análise ainda preliminar, identificamos pelo menos 48 sequências parciais de cDNAs que codificam proteínas com alta similaridade com as citocromos P450 que estão depositadas no GenBank (busca realizada em setembro de 2002). Contudo, a função fisiológica dos produtos destes genes ainda não foi identificada. Por outro lado, neste trabalho demonstramos a existência de uma única cópia do gene da NCPR no genoma de *Dictyostelium*.

Além do conhecido envolvimento das NCPRs no sistema de detoxificação de xenobióticos, outras importantes funções fisiológicas são desempenhadas por esta enzima como componente do sistema P450. O transporte de elétrons mediado pelo sistema P450 é também responsável pelo metabolismo oxidativo de ácidos graxos, esteróides e prostaglandinas (Sevanian et al., 1990; Smith et al., 1994; Wang et al., 1997; Döhr et al., 2001). Recentemente foi relatado o envolvimento da NCPR na biossíntese de 20-hidroxicdisona durante o desenvolvimento embrionário do bicho-da-seda. A expressão desta proteína aumenta durante o desenvolvimento, acompanhando a elevação na atividade de 20-hidroxicdisona hidroxilase do citocromo P450 (Horike et al., 2000). Em *Drosophila melanogaster*, níveis maiores de mRNA de NCPR são detectados em embriões e antenas quando comparados com larva ou cabeça e corpo de indivíduos adultos (Hovemann et al., 1997). Como mostramos neste trabalho, também em *D. discoideum* o gene da NCPR tem sua expressão regulada durante

o ciclo de vida. O mRNA da NCPR atinge níveis máximos durante a fase de crescimento e, durante as fases iniciais do desenvolvimento, ocorre significativa diminuição na sua quantidade. Após a formação dos agregados compactos, o mRNA da NCPR não é detectável em *Northern blots*.

Os resultados que apresentamos neste trabalho demonstram uma correlação entre a inativação do gene que codifica NCPR e o fenótipo do mutante *redA* de *Dictyostelium discoideum*. O desenvolvimento neste mutante não progride além da fase de formação de agregados compactos e as células acumulam um pigmento amarelo. Contudo, este fenótipo não é muito consistente e é evidente apenas em culturas jovens de *D. discoideum*. Adicionalmente, algumas linhagens mutantes que obtivemos pela inativação do gene da NCPR por recombinação homóloga com o cDNA mutado tampouco apresentaram o mesmo fenótipo exibido pelo mutante *redA*. Uma vez que nossos resultados sugerem fortemente que o gene que codifica a NCPR está aparentemente presente em uma única cópia no genoma de *Dictyostelium*, é muito provável que um ou mais produtos gênicos possam complementar a ausência desta enzima nos mutantes nocaute. Em *S. cerevisiae* foi demonstrado que sistema citocromo b5/ citocromo b5 NADH redutase funciona como um sistema de transporte de elétrons alternativo para atividade catalítica de pelo menos uma isoforma de CYP (CYP51, lanosterol C14-desmetilase) envolvida na biossíntese de esteróides (Truan et al., 1994; Venkateswarlu et al., 1999; Lamb et al., 1999). Investigações adicionais são necessárias para demonstrarmos se o sistema citocromo b5/ citocromo b5 NADPH redutase é o responsável por compensar a ausência de NCPR em *D. discoideum*.

Mas é importante destacar que uma cópia do gene para citocromo b5 de *Dictyostelium* localiza-se no cromossomo 2 (Glöckner et al., 2002) e que várias seqüências parciais de cDNAs que codificam proteínas com alta similaridade a citocromo b5 redutase estão depositadas no GenBank (busca realizada em outubro de 2002). Estas seqüências derivam de bibliotecas de cDNA construídas a partir de mRNAs isolados tanto de células da fase de crescimento como de slugs ou organismos culminantes.

A participação da NCPR no desenvolvimento animal tem sido objeto de intensa investigação, uma vez que se trata de um gene cuja expressão já é detectada em estágios iniciais da embriogênese (Filler & Lew, 1981; Stromstedt et al., 1996). O papel crucial da NCPR no desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans* foi recentemente demonstrado. A supressão da expressão deste gene através de experimentos de interferência mediada por RNA produz anormalidades letais no embrião (Gonczy et al., 2000). O desenvolvimento de embriões de camundongo que tiveram o gene da NCPR inativado também é severamente afetado, mas a letalidade só é observada após o 10^o-13^o dia de gestação (Shen et al., 2002). Estas observações implicam definitivamente a NCPR no desenvolvimento animal. Contudo, como a expressão do gene da NCPR já é detectável após a formação do embrião de duas células, é razoável supor que mecanismos compensatórios para falta desta enzima garantam a sobrevivência dos embriões até o 10^o-13^o dia da gestação.

