



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Juliana Helena Costa Smetana

**“Caracterização das proteínas TIPRL e $\alpha 4$, reguladoras de
fosfatases 2A”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JULIANA HELENA COSTA SMETANA
Nilson I. V. Zanchin
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal e
Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Sm39c

Smetana, Juliana Helena Costa
Caracterização das proteínas TIPRL e alpha4,
reguladoras de fosfatases 2A / Juliana Helena Costa
Smetana. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteínas - Análise. 2. Duplo-híbrido de levedura.
3. Proteína TIP41. 4. Proteína TAP42. 5. Proteína
fosfatase 2A. I. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Characterization of the type 2A phosphatase regulatory proteins, TIPRL and alpha4.

Palavras-chave em inglês: Proteins – Analysis; Yeast two-hybrid; TIP41 protein; TAP42 protein; Protein phosphatase 2A.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Nilson Ivo Tonin Zanchin, Aline Maria da Silva, Sergio Schenkman, Kleber Gomes Franchini, Jörg Kobarg.

Data da defesa: 17/03/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 17 de março de 2009

BANCA EXAMINADORA

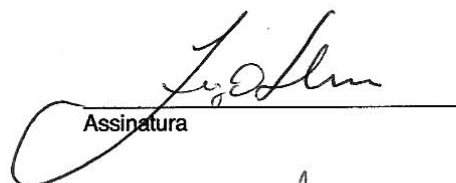
Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin (Orientador)


Assinatura

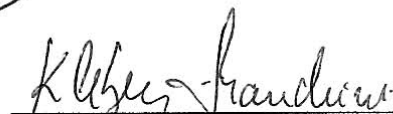
Profa. Dra. Aline Maria da Silva


Assinatura

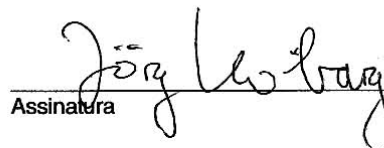
Prof. Dr. Sergio Schenkman


Assinatura

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini


Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg


Assinatura

Profa. Dra . Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura

Profa. Dra. Beatriz Amaral de Castilho

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao LNLS pela oportunidade de desenvolver este projeto e pela excelente infra-estrutura oferecida, e ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Nilson I. T. Zanchin, por me aceitar em seu grupo e acreditar em meu potencial como pesquisadora.

Às funcionárias do LBM, que oferecem todo apoio e mantêm nosso laboratório funcionando - Adriana C. Alves Pinto, Celisa C. Tonoli, Margareth S. Navarro, Elaine C. Teixeira, Givanil L. Garrido, Maria Eugenia Camargo, Tereza C. Lima Silva. Agradeço à Adriana, Elaine, e Tereza também pela grande contribuição a este projeto e pelas missões impossíveis que aceitaram.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP e à secretária Lourdes pelo apoio.

Aos colegas de laboratório Beatriz S. C. Alves, Thais H. Vaz, Patricia P. Coltri, Daniela S. Razolli, Sandra M. N. Scapin, Flavia R. G. Carneiro, Juliana F. Oliveira, Carlos R. C. Paier, Luis Gustavo Morello, Cédric Hesling, Deivid L. Migueleti, Tiago V. Seraphim pela amizade e excelente convivência. Agradeço também à Sandra, ao Carlos e à Daniela pela colaboração direta neste projeto, e ao Cédric pelos primeiros ensinamentos na arte de cultivar células.

Aos colegas da sala ao lado - Daniel M. Trindade, Gustavo C. Bressan, Daniel C. F. Lanza, Alexandre J. C. Quaresma, Marcos Alborguetti, e Flavia C. Nery pela amizade e troca constante de experiências.

Aos membros das bancas de qualificação e pré-banca - Alessandra Alves de Souza, Jörg Kobarg, Maria Cristina C. G. Marcondes, Sandro R. Valentini, pelas ótimas sugestões sobre o desenvolvimento deste trabalho, e aos membros da banca de tese (página III) por aceitar este convite.

Aos ex-estagiários Romenia R. Domingues, Helder A. Silva e Leandro Vieira pela ajuda na expressão e purificação de proteínas.

Aos colaboradores Willy Jablonka e Monica Montero-Lomeli por fornecerem a proteína Tap42, Cristiano L. P. Oliveira e Iris Torriani pela análise dos dados de SAXS, e Thelma A. Pertinhez pela ajuda na interpretação dos dados de dicroísmo circular.

À minha família, e em especial à minha mãe Valquíria Edna Costa, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões. E ao pequeno mestre Alysson Fernandes Mazoni, que fez tudo valer a pena.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE ABREVIACÕES	VIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Vias de sinalização celular	1
1.2. As fosfatases do tipo 2A	2
1.3. Participação das fosfatases 2A na via de sinalização da quinase TOR em levedura	5
1.4. Participação das fosfatases 2A na via de sinalização da quinase mTOR em mamíferos	11
1.5. As proteínas $\alpha 4$ e TIPRL	14
1.6. Referências bibliográficas	20
2. OBJETIVOS	28
3. RESULTADOS	29
3.1	31
<i>Low resolution structure of the human $\alpha 4$ protein (IgBP1) and studies on the stability of $\alpha 4$ and of its yeast ortholog Tap42</i>	
3.2.	43
<i>Identificação de proteínas que interagem com TIPRL no sistema do duplo-híbrido em levedura</i>	
3.3	63
<i>Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, $\alpha 4$ and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL)</i>	
3.4	79
<i>Estudos funcionais das proteínas TIPRL e $\alpha 4$ em culturas de células humanas</i>	
4. DISCUSSÃO	99

4.1. Estudos estruturais de $\alpha 4$ e mecanismo de regulação das fosfatases 2A	99
4.2. Identificação de TIPRL como um novo regulador de fosfatases 2A	103
4.3. Significado funcional do complexo ternário $\alpha 4$:PP2Ac:TIPRL	104
4.3. Participação de $\alpha 4$ e TIPRL na via de sinalização da quinase mTOR	106
4.4. Envolvimento de $\alpha 4$ e TIPRL no controle da expressão gênica	109
4.5. Referências Bibliográficas	111
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	115
6. ANEXO	117
<i>Expressão, purificação e cristalização da proteína TIPRL</i>	

LISTA DE ABREVIACÕES

3-AT	3-aminotriazol
4E-BP1	Proteína de ligação ao fator de início da tradução 4E (<i>4E Binding Protein 1</i>)
ADE	Adenina
AGC	Família das quinases PKA, PKG e PKC
Akt/PKB	Homólogo do oncogene viral de timoma de camundongo/ proteína quinase B (<i>Murine thymoma viral oncogene homolog/ protein kinase B</i>)
AMPK	Proteína quinase ativada por 5' AMP (<i>5' AMP-Activated Protein Kinase</i>)
AP-1	Proteína Ativadora-1 (<i>Activator Protein 1</i>)
ATF	Fator de transcrição ativador (<i>Activating transcription factor</i>)
ATM	Quinase mutada na ataxia telangiectasia (<i>Ataxia Telangiectasia Mutated kinase</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	Quinase relacionada a ATM e Rad3 (<i>ATM- and Rad3-Related Kinase</i>)
AVO1-3	Adere vorazmente a TOR2 (<i>Adheres Voraciously (to TOR2)</i>)
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BIT61	Parceiro de ligação de Tor2p (<i>Binding Partner of Tor2p</i>)
BL21(DE3)	Cepa BL21 de <i>E. coli</i> com o bacteriófago DE3 em estado lisogênico
BLAST	Ferramenta de busca de alinhamento local básica (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
bZIP	Domínio básico com zíper de leucina
c-Myc	Homólogo do oncogene viral de mielocitomatose celular (<i>Cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>)
C-terminal	Extremidade carboxi terminal
C1ORF124	Cromossomo 1, quadro de leitura aberta (<i>open reading frame</i>) 124
C9ORF9	Cromossomo 9, quadro de leitura aberta (<i>open reading frame</i>) 39
C1q	Componente 1 do complemento, subcomponente q (<i>Complement component 1, q subcomponent</i>)
C1QBP	Proteína de ligação a C1q (<i>C1q Binding Protein</i>)
CAMK	Família das calmodulina quinases
CaMKII	Calmodulina quinase II
CD4/CD8	Agregado de diferenciação 4/8 (<i>Cluster of differentiation 4/8</i>)
Cdc5	Ciclo de divisão celular 5 (<i>Cell Division Cycle 5</i>)
CDK	Quinase dependente de ciclina (<i>Cyclin Dependent Kinase</i>)
cDNA	DNA complementar
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanossulfonato
CIP2A	Inibidor celular de PP2A (<i>Cellular Inhibitor of PP2A</i>)

CK1	Família da caseína quinase 1 (<i>Casein Kinase 1</i>)
CLK	Quinase semelhante a CDC (<i>CDC-like Kinase</i>)
CMGC	Família das quinases CDK, MAPK, GSK3 e CLK
CMV	Citomegalovirus
CR2	Região conservada 2 de Tap42
CRE	Elemento de resposta AMP cíclico (<i>Cyclic AMP Responsive Element</i>)
Cre	Cre recombinase
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico
CTD	Domínio C-terminal (<i>C-Terminal Domain</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DTT	1,4-ditiotreitol
ECL	Quimioluminescência aprimorada (<i>Enhanced Chemoluminescence</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EF-1α	Fator de alongamento da tradução 1 α (<i>Elongation Factor 1A</i>)
EF-2	Fator de alongamento da tradução 2 (<i>Elongation Factor 2</i>)
eIF2α	Subunidade α do fator de início de tradução eucariótico 2 (<i>Eukaryotic Initiation Factor 2α</i>)
eIF4E	Fator de início da tradução eucariótico 4E (<i>Eukaryotic Initiation Factor 4E</i>)
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> (<i>Electrospray Ionization</i>)
FITC	Fluoresceína
FKBP	Proteína de ligação a FK506 (<i>FK506 Binding Protein</i>)
FRAP	Proteína associada a FKBP e rapamicina (<i>FKBP-rapamycin-associated protein</i>), mTOR
FRB	Ligação a FKBP12 e rapamicina (<i>FKBP12 Rapamycin Binding</i>)
Gcn2/4	Controle geral não desreprimível 2/4 (<i>General Control Nonderepressible 2/4</i>)
Gln3	Metabolismo de glutamina 3 (<i>Glutamine metabolism 3</i>)
GSK3	Quinase da sintase de glicogênio 3 (<i>Glycogen synthase kinase 3</i>)
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Enzima que catalisa a hidrólise de guanosina trifosfato
HDAC3	Histona deacetilase 3
HEAT	Huntingtina, EEF3, subunidade A de PP2A, TOR1
HEK293	Linhagem de rim embrionário humano 293 (<i>Human Embryonic Kidney 293</i>)
HIS3	Gene que codifica a enzima imidazolglierol-fosfato desidratase
HSB	Tampão de alta concentração de sal (<i>High Salt Buffer</i>)
IgBP1	Proteína ligadora de imunoglobulina 1 (<i>Immunoglobulin Binding Protein 1</i> (α 4))

Int-6	Sítio de integração 6 do vírus de tumor de glândula mamária de camundongo
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
IRF-1	Fator regulador de interferon 1 (<i>Interferon Regulatory Factor 1</i>)
IRS	Substrato do receptor de insulina (<i>Insulin Receptor Substrate</i>)
IκB	Inibidor de NF- κ B
JAK	Quinase Janus (<i>Janus Kinase</i>)
kDa	Quilodaltos
KOG1	Controlador do crescimento 1 (<i>Kontroller of Growth 1</i>)
LazZ	Gene que codifica a enzima β -galactosidase
LCMT-1	Leucina carboxil metiltransferase 1 (<i>Leucine Carboxyl Methyltransferase-I</i>)
lexA	Repressor lexA
LoxP	<i>Locus de crossing-over P1 (Locus of X-over P1)</i>
LSB	Tampão de baixa concentração de sal (<i>Low Salt Buffer</i>)
LST8	Letal com Sec treze 8 (<i>Lethal with Sec Thirteen 8</i>)
MafB	Família do oncogene de fibrosarcoma musculoponeurótico V-maf (<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family</i>)
MALDI	Dessorção/ionização assistida por matriz (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
MARE	Elemento de reconhecimento de Maf (<i>Maf Recognition Element</i>)
MEM	Meio mínimo essencial alfa (<i>Minimum Essential Alpha Medium</i>)
MBP	Proteína básica de mielina (<i>Myelin Basic Protein</i>)
mDAP-3	Proteína associada à morte de mamíferos 3 (<i>Mammalian Death Associated Protein 3</i>)
MDM2	<i>Double minute</i> de camundongo 2 (<i>Mouse Double Minute 2</i>)
MEK3	Proteína quinase da quinase ativada por mitógenos 3 (<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 3</i>)
MID1/2	Linha média 1/2 (<i>Midline 1/2</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
Msn2/Msn4	Supressor de múltiplas cópias da mutação de SNF1 (<i>Multicopy suppressor of SNF1 mutation</i>)
mTOR	Alvo da rapamicina de mamíferos (<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>)
mTORC1/2	Complexos 1 e 2 da quinase mTOR
MWCO	Limiar de massa molecular (<i>Molecular Weight Cutoff</i>)
N-terminal	Extremidade amino terminal
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>

NDEL1	Fator semelhante ao homólogo do gene de distribuição nuclear NudE de <i>A. nidulans</i> 1 (<i>NudE nuclear distribution gene E homolog (A. nidulans)-like 1</i>)
NIF	Fosfatase semelhante ao fator que interage com NL1 (<i>NLI interacting factor-like phosphatase</i>)
Nf-κB	Fator nuclear κ B (<i>Nuclear Factor κB</i>)
Npr1	Reativador de permease de nitrogênio 1 (<i>Nitrogen Permease Reactivator 1</i>)
O-GlcNAcase	β -N-acetilglicosaminidase
OGT	Uridina difosfo-N-acetilglicosamina:polipetídeo L-N-acetilglicosaminiltransferase
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCAF	Fator associado a p300/CBP (<i>p300/CBP-associated factor</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PK1	Quinase da desidrogenase de piruvato, isoenzima 1 (<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase, isozyme 1</i>)
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIAS1	Proteína inibidora de STAT1 ativado (<i>Protein Inhibitor of Activated STAT1</i>)
PKA	Proteína quinase A (<i>Protein Kinase A</i>)
PKC	Proteína quinase C (<i>Protein Kinase C</i>)
PKG	Proteína quinase G (<i>Protein Kinase G</i>)
PMA	Forbol 12-Miristato 13-Acetato
PME-1	Metilesterase de PP2A 1 (<i>PP2A methylesterase-1</i>)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonila
PNPP	p-nitrofenil fosfato
PP1	Proteína fosfatase 1 (<i>Protein Phosphatase 1</i>)
PP2A	Proteína fosfatase 2A (<i>Protein Phosphatase 2A</i>)
PP2B	Proteína fosfatase 2B (<i>Protein Phosphatase 2B</i>)
PP2C	Proteína fosfatase 2C (<i>Protein Phosphatase 2C</i>)
PP4	Proteína fosfatase 4 (<i>Protein Phosphatase 4</i>)
PP4R1/2/3/4	Subunidades regulatórias de PP4
PP6	Proteína fosfatase 6 (<i>Protein Phosphatase 6</i>)
Pph21/22	Proteína fosfatase 21/22 (<i>Protein Phosphatase 21/22</i>)
Pph3	Proteína fosfatase 3 (<i>Protein Phosphatase 3</i>)
PPP	Fosfatase de fosfoproteína (<i>Phospho Protein Phosphatase</i>)
PSIPRED	Servidor de predição de estrutura de proteínas (<i>Protein Structure Prediction Server</i>)
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina (<i>Phosphatase and Tensin Homologue</i>)
PTP	Fosfatase de fosfotirosina (<i>Phospho Tyrosine Phosphatase</i>)

Q-TOF	Quadrupolo-tempo de voo (<i>Quadrupole-Time of Flight</i>)
Rac1	Substrato C3 da toxina botulínica relacionado a Ras 1 (<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>)
RACK1	Receptor da quinase C ativada 1 (<i>Receptor of Activated C Kinase 1</i>)
RAFT1	Alvos de rapamicina e FKBP12 1 (<i>Rapamycin and FKBP12 Targets 1</i>), mTOR
RalA	Homólogo v-Ral do oncogene viral de leucemia de símios relacionado a Ras A (<i>v-Ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)</i>)
Raptor	Proteína regulatória associada a mTOR (<i>Regulatory Associated Protein of mTOR</i>)
RBCC	Domínio <i>RING-finger B-box coiled-coil</i>
Rbp1	Proteína ligadora de rapamicina 1 (<i>Rapamycin Binding Protein 1</i>)
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido no cérebro (<i>Ras Homolog Enriched in Brain</i>)
Rho	Família gênica de homólogos de Ras (<i>Ras homolog gene family</i>)
Rictor	Companheiro de mTOR independente de rapamicina (<i>Rapamycin Independent Companion of mTOR</i>)
RNA	Ácido Ribonucléico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RTqPCR	Reação em cadeia da polimerase/transcrição reversa quantitativa em tempo real
S6	Proteína ribossomal da subunidade menor 6
S6K	Quinase da proteína ribossomal S6
SAPs	Proteínas associadas a Sit4 (<i>Sit4 Associated Proteins</i>)
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (<i>Small Angle X-Ray Scattering</i>)
SD	Meio definido sintético (<i>Synthetic Defined</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>)
SF2/ASF	Fator de <i>splicing</i> 2/ Fator de <i>splicing</i> alternativo (<i>Splicing factor 2/ Alternative Splicing Factor</i>)
SFRS	Fator de <i>splicing</i> rico em arginina e serina (<i>Splicing factor, arginine/serine-rich</i>)
Sit4	Transcrito induzido por esporulação 4 (<i>Sporulation-Induced Transcript 4</i>)
SMN	Sobrevivência de neurônios motores (<i>Survival of Motor Neurons</i>)
SR	Domínio rico em serinas (<i>Serine Rich</i>)
STAGA	Complexo que contém SPT3-TAF9-GCN5 (<i>SPT3-TAF9-GCN5-containing complex</i>)
STAT1	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>)
STE	homólogas das quinases <i>Sterile</i> de levedura

Stk11	<i>Quinase de serina e treonina 11 (Serine/threonine kinase 11)</i>
TAF10	Fator associado a TBP 10 (<i>TBP Associated Factor 10</i>)
TAK1	Quinase ativada por TGF-beta 1 (<i>TGF-beta activated kinase 1</i>)
Tap42	Proteína associada a fosfatase 2A, 42 kDa (<i>Two-A Associated Protein, 42 kDa</i>)
TBP	Proteína ligadora de <i>TATA box</i> (<i>TATA-binding protein</i>)
TBS	Solução salina tamponada com Tris (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TEV	<i>Protease do vírus do tabaco (Tobacco Etch Virus protease)</i>
TFIID	Fator de início da transcrição IID (<i>Transcription Factor IID</i>)
TFTC	Complexo que contém TAF e não contém TBP (<i>TBP-free TAF containing complex</i>)
Tip41	Proteína que interage com Tap42 de 41 kDa (<i>Tap42-interacting protein of 41 kDa</i>)
TIPRL	Proteína semelhante ao regulador da via TOR (<i>TOR Signaling Pathway Regulator like</i>), hTip41
TIPRLAC	TIPRL com deleção da extremidade C-terminal
TIPRLAN	TIPRL com deleção da extremidade N-terminal
TIPRLANC	TIPRL com deleção das extremidades N e C-terminais
TK	Quinases de tirosina (<i>Tyrosin Kinases</i>)
TLK	Quinases relacionadas a quinases de tirosina (<i>Tyrosin Kinase Like</i>)
TOR	Alvo da rapamicina (<i>Target of Rapamycin</i>)
TPA	2-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
Tpd3	<i>tRNA Processing Deficient, Regulatory subunit A of the heterotrimeric protein phosphatase 2A</i>
TRE	Elemento de resposta a TPA (<i>TPA Responsive Element</i>)
tRNA	RNA transportador
TSC1/TSC2	Complexo da esclerose tuberosa (<i>Tuberous Sclerosis Complex</i>)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
YNB	Base de nitrogênio de leveduras (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)

RESUMO

As células respondem constantemente a uma enorme variedade de estímulos, que são interpretados e integrados por meio de redes de sinalização, dando origem a uma resposta biológica. Defeitos nesses circuitos são a causa de diversas doenças, incluindo muitos, se não todos os tipos de câncer. As fosfatases, enzimas que removem grupamentos fosfato dos substratos de quinases, dependem principalmente de subunidades regulatórias para definir sua especificidade. As fosfatases do tipo 2A constituem a subfamília PPP, que é formada por PP2A, PP4 e PP6. PP2A é a principal fosfatase solúvel de fosfoserina e fosfotreonina em células animais e é encontrada predominantemente como uma holoenzima formada por uma subunidade catalítica (C), uma subunidade regulatória (B, B', B'' ou B''') e uma de ancoragem (PR65/A). Em levedura, as fosfatases 2A desempenham um importante papel na via da quinase TOR, o que ocorre por meio da proteína essencial Tap42. A proteína Tip41 foi identificada como um parceiro de interação de Tap42 e regulador da via da quinase TOR em levedura. A homóloga de Tap42 em mamíferos, chamada de $\alpha 4$, está envolvida na regulação de diversos processos celulares, como diferenciação, desenvolvimento, migração celular e apoptose, por meio de seu papel conservado de regulador de fosfatases 2A. A homóloga em mamíferos de Tip41, chamada TIPRL, é uma proteína ainda pouco caracterizada. Este trabalho teve como objetivo analisar a função das proteínas $\alpha 4$ e TIPRL humanas e esclarecer seu papel na regulação de fosfatases 2A. A caracterização estrutural de $\alpha 4$ e Tap42, usando dados de SAXS, dicroísmo circular e proteólise limitada, mostrou que essas proteínas apresentam um domínio N-terminal compacto formado por α -hélices e um domínio C-terminal desestruturado. Em uma triagem de interações com a proteína TIPRL humana, identificamos as fosfatases PP2Ac, PP4c e PP6c como seus parceiros de interação, assim como os fatores de transcrição MafB e TAF10. Ao contrário do esperado a partir do modelo de levedura, $\alpha 4$ e TIPRL não interagem diretamente, mas formam um complexo ternário com PP2Ac. Uma triagem de substratos de fosfatases 2A regulador por TIPRL identificou os fatores de *splicing* SF2/ASF e SF2p32. Nossos resultados sugerem um modelo estrutural para a regulação das fosfatases 2A por $\alpha 4$ e mostram que TIPRL é um novo regulador comum dessas fosfatases com funções na regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

Cells respond constantly to a variety of stimuli, which are interpreted and integrated through signaling networks, giving rise to biological responses. Defects in this circuitry are a cause of many diseases, including cancer. Protein phosphatases are enzymes which remove phosphate groups from kinase substrates, relying mainly on regulatory subunits for their substrate specificity. Type 2A phosphatases belong to the PPP subfamily, which is formed by PP2A, PP4 and PP6. PP2A is the major soluble serine/threonine phosphatase in animal cells and is found predominantly as a heterotrimer composed of a catalytic (C), a regulatory (B, B', B'' or B''') and a scaffold (PR65/A) subunit. Type 2A phosphatases play a major role in the yeast TOR signaling pathway through their interaction with the essential protein Tap42. Tip41 was identified as a Tap42 interacting protein and regulator of the TOR pathway. $\alpha 4$, the mammalian orthologue of Tap42, regulates many cellular processes such as differentiation, development, cell migration and apoptosis as a conserved type 2A phosphatase regulator. TIPRL, the mammalian orthologue of Tip41, is still poorly characterized. The objective of the present work was to analyse the function of $\alpha 4$ and TIPRL and improve the understanding of their role as type 2A phosphatase regulators. The structural characterization of $\alpha 4$ using SAXS analyses, circular dichroism and limited proteolysis, showed that these proteins are formed by an α -helical N-terminal domain and an unfolded C-terminal domain. A screen for TIPRL interacting proteins identified PP2Ac, PP4c and PP6c and also the transcription factors MafB and TAF10. Unlike their yeast counterparts, $\alpha 4$ and TIPRL do not interact directly, but rather form a ternary complex with PP2A. A search for type 2A phosphatase substrates regulated by TIPRL identified the splicing factor SF2/ASF and its regulatory protein SF2p32. Our results suggest a structural model for the regulation of type 2A phosphatases by $\alpha 4$ and show that TIPRL is a novel common regulator of these phosphatases which functions in regulation of gene expression.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vias de sinalização celular

As células respondem constantemente a uma enorme variedade de estímulos externos, que são interpretados e integrados por meio de redes de sinalização, dando origem a uma resposta biológica - por exemplo, diferenciação, apoptose ou migração. Em organismos multicelulares, esses estímulos geralmente consistem em sinais químicos que são recebidos por proteínas de membrana ou por receptores intracelulares e processados por meio de eventos de fosforilação reversível, que alteram o estado de ativação e localização de fatores de transcrição específicos, resultando na alteração da expressão gênica. Defeitos nesses circuitos são a causa de diversas doenças, incluindo muitos, se não todos os tipos de câncer.

As quinases, enzimas que catalisam a transferência de um grupamento fosfato por meio da hidrólise de ATP, são peças-chave nesses processos. O genoma humano contém 518 genes que codificam quinases, dos quais 478 fazem parte de uma única superfamília dividida em sete grandes famílias (Manning, et al. 2002). Essas enzimas apresentam especificidade para resíduos de tirosina ou serina e treonina, e cada uma delas reconhece esses resíduos dentro de uma sequência consenso específica. As quinases atuam nas redes de sinalização de forma sequencial, propagando sinais na forma de cascatas de fosforilação.

Tão importantes quanto as quinases nas redes de sinalização celular são as fosfatases que, ao remover os grupamentos fosfato das quinases e de seus substratos, permitem que os sinais tenham duração limitada e assim promovem a homeostasia celular. Em contraste com a grande diversidade de quinases, observa-se um número reduzido de genes que codificam fosfatases (cerca de 140 no genoma humano). As fosfatases em eucariotos se dividem em quatro famílias: as famílias PPP (*Phospho Protein Phosphatase*) e PP2C de fosfatases de fosfoserina e fosfotreonina, a família PTP (*Phospho Tyrosine Phosphatase*) das fosfatases de fosfotirosina ou de dupla especificidade, e a família NIF (*NLI interacting factor-like phosphatase*) de fosfatases que agem sobre o domínio CTD da RNA polimerase II (Wilkes and Doerig, 2008). No caso das enzimas específicas para resíduos de serina e treonina, observa-se uma discrepância de números

ainda maior: existem 388 genes que codificam quinases com essa especificidade no genoma humano, e apenas 38 codificam fosfatases. Já que ambos os grupos respondem pela mesma diversidade de substratos, devem existir mecanismos compensatórios para a reduzida variedade de fosfatases - o que se observa na grande diversidade de subunidades regulatórias que estas apresentam. O fato de as fosfatases dependerem de subunidades regulatórias para definir sua especificidade, em contraste com os motivos lineares identificados pela maioria das quinases, dificulta o uso de ferramentas de bioinformática e exige maior esforço experimental na identificação de seus substratos. Em consequência dessas dificuldades, assim como fatores históricos, as fosfatases têm sido menos estudadas que as quinases, o que se reflete também em uma relativa escassez de informações disponíveis sobre essas proteínas. Este trabalho se concentra no papel de duas proteínas reguladoras, $\alpha 4$ e TIPRL, envolvidas no controle de diversos processos celulares por meio das fosfatases do tipo 2A.

1.2. As fosfatases do tipo 2A

As fosfatases do tipo 2A fazem parte da subfamília PPP e compreendem PP2A, PP4 e PP6, as ortólogas em mamíferos das fosfatases de levedura Pph21/22, Pph3 e Sit4, respectivamente. Além da similaridade de sequência, essas fosfatases compartilham a sensibilidade à inibição por ácido ocadáico (em concentrações da ordem de nanomolar) e a metilação em um resíduo de leucina conservado no extremo C-terminal da subunidade catalítica, que regula a associação de outras subunidades. Essas fosfatases apresentam uma ampla gama de substratos e atuam em vários processos celulares, como a transcrição, tradução, regulação do ciclo celular e apoptose. As subunidades catalíticas das fosfatases 2A são encontradas em complexos com outras subunidades (**Figura 1.1**).

PP2A é a principal fosfatase solúvel de fosfoserina e fosfotreonina em células animais e é encontrada predominantemente como uma holoenzima formada por uma subunidade catalítica (C), uma subunidade regulatória (B, B', B" ou B''') e uma de ancoragem (PR65/A) (Eichhorn, et al. 2008; Goldberg 1999; Zabrocki, et al. 2002; Zolnierowicz 2000). As subunidades catalítica e de ancoragem humanas apresentam duas isoformas cada uma (α e β) e, juntas, formam o "core"

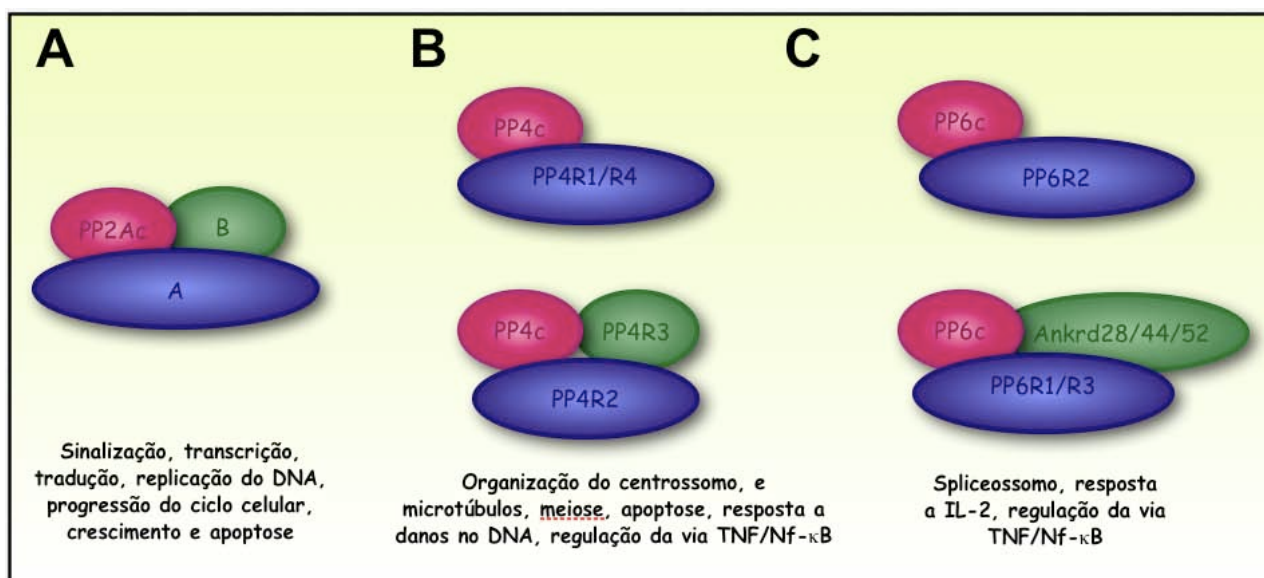


Figura 1.1 Representação esquemática dos complexos das subunidades catalíticas das fosfatases PP2A (A), PP4 (B) e PP6 (C) com suas respectivas subunidades regulatórias ou de ancoragem. Algumas das funções celulares desempenhadas por essas fosfatases são citadas abaixo de cada uma delas.

enzimático. A subunidade PR65/A é formada por repetições HEAT (*Huntingtin*, *EEF3*, *A subunit of PP2A*, *TOR1*), que se enovelam formando um solenóide de formato alongado (Groves, et al. 1999; Kobe, et al. 1999). As subunidades regulatórias pertencem a quatro famílias distintas, sendo cada uma delas composta por diversas isoformas, e determinam a localização subcelular, estado de ativação e especificidade de substrato da holoenzima. A montagem da holoenzima é regulada por modificações pós-traducionais do extremo C-terminal da subunidade catalítica, incluindo a metilação da leucina 309, que é catalisada pela enzima LCMT-1 (*leucine carboxyl methyltransferase-1*) e removida por PME-1 (*PP2A methylesterase-1*).

PP2A também é alvo de regulação por outras proteínas celulares e várias proteínas virais. Diversos estudos têm apontado PP2A como um supressor tumoral que age desfosforilando e inibindo a atividade de produtos de proto-oncogenes como o fator de transcrição c-Myc, a quinase Akt/PKB e a GTPase RalA. A inativação de PP2A por mutações, antígenos tumorais virais (*SV40 small T*) ou proteínas celulares (CIP2A - *cellular inhibitor of PP2A*) é um passo importante entre a imortalização celular e a transformação maligna (Janssens, et al. 2005; Mumby 2007; Westermarck and Hahn 2008).

Uma forma da holoenzima contendo a subunidade regulatória B56/PR61 teve sua estrutura cristalográfica resolvida recentemente em dois trabalhos independentes (Cho and Xu 2007; Xu, et al. 2006) (**Figura 1.2**). A conformação da subunidade A no complexo heterotrimérico difere daquela observada na proteína isolada (Groves et al. 1999) ou no complexo dimérico com a subunidade catalítica (Xing, et al. 2006), assumindo uma forma de ferradura que permite a interação simultânea com as subunidades B e C. A subunidade B56/PR61 apresenta uma estrutura semelhante à subunidade A, sendo formada por repetições pseudo-HEAT. A subunidade catalítica se assemelha estruturalmente às fosfatases PP1 e PP2B, e apresenta uma cauda C-terminal desestruturada que interage com uma região carregada negativamente entre as subunidades A e B. Essa observação sugeriu um mecanismo de regulação da montagem do complexo baseado na neutralização de cargas negativas promovida pela metilação do extremo C-terminal da enzima (Cho and Xu 2007). O sítio ativo encontra-se na face oposta à subunidade A e forma uma interface com a subunidade B, que pode dessa maneira regular a especificidade da holoenzima. Diversas mutações previamente descritas em tumores foram localizadas na interface entre as subunidades, sugerindo que seu efeito tumorigênico poderia resultar da desestabilização estrutural da holoenzima (Cho and Xu 2007).

As fosfatases PP4 e PP6 são menos estudadas que PP2A, mas evidências recentes sugerem que a organização heterotrimérica também é observada para essas fosfatases. PP4 é uma fosfatase envolvida na maturação do centrosomo em células animais e na montagem do spliceossomo por meio de sua interação com membros do complexo SMN (*Survival of Motor Neurons*), o que é coerente com sua localização nuclear e pericentriolar (Cohen, et al. 2005). Três subunidades provavelmente formadas por repetições HEAT foram descritas para esta fosfatase (PP4R1, PP4R2 e PP4R4), provavelmente desempenhando papel semelhante ao da subunidade A de PP2A (Chen, et al. 2008; Cohen et al. 2005), e uma terceira subunidade chamada PP4R3 foi descrita formando um complexo sensível a cisplatina com o heterodímero PP4c-PP4R2 (Gingras, et al. 2005). Os alvos celulares descritos para PP4 incluem Nf- κ B (Hu, et al. 1998), HDAC3 (Zhang, et al. 2005), NDEL1 (Toyo-oka, et al. 2008) e γ -H2X (Chowdhury, et al. 2008; Nakada, et al. 2008). PP6 apresenta três subunidades de ancoragem (PP6R1, PP6R2 e PP6R3) que

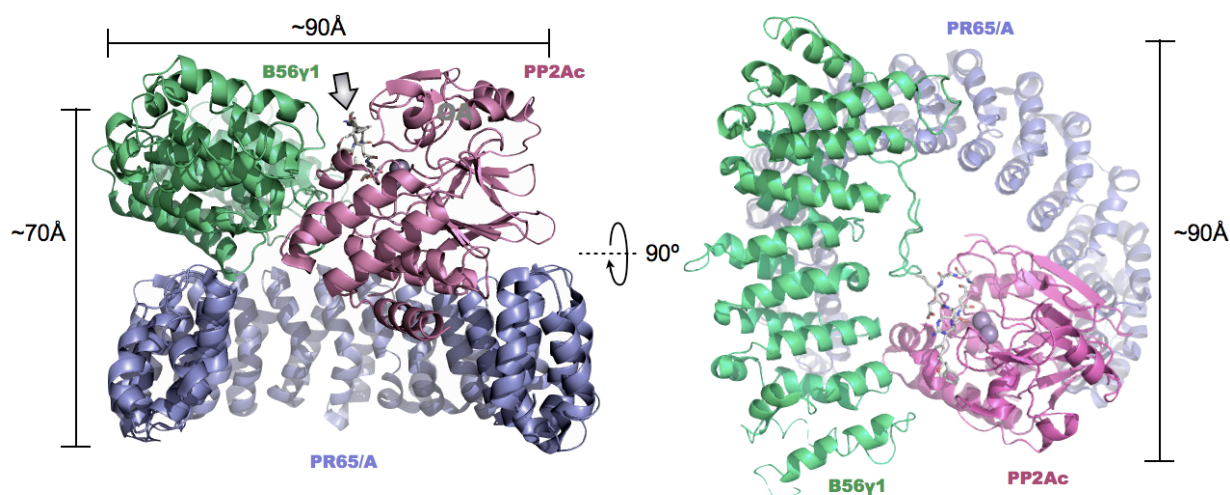


Figura 1.2. Representação do tipo *cartoon* da estrutura cristalográfica do heterotrímero formado por PP2Ac (magenta), PR65/A (azul) e B56γ1 (verde). As esferas em cor cinza ligadas à subunidade catalítica correspondem a dois íons de magnésio, e o inibidor microcistina aparece ligado ao sítio ativo (marcado com uma seta). São mostradas uma visão "frontal" (esquerda) e uma visão "de cima", rotacionada de 90° (direita). As dimensões aproximadas do complexo são 90 x 90 x 70 Å. Figura modificada de (Cho and Xu 2007).

compartilham um domínio conservado de associação a Sit4 chamado SAPS (Stefansson and Brautigan 2006), e uma possível subunidade regulatória formada por repetições "*ankyrin*" foi descrita recentemente (Stefansson, et al. 2008). A função celular de PP6 ainda é pouco conhecida, mas dados recentes sugerem um envolvimento na progressão do ciclo celular (Stefansson and Brautigan 2007) e na resposta a citocinas inflamatórias por meio de IκB (Stefansson and Brautigan 2006) e TAK1 (Kajino, et al. 2006).

1.3. Participação das fosfatases 2A na via de sinalização da quinase TOR em levedura

O controle do crescimento celular em resposta a nutrientes em células eucarióticas é mediado por uma via de sinalização que atua sobre diversos processos celulares e é coordenada pela quinase TOR (*Target Of Rapamycin*). Essa quinase foi identificada inicialmente em *Saccharomyces cerevisiae* como o alvo da rapamicina, uma substância isolada de uma cepa de

Streptomyces hygroscopicus encontrada na ilha de Páscoa (Rapa Nui) que apresenta propriedades antifúngicas, imunossupressoras e antitumorais. Dois genes, *TOR1* e *TOR2*, codificam duas quinases de 280 kDa que apresentam 67% de identidade de sequência e são compostas de seis domínios (**Figura 1.3**). Dois domínios N-terminais formados por repetições HEAT participam de interações entre proteínas, assim como o domínio FAT. O domínio catalítico, que apresenta similaridade com PI3K, localiza-se na região C-terminal e é seguido por uma pequena região conservada denominada FATC, que é encontrada apenas em combinação com o domínio FAT e parece ser importante para a atividade catalítica. A rapamicina, em complexo com seu receptor celular Rbp1/FKBP1, interage com o domínio FRB (*Fragment Rapamycin Binding*). A quinase TOR é encontrada em dois complexos distintos, TORC1 e TORC2. TORC1 é formado por TOR1 ou TOR2, LST8, KOG1 e TCO89, e é responsável pela organização temporal do crescimento, isto é, determinar se a célula cresce ou não. Seus alvos incluem a regulação da biogênese de ribossomos, o controle da tradução, a renovação de transportadores de nutrientes, a inibição da autofagia e da transcrição de genes de resposta a estresse. Já o complexo TORC2 é formado por TOR2, LST8, AVO1-3 e BIT61, e atua no controle espacial do crescimento por meio do citoesqueleto de actina (Loewith, et al. 2002). Apenas TORC1 é inibido por rapamicina, e o mecanismo dessa inibição ainda não é completamente entendido, mas parece envolver a interação com os alvos da quinase e não sua atividade enzimática.

As fosfatases 2A desempenham um importante papel na via da quinase TOR em levedura, o que ocorre por meio da proteína essencial Tap42 (*Two-A Associated Protein, 42 kDa*). Tap42 foi isolada como um supressor de alto número de cópias de uma mutação termossensível de Sit4, a ortóloga em levedura de PP6c (Di Como and Arndt 1996). Tap42 interage fisicamente com Sit4 e também com Pph21/22, ortóloga de PP2Ac, e forma com essas fosfatases um complexo que independe de outras subunidades regulatórias e se dissocia na presença de rapamicina. A superexpressão de Sit4 ou de Pph21/22 resulta em uma redução da taxa de crescimento, que é ainda mais pronunciada em combinação com a superexpressão de Tap42, sugerindo que esta seja um regulador positivo das fosfatases. TOR fosforila Tap42 diretamente, e sua desfosforilação

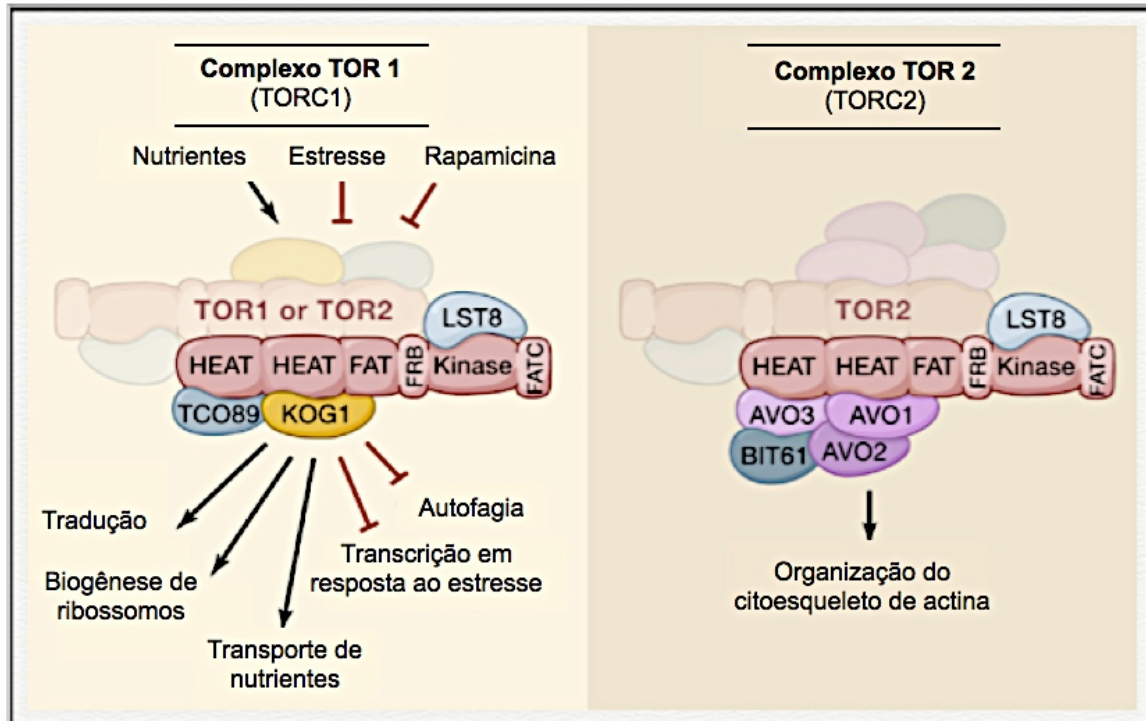


Figura 1.3. Representação esquemática da composição de domínios da quinase TOR de levedura e dos dois complexos de proteínas que contêm essa quinase. TORC1 (esquerda) é composto por TOR1 ou TOR2, LST8, KOG1 e TCO89, responde a nutrientes e é inibido por estresse e rapamicina. Entre seus alvos estão a promoção da biogênese de ribossomos por meio da transcrição de genes ribossomais, o início da tradução e o transporte de nutrientes por meio de permeases de alta afinidade. TORC1 inibe vias relacionadas ao estresse e à falta de nutrientes, como a autofagia e a transcrição de genes de resposta a estresse. TORC2 (direita) é composto por TOR2, LST8, AVO1-3 e BIT61 e regula a organização do citoesqueleto de actina em resposta a estímulos ainda desconhecidos. Tanto TORC1 quanto TORC2 são encontrados na forma de dímeros. Figura traduzida de (Wullschlegel, et al. 2006).

depende de Pph21/22 na sua forma heterotrimérica com as subunidades A (Tpd3) e B (Cdc55) (Jiang and Broach 1999).

Grande parte das funções celulares controladas por TOR são mediadas por Tap42 (**Figura 1.4A**). A inibição da transcrição de genes de resposta a estresse e escassez de nutrientes depende do confinamento dos fatores de transcrição Msn2/Msn4 e Gln3 no citoplasma, impedindo seu acesso aos genes alvo, e no caso de Gln3 esse confinamento depende de sua fosforilação promovida por TOR por meio de Tap42 (Beck and Hall 1999). Outra função de TOR é controlar a renovação dos transportadores de nutrientes, inibindo a degradação de transportadores de alta

afinidade. Na presença de nutrientes, TOR promove a fosforilação e inativação da quinase Npr1 por meio de Tap42, inibindo a degradação do transportador de triptofano de alta afinidade Tat3 (Schmidt, et al. 1998). Tap42 também é essencial na ativação do início da tradução promovida por TOR (Di Como and Arndt 1996), e um mecanismo proposto envolve a fosforilação e inativação da quinase Gcn2, responsável pela fosforilação do fator de início da tradução eIF2 α . A fosforilação de eIF2 α por Gcn2 ocorre diante da escassez de aminoácidos e resulta na redução da tradução em geral e no aumento da tradução do mRNA que codifica Gcn4, um ativador transcricional de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos. Na presença de aminoácidos, a quinase Gcn2 seria inativada por TOR via Tap42 resultando em um aumento na tradução em geral (Cherkasova and Hinnebusch 2003). Tap42 também atua na organização do citoesqueleto de actina por meio da GTPase Rho2 (Wang and Jiang 2003), na diferenciação das células de levedura em pseudo-hifas (Cutler, et al. 2001) e no silenciamento transcricional do transposon Ty1(Jiang 2008), sendo todos eventos regulados por TOR.