Como discutido anteriormente, a NCPR é uma enzima chave em diversos processos metabólicos, como consequência da sua interação principalmente com citocromo P450 e hemexoxigenases. Em particular, sua participação na síntese e/ou degradação de importantes fatores celulares, como ácido retinóico, colesterol e hormônios esteróides, pode estar relacionada com as anormalidades observadas no desenvolvimento de organismos em que a expressão da NCPR foi abolida (Gonczy et al., 2000; Horike et al., 2000; Shen et al., 2002).

Neste contexto, é razoável especular que o bloqueio do desenvolvimento observado no mutante *redA* pode se dever a um provável papel da NCPR no metabolismo de fatores não-proteicos que controlam a diferenciação celular em *Dictyostelium discoideum*. Um destes fatores é DIF-1 (differentiation-inducing factor -1), um fator responsável pela indução da diferenciação de células pré-talo e pela repressão da diferenciação de células pré-esporos que ocorre durante o desenvolvimento de *D. discoideum* (Kay et al., 1999; Kay & Thompson, 2001). DIF-1 é uma alquilfenona clorada cuja degradação envolve sua conversão em pelo menos oito metabólitos e a primeira etapa consiste na descloração, gerando o primeiro metabólito DIF-3. DIF-3 é metabolizado por oxidações sucessivas,

aparentemente catalisadas por isoenzimas dos citocromos P450 (Morandini et al., 1995; Kay et al., 1999; Thompson & Kay, 2000; Kay & Thompson, 2001). Ainda que as isoformas de P450 envolvidas nestas reações de oxidação não tenham sido caracterizadas, seguramente são isoformas dependentes de NCPR. Portanto, a ausência ou diminuição nos níveis desta enzima certamente afeta o funcionamento do citocromo P450, comprometendo o metabolismo de DIF-1 e levando a um provável acúmulo do intermediário DIF-3. Dados da literatura (Kay & Thompson, 2001) indicam que DIF-3 inibe a síntese de DIF-1, aparentemente na etapa de cloração, comprometendo ainda mais a manutenção de níveis apropriados de DIF-1 nos diferentes tipos celulares que compõem o organismo em desenvolvimento. Assim, ainda que não tenhamos medido os níveis de DIF-1 ou DIF-3 nas linhagens mutantes redA e A2002, é provável que o desbalanço na concentração destes fatores seja responsável pela interrupção de seu desenvolvimento na fase de agregados compactos.

5. Bibliografia

Adachi, H., Hasebe, T., Yoshinaga, K., Ohta, T. & Sutoh, K. 1994. Isolation of *Dictyostelium discoideum* cytokinesis mutants by restriction enzyme-mediated integration of the blasticidin S resistance marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:1808-1814.

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

Andrews, S.C., Shipley, D., Keen, J.N., Findlay, J.B. & Harrison, P.M. et al. 1992. The haemoglobin-like protein (HMP) of *Escherichia coli* has ferrisiderophore reductase activity and its C-terminal domain shares homology with ferredoxin NADP⁺ reductases. *FEBS Lett.* 302:247-252.

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

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D. & Seidman, J.G. et al. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.

Baldauf, S.L., Palmer, J.D. & Doolittle, W.F. 1996. The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7749-7754.

Baldauf, S.L. & Doolittle, W.F. 1997. Origem and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12007- 12012.

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.

Banerjee, R. 1997. The Yin-Yang of cobalamin biochemistry. *Chem. Biol.* 4:175-186.

Basu, N.K., Kole, L., Ghosh, A. & Das, P.K. 1997. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite *Leishmania donovani*. FEMS Microbiol. Lett. 156:43-47.

Benveniste, I., Lesot, A., Hasenfratz, M.P., Kochs, G. & Durst, F. 1991. Multiple forms of NADPH-cytochrome P450 reductase in higher plants. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177:105-112.

Black, S.D., Tarr, G.E. & Coon, M.J. 1982. Structural features of isozyme 2 of liver microsomal cytochrome P-450. Identification of a highly conserved cysteine-containing peptide. J. Biol. Chem. 257:14616-14619.

Bonner, J.T. 1967. The cellular slime molds. Princenton University Press, Princenton, N.J.

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.

Cavalier-Smith, T. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. Microbiol. Rev. 57:953-994.

Chen, Y. & Rosazza, J.P. 1994. A bacterial nitric oxide synthase from a *Nocardia* species. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203:1251-1258.

Crane, B.R. & Getzoff, E.D. 1996. The relationship between structure and function for the sulfite reductases. Curr. Opin. Struct. Biol. 6: 774-756.

Cuttrizzolà, F. 1999. Bacterial nitric oxide synthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1411:231-249.

Darnell, J.E, Lodish, H. & Baltimore, D. 1990. Molecular cell biology. Scientific American Books, Inc., New York.

da Silva, A.M. & Klein, C. 1990. Cell adhesion in transformed *D. discoideum* cells: expression of gp80 and its biochemical characterization. Dev. Biol. 140:139-148.

De Lozanne, A. & Spudich, J.A. 1987. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 236:1086-1091.

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

Ding, S., Yao, D., Deeni, Y.Y., Burchell, B. & Wolf, C.R. et al. 2001. Human NADPH-P450 oxidoreductase modulates the level of cytochrome P450 CYP2D6 holoprotein via haem oxygenase-dependent and -independent pathways. *Biochem. J.* 356:613-619.

Döhr, O., Paine, M.J.I., Friedberg, T., Roberts, G.C. & Wolf, C.R. 2001. Engineering of a functional human NADPH-dependent cytochrome P450 system. *PNAS* 98:81-86.

Durner, J. & Klessig, D.F. 1999. Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2:369-374.

Early, A.E. & Williams, J.G. 1988. A *Dictyostelium* prespore-specific gene is transcriptionally repressed by DIF in vitro. *Development.* 103:519-24.

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.

Enoch, H.G. & Strittmatter, P. 1979. Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* 254:8976-8981.

Feelisch, M. & Martin, J.F. 1995. The early role of nitric oxide in evolution. *Trends Ecol. Evol.* 10:496-499.

Filler, R. & Lew, K.J. 1981. Filler Developmental onset of mixed-function oxidase activity in preimplantation mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:6991-6995.

Firtel, R.A. & Bonner, J. 1972. Characterization of the genome of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* 66:339-361.

Fischer, W.H. & Schubert, D. 1996. Characterization of a novel platelet-derived growth factor-associated protein. *J. Neurochem.* 66:2213-2216.

Fujii, H., Zhang, X., Tomita, T., Ikeda-Saito, M. & Yoshida, T. 2001. A role for highly conserved carboxylate, aspartate-140, in oxygen activation and heme degradation by heme oxygenase-1. *J. Am. Chem. Soc.* 123:6475-6484.

Gilep, A.A., Gurvey, O.L., Usanov, S.A. & Estrabrook, R.W. 2001. An enzymatically active chimeric protein containing the hydrophilic form of NADPH-cytochrome P450 reductase fused to the membrane-binding domain of cytochrome b5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284:937-941.

Glöckner, G., Elchinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J.A. & Bankler, A.T. et al. 2002. Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 418:79-85.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W. & Dujon, B. et al. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274:546, 563-7.

Gonczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A. & Jones, S.J. et al. 2000. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* 408:331-336.

Graham, S.E. & Peterson, J.A. 1999. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch. Biochem. Biophys.* 369:24-29.

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

Hall, D.A., Kooi, C.W.V., Stasik, C.N., Stevens, S.Y. & Zuiderweg, E.R.P. et al. 2001. Mapping the interactions between flavodoxin and its physiological partners flavodoxin reductase and cobalamin-dependent methionine synthase. *PNAS* 98:9521-9526.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.

Harlow, E. & Lane, D. 1988. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D. & Higgins, D.G. et al. 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.

Horike, N., Takemori, H., Nonaka, Y., Sonobe, H. & Okamoto, M. 2000. Molecular cloning of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase from silkworm eggs. Its involvement in 20-hydroxyecdysone biosynthesis during embryonic development. Eur. J. Biochem. 267:6914-6920.

Hovemann, B.T., Sehlmeier, F. & Malz, J. 1997. *Drosophila melanogaster* NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: pronounced expression in antennae may be related to odorant clearance. Gene 189:213-219.