Na maior parte dos casos descritos acima, Tap42 promove a fosforilação de seus alvos, sugerindo uma função inibitória na regulação das fosfatases 2A. No entanto, análises genéticas sugeriram que Tap42 regula positivamente as fosfatases (Di Como and Arndt 1996; Jiang and Broach 1999), o que gerou interpretações controversas a respeito de sua função. O fato de Tap42 ser essencial para a função de Sit4 e Pph21/22 (Wang, et al. 2003) também não é coerente com uma função inibitória. Uma alternativa para conciliar esses dados seria supor que Tap42 age como um regulador positivo, mas não da atividade das fosfatases, e sim da proteção dos sítios fosforilados, agindo como uma antifosfatase (Jiang and Broach 1999). Outra hipótese, decorrente da análise global de alvos de Tap42 no controle da transcrição, sugere que Tap42 atua como um inibidor da fosfatase quando se encontra fosforilada e como um ativador quando se encontra desfosforilada (Düvel, et al. 2003). Essa idéia é coerente com dados recentes que mostram que o complexo entre Tap42 e Sit4 encontra-se associado à membrana e interage com TORC1 na presença de nutrientes, sendo liberado para o citoplasma após o tratamento com rapamicina ou na ausência de nutrientes (Yan, et al. 2006). Esses modelos são representados nas **figuras 1.4B e 1.4C**. De acordo com esses resultados, a aparente dissociação entre Tap42 e Sit4 em resposta ao

tratamento com rapamicina é um evento secundário, ocorrendo lentamente após a liberação do complexo para o citoplasma.

Outra proteína envolvida na regulação de fosfatases 2A em levedura, chamada Tip41 (*TAP42-interacting protein of 41 kDa*), foi identificada em uma triagem pelo método do duplo-híbrido como um parceiro de interação de Tap42 (Jacinto, et al. 2001). Ao contrário de Tap42, Tip41 não é uma proteína essencial, e sua deleção confere resistência à rapamicina e suprime uma mutação termossensível de Tap42, sugerindo uma participação de Tip41 na via da quinase TOR antagonizando a função de Tap42. A interação de Tip41 com Tap42 é estimulada por rapamicina e faz parte de uma alça de *feedback* que ativa rapidamente a fosfatase Sit4 em condições que inativam a quinase TOR. Na presença de nutrientes, TOR é ativada e fosforila Tip41, que então se

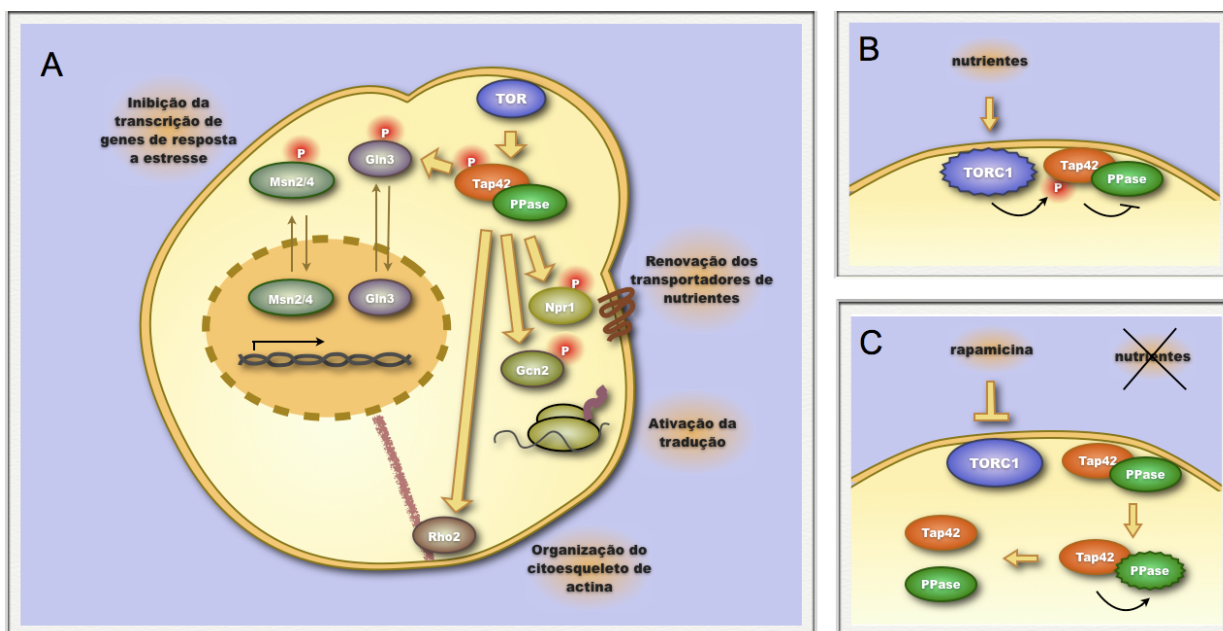


Figura 1.4. Funções do complexo Tap42/Fosfatase 2A (PPase) na via de sinalização da quinase TOR em levedura. **A:** Representação esquemática dos eventos celulares regulados por TOR via Tap42, como descrito no texto. **B, C:** modelo do mecanismo de regulação de Tap42/Fosfatase 2A por TOR. Na presença de nutrientes (**B**), o complexo TORC1 encontra-se ativo e fosforila Tap42, que inibe a fosfatase 2A. Todas as proteínas envolvidas encontram-se em um grande complexo associado à membrana. Na ausência de nutrientes ou na presença de rapamicina (**C**), a quinase TOR deixa de fosforilar Tap42, que é desfosforilada, provavelmente por PP2A na sua forma heterotrimérica. O complexo Tap42/Fosfatase se dissocia rapidamente de TORC1 e se desloca para o citoplasma, onde a fosfatase é ativada por Tap42 e desfosfolila seus alvos. A dissociação do complexo entre Tap42 e fosfatase ocorre em seguida, resultando na inativação da fosfatase. Modelo adaptado de Yan et al., 2006, e Düvel et al., 2003.

dissocia de Tap42 e permite sua associação com Sit4. Na ausência de nutrientes ou na presença de rapamicina, Tip41 é desfosforilada por Sit4 e se associa a Tap42, deixando livre a fosfatase Sit4, que então se associa às SAPs (*Sit4 Associated Proteins*) e desfosforila seus alvos na célula, como o fator de transcrição Gln3 e a quinase Npr1 (**Figura 1.5**). Esse mecanismo de regulação parece ser ainda mais importante que a fosforilação direta de Tap42 por TOR, já que a deleção da Tip41 confere resistência à rapamicina (Jacinto et al. 2001). A ortóloga de Tip41 em *Schyzosaccharomyces pombe* também foi caracterizada como um regulador de fosfatases 2A (Fenyvuesvolgyi, et al. 2005). Ainda não está claro como a proteína Tip41 se encaixaria nos modelos mais recentes da regulação de Sit4 por Tap42.

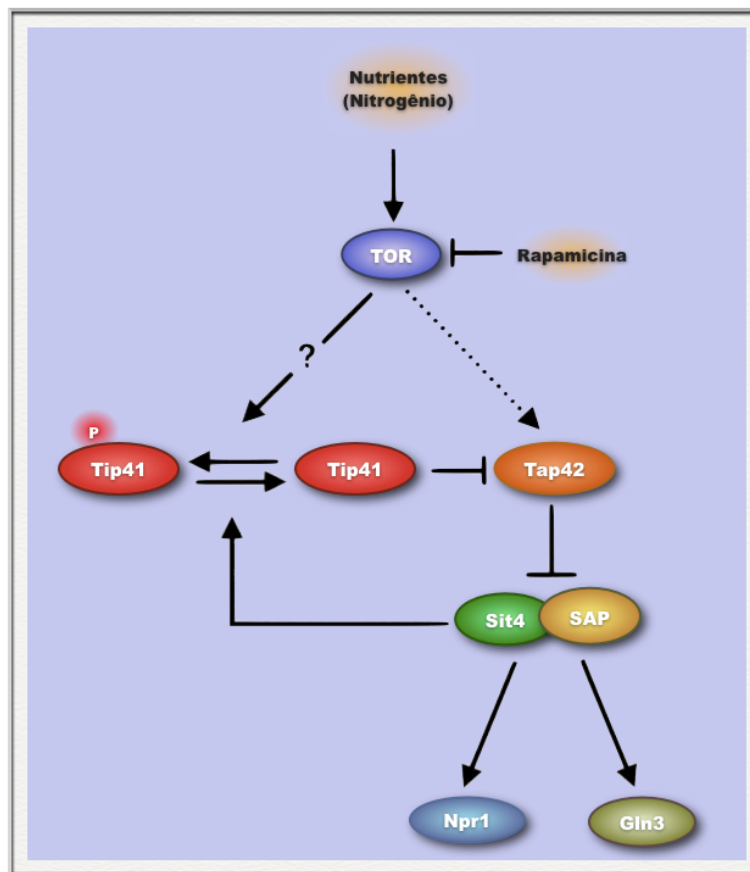


Figura 1.5. Modelo proposto originalmente por Jacinto et al. (2001) para a função da proteína Tip41 em levedura. As setas representam regulação positiva, e as barras, regulação negativa. A seta pontilhada indica que a fosforilação de Tap42 por TOR tem um papel menos importante na regulação de Sit4 do que a fosforilação de Tip41.

1.4. Participação das fosfatases 2A na via de sinalização da quinase mTOR em mamíferos

A quinase TOR é conservada em todos os eucariotos e, em mamíferos, é conhecida como mTOR, FRAP ou RAFT1 (Brown, et al. 1994; Sabatini, et al. 1994). mTOR é encontrada em dois complexos, mTORC1 e mTORC2, que conservam em grande parte a composição de proteínas, a sensibilidade a rapamicina e os processos celulares regulados pelos complexos TOR1 e TOR2 em levedura (**Figura 1.6**). As proteínas Kog1 e Avo3, encontradas nos complexos TORC1 e TORC2, respectivamente, apresentam ortólogas em mamíferos denominadas Raptor e Rictor (Kim, et al. 2002; Sarbassov, et al. 2004). Lst8, presente nos dois complexos, também é conservada e em mamíferos é conhecida como mLst8/GβL. A quinase mTOR age como um integrador de diversos sinais celulares na regulação do crescimento. Além de responder à presença de nutrientes (aminoácidos), mTOR responde também aos níveis de energia, por meio da quinase AMPK, a diversos tipos de estresse, e a fatores de crescimento, pela via PI3K/PDK1/Akt. Seus alvos mais bem caracterizados são a quinase S6K e a proteína 4E-BP1, envolvidas no controle da tradução. S6K é fosforilada e ativada por mTORC1 e fosforila a proteína ribossomal S6, promovendo o início da tradução. Já 4E-BP1 é fosforilada e inativada por mTORC1, e dessa forma libera da inibição o fator de início da tradução eIF4E, responsável pelo reconhecimento de mRNAs com *cap*.

O complexo mTORC2 é considerado insensível a rapamicina, mas na verdade apresenta uma sensibilidade reduzida que se torna aparente em alguns tipos celulares e após longas exposições à droga. Seu principal alvo na célula é o citoesqueleto de actina, controlado por meio das GTPases Rho, Rac e da quinase PKC. Outro importante substrato de mTORC2 é a quinase Akt/PKB, que é fosforilada e ativada por esse complexo na serina 473, localizada no motivo C-terminal hidrofóbico (Sarbassov, et al. 2005). Para a ativação completa de Akt/PKB, é necessária também a fosforilação por PDK1 na treonina 308 na alça de ativação. Apesar de Akt/PKB ser um ativador de mTORC1, não se observa a ativação de mTORC1 em resposta à ativação de mTORC2, sugerindo que as populações dessa quinase que atuam como substrato de mTORC2 e

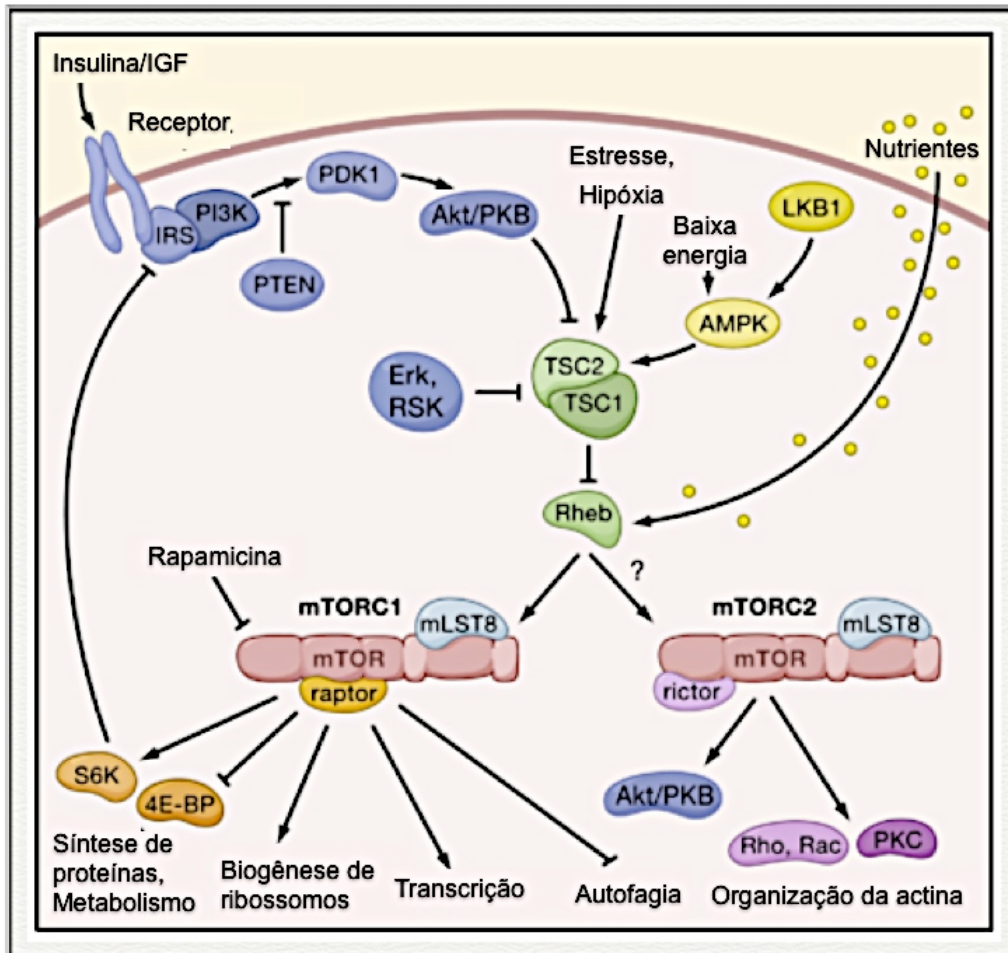


Figura 1.6. Modelo da via de sinalização da quinase mTOR. O complexo mTORC1, sensível a rapamicina, responde a fatores de crescimento, estresse, níveis de energia e nutrientes, e controla diversos processos celulares envolvidos no crescimento, como síntese de proteínas, biogênese de ribossomos e transcrição, e inibe a autofagia. Os fatores de crescimento semelhantes a insulina ligam-se a receptores extracelulares e ativam a via das quinases PI3K - PDK1 - Akt/PKB, ativando o complexo mTORC1 por meio do complexo TSC1/TSC2 e da GTPase Rheb. Os nutrientes (aminoácidos, principalmente leucina) ativam mTORC1 por meio de GTPases Rag, não mostradas. Os níveis de energia são sentidos por meio da quinase dependente de AMP cíclico (AMPK). O complexo mTORC2 regula a quinase Akt/PKB e também o citoesqueleto de actina por meio das GTPases Rac e Rho e da quinase PKC. Não se sabe ao certo o que regula o complexo mTORC2. As setas representam ativação e as barras, inibição. Figura traduzida de (Wullschlegler et al. 2006).

ativador de mTORC1 sejam diferentes. Ao contrário de mTORC2, mTORC1 funciona como um regulador negativo de Akt/PKB por meio de um *feedback* negativo envolvendo a inibição da expressão do substrato do receptor de insulina (IRS) pela quinase S6K.

Um grande número de tumores malignos em humanos apresenta a via de mTORC1 desregulada, e alguns análogos de rapamicina (CCI-779 e RAD001) já tiveram seu uso aprovado como drogas contra o câncer. O complexo mTORC2 também pode estar envolvido em alguns tipos de câncer por meio da ativação de Akt/PKB, e sua sensibilidade ao tratamento prolongado com rapamicina também o torna um possível alvo dessas drogas (Sabatini 2006). O complexo TSC1/TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex*) é um regulador negativo da via de mTORC2 e supressor tumoral, agindo como um ativador da troca de GTP para a GTPase Rheb, e mutações nos genes que codificam essas proteínas resultam em uma síndrome caracterizada pelo aparecimento de tumores. A fosfatase PTEN (*Phosphatase and Tensin Homologue*) é outro regulador negativo da via de mTORC1 que também funciona como supressor tumoral.

Assim como em levedura, as fosfatases 2A também são alvos da sinalização por mTOR, o que é evidenciado pelo aumento na atividade dessas fosfatases em células tratadas com rapamicina (Peterson, et al. 1999). Porém, apesar de Tap42 ser uma proteína conservada, o papel de sua homóloga $\alpha 4$ na via da quinase mTOR ainda é controverso. Os alvos mais estudados do complexo Tap42/fosfatase em levedura (Npr1, Gln3, Msn2/4) não são conservados em mamíferos, indicando que um possível papel de $\alpha 4$ na via de mTOR deve envolver outros substratos, sendo os principais candidatos S6K e 4E-BP1. PP2Ac interage diretamente com S6K e parece ser necessária para sua ativação mediada por mTORC1 (Peterson et al. 1999). $\alpha 4$ participa de um complexo com PP2Ac e S6K em linfócitos B (Yamashita, et al. 2005), mas não há evidências de que regulação da atividade de S6K por PP2Ac/ $\alpha 4$ seja importante em outros tipos celulares. 4E-BP1 também já foi descrito como um possível alvo de $\alpha 4$ /PP2A, mas não está claro se $\alpha 4$ inibe (Nanahoshi, et al. 1998) ou promove sua desfosforilação por PP2A (Nien, et al. 2007). Independentemente de sua possível participação na via de mTOR, sabe-se que $\alpha 4$ está envolvida na regulação de diversos processos celulares, como diferenciação, desenvolvimento,

migração celular e apoptose, por meio de seu papel conservado de regulador de fosfatases 2A (Figura 1.7).

1.5. As proteínas $\alpha 4$ e TIPRL

A proteína $\alpha 4$ foi identificada inicialmente em camundongos como uma fosfoproteína associada ao complexo receptor de linfócitos B por meio da interação com a proteína MB-1/Ig α , e ficou conhecida também como IgBP1 (*Immunoglobulin Binding Protein 1*) (Kuwahara, et al. 1994). A associação da subunidade catalítica da PP2A com a $\alpha 4$ não ocorre simultaneamente à associação com as subunidades A e B (Murata, et al. 1997), sendo promovida pela ausência de fosforilação (Tyr307) e de carboximetilação (Leu309) na subunidade catalítica (Chung, et al. 1999). Tap42 e $\alpha 4$ de camundongo apresentam 24% de identidade de sequência e 37% de similaridade (Figura 1.8A) e pertencem a uma família única, sem similaridade significativa com outras proteínas ou domínios conhecidos. Nenhuma informação estrutural sobre essas proteínas

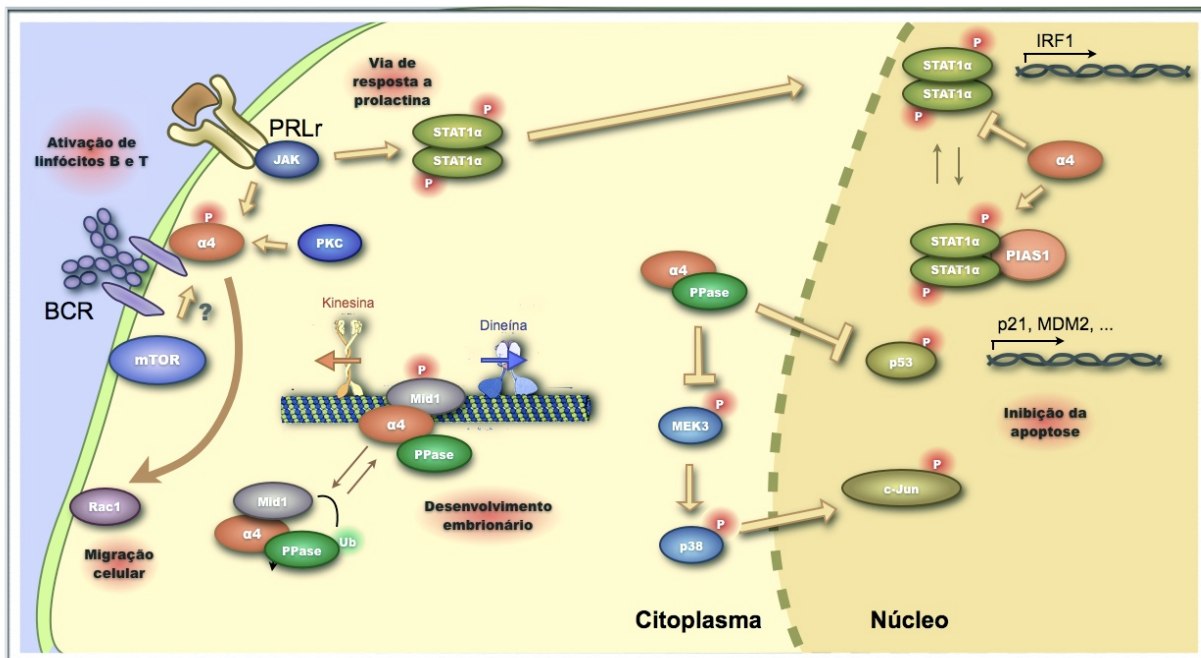


Figura 1.7. Visão geral dos processos celulares regulados por $\alpha 4$. Os processos mostrados não ocorrem necessariamente em um mesmo tipo celular, mas são mostrados em uma única célula por simplicidade. Setas indicam ativação e barras indicam inibição. Ver texto para detalhes.

estava disponível na literatura até o início deste trabalho. Homólogas de $\alpha 4$ /Tap42 já foram descritas em ratos (Too 1997), *Arabidopsis thaliana* (Harris, et al. 1999) *Drosophila melanogaster* e *Schizosaccharomyces pombe*, e provavelmente são encontradas em todos os organismos eucariotos.

A identificação de $\alpha 4$ em associação com o receptor de linfócitos B, sua capacidade de ser fosforilada em resposta ao ativador de PKC forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) e sua associação física com quinases de tirosina sugeriram um papel na ativação desses linfócitos (Kuwahara et al. 1994), que foi confirmado em trabalhos posteriores. Camundongos com *knockout* condicional do gene *IgBP1* pelo sistema Cre/Lox P são deficientes na proliferação em resposta a estimulantes de células B, na mudança de isotipo, na formação de centros germinais e na hipermutação somática da região V, e também apresentam redução na atividade da quinase S6K e menor sensibilidade à rapamicina (Inui, et al. 2002). A mesma abordagem experimental em linfócitos T mostrou que a falta da proteína $\alpha 4$ resulta em baixa proliferação celular e desorganização do timo, com a parada do desenvolvimento dos timócitos no estágio CD4/CD8 duplo negativo (Hua, et al. 2003).

Em células linfoides, $\alpha 4$ participa ainda da sinalização celular em resposta à prolactina, que nessas células funciona como um estímulo à proliferação por meio de uma cascata de sinalização envolvendo a via JAK/STAT. O mRNA que codifica $\alpha 4$ foi isolado em uma triagem em busca de genes com expressão diferencial em células linfoides Nb2 de rato dependentes ou independentes de prolactina, juntamente com os mRNAs que codificam o fator de alongamento EF-2 e uma proteína semelhante a Cdc5 (Too 1997). A expressão do mRNA de $\alpha 4$ diminui em resposta ao tratamento com prolactina em células dependentes desse hormônio, mas é constitutiva em células independentes de prolactina. O tratamento com prolactina em células dependentes provoca ainda a fosforilação de $\alpha 4$ e sinergiza com o efeito do TPA (2-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato), um ativador de PKC (Boudreau, et al. 2002). $\alpha 4$ tem localização predominantemente nuclear nessas células e encontra-se glicosilada (Boudreau et al. 2002; Dauphinee, et al. 2005). Sua super-expressão inibe a ativação do promotor IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor 1*) em resposta ao tratamento com prolactina por meio da inibição da interação entre STAT1 α e PIAS1

(Boudreau et al. 2002; Nien et al. 2007). Essas evidências indicam que $\alpha 4$ é um regulador negativo da resposta a prolactina nessas células.

$\alpha 4$ também está envolvida na regulação do desenvolvimento embrionário em mamíferos por meio da sua interação com as proteínas MID1 e MID2 (de *midline*), pertencentes à família RBCC (*RING-finger B-box coiled-coil*) (Liu, et al. 2001; Trockenbacher, et al. 2001). Essas proteínas são ubiquitina-ligases associadas a microtúbulos que atuam no estabelecimento da linha média do embrião, e mutações nos genes que as codificam estão relacionadas à síndrome de Opitz G/BBB, caracterizada por malformações congênitas na linha média como fenda palatina, hipertelorismo ocular, retardamento mental e anomalias cardíacas. As anomalias observadas nessa síndrome estão diretamente relacionadas com a associação de MID1 aos microtúbulos, uma vez que mutações isoladas de seus portadores provocam o acúmulo de MID1 em grânulos citoplasmáticos (Schweiger, et al. 1999). A interação com MID1 sugeriu que $\alpha 4$, que é produto de um gene localizado no cromossomo X (Onda, et al. 1997), poderia estar relacionada a algumas formas da síndrome de Opitz G/BBB ligadas ao X, e de fato uma nova síndrome ligada ao X e com sobreposição de características com Opitz G/BBB foi mapeada no gene *IgBP1* (Graham, et al. 2003). Essa síndrome se caracteriza por coloboma de íris e nervo ótico, testa alta, retrognatia severa, retardamento mental e agênese do corpo caloso, e se associa a uma dupla mutação na região promotora do gene *IgBP1*(-57delT e T-55A), provavelmente resultando em um padrão de expressão anormal da proteína $\alpha 4$ (Graham et al. 2003).

$\alpha 4$ interage com o domínio B-Box de MID1 por meio de sua região C-terminal e promove uma regulação cruzada entre MID1 e PP2Ac. Por meio da associação com $\alpha 4$, MID1 promove a ubiquitinação e degradação da fração de PP2A associada a microtúbulos (Trockenbacher et al. 2001), enquanto PP2Ac catalisa a desfosforilação de MID1 e promove sua dissociação dos microtúbulos (Liu et al. 2001), regulando também seu transporte ao longo dos microtúbulos mediado por dineína e quinesina (Aranda-Orgillés, et al. 2008a). MID1 e $\alpha 4$ fazem parte de um grande complexo ribonucleoprotéico que inclui o fator de alongamento EF-1 α e várias proteínas envolvidas no transporte de mRNA e tradução, incluindo RACK1, Anexina A2, nucleofosmina e

algumas proteínas ribossomais, sugerindo um papel para essas proteínas no controle da tradução associada ao citoesqueleto (Aranda-Orgillés, et al. 2008b).

Outro importante papel de $\alpha 4$ relaciona-se à sobrevivência de células de mamíferos, tanto diferenciadas quanto em desenvolvimento, já que sua deleção ativa a via intrínseca de apoptose (Kong, et al. 2004). Após a deleção condicional do gene que codifica $\alpha 4$, mediada pela infecção com um retrovírus codificando a recombinase Cre em células modificadas geneticamente para ter esse gene flanqueado por sítios *loxP*, observa-se um aumento na transcrição de genes-alvo de p53 como p21, Noxa, MDM2, ciclina G, e Stk11, e também de genes que participam da via mitocondrial de apoptose como mDAP-3, Siva e endonuclease G. Observa-se também um aumento dos níveis de fosforilação dos fatores de transcrição c-Jun e p53, indicando que $\alpha 4$ promove a desfosforilação e inibição desses fatores (Kong et al. 2004). O efeito antiapoptótico de $\alpha 4$ depende da sua interação com MEK3, uma das MAP quinase quinases que fosforilam a MAP quinase p38 em uma via de apoptose ativada por estresse ou citocinas (Roux and Blenis 2004). A inibição direta da ativação de MEK3 por $\alpha 4$, por meio de sua desfosforilação mediada por PP2A, inibe também a fosforilação e ativação de seus alvos diretos ou indiretos, incluindo p38 e c-Jun, e assim inibe essa via de apoptose (Prickett and Brautigan 2007). Outros processos regulados por $\alpha 4$ incluem a migração celular, regulada por meio da GTPase Rac1 (Kong, et al. 2007), e a formação de memórias no cérebro por meio da quinase CaMKII (Yamashita, et al. 2006).

Apesar da quantidade crescente de informações sobre o papel de $\alpha 4$ em diversos processos celulares, algumas questões fundamentais sobre sua função como regulador de fosfatases 2A e sua participação na via da quinase mTOR permanecem controversas. De acordo com o modelo proposto inicialmente para o complexo entre Tap42 e fosfatases 2A em levedura, a inibição da quinase TOR promoveria a dissociação desse complexo, liberando a fosfatase do efeito inibitório de Tap42 e permitindo assim a desfosforilação de seus alvos. Diversos trabalhos tentaram reproduzir esse modelo em células de mamíferos, gerando resultados contraditórios, já que em alguns casos se observa a dissociação rápida do complexo $\alpha 4$:PP2Ac após o tratamento com rapamicina, enquanto em outros se observa uma dissociação lenta ou nenhuma dissociação. Foi proposto que esses efeitos discrepantes refletiriam diferenças entre os tipos celulares

utilizados, ou ainda que a dissociação do complexo ocorreria apenas em células sensíveis a rapamicina, porém as diferentes estratégias experimentais empregadas dificultam a comparação desses resultados. Modelos mais recentes da regulação das fosfatases 2A por Tap42 em levedura ainda não foram reproduzidos em mamíferos. Outra questão ainda não esclarecida é o mecanismo de regulação de $\alpha 4$ por mTOR. Apesar de ser amplamente aceito que $\alpha 4$ é substrato de mTOR e que sua fosforilação promove a associação com PP2Ac, esses fatos são deduzidos a partir do modelo de levedura sem comprovação direta em células de mamíferos. Uma importante evidência contrária à extrapolação do modelo de levedura para outros organismos é o fato de que a inativação do gene que codifica Tap42/ $\alpha 4$ em *Drosophila melanogaster* não produziu defeitos visíveis na via de sinalização da quinase TOR (Cygnar, et al. 2005).

A descoberta da proteína Tip41 de levedura como peça chave no mecanismo de regulação de Sit4 por Tap42 sugeriu que essa proteína pouco caracterizada poderia esclarecer algumas das lacunas a respeito da regulação das fosfatases 2A por $\alpha 4$ em células de mamíferos. Tip41 é uma proteína conservada (**Figura 1.8B**) e sua ortóloga humana, chamada de TIPRL, era uma proteína de função totalmente desconhecida na época de início deste trabalho, e ainda permanece pouco caracterizada. TIPRL é o produto de um gene localizado em 1q23.2 e apresenta duas isoformas de *splicing*, TIPRL1 e TIPRL2, que apresentam 272 e 178 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Tip41 de levedura e TIPRL humana apresentam 35% de identidade de sequência (Jacinto et al. 2001). Assim como Tap42, Tip41 e suas homólogas não apresentam semelhança com proteínas de outras famílias ou domínios conhecidos.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo central de caracterizar o papel das proteínas $\alpha 4$ e TIPRL na regulação de fosfatases 2A. O interesse inicial sobre a proteína $\alpha 4$ em nosso grupo de pesquisa resultou de sua identificação em uma triagem de interações com a proteína Int-6, uma subunidade do fator de início da tradução eIF3 (F. R. G. Carneiro e N. I. T. Zanchin, dados não publicados). Apesar de essa interação não ter sido confirmada, os estudos com $\alpha 4$ prosseguiram devido a sua possível função no controle da tradução na via da quinase TOR. Devido à quantidade relativamente grande de informações funcionais disponíveis na literatura, o trabalho sobre $\alpha 4$ se concentrou inicialmente nos aspectos estruturais da proteína, que eram ainda

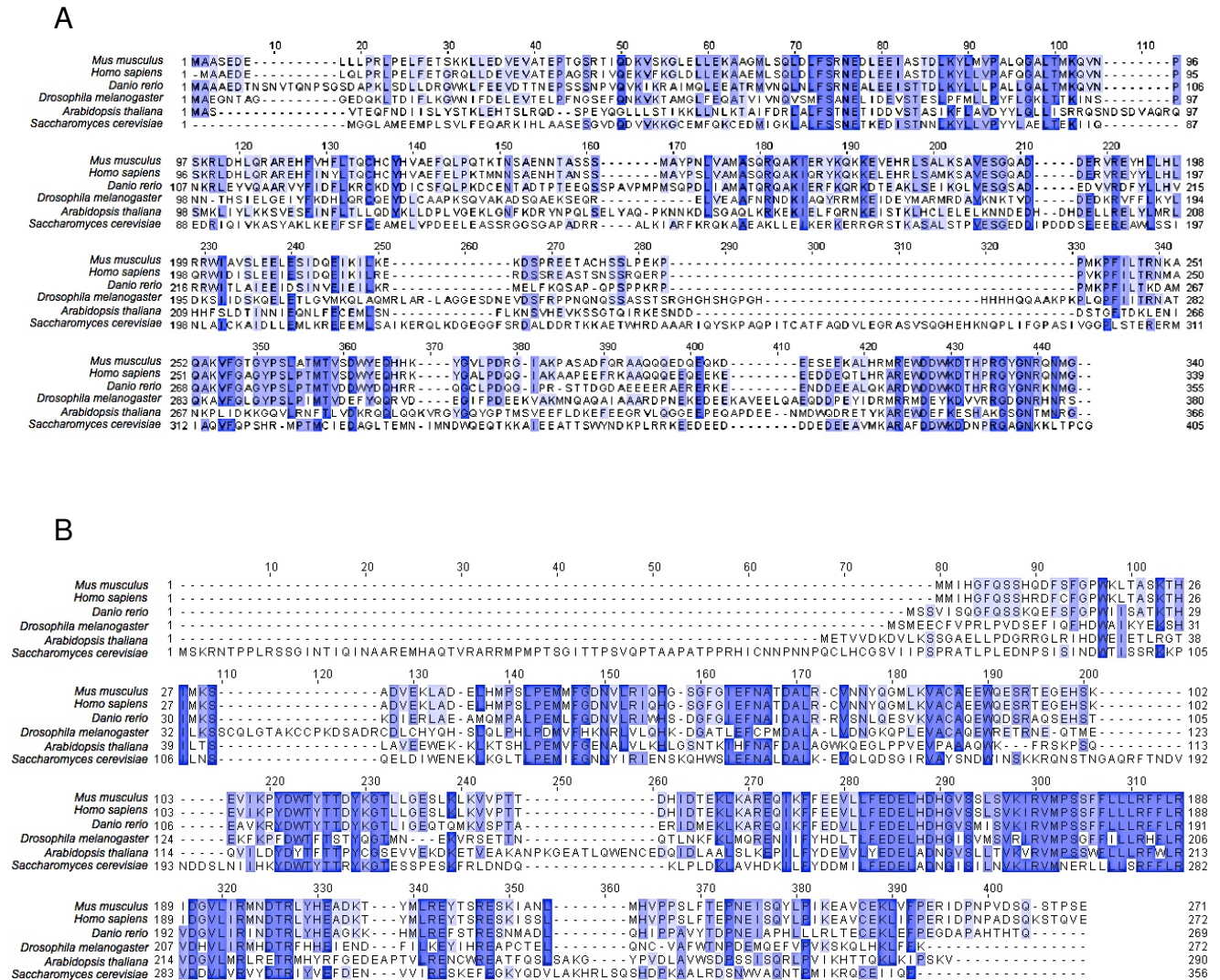


Figura 1.8. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas Tap42/ $\alpha 4$ (A) e Tip41/TIPRL (B) de camundongo (*Mus musculus*), humanos (*Homo sapiens*), peixe (*Danio rerio*), mosca das frutas (*Drosophila melanogaster*), planta (*Arabidopsis thaliana*) e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). A intensidade da cor indica o grau de conservação da seqüência. Alinhamento feito com o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw).

totalmente desconhecidos. Os resultados dessa caracterização estrutural são apresentados na seção 3.1 na forma de um artigo publicado. Já a para a proteína TIPRL, a escassez tanto de dados funcionais quanto estruturais nos levou a priorizar a triagem de interações como forma de obter as primeiras informações sobre a função dessa proteína. Os resultados dessa triagem são apresentados nas seções 3.2 e 3.3. Resultados preliminares sobre a caracterização funcional de $\alpha 4$ e TIPRL oriundos de experimentos em cultura de células são mostrados na seção 3.4, e os resultados das tentativas de cristalização de TIPRL são apresentados na forma de um anexo (seção 6).

1.6. Referências bibliográficas

- Aranda-Orgillés B, Aigner J, Kunath M, Lurz R, Schneider R & Schweiger S 2008a Active transport of the ubiquitin ligase MID1 along the microtubules is regulated by protein phosphatase 2A. *PLoS ONE* **3** e3507.
- Aranda-Orgillés B, Trockenbacher A, Winter J, Aigner J, Köhler A, Jastrzebska E, Stahl J, Müller E, Otto A, Wanker E, et al. 2008b The Opitz syndrome gene product MID1 assembles a microtubule-associated ribonucleoprotein complex. *Hum Genet* **123** 163-176.
- Beck T & Hall MN 1999 The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402** 689-692.
- Boudreau RT, Sangster SM, Johnson LM, Dauphinee S, Li AW & Too CK 2002 Implication of $\alpha 4$ phosphoprotein and the rapamycin-sensitive mammalian target-of-rapamycin pathway in prolactin receptor signalling. *J Endocrinol* **173** 493-506.
- Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS & Schreiber SL 1994 A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369** 756-758.
- Chen GI, Tisayakorn S, Jorgensen C, D'Ambrosio LM, Goudreault M & Gingras AC 2008 PP4R4/KIAA1622 forms a novel stable cytosolic complex with phosphoprotein phosphatase 4. *J Biol Chem*.

-
- Cherkasova VA & Hinnebusch AG 2003 Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2. *Genes & Development* **17** 859-872.
- Cho U & Xu W 2007 Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature* **445** 53-57.
- Chowdhury D, Xu X, Zhong X, Ahmed F, Zhong J, Liao J, Dykxhoorn DM, Weinstock DM, Pfeifer GP & Lieberman J 2008 A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol Cell* **31** 33-46.
- Chung H, Nairn AC, Murata K & Brautigan DL 1999 Mutation of Tyr307 and Leu309 in the protein phosphatase 2A catalytic subunit favors association with the alpha 4 subunit which promotes dephosphorylation of elongation factor-2. *Biochemistry* **38** 10371-10376.
- Cohen PT, Philp A & Vázquez-Martin C 2005 Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions. *FEBS Letters* **579** 3278-3286.
- Cutler NS, Pan X, Heitman J & Cardenas ME 2001 The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol Biol Cell* **12** 4103-4113.
- Cygnar KD, Gao X, Pan D & Neufeld TP 2005 The phosphatase subunit tap42 functions independently of target of rapamycin to regulate cell division and survival in Drosophila. *Genetics* **170** 733-740.
- Dauphinee S, Ma M & Too CK 2005 Role of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the subcellular distribution of alpha4 phosphoprotein and Sp1 in rat lymphoma cells. *J. Cell. Biochem.* **96** 579-588.
- Di Como CJ & Arndt KT 1996 Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & Development* **10** 1904-1916.
- Düvel K, Santhanam A, Garrett S, Schnepfer L & Broach JR 2003 Multiple roles of Tap42 in mediating rapamycin-induced transcriptional changes in yeast. *Mol Cell* **11** 1467-1478.
- Eichhorn PJ, Creyghton MP & Bernards R 2008 Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta*.

- Fenyvuesvolgyi C, Elder RT, Benko Z, Liang D & Zhao RY 2005 Fission yeast homologue of Tip41-like proteins regulates type 2A phosphatases and responses to nitrogen sources. *Biochim Biophys Acta* **1746** 155-162.
- Gingras AC, Caballero M, Zarske M, Sanchez A, Hazbun TR, Fields S, Sonenberg N, Hafen E, Raught B & Aebersold RH 2005 A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics* **4** 1725-1740.
- Goldberg Y 1999 Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem Pharmacol* **57** 321-328.
- Graham JM, Wheeler P, Tackels-Horne D, Lin AE, Hall BD, May M, Short KM, Schwartz CE & Cox TC 2003 A new X-linked syndrome with agenesis of the corpus callosum, mental retardation, coloboma, micrognathia, and a mutation in the Alpha 4 gene at Xq13. *Am J Med Genet A* **123A** 37-44.
- Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA & Barford D 1999 The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* **96** 99-110.
- Harris DM, Myrick TL & Rundle SJ 1999 The Arabidopsis homolog of yeast TAP42 and mammalian alpha4 binds to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A and is induced by chilling. *Plant Physiol* **121** 609-617.
- Hu MC, Tang-Oxley Q, Qiu WR, Wang YP, Mihindukulasuriya KA, Afshar R & Tan TH 1998 Protein phosphatase X interacts with c-Rel and stimulates c-Rel/nuclear factor kappaB activity. *J Biol Chem* **273** 33561-33565.
- Hua DR, Inui S, Yamashita T, Maeda K, Takagi K, Takeda J & Sakaguchi N 2003 T cell-specific gene targeting reveals that alpha4 is required for early T cell development. *Eur J Immunol* **33** 1899-1906.
- Inui S, Maeda K, Hua DR, Yamashita T, Yamamoto H, Miyamoto E, Aizawa S & Sakaguchi N 2002 BCR signal through alpha 4 is involved in S6 kinase activation and required for B cell maturation including isotype switching and V region somatic hypermutation. *Int Immunol* **14** 177-187.

-
- Jacinto E, Guo B, Arndt KT, Schmelzle T & Hall MN 2001 TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell* **8** 1017-1026.
- Janssens V, Goris J & Van Hoof C 2005 PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev* **15** 34-41.
- Jiang Y & Broach JR 1999 Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J* **18** 2782-2792.
- Jiang YW 2008 An essential role of Tap42-associated PP2A and 2A-like phosphatases in Ty1 transcriptional silencing of *S. cerevisiae*. *Yeast* **25** 755-764.
- Kajino T, Ren H, Iemura S, Natsume T, Stefansson B, Brautigan DL, Matsumoto K & Ninomiya-Tsuji J 2006 Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem* **281** 39891-39896.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Sabatini DM 2002 mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110** 163-175.
- Kobe B, Gleichmann T, Horne J, Jennings IG, Scotney PD & Teh T 1999 Turn up the HEAT. *Structure* **7** R91-97.
- Kong M, Bui TV, Ditsworth D, Gruber JJ, Goncharov D, Krymskaya VP, Lindsten T & Thompson CB 2007 The PP2A-associated protein alpha4 plays a critical role in the regulation of cell spreading and migration. *J Biol Chem* **282** 29712-29720.
- Kong M, Fox CJ, Mu J, Solt L, Xu A, Cinalli RM, Birnbaum MJ, Lindsten T & Thompson CB 2004 The PP2A-associated protein alpha4 is an essential inhibitor of apoptosis. *Science* **306** 695-698.
- Kuwahara K, Matsuo T, Nomura J, Igarashi H, Kimoto M, Inui S & Sakaguchi N 1994 Identification of a 52-kDa molecule (p52) coprecipitated with the Ig receptor-related MB-1 protein that is inducibly phosphorylated by the stimulation with phorbol myristate acetate. *J Immunol* **152** 2742-2752.

- Liu J, Prickett TD, Elliott E, Meroni G & Brautigan DL 2001 Phosphorylation and microtubule association of the Opitz syndrome protein mid-1 is regulated by protein phosphatase 2A via binding to the regulatory subunit alpha 4. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** 6650-6655.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P & Hall MN 2002 Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* **10** 457-468.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T & Sudarsanam S 2002 The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298** 1912-1934.
- Mumby MC 2007 PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* **130** 21-24.
- Murata K, Wu J & Brautigan DL 1997 B cell receptor-associated protein alpha4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** 10624-10629.
- Nakada S, Chen GI, Gingras AC & Durocher D 2008 PP4 is a gammaH2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep*.
- Nanahoshi M, Nishiuma T, Tsujishita Y, Hara K, Inui S, Sakaguchi N & Yonezawa K 1998 Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by alpha4 protein and its yeast homolog Tap42. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **251** 520-526.
- Nien WL, Dauphinee S, Moffat LD & Too CK 2007 Overexpression of the mTOR alpha4 phosphoprotein activates protein phosphatase 2A and increases Stat1alpha binding to PIAS1. *Mol Cell Endocrinol* **263** 10-17.
- Onda M, Inui S, Maeda K, Suzuki M, Takahashi E & Sakaguchi N 1997 Expression and chromosomal localization of the human alpha 4/IGBP1 gene, the structure of which is closely related to the yeast TAP42 protein of the rapamycin-sensitive signal transduction pathway. *Genomics* **46** 373-378.
- Peterson RT, Desai BN, Hardwick JS & Schreiber SL 1999 Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** 4438-4442.

- Prickett TD & Brautigan DL 2007 Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3. *Molecular and Cellular Biology* **27** 4217-4227.
- Roux PP & Blenis J 2004 ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68** 320-344.
- Sabatini DM 2006 mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* **6** 729-734.
- Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P & Snyder SH 1994 RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78** 35-43.
- Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Sabatini DM 2004 Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14** 1296-1302.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM & Sabatini DM 2005 Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307** 1098-1101.
- Schmidt A, Beck T, Koller A, Kunz J & Hall MN 1998 The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J* **17** 6924-6931.
- Schweiger S, Foerster J, Lehmann T, Suckow V, Muller YA, Walter G, Davies T, Porter H, van Bokhoven H, Lunt PW, et al. 1999 The Opitz syndrome gene product, MID1, associates with microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** 2794-2799.
- Stefansson B & Brautigan DL 2006 Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets IkappaBepsilon. *J Biol Chem* **281** 22624-22634.
- Stefansson B & Brautigan DL 2007 Protein phosphatase PP6 N terminal domain restricts G1 to S phase progression in human cancer cells. *Cell Cycle* **6** 1386-1392.
- Stefansson B, Ohama T, Daugherty AE & Brautigan DL 2008 Protein phosphatase 6 regulatory subunits composed of ankyrin repeat domains. *Biochemistry* **47** 1442-1451.

- Too CK 1997 Differential expression of elongation factor-2, alpha4 phosphoprotein and Cdc5-like protein in prolactin-dependent/independent rat lymphoid cells. *Mol Cell Endocrinol* **131** 221-232.
- Toyo-oka K, Mori D, Yano Y, Shiota M, Iwao H, Goto H, Inagaki M, Hiraiwa N, Muramatsu M, Wynshaw-Boris A, et al. 2008 Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J Cell Biol* **180** 1133-1147.
- Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, Winter J, Krauss S, Ropers HH, Schneider R & Schweiger S 2001 MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat. Genet.* **29** 287-294.
- Wang H & Jiang Y 2003 The Tap42-protein phosphatase type 2A catalytic subunit complex is required for cell cycle-dependent distribution of actin in yeast. *Molecular and Cellular Biology* **23** 3116-3125.
- Wang H, Wang X & Jiang Y 2003 Interaction with Tap42 is required for the essential function of Sit4 and type 2A phosphatases. *Mol Biol Cell* **14** 4342-4351.
- Westermarck J & Hahn WC 2008 Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends in molecular medicine* **14** 152-160.
- Wilkes JM, Doerig C. 2008 The protein-phosphatome of the human malaria parasite Plasmodium falciparum *BMC Genomics*. **9** 412
- Wullschleger S, Loewith R & Hall MN 2006 TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124** 471-484.
- Xing Y, Xu Y, Chen Y, Jeffrey PD, Chao Y, Lin Z, Li Z, Strack S, Stock JB & Shi Y 2006 Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell* **127** 341-353.
- Xu Y, Xing Y, Chen Y, Chao Y, Lin Z, Fan E, Yu JW, Strack S, Jeffrey PD & Shi Y 2006 Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell* **127** 1239-1251.
- Yamashita T, Inui S, Maeda K, Hua DR, Takagi K, Fukunaga K & Sakaguchi N 2006 Regulation of CaMKII by alpha4/PP2Ac contributes to learning and memory. *Brain Research* **1082** 1-10.