Insall, R. & Kay, R.R. 1990 A specific DIF binding protein in *Dictyostelium*. EMBO J. 9:3323-3328.

Iyanagi, T. & Mason, H.S. 1973. Some properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase. Biochemistry 12:2297-2308.

Iyanagi, T., Makino, N. & Mason, H.S. 1974. Redox properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductases. Biochemistry 13:1701-1710.

Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends Biochem. Sci. 23:403-405.

Kasper, C.B. 1971. Biochemical distinctions between the nuclear and microsomal membranes from rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 246:577-581.

Kay, R.R., Flatman, P. & Thompson, C.R. 1999. DIF signalling and cell fate. Semin. Cell Dev. Biol. 10:577-585.

Kay, R.R. & Thompson, C.R. 2001. Cross-induction of cell types in *Dictyostelium*: evidence that DIF-1 is made by prespore cells. *Development*. 28:4959-4966.

Kay, R.R. & Williams, J. 1999. The *Dictyostelium* genome project: an invitation to species hopping. *Trends Genet.* 15:294-297.

Keeney, D.S. & Waterman, M.R. 1999. Two novel sites of expression of NADPH cytochrome P450 reductase during murine embryogenesis: limb mesenchyme and developing olfactory neuroepithelia. *Dev. Dyn.* 216:511-517.

Kessin, R.H. & Campagne, M. van L. 1992. The development of a social amoeba. *Am. Sci.* 80:556- 565.

Kirton, S.B., Baxter, C.A. & Sutcliffe, M.J. 2002. Comparative modelling of cytochrome P450. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 54:385-406.

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., Dingerman, T. & Nellen, W. 1995. Analysis of gene function in *Dictyostelium*. *Experientia* 51:1116-1123.

Kuspa, A. & Loomis, W.F. 1996. Ordered yeast artificial chromosome clones representing the *Dictyostelium discoideum* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:5562-5566.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 226:680-685.

Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J., Kaderbhai, M.A. & Kelly, S.L. 1999. Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome b5/NADH cytochrome b5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Lett.* 462:283-288.

Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C. & Song, D. et al. 1998. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein

defective in patients with homocystinuria. Proc. Natl. Acad. Sci. U,S,A. 95:3059-3064.

Loomis, W.F. 1982. Development in *Dictyostelium discoideum*. Academic Press. New York.

Loomis, W.F. & Kuspa, A. 1994. REMI-RFLP mapping in the *Dictyostelium* genome. Genetics 138:665-674.

Loomis, W.F. & Kuspa, A. 1997. The genome of *Dictyostelium* – A model System for cell and developmental biology. Chapter 2:15-30.

Loomis, W.F. & Smith, D.W. 1995. Consensus phylogeny of *Dictyostelium*. Experientia 51:1110-1115.

Loomis, W.F. & Söderbom, F. 1998. Cell-cell signaling during *Dictyostelium* development. Trends Microb. 6:402-406.

Maeda, Y. 1997. Cellular and molecular mechanism of the transition from growth to differentiation in *Dictyostelium* cells. In: *Dictyostelium* - A model system for cell and molecular biology. Eds. Y. Maeda, K. Inouye & I. Takeuchi. Universal Academy Press Inc, Tóquio. 207-218.

Maines, M.D. 1988. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. FASEB J. 2:2557-2568.

Mizutani, M. & Ohta, D. 1998. Two isoforms of NADPH:cytochrome P450 reductase in *Arabidopsis thaliana*. Gene structure, heterologous expression in insect cells, and differential regulation. Plant Physiol. 116:357-367.

Morandini, P., Offer, J., Traynor, D., Nayler, O. & Neuhaus, D. et al. 1995. The proximal pathway of metabolism of the chlorinated signal molecule differentiation-inducing factor-1 (DIF-1) in the cellular slime mould *Dictyostelium*. Biochem. J. 306:735-743.

Murataliev, M.B. & Feyereisen, R. 2000. Interaction of NADP(H) with oxidized and reduced P450 reductase during catalysis. Studies with nucleotide analogues. Biochemistry 39:5066-5074.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. & Rodwell, V.W. 1990. 22^a edition, Appleton & Lange.

Mutzel, R. 1995. Molecular biology, growth and development of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Experientia* 51:1103-1109.

Nelson, D.R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.* 369:1-10.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. 1997. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural. Syst.* 8:581-599.

Ninnemann, H. & Maier, J. 1996. Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem. Photobiol.* 64:393-398.

O'Leary, K.A. & Kasper, C.B. 2000. Molecular basis for cell-specific regulation of the NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 379:97-108.

Olteanu, H. & Banerjee, R. 2001. Human methionine synthase reductase, a soluble P450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J. Biol. Chem.* 276:35558-35563.

Paine, M.J.I., Garner, A.P., Powell, D., Sibbald, J. & Sales, M. et al. 2000. Cloning and characterization of a novel human dual flavin reductase. *J. Biol. Chem.* 275:1471-1478.

Paine, M.J., Ayivor, S., Munro, A., Tsan, P. & Lian, L.Y. et al. 2001. Role of the conserved phenylalanine 181 of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in FMN binding and catalytic activity. *Biochemistry* 40:13439-13447.

Paveto, C., Pereira, C., Espinosa, J., Montagna, A.E. & Farber, M. et al. 1995. The nitric oxide transduction in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 270:16576-16579.

Porter, T.D. & Kasper, C.B. 1986. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: Flavin mononucleotide and Flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry* 25:1682-1687.

Porter, T.D. 1991. An unusual yet strongly conserved flavoprotein reductase in bacteria and mammals. *Trends Biochem. Sci.* 16:154-158.

Poulos, T.L., Raman, C.S. & Li, H. 1998. NO news is good news. *Structure*. 6:255-258.

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

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Schacter, B.A., Nelson, E.B., Marver, H.S. & Masters, B.S. 1972. Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J. Biol.Chem.* 247:3601-3607.

Sem, D.S. & Kasper, C.B. 1993. Interaction with arginine 597 of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase is a primary source of the uniform binding energy used to discriminate between NADPH and NADH. *Biochemistry*. 43:11548-11558.

Sevanian, A., Nordenbrand K., Kim, E., Ernster, L. & Hochstein, P. 1990. Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH--cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Radic. Biol. Med.* 8:145-152.

Shen, A.L. & Kasper, C.B. 1993. in *Handbook of Experimental Pharmacology*, eds. Schinkman, J.B. & Greim, H., Springer, New York. 35-59.

Shen, A.L. & Kasper, C.B. 1995. Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 270:27475-27480.

Shen, A.L., O'Leary, K.A. & Kasper, C.B. 2002. Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 277:6536-6541.

Shen, A.L., Porter, T.D., Wilson, T.E. & Kasper, C.B. 1989. Structural analysis of the FMN binding domain of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 264:7584-7589

Shen, A.L., Sem, D.S. & Kasper, C.B. 1999. Mechanistic studies on the reductive half-reaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 274:5391-5398.

Shephard, E.A., Phillips, I.R., Santisteban, I., West, L.F. & Palmer, C.N. et al. 1989. Isolation of a human cytochrome P-450 reductase cDNA clone and localization of the corresponding gene to chromosome 7q11.2. *Ann. Hum. Genet.* 53:291-301.

Simmons, D.L. & Kasper, C.B. 1989. Quantitation of mRNAs specific for the mixed-function oxidase system in rat liver and extrahepatic tissues during development. *Arch. Biochem. Biophys.* 271:10-20.

Smith, G.C.M., Tew, G.D. & Wolf, C.R. 1994. Dissection of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase into distinct functional domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:8710-8714.

Strobel, H.W., Hodgson, A.V. & Shen, S. 1999. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. ed. Ortiz de Montellano. Plenum, New York.

Stromstedt, M., Keeney, D.S., Waterman, M.R., Paria, B.C. & Conley, A.J. et al. 1996. Preimplantation mouse blastocysts fail to express CYP genes required for estrogen biosynthesis. *Mol. Reprod. Dev.* 43:428-436.

Stuehr, D.J. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta* 1411:217-230.

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

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

Sutter, T.R. & Loper, J.C. 1989. Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for NADPH-cytochrome P450 reductase causes increased sensitivity to ketoconazole. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:1257-1266.

Svingen, B.A., Buege, J.A., O'Neal, F.O. & Aust, S.D. 1979. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 254:5892-5899.

Taminato, A., Bagattini, R., Gorjao, R., Chen, G. & Kuspa, A. et al. 2002. Role for YakA, cAMP, and Protein Kinase A in Regulation of Stress Responses of *Dictyostelium discoideum* cells. *Mol. Biol. Cell* 7:2266-2275.