- Yamashita T, Inui S, Maeda K, Hua DR, Takagi K & Sakaguchi N 2005 The heterodimer of alpha4 and PP2Ac is associated with S6 kinase1 in B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **330** 439-445.
- Yan G, Shen X & Jiang Y 2006 Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *EMBO J* **25** 3546-3555.
- Zabrocki P, Van Hoof C, Goris J, Thevelein JM, Winderickx J & Wera S 2002 Protein phosphatase 2A on track for nutrient-induced signalling in yeast. *Mol Microbiol* **43** 835-842.
- Zhang X, Ozawa Y, Lee H, Wen YD, Tan TH, Wadzinski BE & Seto E 2005 Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes & Development* **19** 827-839.
- Zolnierowicz S 2000 Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem Pharmacol* **60** 1225-1235.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é analisar a função das proteínas $\alpha 4$ e TIPRL humanas visando esclarecer seu papel na regulação de fosfatases 2A. As etapas experimentais para se atingir esse objetivo incluem:

- I. Expressar e purificar as proteínas $\alpha 4$ e TIPRL e caracterizá-las estruturalmente.
- II. Identificar e caracterizar interações da proteína TIPRL e verificar sua interação direta com a proteína $\alpha 4$.
- III. Analisar o mecanismo de interação entre $\alpha 4$, TIPRL e PP2Ac.
- IV. Identificar substratos de fosfatases 2A regulados por TIPRL.
- V. Analisar a distribuição subcelular e as modificações pós-traducionais das proteínas $\alpha 4$ e TIPRL.

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são apresentados em quatro seções. A seção 3.1 é um artigo já publicado sobre a caracterização estrutural de $\alpha 4$ e Tap42. A seção 3.2 descreve os resultados da triagem de interações com TIPRL no sistema do duplo-híbrido em levedura, e na seção 3.3 é apresentada a caracterização da interação entre TIPRL, $\alpha 4$ e fosfatases 2A, na forma de outro artigo publicado. A seção 3.4 contém resultados de análises funcionais das proteínas TIPRL e $\alpha 4$ obtidos com experimentos em culturas de células.

3.1

**Low resolution structure of the human $\alpha 4$
protein (IgBP1) and studies on the stability of
 $\alpha 4$ and of its yeast ortholog Tap42**

Juliana Helena Costa Smetana, Cristiano Luiz Pinto Oliveira, Willy Jablonka,
Thelma Aguiar Pertinhez, Flavia Raquel Gonçalves Carneiro, Monica Montero-
Lomeli,
Iris Torriani, Nilson Ivo Tonin Zanchin

Biochimica et Biophysica Acta

2006 vol. 1764 (4) pp. 724-734



Low resolution structure of the human $\alpha 4$ protein (IgBP1) and studies on the stability of $\alpha 4$ and of its yeast ortholog Tap42

Juliana Helena Costa Smetana^a, Cristiano Luiz Pinto Oliveira^{a,b}, Willy Jablonka^c,
Thelma Aguiar Pertinhez^{a,1}, Flavia Raquel Gonçalves Carneiro^a, Monica Montero-Lomeli^c,
Iris Torriani^{a,b}, Nilson Ivo Tonin Zanchin^{a,*}

^a Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron,
R. Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000, Campinas - SP, PO Box 6192-CEP 13084-971, Brazil

^b Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Unicamp, Campinas SP 13084-971, Brazil

^c Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

Received 15 September 2005; received in revised form 15 January 2006; accepted 20 January 2006

Available online 17 February 2006

Abstract

The yeast Tap42 and mammalian $\alpha 4$ proteins belong to a highly conserved family of regulators of the type 2A phosphatases, which participate in the rapamycin-sensitive signaling pathway, connecting nutrient availability to cell growth. The mechanism of regulation involves binding of Tap42 to Sit4 and PPH21/22 in yeast and binding of $\alpha 4$ to the catalytic subunits of type 2A-related phosphatases PP2A, PP4 and PP6 in mammals. Both recombinant proteins undergo partial proteolysis, generating stable N-terminal fragments. The full-length proteins and $\alpha 4$ C-terminal deletion mutants at amino acids 222 ($\alpha 4\Delta 222$), 236 ($\alpha 4\Delta 236$) and 254 ($\alpha 4\Delta 254$) were expressed in *E. coli*. $\alpha 4\Delta 254$ undergoes proteolysis, producing a fragment similar to the one generated by full-length $\alpha 4$, whereas $\alpha 4\Delta 222$ and $\alpha 4\Delta 236$ are highly stable proteins. $\alpha 4$ and Tap42 show α -helical circular dichroism spectra, as do their respective N-terminal proteolysis resistant products. The cloned truncated proteins $\alpha 4\Delta 222$ and $\alpha 4\Delta 236$, however, possess a higher content of α -helix, indicating that the C-terminal region is less structured, which is consistent with its higher sensitivity to proteolysis. In spite of their higher secondary structure content, $\alpha 4\Delta 222$ and $\alpha 4\Delta 236$ showed thermal unfolding kinetics similar to the full-length $\alpha 4$. Based on small angle X-ray scattering (SAXS), the calculated radius of gyration for $\alpha 4$ and Tap42 were 41.2 ± 0.8 Å and 42.8 ± 0.7 Å and their maximum dimension ~ 142 Å and ~ 147 Å, respectively. The radii of gyration for $\alpha 4\Delta 222$ and $\alpha 4\Delta 236$ were 21.6 ± 0.3 Å and 25.7 ± 0.2 Å, respectively. Kratky plots show that all studied proteins show variable degree of compactness. Calculation of model structures based on SAXS data showed that $\alpha 4\Delta 222$ and $\alpha 4\Delta 236$ proteins have globular conformation, whereas $\alpha 4$ and Tap42 exhibit elongated shapes.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Tap42 protein family; Rapamycin signaling pathway; Small angle X-ray scattering

1. Introduction

The control of cell growth in response to nutrients and growth factors is performed by a rapamycin sensitive pathway which acts on protein synthesis, transcription, nutrient transporter turnover and progression of the cell cycle. The major signaling protein in this pathway is Tor, the Target of Rapamycin, which

belongs to the family of phosphatidyl-inositol-kinase-related kinases [1,2]. In yeast cells, the control of protein synthesis by this pathway involves mainly the regulation of the type 2A-related phosphatases Sit4 and PPH22 by the regulatory protein Tap42 [3]. Under growth-promoting conditions, yeast Tor2 phosphorylates Tap42 and thus promotes its association with Sit4 and PPH22, which reduces their phosphatase activity and allows activation of the translation initiation factor 4E [1].

The yeast Tap42 and its mammalian ortholog $\alpha 4$, also known as Immunoglobulin Binding Protein 1 (IgBP1), share 52.6% amino acid similarity (Fig. 1) and belong to a unique and highly conserved family [4–7]. Mammalian $\alpha 4$ has been implicated in

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3512 1113; fax: +55 19 3512 1004.

E-mail address: zanchin@lnls.br (N.I.T. Zanchin).

¹ Present address: University of Parma, Dept. of Experimental Medicine, 43100 Parma, Italy.

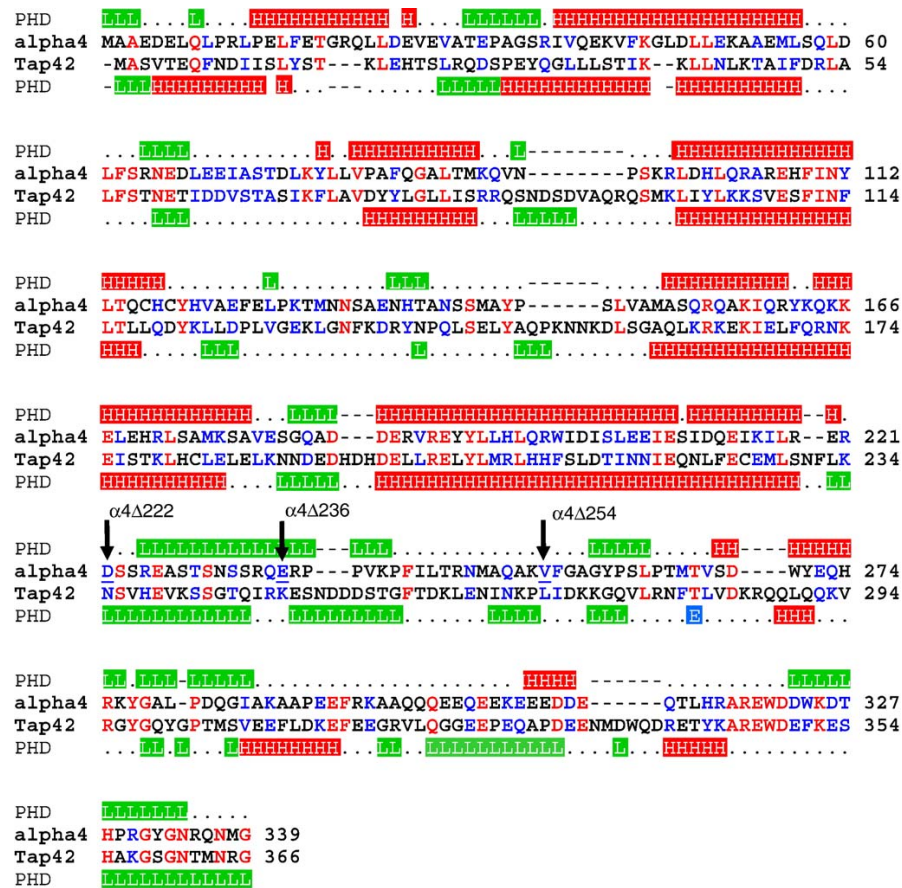


Fig. 1. $\alpha 4$ and Tap42 amino acid sequence alignment. The proteins show 23.6% amino acid identity plus 29% of conserved amino acid substitutions. Dark arrows at amino acids D222, E236 and V254 indicate the C-terminus of the cloned $\alpha 4$ truncated proteins $\alpha 4\Delta 222$, $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 254$. Red letters indicate amino acid identity; blue letters indicate conserved substitutions. Secondary structure predictions are indicated by "PHD" lines. The upper and lower lines indicate $\alpha 4$ and Tap42 secondary structure elements, respectively. Green boxes, coil regions; red boxes, α -helix segments; dots, segments without reliable prediction.

a variety of functions related to cell proliferation, differentiation, apoptosis and vertebrate embryonic development [4,8–13]. The cellular functions attributed to $\alpha 4$ are mediated by its interaction with the catalytic subunits of the type 2A-related phosphatases PP2A, PP4 and PP6. PP2A is the major soluble serine/threonine phosphatase in animal cells and is predominantly found as a trimeric complex formed by the catalytic subunit (PP2Ac), and by a regulatory (B, B' or B'') and a scaffolding (PR65/A) subunit [14]. Regulatory subunits show extremely diverse amino acid sequences, being responsible for localization and specificity of the holoenzyme [14].

Association of $\alpha 4$ or the A/B subunits to PP2Ac is mutually exclusive due to an overlapping in the binding site and binding of $\alpha 4$ to PP2Ac causes the displacement of the A and B subunits [15]. PP2Ac distribution between these two complexes is regulated by post-translational modifications [17]. The interaction between murine $\alpha 4$ and PP2Ac has been mapped to residues 94–202 and 19–165, respectively [15,18]. A more refined mapping showed that residues 19–22 and 150–164 of PP2A are essential for binding to $\alpha 4$ [19]. The association between PP2Ac and $\alpha 4$ is generally thought to be part of a

rapamycin-sensitive signaling pathway in mammalian cells and several studies have reported that rapamycin induces the dissociation of this complex [11,16,18], but this fact is still controversial, since some authors have observed no influence of rapamycin on the stability of the complex [20–22].

Despite the large number of studies on the function of $\alpha 4$ and Tap42, the structural basis for their regulatory function is still unclear. This work presents the first structural data for proteins of the Tap42 family, obtained using standard biophysical techniques, and shows that they belong to the recently identified class of intrinsically unstructured proteins. Proteins of this type contain large unstructured regions, but they frequently undergo induced folding upon binding to a partner such as DNA, membranes or other proteins. Their flexibility is functionally important, since it allows them to fit a variety of different binding partners and also provides a larger binding interface when compared to folded proteins of the same size [23]. Intrinsically unstructured regions can be predicted from the primary structure and several algorithms have been developed for this purpose [24]. In general, these regions are characterized by a high net charge and a low

hydrophobicity [25]. A comparison of the predicted unstructured regions of proteins from the three domains of life has shown that they are far more frequent in eukaryotic genomes than in bacterial or archaeal genomes [26]. They are also more frequently found in regulatory and cancer-associated proteins than in those involved in metabolism, biosynthesis, and degradation [27]. Our findings provide a structural framework to understand the cellular function of $\alpha 4$ and Tap42 in the context of intrinsic disorder.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid construction

The $\alpha 4$ cDNA was amplified by PCR from a human fetal brain cDNA library (Clontech) using primers ONZ107: 5' CCCCATATGGCTGCTGAGGAC-GAGTTAC 3' (forward) and ONZ108: 5' TGGGATCCTCAGCC-CATGTTCTGTCGGTTC 3' (reverse). The PCR product was digested with *NdeI* and *BamHI* and cloned into the pET28a vector. cDNAs of truncated forms of $\alpha 4$ were generated by PCR using the full-length $\alpha 4$ cDNA as a template and subcloned into either pET28a (in frame with an N-terminal hexahistidine tag) or pET29a. All DNA vectors and inserts were digested with *NdeI* and *BamHI* prior to ligation. The following deletion mutants (Fig. 1) were constructed: pET28a- $\alpha 4\Delta 254$ (amino acids 1–254, using primers ONZ107 described above and ONZ167: 5' GGATCCTTAATACTTTGGCTTGAGCCATG 3'), pET28a- $\alpha 4\Delta 236$ (amino acids 1–236, using primers ONZ107 and ONZ191: 5' GGATCCTTACTCTGGCGAGATGAGTTAGAAG 3'), pET28a- $\alpha 4\Delta 222$ (amino acids 1–222, using primers ONZ107 and ONZ192: 5' GGATCCT-TAGTCTCTTCTCTCAGGATCTTTA 3'). Vector pET29a- $\alpha 4\Delta 222$ was constructed by transferring the cDNA sequence comprising nucleotides 1–675 from pET28a- $\alpha 4\Delta 222$ to pET29a. The *TAP42* gene was amplified by PCR from yeast genomic DNA using primers 5' GAGAATTCGGATCCGCGTCAGTAA-CAG 3' (forward) and 5' GAGCTGGATTTCGGTACCTATCCTCTATTC 3' (reverse) and cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega). Subsequently, the *TAP42* gene was digested with *KpnI* and *BamHI* and subcloned into the pQE30 plasmid (Qiagen) in frame with an N-terminal hexahistidine tag. Standard molecular biology techniques were performed as described elsewhere [28]. All of the constructs were verified by DNA sequencing analysis.

2.2. Recombinant protein expression

The human $\alpha 4$ and its deletion mutants were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) carrying the plasmid pRARE (Novagen), which encodes tRNAs for rare codons in *E. coli*. Tap42 was expressed in *E. coli* M15 carrying the plasmid pREP4, which encodes for the T5 RNA polymerase repressor. Pre-cultures of transformed cells were grown overnight at 37 °C and 200 rpm in LB broth containing the appropriate antibiotics (30 μ g/mL ampicillin and 25 μ g/mL kanamycin for Tap42; 20 μ g/mL chloramphenicol and 50 μ g/mL kanamycin for $\alpha 4$ and its deletion mutants). The pre-cultures were used to inoculate fresh LB broth at 2%, which was incubated at 37 °C until the optical density at 600 nm reached ~ 1.0 . At this time, expression of the recombinant proteins was induced with 0.5 mM IPTG and the cultures were incubated for 4 h at 25 °C (for $\alpha 4$ and its deletion mutants) or 2 h at 37 °C (for Tap42). Cells were harvested by centrifugation at 4000 $\times g$ for 10 min at 4 °C and stored at -20 °C.

2.3. Purification of his-tagged proteins

Induced bacterial cells were suspended in affinity chromatography buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM imidazole, 1 mM PMSF) and incubated on ice with lysozyme (50 μ g/mL) for 30 to 60 min. Cells were disrupted by 5–8 cycles of sonication and the lysate was centrifuged at 30,000 $\times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatants were passed by gravity through columns containing Ni-NTA Superflow resin (Qiagen) pre-equilibrated with affinity buffer. The columns were washed with affinity buffer and eluted with increasing imidazole concentrations (up to 200 mM) in the same buffer. The proteins were dialyzed against ion exchange buffer A (Tris–HCl

10 mM, pH 7.4, 10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM benzamidine, 5 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF and 1 μ g/mL pepstatin A) and applied onto a 5-mL HiTrap Q-Sepharose HP column (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with ion exchange buffer A. The column was washed with 10 mL buffer A and proteins were eluted with a 90-mL linear gradient (0 to 100%) of ion exchange buffer B (Tris–HCl 10 mM, pH 7.4, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL pepstatin A and 5 mM β -mercaptoethanol). Fractions enriched with the full-length protein were pooled, concentrated to 2 mL using a centrifugal filter device and loaded onto a Superdex 75 16/60 gel-filtration column. Isocratic elution was performed with gel-filtration buffer (10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL pepstatin A and 5 mM β -mercaptoethanol) at a flow rate of 1 mL/min. Gel-filtration of samples prepared for SAXS analyses was performed with a Superdex 75 10/30 column. Tap42 was purified using the same strategy except that imidazole was not added to the affinity buffer. Ion exchange and gel-filtration chromatography were performed using an AKTA-FPLC system (Amersham Biosciences) at 25 °C. Purification efficiency was analyzed by SDS-PAGE [28] using a Bio-Rad Mini-Protein III system.

2.4. Purification of $\alpha 4\Delta 222$

The truncated protein $\alpha 4\Delta 222$ was expressed without any affinity tag and was purified by conventional chromatographic techniques using an AKTA-FPLC system (Amersham Biosciences). Bacterial cells from 2-L LB cultures were suspended in 20 mL DEAE buffer A (10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 5% glycerol). Cell extracts were prepared as described above and loaded at a flow rate of 2 mL/min onto a 45-mL DEAE-Sepharose column pre-equilibrated with DEAE buffer A. The column was washed with 90 mL DEAE buffer A and eluted with a 450-mL linear gradient of 0–30% DEAE buffer B (10 mM Tris–HCl, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, pH 7.4) at a flow rate of 2.5 mL/min. Fractions enriched with $\alpha 4\Delta 222$ were pooled and brought to 1.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ buffered with 20 mM Tris–HCl pH 7.4. This sample was loaded at a flow rate of 2 mL/min onto a 14 mL Phenyl-Sepharose HP column pre-equilibrated with Phenyl buffer A (20 mM Tris–HCl, pH 7.4, 1.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol). The column was washed with 28 mL of Phenyl buffer A and eluted with a 210 mL linear gradient of 0–60% Phenyl buffer B (20 mM Tris–HCl, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol). $\alpha 4\Delta 222$ enriched fractions were pooled and dialyzed against Q-Sepharose buffer A (10 mM Tris–HCl, pH 8.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol) and loaded at a flow rate of 2 mL/min onto a 16 mL Q-Sepharose HP column pre-equilibrated with the same buffer. The column was washed with 32 mL Q-Sepharose buffer A and $\alpha 4\Delta 222$ was eluted with an 80 mL gradient of 0–100% Q-Sepharose buffer B (10 mM Tris–HCl, pH 8.5, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol). Samples used for SAXS measurements were dialyzed against the gel-filtration buffer described above and concentrated using a centrifugal filter device.

2.5. Protein quantitation

Protein concentration was estimated from direct absorbance at 280 nm in guanidine buffer (6.0 M guanidine–HCl, 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.55) considering extinction molar coefficients of $\epsilon_{280} = 36840 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for $\alpha 4$, $\epsilon_{280} = 14650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$, and $\epsilon_{280} = 26740 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for Tap42. For Tap42tr and $\alpha 4$ tr, absorbance was measured in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 and 10 mM NaCl, and concentration was calculated considering $\epsilon_{280} = 13410$ and $15930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively.

2.6. Circular dichroism (CD) and sequence analysis

Far UV CD spectra were recorded on a Jasco-810 spectropolarimeter using a Peltier system PFD 425S for temperature control. 3 to 10 μ M protein samples were prepared in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 and 10 mM NaCl. CD spectra were acquired at 20 °C using a 1-mm path length cell at 0.5-nm intervals over the wave length range from 190 to 260 nm. Ellipticity is reported as the mean residual ellipticity $[\theta]$ ($\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). Samples were subjected to thermal unfolding from 20 °C to 80 °C with spectra collected at 5 °C intervals. The loss of secondary structure was followed by measuring the ellipticity at 222 nm using 0.2 °C intervals. Midpoint transition temperatures were calculated

as the center of the Gaussian fit of the first derivative of the denaturation curves. Refolding assays were started at 80 °C and the temperature lowered to 20 °C with concomitant acquisition of the ellipticity at 222 nm using 0.2 °C intervals. The α -helix content was estimated using the relation described by Gans et al [29]:

$$[\theta]_{222} = [(n - 4.6)(-40,000)]/n \quad (1)$$

where n is the number of amino acid residues of the protein. Prediction of secondary structure elements was performed using PHD [30] (www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html). Unstructured regions were estimated using PONDR (www.pondr.com, with VL-XT predictor) [31]. Mean net charge versus mean hydrophobicity was plotted as described by Uversky et al. [32].

2.7. Limited proteolysis

0.3 μ L of trypsin (2 mg/mL in 50 mM NH_4HCO_3 pH 8.0) were added to 120 μ L of protein sample at a concentration of 0.5 mg/mL. The buffers used in limited proteolysis reactions were phosphate buffer pH 7.2 for $\alpha 4$ and its N-terminal truncated domain ($\alpha 4\text{tr}$) and Tris buffer pH 7.0 (20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl) for Tap42 and its N-terminal domain (Tap42tr). The reactions were kept at room temperature and 20 μ L aliquots were taken at various times, mixed with an equal volume of 2 $\times$ SDS-PAGE sample buffer containing 1 mM PMSF and heated to 95 °C for 5 min to inactivate the enzyme. The samples were analyzed by SDS-PAGE.

2.8. SAXS measurements and data analysis

SAXS data were collected at the SAS beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) with a 1.488 Å wavelength and a capillary sample holder of 1.5 mm diameter [33]. Protein samples and the molecular weight standard (BSA, 5 mg/mL) were prepared in gel-filtration buffer as described above. Sample to detector distances were 750.2 mm (long) and 446.6 mm (short). Tap42, $\alpha 4$ and $\alpha 4\Delta 236$ contain an N-terminal histidine tag. The following sample concentrations were analyzed: 5 mg/mL BSA, 2 mg/mL $\alpha 4$, 6.9 mg/mL Tap42, 1.7 mg/mL $\alpha 4\Delta 236$, 2 mg/mL $\alpha 4\Delta 222$ and 5 mg/mL $\alpha 4\Delta 222$ (long distance), and 1 mg/mL $\alpha 4$, 21 mg/mL $\alpha 4\Delta 236$ and 26 mg/mL $\alpha 4\Delta 222$ (short distance). Subtraction of parasitic scattering, calculation of the scattering vector q ($q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$, 2θ being the scattering angle and λ the wavelength of the incident monochromatic beam) and error calculations were performed using the program TRAT1D [34]. Fitting of the experimental data and calculation of the pair-distance distribution functions were performed using the GNOM program package [35]. Model calculations were performed using the programs DAMMIN [36] and GASBOR [37]. The program DAMMIN uses simulated annealing optimization to generate a bead atom model that gives the best fit of the scattering intensity. The resulting dummy atom model represents the external shape of the scattering particle. To increase the reliability of the results, the final models for the dummy atom modeling were obtained by a spatial average of ten independent models, calculated with the program DAMAVER [38]. The program GASBOR [37] uses a chain of dummy residues, with the same length of the protein sequence, to represent the protein backbone. Following the same optimization procedure, the program generates a dummy chain model that gives the general shape of the scattering particle and can also give information about the general folding of the studied particle.

3. Results

3.1. Expression and purification of Tap42, $\alpha 4$ and of its C-terminal truncated forms

Expression of his-tagged $\alpha 4$ in *E. coli* BL21 (DE3) yielded approximately 12 mg of soluble protein per liter of culture. His-tagged Tap42 was expressed in *E. coli* M15 and yielded approximately 50 mg of soluble protein per liter of culture. $\alpha 4$ and Tap42 undergo proteolysis after bacterial lysis, generating

fragments of approximately 30 kDa (Fig. 2A, C), which co-purify with each full length protein in metal-chelating affinity columns. The proteolysis fragments correspond to the N-terminal region and co-purify by binding to the affinity column through the N-terminal histidine tag. Thus, the cleavage should

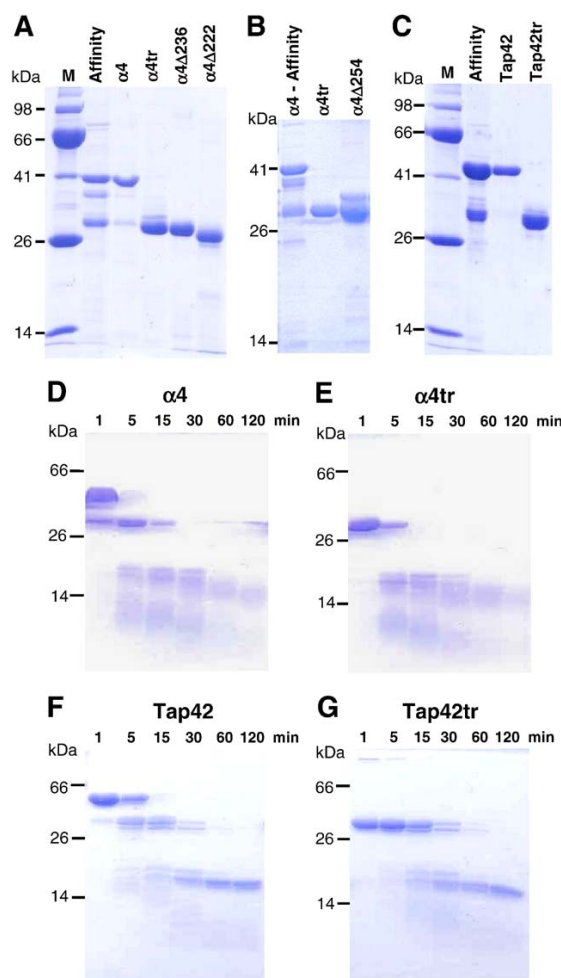


Fig. 2. Coomassie-stained SDS-PAGE gels showing purified proteins and limited proteolysis products. (A) Purification of full-length $\alpha 4$, $\alpha 4\text{tr}$, $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$. The proteins are indicated above each lane. Affinity refers to $\alpha 4$ and $\alpha 4\text{tr}$ following affinity chromatography. $\alpha 4$ and $\alpha 4\text{tr}$ indicate the proteins purified by ion exchange and gel-filtration chromatography. Lanes labeled $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ indicate the respective purified protein. (B) Purification of $\alpha 4\Delta 254$. Samples of the affinity purified $\alpha 4$ and of the purified $\alpha 4\text{tr}$, indicated by $\alpha 4$ -Affinity and $\alpha 4\text{tr}$, respectively, were also loaded on the gel for comparison. (C) Purification of Tap42 and Tap42tr. Affinity indicates the sample obtained after affinity chromatography and Tap42 and Tap42tr indicate the full-length and truncated proteins after fractionation by ion-exchange chromatography. The size of the molecular weight markers (lane M) are indicated on the left side of each panel. (D–G) Limited proteolysis analysis of $\alpha 4$ (D); $\alpha 4\text{tr}$ (E), Tap42 (F) and Tap42tr (G). The molecular weights of the limited proteolysis products of $\alpha 4$, $\alpha 4\text{tr}$, Tap42 and Tap42tr treated with trypsin are in agreement with those obtained during the purification process. The reaction was prepared with a 1:100 (w:w) protein:trypsin ratio and aliquots were removed at various times, indicated above each lane. Position of the molecular weight markers are indicated on the left side of each panel.

occur at corresponding sites in both proteins. His-tagged $\alpha 4$ and Tap42 were purified using the same strategy, consisting of an immobilized metal affinity chromatography, followed by anion exchange and size-exclusion chromatography and relying on protease inhibitors to minimize degradation. After the affinity chromatography, the full-length and the proteolysis products of both proteins are present in similar amounts, being separated by anion exchange chromatography under the same buffer conditions (Fig. 2A, C). Interestingly, the elution profiles of both proteins at this step are very similar (not shown), suggesting that full-length $\alpha 4$ and Tap42 as well as their respective proteolysis products have similar charge distribution. The purified $\alpha 4$ and Tap42 proteolysis products will be referred to as $\alpha 4$ tr and Tap42tr, respectively.

Three deletion mutants of $\alpha 4$ were constructed to tentatively map the site of proteolysis and to generate truncated proteins for structural studies. The apparent size of the proteolysis product on SDS-PAGE is ~ 30 kDa. Taking into account this information and secondary structure prediction, indicating a large coil region between amino acids 221 and 267 (Fig. 1), which could be a possible target for proteases, three truncated proteins were designed and cloned: $\alpha 4\Delta 222$, containing amino acids 1 to 222; $\alpha 4\Delta 236$, comprising amino acids 1 to 236 and $\alpha 4\Delta 254$, containing amino acids 1 to 254 (Fig. 1). Interestingly, $\alpha 4\Delta 254$ undergoes proteolysis, resulting in an N-terminal fragment which has the same apparent molecular weight of the one resulting from proteolysis of the full-length protein (Fig. 2B). $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ do not undergo proteolysis, showing that the cleavage site is located between residues 236 and 254. Expression of $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ yields significantly more soluble protein than full-length $\alpha 4$. Due to its stability and high level of expression, $\alpha 4\Delta 222$ could be easily purified by conventional chromatographic techniques, avoiding the need for a hexahistidine tag. It was first captured from the *E. coli* cell extracts by anion exchange on DEAE-Sepharose and further purified by hydrophobic interaction chromatography (Phenyl-Sepharose), after which $\alpha 4\Delta 222$ was more than 90% pure. The final step consisted of another anion exchange chromatography using a stronger anion exchanger (Q-Sepharose) and a buffer with higher pH to remove the remaining contaminants (Fig. 2A).

3.2. Limited proteolysis

Tap42 and $\alpha 4$ were subjected to limited digestion with trypsin to verify the presence of proteolytically unstable regions (Fig. 2D–G). Their respective N-terminal regions generated by proteolysis during the purification process were digested in parallel as controls (Fig. 2E, G). As expected, the full-length proteins are first converted to a fragment of ~ 30 kDa (Fig. 2D, F), indicating that the C-terminus is quickly degraded. Following conversion of the full length proteins to the ~ 30 kDa fragments, the kinetics of degradation as well as the pattern of low molecular weight fragments generated is very similar for both $\alpha 4$ and $\alpha 4$ tr, and for Tap42 and Tap42tr. Cleavage by trypsin to generate the ~ 30 kDa fragment should occur at the same region cleaved by the *E. coli* proteases found in the lysates, indicating that proteolysis is not specific. In

conclusion, this experiment shows that $\alpha 4$ and Tap42 have C-terminal regions highly sensitive to protease attack. The functional implications of this sensitivity, however, remain unclear.

3.3. Secondary structure and thermally-induced unfolding analyses using circular dichroism

The CD spectra of $\alpha 4$, Tap42 and their respective proteolysis products are very similar, showing that both proteins contain equivalent secondary structure elements, further supporting the structural similarity of these two proteins (Fig. 3A, B). Although the spectra of the full-length proteins and of the proteolysis products are typical of α -helical proteins, the $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ spectra showed a relatively higher α -helical content (Fig. 3C), indicating that the C-terminal region is less structured, consistently with the secondary structure prediction (Fig. 1). An estimation using the equation described by Gans et al. [29] suggests that the α -helix content of $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ is 50% and 41%, respectively, while $\alpha 4$ contains 31% of α -helices, which is consistent with the presence of a coil-rich region in the C-terminus of $\alpha 4$.

Thermal-induced unfolding followed by CD was performed to determine whether the higher proteolysis resistance of the N-terminal region would imply a higher stability for the truncated forms as compared to the respective full-length proteins. Unfolding of Tap42 revealed a midpoint transition temperature of 48 °C (Fig. 4A). Tap42tr aggregates following temperature increase above 45 °C, making it impossible to determine its transition temperature. Thermal unfolding leads Tap42 to acquire a β -sheet-like structure while Tap42tr shows a total loss CD signal due to aggregation (data not shown). The thermal effect observed for $\alpha 4$ and for its C-terminal truncated products also indicates a change to a β -sheet-like folding (data not shown). The unfolding kinetics of these proteins shows a gradual loss of secondary structure, starting from 10 °C, with $\alpha 4$ tr showing a slightly lower midpoint transition temperature (50 °C), whereas $\alpha 4$ (54 °C), $\alpha 4\Delta 236$ (55.3 °C) and $\alpha 4\Delta 222$ (55.2 °C) showed similar transition temperatures (Fig. 4B). This finding was intriguing because the C-terminal region was expected to have an effect on the unfolding of $\alpha 4$, unless it was already unfolded prior to temperature increase. Unfolding was not reversible for both $\alpha 4$ and Tap42, as well as for truncated proteins (data not shown).

3.4. SAXS results and structural models

Small angle scattering curves for Tap42, $\alpha 4$ (his-tagged $\alpha 4$) and its deletion mutants $\alpha 4\Delta 222$ and $\alpha 4\Delta 236$ (his-tagged $\alpha 4\Delta 236$) as well as their corresponding pair distance distribution functions $p(r)$ are shown in Fig. 5. Measurements at short and long distances for several concentrations were combined to produce reliable SAXS patterns within the scattering range recorded in the experiments. The $p(r)$ functions indicate that Tap42 and $\alpha 4$ have a very elongated shape, while $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ are slightly elongated. The radii of gyration were calculated from the second moment of the $p(r)$

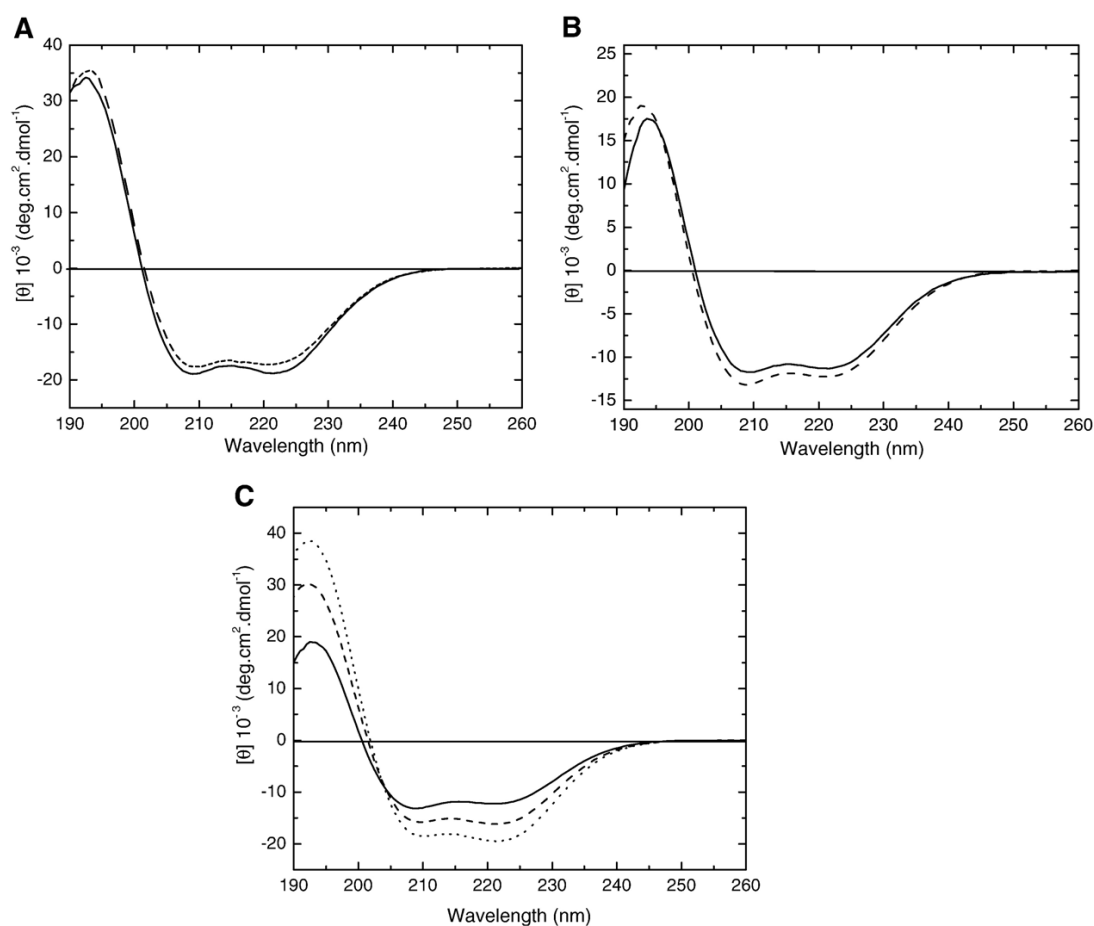


Fig. 3. Circular dichroism analyses. CD spectra were acquired at 20 °C with protein samples at 3 to 10 μ M in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 and 10 mM NaCl as described under Materials and methods. (A) CD spectra of α 4tr (solid line) and Tap42tr (dashed line). (B) CD spectra of α 4 (solid line) and Tap42 (dashed line). (C) CD spectra of α 4 (solid line), α 4 Δ 236 (dashed line) and α 4 Δ 222 (dotted line).

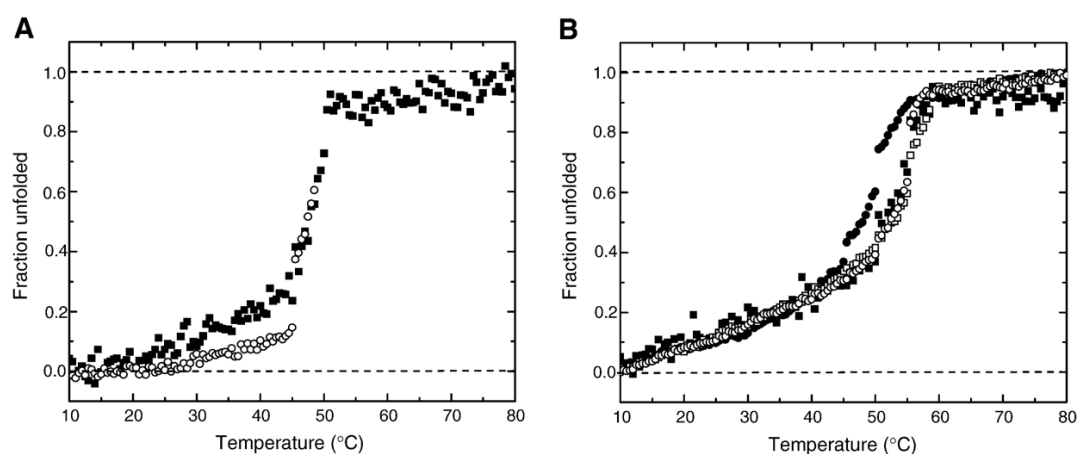


Fig. 4. Analysis of thermal-induced unfolding of α 4, Tap42 and truncated proteins. Unfolding was followed by measuring the ellipticity at 222 nm using 0.2 °C intervals in the temperature range from 20 °C to 80 °C. Proteins (5 μ M) were prepared in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 and 10 mM NaCl. (A) Thermal unfolding of Tap42 (■) and Tap42tr (○). Tap42tr data are shown only up to ~50 °C, since it aggregates above this temperature. (B) Thermal unfolding of α 4 (■), α 4tr (●), α 4 Δ 236 (□) and α 4 Δ 222 (○).

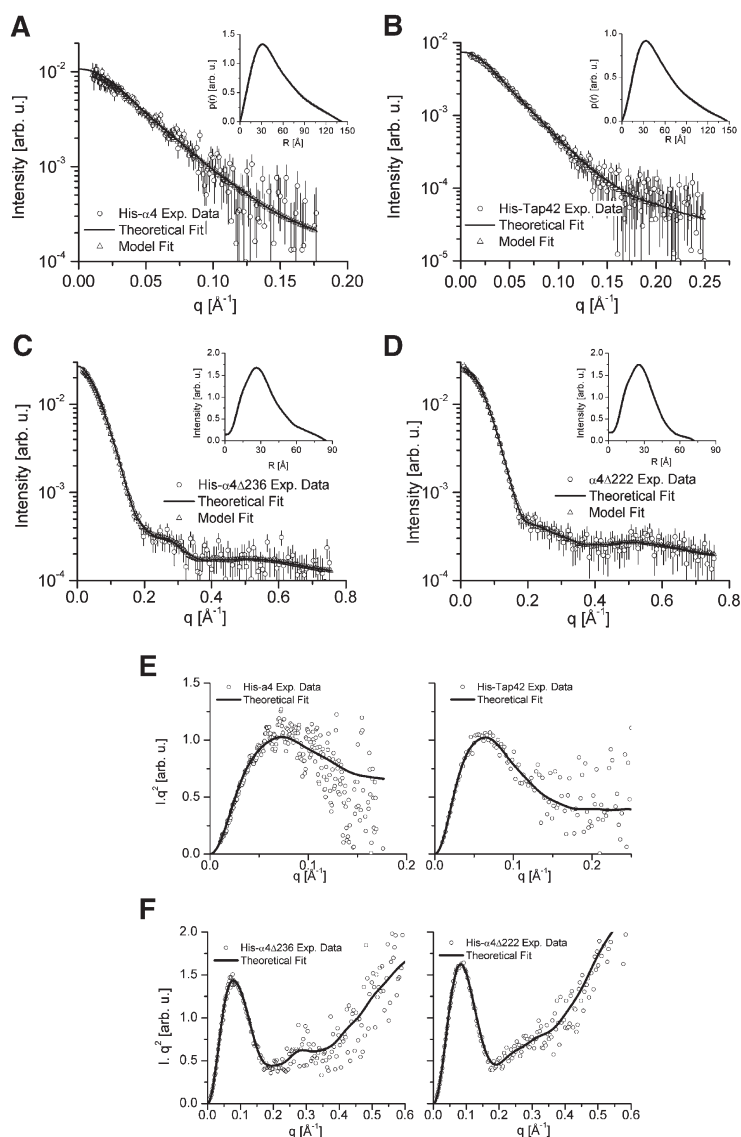


Fig. 5. Experimental solution scattering curves, theoretical (GNOM) and model curve-fittings for $\alpha 4$ (A), Tap42 (B), $\alpha 4\Delta 236$ (C) and $\alpha 4\Delta 222$ (D). Circles and error bars indicate the experimental data. Solid lines indicate the GNOM theoretical fit. Open triangles indicate ab initio model fits. The inset in each graph shows the pair-distance distribution function. Kratky plots for the four proteins are shown in panels E and F.

function. The values obtained were: 42.8 ± 0.7 Å for Tap42, 41.2 ± 0.8 Å for $\alpha 4$, 25.7 ± 0.2 Å for $\alpha 4\Delta 236$ and 21.6 ± 0.3 Å for $\alpha 4\Delta 222$. The maximum dimensions for the proteins were determined from the value where the $p(r)$ function reaches zero, these values being ~ 147 Å (Tap42), ~ 142 Å ($\alpha 4$), ~ 85 Å ($\alpha 4\Delta 236$) and ~ 72 Å ($\alpha 4\Delta 222$).

Molecular weight estimations could be obtained from the extrapolation of the scattering intensities to zero angle performed by the theoretical fit with program GNOM. Using bovine serum albumin (BSA, 66 kDa) as a secondary standard, we obtained molecular weight values that were in good agreement with those expected for the three proteins according to their primary sequences. This showed that the

three proteins were monomeric in solution, assuring the monodispersity of the samples. The values obtained were 43 ± 1 kDa for Tap42, 45 ± 5 kDa for $\alpha 4$, 28 ± 2 kDa for $\alpha 4\Delta 236$ and 23 ± 1 kDa for $\alpha 4\Delta 222$.

The so called Kratky plots ($I \cdot q^2$ vs. q) are a very useful tool to describe the degree of compactness of scattering particles [39]. For all studied proteins, the behavior of the Kratky plots suggests the presence of a certain degree of non compactness which can indicate the presence of flexible domains. From the comparison of the Kratky plots up to $q = 0.2$ Å $^{-1}$, it can be clearly seen that the graphs for the deletion mutants have a higher and sharper maximum than the full-length proteins (Fig. 5E, F). Based on CD results, this can be interpreted as an

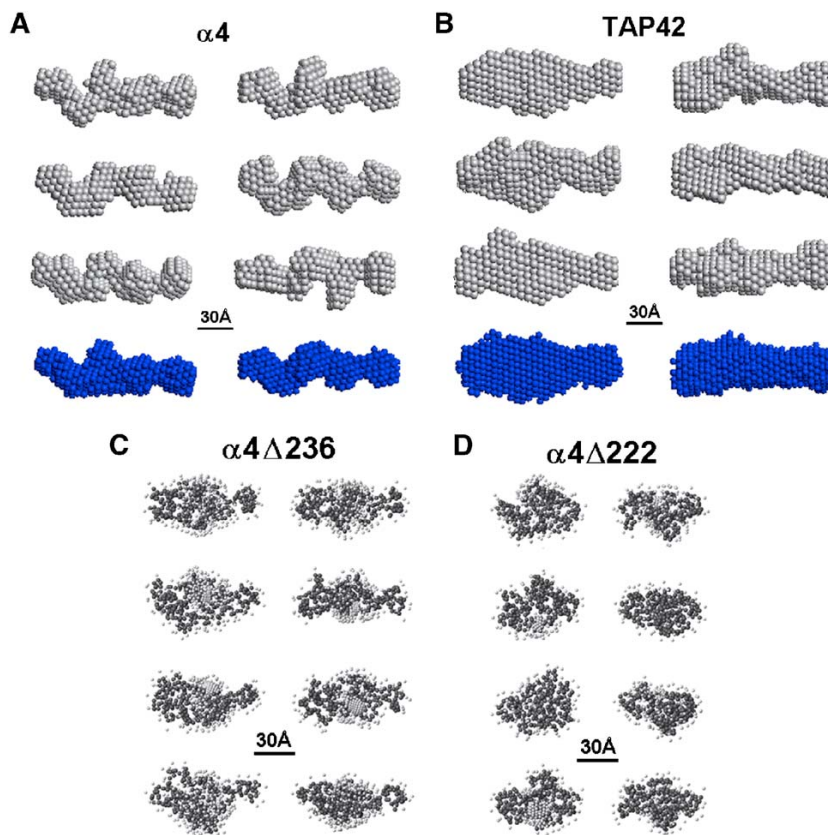


Fig. 6. Representation of the structural models constructed by ab initio modeling. Dummy atom models for $\alpha 4$ (A) and Tap42 (B) were calculated using the program DAMMIN. Three independent calculations are shown in two lengthwise views. The view on the right is rotated 90° relative to the view on the left (gray shade). The fourth model (blue shade) is an average of all independent models calculated. Dummy chain models for $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ were calculated using the program GASBOR. Four independent higher resolution models are presented in panels C and D, respectively. Models on the right are rotated 90° relative to the ones on the left. An average structure is not presented in this case to avoid loss of resolution.

indication of higher coil content in the C-terminal part of $\alpha 4$ and probably also in Tap42.

It is interesting to note that $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ could be obtained at the concentrations of 21 and 26 mg/mL, respectively, which resulted in a good scattering signal even for high q values. The maximum value of q obtained for these proteins was $q_{\max} = 0.76 \text{ \AA}^{-1}$, which means a resolution ($R = 2\pi/q_{\max}$) of $R = 8.4 \text{ \AA}$. As known from SAXS theory and modeling [40], higher q data increase the information content of the scattering curves, decreasing the ambiguity of the calculated models. The parameter N_S (number of Shannon channels)² is an indicator of the resolution that has been reached in each case. For $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ we obtained $N_S = 20$ and 17, respectively. This allowed the construction of structural models with a higher resolution for the N-terminus of the protein. For the full-length proteins, Tap42 and $\alpha 4$, it was not possible to reach equally high q values due to the low concentration of the

samples (Fig. 5). In this case, the number of Shannon channels obtained were $N_S = 9$ and 8, respectively.

The next step in this investigation was the calculation of low resolution structural models. The choice of the correct modeling approach depends on the amount of information available in each case. For the full length proteins, $\alpha 4$ and Tap42, a dummy atom modeling procedure was applied [36]. This approach (recommended for $q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$) gives the so called “shape scattering” and the resulting model represents the general shape of the scattering particle [41]. For the deletion mutants $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$, we applied a dummy chain modeling approach [37]. This approach (recommended for $q > 0.25 \text{ \AA}^{-1}$) can give indication about quaternary structure, domain arrangement and also general folding of the studied proteins [41, 42]. In both cases, the resulting model does not correspond to a unique solution [40]. For the dummy atom models, an average of the models can give the most probable structure [38]. Averaged models were not calculated for the dummy chain models of $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ to get a better insight of the general folding and four resulting models are shown in Fig. 6C and D, respectively. The best solutions in each case are shown in this

² $N_S = (q_{\max} - q_{\min})D_{\max}/\pi$, $q_{\max}$ ($q_{\min}$) being the maximum (minimum) experimental q values and $D_{\max}$ the maximum dimension of the particle.

figure. For $\alpha 4$ and Tap42, the most probable structure is also shown (Fig. 6A, B). From the comparison of the resulting models, some conclusions can be drawn. $\alpha 4$ and Tap42 have very elongated shapes, being the overall model shape similar for both proteins. Due to the low resolution of the models, it is not possible to identify the position of the N- or C-terminus in the models. For the deletion mutants representing the N-terminus, the corresponding models are clearly less ambiguous, which is a result of the higher amount of information obtained from the experimental data. Interestingly, an extension can be observed for the $\alpha 4\Delta 236$ models (Fig. 6C) that is not observed for the $\alpha 4\Delta 222$ models (Fig. 6D). This difference can be explained by the fact that $\alpha 4\Delta 236$ contains 20 additional amino acids at the N-terminus and 14 at the C-terminus relative to $\alpha 4\Delta 222$, representing an additional mass of 3671 Da, equivalent to 14% of $\alpha 4\Delta 222$ molecular mass.

4. Discussion

$\alpha 4$ and Tap42 are conserved proteins sharing functional activities involving regulation of the PP2A-related phosphatases in the context of the rapamycin-sensitive pathway. Recombinant $\alpha 4$ and Tap42 show similar chromatographic behavior and are highly susceptible to proteolysis that degrades the C-terminal region, resulting in ~ 30 kDa stable N-terminal domains. This high sensitivity to proteolysis imposes the use of high amounts of protease inhibitors and additional chromatographic steps to obtain purified proteins. Murine recombinant $\alpha 4$ also undergoes proteolysis on its C-terminus [16] showing that this instability is typical of proteins of this family. High susceptibility of the $\alpha 4$ and Tap42 C-termini to proteolysis was demonstrated by limited trypsin digestion (Fig. 2D–G). In this experiment, both proteins are quickly converted to a ~ 30 kDa product similar to the one generated by the *E. coli* proteases found in the extracts. The proteolysis products contain intact N-termini as they bind to the affinity column through the N-terminal histidine tag and co-purify with the full-length proteins. The C-terminus of the $\alpha 4$ proteolysis product generated by *E. coli* proteases was mapped to the region between amino acids 236 and 254, indicating that part of the predicted coil region remains as part of the proteolysis resistant product. CD studies confirmed that $\alpha 4$ and Tap42 show high α -helical content and the nearly overlapping spectra further indicate their structural similarity. Surprisingly, the high resistance to proteolysis and the high solubility shown by $\alpha 4\Delta 236$ and $\alpha 4\Delta 222$ did not correspond to higher thermal stability, indicating that the C-terminal region does not affect the unfolding mechanism of $\alpha 4$, possibly because it is naturally unstructured.

The N-terminal regions of $\alpha 4$ are more compact and well-structured than the full-length $\alpha 4$, although the SAXS data indicate that a certain degree of flexibility is also shown by the truncated proteins. Based on these data, and from the comparison between $\alpha 4$ and Tap42, it is reasonable to suppose that the structural model with prolate shape obtained in both cases is representative of all proteins of this family. The results obtained by limited proteolysis and SAXS analyses support the

hypothesis that the C-terminal regions of $\alpha 4$ and Tap42 are flexible and could be intrinsically unstructured. Natively unfolded proteins or protein segments have been described for a large number of proteins, including transcriptional and translational regulators, factors involved in protein–protein and interactions and factors showing nucleic acid binding activity [27,43–45]. Secondary structure prediction indicates that the C-terminal regions of $\alpha 4$ and Tap42 are formed mainly by coil and segments without reliable prediction. Prediction of intrinsically disordered regions [31] does find high scores for both C-terminal regions but they are not clearly distinct from the scores observed for other regions of $\alpha 4$ and Tap42 (data not shown). Uversky et al. [32] have used the relation between the normalized net charge versus mean hydrophobicity to show that naturally folded and intrinsically unstructured proteins fall in different regions of charge-hydrophobicity phase space, revealing that intrinsically unstructured proteins show a combination of high mean net charge and low hydrophobicity. Interestingly, by plotting the mean net charge versus mean hydrophobicity, we observed that the N-terminal regions corresponding to the protease resistant domains are localized in the phase space of natively folded proteins, whereas full-length $\alpha 4$ and Tap42 and especially the C-terminal regions are localized in the phase space of intrinsically unstructured proteins (Fig. 7).

The presence of natively unstructured domains, which may fold and stabilize upon substrate binding, is a common theme in regulatory and signaling proteins and may allow them to recognize different targets with high specificity [27,32,43–45]. Therefore, the structural flexibility of $\alpha 4$ and Tap42 may be important for them to exert their cellular functions by interacting with other proteins and regulating their activity. The $\alpha 4$ /Tap42 best described interacting partner is the catalytic subunit of PP2A, which binds $\alpha 4$ on its N-terminal domain, mapped to residues 94–202 on murine $\alpha 4$ [18]. Association with $\alpha 4$ augments phosphatase activity towards phosphorylase *a* [16], myelin basic protein [16,18], histone [18], and translation elongation factor 2 [17], but diminishes its activity toward *p*-nitrophenyl phosphate [46] and eIF-4E-binding

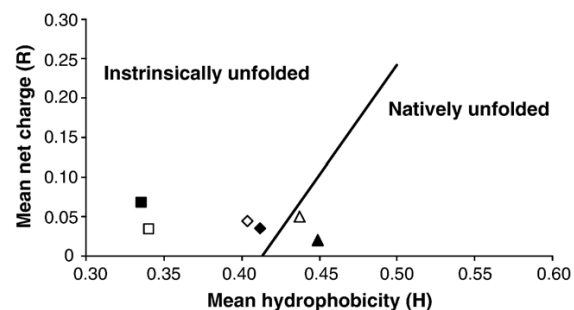


Fig. 7. Analysis of the net charge and hydrophobicity of $\alpha 4$ and Tap42. The mean net charge (R) and mean hydrophobicity were plotted for full-length $\alpha 4$ (◇) Tap42 (◆), the N-terminal regions of $\alpha 4$ (△, residues 1–222) and of Tap42 (▲, residues 1–247) and for the C-terminal regions of $\alpha 4$ (□, residues 223–339) and of Tap42 (■, residues 248–366). The continuous black line ($R=2.785H-1.151$) represents the boundary between natively unfolded and folded proteins determined by Uversky et al. [40].

protein [21]. In spite of the discrepancy among these published data, it is clear that the regulation of PP2A by $\alpha 4$ is not a simple question of activation or inhibition, but rather of substrate specificity. The data obtained in this work suggest a model in which $\alpha 4$ binds the phosphatase catalytic subunit by its rigid N-terminal domain, while its flexible C-terminus interacts with diverse substrates and thus mediates their interaction with the phosphatase. This model could explain the mechanism of regulation of MID1 dephosphorylation, which is catalyzed by $\alpha 4$ -bound PP2Ac, in which the phosphatase is targeted to its substrate by the interaction between the C-terminus of $\alpha 4$ and the B-box domain of MID1 [12,13]. Another feature conferred by the structural flexibility of some proteins is their easy degradation, which might be essential for regulatory proteins whose cellular levels must change rapidly in response to environmental stimuli. Since Tap42 and $\alpha 4$ were shown to be degraded preferentially from their C-termini in vitro, it would be interesting to investigate the consequences of this degradation kinetics in vivo.

Acknowledgements

We thank Tereza C. Lima Silva, Adriana C. Alves, Luciana R. Camillo, Romênia R. Domingues, Leandro C. Vieira, Helder A. Silva and Zildene G. Correa for technical assistance and Yraima Cordeiro for helping with Tap42 CD experiments. J.H.C.S., C.L.P.O., T.A.P. and F.R.G.C. were recipients of FAPESP fellowships. C.L.P.O. was also a recipient of CNPq fellowship. This work was supported by FAPESP grant 00/02788-4 (N.I.T. Z.), the FAPESP SMOlBNet and CEPID/CBME programs, and by the National Structural Biology Program from the LNLS/CNPq/MCT.

References

- [1] T. Schmelzle, M.N. Hall, TOR, a central controller of cell growth, *Cell* 103 (2000) 253–262.
- [2] N. Hay, N. Sonenberg, Upstream and downstream of mTOR, *Genes Dev.* 18 (2004) 1926–1945.
- [3] C.J. Di Como, K.T. Arndt, Nutrients, via the TOR proteins, stimulate the association of Tap42p with type 2A phosphatases, *Genes Dev.* 10 (1996) 1904–1916.
- [4] K. Kuwahara, T. Matsuo, J. Nomura, H. Igarashi, M. Kimoto, S. Inui, N. Sakaguchi, Identification of a 52-kDa molecule (p52) coprecipitated with the Ig receptor-related MB-1 protein that is inducibly phosphorylated by the stimulation with phorbol myristate acetate, *J. Immunol.* 152 (1994) 2742–2752.
- [5] C.K. Too, Differential expression of elongation factor-2, $\alpha 4$ phosphoprotein and Cdc5-like protein in prolactin-dependent/independent rat lymphoid cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 131 (1997) 221–232.
- [6] L.T. Binh, K. Oono, Molecular cloning and characterization of genes related to chilling tolerance in rice, *Plant Physiol.* 99 (1992) 1146–1150.
- [7] D.M. Harris, T.L. Myrick, S.J. Rundle, The *Arabidopsis* ortholog of yeast TAP42p and mammalian $\alpha 4$ binds to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A and is induced by chilling, *Plant Physiol.* 121 (1999) 609–617.
- [8] S. Inui, K. Kuwahara, J. Mizutani, K. Maeda, T. Kawai, H. Nakayasu, N. Sakaguchi, Molecular cloning of a cDNA clone encoding a phosphoprotein component related to the Ig receptor-mediated signal transduction, *J. Immunol.* 154 (1995) 2714–2723.
- [9] S. Inui, K. Maeda, D.R. Hua, T. Yamashita, H. Yamamoto, E. Miyamoto, S. Aizawa, N. Sakaguchi, BCR signal through $\alpha 4$ is involved in S6 kinase activation and required for B cell maturation including isotype switching and V region somatic hypermutation, *Int. Immunol.* 14 (2002) 177–187.
- [10] D.R. Hua, S. Inui, T. Yamashita, K. Maeda, K. Takagi, J. Takeda, N. Sakaguchi, T cell-specific gene targeting reveals that $\alpha 4$ is required for early T cell development, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 1899–1906.
- [11] M. Kong, C.J. Fox, J. Mu, L. Solt, A. Xu, R.M. Cinalli, M.J. Birnbaum, T. Lindsten, C.B. Thompson, The PP2A-associated protein $\alpha 4$ is an essential inhibitor of apoptosis, *Science* 306 (2004) 695–698.
- [12] J. Liu, T.D. Prickett, E. Elliott, G. Meroni, D.L. Brautigan, Phosphorylation and microtubule association of the Opitz syndrome protein mid-1 is regulated by protein phosphatase 2A via binding to the regulatory subunit $\alpha 4$, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 6650–6655.
- [13] K. Short, B. Hopwood, Z. Yi, T.C. Cox, MID1 and MID2 homo- and heterodimerise to tether the rapamycin-sensitive PP2A regulatory subunit, $\alpha 4$, to microtubules: implications for the clinical variability of X-linked Opitz GBBB syndrome and other developmental disorders, *BMC Cell Biol.* 3 (2002) 1.
- [14] Y. Goldberg, Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 321–328.
- [15] T.D. Prickett, D.L. Brautigan, Overlapping binding sites in protein phosphatase 2A for association with regulatory A and $\alpha 4$ (mTap42) subunits, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 38912–38920.
- [16] K. Murata, J. Wu, D.L. Brautigan, B cell receptor-associated protein $\alpha 4$ displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 10624–10629.
- [17] H. Chung, A.C. Nairn, K. Murata, D.L. Brautigan, Mutation of Tyr307 and Leu309 in the protein phosphatase 2A catalytic subunit favors association with the $\alpha 4$ subunit which promotes dephosphorylation of elongation factor-2, *Biochemistry* 38 (1999) 10371–10376.
- [18] S. Inui, H. Sanjo, K. Maeda, H. Yamamoto, E. Miyamoto, N. Sakaguchi, Ig receptor binding protein 1 ($\alpha 4$) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A, *Blood* 92 (1998) 539–546.
- [19] T. Yamashita, S. Inui, K. Maeda, D.R. Hua, K. Takagi, N. Sakaguchi, The heterodimer of $\alpha 4$ and PP2Ac is associated with S6 kinase1 in B cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (2) (2005) 439–445.
- [20] J. Chen, R.T. Peterson, S.L. Schreiber, $\alpha 4$ associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (1998) 827–832.
- [21] M. Nanahoshi, T. Nishiuma, Y. Tsujishita, K. Hara, S. Inui, N. Sakaguchi, K. Yonezawa, Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by $\alpha 4$ protein and its yeast homolog Tap42, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (1998) 520–526.
- [22] S. Kloerker, R. Reed, J.L. McConell, D. Chang, K. Tran, R.S. Westphal, B.K. Law, R.J. Colbran, M. Kamoun, K.S. Campbell, B.E. Wadzinski, Parallel purification of three catalytic subunits of the protein serine/threonine phosphatase family (PP2Ac, PP4c and PP6c) and analysis of the interaction of PP2Ac with $\alpha 4$ protein, *Protein Expr. Purif.* 31 (2003) 19–33.
- [23] A.L. Fink, Natively unfolded proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15 (2005) 35–41.
- [24] C. Bracken, L.M. Iakoucheva, P.R. Romero, A.K. Dunker, Combining prediction, computation and experiment for the characterization of protein disorder, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14 (2004) 570–576.
- [25] V.N. Uversky, What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2–12.
- [26] J.J. Ward, J.S. Sodhi, L.J. McGuffin, B.F. Buxton, D.T. Jones, Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life, *J. Mol. Biol.* 337 (2004) 635–645.
- [27] L.M. Iakoucheva, C.J. Brown, J.D. Lawson, Z. Obradovic, A.K. Dunker, Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins, *J. Mol. Biol.* 323 (2002) 573–584.

- [28] F.M. Ausubel, R. Brent, R. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, 1998.
- [29] P.J. Gans, P.C. Lyu, M.C. Manning, R.W. Woody, N.R. Kallenbach, The helix-coil transition in heterogeneous peptides with specific side-chain interactions: theory and comparison with CD spectral data, *Biopolymers* 31 (1991) 1605–1614.
- [30] B. Rost, PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks, *Methods Enzymol.* 266 (1996) 525–539.
- [31] P. Romero, Z. Obradovic, A.K. Dunker, Sequence data analysis for long disordered regions prediction in the calcineurin family, *Genomics Inf.* 8 (1997) 110–124.
- [32] V.N. Uversky, J.R. Gillespie, A.L. Fink, Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* 41 (2000) 415–427.
- [33] L.P. Cavalcanti, I.L. Torriani, T.S. Plivelic, C.L.P. Oliveira, G. Kellermann, R. Neuenschwander, Two new sealed sample cells for small angle X-ray scattering from macromolecules in solution and complex fluids using synchrotron radiation, *Rev. Sci. Instrum.* 75 (2004) 4541–4546.
- [34] C.L.P. Oliveira, TRAT1D- Computer Program for SAXS Data Treatment, LNL Technical Manual MT01/2003, 2003.
- [35] V. Semenyuk, D.I. Svergun, GNOM—A program package for small-angle scattering data-processing, *J. Appl. Cryst.* 24 (1991) 537–540.
- [36] D.I. Svergun, Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, *Biophys. J.* 76 (1999) 2879–2886.
- [37] D.I. Svergun, M.V. Petoukhov, M.H.J. Koch, Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering, *Biophys. J.* 80 (2001) 2946–2953.
- [38] V.V. Volkov, D.I. Svergun, Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering, *J. Appl. Cryst.* 36 (2003) 860–864.
- [39] O. Glatter, O. Kratky, *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, 1982.
- [40] D.I. Svergun, M.H.J. Koch, Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution, *Rep. Prog. Phys.* 66 (2003) 1735–1782.
- [41] K. Bilecen, U.H. Ozturk, A.D. Duru, T. Sutlu, M.V. Petoukhov, D.I. Svergun, M.H. Koch, U.O. Sezerman, I. Cakmak, Z. Sayers, Triticum durum metallothionein. Isolation of the gene and structural characterization of the protein using solution scattering and molecular modeling, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 13701–13711.
- [42] M.V. Petoukhov, D.I. Svergun, Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data, *Biophys. J.* 89 (2005) 1237–1250.
- [43] L.M. Iakoucheva, P. Radivojac, C.J. Brown, T.R. O'Connor, J.G. Sikes, Z. Obradovic, A.K. Dunker, The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1037–1049.
- [44] H.J. Dyson, P.E. Wright, Intrinsically unstructured proteins and their functions, *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 197–208.
- [45] V.N. Uversky, Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics, *Protein Sci.* 11 (2002) 739–756.
- [46] M. Nanahoshi, Y. Tsujishita, C. Tokunaga, S. Inui, N. Sakaguchi, K. Hara, K. Yonezawa, Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases, *FEBS Lett.* 446 (1999) 108–112.

3.2.

Identificação de proteínas que interagem com TIPRL no sistema do duplo-híbrido em levedura

Juliana H. C. Smetana, Sandra M. N. Scapin, Daniela S. Razolli, Adriana C. Alves Pinto e Nilson

I. T. Zanchin

Resumo

A proteína Tip41 é um regulador negativo da via da quinase TOR em levedura, inibindo a interação de Tap42 com fosfatases do tipo 2A. A função de sua ortóloga humana, TIPRL, é pouco caracterizada. Neste estudo, TIPRL foi usada como isca em uma triagem de interações usando o sistema do duplo-híbrido em levedura. Ao contrário do esperado, a ortóloga humana de Tap42, $\alpha 4$, não foi isolada nessa triagem. A maior parte dos clones isolados corresponde aos cDNAs dos fatores de transcrição MafB e TAF10, e das subunidades catalíticas de fosfatases do tipo 2A (PP2Ac, PP4c e PP6c). Essas interações foram confirmadas em ensaios *in vitro*. Dois outros cDNAs isolados e confirmados por retransformação correspondem aos produtos dos genes C1ORF124 e C9ORF9, que codificam proteínas de função desconhecida. A interação com C1ORF124 também foi confirmada diretamente. Essas interações sugerem um papel de TIPRL na regulação transcricional, além da função esperada de regulador de fosfatases 2A.

Introdução

Tip41 foi inicialmente identificada em levedura como um componente da via de sinalização da quinase TOR, uma via conservada que regula diversos processos celulares, incluindo o início e alongamento da tradução, biossíntese de RNA transportador e ribossomal, organização do citoesqueleto de actina, transporte de nutrientes e progressão do ciclo celular (Hay and Sonenberg 2004; Raught, et al. 2001). Em levedura, Tip41 parece funcionar como um regulador negativo dessa via por meio de sua interação com Tap42, uma proteína reguladora de fosfatases 2A (Di Como and Arndt, 1996, Jiang and Broach, 1999). A interação de Tip41 com Tap42 é estimulada por rapamicina e faz parte de uma alça de *feedback* que ativa rapidamente a fosfatase Sit4 em condições que inativam a quinase TOR. Na presença de nutrientes, TOR é ativada e fosforila Tip41, que então se dissocia de Tap42 e permite sua associação com Sit4. Na ausência de nutrientes ou na presença de rapamicina, Tip41 é desfosforilada por Sit4 e se associa a Tap42, deixando livre a fosfatase Sit4, que então se associa às SAPs (*Sit4 Associated Proteins*) e desfosforila seus alvos na célula, como o fator de transcrição Gln3 e a quinase Npr1 (Jacinto, et al., 2001)

Pouco é sabido sobre TIPRL, a ortóloga humana de Tip41, uma proteína que foi inicialmente identificada em uma triagem em larga escala de possíveis ativadores de MAP quinases e NF- κ B (Matsuda, et al., 2003). TIPRL é codificada por um gene localizado em 1q23.2 e apresenta duas isoformas de *splicing*, de 178 e 272 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Devido à grande conservação de sequência entre TIPRL humana e Tip41 de levedura, (35% de identidade), seria esperado que sua função também fosse conservada.

Para estabelecer um contexto funcional para essa proteína humana, realizamos uma triagem de interações no sistema do duplo-híbrido em levedura (Fields and Song, 1989). Esse sistema se baseia na reconstituição de um fator de transcrição híbrido no núcleo de células de levedura cotransformadas com dois vetores, um deles codificando a fusão de uma proteína de interesse a um domínio de ligação ao DNA (“isca”), e outro codificando uma proteína candidata em fusão a um domínio de ativação da transcrição (“presa”). A interação entre as duas proteínas promove a aproximação dos domínios de ligação ao DNA e de ativação da transcrição,

permitindo a transcrição de genes repórteres - no caso, a marca de prototrofia a histidina *HIS3* e o gene *LacZ*, que codifica a enzima β -galactosidase e confere coloração azul na presença do substrato X-Gal.

Essa triagem foi feita em busca de identificar a interação de TIPRL com $\alpha 4$ e também novas interações ainda não descritas em outros sistemas. Surpreendentemente, foram identificadas interações com as subunidades catalíticas das fosfatases 2A e com os fatores de transcrição MafB e TAF10, mas não com $\alpha 4$. Além de uma função na regulação de fosfatases 2A, nossos resultados indicam um papel para TIPRL no controle da transcrição, possivelmente por meio da regulação do estado de fosforilação de seus alvos.

Materiais e Métodos

Construção dos vetores

O cDNA de TIPRL (NM_152902) foi amplificado por PCR a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (Clontech Laboratories) usando o oligonucleotídeo direto 5' GAA TTC ATG ATC CAC GGC TTC CAG AGC 3' e o oligonucleotídeo reverso 5' GGA TCC TTA TTC CAC TTG TGT ACT TTT TTG 3', e clonado no vetor pGEM-T (Promega). Esse cDNA foi subclonado entre os sítios de restrição *EcoRI* e *BamHI* do vetor pTL1, obtido a partir do vetor pBTM116 pela troca da marca de resistência de ampicilina para canamicina (Carneiro, et al 2006), gerando o vetor pTL1-TIPRL que codifica a proteína TIPRL em fusão com LexA. O mesmo cDNA, amplificado com o oligonucleotídeo reverso descrito acima e o direto 5' CAT ATG ATC CAC GGC TTC CAG AGC 3', foi subclonado entre os sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* no vetor pET-TEV, um derivado do pET28a que contém um sítio de clivagem da protease TEV (Carneiro, et al 2006). O vetor resultante (pET-TEV-TIPRL) foi usado para expressar a proteína TIPRL em *E. coli* em fusão a uma cauda de polihistidina N-terminal. Os vetores pGEX-MafB/CT, pGEX-TAF10 (78 - 218), usados para a expressão dessas proteínas em *E.coli* em fusão a GST, foram construídos a partir da subclonagem dos respectivos cDNAs parciais, isolados na triagem de interações com TIPRL, entre os sítios de restrição *EcoRI* e *XhoI* do vetor pGEX-5X-2

(GE Healthcare). Para a construção do vetor pGEX-1.44 (cDNA parical de C1ORF124), foram usados os sítios de *BamHI* e *XhoI* do vetor pGEX-5X-2. Para a expressão do cDNA completo de MafB, também isolado na triagem de interações, este foi subclonado no vetor pGEX-4T-1 (GE Healthcare) entre os sítios de restrição *BamHI* e *BglIII*. O cDNA completo do produto do gene C1ORF124 foi amplificado por PCR a partir de uma biblioteca de cDNAs de linfócitos humanos (Clontech Laboratories) utilizando o oligonucleotídeo direto 5' GGA TCC CCT CGA GGA TGG ATG ATG ACT TGA TGT TGG C 3', e o reverso CTG CAG CTG AGT TAA AGA CTT TCT TCG CTT TTG ACT TTG 3' e clonado no vetor pCRII (Invitrogen). Esse cDNA foi subclonado no vetor pGEX-5X-2 no sítio de restrição *XhoI* para a expressão em *E. coli* em fusão a GST.

Duplo-híbrido em levedura

O vetor pTL1-TIPRL foi cotransformado com o vetor pGAD424 na cepa de levedura L40 (Hollenberg, et al., 1995) utilizando o protocolo de transformação de levedura em fase estacionária mediada por PEG e acetato de lítio (Sherman *et al.*, 1986), e testado quanto à autoativação dos genes repórteres *HIS3* e *LacZ*, usando o ensaio de crescimento em meio deficiente em histidina ou o ensaio do X-Gal em filtro, respectivamente. A expressão da proteína de fusão foi verificada por *Western blot* com um anticorpo específico para LexA (Invitrogen). A cepa L40:pTL1-TIPRL foi transformada sequencialmente com uma biblioteca de cDNAs de leucócitos humanos (Clontech) seguindo o protocolo do manual MATCHMAKER GAL4 para as transformações nas escalas *Large* e *Library*. As transformações foram plaqueadas em meio seletivo sintético definido (SD) suplementado com 3-AT (3-aminotriazol), um inibidor competitivo do produto do gene *HIS3* (YNB +ADE + 5 mM 3-AT) e mantidas a 30°C por 3 a 7 dias. Colônias positivas foram isoladas e submetidas ao teste de ativação do gene *LacZ* usando o protocolo do X-Gal em filtro. As colônias que apresentaram resultado positivo nesse teste tiveram seu DNA extraído e transformado na cepa DH5 α de *E. coli*. Os vetores foram extraídos de *E. coli* e sequenciados, e a identidade dos clones foi determinada usando o algoritmo BLAST. A confirmação das interações no sistema do duplo-híbrido foi feita pela cotransformação em L40 de cada vetor candidato com pTL1-TIPRL ou pBTM-Nip7 como controle negativo. O teste de

interação com $\alpha 4$ foi feito utilizando um cDNA parcial isolado no duplo-híbrido com a proteína Int-6 (Carneiro e Zanchin, dados não publicados), iniciado no resíduo 23.

SDS-PAGE e Western blot

As eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram realizadas no sistema Mini-Protean (BioRad). Para as análises por *Western blot*, as amostras de proteínas fracionadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas Immobilon-P (Millipore) usando o sistema Multiphor NovaBlot (GE Healthcare). As membranas foram bloqueadas com TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) contendo BSA 1% e em seguida incubadas com anticorpo primário na diluição apropriada em TBS contendo 0,1% BSA (anti-TIPRL (A300–663A, Bethyl Laboratories) 1:5000, anti-PP2Ac (A300–732A, Bethyl Laboratories) 1:5000, anti-GST (monoclonal hibridoma, cedido por Dr. Jörg Kobarg), 1:5). A detecção foi feita com anticorpos secundários conjugados a fosfatase alcalina (*anti-rabbit* ou *anti-mouse* imunoglobulina G 1:5000, Sigma) usando BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) e NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*).

Cultura de células e preparação e quantificação de extratos

Células HEK293 foram cultivadas em meio MEM (*Minimal Essential Alpha Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina a 37°C sob uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Para a obtenção de extratos totais, células HEK293 foram lavadas em PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM K₂HPO₄) e ressuspensas em tampão HSB (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 0,5% Igepal CA-630, 5 mM EDTA) suplementado com inibidores de proteases (Complete, EDTA-Free, Roche) e NaF 50 mM e, após 30 minutos de incubação no gelo, os lisados foram submetidos a centrifugação (20000 g, 10 min, 4°C). Os sobrenadantes foram quantificados com o *BCA assay kit* (Pierce) usando BSA como padrão.

Expressão em *E. coli* e experimentos de GST pull-down

Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os vetores de interesse foram cultivadas em meio Luria–Bertani contendo os antibióticos apropriados na concentração de 50 µg/mL e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 0,5 mM IPTG (*isopropyl thio-β-D-galactoside*) por 4 horas a 25°C. Para a preparação dos extratos, as células foram ressuspensas no gelo em tampão de lise [PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM K₂HPO₄) contendo 0,5% Igepal CA-630, 1 mM DTT (1,4 ditioneitol) e 1 mM PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonila)], tratadas com lisozima, sonicadas e centrifugadas (20000 g, 10 min, 4°C). Os sobrenadantes foram incubados com resina glutationa sepharose (GE Healthcare) por 30 min a 4°C. Subseqüentemente, a resina foi sedimentada (550 g, 5 min, 4°C) e lavada três vezes com tampão de lise. Nos ensaios envolvendo apenas proteínas recombinantes, as proteínas ligadas foram eluídas em tampão de amostra e separadas por SDS-PAGE. Nos ensaios envolvendo proteínas endógenas, as resinas contendo as proteínas recombinantes de interesse foram incubadas com extratos de células HEK293 por 60 minutos a 4°C e em seguida foram sedimentadas (550 g, 5 min, 4°C) e lavadas três vezes com tampão HSB suplementado com inibidores de proteases (Complete, EDTA-Free, Roche Molecular Biochemicals). As proteínas ligadas foram então eluídas em tampão de amostra e separadas por SDS-PAGE. Os resultados foram visualizados por coloração com *Coomassie Blue* ou *Western blot*.

Resultados e Discussão

Identificação de proteínas que interagem com TIPRL

A identificação de parceiros de interação é um excelente ponto de partida para se determinar a função de proteínas não caracterizadas. No caso de TIPRL, esperava-se a identificação da interação com $\alpha 4$, com base na função de sua ortóloga em levedura. As **tabelas 1** e **2** resumem todos os clones isolados em duas triagens independentes feitas em escalas diferentes (*Large* e *Library*, respectivamente) usando como isca a proteína TIPRL humana (isoforma 1) em

fusão com LexA. Em ambas as triagens, predominaram os clones correspondentes a MafB, TAF10 e fosfatases 2A. Dentre os demais clones, observa-se que muitos correspondem a regiões genômicas ou não traduzidas, e portanto não podem codificar proteínas funcionais. Um clone representativo de cada uma das interações isoladas com maior frequência (MafB, TAF10 e fosfatases 2A) foi selecionado para a confirmação por meio da retransformação de levedura seguida da verificação da ativação específica dos genes repórteres. Como controle negativo, foi usada a proteína não relacionada Nip7 no lugar de TIPRL. Os resultados (**Figura 1**), confirmaram a especificidade dessas três interações. Ensaios *in vitro* mostrados abaixo confirmaram as interações com MafB e TAF10. A confirmação das interações com as subunidades catalíticas das fosfatases 2A é mostrada na seção 3.3.

Dentre as demais interações, alguns dos clones que codificavam proteínas possivelmente envolvidas em sinalização ou controle da expressão gênica foram selecionados para a retransformação e confirmação das interações no sistema do duplo-híbrido. O resultado dessas transformações (**Figura 2**) mostrou que de cinco proteínas testadas, apenas duas ativaram especificamente o gene *HIS3*. Esses clones correspondem a duas proteínas de função desconhecida, produtos dos genes *C1ORF124* e *C9ORF39*. Ao contrário do esperado, nenhum dos clones isolados codificava a proteína $\alpha 4$. Para testar a possibilidade de que se tratasse de um falso negativo, a interação entre TIPRL e $\alpha 4$ foi testada diretamente em paralelo com outras interações (**Figura 2**). O resultado desse teste demonstrou que $\alpha 4$ e TIPRL não interagem no sistema do duplo-híbrido em levedura.

Interação entre TIPRL e MafB

O parceiro de interação identificado com maior frequência na triagem foi o fator de transcrição MafB, um membro da família Maf de reguladores da transcrição que controla processos relacionados ao desenvolvimento, diferenciação e tumorigênese. Os fatores de transcrição Maf contêm um domínio b-ZIP C-terminal que interage com sequências específicas de DNA e também está envolvido na formação de homodímeros e heterodímeros (Blank and Andrews 1997; Motohashi, et al. 1997). As sequências MARE (*Maf Recognition Element*), de

reconhecimento dos fatores de transcrição Maf são relacionadas com as sequências TRE (*phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate (TPA) responsive element*) e CRE (*cyclic AMP responsive element*), reconhecidas pelos fatores do tipo bZIP das famílias AP-1 e CREB/ATF, respectivamente (Kataoka, et al., 1994). MafB pertence ao subgrupo das grandes Mafs que, além do domínio bZIP, apresentam um domínio N-terminal de transativação rico em prolina, serina e treonina. Os fatores de transcrição Maf podem promover a transformação celular por meio de seu domínio de transativação (Kataoka, et al., 2001).

Os clones correspondentes a MafB compreendem cinco cDNAs diferentes (**Figura 3A**), incluindo desde a sequência completa da proteína até um fragmento de 72 resíduos de aminoácidos do extremo C-terminal (resíduos 252 - 323), indicando que esse fragmento é responsável pela interação com TIPRL. O domínio bZIP de dimerização e interação com DNA inclui os resíduos 207 a 316 (de um total de 323 resíduos), sendo que o motivo básico de ligação ao DNA compreende os resíduos 238 a 264, e o zíper de leucina compreende os resíduos 266 a 287. A sobreposição entre o sítio de interação com TIPRL e o domínio bZIP indica que TIPRL pode regular diretamente a dimerização e interação de MafB com seu DNA alvo.

Para confirmar essa interação diretamente, os clones correspondentes à sequência completa de MafB e à região C-terminal (MafB/CT) foram subclonados em vetores de expressão em *E. coli* em fusão com GST. A proteína TIPRL em fusão a uma cauda de polihistidina foi coexpressa em *E. coli* com GST, GST-MafB, e GST-MafB/CT, e os extratos foram submetidos a cromatografia de afinidade em resina glutationa sepharose. TIPRL foi detectada em associação com a resina na presença de GST-MafB e GST-MafB/CT, mas não de GST apenas, confirmando a especificidade dessa interação (**Figura 3B**). O mesmo resultado foi obtido ao se testar a interação entre GST-MafB/CT recombinante e TIPRL endógena de células HEK293, confirmando mais uma vez a interação específica entre TIPRL e a região C-terminal de MafB (**Figura 3C**).

O domínio bZIP é extremamente conservado entre as grandes Mafs, que incluem MafA e c-Maf (**Figura 3D**). Essas proteínas apresentam padrões de expressão específicos entre diferentes tecidos. MafB é muito expressa na linhagem de monócitos e macrófagos, e nas células α do pâncreas, já MafA é muito expressa no cristalino ocular e nas células β do pâncreas (Yang and

Cvekl, 2007). A conservação de sequência na região responsável pela interação com TIPRL, somada à expressão tecido-específica, sugere que a identificação de MafB e não de outras Mafs possa ser decorrente da escolha da biblioteca, não significando que a interação seja exclusiva de MafB. É possível, portanto, que TIPRL seja um regulador comum das grandes Mafs.

Interação entre TIPRL e TAF10

Outro cDNA isolado em alta frequência na triagem de interações com TIPRL foi aquele que codifica o fator de transcrição TAF10. Essa proteína, anteriormente conhecida como TFII30, é um fator associado a TBP (*TATA-binding protein*) que apresenta um domínio semelhante a histona, e é encontrado nos complexos reguladores da transcrição TFIID e TFTC, e também em complexos semelhantes a TFTC como STAGA (*SPT3-TAF9-GCN5-containing complex*) e PCAF (*p300/CBP-associated factor*) (Jacq, et al. 1994; Wieczorek, et al. 1998). TAF10 não é necessário para a transcrição em geral., mas regula um subconjunto de genes incluindo os alvos do receptor de estrógeno (Jacq et al. 1994; Verrier, et al. 1997). Sua função é necessária para os estágios iniciais da embriogênese e para o estabelecimento da barreira da pele na epiderme fetal (Indra, et al. 2005; Mohan, et al. 2003).

O maior clone correspondente a TAF10 se inicia no resíduo 23, e o menor no resíduo 74, sugerindo que a interação é mediada pelo domínio semelhante a histona desse fator de transcrição (**Figura 4A**). A interação foi confirmada como descrito para MafB, usando o sistema do duplo-híbrido e ensaios de interação *in vitro* com proteínas recombinantes (**Figura 4B**) e também com GST-TAF10 (78 - 218) recombinante e TIPRL endógena de células HEK293 (**Figura 4C**), e em todos os ensaios foi observada a interação específica entre TIPRL e TAF10. No ensaio com extratos de células HEK293, foi detectada também a associação específica entre GST-TAF10 e PP2Ac endógena (**Figura 4C**). Esses resultados sugerem que TIPRL possa regular a desfosforilação de TAF10 por PP2Ac, possivelmente controlando sua atividade.

Outras possíveis interações : C1ORF24 e C9ORF39

Dentre as demais possíveis interações isoladas, dois clones que apresentaram resultado positivo no teste de ativação do gene *HIS3* correspondem a proteínas de função desconhecida. O clone que apresentou interação mais forte é o produto do gene *C1ORF39*, que codifica uma proteína de 1430 resíduos de aminoácidos e apresenta similaridade com proteínas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*), envolvidas na segregação de cromossomos (Hirano, 2006). A sequência parcial do clone isolado no duplo-híbrido se inicia no segundo resíduo de aminoácido, mas não foi possível obter a sequência completa desse clone. Apesar da similaridade com proteínas nucleares, essa proteína foi recentemente identificada no centrôssomo, e nomeada Centlein (*Centrosomal Protein*) (Makino et al., 2008). Essa interação não foi ainda confirmada diretamente devido a dificuldades na subclonagem desse cDNA em vetores de expressão, provavelmente devido a seu tamanho. Caso essa interação seja confirmada, uma hipótese provável é que essa proteína seja um alvo de PP4, uma fosfatase localizada no centrôssomo (Cohen et al., 2005) que é um dos alvos de TIPRL.

Já o clone que apresentou uma interação mais fraca é o produto do gene *C1ORF124*, que apresenta duas isoformas de *splicing*. O clone isolado corresponde a uma pequena região do domínio SprT, comum a ambas as isoformas (**Figura 5A**). Uma dessas isoformas apresenta apenas o domínio SprT, encontrado em fatores envolvidos no alongamento da transcrição. A outra isoforma é formada por esse domínio e também um domínio *Zinc Finger*, encontrado em proteínas que interagem com ácidos nucleicos. A combinação desses domínios indica uma possível função do produto do gene *C1ORF124* no controle da transcrição. A sequência completa da isoforma maior foi amplificada a partir de uma biblioteca de cDNAs de leucócitos humanos e subclonada no vetor pGEX-5X-2. O clone original também foi subclonado nesse mesmo vetor, e essas construções foram expressas em *E. coli* em fusão a GST. A co-purificação de TIPRL endógena de células HEK293 ou recombinante confirmou a especificidade dessa interação *in vitro* (**Figura 5B, C**). Apesar de não haver informações na literatura sobre essa proteína, sua composição de domínios sugere tratar-se de um fator de transcrição, o que seria uma evidência a mais do envolvimento de TIPRL no controle da expressão gênica.

Referências Bibliográficas

- Blank V, Andrews NC 1997 The Maf transcription factors: regulators of differentiation *Trends Biochem Sci.* **22** 437-441.
- Carneiro FR, Silva TC, Alves AC, Haline-Vaz T, Gozzo FC, Zanchin NI 2006 Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1 *Biochem Biophys Res Commun.* **343** 260-268
- Cohen PT, Philp A & Vázquez-Martin C 2005 Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions. *FEBS Letters* **579** 3278-3286.
- Di Como CJ & Arndt KT 1996 Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & Development* **10** 1904-1916.
- Fields S, & Song O 1989 A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340** 245-246
- Hay N & Sonenberg N 2004 Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* **18** 1926-1945.
- Hirano T. 2006 At the heart of the chromosome: SMC proteins in action *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7** 311-322.
- Indra AK, Mohan WS 2nd, Frontini M, Scheer E, Messaddeq N, Metzger D, Tora L 2005 TAF10 is required for the establishment of skin barrier function in foetal, but not in adult mouse epidermis *Dev Biol* **285** 28-37.
- Jacinto E, Guo B, Arndt KT, Schmelzle T & Hall MN 2001 TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell* **8** 1017-1026.
- Jacq X, Brou C, Lutz Y, Davidson I, Chambon P, Tora L 1994 Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor *Cell.* **79** 107-117
- Jiang Y & Broach JR 1999 Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J* **18** 2782-2792.
- Kataoka K, Fujiwara KT, Noda M, Nishizawa M 1994 MafB, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with Jun *Mol Cell Biol.* **14** 7581-7591

- Kataoka K, Yoshitomo-Nakagawa K, Shioda S, Nishizawa M 2001 A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation, and transforming activities *J Biol Chem.* **276** 819-826.
- Makino K, Umeda K, Uezu A, Hiragami Y, Sakamoto T, Ihn H, Nakanishi H. 2008. Identification and characterization of the novel centrosomal protein centlein *Biochem Biophys Res Commun.* **366** 958-962.
- Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, & Sugano S. 2003 Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* **22** 3307-3318.
- Mohan WS Jr, Scheer E, Wendling O, Metzger D, Tora L 2003 TAF10 (TAF(II)30) is necessary for TFIID stability and early embryogenesis in mice *Mol Cell Biol.* **23** 4307-4318.
- Motohashi H, Shavit JA, Igarashi K, Yamamoto M, Engel JD. 1997 The world according to Maf *Nucleic Acids Res.* **25** 2953-2959
- Raught B, A.C. Gingras AC, and &. Sonenberg N 2001 The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** 7037-7044.
- Verrier CS, Roodi N, Yee CJ, Bailey LR, Jensen RA, Bustin M, Parl FF 1997 High-mobility group (HMG) protein HMG-1 and TATA-binding protein-associated factor TAF(II)30 affect estrogen receptor-mediated transcriptional activation *Mol Endocrinol.* **11** 1009-1019
- Wieczorek E, Brand M, Jacq X, Tora L 1998 Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II *Nature.* **393** 187-191.
- Yang Y, Cvekl A 2007 Large Maf transcription factors: Cousins of AP-1 proteins and important regulators of cellular differentiation *Einstein J Biol Med.* **23** 2-11

Tabela 1. Clones isolados no duplo-híbrido com TIPRL, escala *Large*.

Proteína	Número de clones identificados	Função	Número de acesso	Confirmação
MafB	7	Fator de transcrição da família bZIP.	31652256	Confirmado (duplo-híbrido e teste <i>in vitro</i>)
TAF10	4	Fator de transcrição associado a TBP, componente dos complexos TFIID e TFTC.	21166374	Confirmado (duplo-híbrido e teste <i>in vitro</i>)
PP2Ac alpha	2	Fosfatase de fosfoserina e fosfotreonina.	21619479	Confirmado (duplo-híbrido e teste <i>in vitro</i>)
Citocromo oxidase III	3	Proteína da membrana mitocondrial, participa da cadeia de transporte de elétrons.	33466037	Não testado
Glicoforina C	3	Glicoproteína integral da membrana de eritrócitos, regula a estabilidade mecânica dessas células.	56157790	Não testado
clone IMAGE: 5270771	1	Proteína transmembrana glicosilada (<i>Homo sapiens small transmembrane and glycosylated protein</i>)	28279013	Não testado
BAZ2A (Clone 1.6)	1	Bromodomain associated to zinc finger domain, participa do complexo NoRC de remodelamento da cromatina.	6683497	Não confirmado (duplo-híbrido)
Regiões genômicas ou não traduzidas	6			

Tabela 2. Clones isolados no duplo-híbrido com TIPRL, escala *Library*.