Tao, Y., Howlett, A. & Klein, C. 1992a. Nitric oxide compounds inhibit *Dictyostelium discoideum* aggregation without altering cGMP production. *FEBS Lett.* 314:49-52.

Tao, Y., Howlett, A. & Klein, C. 1992b. Nitric oxide stimulates the ADP-ribosylation of a 41-kDa cytosolic protein in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:5902-5906.

Tao, Y., Howlett, A. & Klein, C. 1996. Nitric oxide inhibits the initiation of cAMP pulsing in *D. discoideum* without altering receptor-activated adenylate cyclase. *Cell Signal.* 8:26-34.

Tao, Y., Misko, T.P., Howlett, A. & Klein, C. 1997. Nitric oxide, an endogenous regulator of *Dictyostelium discoideum* differentiation. *Development.* 124:3587-3595.

Thompson, C.R. & Kay, R.R. 2000. The role of DIF-1 signaling in *Dictyostelium* development. *Mol. Cell* 6:1509-1514.

Truan, G., Epinat, J.C., Rougeulle, C., Cullin, C. & Pompon, D. 1994. Cloning and characterization of a yeast cytochrome b5-encoding gene which suppresses ketoconazole hypersensitivity in a NADPH-P-450 reductase-deficient strain. *Gene*. 142:123-127.

van den Brink, H.J., van Zeijl, C.M., Brons, J.F., van den Hondel, C.A. & van Gorcom, R.F. 1995. Cloning and characterization of the NADPH cytochrome P450 oxidoreductase gene from the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *DNA Cell Biol.* 14:719-729.

Venkateswarlu, K., Lamb, D.C., Kelly, D.E, Manning N.J. & Kelly, S.L. 1998. The N-terminal membrane domain of yeast NADPH-cytochrome P450 (CYP) oxidoreductase is not required for catalytic activity in sterol biosynthesis or in reconstitution of CYP activity. *J. Biol. Chem.* 273:4492-4496.

Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V. & Coon, M.J. 1981. Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* 256:266-277.

Vermilion, J.L. & Coon, M.J. 1978. Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. *J. Biol. Chem.* 253:2694-2704.

Wang, M., Roberts, D.L. & Paschke, R. 1997. Three dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN and FAD containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:8411-8416.

Wilken, M. & Huchzermeyer, B. 1999. Suppression of mycelia formation by NO produced endogenously in *Candida tropicalis*. *Eur. J. Cell Biol.* 78:209-213.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M. & Lyne, R. et al., 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415:871-880.

Yadav, J.S. & Loper, J.C. 2000. Cloning and characterization of the cytochrome P450 oxidoreductase gene from the zygomycete fungus *Cunninghamella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:345-53.

Yamazaki, H., Nakajima, M., Nakamura, M., Asahi, S. & Shimada, N. et al. 1999. Enhancement of cytochrome P-450 3A4 catalytic activities by cytochrome b(5) in bacterial membranes. *Drug. Metab. Dispos.* 27:999-1004.

Yamazaki, H., Shimada, T., Martin, M.V. & Guengerich, F.P. 2001. Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo-cytochrome b5: evidence against transfer of heme from cytochrome P450 3A4 to apo-cytochrome b5 or heme oxygenase. *J. Biol. Chem.* 276:30885-30891.

CURRICULUM VITAE

Daniela Carvalho Gonzalez

Nascida em São Paulo em 06 de março de 1974

EDUCAÇÃO

COLEGIAL: Colégio São Luís (1989)

Colégio FAAP (1990-1991)

GRADUAÇÃO: Universidade de São Paulo - Instituto de Química - BACHAREL
EM QUÍMICA OPÇÃO INDUSTRIAL (1993 - 1999)

OUTROS

Participação na **XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica - SBBq** no período de 19 a 22 de maio de 2001 com o pôster intitulado: **Characterization of redA: a *Dictyostelium discoideum* developmental mutant.**

Ministrou a matéria : **QBQ 2001 - Bioquímica do Envelhecimento** .
Matéria optativa para alunos de graduação no período de 12 a 16 de fevereiro de 2001 sob supervisão do Prof. Bayardo B. Torres.

Ministrou o minicurso **Bioquímica do Envelhecimento** na **XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica - SBBq** no período de 18 a 21 de maio de 2002