Proteína	Número de clones identificados	Função	Número de acesso	Confirmação
MafB	23	Fator de transcrição da família bZIP.	31652256	Confirmado (duplo-híbrido e teste <i>in vitro</i>)
TAF10	9	Fator de transcrição associado a TBP, componente dos complexos TFIID e TFTC.	21166374	Confirmado (duplo-híbrido e teste <i>in vitro</i>)
PP4c	4	Fosfatase de fosfoserina e fosfotreonina.	4506026	Confirmado (duplo-híbrido e teste <i>in vitro</i>)
PP6c	2	Fosfatase de fosfoserina e fosfotreonina.	20127429	Confirmado (duplo-híbrido e teste <i>in vitro</i>)
PP2Ac beta	3	Fosfatase de fosfoserina e fosfotreonina.	57222564	Confirmado (duplo-híbrido e teste <i>in vitro</i>)
Aldolase C	2	Enzima da glicólise que catalisa a clivagem de frutose 1,6 bifosfato.	68303552	Não testado
Centlein (Clone 1.27)	1	Proteína centrossomal de função desconhecida. Apresenta domínio Smc (<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>)	21758527	Confirmado (duplo-híbrido)
glycosyltransferase 1 domain containing 1 (GLT1D1)	1	Proteína de função desconhecida, contém domínio de glicosiltransferase.	21389558	Não testado
cDNA FLJ13279 fis	1	Proteína de função desconhecida, semelhante ao <i>Pre-B enhancing factor precursor</i>	10435234	Não testado
Cofilin 1	1	Regulador do citoesqueleto de actina.	15147368	Não testado
C1ORF124 (Clone 1.44)	1	Proteína de função desconhecida que apresenta um domínio SprT com possível função no alongamento da transcrição	14041917	Confirmado (duplo-híbrido e teste <i>in vitro</i>)
Cathepsin S	1	Protease lisossomal envolvida na degradação de antígenos para apresentação ao MHC II.	806607	Não testado

Tabela 2 (continuação). Clones isolados no duplo-híbrido com TIPRL, escala *Library*.

Proteína	Número de clones identificados	Função	Número de acesso	Confirmação
Hemoglobin, alpha 1 (HBA1)	1	Uma das cadeias polipeptídicas que constituem a hemoglobina HbA.	14456711	Não testado
IGL mRNA for immunoglobulin lambda light chain	1	Parte da cadeia de imunoglobulina.	21669516	Não testado
Nuclear Helicase II, DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9 (Clone 2.10)	1	Helicase de RNA e DNA, envolvida no metabolismo de ácidos nucleicos celulares e virais.	1806047	Não confirmado (duplo-híbrido)
Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1) (Clone 2.16)	1	Proteína celular que antagoniza a função de E1A de adenovirus.	14250390	Não confirmado (duplo-híbrido)
Regiões genômicas ou não traduzidas	7			

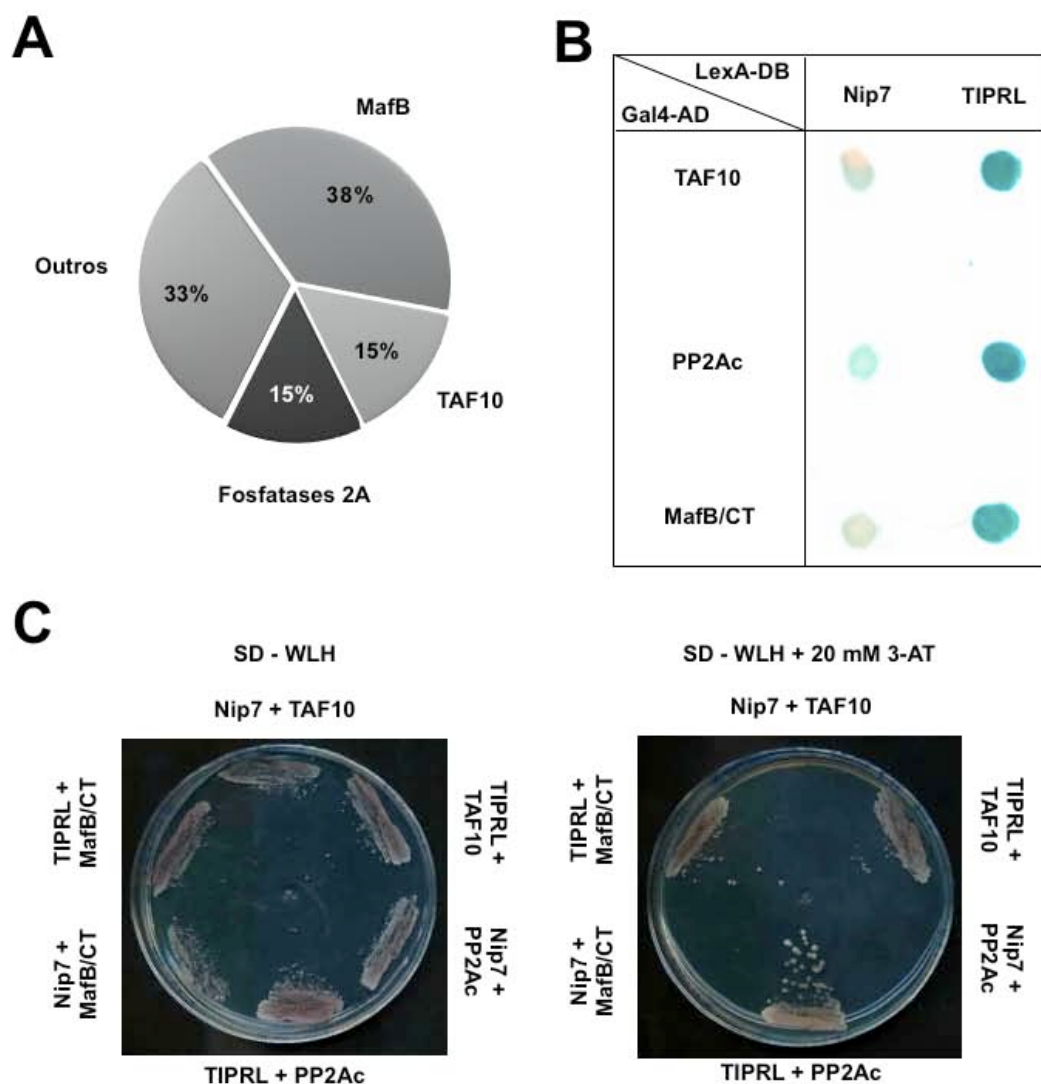


Figura 1. (A) Representação esquemática dos cDNAs obtidos na triagem de interações com TIPRL no sistema do duplo-híbrido em levedura. Os resultados representam o total de duas triagens independentes, totalizando 88 clones. **(B)** Teste de ativação do gene repórter *LacZ*. Os vetores codificando TAF10 (resíduos 78 a 218), MafB/CT ou PP2Ac foram cotransformados em L40 com pTL1-TIPRL e as colônias resultantes foram testadas quanto a sua habilidade de ativar a expressão da β -galactosidase em um ensaio do X-Gal em filtro. Como controle negativo, cada vetor foi cotransformado também com pBTM-Nip7, que codifica uma proteína não relacionada. Os cotransformantes com TIPRL produziram uma coloração azul muito mais intensa do que com Nip7, confirmando a especificidade dessa ativação. **(C)** Teste de ativação do gene repórter *HIS3*. Os cotransformantes mostrados em B foram estriados em meio mínimo deficiente em triptofano, leucina e histidina (SD-WLH), no qual todos foram capazes de crescer, ou no mesmo meio suplementado com 3-AT, um inibidor do produto do gene *HIS3*, no qual apenas os transformantes com TIPRL foram capazes de crescer, confirmando a especificidade das interações.

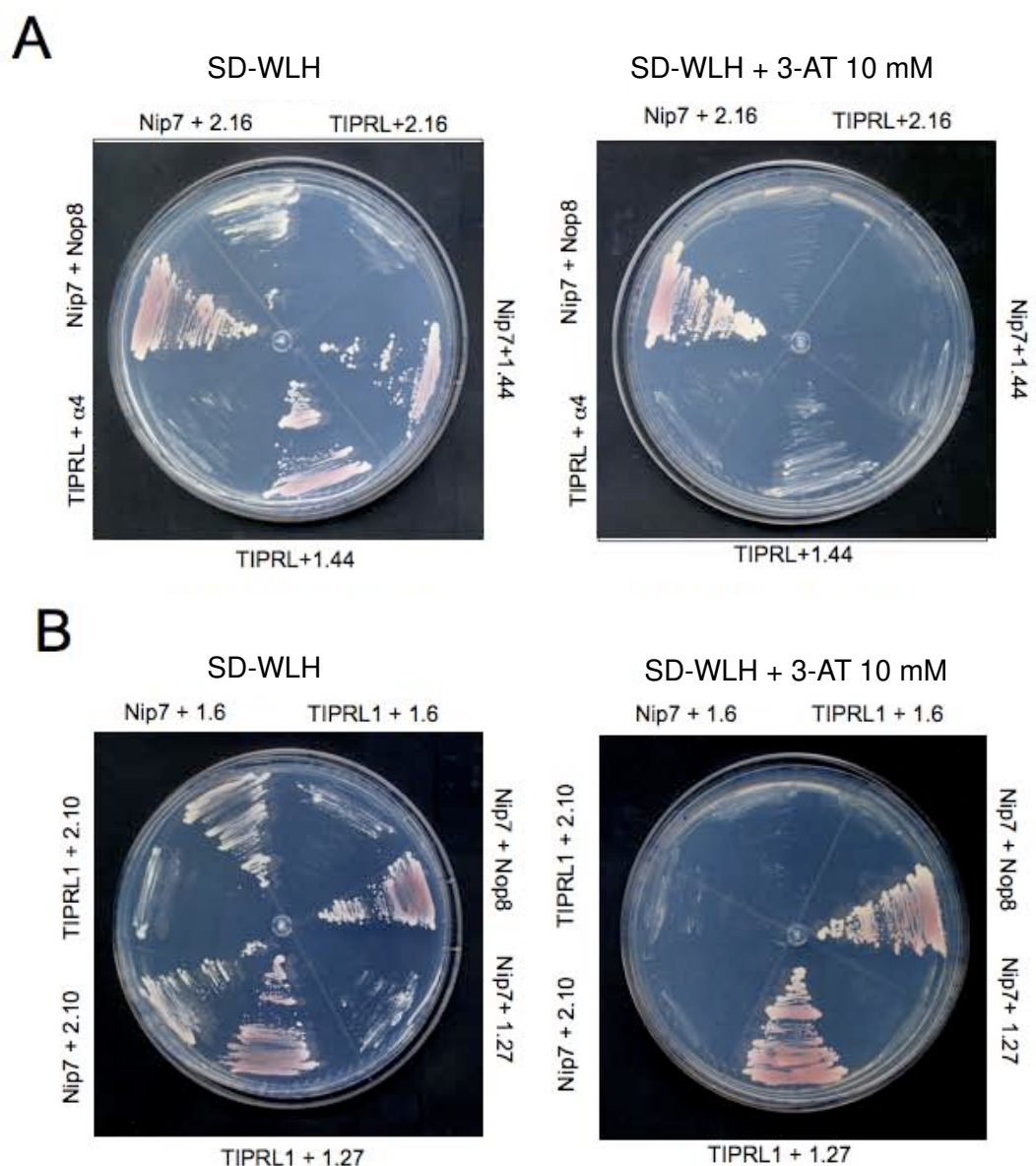


Figura 2. Confirmação de outras interações com TIPRL no sistema do duplo-híbrido e levedura. Os clones 1.6, 1.27, 1.44, 2.10 e 2.16, correspondendo a cDNAs parciais de BAZ2A, C9ORF39, C1ORF124, *Nuclear Helicase II* e CREG1, respectivamente, foram co-transformados na cepa de levedura L40 e testados quanto a sua habilidade de ativar o gene repórter *HIS3* pelo crescimento em meio de cultura deficiente em histidina (SD-WLH) e suplementado com 3-AT (SD-WLH+3-AT 10 mM), um inibidor do produto do gene *HIS3*. Um cDNA parcial de α 4 (resíduos 23 - 339) também foi testado. A interação entre Nip7 e Nop8 foi usada como controle positivo, e Nip7 foi usada como controle negativo. Apenas os clones 1.27 e 1.44 foram capazes de ativar especificamente o gene *HIS3* nas condições testadas.

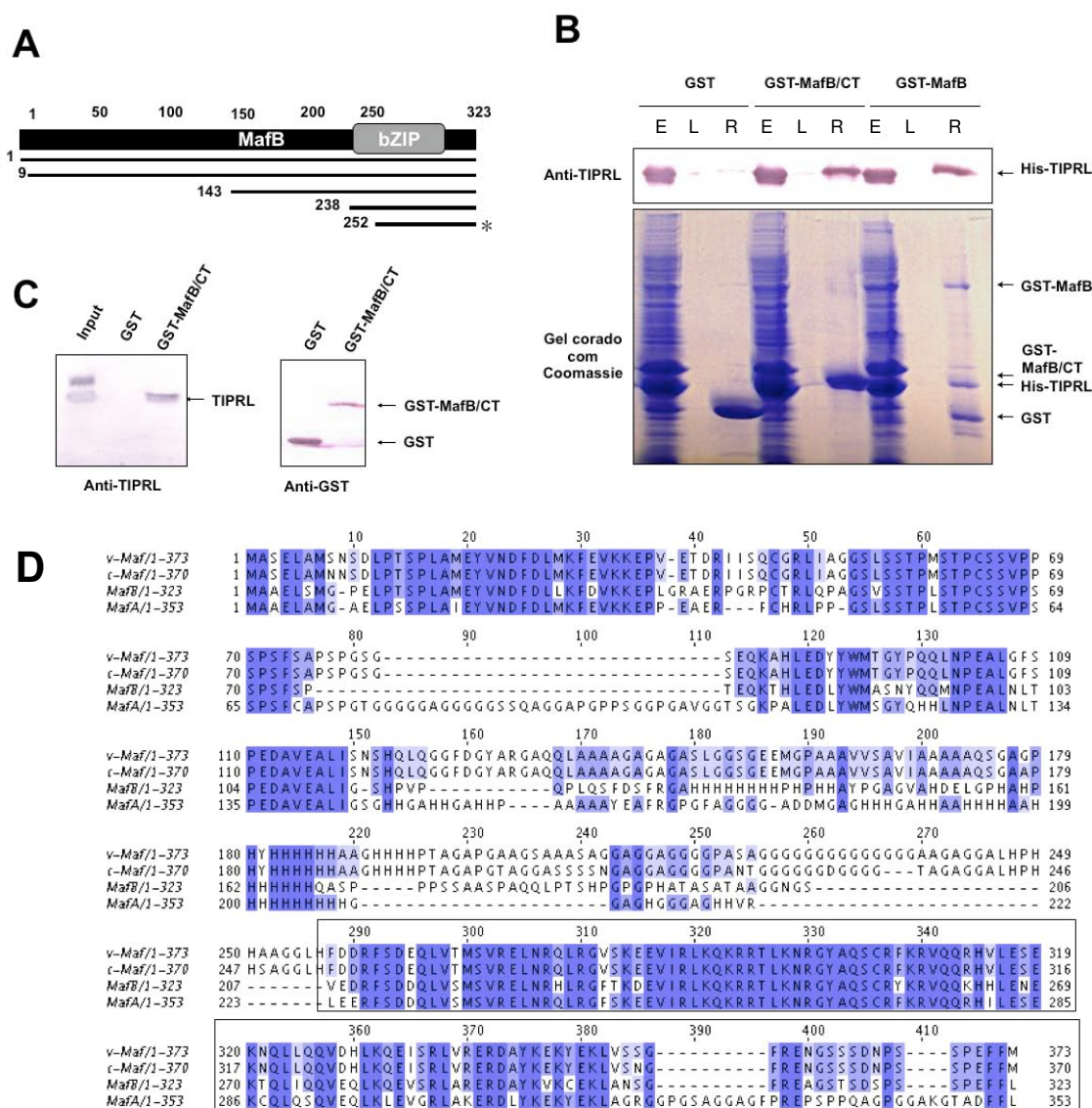


Figura 3. (A) Representação esquemática dos clones de MafB isolados na triagem de interações com TIPRL. A extensão de cada clone é representada por uma linha com o resíduo inicial indicado à esquerda. O asterisco indica o clone correspondente a MafB/CT. **(B)** Teste de interação *in vitro* usando proteínas recombinantes. TIPRL em fusão a polihistidina (His-TIPRL) foi coexpressa em *E. coli* com GST, GST-MafB e GST-MafB/CT, e os extratos foram submetidos a cromatografia de afinidade em resina glutationa sepharose. A copurificação de His-TIPRL com GST-MafB e GST-MafB/CT, mas não com GST apenas, confirma a especificidade dessa interação. E: extrato, L: lavagem, e R: resina. **(C)** Ensaio de interação entre TIPRL endógena de células HEK293 e GST-MafB/CT recombinante. Extratos de células HEK293 foram incubados com GST ou GST-MafB/CT ligadas à resina glutationa sepharose, e as proteínas ligadas após três lavagens foram detectadas por Western blot. TIPRL endógena se associou especificamente a MafB/CT. **(D)** Alinhamento feito com o programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw), mostrando a conservação dos domínios bZIP de MafA, MafB e c-Maf (destacados com retângulos).

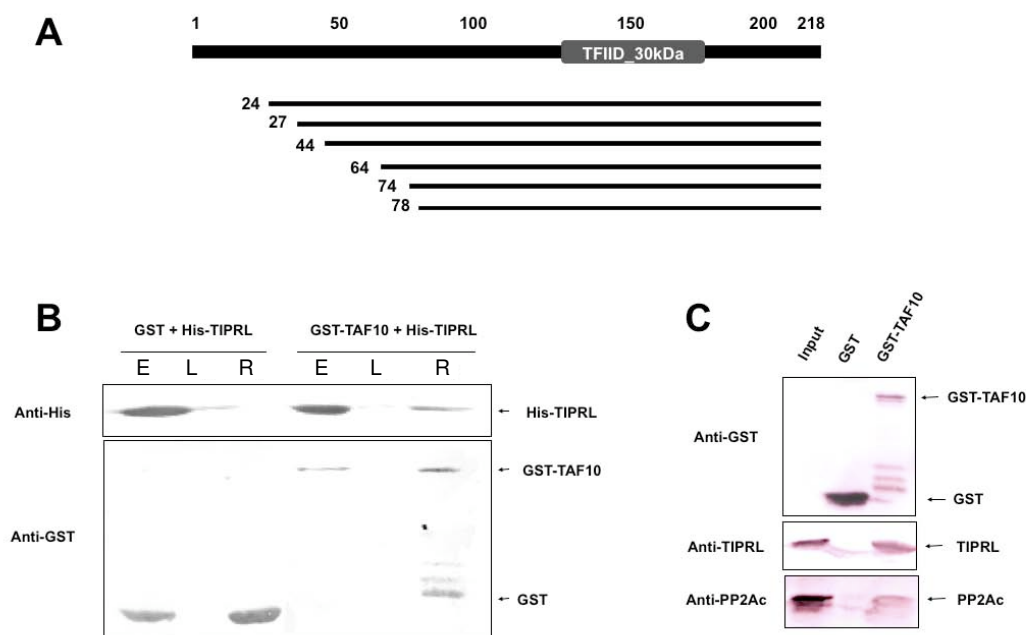


Figura 4. (A) Representação esquemática dos clones de TAF10 isolados na triagem de interações com TIPRL. A extensão de cada clone é representada por uma linha com o resíduo inicial indicado à esquerda. **(B)** Confirmação *in vitro* da interação da proteína TIPRL com o fator de transcrição TAF10. TIPRL em fusão a polihistidina (His-TIPRL) foi coexpressa em *E. coli* com GST ou GST-TAF10 (resíduos 78 - 218). Os extratos foram incubados com a resina glutationa sepharose e, após três lavagens, as proteínas ligadas à resina foram eluídas em tampão de amostra e resolvidas por SDS-PAGE (10%). A ligação da proteína His-TIPRL a cada uma das fusões com GST foi verificada por *Western blot* anti-His, e foi feito um *Western blot* anti-GST das mesmas amostras como controle. Foram analisadas frações do extrato (E), lavagem (L) e resina (R). Observa-se a presença da proteína TIPRL em todos os extratos, mas a interação foi detectada apenas com TAF10, e não com o controle negativo (GST). **(C)** Teste de interação entre GST-TAF10 (resíduos 78 - 218) e TIPRL endógena de células HEK293. Extratos de células HEK293 (*input*) foram incubados com GST ou GST-TAF10 previamente imobilizados em resina glutationa sepharose e, após três lavagens, as proteínas ligadas à resina foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por *Western blot*. Observa-se que TIPRL e PP2Ac endógenas interagiram com GST-TAF10, mas não com GST, o que demonstra a especificidade das interações.

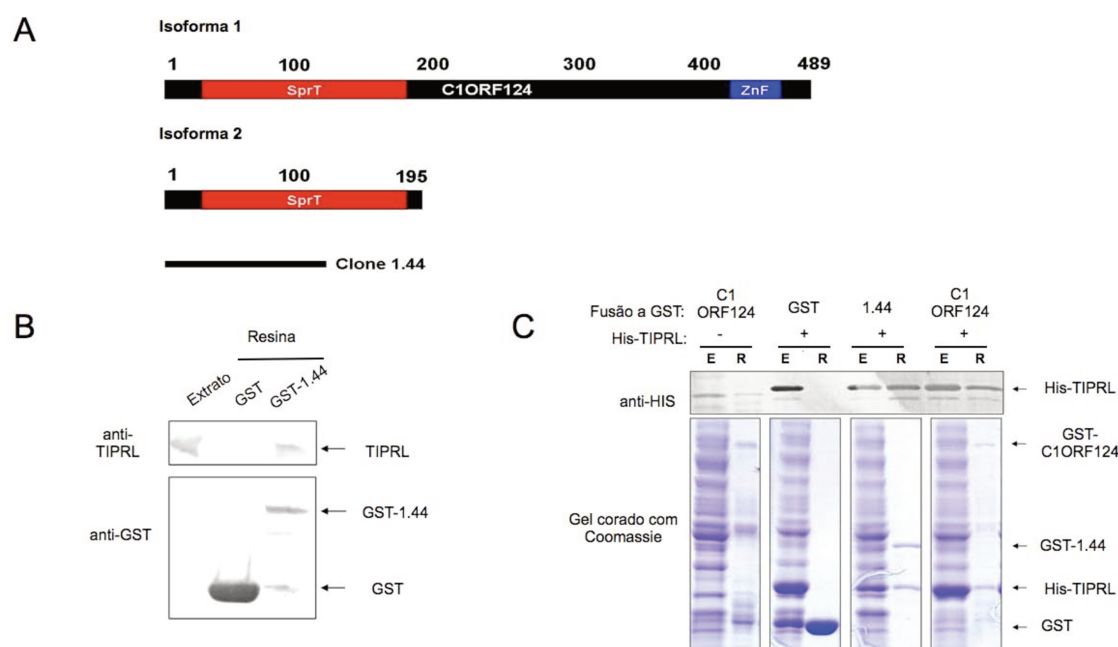


Figura 5. (A) Representação esquemática das duas isoformas de C1ORF124 e da extensão do clone 1.44 isolado no duplo-híbrido. **(B)** Teste de interação entre TIPRL endógena de células HEK293 e GST-1.44 recombinante. GST ou GST-1.44 imobilizadas em resina glutationa sepharose foram incubadas com extrato celular de HEK293 e as proteínas ligadas à resina foram eluídas em tampão de amostra e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. GST, GST-1.44 e TIPRL foram detectadas por análises de *Western blot* usando os anticorpos anti-TIPRL ou anti-GST. TIPRL endógena do extrato celular de HEK293 foi detectada em associação com GST-1.44, mas não com GST sozinha. **(C)** Análise da interação entre TIPRL e a isoformas 1 de C1ORF124. Proteínas de fusão a GST foram isoladas de extratos de *E. coli* BL21(DE3) pela imobilização em resina glutationa sepharose e, após três lavagens, as proteínas ligadas foram eluídas em tampão de amostra e detectadas por *Western blot* com anticorpo anti-His ou por coloração com *Coomassie Brilliant Blue*. Os experimentos mostram que C1ORF124 interage diretamente com TIPRL. E: extrato, R: resina.

3.3

**Interaction analysis of the heterotrimer
formed by the phosphatase 2A catalytic
subunit, $\alpha 4$ and the mammalian ortholog of
yeast Tip41 (TIPRL)**

Juliana Helena Costa Smetana e Nilson Ivo Tonin Zanchin

The FEBS Journal

2007 vol. 274 (22) pp. 5891-5904

Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, $\alpha 4$ and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL)

Juliana H. C. Smetana and Nilson I. T. Zanchin

Center for Structural Molecular Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil

Keywords

$\alpha 4$; rapamycin pathway; Tip41; type 2A phosphatases; yeast two-hybrid system

Correspondence

N. I. T. Zanchin, Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, R. Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000, Campinas – SP, PO Box 6192, CEP 13084-971, Brazil
Fax: +55 19 3512 1004
Tel: +55 19 3512 1113
E-mail: zanchin@lnls.br

(Received 7 June 2007, revised 25 August 2007, accepted 20 September 2007)

doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06112.x

Type 2A serine/threonine phosphatases are part of the PPP subfamily that is formed by PP2A, PP4 and PP6, and participate in a variety of cellular processes including transcription, translation, regulation of the cell cycle, signal transduction and apoptosis. PP2A is found predominantly as a heterotrimer formed by the catalytic subunit (C) and by a regulatory (B, B' or B'') and a scaffolding (A) subunit. Yeast Tap42p and Tip41p are regulators of type 2A phosphatases, playing antagonistic roles in the target of rapamycin signaling pathway. $\alpha 4$ and target of rapamycin signaling pathway regulator-like (TIPRL) are the respective mammalian orthologs of Tap42p and Tip41p. $\alpha 4$ has been characterized as an essential protein implicated in cell signaling, differentiation and survival; by contrast, the role of mammalian TIPRL is still poorly understood. In this study, a yeast two-hybrid screen revealed that TIPRL interacts with the C-terminal region of the catalytic subunits of PP2A, PP4 and PP6. The TIPRL-interacting region on the catalytic subunit was mapped to residues 210–309 and does not overlap with the $\alpha 4$ -binding region, as shown by yeast two-hybrid and pull-down assays using recombinant proteins. TIPRL and $\alpha 4$ can bind PP2Ac simultaneously, forming a stable ternary complex. Reverse two-hybrid assays revealed that single amino acid substitutions on TIPRL including D71L, I136T, M196V and D198N can block its interaction with PP2Ac. TIPRL inhibits PP2Ac activity *in vitro* and forms a rapamycin-insensitive complex with PP2Ac and $\alpha 4$ in human cells. These results suggest the existence of a novel PP2A heterotrimer ($\alpha 4$:PP2Ac:TIPRL) in mammalian cells.

Type 2A phosphatases are part of the PPP subfamily that is formed by PP2A, PP4 and PP6, the mammalian orthologs of yeast Pph21/22, Pph3 and Sit4, respectively. These are serine/threonine phosphatases with a wide range of substrates acting in a variety of cellular processes such as transcription, translation, regulation of the cell cycle, signal transduction and apoptosis [1–4]. PP2A has been described as a holoenzyme formed by a catalytic (C), a regulatory (B, B' or B'') and a scaffolding (PR65/A) subunit [1–4].

Although dimers formed by AC subunits have been described *in vivo*, the prevalent form of the PP2A holoenzyme is the trimeric A:B:C complex. The number of B-type subunits is still growing with new members continuously being discovered. The subunit composition of the holoenzyme determines its subcellular localization, activation state and substrate specificity [1–4]. PP4 forms either a heterotrimer with the subunits PP4R2 and PP4R3 or a heterodimer with PP4R1 [5], and specific subunits of PP6 (PP6R1,

Abbreviations

3-AT, 3-amino-1,2,4-triazole; GST, glutathione S-transferase; RBCC, ring finger B-box coiled coil; TIPRL, TOR signaling pathway regulator-like; TOR, target of rapamycin.

PP6R2 and PP6R3) have also been characterized recently [6].

In addition to the regulatory and scaffolding subunits described above, mammalian type 2A phosphatases share the $\alpha 4$ protein as a common regulator, which binds directly to the catalytic subunits and displaces other regulatory subunits [7–10]. $\alpha 4$, the mammalian ortholog of yeast Tap42, was initially identified in association with the B-cell receptor Ig α [11] and has been implicated in the regulation of B- and T-cell differentiation [12,13], vertebrate embryonic development and cell death [14]. $\alpha 4$ was shown to interact directly with the catalytic subunits of PP2A, PP4 and PP6 [10] and with the ring finger B-box coiled coil (RBCC) proteins MID1 and MID2 [15,16], and has also been found to participate in kinase/phosphatase signaling modules with S6K [17] and CaMKII [18]. These $\alpha 4$ -containing complexes exemplify mechanisms of PP2A regulation which are independent of the canonical A and B regulatory subunits.

Type 2A phosphatases are key players in the yeast target of rapamycin (TOR) signaling pathway [3]. Although Tap42 was characterized as a regulator of the TOR pathway in yeast cells [19], the role of $\alpha 4$ in the mTOR-dependent control of cell growth is still unclear. The yeast Tip41 protein was identified in a yeast two-hybrid screen as a binding partner for Tap42 and genetic analyses suggested that it functions as a negative regulator of the rapamycin-sensitive signaling pathway by competing with Sit4 for Tap42 [20]. The fission yeast homolog of Tip41 has been characterized as a regulator of the activity of type 2A phosphatases, possibly through its interaction with Tap42 [21]. Therefore, characterization of TOR signaling pathway regulator-like (TIPRL; TIP41), the mammalian ortholog of Tip41, may provide clues to better understand the regulation of type 2A phosphatases and mTOR signaling.

In this study, starting from yeast two-hybrid analyses, we identified the interaction of TIPRL with the C-terminal region of the catalytic subunits of type 2A phosphatases. TIPRL forms a heterotrimeric complex with PP2Ac and $\alpha 4$ and does not compete with $\alpha 4$ for PP2Ac binding, which contrasts with the model described previously for their respective yeast orthologs [20]. Reverse two-hybrid assays revealed that single amino acid substitutions on TIPRL including D71L, I136T, M196V and D198N can block its interaction with PP2Ac. TIPRL inhibits PP2A activity *in vitro* and the PP2Ac/TIPRL complex is not affected by rapamycin treatment of human cells. Our results suggest that TIPRL, $\alpha 4$ and PP2Ac constitute a novel heterotrimeric phosphatase holoenzyme.

Results

TIPRL interacts with the C-terminal region of the catalytic subunits of type 2A phosphatases

A yeast two-hybrid screen using TIPRL as bait revealed its interaction with the catalytic subunits of type 2A phosphatases. A human leukocyte cDNA library fused to the *GAL4* activation domain of pACT2 was screened using the yeast two-hybrid system with TIPRL fused to *lexA* as bait. pACT2 was rescued from 88 positive clones and the cDNAs were identified by DNA sequencing. Ten cDNAs from the 88 positive clones encoded catalytic subunits of the type 2A phosphatases PP2Ac α (one cDNA), PP2Ac β (three cDNAs), the C-terminal region of PP2Ac α / β (one cDNA), PP4c (three cDNAs) and PP6c (two cDNAs). Initial mapping of the region of PP2Ac involved in TIPRL binding was obtained from the cDNAs that showed positive interaction with TIPRL. The extension of these cDNAs is shown in Fig. 1A. Complete cDNAs were isolated only for PP2Ac α and PP2Ac β . An additional PP2Ac β cDNA was truncated at residue 14. A fourth type of PP2Ac cDNA, encoding residues from position 210 to the C-terminus, may correspond to both PP2Ac α and PP2Ac β because they show identical amino acid sequence in this region. Two different cDNAs encoding PP4c were isolated, including from residues 175 and 195 to the C-terminus. The cDNAs encoding PP6c comprise from residues 106 and 171 to the C-terminus, respectively.

The interaction between TIPRL and the catalytic subunit of type 2A phosphatases was verified by retransforming the prey plasmids into the L40 strain containing plasmids pTL1-TIPRL encoding the *lexA*-TIPRL fusion protein (Fig. 1B). This assay was performed with the complete PP2Ac α and PP2Ac β cDNAs, with the longest PP4c and PP6c cDNAs, encompassing residues 175–307 and 106–305, respectively, and the shortest cDNA, corresponding to the C-terminal residues 210–309 of PP2Ac α / β (named PP2AcCT). As negative controls, the cDNA clones in pACT2 were tested for self-activation using an unrelated bait (Nip7p). The interacting proteins Nip7p and Nop8p were used as a positive two-hybrid control [22]. This assay confirmed the activation of *HIS3* and *lacZ* (not shown) expression in the clones containing *lexA*-TIPRL and the catalytic subunit of the phosphatases fused to the *GAL4* activation domain (Fig. 1B), indicating specific interactions between TIPRL and PP2A catalytic subunits.

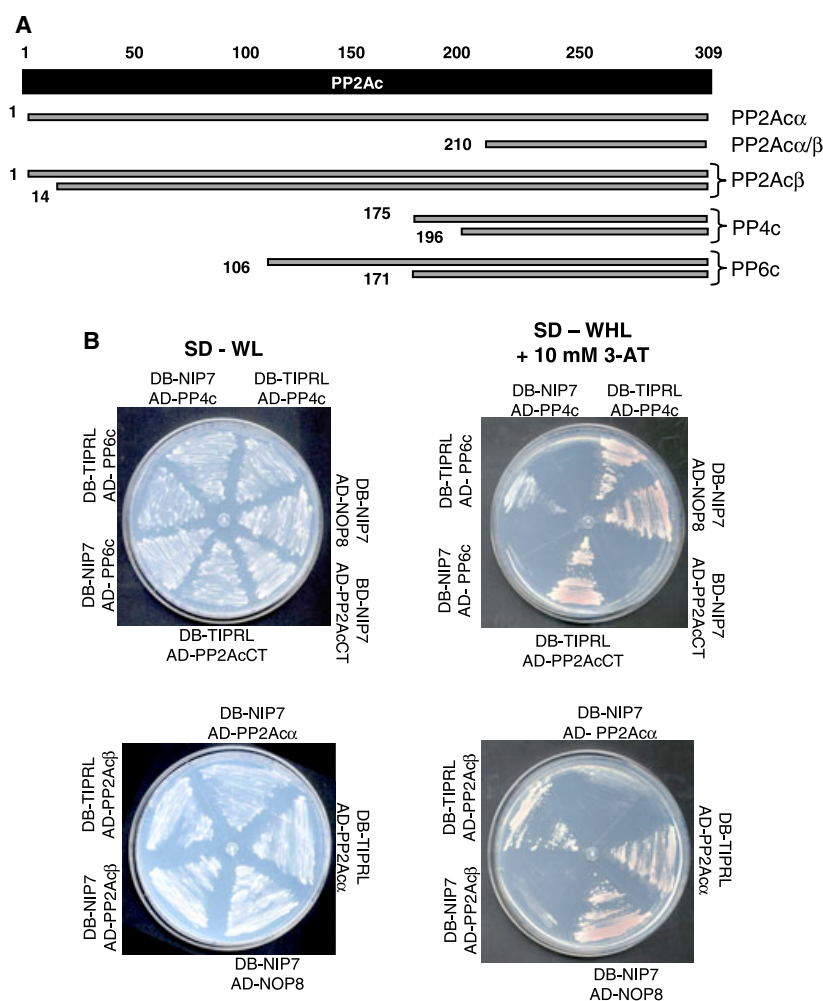


Fig. 1. TIPRL interaction with catalytic subunits of type 2A phosphatases in the yeast two-hybrid system. (A) Schematic representation of the cDNAs encoding catalytic subunits of type 2A phosphatases isolated in the yeast two-hybrid screen using the TIPRL as bait. PP2Ac is represented by a black bar for comparison. Numbers on the left of the gray bars indicate the first amino acid in the respective activation domain-phosphatase catalytic subunit fusion. The PP2Ac isoforms α and β share identical amino acid sequences in the C-terminal region comprising residues 210–309. (B) Two-hybrid assay for expression of the *HIS3* reporter gene. Strain L40 carrying the yeast two-hybrid vectors encoding the indicated DNA-binding domain (DB) and activation domain (AD) fusions were plated on synthetic minimal medium lacking tryptophan and leucine (left, SD-WL) and, on minimal medium supplemented with 10 mM 3-AT lacking tryptophan, leucine and histidine (right, SD-WLH +10 mM 3-AT). The phosphatase cDNAs fused to the activation domain were: PP2Ac α and PP2Ac β : full length, PP4c: residues 175–307, PP6c: residues 106–305 and PP2AcCT: residues 210–309. As negative controls, the activation domain-phosphatase cDNA fusions were assayed in combination with pBTM-NIP7, encoding a DNA-binding domain fusion with an unrelated protein. Plasmids pBTM-NIP7 (DB-NIP7) and pACT-NOP8 (AD-NOP8) were used as a positive control.

The cDNAs of the phosphatase catalytic subunits tested in the yeast two-hybrid system were subcloned into the plasmid pGEX-5x2 in frame with glutathione *S*-transferase (GST) and the resulting fusion proteins were used to test their interaction with His-TIPRL using recombinant proteins expressed in *Escherichia coli*. In this experiment, His-TIPRL was pulled down by all GST-phosphatase fusion proteins tested, but not by GST alone (Fig. 2A). Residues 210–309 corresponding to the C-terminal region of PP2Ac α and

PP2Ac β were sufficient for this interaction (Fig. 2A). The interaction between recombinant PP2Ac α and endogenous TIPRL from HEK293 was tested in a GST pull-down assay using glutathione-Sepharose-immobilized GST-PP2Ac α or GST and a HEK293 cell extract. TIPRL was able to bind to GST-PP2Ac α , but not to GST alone, which further confirms the specificity of this interaction (Fig. 2B).

Analysis of TIPRL protein expression by immunoblot analysis identified similar levels in the immortalized cell

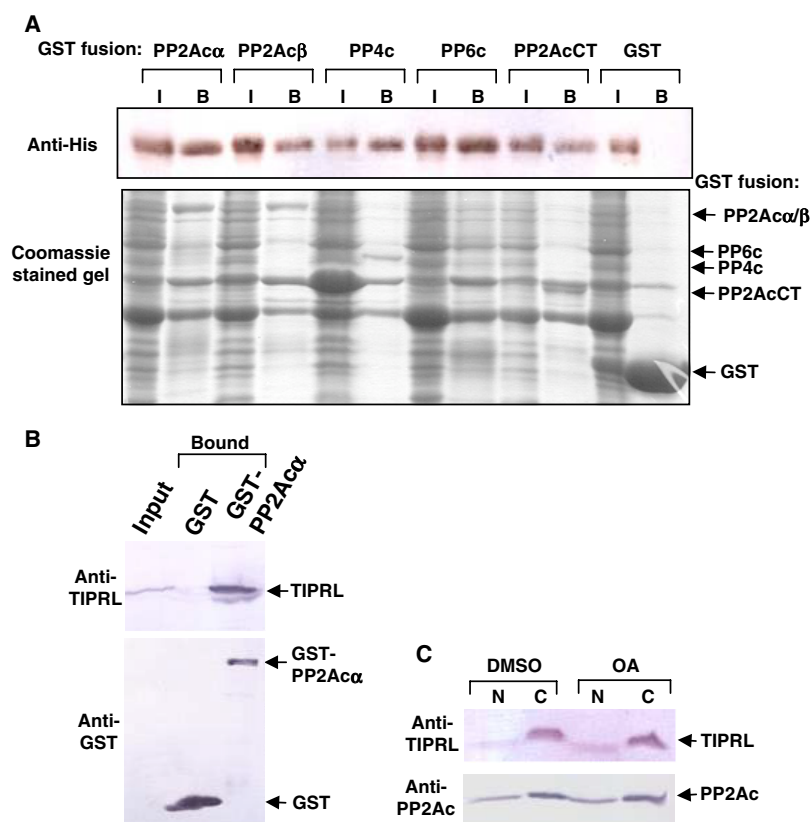


Fig. 2. Analysis of TIPRL interaction with catalytic subunits of type 2A phosphatases. (A) GST pull-down assay using recombinant proteins. GST fusions of the indicated phosphatase catalytic subunits were coexpressed with His-TIPRL in *E. coli*. GST fusion proteins were isolated from extracts by binding to glutathione-Sepharose beads. Bound proteins were resolved by SDS/PAGE and detected by immunoblotting with the indicated primary antibodies or by Coomassie Brilliant Blue staining. The phosphatase cDNAs fused to GST were: PP2A α and PP2A β : full length, PP4c: residues 175–307, PP6c: residues 106–305 and PP2AcCT: residues 210–309. His-tagged TIPRL copurified with each one of the GST-phosphatase fusions but not with GST alone. (B) GST or GST-PP2Ac immobilized on glutathione-Sepharose beads were incubated with HEK293 cell extracts and bound proteins were eluted by boiling in SDS/PAGE sample buffer. GST and TIPRL were detected by immunoblot analysis. TIPRL was detected in association with GST-PP2Ac but not with GST alone. (C) Analysis of TIPRL subcellular distribution. HEK293 cells were treated with 50 nM of the PP2Ac inhibitor okadaic acid (OA) or with vehicle (dimethylsulfoxide) for 3.5 h in serum-free medium and the nuclear (N) and cytoplasmic (C) fractions were separated and probed with specific antibodies. 7.5 μ g of total protein extract were loaded on each lane. Both TIPRL and PP2Ac are found predominantly in the cytoplasm and their subcellular distribution was not affected by okadaic acid.

lines HeLa, HEK293 and K562 (not shown). Cell fractionation experiments showed that the subcellular distribution of TIPRL in HEK293 cells was predominantly cytoplasmic, coinciding with that of PP2Ac (Fig. 2C), which further supports their functional relation. Inhibition of type 2A phosphatase activity by okadaic acid treatment did not alter the subcellular distribution of either TIPRL or PP2Ac (Fig. 2C).

Identification of TIPRL residues important for interaction with PP2A α

Analysis of the TIPRL amino acid sequence did not reveal structural domains that could support a strategy

for construction of deletion mutants to map the regions responsible for PP2A α binding. Therefore, a reverse two-hybrid approach was employed to find interaction-deficient mutants of TIPRL that may provide information on the sites of interaction or contact regions between TIPRL and PP2A α . A PCR-based random mutagenesis strategy [23] was used to generate a library of mutant TIPRL cDNAs which was transformed into strain L40 carrying pACT2-PP2A α , along with the linearized pTL1 vector in which the region of the TIPRL cDNA comprising nucleotides 127–319 was removed. Recombination between a PCR product and the remaining residues of the TIPRL cDNA would reconstitute TIPRL coding sequence. As

a first step, the screen involved identification of interaction-deficient mutants as determined by loss of the His3⁺ phenotype and loss of activation of the *lacZ* reporter gene. Subsequently, clones showing loss of interaction were submitted to a round of immunoblot analysis to exclude those that did not express the full-length *lexA*-TIPRL fusion protein. Using these criteria, 6 clones of 65 transformants tested were selected for DNA sequencing analysis in order to identify the mutations in the TIPRL cDNA. Each clone showed single amino acid substitutions including D71L, Y79H, I136T, M196V, D198N and Y214C. These clones were retransformed into the L40 strain carrying plasmids expressing activation domain fusions to full-length PP2Ac α , PP2Ac β and PP4c and tested for the activation of the reporter gene *HIS3* by growth on selective medium lacking histidine and supplemented with 10 mM 3-amino-triazol (3-AT). This assay confirmed loss of interaction for the mutants D71L, I136T, M196V and D198N, whereas mutants Y79H and Y214C still showed some activation of the reporter gene (Fig. 3A). Similar results were obtained for the three different catalytic subunits tested, which was expected, because they should share an equivalent interaction mechanism. Mutant Y79H behaved differently in this respect, because it appears to have a reduced affinity for PP2Ac α , but not for PP2Ac β or PP4c. Two independently isolated clones contained mutations at very close positions (M196V/D198N), strongly supporting the hypothesis that these residues are located on TIPRL regions responsible for interaction with PP2Ac α . In addition, a multisequence alignment showed that residues D71, I136 and D198 corresponded to conserved positions on the TIPRL sequence (Fig. 3B).

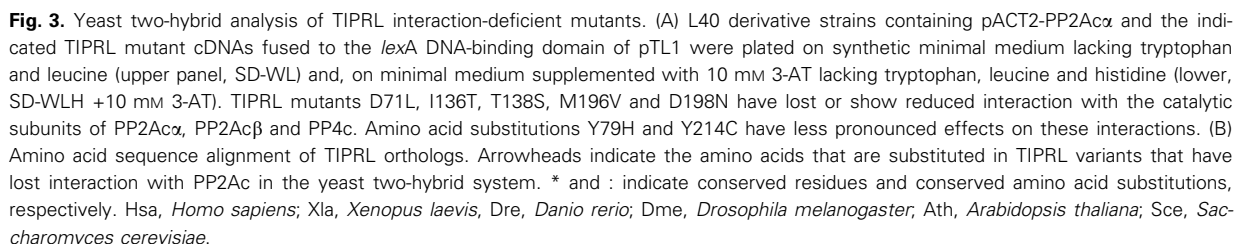
Ternary complex formation by TIPRL, PP2Ac and α 4

Because the yeast ortholog of TIPRL has been described as a Tap42 interacting protein [20], it was surprising that no cDNA encoding α 4 was isolated in the yeast two-hybrid screen using TIPRL as bait. Furthermore, a direct assay using *lexA*-TIPRL and *GAL4* activation domain- α 4 in the yeast two-hybrid system did not indicate an interaction between these two proteins (data not shown). However, the identification of type 2A phosphatase catalytic subunits as binding partners for TIPRL suggested that TIPRL and α 4 might be physically and functionally connected through the type 2A phosphatase catalytic subunits. GST pull-down assays were performed using *E. coli* extracts containing His- α 4, which were incubated with

GST-PP2Ac α , GST-TIPRL or GST alone immobilized on glutathione-Sepharose beads and extracts of a coexpression assay containing His- α 4 and His-PP2Ac α , which were incubated with GST-TIPRL immobilized on glutathione-Sepharose beads. Under these conditions, the association between His- α 4 and GST-TIPRL takes place only in the presence of His-PP2Ac α , clearly showing the existence of a ternary complex involving these proteins (Fig. 4A). A second experiment was performed in which α 4 was fused to GST and immobilized on glutathione-Sepharose beads. As expected, His-TIPRL associated only with GST- α 4 in the presence of His-PP2Ac α (data not shown). Similar results were obtained using the PP2Ac-binding domain of α 4, α 4 Δ 222 [24], instead of the full-length protein (Fig. 4B), which further confirms that the TIPRL- α 4 association is mediated by PP2A and suggests that no direct interaction between TIPRL and α 4 is needed to stabilize this complex.

GST pull-down assays indicated that TIPRL and α 4 bind simultaneously to PP2Ac. This was confirmed using sequential binding experiments. Initially, GST-PP2Ac α was coexpressed with either His-TIPRL or His- α 4 and the GST-PP2Ac α :His-TIPRL and GST-PP2Ac α :His- α 4 complexes were affinity-purified on glutathione-Sepharose columns. Subsequently, the GST-PP2Ac α :His-TIPRL complex was incubated with His- α 4 and the GST-PP2Ac α :His- α 4 complex was incubated with His-TIPRL. Binding of His-TIPRL to the previously formed GST-PP2Ac α :His- α 4 complex is shown in Fig. 4C. In the reciprocal experiment, binding of His- α 4 to the previously formed GST-PP2Ac α :His-TIPRL complex was also observed (data not shown). Because of the lower levels of expression of GST-PP2Ac α relative to His- α 4 or His-TIPRL, the recovered dimeric complexes were stoichiometric, and binding of the third protein without displacing the one that was previously associated with the complex was interpreted as an evidence of simultaneous binding to PP2Ac α .

The results of these *in vitro* binding experiments suggested that although TIPRL and α 4 do not interact directly, they may be associated *in vivo* in a ternary complex with PP2Ac. In agreement with this hypothesis, α 4 was specifically detected in TIPRL immunoprecipitates from HEK293 cell extracts (Fig. 4D). To obtain further evidence on the TIPRL:PP2Ac: α 4 association *in vivo*, HEK393 cell extracts were submitted to gel-filtration chromatography and TIPRL, PP2Ac and α 4 were detected by western blotting (Fig. 4E). PP2Ac elutes in two major peaks, one of which, with molecular size in the range above 158 kDa, overlaps with only α 4, whereas the second overlaps with both α 4 and



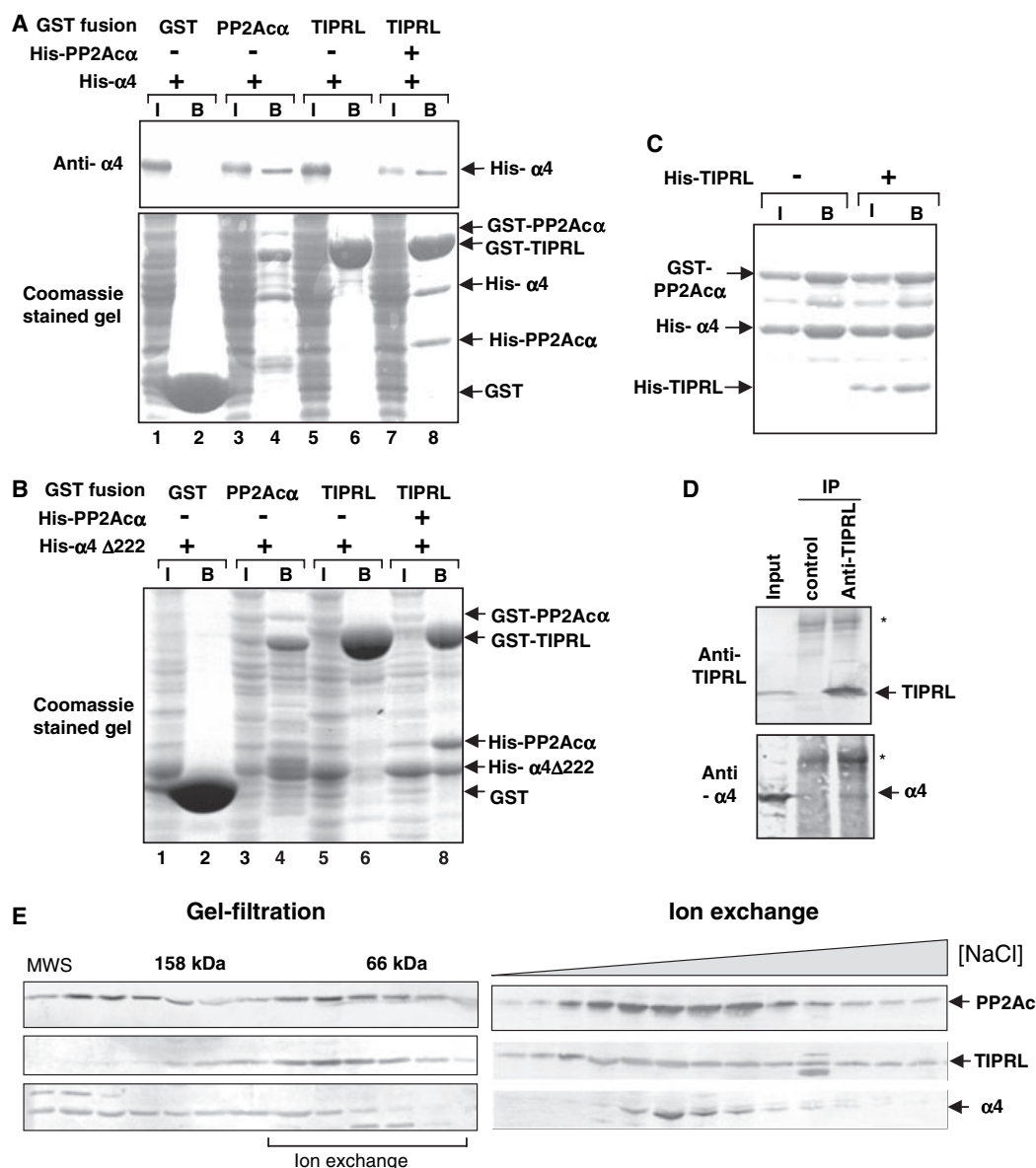


Fig. 4. Ternary complex formed by TIPRL, PP2Ac and $\alpha 4$. (A) GST, GST-TIPRL, GST-PP2Ac α and His- $\alpha 4$ were expressed separately in *E. coli* and His-PP2Ac α was coexpressed with His- $\alpha 4$ in *E. coli*. Bound proteins were resolved by SDS/PAGE and detected by immunoblotting with an antibody for $\alpha 4$ or by Coomassie Brilliant Blue staining. His- $\alpha 4$ associated with GST-TIPRL only in the presence of His-PP2Ac α . GST and GST-PP2Ac α were used as negative and positive controls, respectively; I: input; B: bound. (B) The experiment shown in (A) was repeated using a C-terminal deletion of $\alpha 4$ ($\alpha 4\Delta 222$) instead of full-length protein to show that only the PP2Ac-interacting domain of $\alpha 4$ is sufficient to assemble the ternary complex. (C) TIPRL does not compete with $\alpha 4$ for PP2Ac binding. GST-PP2Ac was coexpressed with His- $\alpha 4$ in *E. coli* and the complex was affinity-purified on glutathione-Sepharose beads. Samples of the complex incubated with recombinant His-TIPRL (right) or of the control without His-TIPRL (left) were analyzed by SDS/PAGE (10%) and visualized by Coomassie Brilliant Blue staining. TIPRL interacted with the PP2Ac: $\alpha 4$ complex previously formed. (D) *In vivo* association of TIPRL and $\alpha 4$. Endogenous TIPRL was immunoprecipitated from HEK293 cell extracts and immunoprecipitates were probed with antibodies for TIPRL and $\alpha 4$. The * indicates staining of IgG heavy chain and is shown as a loading control. (E) The left panel shows western blot analyses of the elution profiles of PP2Ac, TIPRL and $\alpha 4$ fractionated by gel filtration chromatography. MWS indicates the elution positions of molecular mass markers are shown above the panels. The profiles of the three proteins overlap over a region that coincides with the expected molecular mass of the ternary complex (~110 kDa). The TIPRL peak fractions indicated in the bottom of the left panel were fractionated by ion exchange chromatography. The elution profiles of PP2Ac, TIPRL and $\alpha 4$ from the ion-exchange chromatography are shown in the right panel. Only relevant fractions are shown.

TIPRL (Fig. 4E, left panel). The elution profiles of the three proteins overlap in several fractions corresponding to the expected molecular mass of a ternary complex (~ 110 kDa), which is in agreement with the existence of such a complex in mammalian cells. The TIPRL peak fractions from the gel-filtration chromatography were further fractionated on an ion-exchange column. The elution peaks of the three proteins correspond to the same fractions, further indicating that they are associated.

Regulation of PP2Ac activity by TIPRL

$\alpha 4$ has been characterized as a regulator of type 2A phosphatases [7–9]. The finding that TIPRL interacts with catalytic subunits of type 2A phosphatases suggests that it might also directly regulate PP2Ac activity. In order to test this hypothesis, *in vitro* assays were performed in which the activity of PP2A core enzyme (A and C subunits) was measured in the presence of His- $\alpha 4$ or His-TIPRL using the phosphopeptide RRA(pT)VA as a substrate. Because His- $\alpha 4$ and His-TIPRL are able to bind PP2Ac simultaneously, the effect of both proteins was also assayed. Under these conditions, His- $\alpha 4$ and His-TIPRL acted as PP2A inhibitors, but no additive effect on PP2A inhibition was observed in the presence of both His- $\alpha 4$ and His-TIPRL compared with the inhibitory effect of each single protein (Fig. 5A).

To verify whether phosphatase inhibition was due to occlusion of the active site, *in vitro* binding assays were performed in the presence of the PP2Ac inhibitor okadaic acid. These assays showed that binding of His-TIPRL or His- $\alpha 4$ to GST-PP2Ac was not

affected by previous incubation of GST-PP2Ac with okadaic acid (Fig. 5B,C), and also that okadaic acid was not able to induce dissociation of the copurified complexes His-TIPRL:GST-PP2Ac and His- $\alpha 4$:GST-PP2Ac (data not shown). Previously reported okadaic acid-induced dissociation of the $\alpha 4$:PP2Ac complex [25] was interpreted as evidence that the binding site for $\alpha 4$ might overlap the active site of the catalytic subunit. However, the results obtained in this study indicate that $\alpha 4$ and TIPRL are allosteric regulators of PP2Ac rather than inhibitors, which is in agreement with published observations showing that $\alpha 4$ binds PP2Ac on the surface opposite to the active site [26], and that it has opposing allosteric effects on PP2Ac and PP6c [27].

Rapamycin pathway-independent association of TIPRL, PP2Ac and $\alpha 4$ in human K562 cells

Although in yeast Tap42 and type 2A phosphatases are key players in the TOR pathway [19], the role of $\alpha 4$ and PP2Ac in the mammalian rapamycin-sensitive pathway remains controversial [7,8,9,14,25,28]. To test TIPRL involvement in the mTOR pathway, $\alpha 4$ or PP2Ac were immunoprecipitated from K562 cell extracts following rapamycin treatment. TIPRL coimmunoprecipitated specifically with $\alpha 4$, which further confirms the existence of a TIPRL:PP2Ac: $\alpha 4$ complex *in vivo* (Fig. 6). However, none of the pairwise interactions tested (PP2Ac:TIPRL, PP2Ac: $\alpha 4$, TIPRL: $\alpha 4$) was affected by rapamycin treatment. These observations support the existence of a TIPRL:PP2A: $\alpha 4$ heterotrimer in human cells, whose assembly is independent of the mTOR signaling pathway (Fig. 6).

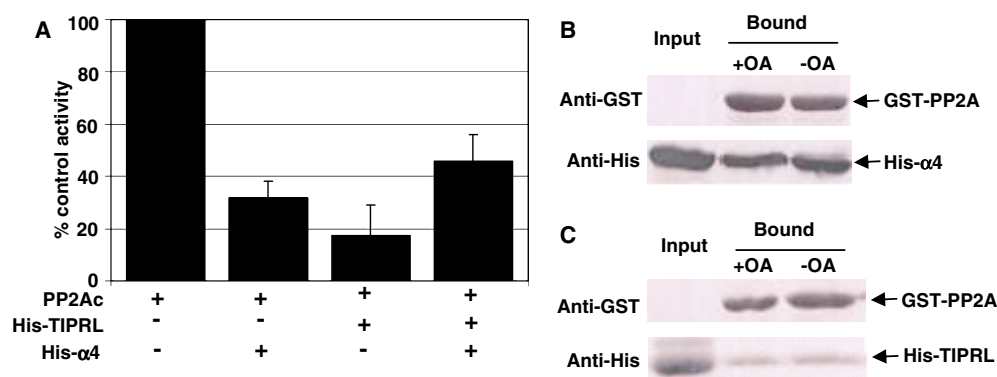


Fig. 5. Regulation of PP2Ac by TIPRL and $\alpha 4$. (A) *In vitro* assay of PP2A core enzyme activity in the presence of purified His-TIPRL and/or His- $\alpha 4$ using the Promega phosphatase assay system. Activities are expressed as a fraction of the positive control (without TIPRL and $\alpha 4$). (B, C) PP2Ac interaction with TIPRL or $\alpha 4$, respectively, is not affected by okadaic acid treatment. GST-PP2Ac α bound to glutathione-Sepharose beads was incubated with okadaic acid ($1 \mu\text{M}$) and His-TIPRL or His- $\alpha 4$. Bound proteins were resolved by SDS/PAGE (10%) and probed with antibodies for the histidine and GST tags.

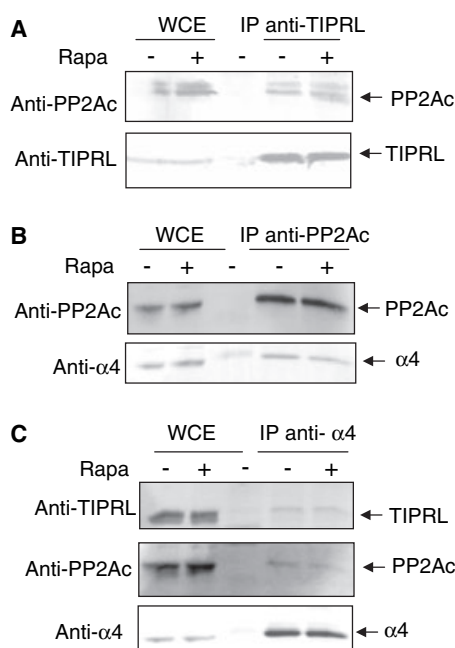


Fig. 6. Association of TIPRL, PP2Ac and $\alpha 4$ is not affected by rapamycin treatment. K562 cells were treated with 200 nM rapamycin or dimethylsulfoxide for 3.5 h in serum-free medium (A) or in the presence of 10% fetal calf serum (B, C). TIPRL (A) PP2Ac (B) and $\alpha 4$ (C) were immunoprecipitated from whole cell extracts (WCE), resolved on SDS/PAGE (10%) and probed with antibodies for $\alpha 4$, PP2Ac and TIPRL. The interactions PP2Ac:TIPRL (A) and PP2Ac: $\alpha 4$ (B), as well as the PP2Ac-mediated TIPRL: $\alpha 4$ association (C) were specifically detected and were not affected by rapamycin treatment.

Discussion

The interaction analyses presented in this study show that TIPRL interacts specifically with the C-terminal region of the catalytic subunits of type 2A phosphatases. Residues 210–309 of PP2Ac are sufficient for interaction with TIPRL. The TIPRL region that interacts with PP2Ac was investigated by using a reverse yeast two-hybrid approach, which identified amino acid substitutions in four independently isolated mutants (D71L, I136T, M196V and D198N) that block their interaction with type 2A phosphatases. TIPRL shows a subcellular distribution that coincides with PP2Ac in human HEK293 cells and inhibits its activity *in vitro*. Okadaic acid does not affect TIPRL interaction with PP2Ac, suggesting that its binding surface on PP2Ac does not involve the active site. These findings characterize TIPRL as a novel allosteric regulator of type 2A phosphatases, a role that has been attributed to date only to the $\alpha 4$ protein. The fission yeast ortholog of Tip41 was characterized as a regulator of type 2A phosphatases [21], which is in agreement with our results.

Because both TIPRL and $\alpha 4$ interact with the catalytic subunits of type 2A phosphatases, we examined the possibility of their simultaneous association, and showed that TIPRL forms a ternary complex with $\alpha 4$ and PP2Ac in mammalian cells and that this complex can be reconstituted *in vitro* from purified, recombinant proteins. The 3D arrangement of the binding sites for TIPRL and $\alpha 4$ on the surface of PP2Ac shows that they are in close proximity, but not overlapping, which allows the assembly of the TIPRL:PP2Ac: $\alpha 4$ complex (Fig. 7A). Genetic mapping of the interaction sites shows that $\alpha 4$ and TIPRL bind PP2Ac approximately on the same regions as PR65/A and B-type subunits, respectively. $\alpha 4$ and PR65/A bind to overlapping sites on the surface of PP2Ac in a mutually exclusive fashion, requiring complementary charged residues [26]. The $\alpha 4$ -binding surface on PP2Ac was mapped to two separated regions, comprising residues 19–22 and 150–164 [17], which are represented in blue in Fig. 7. The interaction of PP2Ac with the regulatory B subunit requires the extreme C-terminal region of the catalytic subunit [29] and the interaction site for TIPRL was mapped to the C-terminal third of PP2A, showing that the TIPRL-binding region on PP2A is in close proximity to, possibly overlapping, the B-subunit-binding region. These similarities suggest that the overall shape and subunit arrangement of the TIPRL:PP2Ac: $\alpha 4$ complex might resemble that of the canonical A:B:C complex, although their assembly and regulation appear to be different. In the A:B:C complex, the A subunit binds to C and enhances its binding to B, whereas $\alpha 4$ and TIPRL appear to bind PP2Ac independently. There is also no evidence of physical contact between TIPRL and $\alpha 4$ in the ternary complex, which contrasts with the existence of an A:B interface [30,31].

Important differences between the yeast and mammalian models have been found. First, yeast Tip41 was reported to compete with Sit4 for Tap42 binding [20], whereas TIPRL and $\alpha 4$ can bind simultaneously to PP2Ac. In addition, the rapamycin-insensitive assembly of the TIPRL:PP2Ac: $\alpha 4$ complex also contrasts with yeast studies [19] and with some studies involving mammalian cells [7,8,14], although several studies have already reported that rapamycin treatment has no effect on the assembly of the PP2Ac: $\alpha 4$ complex [9,25,28]. While this manuscript was in preparation, similar observations were published by McConell *et al.* [32] regarding the rapamycin-insensitive binding of TIPRL to type 2A phosphatases. The effect of rapamycin on the stability of these complexes might depend on the cell line, because some cell lines are more sensitive to rapamycin than others. The mTOR

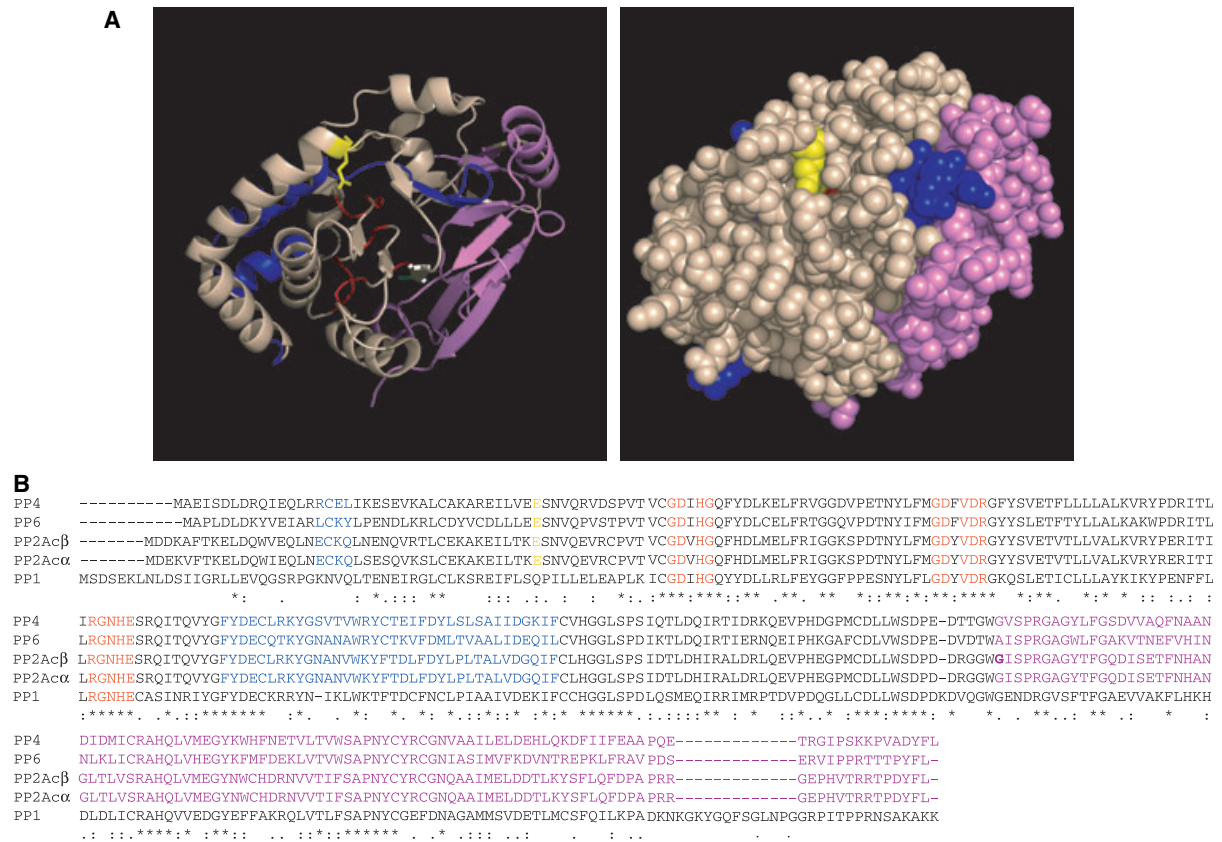


Fig. 7. PP2A catalytic subunit regions responsible for $\alpha 4$ and TIPRL binding. (A) The structure of PP2Ac α downloaded from PDB (code 2IE3) is shown in ribbon (left) and space filling models (right). The regions responsible for binding to $\alpha 4$ and to TIPRL1 are shown in blue and violet, respectively. Residue Glu42 (yellow) is critical for interaction with $\alpha 4$ [26]. (B) Multiple sequence alignment of PP2A catalytic subunit orthologs. * and : indicate conserved residues and conserved amino acid substitutions, respectively. Active site residues are colored red.

pathway is constitutively active in the K562 cell line due to the expression of the BCR/Abl kinase, and this cell line responds to rapamycin treatment by dephosphorylating the ribosomal protein S6 [33]. However, no effect of rapamycin on the stability of the TIPRL:PP2Ac: $\alpha 4$ complex was observed in this cell line, although it cannot currently be ruled out that rapamycin responsiveness is not at the level of complex stability, but rather at the level of activity or substrate specificity. The apparent discrepancies between studies in yeast and mammalian cells indicate that the TOR signaling pathway is not as conserved as previously thought. Most probably, the TIPRL:PP2Ac: $\alpha 4$ complex participates in other signaling pathways, including the ataxia telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia and Rad-3-related (ATM/ATR) pathway [32], but its targets remain to be identified.

In conclusion, our results show that TIPRL directly binds the catalytic subunits of type 2A phosphatases, but not $\alpha 4$, and that it regulates the activity of PP2A. These findings contrast with the model proposed for

the yeast counterparts [20], but agree with recently published studies involving the human proteins [5,32]. In addition to previous studies, we have mapped the TIPRL-binding region on PP2Ac and identified some of the residues on TIPRL which are responsible for phosphatase binding. Finally, we report for the first time the ternary association of PP2Ac, $\alpha 4$ and TIPRL.

Experimental procedures

Plasmid construction

A list of the plasmid vectors used in this work is found in Table 1. The TIPRL cDNA (NM_152902) was amplified from a fetal brain cDNA library (Clontech Laboratories, Inc., San Diego, CA) and cloned into pTL1 (*Eco*RI–*Bam*HI sites), pET–TEV (*Nde*I–*Bam*HI sites) and pET–GST–TEV (*Nco*I–*Bam*HI sites). pTL1, pET–TEV and pET–GST–TEV are derivatives of pBTM116 and pET28a (Novagen, Darmstadt, Germany) that have been previously described [34]. pTL1–TIPRL encodes TIPRL containing an N-terminal

Table 1. Plasmid vectors used in this study.

Plasmid	Relevant features	Ref.
pTL1-TIPRL	exADB::TIPRL TRP1 2 μ m	This study
pACT2-PP2A α	GAL4AD::PP2A α LEU2 2 μ m	This study
pACT2-PP2A β	GAL4AD::PP2A β LEU2 2 μ m	This study
pACT2-PP2A β (14–309)	GAL4AD::PP2A β (14–309) LEU2 2 μ m	This study
pACT2-PP4c (175–307)	GAL4AD::PP4c(175–307) LEU2 2 μ m	This study
pACT2-PP4c (196–307)	GAL4AD::PP4c(196–307) LEU2 2 μ m	This study
pACT2-PP6c (106–305)	GAL4AD::PP6c(106–305) LEU2 2 μ m	This study
pACT2-PP6c (171–305)	GAL4AD::PP6c(171–305) LEU2 2 μ m	This study
pACT2-PP2AcCT (210–309)	GAL4AD::PP6c(210–309) LEU2 2 μ m	This study
pACT2-PP4c	GAL4AD::PP4c LEU2 2 μ m	This study
pBTM116-NIP7	lexADB::NIP7 TRP1 2 μ m	[22]
pGAD-NOP8	GAL4AD::NOP8 LEU2 2 μ m	[22]
pET28a- α 4	His6:: α 4, kan ^R	[24]
pET28a- α 4 Δ 222	His6:: α 4 Δ 222, kan ^R	[24]
pET-TIPRL	His6::TIPRL, kan ^R	This study
pProEx-PP2A α	His6::PP2A α , amp ^R	This study
pGEX-5X2	GST, amp ^R	GE Healthcare
pGEX-5X2-PP2A α	GST::PP2A α , amp ^R	This study
pGEX-5X2-PP2A β	GST:: PP2A β , amp ^R	This study
pGEX-5X2-PP4c (175–307)	GST::PP4c(175–307), amp ^R	This study
pGEX-5X2-PP6c (106–305)	GST::PP6c(106–305), amp ^R	This study
pGEX-5X2-PP2AcCT (210–309)	GST::PP2AcCT(210–309), amp ^R	This study
pET-GST-TIPRL	GST::TIPRL, kan ^R	This study

lexA fusion and harbors the bacterial kanamycin marker. pET-TIPRL and pET-GST-TIPRL encode N-terminal hexahistidine and GST fusions, respectively, separated by a TEV protease cleavage site. Construction of plasmids pET28a- α 4 and pET28a- α 4 Δ 222 was described previously [24]. To construct a plasmid encoding a GST- α 4 fusion protein, the cDNAs of GST, digested with *Xba*I–*Sal*I, and α 4, digested with *Sal*I–*Bam*HI, were subcloned into the plasmid pET29a (Novagen) previously digested with *Xba*I–*Bam*HI. The phosphatase cDNAs isolated from positive two hybrid interactions were subcloned into the *Eco*RI and *Xho*I sites of pGEX-5x2 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). The PP2A α cDNA was also subcloned into pProEx HtB (Invitrogen, Carlsbad, CA) using the same restriction sites. Full-length PP4c cDNA was amplified from a human leukocyte cDNA library and cloned into pACT2 between the *Eco*RI and *Xho*I sites.

Yeast two-hybrid assays

Yeast two-hybrid screens were performed using yeast strain L40 harboring plasmid pTL1-TIPRL. Expression of the lexA-TIPRL fusion was verified by western blot with an antibody for lexA (Invitrogen) and self-activation of the reporter genes was tested with L40 strain transformed with plasmids pTL1-TIPRL and pGAD424. Large- and library-scale sequential transformations of L40/pTL1-TIPRL with a human leukocyte cDNA library cloned into pACT2 (BD Bioscience Clontech) were performed using

the PEG/lithium acetate protocol as previously described. Positive clones (His3⁺) were initially selected on SD-WLH (synthetic complete medium lacking tryptophan; leucine and histidine) supplemented with 5 mM 3-AT. Subsequently, His3⁺ clones were subjected to a second round of selection based on the activation of the reporter gene *lacZ*, using X-Gal filter assays. The large-scale sequential transformation yielded 54 positive clones from 4.5 $\times$ 10⁴ clones tested and the library scale transformation yielded 1100 positive clones from 6.0 $\times$ 10⁶ clones tested. Plasmid pACT2 was rescued from 88 positive clones and the TIPRL-interacting proteins identified by DNA sequencing followed by BLAST analyses (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Random mutagenesis and reverse two-hybrid assays

A PCR-based random mutagenesis strategy [23] was used to generate a library of mutant TIPRL cDNAs, using high MgCl₂ concentrations (3 mM) to reduce DNA polymerase fidelity. This library was transformed into L40/pACT2-PP2A α strain along with pTL1-TIPRL linearized with *Nde*I and the cotransformants were selected by plating on SD-WL (synthetic complete medium lacking tryptophan and leucine). Interaction-deficient mutants were selected by replica plating on SD-WL and SD-WLH + 10 mM 3-AT to identify clones showing a His[–] phenotype. His[–] colonies were subsequently tested for activation of the *lacZ* reporter

gene using an X-Gal filter assay. The colonies in which the yeast two-hybrid markers were no longer activated were tested for expression of the full-length TIPRL by western blotting using an antibody for lexA (Invitrogen). Colonies negative for two-hybrid interaction and expressing the full-length lexA-TIPRL fusion protein were selected for further analysis. The plasmid pTL1-TIPRL was rescued from these strains and analyzed by DNA sequencing to identify the amino acid substitutions that abrogate TIPRL-PP2Ac interaction. Loss of interaction was confirmed by retransforming pTL1 containing the mutant variants of TIPRL into L40 strains carrying pACT2-PP2Ac α , pACT2-PP2Ac β , and pACT2-PP24c.

GST pull-down assays

Bacterial cells [*E. coli* BL21(DE3)] were grown on Luria-Bertani medium containing the appropriate antibiotics at 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and recombinant protein expression was induced with 0.5 mM isopropyl thio- β -D-galactoside for four hours at 25 °C. Bacterial pellets were suspended in ice cold lysis buffer [NaCl/P_i (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄), containing 0.5% Igepal CA-630, 1 mM dithiothreitol and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride], treated with lysozyme, sonicated and centrifuged (20 000 *g*, 10 min, 4 °C). The supernates were incubated with glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare) for 30–60 min at 4 °C. Subsequently, the beads were washed three times with ice-cold lysis buffer and bound proteins were eluted with SDS/PAGE sample buffer. For semi *in vivo* binding experiments, glutathione-Sepharose beads containing GST-PP2Ac or GST were prepared as above and, before elution in SDS/PAGE sample buffer, the beads were incubated with HEK293 cell extracts for 30–60 min at 4 °C and washed three times with High Salt Buffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 0.5% Igepal CA-630, 5 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors (Complete, EDTA-Free, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN).

Phosphatase assays

Activity of PP2A core enzyme (A and C subunits, Promega, Madison, WI) was assayed using the Serine/Threonine Phosphatase Assay Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The colorimetric measurements were taken in an ELx 800 microplate reader (Bio Tek Instruments, Winooski, VT) at 630 nm. 0.5 units of PP2A were assayed in triplicate in the presence of 25 ng of His-tagged $\alpha 4$ and/or TIPRL, for 15 min at 30 °C. His-tagged TIPRL was purified by affinity chromatography on a Ni-NTA column (Qiagen, Valencia, CA), and his-tagged $\alpha 4$ was purified as described previously [22]. TIPRL and $\alpha 4$ were quantified by direct absorbance at 280 nm.

Cell culture, fractionation and immunoprecipitation assays

HEK293 and K562 cells were cultured in minimal essential alpha medium supplemented with 10% fetal bovine serum, with 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ penicillin and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Total cell extracts were prepared by suspending cells in high salt buffer supplemented with protease inhibitors (Complete, EDTA-Free, Roche) and NaF 50 mM. After 30 min on ice, lysates were cleared by centrifugation (20 000 *g*, 10 min, 4 °C). Cytoplasmic fractions were obtained by suspending cell pellets in low salt buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 320 mM sacarose, 2 mM MgCl₂, 3 mM CaCl₂, 0.4% Igepal CA-630, 0.5 mM dithiothreitol) supplemented with protease inhibitors (Complete, EDTA-Free, Roche) and centrifuging at low speed (800 *g*, 5 min, 4 °C) after 10 min on ice. Nuclear fractions were prepared from this low-speed centrifugation pellet as described above for total cell extracts. Protein extracts were quantified using the BCA assay kit (Pierce, Rockford, IL) and BSA as standard. Rabbit polyclonal antibodies for TIPRL (A300–663A), PP2Ac (A300–732A) and $\alpha 4$ (A300–471A) were used in immunoprecipitation assays, and antibody for murine MafB (A300–612A), which does not recognize any protein in human cells, was used as a negative control (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Protein extract (500 μg) was incubated with 1 μg of antibody and Protein A-Sepharose beads (Pharmacia, Uppsala, Sweden) for 3 h at 4 °C. The Protein A-Sepharose beads were washed three times with ice-cold high salt buffer and the bound proteins were eluted with SDS/PAGE sample buffer. Western blots were performed as described previously [35].

Gel-filtration and ion-exchange chromatography of HEK293 cell extracts

HEK293 cells were suspended in High Salt Buffer supplemented with protease inhibitors (Complete, EDTA-Free, Roche), incubated on ice for 30 min and sonicated. Cell lysates were centrifuged at 20 000 *g* for 10 min at 4 °C and the supernates were centrifuged at 100 000 *g* for 60 min at 4 °C. The supernate of the high-speed centrifugation (S100 extract) was loaded on a Superdex 200 16/60 column (GE Healthcare) and isocratic elution was performed in high salt buffer at 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The column was calibrated using ferritin (440 kDa), aldolase (158 kDa), albumin (66 kDa) and ribonuclease (13.7 kDa) and the void elution volume was determined using blue dextran. Fractions from the gel filtration chromatography corresponding to the TIPRL elution peak were dialyzed against ion exchange buffer A (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Igepal CA-630) for 16 h at 4 °C and fractionated on a Mono Q column pre-equilibrated in the same buffer. The column was washed with 10 mL of buffer A and proteins were

eluted with a linear gradient of 0–100% buffer B (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Igepal CA-630) in 15 mL at 1 mL·min⁻¹. Chromatography was performed on an ÄKTA FPLC (GE Healthcare).

Structural modeling and amino acid sequence alignment

The coordinates of the PP2A α structure were downloaded from PDB (code 2IE3) and the figures generated using PYMOL (<http://www.pymol.org>). Multiple sequence alignment was performed with the CLUSTALW algorithm (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>).

Acknowledgements

We thank Tereza C. Lima Silva, Adriana C. Alves and Zildene G. Corrêa for technical support, and Carlos R. C. Paier and Daniela S. Razolli for helping with yeast reverse two-hybrid screening. JHCS was recipient of CNPq fellowship. This work was supported by FAPESP grant 06/02083-7 (NITZ) and the FAPESP SMolBNet (00/10266-8) and CEPID/CBME (98/14138-2) programs.

References

- Goldberg Y (1999) Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem Pharmacol* **57**, 321–328.
- Zolnierowicz S (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem Pharmacol* **60**, 1225–1235.
- Zabrocki P, Van Hoof C, Goris J, Thevelein JM, Windrickx J & Weraal S (2002) Protein phosphatase 2A on track for nutrient-induced signalling in yeast. *Mol Microbiol* **43**, 835–842.
- Cohen PT, Philp A & Vazquez-Martin C (2005) Protein phosphatase 4 – from obscurity to vital functions. *FEBS Lett* **579**, 3278–3286.
- Gingras AC, Caballero M, Zarske M, Sanchez A, Hazbun TR, Fields S, Sonenberg N, Hafen E, Raught B & Aebersold R (2005) A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1725–1740.
- Stefansson B & Brautigan DL (2006) Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets I κ B ϵ . *J Biol Chem* **281**, 22624–22634.
- Murata K, Wu J & Brautigan DL (1997) B cell receptor-associated protein α 4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10624–10629.
- Inui S, Sanjo H, Maeda K, Yamamoto H, Miyamoto E & Sakaguchi N (1998) Ig receptor binding protein 1 (α 4) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Blood* **92**, 539–546.
- Nanahoshi M, Nishiuma T, Tsujishita Y, Hara K, Inui S, Sakaguchi N & Yonezawa K (1998) Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by α 4 protein and its yeast homolog Tap42. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 520–526.
- Nanahoshi M, Tsujishita Y, Tokunaga C, Inui S, Sakaguchi N, Hara K & Yonezawa K (1999) α 4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases. *FEBS Lett* **446**, 108–112.
- Kuwahara K, Matsuo T, Nomura J, Igarashi H, Kimoto M, Inui S & Sakaguchi N (1994) Identification of a 52-kDa molecule (p52) coprecipitated with the Ig receptor-related MB-1 protein that is inducibly phosphorylated by the stimulation with phorbol myristate acetate. *J Immunol* **152**, 2742–2752.
- Inui S, Maeda K, Hua DR, Yamashita T, Yamamoto H, Miyamoto E, Aizawa S & Sakaguchi N (2002) BCR signal through α 4 is involved in S6 kinase activation and required for B cell maturation including isotype switching and V region somatic hypermutation. *Int Immunol* **14**, 177–187.
- Hua DR, Inui S, Yamashita T, Maeda K, Takagi K, Takeda J & Sakaguchi N (2003) T cell-specific gene targeting reveals that α 4 is required for early T cell development. *Eur J Immunol* **33**, 1899–1906.
- Kong M, Fox CJ, Mu J, Solt L, Xu A, Cinalli RM, Birnbaum MJ, Lindsten T & Thompson CB (2004) The PP2A-associated protein α 4 is an essential inhibitor of apoptosis. *Science* **306**, 695–698.
- Liu J, Prickett TD, Elliott E, Meroni G & Brautigan DL (2001) Phosphorylation and microtubule association of the Opitz syndrome protein mid-1 is regulated by protein phosphatase 2A via binding to the regulatory subunit α 4. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 6650–6655.
- Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, Winter J, Krauss S, Ropers HH, Schneider R & Schweiger S (2001) MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet* **29**, 287–294.
- Yamashita T, Inui S, Maeda K, Hua DR, Takagi K & Sakaguchi N (2005) The heterodimer of α 4 and PP2Ac is associated with S6 kinase1 in B cells. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 439–445.
- Yamashita T, Inui S, Maeda K, Hua DR, Takagi K, Fukunaga K & Sakaguchi N (2006) Regulation of CaMKII by α 4/PP2Ac contributes to learning and memory. *Brain Res* **1082**, 1–10.
- Di Como CJ & Arndt KT (1996) Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev* **10**, 1904–1916.

- 20 Jacinto E, Guo B, Arndt KT, Schmelzle T & Hall MN (2001) TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell* **8**, 1017–1026.
- 21 Fenyvuesvolgyi C, Elder RT, Benko Z, Liang D & Zhao RY (2005) Fission yeast homologue of Tip41-like proteins regulates type 2A phosphatases and responses to nitrogen sources. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 155–162.
- 22 Zanchin NI & Goldfarb DS (1999) Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol Cell Biol* **19**, 1518–1525.
- 23 Zhou Y, Zhang X & Ebright RC (1991) Random mutagenesis of gene-sized DNA molecules by use of PCR with Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **19**, 6052.
- 24 Smetana JH, Oliveira CL, Jablonka W, Aguiar Pertinhez T, Carneiro FR, Montero-Lomeli M, Torriani I & Zanchin NI (2006) Low resolution structure of the human $\alpha 4$ protein (IgBP1) and studies on the stability of $\alpha 4$ and of its yeast ortholog Tap42. *Biochim Biophys Acta* **1764**, 724–734.
- 25 Kloeker S, Reed R, McConnell JL, Chang D, Tran K, Westphal RS, Law BK, Colbran RJ, Kamoun M, Campbell KS *et al.* (2003) Parallel purification of three catalytic subunits of the protein serine/threonine phosphatase 2A family (PP2A(C), PP4(C), and PP6(C)) and analysis of the interaction of PP2A(C) with $\alpha 4$ protein. *Protein Expr Purif* **31**, 19–33.
- 26 Prickett TD & Brautigan DL (2004) Overlapping binding sites in protein phosphatase 2A for association with regulatory A and $\alpha 4$ (mTap42) subunits. *J Biol Chem* **279**, 38912–38920.
- 27 Prickett TD & Brautigan DL (2006) The $\alpha 4$ regulatory subunit exerts opposing allosteric effects on protein phosphatases PP6 and PP2A. *J Biol Chem* **281**, 30503–30511.
- 28 Chen J, Peterson RT & Schreiber SL (1998) $\alpha 4$ associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 827–832.
- 29 Ogris E, Gibson DM & Pallas DC (1997) Protein phosphatase 2A subunit assembly: the catalytic subunit carboxy terminus is important for binding cellular B subunit but not polyomavirus middle tumor antigen. *Oncogene* **15**, 911–917.
- 30 Xu Y, Xing Y, Chen Y, Chao Y, Lin Z, Fan E, Yu JW, Strack S, Jeffrey PD & Shi Y (2006) Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell* **127**, 1239–1251.
- 31 Cho US & Xu W (2007) Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature* **445** (7123), 53–57.
- 32 McConnell JL, Gomez RJ, McCorvey LR, Law BK & Wadzinski BE (2007) Identification of a PP2A-interacting protein that functions as a negative regulator of phosphatase activity in the ATM/ATR signaling pathway. *Oncogene* **26**, 6021–6030.
- 33 Ly C, Arechiga AF, Melo JV, Walsh CM & Ong ST (2003) Bcr-Abl kinase modulates the translation regulators ribosomal protein S6 and 4E-BP1 in chronic myelogenous leukemia cells via the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res* **63**, 5716–5722.
- 34 Carneiro FR, Silva TC, Alves AC, Haline-Vaz T, Gozzo FC & Zanchin NI (2006) Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. *Biochem Biophys Res Commun* **343**, 260–268.
- 35 Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York.

3.4

Estudos funcionais das proteínas TIPRL e $\alpha 4$ em culturas de células humanas

**Juliana H. C. Smetana, Sandra M. N. Scapin, Margareth Sugano Navarro e
Nilson I. T. Zanchin**

Resumo

TIPRL, ortóloga humana da proteína Tip41 de levedura, é uma proteína ainda pouco caracterizada tanto funcional quanto estruturalmente. Tip41 foi identificada como um parceiro de interação de Tap42 e regulador negativo da via da quinase TOR em levedura por meio da fosfatase Sit4 (Jacinto et al., 2001). A proteína $\alpha 4$, ortóloga de Tap42, é um regulador comum de fosfatases 2A (PP2A, PP4 e PP6), e nosso trabalho anterior demonstrou que TIPRL também interage diretamente com essas fosfatases. O objetivo central deste trabalho é a identificação de substratos de fosfatases 2A regulados por TIPRL. Para isso, foi construída uma linhagem celular com expressão aumentada de TIPRL e as fosfoproteínas provenientes dessa linhagem foram comparadas com a linhagem controle transfectada com o vetor vazio em busca de proteínas com fosforilação alterada. Duas bandas com fosforilação alterada foram identificadas por espectrometria de massas como o fator de splicing SF2/ASF e sua proteína regulatória SF2p32. Em uma abordagem complementar de caracterização funcional, foi analisada a distribuição subcelular de TIPRL em linhagens de células humanas, juntamente com $\alpha 4$ e PP2Ac. Foi observada uma distribuição nuclear e citoplasmática dessas proteínas, e a distribuição de TIPRL se assemelha à de PP2Ac. Surpreendentemente, essa abordagem levou à identificação de uma possível modificação pós-traducional de $\alpha 4$ encontrada exclusivamente no núcleo, e a análise de sua sequência sugeriu tratar-se de uma glicosilação O-ligada. Os possíveis substratos identificados sugerem uma função para TIPRL no controle do *splicing* e do início da tradução, o que é coerente com sua distribuição nuclear e citoplasmática.

Introdução

TIPRL, ortóloga humana da proteína Tip41 de levedura, é uma proteína ainda pouco caracterizada tanto funcional quanto estruturalmente. Tip41 foi identificada como um parceiro de interação de Tap42 e regulador negativo da via da quinase TOR em levedura por meio da fosfatase Sit4 (Jacinto et al., 2001). Nosso trabalho anterior (Smetana e Zanchin, 2007) caracterizou TIPRL como um novo regulador comum das fosfatases 2A, função que até então havia sido descrita apenas para $\alpha 4$, ortóloga de Tap42. As fosfatases do tipo 2A constituem a subfamília PPP, que é formada por PP2A, PP4 e PP6, as ortólogas em mamíferos das fosfatases de levedura Pph21/22, Pph3 e Sit4, respectivamente. Essas fosfatases apresentam uma ampla gama de substratos e atuam em vários processos celulares, como a transcrição, tradução, regulação do ciclo celular e apoptose. PP2A é a principal fosfatase solúvel de fosfoserina e fosfotreonina em células animais e é encontrada predominantemente como uma holoenzima formada por uma subunidade catalítica (C), uma subunidade regulatória (B, B', B'' ou B''') e uma de ancoragem (PR65/A) (Eichhorn, et al. 2008; Goldberg 1999; Zabrocki, et al. 2002; Zolnierowicz 2000). As fosfatases PP4 e PP6 são menos estudadas que PP2A, mas evidências recentes sugerem que a organização heterotrimérica também é observada para essas fosfatases.

A compreensão da enorme diversidade de processos regulados por essas fosfatases requer a identificação e caracterização de alvos regulados por subunidades ou proteínas regulatórias específicas. Poucos substratos dessas fosfatases regulados por $\alpha 4$ são conhecidos. A proteína associada a microtúbulos MID1 (Liu et al., 2001) e a quinase MEK3 (Prickett e Brautigan, 2007) são alvos bem caracterizados, que interagem diretamente com o domínio C-terminal de $\alpha 4$ e têm sua desfosforilação promovida. Os fatores de transcrição p53 e c-jun são alvos da regulação por $\alpha 4$, porém não há evidências de uma interação direta (Kong et al., 2004), e no caso de c-jun é provável que essa regulação seja indireta via MEK3 e p38 (Prickett e Brautigan, 2007). Já no caso de TIPRL, nenhum alvo de desfosforilação foi ainda identificado. Um possível alvo seria uma proteína de 32 kDa fosforilada em um sítio de reconhecimento das quinases ATM e ATR (McConnell et al., 2007), mas a identidade dessa proteína ainda não é conhecida.

O objetivo central deste trabalho é a identificação de substratos de fosfatases 2A regulados por TIPRL. Para isso, foi construída uma linhagem celular com expressão aumentada de TIPRL e as fosfoproteínas provenientes dessa linhagem foram comparadas com a linhagem controle transfectada com o vetor vazio em busca de proteínas com fosforilação alterada. Em uma abordagem complementar de caracterização funcional, foi analisada a distribuição subcelular de TIPRL em linhagens de células humanas, juntamente com $\alpha 4$ e PP2Ac. Surpreendentemente, essa abordagem levou à identificação de uma possível modificação pós-traducional de $\alpha 4$ encontrada exclusivamente no núcleo. Os possíveis substratos identificados sugerem uma função para TIPRL no controle do *splicing* e do início da tradução, o que é coerente com sua distribuição nuclear e citoplasmática.

Materiais e Métodos

Construção dos vetores

O vetor pCDNA3-TIPRL, usado na super-expressão, foi obtido inserindo-se o cDNA de TIPRL amplificado com os oligonucleotídeos 5' CTG GAT CCG CCA TGG TGA TCC ACG GCT TCC 3' e 5' ACT CTA GAT TCC ACT TGT GTA CTT TTT TGT G 3' no vetor clivado com *BamHI* e *XbaI*. O oligonucleotídeo *forward* insere uma alteração de aminoácido (M2V) no cDNA TIPRL, necessária para a incorporação de uma sequência Kozak de reconhecimento do início da tradução.

Cultura de células, transfecção e seleção de clones estáveis

Células HEK293 foram cultivadas em meio MEM (*Minimal Essential Alpha Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina a 37°C sob uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As transfecções de células HEK293 para gerar clones estáveis foram realizadas por eletroporação partindo-se de células de uma cultura confluenta em garrafa de 75 mm² para cada transfecção. As células foram coletadas com a adição de tampão PBS contendo EDTA 10 mM. Foram feitas três lavagens com

meio sem soro e em seguida as células foram ressuspensas em 300 µl de MEM sem soro, incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente com o DNA a ser transfectado (pCDNA3 ou pCDNA3-TIPRL) e, então, submetidas a um pulso elétrico a 110 V por 25 milissegundos (programa HEK293 do “*Bio-Rad Gene Pulser Xcell Electroporation System 110*”), em cubeta de 0,2 cm. 72 horas após a transfecção, as células foram submetidas à seleção com higromicina (0,5 mg/ml), que foi mantida por 10 a 15 dias, até que se observasse a formação de colônias de células visíveis a olho nu. Essas colônias foram então transferidas individualmente para placas de 24 poços e amplificadas sob pressão de seleção. A alteração na expressão em cada clone foi monitorada em nível de mRNA, por RTqPCR, e de proteína, por *Western blot*.

Preparação e quantificação de extratos de células

Para a obtenção de extratos totais, as células foram coletadas com tampão PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM K₂HPO₄) suplementado com EDTA (10 mM), lavadas com PBS e ressuspensas em tampão HSB (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 0,5% Igepal CA-630, 5 mM EDTA) suplementado com inibidores de proteases (Complete, EDTA-Free, Roche) e NaF 50 mM. Após 30 minutos de incubação no gelo, os lisados foram submetidos a centrifugação (20000 g, 10 min, 4°C). Para o fracionamento celular, as células foram coletadas como descrito acima, ressuspensas em tampão LSB (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 320 mM sacarose, 2 mM MgCl₂, 0,3 mM CaCl₂, 0,4% Igepal, 0,5 mM DTT) suplementado com inibidores de protease e fosfatase (Roche), incubadas por 10 minutos no gelo e centrifugadas a 800 g por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante (fração citoplasmática) foi separado, e o precipitado (fração nuclear) foi ressuspendido em tampão PBS e sonificado por 20 segundos no gelo. Ambas as frações foram centrifugadas a 20000 g por 20 minutos a 4°C. As frações insolúveis foram ressuspensas em tampão PBS com Triton X-100 (0,5%) e sonificadas. As amostras foram quantificadas com o *BCA assay kit* (Pierce) usando BSA como padrão.

SDS-PAGE e *Western blot*

As eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram realizadas no sistema Mini-Protean (BioRad). Para as análises por *Western blot*, as amostras de proteínas fracionadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas Immobilon-P (Millipore) usando o sistema Multiphor NovaBlot (GE Healthcare). As membranas foram bloqueadas com TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) contendo BSA 1% e em seguida incubadas com anticorpo primário na diluição apropriada em TBS contendo 0,1% BSA [anti-TIPRL (A300–663A, Bethyl Laboratories) 1:5000, anti-PP2Ac (A300–732A, Bethyl Laboratories) 1:5000, anti- α 4 (A300–471A, Bethyl Laboratories) 1:5000, anti-actina (Santa Cruz Biotechnology) 1:500. A detecção foi feita com anticorpos secundários conjugados a fosfatase alcalina (anti-rabbit ou anti-mouse imunoglobulina G 1:5000, Sigma) usando BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate*) e NBT (*nitroblue tetrazolium*) ou com anticorpos conjugados a peroxidase e revelados com o sistema *ECL plus*.

RT-PCR quantitativo em tempo real (RTqPCR)

Para determinar os níveis do mRNA que codifica TIPRL nos clones de superexpressão em HEK293, foi utilizada a técnica de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo-real (RTqPCR). Foram feitas extrações de RNA total dos clones com Trizol (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante, e a síntese de cDNA foi feita a partir de 5 μ g desse RNA, utilizando-se o *First-Strand cDNA Synthesis* (GE Healthcare). As amostras de cDNA foram utilizadas como molde nas reações de PCR quantitativo em tempo-real, segundo especificações do *SYBR Green 7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Foi utilizado o método da quantificação relativa, no qual a quantidade do produto de PCR do alvo é normalizada em relação a um gene constitutivo, no caso a actina β , cuja reação de quantificação é feita em paralelo à do gene alvo. Os *primers* para as reações de quantificação do mRNA de TIPRL (ONZ617: 5'-GAT CAT GGA GTT TCA AGC CTG AGT-3' e ONZ618: 5'-CGC AAC AGC AGG AAA AAG C-3')

foram utilizados na concentração de 40 nM e hibridizam em dois *exons* contíguos e exclusivos da isoforma 1.

Imunolocalização

Células HEK293 foram semeadas em lamínulas e cultivadas como descrito acima. As células foram fixadas em tampão PBS contendo paraformaldeído 2% e tratadas com glicina 200 mM em PBS. O bloqueio foi feito por uma hora com BSA 1% e imunoglobulina 5 µg/mL (*goat* IgG, Santa Cruz Biotechnology,) em PBS. As células foram incubadas com o anticorpo primário (anti-TIPRL A300–663A 1: 400 ou anti- $\alpha 4$ A300–471A 1:200, Bethyl Laboratories), diluído em PBS contendo BSA 0,1%, por duas horas, e após cinco lavagens foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a fluoresceína (*goat* anti-rabbit, Zymed, 1:25) diluído em PBS com BSA 1% e DAPI e as células foram incubadas por mais duas horas. Após dez lavagens, as células foram montadas em lamínulas com glicerol 90% em PBS e observadas em um microscópio de fluorescência Nikon.

Purificação de fosfoproteínas

Proteínas totais fosforiladas de células HEK293 foram isoladas usando um sistema comercial (Qiagen Phospho Protein Purification Kit) de acordo com as instruções do fabricante. As células transfectadas permanentemente com pCDNA3 vazio ou pCDNA3-TIPRL (2 garrafas de 75 cm²) foram ressuspensas no meio de cultura e lavadas em tampão Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM. A lise foi feita em 5 mL de tampão de lise (Qiagen) contendo detergente CHAPS, benzonase e inibidores de protease e fosfatase, e os extratos foram incubados por 30 minutos no gelo com agitação frequente, e centrifugados a 10000 g por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram quantificados com o *BCA assay kit* (Pierce) usando BSA como padrão. 2,5 mg de proteína total de cada amostra foram aplicados na coluna de afinidade a fosfoproteínas em um volume final de 25 mL. Após a passagem dos extratos por gravidade, as colunas foram lavadas com 6 mL de tampão de lise e a eluição foi feita em 5 frações de 500 µL em tampão de eluição. As

frações eluídas (3 a 5) foram reunidas e concentradas em colunas NanoSep (MWCO 10000) e o *flowthrough* foi concentrado em concentrador Millipore (MWCO 5000). Todas as frações foram quantificadas e tiveram suas concentrações ajustadas para 1 mg/ml.

Identificação de proteínas por espectrometria de massas

As frações provenientes da purificação de fosfoproteínas foram separadas em eletroforese (SDS-PAGE) e visualizadas com Coomassie Blue. Duas bandas visivelmente alteradas entre as duas amostras eluídas, migrando com cerca de 30 kDa, foram recortadas do gel separadamente nas canaletas provenientes da amostra transfectada com pCDNA3-TIPRL. As bandas foram picotadas e tratadas com acetonitrila para a desidratação e remoção do corante Coomassie Blue. Os fragmentos foram desidratados em Speed Vac e reconstituídos em solução de tripsina (12,5 ng/ μ L) em tampão bicarbonato de amônio 50 mM. Após incubação a 37°C por 16 horas, os peptídeos foram extraídos em solução de acetonitrila 75% e ácido fórmico 5% e concentrados em Speed Vac. Os peptídeos foram purificados em colunas Zip Tip C18 (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante. Para a identificação usando o espectrômetro de massas MALDI-QToF Premier (Waters/Micromass), as amostras foram misturadas com matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico na proporção de 1:1 e foram adquiridos espectros na faixa de m/z (massa/carga) de 800 até 3000 em modo positivo. Foi realizada a fragmentação dos 12 peptídeos mais intensos existentes no espectro. As mesmas amostras foram analisadas utilizando o espectrômetro de massas com fonte de ionização por *eletrospray* ESI-QToF – Ultima (Waters/Micromass) e sistema de cromatografia líquida de ultra desempenho (UPLC – NanoAcquity – Waters). Utilizando uma coluna C18, os peptídeos foram separados por cromatografia em fase reversa com um gradiente de água/acetonitrila (contendo 0,1% de ácido fórmico) executado em 60 minutos. Os peptídeos separados pela cromatografia foram introduzidos na fonte de *eletrospray* e foram adquiridos espectros na faixa de m/z de 100 a 2000 em modo positivo. Os dados obtidos nos dois casos foram processados pelo programa Mascot Distiller e submetidos à busca no banco de dados MSDB através do *Mascot Server*.

Resultados e discussão

Estabelecimento de linhagem celular com expressão alterada de TIPRL

Células HEK293 foram transfectadas permanentemente com um vetor contendo o cDNA de TIPRL sob o controle do promotor CMV (pCDNA3-TIPRL) ou com o vetor vazio. Clones individuais foram selecionados e dois deles, tanto da superexpressão quanto do controle, foram selecionados aleatoriamente e analisados quanto aos níveis de mRNA e proteína. Os aumentos nos níveis de mRNA foram muito altos (cerca de 100 vezes) em ambos os clones em relação aos controles negativos, enquanto os níveis de proteína aumentaram de maneira menos intensa (cerca de 2 a 3 vezes), sugerindo que o mRNA resultante dessa construção não apresenta características favoráveis à tradução (**Figura 1**).

Análise da distribuição subcelular de TIPRL e $\alpha 4$

Nossos resultados anteriores mostraram que TIPRL é encontrada predominantemente no citoplasma, mas também no núcleo de células HEK293, e sua distribuição coincide de forma geral com a de PP2Ac (seção 3.3). Para analisar melhor essa distribuição, foram feitos alguns experimentos adicionais. A proteína TIPRL endógena de células HEK293 foi visualizada por imunolocalização usando um anticorpo específico (**Figura 2A**), o que confirmou sua localização citoplasmática e nuclear. O fracionamento celular dessa linhagem seguido de detecção por *Western blot* foi repetido, desta vez incluindo as frações insolúveis, correspondendo a membranas e, no caso do núcleo, também a cromatina (**Figura 2B**). A proteína TIPRL foi detectada no citoplasma, nas frações solúvel e insolúvel, e no núcleo quase exclusivamente na fração solúvel. $\alpha 4$ é relativamente mais abundante no núcleo do que TIPRL. A distribuição celular de TIPRL e $\alpha 4$ foi analisada também nas linhagens K562 e Jurkat, mostrando um padrão muito semelhante ao observado em células HEK293. A distribuição celular de TIPRL assemelha-se à de PP2Ac e também de PP4c em células Jurkat (**Figura 2B**).

Surpreendentemente, foram observadas bandas de migração alterada de $\alpha 4$ exclusivamente na fração nuclear das três linhagens analisadas, e mais ainda na fração insolúvel

do núcleo, sugerindo que a localização nuclear de $\alpha 4$ é regulada por uma modificação pós-traducional. A proteína $\alpha 4$ em células Nb2 de rato encontra-se glicosilada e apresenta distribuição exclusivamente nuclear (Boudreau et al. 2002; Dauphinee et al. 2005). Uma análise da sequência primária da proteína $\alpha 4$ humana mostrou diversos sítios potenciais de glicosilação O-ligada, que se concentram em uma região conservada rica em serinas localizada no início da região C-terminal desestruturada (**Figura 3**). Ao contrário da glicosilação N-ligada, que é encontrada em proteínas secretadas ou de superfície, a glicosilação O-ligada é uma modificação regulatória que ocorre em proteínas intracelulares e é comum em proteínas regulatórias e fatores de transcrição. Essa modificação é catalisada pela enzima OGT (*uridine diphospho-N-acetylglucosamine: polypeptide L-N-acetylglucosaminyltransferase*), que adiciona uma única molécula de N-acetilglicosamina a resíduos de serina ou treonina, e é removida pela enzima O-GlcNAcase (β -N-acetylglucosaminidase) (Wells and Hart 2003; Wells, et al. 2003). É provável que essa modificação seja responsável pelo direcionamento de $\alpha 4$ para o núcleo. Futuros experimentos são necessários para comprovar essa hipótese.

Identificação de alvos de fosfatases 2A regulados por TIPRL

Nossos resultados anteriores mostraram que a proteína TIPRL é um novo regulador de fosfatases do tipo 2A (Smetana and Zanchin 2007). Para caracterizar melhor essa função, é necessário determinar quais são os alvos da desfosforilação promovida ou inibida por TIPRL na célula. Dois possíveis candidatos são MafB e TAF10, devido a sua interação direta com TIPRL, mas provavelmente existem muitos outros alvos que não seriam detectados pelo sistema do duplo-híbrido por não formarem complexos estáveis com TIPRL.

Em um ensaio para identificar alguns desses alvos, extratos de células HEK293 que superexpressam TIPRL foram submetidos a um fracionamento específico para proteínas fosforiladas, em uma coluna de anticorpos imobilizados (Qiagen) esquematizada na **Figura 4A**, e as proteínas fosforiladas foram resolvidas por SDS-PAGE e comparadas com aquelas provenientes da linhagem transfectada com o vetor vazio. Com essa estratégia, foi possível identificar pelo menos duas bandas com intensidades visivelmente alteradas nas frações

fosforiladas provenientes da linhagem que super-expressa TIPRL e do controle (**Figura 4B**) sendo uma delas reduzida e a outra aumentada. Essas bandas foram extraídas do gel, tripsinizadas e submetidas à identificação por espectrometria de massas.

Uma análise da banda de maior peso feita em um espectrômetro de massas MALDI-TOF identificou peptídeos correspondentes a duas proteínas: SF2/ASF, produto do gene *SFRS1* (*Splicing factor, arginine/serine-rich 1*), e p32, produto do gene *C1QBP* (*complement component 1, q subcomponent binding protein*), mostrados na **Figura 4C**. Não foram identificados peptídeos na amostra de menor peso com essa análise além de produtos da degradação de tripsina e queratina. Outra análise das mesmas amostras por cromatografia líquida seguida de ionização de *eletrospray* e fragmentação (LC-MS/MS) em um espectrômetro ESI-QToF, capaz de maior sensibilidade na detecção, confirmou os resultados anteriores e ainda identificou proteínas adicionais. Na amostra de maior peso, foram identificados novos peptídeos das proteínas SF2/ASF e p32, e ainda de outros fatores de *splicing* da família SR e da proteína ribossomal RPS6, além de uma proteína de função desconhecida que apresenta domínio de DNA e RNA helicases (**Tabela 1**). Na amostra de menor peso, foi possível identificar peptídeos da proteína quinase CDC2, da proteína associada a ribossomos RACK1 e outra proteína ribossomal, RPS3 (**Tabela 2**).

Provavelmente, as bandas mais visivelmente alteradas entre a superexpressão de TIPRL e o controle são aquelas que produziram o maior número de peptídeos e puderam ser identificadas mesmo no espectro do MALDI-TOF, mas a identificação de outras proteínas dentro de um mesmo contexto funcional sugere que as demais podem não ser simples contaminantes. Duas dessas proteínas são de interesse especial. RPS6 é o principal alvo da quinase S6K no controle da tradução na via da quinase mTOR (Schmelzle and Hall, 2000), e sua identificação poderia indicar uma participação de TIPRL nessa via, o que seria esperado pela função de sua ortóloga em levedura. Já a proteína RACK1, apesar de não ser propriamente uma proteína ribossomal, encontra-se associada a ribossomos (Sengupta et al., 2004) e seu mRNA se comporta como os mRNAs de proteínas ribossomais, sendo sua tradução regulada pela via sensível a rapamicina (Loreni et al., 2005). RACK1 é um regulador de PKC e interage com muitas proteínas, como

JNK (López-Bergami et al., 2005) e Ki 1/57 (Nery et al., 2006), direcionando a atividade de PKC para seus alvos. Recentemente, RACK1 foi identificada em um complexo associado a microtúbulos juntamente com MID1 e $\alpha 4$ (Aranda-Orgillés et al., 2008), sugerindo uma possível relação funcional com $\alpha 4$. Para determinar quais dessas proteínas são realmente alvos de TIPRL, será necessário verificar os níveis de fosforilação de cada uma delas separadamente.

As proteínas SF2/ASF e p32 apresentam massas moleculares aparentes muito próximas, de cerca de 32 kDa, o que explica sua identificação em uma mesma região do gel. Além disso, essas duas proteínas interagem especificamente entre si. SF2/ASF é um fator de *splicing* que apresenta dois domínios de reconhecimento de RNA (RRM) e um domínio rico em serinas e argininas (SR), que é fosforilado pela quinase SRPK1. Ao contrário de outros fatores de *splicing*, que são encontrados no núcleo, essa proteína transita entre o núcleo e o citoplasma, onde regula, respectivamente, o *splicing* e a tradução do mRNA alvo. Essas funções são reguladas pelo estado de fosforilação do domínio SR, sendo que este se encontra hiperfosforilado no núcleo e hipofosforilado no citoplasma (Sanford, et al. 2005). Em um trabalho recente, foi demonstrado que SF2/ASF promove a fosforilação de 4E-BP1 por mTOR e assim regula o início da tradução, e também que SF2/ASF interage diretamente com mTOR e indiretamente com PP2Ac (Michlewski, et al. 2008). Uma hipótese interessante a ser testada é se TIPRL é capaz de fazer uma ponte de interação entre PP2Ac e SF2/ASF.

p32 é uma proteína com múltiplas funções que é encontrada em diversas partes da célula. Sua localização predominante é na matriz mitocondrial, onde regula a fosforilação oxidativa (Muta, et al. 1997) e a apoptose (Itahana and Zhang 2008). Além disso, uma fração da proteína se localiza no núcleo (Brokstad, et al. 2001), onde interage com SF2/ASF e regula o *splicing* (Petersen-Mahrt, et al. 1999), e ainda outra população é encontrada na superfície celular, onde funciona como um receptor para o domínio globular da proteína C1Q do sistema complemento. Além disso, p32 interage com ácido hialurônico e com várias proteínas virais, e está envolvida em processos de infecção e inflamação (Ghebrehiwet, et al. 2001). A estrutura cristalográfica dessa proteína mostra um enovelamento distinto de qualquer outro conhecido previamente,

apresentando estrutura quaternária trimérica em forma de toro, com distribuição assimétrica de cargas (Jiang, et al. 1999).

Devido à interação entre p32 e SF2/ASF, a identificação de ambas como possíveis alvos de TIPRL pode significar que TIPRL regula a fosforilação de apenas uma delas, sendo que a outra foi encontrada na fração fosforilada devido à sua forte interação com a primeira, ou ainda que TIPRL regula a fosforilação de cada uma separadamente. Não é possível distinguir entre essas possibilidades no momento, pois ambas são fosfoproteínas. A fosforilação de p32 não foi tão caracterizada na literatura quanto a de SF2/ASF, mas dados recentes mostram que p32 de camundongo é fosforilada por ATM na serina 148 (Kato, et al. 2008). McConnell e colaboradores (2007) demonstraram que TIPRL regula a fosforilação de um alvo de ATM/ATR de massa aparente de 32 kDa, mas essa proteína ainda não foi identificada. De acordo com nossos resultados, essa proteína poderia ser p32. Para confirmar esses resultados, será necessário verificar diretamente o efeito da superexpressão de TIPRL no estado de fosforilação de SF2/ASF e SF2p32, que será feito com a cotransfecção de células HEK293 seguida de imunoprecipitação e *Western blot* contra fosfoaminoácidos. Também será verificada a possível associação entre TIPRL e essas proteínas utilizando a mesma estratégia.

Referências Bibliográficas

- Aranda-Orgillés B, Trockenbacher A, Winter J, Aigner J, Köhler A, Jastrzebska E, Stahl J, Müller E, Otto A, Wanker E, et al. 2008b The Opitz syndrome gene product MID1 assembles a microtubule-associated ribonucleoprotein complex. *Hum Genet* **123** 163-176.
- Boudreau RT, Sangster SM, Johnson LM, Dauphinee S, Li AW & Too CK 2002 Implication of alpha4 phosphoprotein and the rapamycin-sensitive mammalian target-of-rapamycin pathway in prolactin receptor signalling. *J Endocrinol* **173** 493-506.
- Brokstad KA, Kalland KH, Russell WC & Matthews DA 2001 Mitochondrial protein p32 can accumulate in the nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **281** 1161-1169.

- Dauphinee S, Ma M & Too CK 2005 Role of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the subcellular distribution of alpha4 phosphoprotein and Sp1 in rat lymphoma cells. *J. Cell. Biochem.* **96** 579-588.
- Ghebrehiwet B, Lim BL, Kumar R, Feng X & Peerschke EI 2001 gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartamental cellular proteins, is involved in inflammation and infection. *Immunol Rev* **180** 65-77.
- Itahana K & Zhang Y 2008 Mitochondrial p32 is a critical mediator of ARF-induced apoptosis. *Cancer Cell* **13** 542-553.
- Jacinto E, Guo B, Arndt KT, Schmelzle T & Hall MN 2001 TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell* **8** 1017-1026.
- Jiang J, Zhang Y, Krainer AR & Xu RM 1999 Crystal structure of human p32, a doughnut-shaped acidic mitochondrial matrix protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** 3572-3577.
- Kato H, Takashima S, Asano Y, Shintani Y, Yamazaki S, Seguchi O, Yamamoto H, Nakano A, Higo S, Ogai A, et al. 2008 Identification of p32 as a novel substrate for ATM in heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **366** 885-891.
- Kong M, Fox CJ, Mu J, Solt L, Xu A, Cinalli RM, Birnbaum MJ, Lindsten T & Thompson CB 2004 The PP2A-associated protein alpha4 is an essential inhibitor of apoptosis. *Science* **306** 695-698.
- Liu J, Prickett TD, Elliott E, Meroni G & Brautigan DL 2001 Phosphorylation and microtubule association of the Opitz syndrome protein mid-1 is regulated by protein phosphatase 2A via binding to the regulatory subunit alpha 4. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** 6650-6655.
- López-Bergami P, Habelhah H, Bhoumik A, Zhang W, Wang LH, Ronai Z. 2005 RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C *Mol Cell.***19** 309-320.
- Loren F, Iadevaia V, Tino E, Caldarola S, Amaldi F. 2005 RACK1 mRNA translation is regulated via a rapamycin-sensitive pathway and coordinated with ribosomal protein synthesis. *FEBS Lett* **579** 5517-5520
- McConnell JL, Gomez R, Mccorvey L, Law BK & Wadzinski BE 2007 Identification of a PP2A-interacting protein that functions as a negative regulator of phosphatase activity in the ATM/ATR signaling pathway. *Oncogene* **26** 6021-6030.
- Michlewski G, Sanford JR & Cáceres JF 2008 The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell* **30** 179-189.

- Muta T, Kang D, Kitajima S, Fujiwara T & Hamasaki N 1997 p32 protein, a splicing factor 2-associated protein, is localized in mitochondrial matrix and is functionally important in maintaining oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* **272** 24363-24370.
- Nery FC, Passos DO, Garcia VS, Kobarg J. 2004 Ki-1/57 interacts with RACK1 and is a substrate for the phosphorylation by phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C *J Biol Chem*. **279** 11444-11455.
- Petersen-Mahrt SK, Estmer C, Ohrmalm C, Matthews DA, Russell WC & Akusjärvi G 1999 The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *EMBO J* **18** 1014-1024.
- Prickett TD & Brautigan DL 2007 Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3. *Molecular and Cellular Biology* **27** 4217-4227.
- Sanford JR, Ellis JD, Cazalla D & Cáceres JF 2005 Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** 15042-15047.
- Schmelzle T, Hall MN 2000 TOR, a central controller of cell growth. *Cell*. **103** 253-262
- Sengupta J, Nilsson J, Gursky R, Spahn CM, Nissen P, Frank J. 2004 Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM *Nat Struct Mol Biol*. 2004 **11** 957-962
- Smetana JH & Zanchin NI 2007 Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, alpha4 and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL). *FEBS J* **274** 5891-5904.
- Wells L & Hart GW 2003 O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Letters* **546** 154-158.
- Wells L, Whelan SA & Hart GW 2003 O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **302** 435-441.

Tabela 1. Proteínas identificadas por ESI-QTOF MS/MS a partir da banda de maior peso mostrada na Figura 4.

Proteína	Massa molecular (kDa)	Número de acesso	Número de peptídeos identificados	Função
SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 1, SF2/ASF (SFRS1)	27,7	NP_008855	9	Fator de <i>splicing</i> rico em serina e arginina (SR). Regulação de <i>splicing</i> e tradução de mRNAs.
SF2p32 (C1QBP)	31,7	NP_001203	5	Proteína de diversas funções e localizações na célula, regula o fator de <i>splicing</i> SF2/ASF.
SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 2 (SFRS2)	25,4	AAH66958	3	Fator de <i>splicing</i> rico em serina e arginina (SR). Regulação de <i>splicing</i> .
RIBOSOMAL PROTEIN S6 (RPS6)	28,8	Q96DV6	2	Proteína ribossomal, substrato da quinase S6K.
SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 7 (SFRS7)	27,1	AAH17908	2	Fator de <i>splicing</i> rico em serina e arginina (SR). Regulação de <i>splicing</i> .
CHROMOSOME 3 OPEN READING FRAME 26 (C3ORF126)	32,0	AAH06475	1	DNA e RNA helicases, superfamília II. Replicação, recombinação e reparo de DNA. Tradução, estrutura e biogênese de ribossomos.

Tabela 2. Proteínas identificadas por ESI-QTOF MS/MS a partir da banda de maior peso mostrada na Figura 4.

Proteína	Massa molecular (kDa)	Número de acesso	Número de peptídeos identificados	Função
RIBOSOMAL PROTEIN S3 (RPS3)	26,8	R3HUS3	5	Proteína ribossomal
Cell division cycle 2 (CDC2)	34,2	AAP36294	3	Quinase, regulação do ciclo celular (G1 - S e G2 - M)
RECEPTOR OF ACTIVATED PROTEIN KINASE C (RACK1)	35,5	P63244	2	Ancoragem de PKC ativada no citoesqueleto, proteína associada a ribossomos, domínio WD40.

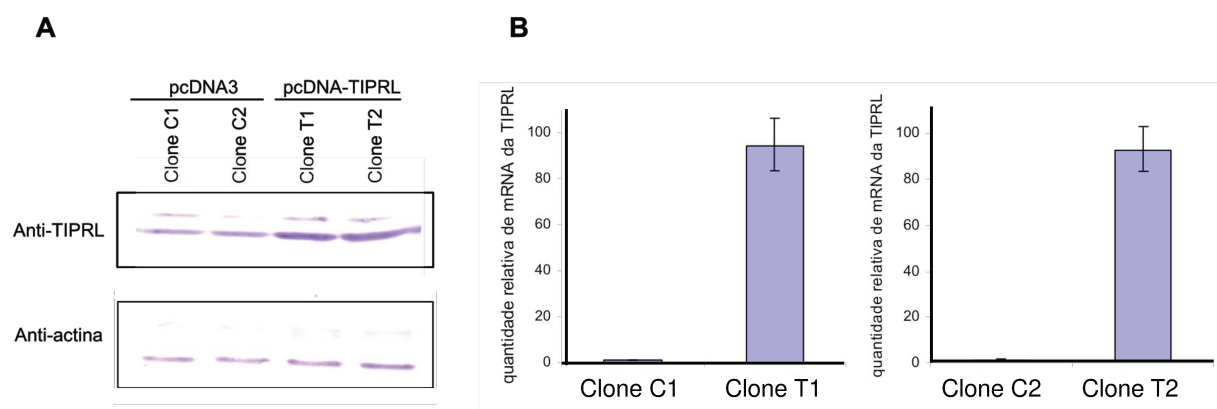


Figura 1: Avaliação dos clones isolados no experimento de superexpressão da TIPRL em células HEK293. **(A)** *Western blot* evidenciando o aumento na quantidade de TIPRL nos clones transfectados com o vetor pcDNA-TIPRL (T1 e T2) em comparação aos clones controles contendo o pcDNA3 vazio (C1 e C2). A marcação da actina foi utilizada como um controle para demonstrar que quantidades iguais de extrato foram analisadas. **(B)** Análise dos níveis do mRNA de TIPRL nos clones T1 e T2 em relação aos clones C1 e C2, respectivamente, através de RT-PCR quantitativo. Como referência foram utilizados os níveis de mRNA constitutivo da actina β presentes em cada amostra. Os resultados mostrados nos gráficos foram normalizados em relação aos níveis de mRNA da TIPRL medidos nos clones controles, que foram fixados em 1. As quantificações de cada amostra foram realizadas em triplicatas e as barras representam o desvio-padrão.

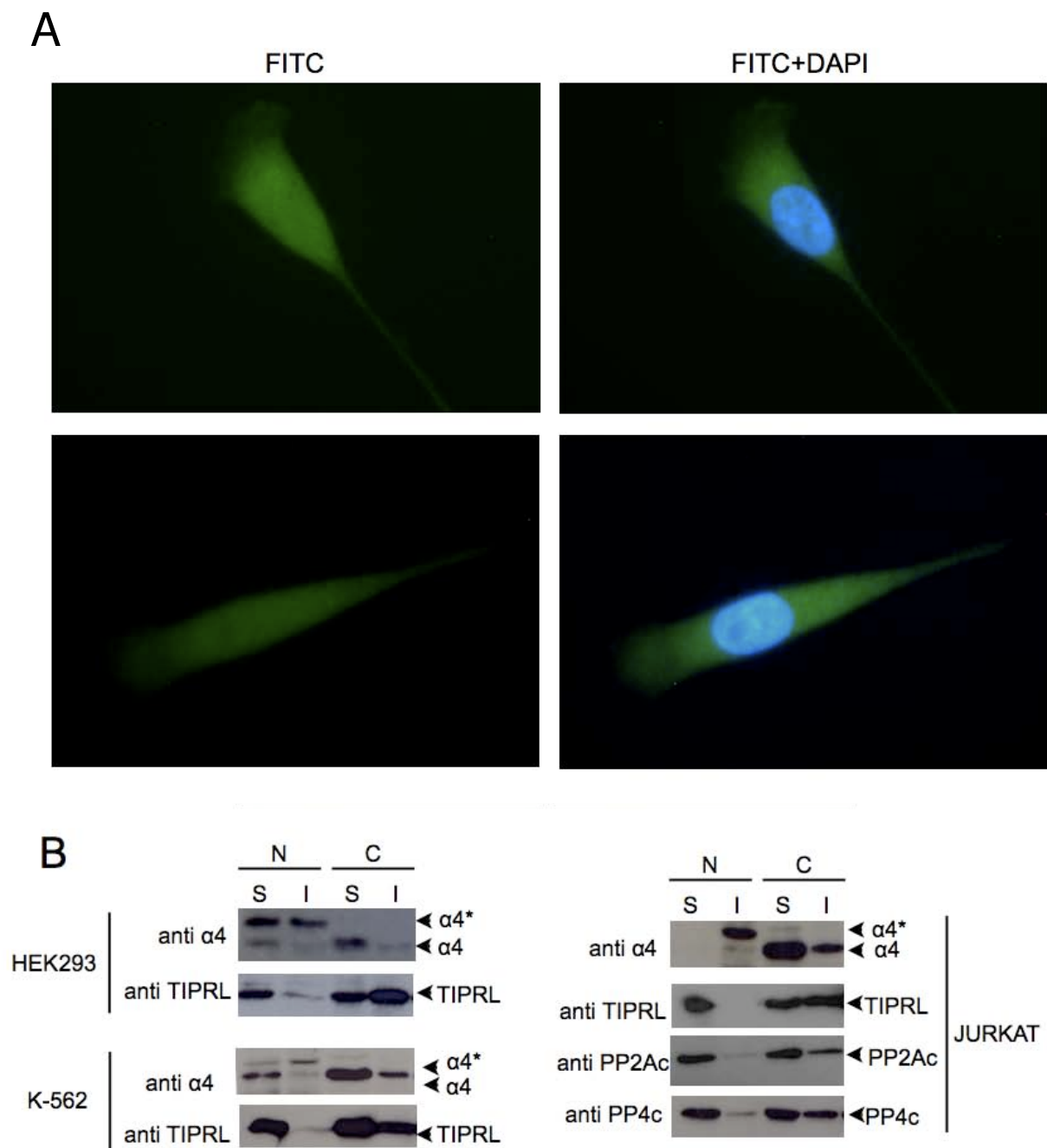


Figura 2. (A) Imunolocalização da proteína TIPRL endógena de células HEK293. As células foram fixadas e marcadas com anticorpo primário contra TIPRL, e secundário conjugado a FITC. Os núcleos foram marcados com DAPI. São mostradas duas células representativas da localização observada nas demais. **(B)** Distribuição subcelular de $\alpha 4$, TIPRL, PP2Ac e PP4c. As linhagens de células humanas HEK293, K-562 e Jurkat foram fracionadas em núcleo (N) e citoplasma (C), e cada fração foi separada em solúvel (S) ou insolúvel (I). As frações foram analisadas por *Western blot* usando anticorpos específicos para cada proteína. Quantidades iguais de proteína total foram aplicadas em cada canal. $\alpha 4^*$ refere-se a uma banda de migração alterada reconhecida pelo anticorpo contra $\alpha 4$.

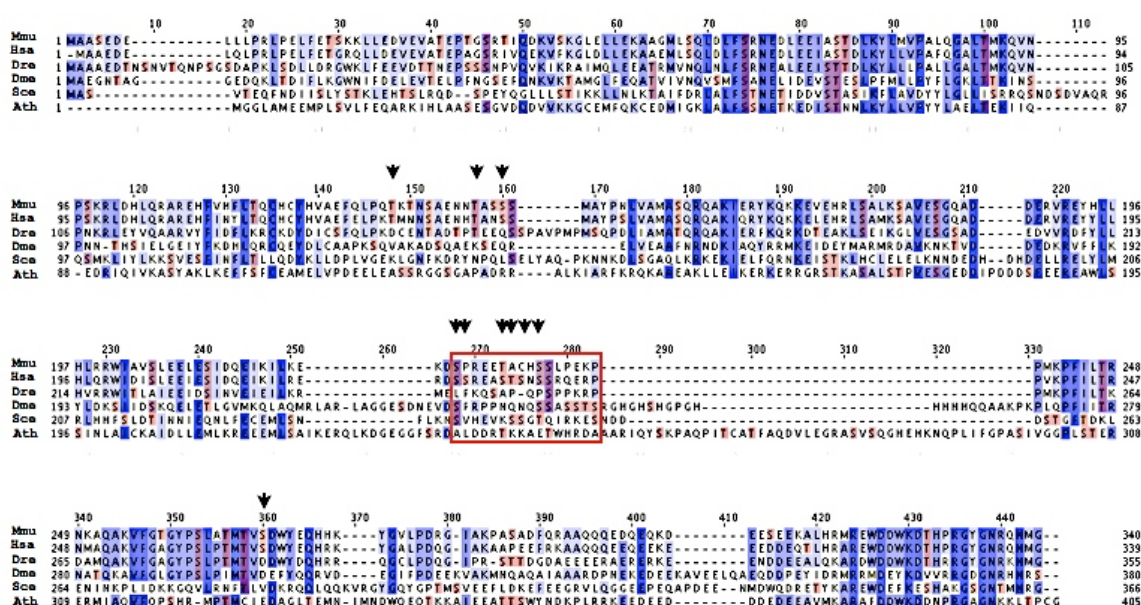


Figura 3. Predição de sítios de glicosilação e alinhamento da sequência de $\alpha 4$. A sequência primária da proteína $\alpha 4$ humana foi analisada no servidor YinOYang (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang>) em busca de sítios potenciais de glicosilação O-ligada. Os sítios encontrados são marcados com setas, e uma região conservada que concentra a maior parte deles foi marcada com um retângulo. O alinhamento com sequências de outras espécies foi feito com o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>). A conservação de sequência é mostrada em azul, e os resíduos de serina e treonina são mostrados em vermelho. Mmu: *Mus musculus*, Hsa: *Homo sapiens*, Dre: *Danio rerio*, Dme: *Drosophila melanogaster*, Sce: *Saccharomyces cerevisiae*, Ath: *Arabidopsis thaliana*.

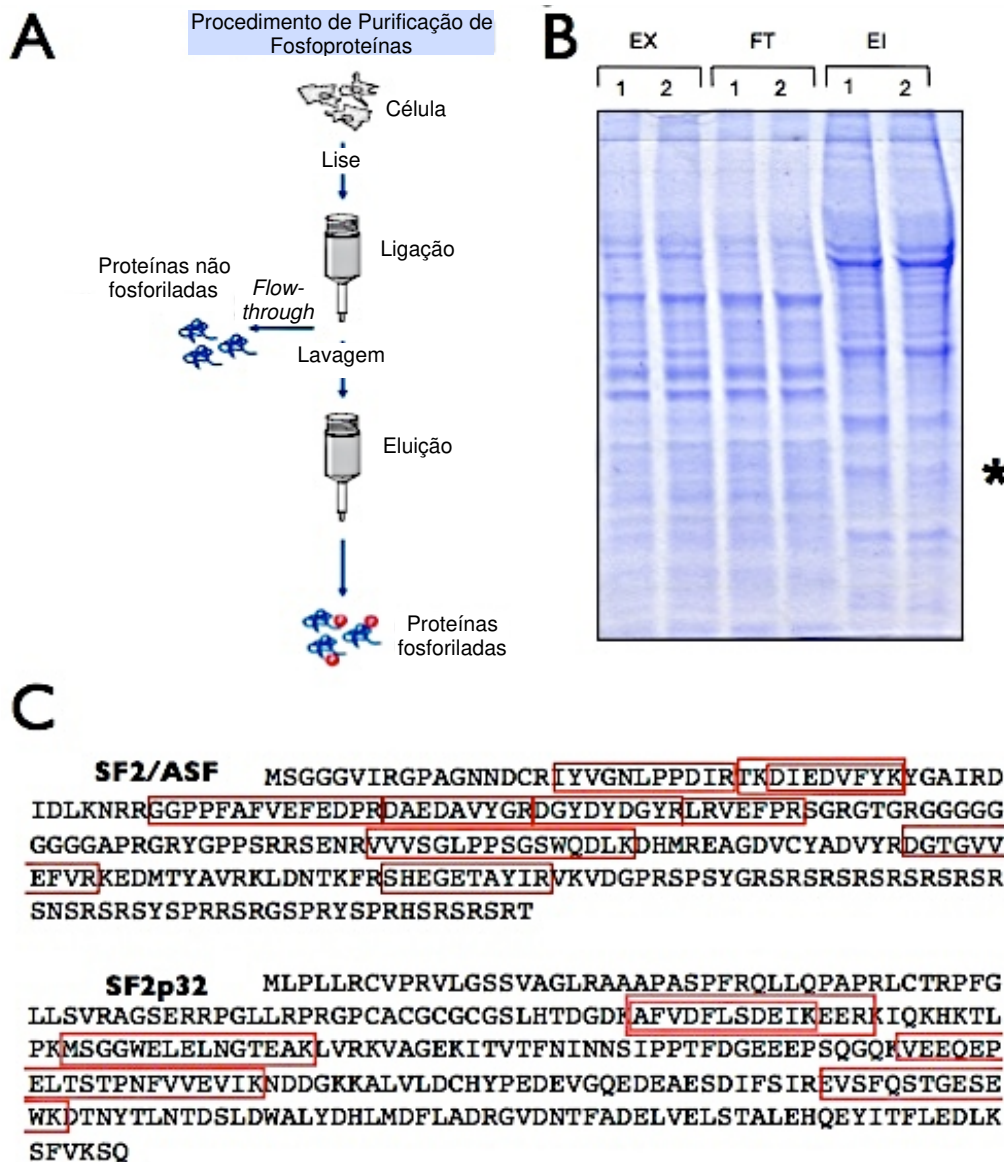


Figura 4. **A:** Representação esquemática da separação de fosfoproteínas utilizando o sistema Qiagen *PhosphoProtein Purification Kit*. **B:** Resultado obtido nas linhagens de HEK293 com superexpressão de TIPRL (2) e controle (1). Extratos totais (EX) das duas linhagens foram submetidos a cromatografia de afinidade a fosfo-aminoácidos utilizando as colunas de anticorpos imobilizados (Qiagen). O *flowthrough* (FT) corresponde a proteínas não fosforiladas, e a eluição (EL) corresponde a proteínas fosforiladas. O asterisco indica duas bandas muito próximas nas quais se observam proteínas diferencialmente fosforiladas. **C:** Identificação de proteínas presentes nas bandas marcadas com asterisco em B. As proteínas foram submetidas a tripsinização e purificação com coluna zip tip C18 (Millipore) e foram identificadas por espectrometria de massas. Os peptídeos observados são marcados como retângulos vermelhos sobre as sequências de duas proteínas identificadas, que correspondem ao fator de *splicing* SF2/ASF e a uma proteína associada a esse fator, SF2p32. Ambas apresentam massa molecular aparente de cerca de 32 kDa.

4. DISCUSSÃO

4.1. Estudos estruturais de $\alpha 4$ e mecanismo de regulação das fosfatases 2A

A proteína Tap42 de levedura foi inicialmente descrita como um regulador de fosfatases 2A que participa da via de sinalização sensível a nutrientes mediada pela quinase TOR. Proteínas ortólogas foram descritas em várias espécies, indicando uma função conservada como reguladoras dessas fosfatases. Pouco se sabe, no entanto, sobre o mecanismo de regulação da atividade das fosfatases 2A por Tap42/ $\alpha 4$. No caso das proteínas de levedura, foi proposto inicialmente que Tap42 seria um ativador dessas fosfatases, porém um trabalho posterior sugeriu um papel inibitório, que foi mais amplamente aceito e mesmo extrapolado para as proteínas humanas. Um modelo proposto para explicar esse possível papel inibitório de $\alpha 4$ sugeriu que esta se ligaria diretamente ao sítio ativo da fosfatase, bloqueando seu acesso aos substratos (Kloecker, et al. 2003). Porém, o acúmulo de evidências experimentais não sustentou nenhum dos modelos propostos inicialmente, e ficou claro que não se pode atribuir um papel exclusivamente positivo ou negativo para Tap42/ $\alpha 4$ na regulação de fosfatases 2A. Ensaio *in vitro* mostraram que $\alpha 4$ aumenta a atividade de PP2A tendo como substrato fosforilase a, MBP (*Myelin Basic Protein*) e histona (Murata, et al., 1997, Inui, et al., 1998, Chung, et al., 1999), mas diminui sua atividade com os substratos PNPP e 4EBP (Nanahoshi, et al, 1998 Nanahoshi, et al, 1999). O efeito regulatório de $\alpha 4$ também difere entre as fosfatases, sendo positivo para PP2A e negativo para PP6 quando se usa MBP como substrato, mas igualmente inibitório para ambas as fosfatases diante do substrato PNPP (Prickett and Brautigan, 2007). Esses resultados indicam que $\alpha 4$ tem um papel complexo na regulação das fosfatases 2A, que depende tanto do substrato quanto da fosfatase.

Os primeiros dados estruturais sobre essas proteínas foram obtidos neste projeto utilizando dados de SAXS, proteólise limitada e dicroísmo circular (seção 3.1) o que mostrou que $\alpha 4$ e Tap42 são proteínas alongadas formadas por um domínio estruturado N-terminal rico em α -hélices e um domínio intrinsecamente desestruturado na região C-terminal. A resolução posterior da estrutura de Tap42 (Yang, et al. 2007) confirmou esses dados, já que o domínio cristalizado

corresponde exatamente à região N-terminal estruturada, e é composto exclusivamente de α -hélices. Os autores relatam que tentativas de cristalizar a proteína $\alpha 4$ humana falharam, e a cristalização de Tap42 inteira produziu cristais de baixa qualidade nos quais a proteína se encontrava degradada, o que resultou na identificação do domínio estável que foi posteriormente cristalizado.

Apesar da ausência de similaridade de sequência com proteínas de outras famílias, o enovelamento do domínio N-terminal de Tap42 (**Figura 4.1A**), mostra grande semelhança com proteínas das famílias 14-3-3 e tetratricopeptídeo (Yang et al. 2007). Esses domínios funcionam como adaptadores em interações entre proteínas, o que é coerente com a função de $\alpha 4$. O domínio N-terminal de Tap42 (Tap42 Δ CT) apresenta quatro regiões conservadas, e a análise de mutantes mostrou que a região CR2 é responsável pela interação com a subunidade catalítica da fosfatase. Tap42 Δ CT cristalizou como um dímero formado por duas moléculas (Mol. A e Mol. B) que apresentam conformações diferentes na região CR2, mostrando que a região que interage com a fosfatase apresenta flexibilidade conformacional (Yang et al. 2007). Em um modelo de $\alpha 4$ feito por homologia com a estrutura de Tap42 Δ CT (**Figura 4.1B**), observa-se que a hélice onde se localiza a região CR2 é parcialmente desfeita na conformação B. É possível que essas duas conformações correspondam a uma forma livre de Tap42/ $\alpha 4$ e outra ligada à fosfatase.

Um possível mecanismo para a regulação da atividade das fosfatases 2A por $\alpha 4$ /Tap42 foi sugerido em nosso trabalho inicial (seção 3.1) a partir da constatação de que a região C-terminal dessas proteínas pertence a uma classe recentemente reconhecida de proteínas ou domínios intrinsecamente desenovelados, que se caracterizam por não apresentar estrutura tridimensional definida. Essa característica confere flexibilidade e possibilita a interação com ligantes estruturalmente diversos, e geralmente as interações induzem o aparecimento de elementos de estrutura secundária nesses domínios naturalmente desenovelados (Tomba 2002; Uversky 2002). Alguns exemplos de domínios desestruturados em complexo com seus ligantes são mostrados na **Figura 4.2**, evidenciando como sua conformação estendida maximiza os contatos intermoleculares. A presença de dois domínios distintos nas proteínas $\alpha 4$ e Tap42, sendo um deles globular e previamente descrito como responsável pela interação com as subunidades catalíticas

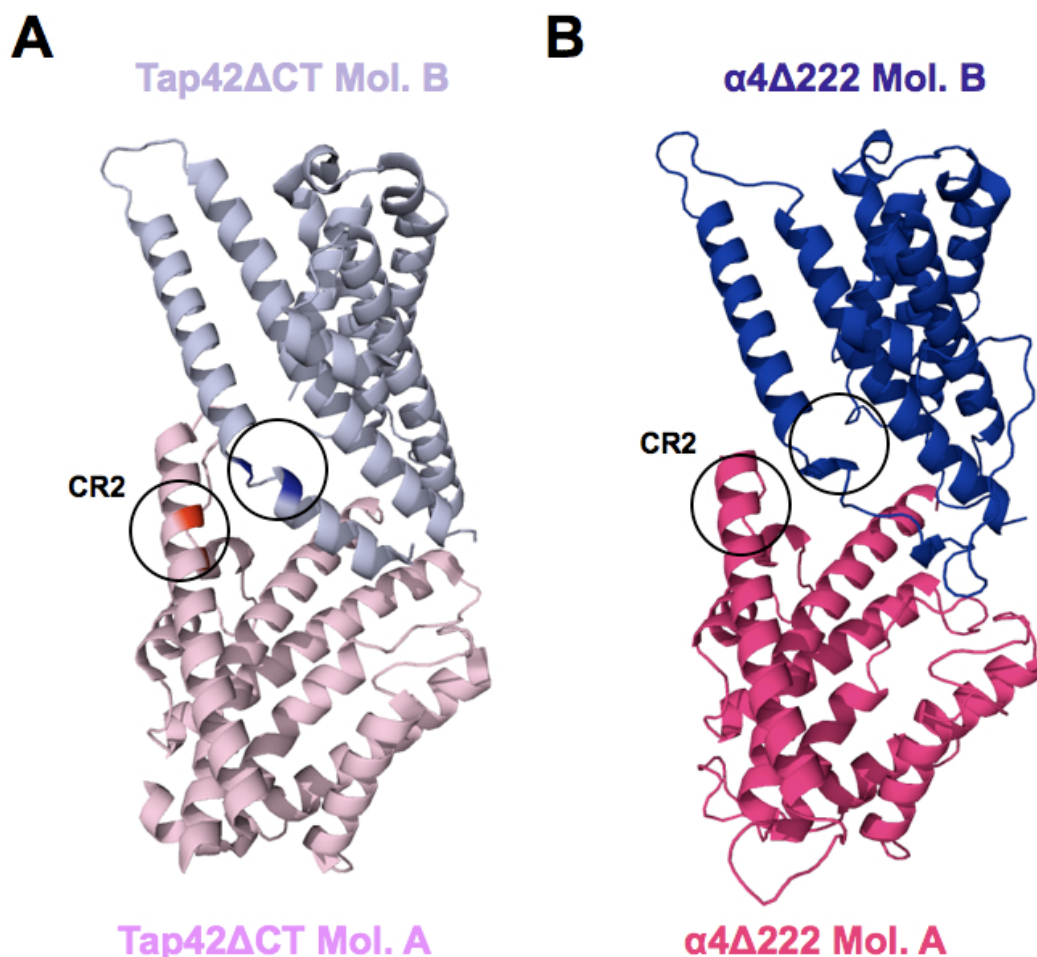


Figura 4.1. (A) Modelo estrutural de Tap42ΔCT, feito no programa Pymol a partir da estrutura depositada por Yang et al. (2007) com número de acesso PDB 2V0P. As duas moléculas presentes na unidade assimétrica são mostradas em cores distintas, e a região conservada CR2, responsável pela interação com a fosfatase, é circulada em cada uma delas. (B) Modelo estrutural de α4Δ222 feito com base no alinhamento com Tap42ΔCT usando o servidor Swiss Model.

das fosfatases 2A (Inui et al., 1998), e o outro intrinsecamente desenovelado e responsável pela interação com MID1 (Liu et al., 2001), sugeriu que esse domínio desenovelado deveria ser responsável pela interação com os substratos e seu recrutamento para o sítio ativo da fosfatase. Esse modelo leva a duas previsões principais: primeiramente, que outros substratos das fosfatases 2A regulados por α4 devem interagir com seu domínio C-terminal desestruturado, e ainda que qualquer dos dois domínios expresso separadamente deve apresentar um fenótipo dominante negativo.

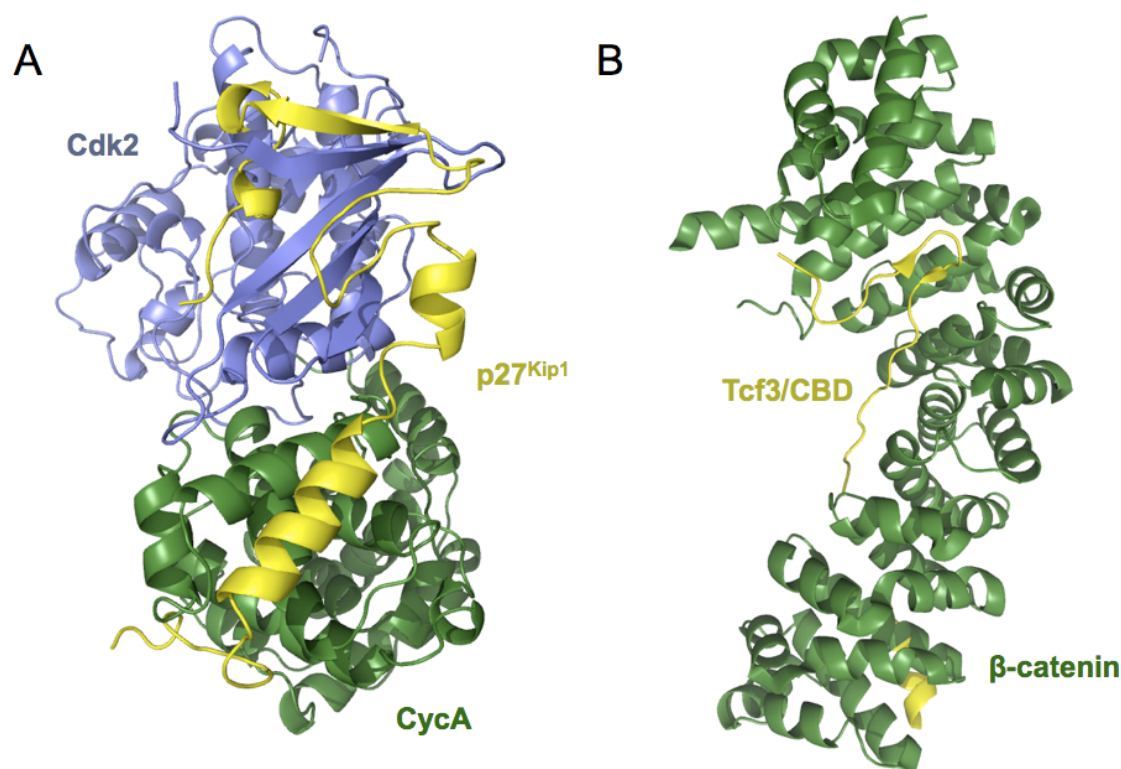


Figura 4.2. Exemplos de estruturas cristalográficas de proteínas intrinsicamente desenoveladas associadas a seus ligantes. **(A)** p27^{Kip1} (amarelo) associada a ciclina A (verde) e quinase dependente de ciclina 2 (azul). **(B)** Domínio de transativação CBD de Tcf3 (amarelo) ligado a β-catenin (verde). Figura feita com o programa Pymol com as estruturas PDB 1JSU e 1G3J a partir de figura de Tompa, 2002.

Apesar da escassez de dados detalhados sobre substratos específicos dos complexos $\alpha 4$:fosfatases 2A, um trabalho recente possibilitou a confirmação desse modelo. (Prickett and Brautigan 2007) caracterizaram a MAP quinase MEK3 como um novo substrato de PP2A regulado por $\alpha 4$, satisfazendo a ambas as previsões do modelo descrito acima. O domínio C-terminal de $\alpha 4$ é suficiente para a interação com MEK3, e a superexpressão desse domínio tem efeito dominante negativo, protegendo MEK3 da inativação por PP2A. Foi mostrado também que a regulação de MEK3 por $\alpha 4$ depende de MID1, sugerindo que o domínio C-terminal é capaz de interagir com esses dois substratos de PP2A simultaneamente (Prickett and Brautigan 2007), o que evidencia sua flexibilidade estrutural. Espera-se que a caracterização de novos substratos de fosfatases 2A regulados por $\alpha 4$ forneçam mais evidências a favor desse modelo.

4.2. Identificação de TIPRL como um novo regulador de fosfatases 2A

As subunidades catalíticas das fosfatases do tipo 2A, que incluem PP2A, PP4 e PP6, são encontradas na célula em complexo com subunidades regulatórias específicas de cada uma delas. A proteína $\alpha 4$ era, até pouco tempo atrás, a única proteína conhecida capaz de regular essas três fosfatases. Nosso grupo (Smetana and Zanchin 2007), e outros (Gingras et al. 2005; McConnell et al. 2007), identificaram independentemente a interação direta da TIPRL com as subunidades catalíticas das três fosfatases 2A. Essa descoberta foi inesperada, uma vez que o modelo de levedura previa a interação de TIPRL com $\alpha 4$ (Jacinto et al., 2001), e não com as fosfatases, e seu significado funcional ainda não foi bem esclarecido.

Gingras e colaboradores (2005) identificaram a interação de TIPRL (hTip41) com PP4c em uma análise de novas interações dessa fosfatase por espectrometria de massas. TIPRL foi identificada em associação com PP4c e também com sua subunidade regulatória PP4R2. Testes de interação *in vitro* mostraram que TIPRL interage também com PP6c e PP2Ac, mas não com PP1.

Nosso trabalho, e o de McConnell e colaboradores (2007), foram os primeiros a caracterizar funcionalmente a interação entre TIPRL e as fosfatases 2A. Essa interação foi mapeada em nosso trabalho com os clones de fosfatases isolados na triagem pelo sistema do duplo-híbrido, mostrando que um fragmento C-terminal de PP2Ac (resíduos 210 - 309) é suficiente para a interação com TIPRL. Uma triagem de mutantes identificou resíduos conservados na sequência de TIPRL que são necessários para a interação com a fosfatase. McConnell e colaboradores (2007) mapearam a interação usando a isoforma 2 de TIPRL, que demonstraram ser incapaz de interagir com PP2Ac. Essa isoforma difere da isoforma 1 por apresentar cerca de 100 resíduos a menos no C-terminal, devido a *splicing* alternativo, e esses resíduos foram apresentados como a região responsável pela interação com PP2Ac. Dois dos mutantes que isolamos (M196V e D198N) coincidem com essa região, mas outros não, sugerindo que outras regiões de TIPRL também são importantes na interação.

Em ambos os trabalhos, ensaios de atividade de PP2A *in vitro* mostraram uma inibição na presença de TIPRL, porém a interpretação desse efeito foi diferente. Enquanto McConnell e

colaboradores (2007) consideraram TIPRL como um inibidor de PP2A, nosso trabalho propõe apenas que TIPRL é um regulador de PP2A. $\alpha 4$ e Tap42 foram precipitadamente chamadas de inibidores e estudos posteriores demonstraram que seu efeito sobre a fosfatase também pode ser de ativação. De fato, em nossos resultados obtidos posteriormente (seção 3.4), a superexpressão de TIPRL reduziu visivelmente os níveis de fosforilação de uma proteína, mas também aumentou os níveis de outra, sugerindo que, assim como $\alpha 4$, TIPRL pode ter efeitos opostos em diferentes substratos.

4.3. Significado funcional do complexo ternário $\alpha 4$:PP2Ac:TIPRL

A interação descrita em levedura entre as proteínas Tip41 e Tap42 (Jacinto et al. 2001) nos levou a testar a interação entre suas homólogas humanas TIPRL e $\alpha 4$. Surpreendentemente, as proteínas humanas não interagiram diretamente *in vitro*, mas sim indiretamente na presença de PP2Ac, formando um complexo ternário estável (seção 3.3). O mapeamento dos sítios de interação de $\alpha 4$ e TIPRL no modelo estrutural de PP2A mostrou que essas regiões não se sobrepõem, indicando que ambas as proteínas poderiam interagir simultaneamente com PP2Ac, o que está de acordo com nossas observações. Um ensaio de competição direta *in vitro* também mostrou que TIPRL pode interagir com o complexo PP2Ac- $\alpha 4$ previamente formado, assim como $\alpha 4$ com o complexo PP2Ac-TIPRL, descartando a possibilidade de competição entre essas duas proteínas na interação com PP2Ac. Portanto, os ensaios *in vitro* mostram claramente a interação simultânea de $\alpha 4$ e TIPRL com PP2Ac, formando um complexo ternário. Dada a conservação entre as fosfatases 2A, é provável que o mesmo seja verdade para PP4c e PP6c.

Os clones de fosfatases 2A isolados na triagem de interações com TIPRL mostraram que a região C-terminal de PP2Ac é capaz de interagir com TIPRL, indicando que esta se liga a um sítio próximo ao de interação com as subunidades B/B'/B". Um trabalho anterior mostrou que $\alpha 4$ interage com PP2Ac em uma região que se sobrepõe ao sítio de interação com a subunidade A, e essas interações são mutuamente exclusivas (Prickett and Brautigan 2004). Esses dados indicam que o complexo ternário $\alpha 4$:TIPRL:PP2Ac tem uma organização espacial que lembra o complexo A:B:C. Uma diferença importante entre esses dois complexos é que, enquanto o complexo A:B:C

é estabilizado por interações aos pares entre cada um dos membros (Cho and Xu 2007; Xu et al. 2006), no complexo $\alpha 4$:TIPRL:PP2Ac parece não haver uma interação estável entre $\alpha 4$ e TIPRL. Além de não ser possível detectar uma interação entre $\alpha 4$ e TIPRL diretamente, também não se observou diferença na formação do complexo ternário na presença de $\alpha 4$ inteira ou apenas seu domínio N-terminal ($\alpha 4\Delta 222$), indicando que o domínio C-terminal não participa de interações dentro desse complexo. Esse fato é condizente com nosso modelo que propõe um papel para o domínio C-terminal de $\alpha 4$ na interação com substratos (seção 3.1).

A existência desse complexo ternário implica que, mesmo sem uma interação direta entre TIPRL e $\alpha 4$, essas proteínas se associariam *in vivo* por meio das fosfatases 2A. De fato, nosso trabalho identificou a interação entre TIPRL e $\alpha 4$ em células HEK293 e K562. Apesar de específica, essa interação é pouco abundante em comparação à interação de cada uma delas com PP2Ac, sugerindo que o complexo ternário não é a forma predominante de $\alpha 4$ nem de TIPRL na célula. Talvez devido a esse fato, McConnell e colaboradores (2007) não tenham identificado a associação entre $\alpha 4$ e TIPRL em células humanas. Uma explicação possível para a relativa escassez desse complexo seria o seu confinamento em alguma região específica da célula, ou ainda a regulação da montagem do complexo ternário por alguma modificação pós-traducional, em resposta a um estímulo específico. A restrição espacial ou temporal do complexo ternário não significa necessariamente uma importância funcional reduzida. Foi demonstrado, por exemplo, que uma pequena fração de Tap42 (menos de 10%) associada à membrana cumpre um importante papel na sinalização pela quinase TOR em levedura (Yan et al. 2006).

A identificação de substratos de fosfatases 2A regulados tanto por TIPRL quanto por $\alpha 4$ poderia fornecer pistas sobre possíveis funções celulares do complexo ternário. Nossos resultados indicam que dois possíveis alvos em comum de TIPRL e $\alpha 4$ são as proteínas SF2p32 (C1QBP) e RACK1. Essas proteínas, identificadas na triagem de alvos de TIPRL descrita na seção 3.4, foram identificadas também como componentes de um complexo ribonucleoproteico associado a microtúbulos do qual fazem parte $\alpha 4$, MID1 e proteínas ribossomais, entre outras (Aranda-Orgillés et al. 2008). Esses possíveis alvos, se confirmados, indicariam que o complexo ternário

possa se associar a microtúbulos, e desempenhar um papel no direcionamento da maquinaria de tradução ao citoesqueleto.

4.3. Participação de $\alpha 4$ e TIPRL na via de sinalização da quinase mTOR

As proteínas de levedura Tap42 e Tip41 são reguladores bem caracterizados da via de sinalização da quinase TOR, mas a participação de suas homólogas humanas $\alpha 4$ e TIPRL na via da quinase mTOR ainda não é bem compreendida. Apesar de Tap42 e Tip41 serem substratos diretos de TOR, não se sabe se o mesmo ocorre com $\alpha 4$ e TIPRL (Jacinto et al. 2001; Jiang and Broach 1999). Foi demonstrado que Tap42 se dissocia das fosfatases Sit4 e Pph21 em células de levedura tratadas com rapamicina após cerca de 30 minutos (Di Como and Arndt 1996), e mais recentemente essa dissociação foi descrita como um evento secundário e subsequente à liberação do complexo Tap42:fosfatase de sua associação com a quinase TOR na membrana celular (Yan et al. 2006).

Em diversos trabalhos, resumidos na **tabela 4.1**, a possível participação de $\alpha 4$ e TIPRL na via da quinase mTOR foi estudada indiretamente, por meio da sensibilidade da associação entre $\alpha 4$ e PP2A ou TIPRL e PP2A ao tratamento com rapamicina. Os resultados divergentes desses estudos têm sido interpretados como variações entre tipos celulares. Nossos resultados mostraram que os complexos $\alpha 4$:PP2A e TIPRL:PP2A de células K562 se mantêm estáveis mesmo após 3,5 horas de tratamento com rapamicina (seção 3.3), resultado semelhante ao obtido por McConnell e colaboradores (2007) em células HEK293 T-Rex. Um fato interessante é que, com exceção do primeiro trabalho publicado a esse respeito em células humanas, no qual o complexo $\alpha 4$:PP2A se dissociou após 30 minutos de tratamento com rapamicina (Murata et al. 1997), em nenhum outro caso foi observada a dissociação do complexo em um período inferior a 24 horas. Essa cinética de dissociação não seria compatível com eventos de sinalização celular, que ocorrem em uma escala de tempo curta.

Trabalhos recentes demonstraram que o tratamento prolongado com rapamicina realmente pode apresentar efeitos muito distintos entre linhagens celulares. O complexo mTORC2, considerado resistente a rapamicina, na verdade se desestabiliza após um tratamento prolongado

Tabela 4.1 Resumo de resultados publicados sobre a dissociação do complexo entre Tap42/ $\alpha 4$ e fosfatases 2A.

Referência	Célula	[Rapa]	Tempo	Proteínas	Resultado
(Di Como and Arndt 1996)	levedura W303	0,33 a 0,66 $\mu\text{g/mL}$	30 min	HA-Sit4, HA-Pph21, Tap42 endógena	Dissocia
(Murata et al. 1997)	COS-7	100 nM	30 min	Flag- $\alpha 4$ + PP2Ac endógena	Dissocia
(Chen, et al. 1998)	Tag-Jurkat	1 μM	1 h	Flag- $\alpha 4$ + PP2Ac endógena	Não dissocia
(Inui et al. 1998)	Jurkat e Raji	Até 1 μM	até 72 h	$\alpha 4$ e PP2Ac endógenas	Apenas Jurkat dissocia
(Nanahoshi et al. 1998)	HEK293	100 nM		Flag-PP2Ac, Myc- $\alpha 4$, Myc-Tap42	Não dissocia
(Kloeker et al. 2003)	COS-M6	200 nM	15 a 30 min	myc- $\alpha 4$ e PP2Ac endógena	Não dissocia
(Kong et al. 2004)	FL5.12 (linfoide)	20 nM	<i>overnight</i>	$\alpha 4$ e PP2Ac endógenas	Dissocia
(Nien et al. 2007)	COS-1	100 nM	30 min, 24 h	$\alpha 4$ e PP2Ac endógenas	Não dissocia
(McConnell et al. 2007)	HEK293 T-Rex	200 nM	20 min	Myc- $\alpha 4$, Flag-TIPRL, PP2Ac endógena	Não dissocia
(Smetana and Zanchin 2007)	K562	200 nM	3h 30 min	$\alpha 4$, TIPRL e PP2Ac endógenas	Não dissocia

(24 horas ou mais), enquanto o complexo mTORC1 se desestabiliza após cerca de uma hora (Sarbasov, et al. 2006). Em algumas linhagens celulares, como PC3 e Jurkat, o complexo mTORC2 se dissocia completamente após 24 horas de tratamento com rapamicina, enquanto em outras, como HeLa, uma pequena quantidade do complexo resiste mesmo após 72 horas de tratamento. Essas diferenças se refletem na fosforilação do substrato de mTORC2, a quinase Akt/PKB, que apresenta sensibilidade a rapamicina apenas nas linhagens que dissociam completamente mTORC2 (Sarbasov, et al. 2006). O efeito do tratamento prolongado com rapamicina na fosforilação de 4E-BP1 e S6K, os dois substratos mais caracterizados de mTORC1, também difere radicalmente, já que S6K permanece desfosforilada durante toda a

Tabela 4.2 Resumo de resultados publicados sobre o efeito de $\alpha 4$ na fosforilação e atividade dos substratos de mTORC1.

Referência	Linhagem ou organismo	Abordagem experimental	Resultado
(Nanahoshi et al. 1998)	—	Desfosforilação <i>in vitro</i>	$\alpha 4$ inibe a desfosforilação de 4E-BP1 por PP2A
(Chung et al. 1999)	COS-7	Superexpressão de $\alpha 4$	Não se observou efeito na fosforilação de S6K nem de 4E-BP1
(Inui et al. 2002)	Linfócitos B	<i>Knockout</i> condicional de $\alpha 4$	$\alpha 4$ é necessária para a ativação de S6K após estímulo com anti-IgM
(Kloeker et al. 2003)	COS-M6	Células transfectadas com Myc- $\alpha 4$ e Flag-S6K	$\alpha 4$ não interage com S6K
(Yamashita et al. 2005)	Linfócitos B	<i>Knockout</i> condicional de $\alpha 4$	$\alpha 4$ se associa com S6K após estimulação com LPS. A associação é mediada por PP2Ac.
(Cygner et al. 2005)	Drosophila	<i>Knockout</i> de $\alpha 4$	Não se observou efeito na fosforilação de S6K
(Prickett and Brautigan 2006)	COS-7	Superexpressão de $\alpha 4$	Não se observou efeito na fosforilação de S6K
(Nien et al. 2007)	COS-1	Superexpressão de $\alpha 4$	$\alpha 4$ promove a desfosforilação de 4E-BP1, mas não tem efeito sobre S6K.
(Bielinski and Mumby 2007)	Drosophila	<i>Knockdown</i> de $\alpha 4$ por RNAi	Não se observou efeito na fosforilação de S6K
(Prickett and Brautigan 2007)	HeLa	<i>Knockdown</i> de $\alpha 4$ por RNAi	Não se observou efeito na fosforilação de S6K
(Grech et al. 2008)	Eritroblastos I/11	Superexpressão de $\alpha 4$	$\alpha 4$ aumenta a fosforilação de 4E-BP1 e S6K

duração do tratamento, enquanto 4E-BP1 pode recuperar seus níveis de fosforilação e atividade em algumas linhagens, como HeLa e HEK293 (Choo, et al. 2008). No caso de $\alpha 4$ e PP2Ac, apenas um trabalho realizou uma comparação entre linhagens, concluindo que o complexo se dissocia após 24 horas de tratamento na linhagem Jurkat, que é sensível a rapamicina, e não em Raji, que é relativamente insensível (Inui, et al. 1998).

Além da sensibilidade ao tratamento com rapamicina, outra evidência da participação de $\alpha 4$ na via de mTOR é seu efeito sobre a fosforilação e atividade dos principais alvos de mTORC1, S6K e 4E-BP1. Os dados disponíveis na literatura sobre essa questão foram resumidos na **tabela 4.2**. Como se pode observar, os resultados são contraditórios, especialmente no caso de 4E-BP1, sobre o qual são reportados efeitos opostos tais como ativação (Grech, et al. 2008; Nanahoshi et al. 1998) e inibição (Nien et al. 2007) por $\alpha 4$, ou mesmo nenhum efeito (Chung et al. 1999). Já no caso de S6K, existem evidências de sua regulação positiva por $\alpha 4$, e mesmo de associação física, em linfócitos estimulados com ativadores policlonais (Inui et al. 2002; Yamashita et al. 2005) e possivelmente em eritrócitos (Grech et al. 2008), mas em outros tipos celulares essa regulação parece não existir.

Os dados da literatura indicam que $\alpha 4$ não é um mediador importante da ativação dos substratos mais conhecidos de mTORC1. É possível que sua participação seja necessária em outros processos regulados por mTORC1, como por exemplo na regulação da localização nuclear do fator de transcrição GLI3 (Krauss, et al. 2008), o que se aproxima mais da função de Tap42 em levedura (Beck and Hall 1999). Outra possibilidade é que $\alpha 4$ esteja envolvida na função de mTORC2 e Akt/PKB, o que seria compatível com a cinética de dissociação do complexo com PP2Ac.

4.4. Envolvimento de $\alpha 4$ e TIPRL no controle da expressão gênica

A triagem de interações de TIPRL no sistema do duplo-híbrido em levedura identificou predominantemente as subunidades catalíticas de fosfatases 2A e dois fatores de transcrição, MafB e TAF10. Essas interações sugeriram um papel para TIPRL no controle da transcrição. $\alpha 4$ também tem um papel descrito no controle transcricional da apoptose mediada pelos fatores de transcrição p53 e c-jun (Kong et al. 2004; Prickett and Brautigan 2007). A localização parcialmente nuclear de TIPRL e $\alpha 4$ (seção 3.4) está de acordo com essas funções. Já a triagem de possíveis substratos de TIPRL identificou fatores de *splicing* e proteínas ribossomais, apontando para uma função no controle do *splicing* e início da tradução.

As evidências disponíveis até agora, tanto de resultados apresentados aqui quanto da literatura, sugerem que $\alpha 4$ e TIPRL participam de todas as etapas do controle da expressão gênica. Um cenário provável seria que $\alpha 4$ e TIPRL atuam desde a recepção de sinais celulares em associação a receptores de membrana até o controle direto da transcrição no núcleo e, possivelmente em associação com o mRNA transcrito, participam de seu processamento e tradução, sempre por meio de sua associação com as fosfatases 2A. Essa hipótese unificaria dados aparentemente discrepantes de possíveis funções celulares e vias de sinalização das quais essas proteínas participam, sugerindo para elas um papel de integradores de diversas vias em um único processo, que é o controle da expressão gênica. A **Figura 4.3** representa esquematicamente uma rede de interações envolvendo TIPRL, $\alpha 4$, fosfatases 2A e proteínas envolvidas no controle da expressão gênica.

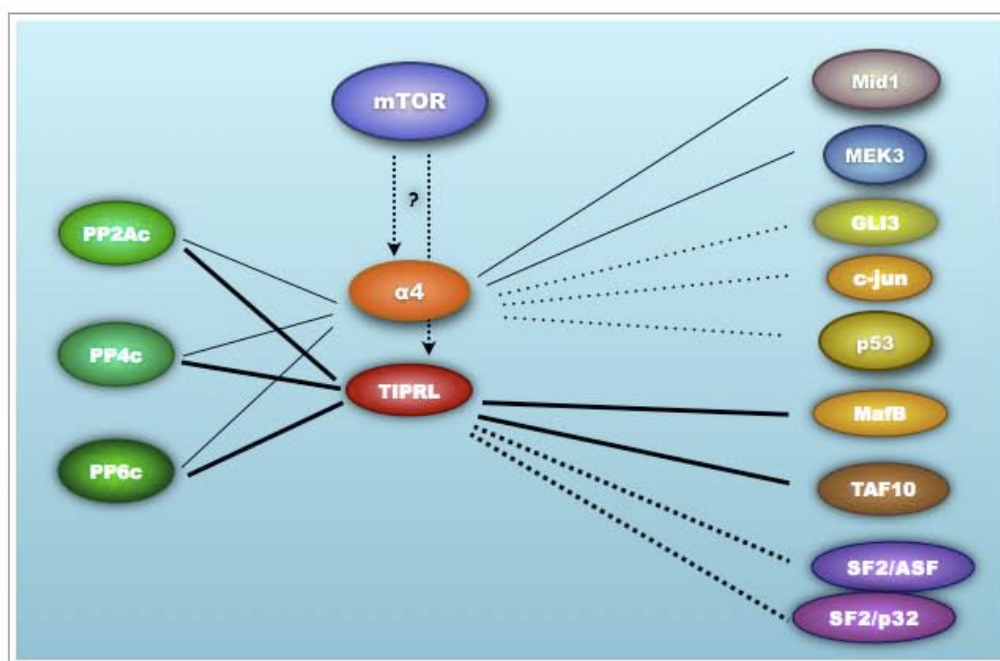


Figura 4.3. Representação esquemática de uma rede de interações envolvendo TIPRL, $\alpha 4$, fosfatases 2A e proteínas envolvidas no controle da expressão gênica. As linhas cheias representam interações diretas e as pontilhadas, interações indiretas ou ainda não testadas diretamente. Nos dois casos, as linhas mais grossas correspondem a interações identificadas neste trabalho, e as mais finas a interações já descritas na literatura. As setas pontilhadas indicam a possível regulação de TIPRL e $\alpha 4$ por mTOR.

4.5. Referências Bibliográficas

- Aranda-Orgillés B, Trockenbacher A, Winter J, Aigner J, Köhler A, Jastrzebska E, Stahl J, Müller E, Otto A, Wanker E, et al. 2008 The Opitz syndrome gene product MID1 assembles a microtubule-associated ribonucleoprotein complex. *Hum Genet* **123** 163-176.
- Beck T & Hall MN 1999 The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402** 689-692.
- Bielinski VA & Mumby MC 2007 Functional analysis of the PP2A subfamily of protein phosphatases in regulating Drosophila S6 kinase. *Experimental Cell Research* **313** 3117-3126.
- Chen J, Peterson RT & Schreiber SL 1998 Alpha 4 associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **247** 827-832.
- Cho U & Xu W 2007 Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature* **445** 53-57.
- Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP & Blenis J 2008 Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci USA* **105** 17414-17419.
- Chung H, Nairn AC, Murata K & Brautigan DL 1999 Mutation of Tyr307 and Leu309 in the protein phosphatase 2A catalytic subunit favors association with the alpha 4 subunit which promotes dephosphorylation of elongation factor-2. *Biochemistry* **38** 10371-10376.
- Cygnar KD, Gao X, Pan D & Neufeld TP 2005 The phosphatase subunit tap42 functions independently of target of rapamycin to regulate cell division and survival in Drosophila. *Genetics* **170** 733-740.
- Di Como CJ & Arndt KT 1996 Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & Development* **10** 1904-1916.
- Gingras AC, Caballero M, Zarske M, Sanchez A, Hazbun TR, Fields S, Sonenberg N, Hafen E, Raught B & Aebersold RH 2005 A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics* **4** 1725-1740.

- Grech G, Blazquez-Domingo M, Kolbus A, Bakker WJ, Mullner EW, Beug H & von Lindern M 2008 Igbp1 is part of a positive feed-back loop in SCF-dependent, selective mRNA translation initiation inhibiting erythroid differentiation. *Blood*.
- Inui S, Maeda K, Hua DR, Yamashita T, Yamamoto H, Miyamoto E, Aizawa S & Sakaguchi N 2002 BCR signal through alpha 4 is involved in S6 kinase activation and required for B cell maturation including isotype switching and V region somatic hypermutation. *Int Immunol* **14** 177-187.
- Inui S, Sanjo H, Maeda K, Yamamoto H, Miyamoto E & Sakaguchi N 1998 Ig receptor binding protein 1 (alpha4) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Blood* **92** 539-546.
- Jacinto E, Guo B, Arndt KT, Schmelzle T & Hall MN 2001 TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell* **8** 1017-1026.
- Jiang Y & Broach JR 1999 Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J* **18** 2782-2792.
- Kloeker S, Reed R, McConnell JL, Chang D, Tran K, Westphal RS, Law BK, Colbran RJ, Kamoun M, Campbell KS, et al. 2003 Parallel purification of three catalytic subunits of the protein serine/threonine phosphatase 2A family (PP2A(C), PP4(C), and PP6(C)) and analysis of the interaction of PP2A(C) with alpha4 protein. *Protein Expression and Purification* **31** 19-33.
- Kong M, Fox CJ, Mu J, Solt L, Xu A, Cinalli RM, Birnbaum MJ, Lindsten T & Thompson CB 2004 The PP2A-associated protein alpha4 is an essential inhibitor of apoptosis. *Science* **306** 695-698.
- Krauss S, Foerster J, Schneider R & Schweiger S 2008 Protein phosphatase 2A and rapamycin regulate the nuclear localization and activity of the transcription factor GLI3. *Cancer Res* **68** 4658-4665.

-
- Liu J, Prickett TD, Elliott E, Meroni G & Brautigan DL 2001 Phosphorylation and microtubule association of the Opitz syndrome protein mid-1 is regulated by protein phosphatase 2A via binding to the regulatory subunit alpha 4. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** 6650-6655.
- McConnell JL, Gomez R, McCorvey L, Law BK & Wadzinski BE 2007 Identification of a PP2A-interacting protein that functions as a negative regulator of phosphatase activity in the ATM/ATR signaling pathway. *Oncogene* **9**.
- Murata K, Wu J & Brautigan DL 1997 B cell receptor-associated protein alpha4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** 10624-10629.
- Nanahoshi M, Nishiuma T, Tsujishita Y, Hara K, Inui S, Sakaguchi N & Yonezawa K 1998 Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by alpha4 protein and its yeast homolog Tap42. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **251** 520-526.
- Nanahoshi M, Tsujishita Y, Tokunaga C, Inui S, Sakaguchi N, Hara K, Yonezawa K. 1999 Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases. *FEBS Lett.* **446** 108-112.
- Nien WL, Dauphinee S, Moffat LD & Too CK 2007 Overexpression of the mTOR alpha4 phosphoprotein activates protein phosphatase 2A and increases Stat1alpha binding to PIAS1. *Mol Cell Endocrinol* **263** 10-17.
- Prickett TD & Brautigan DL 2004 Overlapping binding sites in protein phosphatase 2A for association with regulatory A and alpha-4 (mTap42) subunits. *J Biol Chem* **279** 38912-38920.
- Prickett TD & Brautigan DL 2006 The alpha4 regulatory subunit exerts opposing allosteric effects on protein phosphatases PP6 and PP2A. *J Biol Chem* **281** 30503-30511.
- Prickett TD & Brautigan DL 2007 Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3. *Molecular and Cellular Biology* **27** 4217-4227.

- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL & Sabatini DM 2006 Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* **22** 159-168.
- Smetana JH, Oliveira CL, Jablonka W, Aguiar Pertinhez T, Carneiro FR, Montero-Lomeli M, Torriani I & Zanchin NI 2006 Low resolution structure of the human alpha4 protein (IgBP1) and studies on the stability of alpha4 and of its yeast ortholog Tap42. *Biochim Biophys Acta* **1764** 724-734.
- Smetana JH & Zanchin NI 2007 Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, alpha4 and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL). *FEBS J* **274** 5891-5904.
- Tompa P 2002 Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **27** 527-533.
- Uversky VN 2002 What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* **269** 2-12.
- Xu Y, Xing Y, Chen Y, Chao Y, Lin Z, Fan E, Yu JW, Strack S, Jeffrey PD & Shi Y 2006 Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell* **127** 1239-1251.
- Yamashita T, Inui S, Maeda K, Hua DR, Takagi K & Sakaguchi N 2005 The heterodimer of alpha4 and PP2Ac is associated with S6 kinase1 in B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **330** 439-445.
- Yan G, Shen X & Jiang Y 2006 Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *EMBO J* **25** 3546-3555.
- Yang J, Roe SM, Prickett TD, Brautigan DL & Barford D 2007 The structure of Tap42/alpha4 reveals a tetratricopeptide repeat-like fold and provides insights into PP2A regulation. *Biochemistry* **46** 8807-8815.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As principais conclusões deste trabalho são as seguintes:

- As proteínas $\alpha 4$ humana e Tap42 de levedura são formadas por um domínio N-terminal compacto formado por α -hélices, e um domínio C-terminal intrinsecamente desenovelado.
- A proteína humana TIPRL interage diretamente com as subunidades catalíticas das fosfatases PP2A, PP4 e PP6. TIPRL e $\alpha 4$ não interagem diretamente, mas podem se associar simultaneamente com PP2A formando um complexo ternário.
- A região C-terminal de PP2Ac é suficiente para a interação com TIPRL.
- Foram isolados mutantes de TIPRL deficientes na interação com as fosfatases 2A.
- TIPRL e $\alpha 4$ inibem a atividade de PP2A *in vitro* usando um peptídeo fosforilado como substrato.
- As interações entre TIPRL, PP2Ac e $\alpha 4$ endógenas de células K-562 não são desfeitas após 3,5 horas de tratamento com rapamicina.
- TIPRL interage diretamente com os fatores de transcrição MafB e TAF10. O extremo C-terminal de MafB (MafB/CT), que contém parte do domínio bZIP, é suficiente para interagir com TIPRL.
- As proteínas $\alpha 4$ e TIPRL apresentam localização nuclear e citoplasmática em células HEK293, Jurkat e K-562.
- A distribuição subcelular de TIPRL coincide com a de PP2Ac e PP4c em células Jurkat.

Os principais resultados aguardando confirmação, como perspectiva de novos trabalhos são:

- Confirmar uma provável modificação pós-traducional de $\alpha 4$ exclusiva da fração nuclear, possivelmente uma glicosilação O-ligada.
- Verificar se o fator de *splicing* SF2/ASF e sua proteína regulatória SF2p32 são alvos de fosfatases 2A regulados por TIPRL.

6. ANEXO

Expressão, purificação e cristalização da proteína TIPRL

Juliana H. C. Smetana, Adriana C. Alves Pinto, Elaine C. Teixeira, Gustavo A. Bezerra, Beatriz

G. Guimarães e Nilson I. T. Zanchin

As proteínas Tip41/TIPRL não apresentam similaridade com qualquer proteína de estrutura conhecida. A resolução da estrutura cristalográfica dessas proteínas poderia fornecer pistas importantes a respeito de sua função. Com o objetivo de obter essa estrutura, os cDNAs das duas isoformas da proteína TIPRL humana foram clonados em vetores de expressão em *E. coli*. A isoforma 1 foi expressa abundantemente na fração solúvel nas três construções testadas - fusão a GST, fusão a polihistidina (ambas no N-terminal) e sem fusão. Já a isoforma 2 foi expressa em corpos de inclusão nessas mesmas condições (dados não mostrados). Após extensas tentativas de cristalização da isoforma 1, foi adotada uma estratégia de deleção das extremidades como forma de eliminar possíveis regiões desestruturadas. A predição de estrutura secundária de TIPRL, feita com o programa PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), mostra a presença de α -hélices e fitas β intercaladas, e os extremos N- e C-terminais se apresentam sem estrutura definida (**Figura 1A**). Foram feitos mutantes com a deleção da região N-terminal (TIPRL Δ N), C-terminal (TIPRL Δ C) e o duplo mutante com ambas as deleções (TIPRL Δ NC) (**Figura 1B**). Esses mutantes foram expressos em *E.coli* em fusão a polihistidina. Aparentemente, a deleção do C-terminal perturbou demais a estrutura da proteína já que ambos os mutantes contendo essa

deleção foram expressos quase totalmente na fração insolúvel. Já o mutante com a deleção do N-terminal foi abundantemente expresso na fração solúvel (**Figura 1C**). Esse mutante foi purificado por cromatografia de afinidade a níquel seguida de gel filtração (**Figura 2A, B**) e foi submetido a extensos testes de cristalização. Foram obtidos pequenos cristais em uma condição contendo acetato de sódio 100 mM pH 4.5; 30% PEG 8000 (v/w); 200 mM Li_2SO_4 , com a proteína a 12 mg/mL (**Figura 2C**). Após um ciclo de otimização dessas condições, foram obtidos cristais com a proteína a 2 mg/mL em acetato de sódio 100 mM pH 5,5; 35% PEG 8000 (v/w) e 200 mM Li_2SO_4 . (**Figura 2D**). A coloração com *Iziti* (Hampton) confirmou que os cristais obtidos nesta última condição são de proteína (**Figura 2E**), mas não foi possível obter um padrão de difração, provavelmente por se tratar de um aglomerado de microcristais. Esses cristais se encontram atualmente em fase de otimização com o objetivo de produzir monocristais apropriados para a obtenção de um padrão de difração.

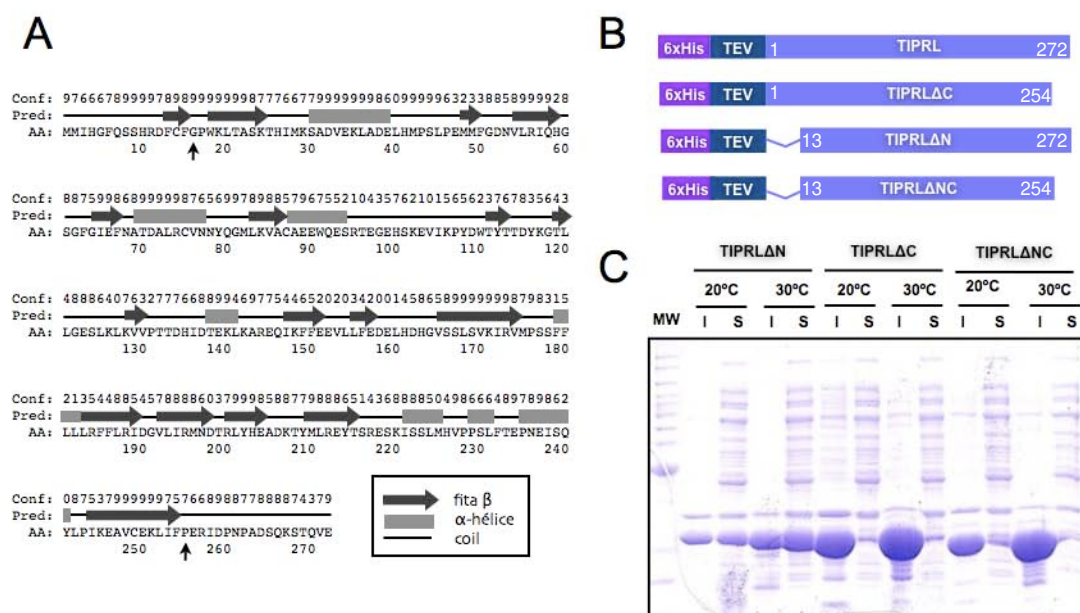


Figura 1. (A) Predição de estrutura secundária da isoforma 1 da proteína TIPRL humana, feita com o programa PSIPRED. Os sítios onde foram feitas as deleções são marcados com setas verticais. **(B)** Representação esquemática das construções TIPRL (sequência completa), TIPRLΔN, TIPRLΔC e TIPRLΔNC no vetor pET-TEV, feito a partir do pET28a com a troca do sítio de trombina por TEV. Os resíduos de aminoácido de início e fim de cada construção são indicados. **(C)** Análise por SDS-PAGE dos testes de expressão das construções TIPRLΔN, TIPRLΔC e TIPRLΔNC em *E. coli* BL21(DE3). As expressões foram feitas com IPTG 0,5 mM por 4 horas a 20°C ou 30°C. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em tampão de lise e tratadas com lisozima. As frações solúveis (S) correspondem aos sobrenadantes da centrifugação dos lisados a 20000 g por 10 minutos a 4°C. A fração insolúvel (I) corresponde aos corpos de inclusão, obtidos após lavagens do precipitado da centrifugação em tampão de lise contendo Triton X-100 (1%). Observa-se que TIPRLΔN foi expressa na fração solúvel e nos corpos de inclusão nas duas temperaturas testadas, com maior rendimento a 30°C. Já TIPRLΔC e TIPRLΔNC foram obtidas quase exclusivamente nos corpos de inclusão nas duas temperaturas testadas, também apresentando maior rendimento a 30°C.

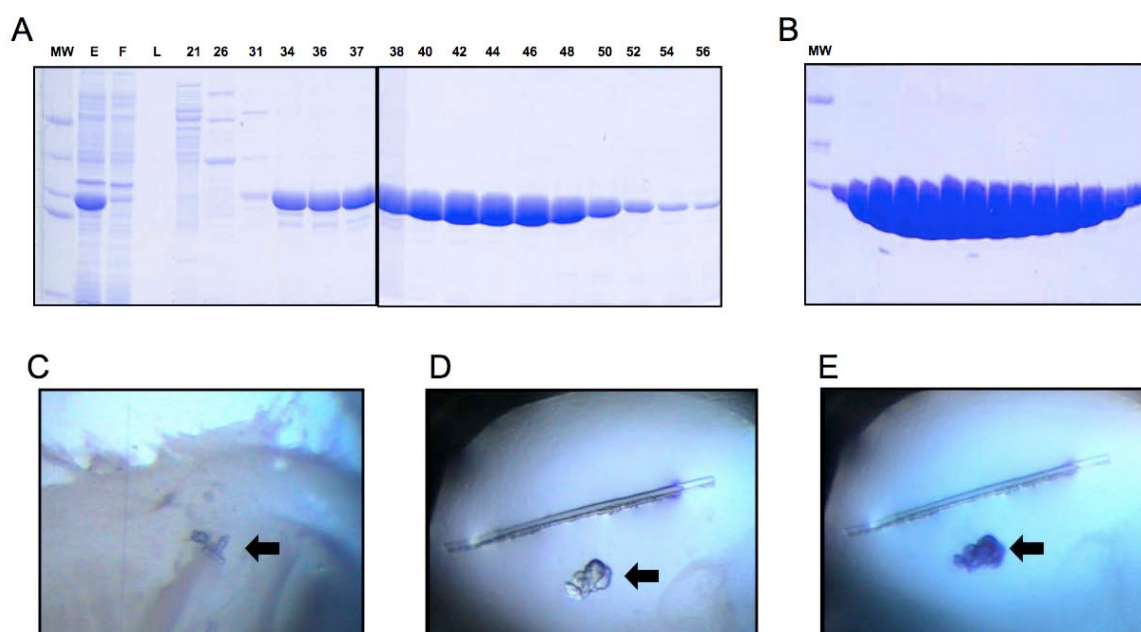


Figura 2. (A) Análise por SDS-PAGE da purificação de TIPRLΔN por cromatografia de afinidade em resina de níquel usando uma coluna HisTrap de 5 mL. MW: marcador de massa molecular, E: extrato, F: *flowthrough*, L: lavagem. Os números correspondem a frações obtidas na eluição com um gradiente de imidazol. **(B):** As frações 36 a 52 mostradas em A foram submetidas a uma cromatografia de gel-filtração em coluna Superdex 75 16/60. As frações correspondentes ao pico de eluição de TIPRLΔN foram analisadas por SDS-PAGE. **(C)** Microcristal obtido por difusão de vapor no tampão acetato de sódio 100 mM pH 4.5; 30% PEG 8000 (v/w); 200 mM Li₂SO₄, com a proteína a 12 mg/mL. **(D)** Produto de otimização da condição mostrada em C, com a proteína a 2 mg/mL em acetato de sódio 100 mM pH 5,5; 35% PEG 8000 (v/w) e 200 mM Li₂SO₄. **(E)** A gota mostrada em E foi corada com *Izit* (Hampton), corante específico para cristais de proteína. Em C, D e E, os cristais de TIPRLΔN são apontados com setas.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada **Caracterização das proteínas TIPRL e $\alpha 4$, reguladoras de fosfatases 2A:**

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) está inserido no **Projeto CIBio/ABTluS** (Protocolo nº NITZ 6.3), intitulado Análise da regulação das proteínas $\alpha 4$ e Tip41, envolvidas na via de sinalização sensível a rapamicina;

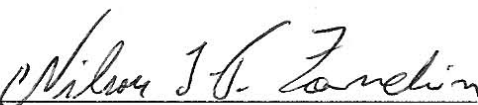
() tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.

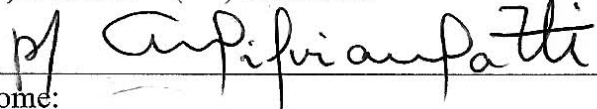
Especificar: _____


Aluna: Juliana Helena Costa Smetana


Orientador: Nilso Ivo Tonin Zanchin

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido


Nome: _____

Função: _____

Prof. Dra. HELENACOUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP