



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA AMÉLIA SANCHEZ IACIA

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA TIPRL COM FOSFATASES
TIPO 2A EM CULTURA DE CÉLULAS**

CAMPINAS

2021

ANA AMÉLIA SANCHEZ IACIA

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA TIPRL COM FOSFATASES
TIPO 2A EM CULTURA DE CÉLULAS**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: DRA. JULIANA HELENA COSTA SMETANA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA AMÉLIA SANCHEZ IACIA, E ORIENTADA PELA DRA. JULIANA HELENA COSTA SMETANA.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

la1c Iacia, Ana Amélia Sanchez, 1985-
Caracterização da interação da proteína TIPRL com fosfatases tipo 2A em cultura de células / Ana Amélia Sanchez Iacia. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Juliana Helena Costa Smetana.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fosfatases. 2. Proteína TIPRL humana. I. Smetana, Juliana Helena Costa, 1983-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of the interaction of the TIPRL protein with type 2A phosphatases in cell culture

Palavras-chave em inglês:

Phosphatases

TIPRL protein, human

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Juliana Helena Costa Smetana [Orientador]

Daniel Maragno Trindade

Luis Antônio Peroni

Matheus de Castro Fonseca

Fabio Cesar Gozzo

Data de defesa: 25-05-2021

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4419-1286>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2001008428616851>

Campinas, 25 de maio de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana Helena Costa

Prof. Dr. Daniel Maragno Trindade

Prof. Dr. Luís Antônio Peroni

Prof. Dr. Matheus de Castro Fonseca

Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp.

Dedico esta tese a minha família, meus filhos, Samuel e Daniel, que são a minha fonte infindável de força, inspiração e resiliência e ao meu esposo Paulo pelo companheirismo.

DEDICO

A minha orientadora amiga Dra. Juliana pela confiança, suporte e amizade.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Juliana Helena Costa Smetana pela excelente orientação, amizade e carinho nesses 5 anos juntas.

Ao Dr. Egon Ogris pela valiosa orientação a essa pesquisa durante o período de estágio BEPE-FAPESP na Universidade Médica de Viena.

A Dra. Ingrid Frohner pela valiosa coorientação durante o estágio BEPE/FAPESP.

A Universidade de Campinas (Unicamp) e a Universidade Médica de Viena (MedUni Vienna) pela acessibilidade as dependências, assim como pela assistência dos seus respectivos funcionários.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos no Brasil (Processo FAPESP: 2016/12560-9) e a bolsa de estudos no exterior BEPE-FAPESP (Processo BEPE-FAPESP: 2018/09337-1).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao CNPEM pelo acolhimento e disposição de material, facilites e apoio dos seus colaboradores para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Instituto Max Perutz Labs Vienna pelo período de estágio BEPE-FAPESP por disponibilizar os recursos necessários para a conclusão do projeto de colaboração.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Jörg Kobarg, Dr. Celso Eduardo Benedetti e Dr. Daniel Maragno Trindade pelas valiosas sugestões para o desenvolvimento deste projeto.

Aos membros da banca da defesa da tese pela disponibilidade em colaborar para o enriquecimento deste manuscrito.

A todos funcionários e estagiários do CNPEM pelo apoio e amizade, principalmente ao grupo da Dra. Juliana H. C. Smetana e ao grupo do Dr. Artur Torres Cordeiro.

A todos os professores, funcionários e estagiários da Unicamp pelos ensinamentos e cooperação, especialmente do Instituto de Biologia (IB).

As colegas de laboratório Mariana Piccolli Gonçalves, Tatiani Brenelli de Lima, Valéria Scorsato e Nadia Rasheed colaboração na execução dos experimentos, pela doce amizade e pelo suporte emocional nas horas difíceis.

A todos os meus muitos amigos que conheci durante essa jornada e sempre torceram por mim.

A toda a minha família que sempre me apoiou e acreditou em mim, principalmente aos meus pais Rosa Gavira Sanchez Iacia e Oswaldo Iacia, a minha avó Aparecida Polizel Iacia e aos meus tios Dalva Iassia e Reinaldo, a todos vocês minha eterna gratidão.

Ao meu esposo Paulo E. P. Merino, cujo suporte, perseverança e amor me trouxeram até aqui.

E por fim, especialmente, aos meus dois queridos filhos, Samuel e Daniel, vocês são a razão da minha vida e da minha luta. Eu amo vocês.

RESUMO

TIPRL (TOR Signaling Pathway Regulator-like) é uma proteína reguladora que interage com as subunidades catalíticas das fosfatases do tipo 2A (PP2A, PP4 e PP6), um conjunto de fosfatases de fosfoserina e fosfotreonina que responde por grande parte dos eventos de desfosforilação intracelulares. Essas fosfatases regulam vários processos celulares, como apoptose, resposta a danos no DNA e divisão celular, e PP2A é um importante supressor tumoral, regulando negativamente diversas vias de sinalização oncogênicas. TIPRL é superexpressa em diversos carcinomas humanos e possivelmente exerce uma função pró-tumoral através da inibição de PP2A por mecanismos ainda pouco compreendidos. TIPRL apresenta um enovelamento único com uma fenda conservada na qual se liga a cauda carboxiterminal conservada da subunidade catalítica da PP2A (PP2Ac), e presumivelmente também de PP4c e PP6c que apresentam similaridade de sequência com PP2Ac nessa região. Essa cauda abriga dois sítios de fosforilação (T304 e T307) e um de carboximetilação (L309), onde sofre modificações pós-traducionais reversíveis que regulam o recrutamento seletivo de subunidades regulatórias. A fosforilação inibe a PP2Ac e prejudica a formação da holoenzima ativa, que é composta por uma subunidade de ancoragem (PR65/A) e um subconjunto de subunidades regulatórias (B, B', B'' e striatinas). Já a metilação é necessária para o recrutamento de algumas subunidades tipo B. TIPRL inibe a atividade de PP2A *in vitro*, porém o mecanismo de regulação de PP2A por TIPRL na célula ainda não foi elucidado. Mais especificamente, a consequência funcional dessas modificações na interação com TIPRL ainda é desconhecida. Neste trabalho, examinamos a interação entre PP2Ac e TIPRL usando linhagens celulares que expressam de forma estável (NIH/3T3 e N2a), ou transiente (HEK293T), mutantes fosfomiméticos e suas respectivas contrapartes não fosforiláveis, assim como mutantes da leucina no C-terminal da PP2Ac que impedem a carboximetilação. Em análises de imunoprecipitação e *Western blot*, observamos que a interação de TIPRL é extremamente sensível às mutações no C-terminal da PP2Ac, e também ao pH. A mutação fosfomimética T304D aumentou significativamente a interação de TIPRL com PP2Ac, já as mutações Y307F, Y307E e L309Δ aboliram completamente a interação. TIPRL interagiu exclusivamente com a versão não metilada da PP2Ac. A superexpressão de TIPRL diminuiu a interação de PP2Ac com a subunidade B em células transfectadas transientemente, mas esse resultado não se reproduziu em linhagens estáveis. Foram analisadas ainda as interações de mutantes da TIPRL com as fosfatases PP2Ac, PP4c e PP6c. Esses mutantes foram selecionados por seu potencial de abolir a interação com a cauda da PP2Ac, porém, alguns deles surpreendentemente tiveram ganho de interação com PP4c e PP6c. As linhagens estáveis desenvolvidas neste trabalho permitiram analisar a interação de TIPRL e PP2Ac de forma semiquantitativa e reprodutível. A preferência de TIPRL pela versão não metilada de PP2Ac e pelo mutante fosfomimético é T304D condizente com um papel de TIPRL nas etapas iniciais da biogênese da PP2A.

Palavras-chave: TIPRL, PP2A, PP4, PP6, serina/treonina fosfatases, fosforilação, carboximetilação, supressor tumoral, biogênese.

ABSTRACT

TIPRL (TOR Signaling Pathway Regulator-like) is a regulatory protein that interacts with the catalytic subunits of type 2A phosphatases (PP2A, PP4 and PP6), a set of phosphoserine and phosphothreonine phosphatases that accounts for a large part of intracellular dephosphorylation events. These phosphatases regulate several cellular processes, such as apoptosis, DNA damage response and cell division, and PP2A is an important tumor suppressor, negatively regulating several oncogenic signaling pathways. TIPRL is overexpressed in several human carcinomas and possibly exerts a pro-tumor function through the inhibition of PP2A by mechanisms that are still poorly understood. TIPRL presents a unique folding with a conserved cleft which binds the conserved carboxyterminal tail of the catalytic subunit of PP2A (PP2Ac) and presumably also of PP4c and PP6c that show sequence similarity with PP2Ac in that region. This tail harbors two phosphorylation sites (T304 and T307) and one carboxymethylation site (L309), where it undergoes reversible post-translational modifications that regulate the selective recruitment of regulatory subunits. Phosphorylation inhibits PP2Ac and impairs the formation of the active holoenzyme, which is composed of a scaffold subunit (PR65/A) and a subset of regulatory subunits (B, B', B'' and striatins). Methylation is necessary for the recruitment of some B-type subunits. TIPRL inhibits PP2A activity in vitro, but the mechanism for PP2A regulation by TIPRL in the cell has not yet been elucidated. More specifically, the functional consequence of these modifications in the PP2Ac interaction with TIPRL is still unknown. In this study, we examined the interaction between PP2Ac and TIPRL in cell lines using stable (NIH-3T3 and N2a), or transient expression (HEK293T), of phosphomimetic mutants and their respective non-phosphorylatable counterparts, as well as deletion of the C-terminal leucine which prevents carboxymethylation. In immunoprecipitation and Western blot analyses, we observed that the TIPRL interaction is extremely sensitive to mutations in the C-terminal of PP2Ac, and also to pH. The T304D phosphomimetic mutation significantly increased the TIPRL interaction with PP2Ac, whereas Y307F, Y307E and L309 Δ mutations completely abolished the interaction. TIPRL interacted exclusively with the non-methylated version of PP2Ac. TIPRL overexpression decreased the interaction of PP2Ac with B subunit in transiently transfected cells, but this result did not reproduce in stable cell lines. The interactions of TIPRL mutants with PP2Ac, PP4c and PP6c were also analyzed. These mutants were selected for their potential to abolish the interaction with the PP2Ac tail, however, some of them surprisingly have gained interaction with PP4c and PP6c. The stable lines developed in this study allowed us to analyze the TIPRL - PP2Ac interaction in a semi-quantitative and reproducible way. The preference of TIPRL for the non-methylated version of PP2Ac and for the phosphomimetic mutant is T304D consistent with a role of TIPRL in the early steps of PP2A biogenesis.

Keywords: TIPRL, PP2A, PP4, PP6, serine/threonine phosphatases, phosphorylation, carboxymethylation, tumor suppressor, biogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Similaridade de sequência das fosfatases da família PPP.....	19
Figura 2. Esquema representativo da holoenzima da PP2A.....	22
Figura 3. Estrutura cristalográfica do heterotrímero AB'C da PP2A ligado ao inibidor microcistina (PDB: 2IAE).....	25
Figura 4. Mudança conformacional da estrutura da subunidade A α sozinha (cinza) e no complexo trimérico (azul), com vistas frontal e superior.....	25
Figura 5. Estruturas do core da PP2A (subunidades A e C) e três diferentes composições da holoenzima (core e uma das possíveis subunidades regulatórias).....	27
Figura 6. Representação das modificações pós-traducionais no extremo C-terminal 304TPDYFL309 da PP2Ac.....	29
Figura 7. Interação entre proteínas quinases CDK1, AURKA, AURKB e Plk1 e fosfatases regulando a progressão mitótica.....	32
Figura 8. A biogênese da holoenzima da PP2A.....	33
Figura 9. Representação da estrutura da fosfatase PP4.....	37
Figura 10. Representação da estrutura da PP6.....	39
Figura 11. Estrutura da TIPRL.....	41
Figura 12. Estrutura geral da holoenzima da PP2A, composta pela subunidade catalítica C, TIPRL e a subunidade de ancoragem A.....	43
Figura 13. Alterações de TIPRL em tumores humanos de acordo com informações disponíveis no banco de dados cbioportal (http://www.cbioportal.org).....	47
Figura 14. Frequência de mutações nas subunidades da PP2A.	48
Figura 15. Genes envolvidos em vias que causam a transformação celular.....	49
Figura 16. Interações e atividade enzimática dos mutantes da PP2A co-transfectados com TIPRL.....	65
Figura 17. Análise dos níveis de expressão no extrato celular total (WCE) de duas linhagens celulares diferentes de clones estáveis de PP2A.....	67
Figura 18. Análise da expressão dos clones estáveis da coexpressão da Myc-TIPRL e HA-PP2A.....	69
Figura 19. Padronização da transfecção do esiRNA-GFP e esiRNA-TIPRL em células HEK293 com pcDNA-FLAG-GFP e pcDNA-FLAG-PP2Ac.....	72
Figura 20. Diferenciação de células Neuro2A pelo tratamento de estresse nutricional (soro fetal bovino 0,1%) não alterou a interação da TIPRL-PP2Ac.....	74

Figura 21. A interação da TIPRL com a PP2A é sensível ao pH.....	75
Figura 22. Expressão da TIPRL, PP2A, PP4c e PP6c endógenas em dez linhagens celulares.....	78
Figura 23. Mutantes da TIPRL e suas interações.....	81
Figura 24. Coexpressão da PP2Ac WT com a TIPRL WT e mais uma série de mutantes.....	83
Figura 25. Imunofluorescência (IF) de células NIH/3T3 estavelmente expressando as proteínas HA-PP2A, Myc-TIPRL e o controle vazio (<i>empty vector</i>), em três diferentes fases mitóticas.....	86
Figura 26. Estrutura do trímero TIPRL-PP2Ac-A com a subunidade A representada como superfície de potencial eletrostático.....	124
Figura 27. Comparação entre a conformação do C-terminal da PP2Ac (rosa) e subunidade A (azul) em complexo com a subunidade B56 γ 1 (<i>B56 bound</i> , PDB:2IAE) e com TIPRL (<i>TIPRL bound</i> , PDB:5W0W).....	126
Figura 28. TIPRL é sensível a modificações pós-traducionais na cauda C-terminal da subunidade catalítica da PP2A.....	127

Capítulo 3

Figure 1. TIPRL interactions in transient and stable TIPRL-expressing cells. Immunoprecipitates (IP) and lysates (WCE) were resolved by SDS-PAGE and detected with the indicated antibodies.....	106
Figure 2. Interaction of PP2Ac C-terminal mutants with TIPRL and other endogenous PP2Ac interacting proteins.....	108
Figure 3. Impact of stable overexpression of Myc-TIPRL on the post-translational modifications and interactions of HA-PP2Ac.....	110
Figure S1. Validation of the phospho-specificity of p-T304 antibody.....	111
Figure S2. PP2Ac interaction with TIPRL, but not with α 4, PR65/A and B55 α , is sensitive to high pH.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição detalhada das diferentes isoformas das subunidades regulatórias do tipo B da fosfatase PP2A.....	23
Tabela 2. Competência de metilação da PP2A WT e mutantes e a capacidade de ligação com quatro isoformas da subunidade B da PP2A.	30
Tabela 3. Mutantes da subunidade catalítica da PP2A, localização na subunidade e possível ação na biogênese.....	52
Tabela 4. Mutantes da TIPRL, localização e fenótipo esperado.....	53
Tabela 5. Descrição das linhagens celulares utilizadas neste estudo.....	54
Tabela 6. Tabela dos anticorpos utilizados nos experimentos de imunolocalização (IF) e <i>Western blot</i> (WB).....	58
Tabela 7. Proposta de como a TIPRL interage com a subunidade catalítica da PP2A sob influência de modificações pós-traducionais específicas nos resíduos T304 e L309 na cauda C-terminal	128

Capítulo 3

Table 1. Quantification of the interactions of endogenous TIPRL and B55 α with PP2Ac WT and C-terminal mutants and methylation levels of these mutants.....	100
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

α4	Proteína alpha 4	<i>Alpha4 protein</i>
ABCB1	Cassete de ligação de ATP subfamília B membro 1	<i>ATP binding cassette subfamily B member 1</i>
AKT	Proteína quinase B	<i>Protein kinase B</i>
AMPK	Adenosina Monofosfato	<i>Adenosine monophosphate-activated protein</i>
BSA	Albumina de soro bovino	<i>Bovine serum albumin</i>
Cdc25	Tirosina fosfatases do ciclo de divisão celular 25	<i>Cell division cycle tyrosine phosphatases 25</i>
Cdc6	Ciclo de divisão celular 6	<i>Cell division cycle 6</i>
Cdk	Quinases dependentes de ciclina	<i>Cyclin dependent kinases</i>
CIP2A	Inibidor celular de PP2A	<i>Cellular inhibitor of PP2A</i>
c-Myc	Proto-oncogene MYC, fator de transcrição bhlh	<i>MYC proto-oncogene, bhlh transcription factor</i>
CTTNBP	Proteína de ligação à cortactina	<i>Cortactin-binding protein</i>
DiFMUP	6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato	<i>6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl phosphate</i>
DNA-PK	Proteína quinase dependente de DNA	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
eIF2α-ATF	Subunidade α do fator de iniciação da tradução eucariótica 2	<i>α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2</i>
ERK	Quinases extracelulares reguladas por sinal	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
ERα	Receptor de estrógeno alfa	<i>Estrogen receptor alpha</i>
FOXO1	Fatores de transcrição forkhead	<i>Forkhead box protein O1</i>
GFPT2	Glutamina-frutose-6-fosfato aminotransferase 2	<i>Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase 2</i>
H2A	Histona H2A	<i>Histone H2A</i>
HEAT	Huntingtina-elongação-a subunidade-tor	<i>Huntingtin-elongation-a subunit-tor</i>
HPV	Papilomavírus humano	<i>Human Papilloma Virus</i>
HTERT	Transcriptase reversa da telomerase humana	<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>

IP	Imunoprecipitação	<i>Immunoprecipitation</i>
JNK	Quinase C-jun N-terminal	<i>C-jun N-terminal kinase</i>
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em tandem	<i>Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i>
LCMT1	Leucina carboxil metiltransferase 1	<i>Leucine carboxyl methyltransferase 1</i>
MAP4K4	Proteína quinase quinase quinase quinase ativada por mitogênio	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4</i>
MCM3AP	Proteína associada a proteína 3 de manutenção do minicromossomo	<i>Minichromosome maintenance complex component 3 associated protein</i>
MEK	Proteína quinase Serina/treonina específica para meiose	<i>Meiosis-specific serine/threonine-protein kinase</i>
MKK7	MAP quinase quinase 7	<i>MAP kinase kinase 7</i>
MTCL1	Fator de reticulação de microtúbulo 1	<i>Microtubule crosslinking factor 1</i>
mTORC1	Alvo do complexo 1 de rapamicina de mamífero	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
MYBL2 S-241	MYB proto-oncogene 2	<i>MYB proto-oncogene like 2</i>
N2a	Linhagem celular neuronal neuro2a	<i>Neuronal cell line</i>
p53	TP53 ou proteína de tumor	<i>TP53 protein</i>
p53 shRNA	Nocaut de proteína de p53	<i>p53 protein knockdown</i>
PAK1	Serina / treonina-proteína quinase PAK 1	<i>Serine/threonine-protein kinase PAK 1</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PEI	Polietilenimina	<i>Polyethyleneimine</i>
PI(3)K	Fosfoinosítido 3-quinase	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PME-1	Proteína metilesterase 1	<i>Protein phosphatase methylesterase 1</i>
pNPP	Para-nitrofenilfosfato	<i>Para-nitrophenylphosphate</i>
PP1	Proteína fosfatase 1	<i>Protein phosphatase 1</i>
PP2A	Proteína fosfatase 2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
PP2Ac	Subunidade catalítica da PP2A	<i>Catalytic subunit of PP2A</i>
PP4	Proteína fosfatase 4	<i>Protein phosphatase 4</i>

PP6	Proteína fosfatase 6	<i>Protein phosphatase 6</i>
PPP	Fosfoproteína fosfatase	<i>Phosphoprotein phosphatase</i>
PTPA	Ativador de proteína serina/treonina fosfatase 2A	<i>Serine/threonine protein phosphatase 2A activator</i>
RAC1	Família RAC GTPase 1	<i>Rac GTPase 1 family</i>
Ras	Vírus do sarcoma de rato	<i>Rat Sarcoma virus</i>
Rb shRNA	Nocaute de proteína de retinoblastoma	<i>Retinoblastoma protein knockdown</i>
S6K	Proteína ribossomal S6 quinase beta-1	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>
SAM	S-adenosilmetionina	<i>S-adenosylmethionine</i>
SET	SET nuclear proto-oncogene	<i>SET nuclear proto-oncogene</i>
SFB	Soro fetal bovino	<i>Fetal bovine serum</i>
Sgo	Proteína semelhante a shugoshin 1	<i>Shugoshin-like 1 protein</i>
shRNA	RNA em grampo curto	<i>Short hairpin RNA</i>
SMN	Proteína de sobrevivência de motoneurônio	<i>Survival motor neuron protein</i>
SV40	Vírus símio 40	<i>Simian virus 40</i>
TBS	Solução salina tamponada com tris	<i>Tris-buffered saline</i>
TIPRL	Regulador de via de sinalização TOR	<i>TOR signaling pathway regulator</i>
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF	<i>Tnf-related apoptosis-inducing ligand</i>
WCE	Extrato celular total	<i>Whole cell extract</i>
γ-H2AX	Membro da família X das histonas gamma-h2a	<i>Gamma-h2a histone family member X</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 A fosfatase PP2A.....	18
1.1.1 A estrutura da PP2A é a base para a sua atividade.....	24
1.1.2 Modificações pós-traducionais na cauda C-terminal da subunidade catalítica da PP2A (PP2Ac) 28	
1.2 O processo de biogênese da PP2A	32
1.3 Proteínas fosfatases PP4 e PP6.....	35
1.3.1 Fosfatase PP4.....	35
1.3.2 Fosfatase PP6.....	38
1.4 TIPRL.....	40
1.4.1 Papel da PP2A e TIPRL no câncer.....	45
2. OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivos específicos.....	50
3. METODOLOGIA	51
3.1 Técnicas de DNA recombinante e mutagênese.....	51
3.2 Cultura de células de mamíferos	53
3.3 Transfecção transiente e produção de clones estáveis	54
3.4 Imunoprecipitação e <i>Western blot</i>	56
3.5 Ensaio de atividade da fosfatase PP2A.....	59
3.6 Ensaios de imunolocalização	60
3.7 Diferenciação de células Neuro2A (N2a).....	61
3.8 Análise de dados.....	62
4. RESULTADOS	63
Capítulo 1	63
Superexpressão e teste de atividade da PP2A selvagem e mutantes.....	63
4.1 Expressão da PP2A em transfecções transientes	64
4.2 Expressão da PP2A em clones estáveis	66
4.3 Estabelecimento de um sistema de coexpressão de PP2Ac e TIPRL	68
4.4 Silenciamento da TIPRL.....	70
4.5 Status da TIPRL após diferenciação em linhagem neuronal (Neuro2A)	73
4.6 A interação de TIPRL com PP2Ac é sensível ao pH.....	74
Capítulo 2	77
Expressão da TIPRL em diferentes linhagens e sua interação com as fosfatases PP4 e PP6.....	77
4.7 Expressão da TIPRL endógena em diferentes linhagens celulares	78

4.8 Impacto de mutações de TIPRL na interação com PP2Ac, PP4c e PP6c.....	79
4.9 Imunolocalização da PP2Ac e TIPRL	85
Capítulo 3	88
Abstract	89
Introduction	91
Materials and methods	93
Results	96
Discussion.....	101
Figure Legends	106
References.....	112
5. DISCUSSÃO.....	116
5.1 Estudos da interação dos mutantes da PP2Ac com TIPRL	116
5.2 Interação de mutantes da TIPRL com PP2Ac, PP4c e PP6c.....	119
5.3 Expressão endógena de TIPRL e fosfatases 2A em diferentes linhagens	121
5.4 Um possível mecanismo para a atuação de TIPRL na desmontagem das holoenzimas....	122
6. CONCLUSÕES.....	130
7. BIBLIOGRAFIA.....	131
8. ANEXOS.....	143
8.1 Declaração de que o trabalho não versou sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais, patrimônio genético ou temas afetos a biossegurança	144
8.2 Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora	145

1. INTRODUÇÃO

1.1 A fosfatase PP2A

Cerca de um terço das proteínas celulares são reguladas por fosforilação reversível, que atua como ponto de checagem em várias atividades celulares tais como a divisão celular, crescimento e desenvolvimento, sobrevivência, proliferação e apoptose (Seshacharyulu et al, 2013).

A maioria dos processos celulares são controlados pelo balanço da fosforilação e desfosforilação respectivamente por meio de proteínas quinases e suas fosfatases correspondentes. Em humanos, são 512 genes que codificam proteínas quinases e além disso 70% de todas as proteínas eucarióticas são fosforiladas em resíduos de serina, treonina e tirosina (Haesen et al, 2014). Por sua vez, as fosfatases atacam o grupo fosfato, conjugado a esses resíduos, por catálise na presença de água e desfosforilam esses resíduos de aminoácidos através da remoção desse grupo fosfato (Seshacharyulu et al, 2013).

Em células eucarióticas, a fosforilação/desfosforilação ocorre principalmente no grupo hidroxil de resíduos de serina (86,4%), treonina (11,8%) e tirosina (1,8%). Em resíduos de serina e treonina, mais de 90% das desfosforilações são promovidas por proteínas fosfatases do tipo 2A (PP2A) e pela Proteína Fosfatase 1 (PP1) (Eichhorn et al, 2009).

As fosfatases 2A fazem parte da subfamília PPP e compreendem PP2Ac, PP4c e PP6c. Além da similaridade de sequência (Figura 1) e da capacidade de desfosforilar resíduos de serina e treonina, 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 de subunidade catalítica, que regula a associação de outras subunidades (Shi et al, 2009). Essas fosfatases apresentam uma ampla gama de substratos e atuam em vários processos celulares.

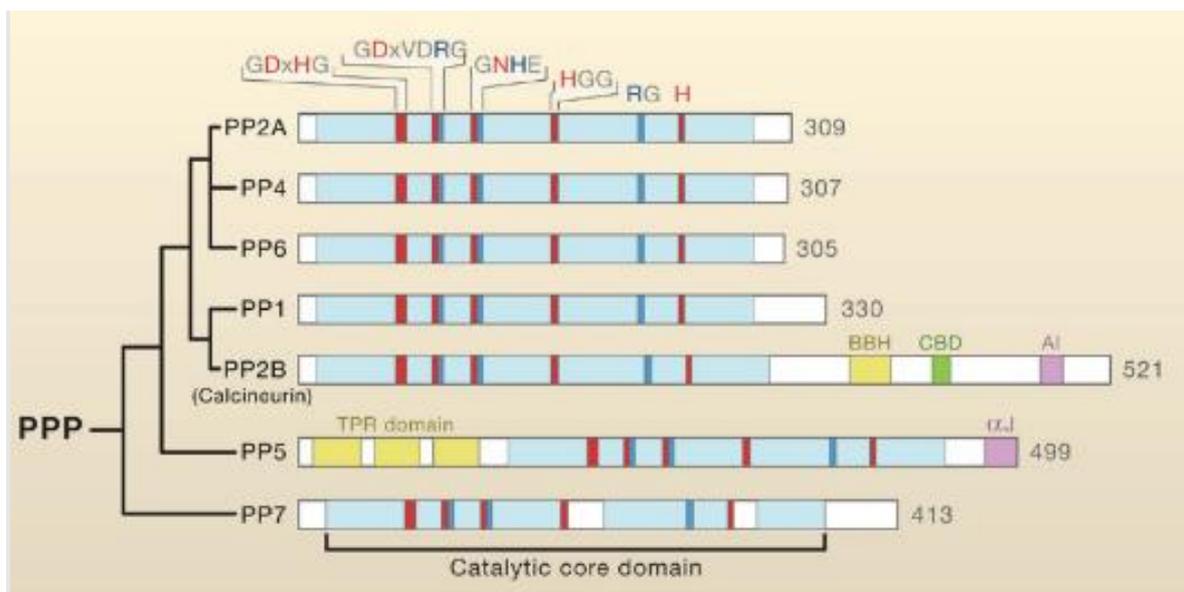


Figura 1. Árvore filogenética dos diferentes membros da família PPP de fosfatases. Esta família contém três *motifs* de sequência característicos dentro do domínio catalítico conservado de 30 kD: GDxHG, GDxVDRG e GNHE (G, glicina; D, ácido aspártico; x, qualquer aminoácido; H, histidina; V, valina; R, arginina; N, asparagina; E, ácido glutâmico) (Shi et al, 2009).

A PP2A é a principal fosfatase solúvel de fosfoserina e fosfotreonina em células animais, constituindo cerca de 1% do total das proteínas em células humanas e é altamente conservada desde levedura até humanos. Nas células pode ser encontrada em complexo com outras proteínas formando heterodímeros ou heterotrímeros e seu mecanismo regulatório é extraordinariamente complexo (Shi, 2009).

A enzima PP2A apresenta uma ampla gama de substratos que atuam em vários processos celulares, como a transcrição, tradução, proliferação e regulação direta do ciclo celular, na dinâmica do citoesqueleto, na mobilidade celular e apoptose (Shi et al 2009, Virshup 2000, Wurzenberger e Gerlich 2011, Seshacharyulu et al, 2013). Somente no

ciclo celular a PP2A possui mais de 300 substratos conhecidos (Wlodarchak e Xing, 2016). A PP2A também pode atuar no metabolismo celular regulando a atividade de enzimas envolvidas na glicólise, no metabolismo de lipídios e na síntese de neurotransmissores (catecolaminas) (Seshacharyulu et al, 2013).

Essa fosfatase é reconhecida por desempenhar o papel de supressor tumoral na célula. A desfosforilação promovida pela PP2A inibe os produtos de protooncogenes (c-Myc, quinase Akt/PKB e GTPase RalA, entre outros), assim como promove a ativação do supressor tumoral p53 (Sablina e Hahn, 2007; Reid et al, 2013). Além disso, sua inativação por mutações, antígenos tumorais virais, por pequenas moléculas como ácido ocadáico, ou por inibidores endógenos leva à formação de tumor (Bialojan e Takai, 1988; Pallas et al, 1990; Williams et al, 2019). Todas essas alterações na PP2A podem ocasionar a imortalização celular e, conseqüentemente, a transformação em células malignas (Janssens et al, 2005; Mumby, 2007).

Mutações e a expressão desordenada nas diversas subunidades que podem compor a holoenzima da PP2A estão presentes em vários tipos de câncer. Por desempenhar um forte papel no controle do ciclo celular, a PP2A pode induzir o crescimento destas células cancerígenas (Cho e Xu, 2007; Seshacharyulu et al, 2013, Gong et al, 2015, Goguet-Rubio et al, 2020). Alterações na PP2A também são observadas em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, onde a disfunção da PP2A eleva o grau de fosforilação na proteína Tau, cuja função é a estabilização dos microtúbulos (Sontag et al, 2014; Wei et al, 2020).

Outras doenças também estão relacionadas com o mau funcionamento da homeostase celular promovida pela PP2A, como o diabetes tipo 2 (Hojlund et al, 2002; Jayaraj et al, 2020), doenças cardíacas (DeGrande et al, 2013) e doenças inflamatórias

pulmonares como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Wallace et al, 2012; Nader et al, 2019).

A PP2A, típica de mamífero, é um heterotrímero formado por uma subunidade catalítica (C), uma subunidade de ancoragem (A) e uma subunidade regulatória (B) (Cho e Xu, 2006).

Cada uma das subunidades da holoenzima possui ao menos duas isoformas (Figura 2). A subunidade C possui as isoformas alfa e beta (PP2Ac α e PP2Ac β), assim como a subunidade A (PP2A-A α e PP2A-A β), sendo que em ambas a isoforma α é a mais abundante do que a isoforma β (Xing et al, 2006). Estas isoformas são produtos dos genes PPP2CA e PPP2CB, e PPP2R1A e PPP2R1B, respectivamente (Haesen et al, 2014; Stone et al, 1987). A subunidade catalítica α (PP2Ac α) apresenta ainda outra isoforma menor denominada PP2Ac α 2 originária de um splicing alternativo, esta é desprovida de atividade enzimática e não participa dos complexos ativos (Migueleti et al, 2012).

Em humanos, 15 diferentes genes codificam 23 isoformas das subunidades regulatórias do tipo B. São quatro famílias de isoformas dessas subunidades (B, B', B'' e B''') (Figura 2), estas podem ainda ser denominadas como B55, B56, PR72 e striatinas, respectivamente.

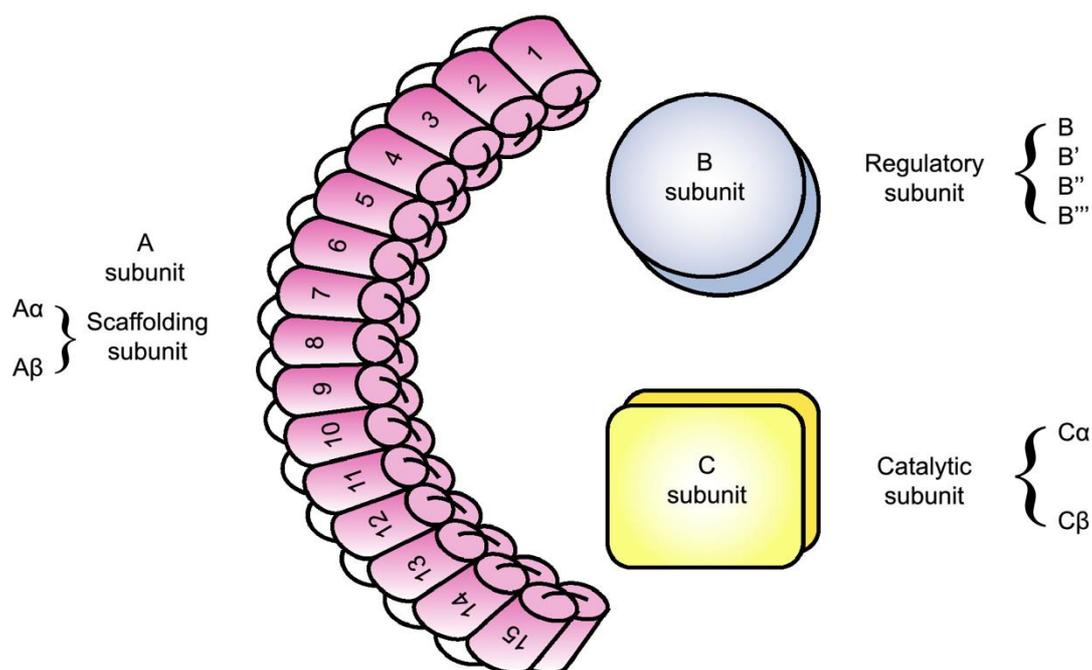


Figura 2. Esquema representativo das subunidades da holoenzima da PP2A. A PP2A apresenta-se em células de mamíferos como um heterotrímero formado por uma subunidade catalítica (C) e uma subunidade ancoradora (A), ambas com duas isoformas distintas de C (PP2A α e PP2A β) e A (PP2A A α e PP2A A β). A subunidade do tipo B é composta por quatro famílias diferentes (B, B', B'' e B''') que possuem uma ampla variedade de isoformas (Sangodkar et al, 2015).

As isoformas também podem ser denominadas por letras gregas ou por peso molecular aproximado. Por exemplo, as subunidades B (B55/PR55), B' (B56/PR61), B'' (PR48/PR72/PR130) e B''' (PR93/PR110), cada uma destas isoformas da subunidade B ainda possuem outras múltiplas isoformas codificadas por genes diferentes (α , β , γ , δ , ϵ) (Tabela 1). Inclusive, algumas isoformas têm outras múltiplas variantes de *splicing*, por exemplo a isoforma B' γ humana tem pelo menos três variantes diferentes chamadas de γ_1 , γ_2 e γ_3 (Shi, 2008).

Tabela 1. Descrição detalhada das diferentes isoformas das subunidades regulatórias do tipo B da fosfatase PP2A, suas principais características, substratos representativos, código de identificação da proteína no banco de dados Uniprot e código de referência da estrutura cristalográfica depositada no banco de dados PDB.

Subunidade	Gene	Tamanho	Localização	Substrato	Uniprot/PDB	Referência	
B	B55 α	PPP2R2A	55 kDa	Núcleo e citoplasma	AktT308, Tau, GFPT2, FOXO1, mTORC1	P63151 PDB: 3DW8	Li et al, 2018; Reid et al, 2013; Liu et al, 2011; Schmitz et al, 2010; Kuo et al, 2008; Xu et al, 2008.
	B55 β	PPP2R2B	55 kDa	Citoesqueleto e mitocôndria	Myc, S6K	Q00005	Tan et al, 2010
	B55 γ	PPP2R2C	55 kDa	Citoplasma	Tau, S6K	Q9Y2T4	Fan et al, 2013; Leong et al, 2020
	B55 δ	PPP2R2D	55 kDa	Citoplasma (mitose)	AMP quinase	Q66LE6	Castilho et al, 2009; Joseph et al, 2015
B''	B'' α	PPP2R3A	72 kDa	Núcleo	Wnt	Q06190 PDB: 4I5J	Wlodarchak et al, 2013; Chen et al, 2019
	B'' β	PPP2R3B	48 kDa	Núcleo	Cdc6	Q9Y5P8 PDB: 4MEW	Yan et al, 2000; Wlodarchak et al, 2013; Dovega et al, 2014
	B'' γ	PPP2R3C	53 kDa	Núcleo	MCM3AP, ABCB1	Q969Q6	Kamnasaran et al, 2005; Guran et al, 2019
B'	B56 α	PPP2R5A	56 kDa	Núcleo e citoplasma	c-Myc, Sgo	Q15172 PDB: 6NTS	McCright et al, 1996; Leonard et al, 2020
	B56 β	PPP2R5B	56 kDa	Citoplasma	Akt T-308, Akt S-473	Q15173	McCright et al, 1996; Rodgers et al, 2011; Rocher et al, 2007
	B56 γ 1 B56 γ 2 B56 γ 3	PPP2R5C	56 kDa	Núcleo	Cdc6, S6K, Akt, p53, TP53, ERK	Q13362 PDB: 2JAK	McCright et al, 1996, Hahn et al, 2010; Rocher et al, 2007; Nobumori et al, 2013
	B56 δ	PPP2R5D	56 kDa	Núcleo	TP53, ERK, Cdc25, CDK1	Q14738	McCright et al, 1996; Letourneux et al, 2006; Li et al, 2007; Forester et al, 2007
	B56 ϵ	PPP2R5E	56 kDa	Citoplasma	MTCL1, MYBL2 S-241	Q16537	McCright et al, 1996; Hyodo et al, 2016; Morita et al, 2020
B'''	STRN	PPP2R6A	86 kDa	Núcleo	Akt, CTTNBP	Q43815	Goudreault et al, 2009
	STRN3	PPP2R6B	87 kDa	Núcleo	ER α	Q13033 PDB: 6IUR	Tan et al, 2008; Tang et al, 2020
	STRN4	PPP2R6C	80 kDa	Citoplasma	MAP4K4	Q9NRL3	Wong et al, 2014

Portanto, essa diversidade de isoformas da PP2A é decorrente de diferentes promotores, *splicing* e sítios alternativos de início da tradução. Essas diferentes

subunidades A, B e C resultam em 92 diferentes configurações para a montagem do heterotrîmero, cada qual com atividade enzimática distinta e especificidade de substrato (Haesen et al, 2014). Porém, embora as sequências sejam altamente conservadas dentro da mesma família, essas subunidades regulatórias compartilham pouca similaridade de sequência entre as famílias, e seus níveis de expressão variam muito em diferentes tipos de células e tecidos (Shi, 2008).

1.1.1 A estrutura da PP2A é a base para a sua atividade

A diversidade de composição do heterotrîmero A-B-C é a base para a ampla gama de funções fisiológicas da PP2A. Especificamente, cada uma das subunidades do tipo B define qual o substrato e a localização subcelular da PP2A, formando uma grande diversidade de holoenzimas (Figura 3).

A subunidade catalítica C (36 kDa) é formada por uma estrutura globular e compacta composta por α -hélices e folhas β (Xing et al, 2006). Embora essa estrutura seja homóloga a outras subunidades catalíticas da família de fosfatases PPP, elas não são intercambiáveis entre si.

O sítio ativo da subunidade C contém dois átomos de manganês que interagem com o fosfato ligado aos resíduos de serina/treonina das proteínas substrato e o removem por hidrólise. O sítio ativo é posicionado longe das repetições HEAT da subunidade A e mais próximo ao sítio onde as subunidades B se ligam (Xing et al, 2006).

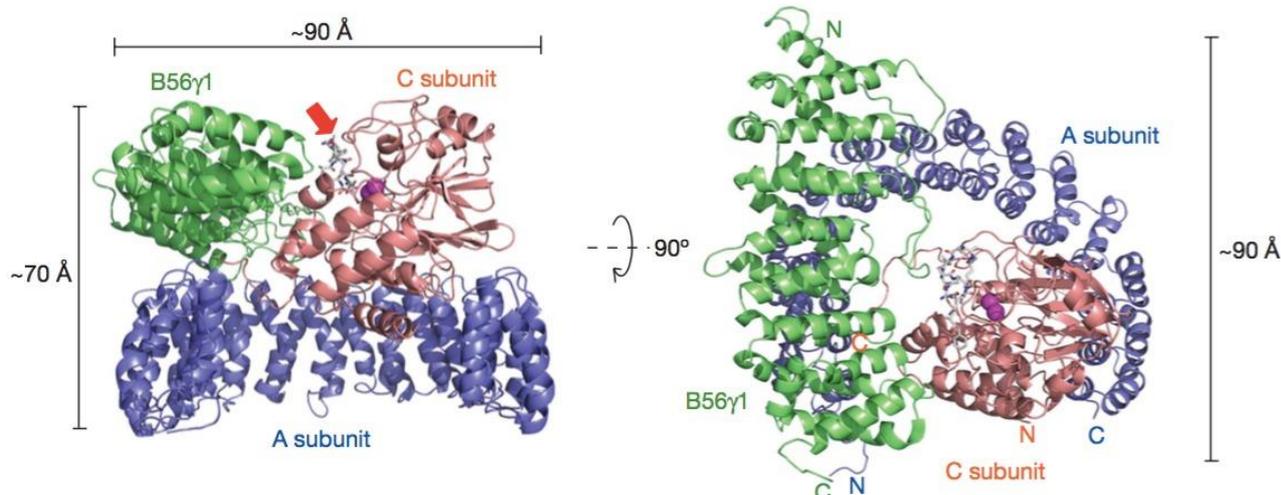


Figura 3. Estrutura cristalográfica do heterotrímero AB'C da PP2A ligado ao inibidor microcistina (PDB: 2IAE). A seta vermelha indica o sítio ativo com o inibidor (Cho e Xu, 2007).

O *core* da PP2A é um dímero formado pelas subunidades A e C (Figura 4). A estrutura da subunidade de ancoragem A (PR65/A, de 65 kDa) possui uma notável flexibilidade, que é um pré-requisito para a ligação às subunidades catalíticas e regulatórias B.

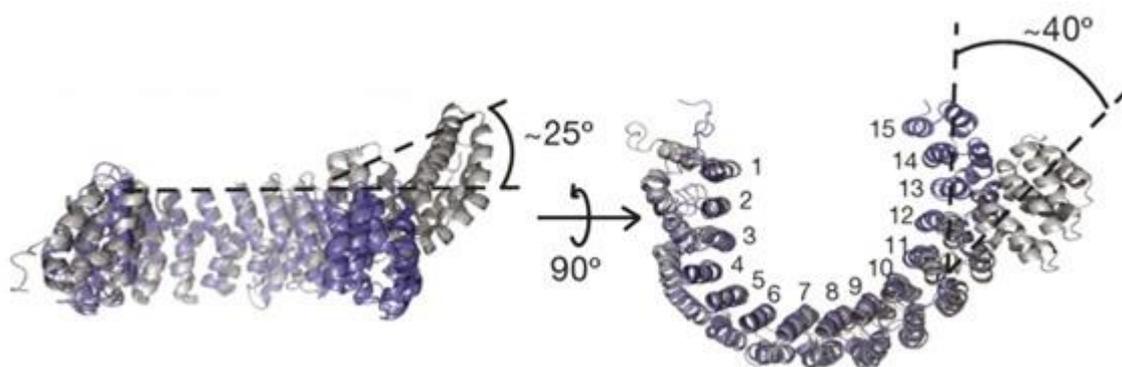


Figura 4. Mudança conformacional da estrutura da subunidade A α sozinha (cinza) e no complexo trimérico (azul), com vistas frontal e superior. Em complexo com as outras subunidades, os *loops* intra-repetição da subunidade A, que são responsáveis pela ligação das subunidades B e C, formam um semicírculo mais estreito do que aquele formado pelos *loops* inter-repetição. As mudanças conformacionais das repetições 11 a 15 são principalmente provenientes da mudança de interface entre as repetições 12 a 13 (Cho e Xu, 2007).

Estruturalmente, a subunidade A tem a forma de um solenoide e é formada por repetições do tipo HEAT (*Huntingtin-Elongation-A subunit-TOR*), são ao total 15 repetições HEAT que se reúnem para formar uma estrutura longa, curva e assimétrica que consiste inteiramente em hélices (Groves et al, 1999).

Cada repetição HEAT compreende um par de alfa hélices antiparalelas contendo 39 aminoácidos cada. A interação com a subunidade catalítica ocorre em uma das extremidades entre as repetições 11 a 15 da subunidade A (Xing et al, 2006; Groves et al, 1999), inclusive somente as repetições 11-15 já são suficientes para a interação. As subunidades B interagem na outra extremidade, próximas ao N-terminal, mutações nas repetições 4, 5 e 6 são suficientes para abolir a interação (Groves et al, 1999)

Quando livre, a subunidade A possui uma maior flexibilidade graças às repetições HEAT (Groves et al, 1999), todavia, quando ligadas à subunidade catalítica as repetições HEAT 13 a 15 são deslocadas em 20 a 30 Å (Figura 4), gerando uma drástica mudança entre as repetições HEAT 12 e 13 (Xing et al, 2006). Já quando a subunidade B é ligada ao *core* força as repetições HEAT do N terminal a girar e mover-se em até 50-60 Å (Cho e Xu, 2006, Xu et al, 2006).

Graças a essas mudanças estruturais são originadas, reorganizando assim o núcleo hidrofóbico entre e dentro das repetições HEAT. Foi observado inclusive que essa capacidade de flexibilidade da subunidade A permite uma melhor atividade de desfosforilação da subunidade catalítica por permitir um melhor direcionamento desta para o substrato (Cho e Xu, 2007, Xu et al, 2006).

Estruturalmente, cada família da subunidade B apresenta um enovelamento específico, sendo a família B (PR55) do tipo *beta-propeller/WD repeat* (PDB 3DW8, Xu et al, 2008). A família da subunidade B' (PR56) (PDB 2IAE, Cho e Xu, 2007) é formada por repetições do tipo *HEAT-repeat*. Já a família B'' (PR72) (PDB 4I5L, Wlodarchak et al,

2013) é formada por diferentes repetições de *motifs* funcionais, incluindo um *motif* hidrofóbico no N-terminal e dois *motifs* ligadores de cálcio do tipo *EF-hand*. As famílias da B' e B'' são proteínas alongadas formadas por estruturas repetitivas de alfa-hélices (Figura 5).

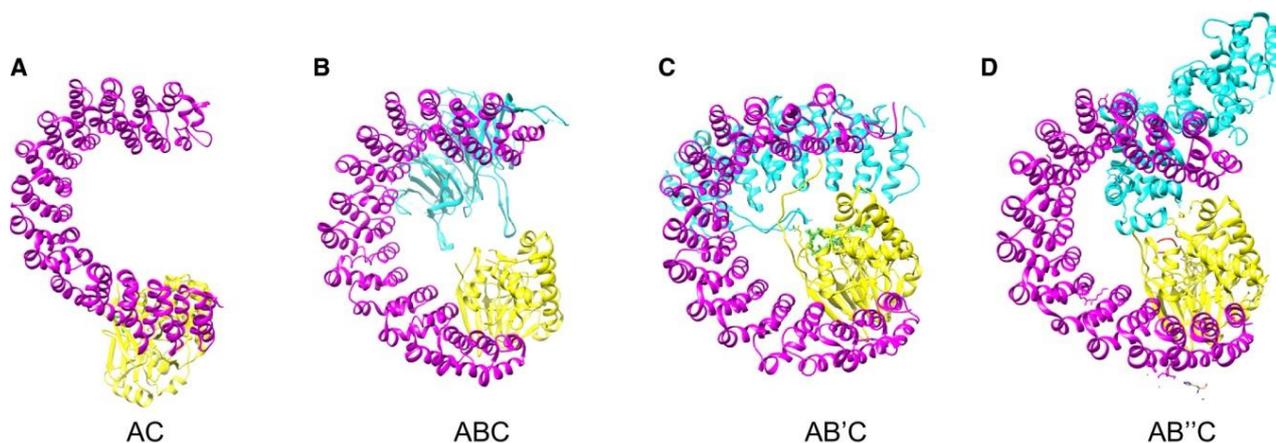


Figura 5. Comparação das estruturas do *core* da PP2A (subunidades A e C) e três diferentes composições da holoenzima (*core* e uma das possíveis subunidades regulatórias). (A) (PDB 2IE3) Subunidade A α (em roxo) e a subunidade C α (em amarelo). A subunidade C liga-se a A entre as repetições HEAT de 11 a 15. (B) (PDB 3DW8) Ligação da enzima *core* à subunidade da família PR55/B (em ciano), B α /PR55 α . Após a ligação da subunidade B à holoenzima, o seu sítio de ligação ao substrato ficará na face superior proximal ao sítio ativo da subunidade catalítica. (C) (PDB 2IAE) Ligação da enzima *core* à subunidade da família PR56/B' (em ciano), B γ 10/PR61 γ 1. (D) (PDB 4I5L) Ligação da enzima *core* à subunidade da família PR72/B'' (em ciano). A conformação resultante dessa holoenzima é mais larga e mais alta do que aquela que se forma com as subunidades B ou B' (Sangodkar et al, 2015).

As subunidades B''' são 3 proteínas multidomínio (STRN, STRN3 e STRN4) formadas por motivos *coiled-coil*, *WD repeats* e regiões desestruturadas, essas proteínas não possuem atividade catalítica e atuam como proteínas de ancoragem (Tan et al, 2008; Goudreault et al, 2009; Wong et al, 2014). Dessas três proteínas, somente STRN3 possui estrutura cristalográfica resolvida (Tang et al, 2020). Essas subunidades atuam principalmente em tecidos neurais e cardíaco e quando sua função é alterada são

relacionadas a diversas doenças, principalmente desordens neurológicas como transtorno do espectro autista (Hwang e Pallas, 2014).

De modo geral, as subunidades do tipo B confere à PP2A especificidade espacial e temporal, bem como na determinação de substrato de forma precisa. Por exemplo, a subunidade B' (B56) é específica para interagir com a proteína Shugoshin, mas não com as isoformas B (B55) ou B'' (PR72). Shugoshin é uma proteína centromérica necessária para a segregação adequada do genoma em meiose I (Kitajima et al, 2006, Riedel et al, 2006, Tang et al, 2006). Em contraste, a subunidade B, mas não B' ou B'', é responsável pela desfosforilação da proteína de ligação aos microtúbulos Tau, consistentemente, doenças neurodegenerativas são observadas na presença de mutação na B55 (Sontag et al, 2014; Xu et al, 2008).

1.1.2 Modificações pós-traducionais na cauda C-terminal da subunidade catalítica da PP2A (PP2Ac)

As subunidades da PP2A são controladas por meio de modificações pós traducionais por numerosas proteínas celulares as quais irão definir sua especificidade e função. Esta regulação é direcionada por meio de proteínas modulatórias, tais como PTPA, LCMT1 (Stanevich et al, 2011), PME1 (Xing et al, 2008), TIPRL (Scorsato et al, 2016, Wu et al, 2017) e $\alpha 4$, por meio da sequência $_{304}TPDYFL_{309}$ da cauda C-terminal da subunidade catalítica da PP2A (PP2Ac).

Esta sequência da PP2Ac contém dois resíduos-alvo de fosforilação, Treonina 304 (T304) e Tirosina 307 (Y307), e resíduo alvo sítio de carboximetilação na Leucina 309 (L309). Essa sequência e suas modificações pós-traducionais desempenham papel essencial na regulação da montagem dos heterotrímeros da PP2A na célula, sendo

responsáveis por recrutar seletivamente as subunidades regulatórias. Por meio de estruturas cristalográficas, foi observado que nessa sequência onde ocorrem interações com proteínas modulatórias como a LCMT1 (Stanevich et al, 2011), PME-1 (Xing et al, 2008) e TIPRL (Scorsato et al, 2016).

A metilação da L309 é um processo conservado, reversível e mediado pela enzima leucina metil transferase (LCMT1) e seu cofator S-adenosil metionina (SAM) (Figura 6). A doação do grupo metil para a L309 é intermediada por LCMT1 juntamente com o cofator SAM que produz o metil por meio do nutriente folato (Sontag et al, 2008).

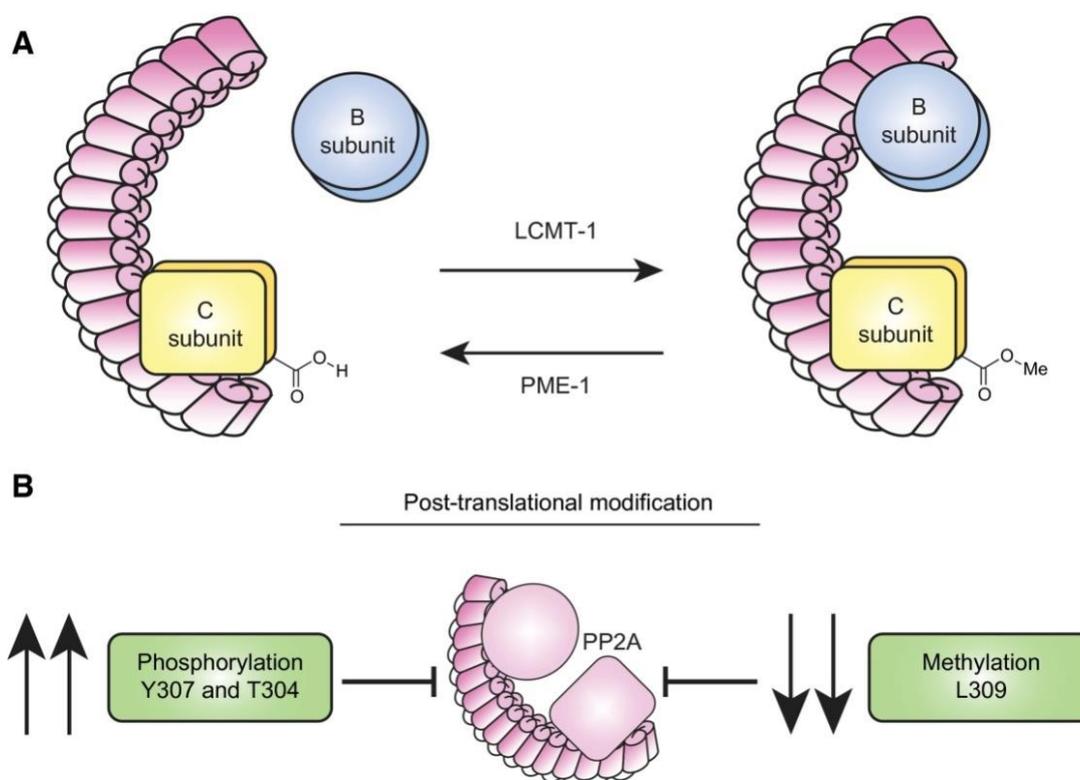


Figura 6. Representação das modificações pós-traducionais no extremo C-terminal $_{304}\text{TPDYFL}_{309}$ da PP2Ac. (A) C-terminal da subunidade catalítica C da PP2A sofre metilação na leucina 309 (último resíduo) por meio da proteína metiltransferase LCMT1, dependente de SAM (S-adenosilmetionina). A metilesterase PME-1 age na desmetilação deste mesmo resíduo de leucina. (B) Diminuição da metilação em L309 e aumento da fosforilação de Y307 e T304 da subunidade C catalítica são modificações pós-traducionais que inibem a PP2A (Sangodkar et al, 2015).

Além disso, quando a L309 se encontra metilada afeta a interação da subunidade C com a proteína $\alpha 4$ cuja atividade é a inibição da PP2A (Chung et al, 1999). Já com relação a especificidade da PP2A essa depende dessa metilação, pois define qual subunidade B (B, B', B'' ou B''') será inserida na holoenzima.

Sabe-se que, por exemplo, a subunidade do tipo B55 α , que é a mais comum em humanos, tem preferência pela PP2Ac L309 metilada (PP2Ac-L309me), entretanto a B56 α , a segunda mais comum, prefere a PP2Ac não metilada (Bryant et al, 1999). Abaixo é possível observar uma compilação da competência de metilação da PP2Ac selvagem e alguns mutantes dos resíduos que sofrem modificação pós-traducional e a consequente capacidade de interação com algumas isoformas da subunidade B, B' e B'' (Tabela 2) (Nunbhakdi-Craig et al, 2007).

Tabela 2. Competência de metilação da PP2A selvagem (WT) e mutantes e a capacidade de ligação com quatro isoformas da subunidade B da PP2A. ^aDados de metilação de acordo com (Yu et al. 2001). ^bDados de ligação de interação da subunidade B em células NIH/3T3 (Ogris et al, 1997; Yu et al, 2001). As análises foram realizadas por densitometria de sinais de banda de *Western blot* em NIH (n = 4) e Neuro2A (n = 2) (Nunbhakdi-Craig et al, 2007).

PP2A-C	^a Methylation competence (%)	Cell type	^b B/B55 α binding (%)	B'/B56 α binding (%)	B'/B56 δ binding (%)	B''/PR59 binding (%)
WT	100		100	100	100	100
T304A	71–100	3T3	173 \pm 45	46 \pm 10	113 \pm 13	59 \pm 9
		N2a	179 \pm 12	50 \pm 11	112 \pm 62	60 \pm 15
T304D	71–100	3T3	0.9 \pm 0.6	22 \pm 6	192 \pm 88	151 \pm 22
		N2a	0	24 \pm 8	238 \pm 94	190 \pm 40
Y307F	41–70	3T3	165 \pm 28	5 \pm 4	23 \pm 11	117 \pm 14
		N2a	153 \pm 7	9 \pm 8	42 \pm 16	124 \pm 22
Y307E	<10	3T3	0.2 \pm 0.4	0.5 \pm 0.7	20 \pm 10	69 \pm 11
		N2a	0	0	18 \pm 5	57 \pm 8
L309 Δ	<10	3T3	0.4 \pm 0.4	1.0 \pm 1.0	21 \pm 19	152 \pm 40
		N2a	0	0	15 \pm 11	130 \pm 35

No caminho inverso a ação da LCMT1 e causando a remoção por hidrólise do metil encontra-se a metilesterase PME-1. Essa proteína além de desmetilar a PP2Ac, também inibe sua atividade estabilizando-a em uma conformação inativa (A-C-PME1). Acredita-se que esse complexo com PME-1 possa ser um *pool* celular da holoenzima quase pronta para ser ativada pela adição da subunidade B quando necessário (Ogris et al, 1999; Longin et al, 2004).

A PP2A sofre alterações nos níveis de metilação durante o ciclo celular. Isso sugere que a metilação da PP2A pode participar da regulação ou ser regulada pela progressão do ciclo celular (Ogris et al. 1999).

Os dois sítios de fosforilação da cauda C terminal apresentam como característica em comum a desativação da PP2A por meio da redução da afinidade da subunidade B ao *core* da enzima. A fosforilação na T304 inibe seletivamente a montagem da holoenzima com as subunidades do tipo B55, enquanto a fosforilação na Y307 afeta seletivamente a interação com B56 (Longin et al, 2007, Nunbhakdi-Craig, 2007).

Além de regular o recrutamento de subunidades B específicas, as modificações pós-traducionais do C-terminal podem interferir entre si. Embora a fosforilação do sítio T304 não pareça influenciar na metilação, sabe-se que a fosforilação no resíduo Y307 pode impedir a metilação no resíduo L309, o que sugere um processo sequencial no qual cada etapa depende das etapas anteriores. Acredita-se que essas fosforilações são inclusive capazes de dissociar as subunidades B de trímeros totalmente formados (Longin et al, 2007).

As quinases envolvidas na fosforilação destes resíduos são as quinases dependente de ciclina (CDK), proteína tirosina quinase (src) ou pelo receptor de tirosina quinase (RTK). Acredita-se que a desfosforilação ocorre por autodesfosforilação

(Seshacharyulu et al, 2013; Chen et al, 1992). Através de técnicas de fosfoproteômica hoje há evidências que a PP2Ac quando fosforilada no resíduo de treonina 304 encontra-se inativada e não age sobre as principais quinases responsáveis pela divisão celular, tais como CDK1, Plk1 e Aurora1 (Figura 7).

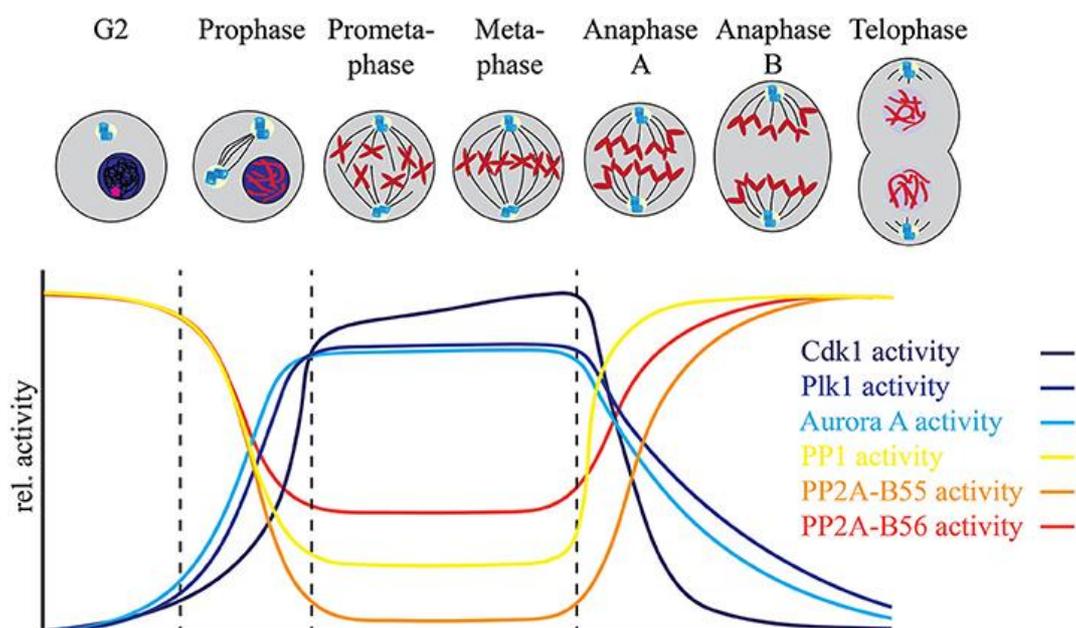


Figura 7. Efeito da atividade das proteínas quinases CDK1, AURKA, AURKB e Plk1 e fosfatases regulando a progressão mitótica. Há uma diminuição relativa nas atividades das principais fosfatases mitóticas, incluindo PP1, PP2A-B56 e PP2A-B55. Ao final da mitose, a atividade das fosfatases volta a se normalizar e atividade das quinases mitóticas a diminuir (Nasa e Kettenbach, 2018).

Essas modificações pós-traducionais são determinantes na especificidade da PP2A e envolvem proteínas modulatórias que, através de etapas sucessivas, vão montando o trímero A-B-C, este processo é denominado de biogênese da PP2A.

1.2 O processo de biogênese da PP2A

A biogênese da PP2A é um processo altamente controlado desde a síntese de suas subunidades no ribossomo até a formação do complexo heterotrimérico ativo,

passando por uma rede sofisticada e coordenada de proteínas moduladoras que atuam como uma linha de montagem. Cinco proteínas estão envolvidas na biogênese, sendo elas $\alpha 4$, PTPA (*Serine/threonine phosphatase 2A activator*), LCMT1 (*leucine carboxyl methyl transferase 1*), PME-1 (*PP2A methyl esterase 1*) e a mais recente descoberta a proteína TIPRL (*target of rapamycin signaling pathway regulator-like 1*). Exceto $\alpha 4$, todas as outras proteínas interagem com a subunidade catalítica pelo extremo C-terminal.

O processo da biogênese inicia-se como descrito a seguir e está ilustrado na

Figura 8:

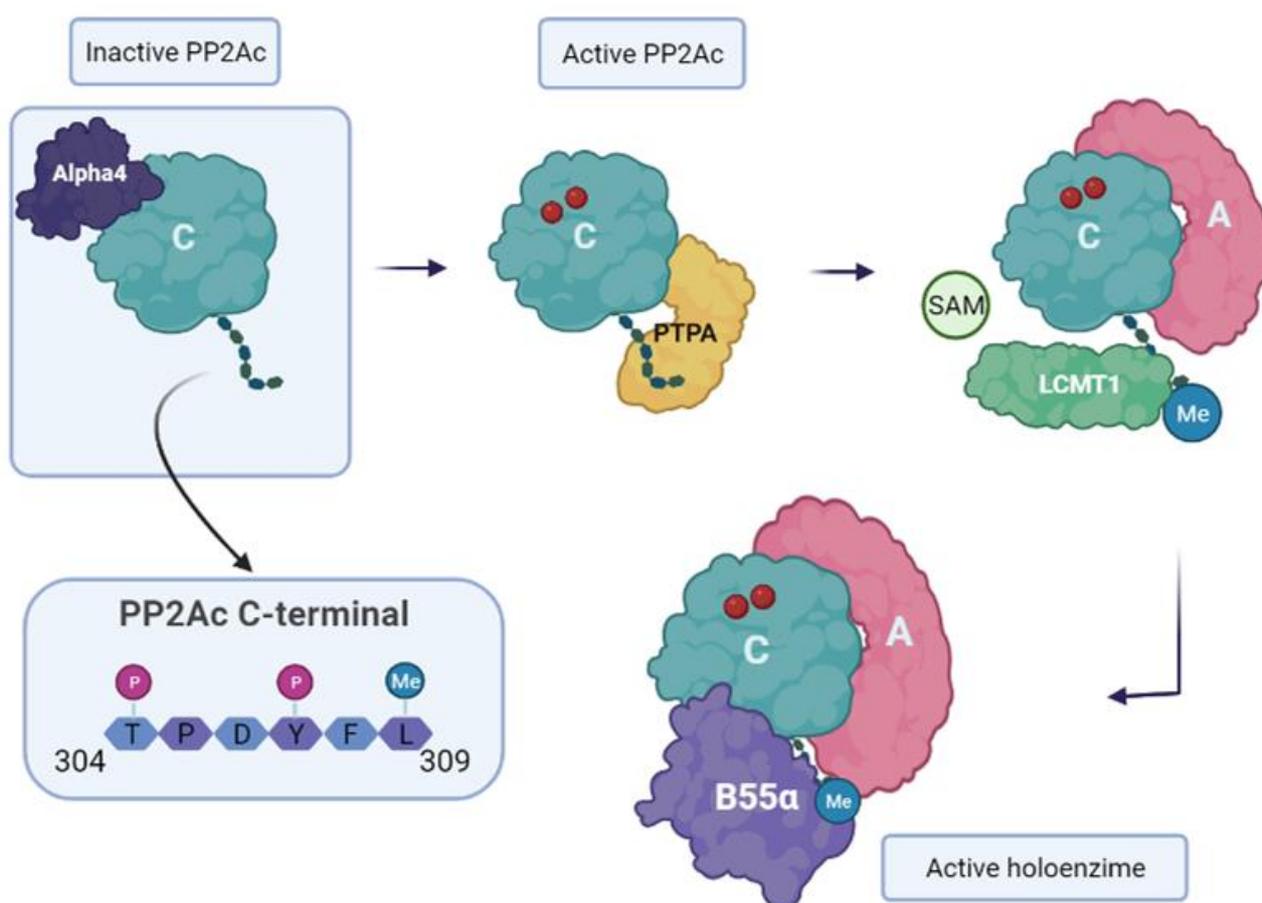


Figura 8. A biogênese da holoenzima da PP2A. A subunidade catalítica ainda inativa liga-se a Alfa4. Na sequência, PTPA adiciona dois íons metálicos de magnésio na subunidade catalítica ativando-a antes da ligação com a subunidade A. A PP2Ac ativa se liga então à subunidade A. O dímero ativo (*core*) pode formar holoenzimas com uma das várias subunidades do tipo B (B, B', B'' e B'''), podendo para isso, na cauda C-terminal a Leu309-PP2Ac ser então metilada por LCMT-1 usando o cofator SAM, o que facilita a

interação com subunidades B sensíveis a metilação. Essa modificação pode ser revertida por PME-1.

1) a subunidade catalítica da PP2A (PP2Ac) recém-sintetizada do ribossomo e ainda parcialmente desestruturada e inativa liga-se à proteína $\alpha 4$, cuja função é mantê-la estável, livre da interação com a subunidade A e da degradação mediada por ubiquitinação, em um estado denominado latência estável (Jiang et al, 2013). Até hoje não se sabe como a $\alpha 4$ é desligada da subunidade catalítica.

2) em seguida, a PTPA liga-se à subunidade catalítica e atua como uma chaperona estabilizando a estrutura e adiciona dois íons de magnésio no sítio ativo, liberando assim a formação do *core* da enzima com a interação da subunidade A (PP2Ac-A) (Guo et al, 2013).

3) o *core* ativo da PP2Ac-A então liberada da interação com PTPA, liga-se à enzima LCMT1. A subunidade catalítica sofre metilação na leucina (L309) da cauda C-terminal pela proteína LCMT1 através da atividade da SAM que fornece o metil (Stanevich et al, 2014). A metilação é reversível por meio da PME-1 que remove o metil (Lee et al, 1993) e ainda a protege de degradação por ubiquitinação (Yabe et al, 2015).

4) somente após a metilação ocorre a etapa final da biogênese com a adição da subunidade B no *core* da enzima, formando o complexo heterotrimérico (Wlodarchak e Xing, 2016).

5) PP2Ac pode ser desmetilada por PME-1 e esses complexos triméricos podem ser desmontados e reciclados, trocando as subunidades regulatórias. Não está claro se as holoenzimas contendo subunidades regulatórias independentes de metilação são formadas após a reciclagem de complexos metilados e/ou são montadas por uma rota de biogênese independente.

Recentemente, vem se reconhecendo a presença de mais uma proteína reguladora na biogênese, a proteína TIPRL (*TOR Signaling Pathway Regulator-like*). No entanto, ainda não há muitos estudos acerca da ação dessa proteína em células humanas (Sents et al, 2013).

A biogênese da PP2A é, portanto, constituída por eventos sequenciais e extremamente regulados pela célula. No entanto, as etapas de maturação da PP2A ainda não foram totalmente esclarecidas. Especialmente qual a ordem exata de cada evento, quais as proteínas envolvidas em cada um desses passos e qual o compartimento subcelular onde ocorre cada etapa.

1.3 Proteínas fosfatases PP4 e PP6

As fosfatases PP4 e PP6, assim como a PP2A, apresentam uma organização multimérica em complexos com subunidades reguladoras B e de ancoragem e uma interação conservada na interface entre as subunidades C e A. Os outros membros da família PPP (PP1, PP2B, PP5 e PP7) no entanto, não têm interação com subunidade A mesmo que estas compartilhem extensa similaridade de sequência com a subunidade catalítica da PP2A (Shi, 2008).

1.3.1 Fosfatase PP4

A PP4 é uma fosfatase nuclear envolvida em diversas funções celulares como, por exemplo, a regulação da montagem de microtúbulos e centrossomos, regulação da resposta ao dano no DNA, regulação da montagem do spliceossomo por meio da interação com o complexo SMN (*survival of motor neuron*) e regulação da apoptose

(Cohen et al, 2005; Lee et al, 2012). PP4 destaca-se como uma das principais fosfatases envolvidas em reparo no DNA, esta função é extremamente importante pois as células são constantemente expostas a eventos endógenos e exógenos que podem causar aberrações genômicas levando-as a morte celular ou transformação maligna (Park e Lee, 2020).

Diversas doenças são observadas quando a PP4 se encontra alterada, a superexpressão de PP4 é observada em diversos tipos de câncer, por exemplo, em mama e pulmão (Wang et al, 2008), do sistema nervoso do tipo glioma (Li et al, 2016) adenocarcinoma pancreático (Weng et al, 2012) e colorretal (Li et al, 2015), em contrapartida uma menor expressão é encontrada em leucemia mieloide aguda (LMA) (Herzig et al, 2017).

Estruturalmente, a PP4 é formada por uma subunidade catalítica (PP4c) e por cinco subunidades reguladoras diferentes PP4R1, PP4R2, PP4R3 α , PP4R3 β e PP4R4 que desempenham um papel semelhante ao da subunidade A da PP2A pois são formadas por repetições do tipo HEAT (Figura 9). Essas subunidades formam um dímero ativo da PP4 (Cohen et al, 2005). Uma terceira subunidade chamada PP4R3 forma um trímero com o complexo PP4c-PP4R2 (Gingras et al, 2005).

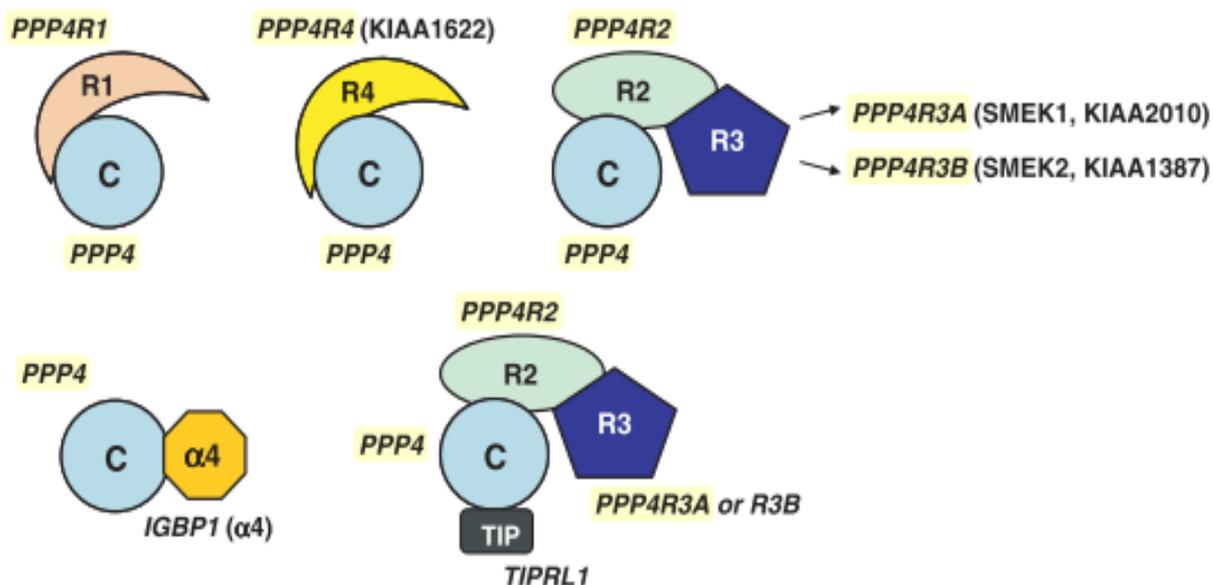


Figura 9. Representação da estrutura dos complexos da fosfatase PP4. A subunidade catalítica (PP4c) forma dois complexos diméricos e dois triméricos canônicos com outras subunidades. Os complexos diméricos consistem na subunidade C catalítica e nas subunidades reguladoras R1 ou R4. Os complexos triméricos são formados por uma subunidade C catalítica, uma subunidade de ancoragem R2 e uma subunidade reguladora R3A ou R3B. As proteínas $\alpha 4$ e TIPRL são encontradas em complexos com PP4c e em complexos triméricos PP4c–R2–R3A (ou R3B), respectivamente (Sents et al, 2013).

Modificações pós-tradicionais também são fundamentais para a ativação e desativação da PP4. A subunidade catalítica PP4c, assim como a PP2Ac, é metilada por LCTM1 no resíduo de leucina no C-terminal para formar o complexo PP4 ativo, já durante a mitose as subunidades regulatórias PP4R2 e PP4R3 precisam ser inativadas por meio de fosforilação (Voss et al, 2013; Lee e Lee, 2014; Hwang et al, 2016).

Proteínas como a TIPRL, $\alpha 4$, PP4IP (*protein phosphatase 4 inhibitory protein*) e DHX38 (*DEAH box polypeptide 38*) são inibidoras endógenas da PP4 (Nanahoshi et al, 1999; Smetana e Zanchin, 2007).

Especificamente, TIPRL regula negativamente a atividade do complexo PP4c-PP4R2-PP4R3 β na resposta a danos no DNA (Rosales et al, 2015). Os alvos celulares descritos para PP4 incluem o fator de transcrição NF- κ B (Hu et al, 1998), histona desacetilase 3 (HDAC3) (Zhang et al, 2005) e proteína de distribuição nuclear (NDEL1)

(Toyo-oka et al, 2008). Logo, PP4 desempenha um papel importante na resposta a danos no DNA (Park et al, 2019).

A interação de duas subunidades de PP4 (PP4R2 e PP4R3 β) com TIPRL resulta em um aumento na fosforilação de γ -H2AX, pela inibição da atividade desta fosfatase. A fosforilação da histona H2A, variante H2AX, é um dos primeiros eventos que ocorrem em resposta às quebras de fita dupla do DNA. A fosforilação na Ser139 de H2AX é mediada por quinases do tipo PI(3)K, ATM/ATR e DNA-PK para gerar a γ -H2AX. A fosforilação do H2AX resulta no recrutamento e acúmulo de proteínas de reparo do DNA necessárias para mediar a sinalização *checkpoint* e reparação (Rosales et al, 2015).

Células em que a TIPRL foi silenciada por *knockdown* foram protegidas contra a morte induzida por danos ao DNA, enquanto as células superexpressando TIPRL foram mais sensibilizadas a danos no DNA. Portanto, TIPRL promove a morte celular em resposta a estresse genotóxico por promover a hiperfosforilação de γ -H2AX (Rosales et al, 2015). A interação da TIPRL e PP6 é menos estudada do que a interação com PP4. Porém, sabe-se que TIPRL, α 4 e a subunidade catalítica da PP6 interagem de forma semelhante a PP4 e PP2A (McConnell et al, 2007, Smetana e Zanchin, 2007).

1.3.2 Fosfatase PP6

A fosfatase PP6c compartilha uma similaridade de sequência expressiva com a PP2Ac (58,1%) e com PP4c (62,6%), embora dentre as três fosfatases esta seja a menos estudada (Ohama, 2019).

PP6c é expressa em todos tecidos de mamíferos, sendo, inclusive, dentro das fosfatases PPP, a mais abundante na linhagem celular de câncer de colo uterino *HeLa* (Nagaraj et al, 2011). Alterações na expressão de PP6c foram encontradas em diversas

doenças. A expressão diminuída de PP6c foi observada em câncer hepatocelular e aumentada em câncer dos ductos do pâncreas (Sato et al, 2004), cerebral do tipo glioblastoma (Shen et al, 2011) e do tipo mesotelioma localizado no revestimento externo dos órgãos da cavidade abdominal (Ivanov et al, 2010). A superexpressão também foi observada em tecidos adiposos de camundongos modelo para resistência à insulina e na doença inflamatória intestinal de Crohn (Ohama, 2019).

A função celular de PP6 ainda é pouco conhecida, mas alguns trabalhos sugerem um envolvimento na progressão do ciclo celular (Stefansson e Brautigan, 2007) e na resposta a citocinas inflamatórias por meio de I κ B (Stefansson e Brautigan, 2006) e TAK1 (Kajino et al, 2006), recentemente descobriu-se que PP6 é necessária para o início do processo de embriogênese em camundongos (Ogoh et al, 2016).

A PP6 canônica é encontrada na forma de um complexo heterotrimérico formado por uma subunidade de ancoragem (dentre três diferentes isoformas PPP6R1, PPP6R2 e PPP6R3) que compartilham um domínio conservado de associação chamada de SAPS (*Sit4-associated proteins*) (Stefansson e Brautigan, 2006) e uma possível subunidade regulatória formada por repetições *ankyrin* (Figura 10) (Stefansson et al, 2008).

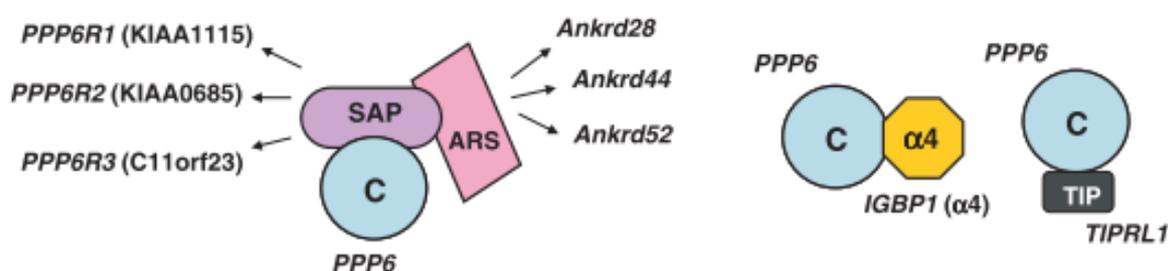


Figura 10. Representação da estrutura da PP6. A estrutura é constituída por uma subunidade catalítica C (PPP6C), uma subunidade de *scaffold* (SAP) e uma subunidade regulatória (ARS). A PP6c também é encontrada em complexos não canônicos com $\alpha 4$ e TIPRL, respectivamente (Sents et al, 2013).

Assim como PP2Ac, PP6c também interage com as proteínas regulatórias $\alpha 4$ e TIPRL formando heterodímeros (Prickett e Brautigan, 2006; Smetana e Zanchin, 2007). As atividades de $\alpha 4$ incluem a função de inibir a atividade de PP6 e principalmente estabilizar a subunidade catalítica (PP6c) (Kong et al, 2009; Prickett e Brautigan, 2006). Já com a TIPRL, Smetana e Zanchin (2007) demonstraram que há esta interação de TIPRL com PP6, no entanto ainda carece de informações estruturais para determinar se esta interação é similar à da PP2A.

Outra característica em comum entre a PP2Ac, PP4c e PP6c é a similaridade de sequência no extremo C-terminal. Os três resíduos finais da subunidade catalítica (YFL) da PP2Ac (-TPDYFL) são idênticos também em PP4c (-VADYFL) e PP6c (-TTPYFL), todas são substrato de LCMT1 e PME-1 na leucina final. Células embrionárias de fibroblasto murino (MEFs) nocaute de LCMT-1 reduziram drasticamente a metilação de ambas fosfatases (Hwang et al, 2016). PP6, contudo, possui características próprias como a não dependência dessa metilação para a montagem da holoenzima (Hwang et al, 2016) e não formar complexo estável com PME-1 (Wandzioch et al, 2014).

1.4 TIPRL

A proteína TIPRL é uma proteína inibitória das fosfatases PP4c, PP6c e PP2Ac (Smetana e Zanchin 2007, McConnell et al, 2007). Originalmente descoberta em leveduras em uma triagem de interações da proteína Tap42, a ortóloga de $\alpha 4$, essa proteína foi denominada de Tip41 (*Tap42-interacting protein*) (Jacinto et al, 2001) e demonstrou interagir com todas as fosfatases similares a PP2A de levedura, incluindo Pph21/22, Sit4, Pph3 e Ppg1 (Gingras et al, 2005). Em leveduras a Tip41 é parceira de interação de Tap42 que regula negativamente a quinase TOR através da fosfatase Sit4.

Em células de mamíferos, TIPRL não interage diretamente com $\alpha 4$, mas obrigatoriamente interage com uma das subunidades catalíticas, formando dímeros (TIPRL-C) ou mesmo trímeros com $\alpha 4$ (TIPRL-C- $\alpha 4$) (Smetana e Zanchin, 2007; McConnell et al, 2007; Gingras et al, 2005)

TIPRL não compete pelo mesmo sítio de interação da PP2A com $\alpha 4$ em complexos endógenos celulares ou *in vitro* (Smetana e Zanchin, 2007; Scorsato et al, 2016; Wu et al, 2017). Este fato foi confirmado pelas estruturas cristalográficas recentemente publicadas (Scorsato et al, 2016; Wu et al, 2017), na qual pode-se elucidar um possível mecanismo de regulação da desmontagem das holoenzimas de PP2A por $\alpha 4$ e TIPRL (Wu et al, 2017).

A estrutura cristalográfica da TIPRL, resolvida por nosso grupo, revelou a interface de interação com a cauda C-terminal da PP2A (Figura 11) (Scorsato et al, 2016).

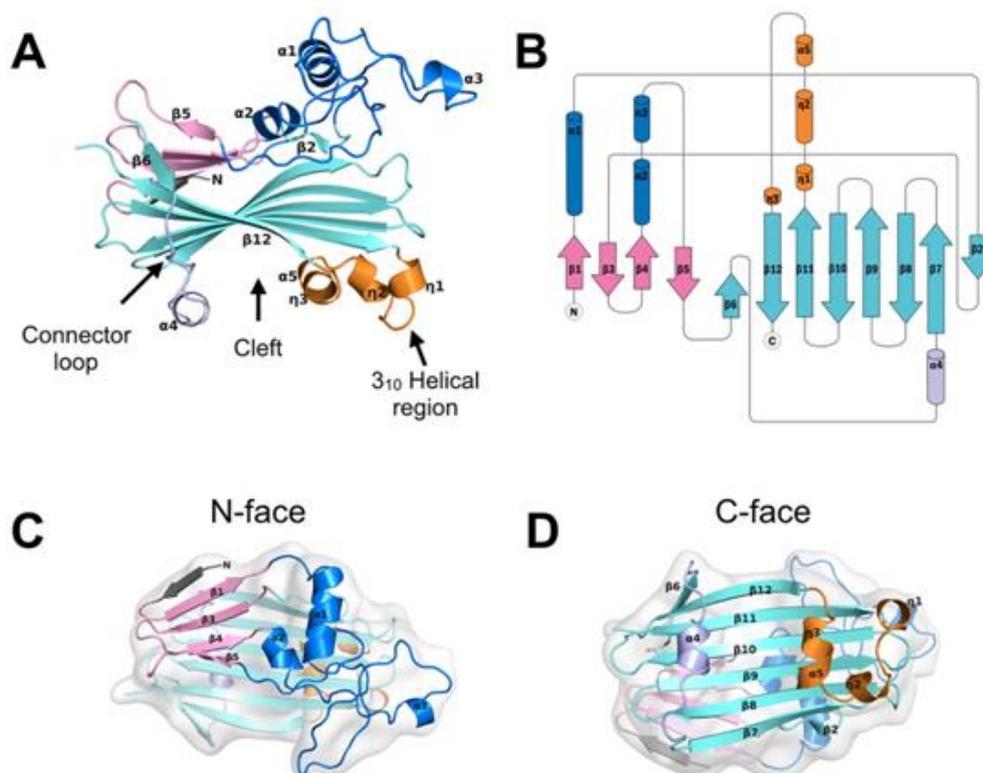


Figura 11. Estrutura da TIPRL. (A) Representação da estrutura com destaque a região da fenda de interação (*cleft*) com a cauda C-terminal da PP2A. (B) Diagrama de topologia da estrutura. (C) Vista superior da representação mostrando o N-terminal e (D) vista inferior

apresentando a fenda de interação combinadas com o perfil da superfície (transparência) (Scorsato et al, 2016). PDB: 5D9G.

A TIPRL é constituída por 272 aminoácidos (31 kD) e possui um enovelamento único organizado em torno de um núcleo central de 6 folhas beta antiparalelas e uma fenda conservada, cada folha beta é composta por 13 resíduos na região C-terminal, essas 6 folhas são então cobertas por outras cinco pequenas fitas de folhas betas e alfa hélices na região N-terminal, cuja estrutura não apresenta uma configuração repetitiva (Figura 11a). A porção final da região C-terminal da TIPRL (últimos 16 resíduos) não aparece na densidade eletrônica e dados de *crosslink/MS* indicam que essa região é flexível e desordenada (Scorsato et al, 2016).

Um longo *loop* que abrange os resíduos 121-148 conecta as regiões N e C terminais e envolve a fenda de interação da TIPRL, região está carregada positivamente (Figura 11 C, D). Comparando-se a sequência da TIPRL com suas ortólogas, pôde-se observar que o núcleo da folha beta no C-terminal mostra uma maior conservação evolutiva (Scorsato et al, 2016). Dados de cristalografia, HDX-MS (troca de hidrogênio-deutério) e mutagênese/*pull-down* mostraram que os últimos quatro resíduos da cauda C-terminal da PP2Ac, DYFL (306–309), interagem exatamente na região dessa fenda da TIPRL (Scorsato et al, 2016).

A estrutura do complexo trimérico da TIPRL com a subunidade catalítica da PP2A e a subunidade A foi publicada durante este projeto (Figura 12).

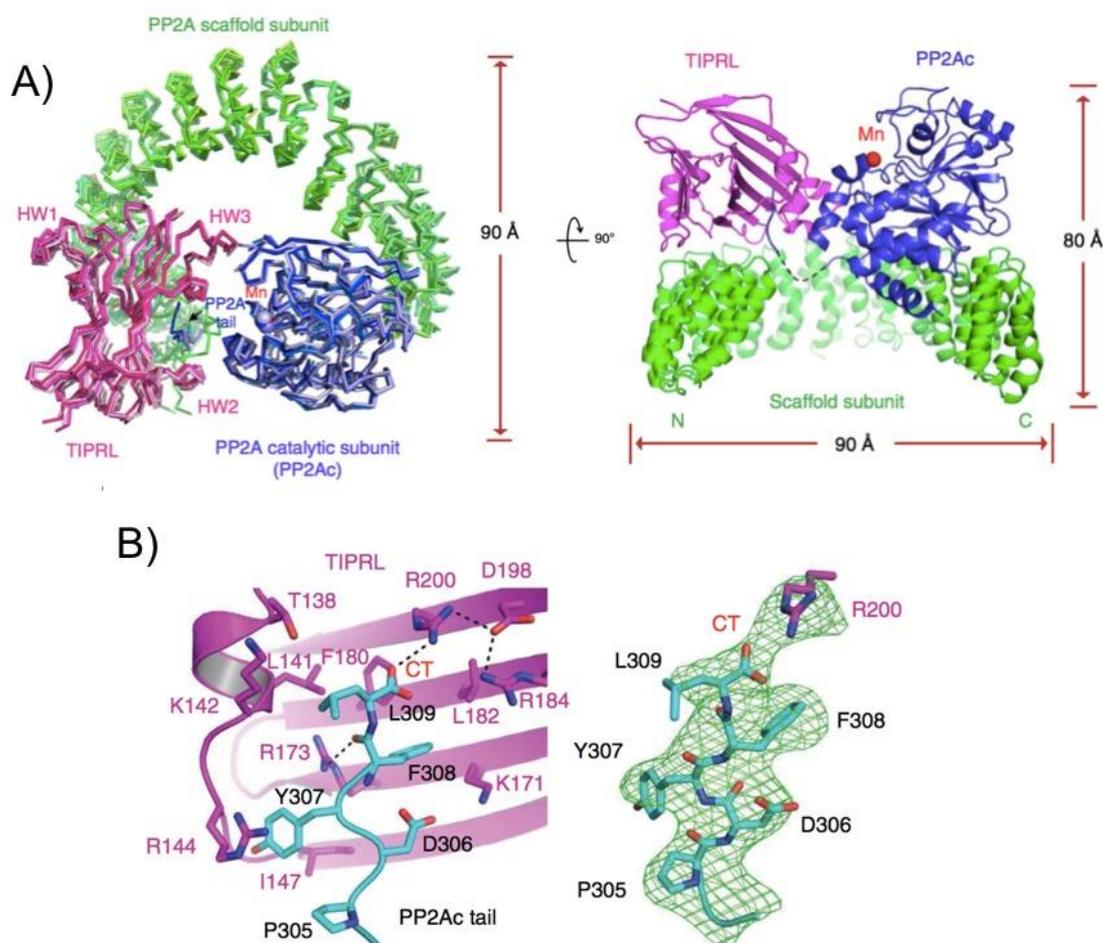


Figura 12. Complexo da TIPRL com o *core* da PP2Ac. A) Estrutura geral da holoenzima da PP2A, composta pela subunidade catalítica C, TIPRL e a subunidade de ancoragem A. Estruturas do cristal onde TIPRL está representada em magenta, a subunidade catalítica C em azul e a subunidade A em verde. Os íons de manganês presentes no sítio ativo da PP2Ac são mostrados como esferas azul a direita e vermelha a esquerda. B) Visão aproximada da interação entre a cauda da PP2Ac (ciano) e TIPRL (magenta) a esquerda. O mapa de densidade elétrica (FO-FC) da cauda da PP2Ac e a cadeia lateral do resíduo R200 da TIPRL é contornado em $3,0\sigma$ em malha verde a direita. A cauda C-terminal da PP2Ac é denominada como CT. As interações de ligação de hidrogênio são mostradas em linhas tracejadas pretas (Wu et al, 2017).

Quando comparado com as outras proteínas regulatórias da PP2A ($\alpha 4$, PTPA, LCMT1 e PME-1), TIPRL possui a maior área de interação com a subunidade catalítica da PP2A e essa interação ocorre exclusivamente com a versão da PP2A não metilada no resíduo L309 (Wu et al, 2017).

Por meio desta estrutura, foi observado que TIPRL atua de forma diferente das subunidades regulatórias B com o *core*. TIPRL somente interagiu com a PP2A-L309 na versão não metilada deste resíduo e a sua interação perturbou a conformação e inclusive a quelação dos íons metálicos no sítio ativo da subunidade catalítica. Essas modificações provenientes da interação da TIPRL tornaram a PP2A inativa (Wu et al, 2017).

A interface de interação da TIPRL com a subunidade A ocorre entre as folhas betas da TIPRL e o N-terminal da subunidade A (Figura 12). Já a interação da TIPRL com a subunidade catalítica ocorre através da cauda C-terminal da PP2A interagindo diretamente na fenda de interação da TIPRL (Wu et al, 2017), confirmando resultados anteriores com peptídeo TEV na estrutura da TIPRL isolada, na qual possui resíduos iguais aos da cauda C-terminal da PP2Ac (Scorsato et al, 2016).

O resíduo PP2Ac-L309 na versão não metilada interage diretamente com o resíduo R200 da TIPRL por uma ligação salina e interações de ligação de hidrogênio (Wu et al, 2017). O resíduo TIPRL-R200 faz uma interação iônica com a cauda carboxila do resíduo L309 da PP2A (Scorsato et al, 2016).

A fenda de interação da TIPRL que faz a interação específica com os resíduos finais da cauda C-terminal da PP2A é uma região carregada positivamente devido a presença de resíduos de arginina e lisina e a pequenas regiões hidrofóbicas formadas por resíduos de treonina, leucina, isoleucina e fenilalanina. O resíduo da PP2A-L309 interage exatamente nesta região de carga positiva com o resíduo R200 por meio de interação eletrostática e ligações de hidrogênio (Scorsato et al, 2016; Wu et al, 2017).

Antes mesmo da elucidação da estrutura da TIPRL e de sua ligação à cauda da PP2Ac, foi proposto que TIPRL poderia atuar na biogênese estabilizando o complexo da PP2Ac com $\alpha 4$, neutralizando a atividade descontrolada da PP2Ac resultante da desmontagem das holoenzimas em condições de stress, ou ainda mediando eventos de

montagem e desmontagem dos complexos da PP2A ou PP4 na recuperação da célula após danos no DNA (Sents et al, 2013). A estrutura do trímero TIPRL-PP2Ac-A em conjunto com experimentos *in vitro* forneceu suporte à ideia de que TIPRL atua na desmontagem das holoenzimas da PP2A, mais especificamente, desencadeando a desmontagem das holoenzimas desmetiladas em conjunto com $\alpha 4$ (Wu et al, 2017).

1.4.1 Papel da PP2A e TIPRL no câncer

A desregulação do equilíbrio entre quinases e fosfatases é um fator que permite que as células não respondam aos sinais de autolimitação interna e externamente, tornando-se malignas. A PP2A é uma fosfatase altamente regulada que possui propriedades que reprimem a formação de tumores em vários tecidos humanos, dessa forma, a homeostase da célula é dependente das fosfatases, sendo a PP1 e PP2A de modo geral as mais frequentemente inativadas neste tipo de doença. PP2A vem sendo apontada como um supressor tumoral por desfosforilar e inativar diversos produtos de oncogenes.

A TIPRL é superexpressa em diversos carcinomas humanos, por exemplo em hepatocarcinoma onde ocorre a inativação de indutores de apoptose (MKK7, JNK e TRAIL) mediada pela PP2A (Song et al, 2012). TIPRL, por ser um inibidor endógeno de PP2A, atua de forma contraditória à fosfatase, favorecendo a fosforilação de resíduos de serina e treonina. Em câncer de pulmão de células não pequenas, a TIPRL é superexpressa e favorece a migração e invasão das células malignas, atuando assim como um promotor de metástase (Xu et al, 2020). A regulação positiva de TIPRL aumentou a atividade de autofagia diminuindo assim o estresse metabólico das células cancerígenas por meio da interação da TIPRL com fator de iniciação eucariótico 2 α

(eIF2 α) elevando a fosforilação de eIF2 α e ativação da via eIF2 α -ATF4, induzindo assim a autofagia. Em contrapartida, a depleção da TIPRL aumentou a apoptose neste tipo de células (Jeon et al, 2019).

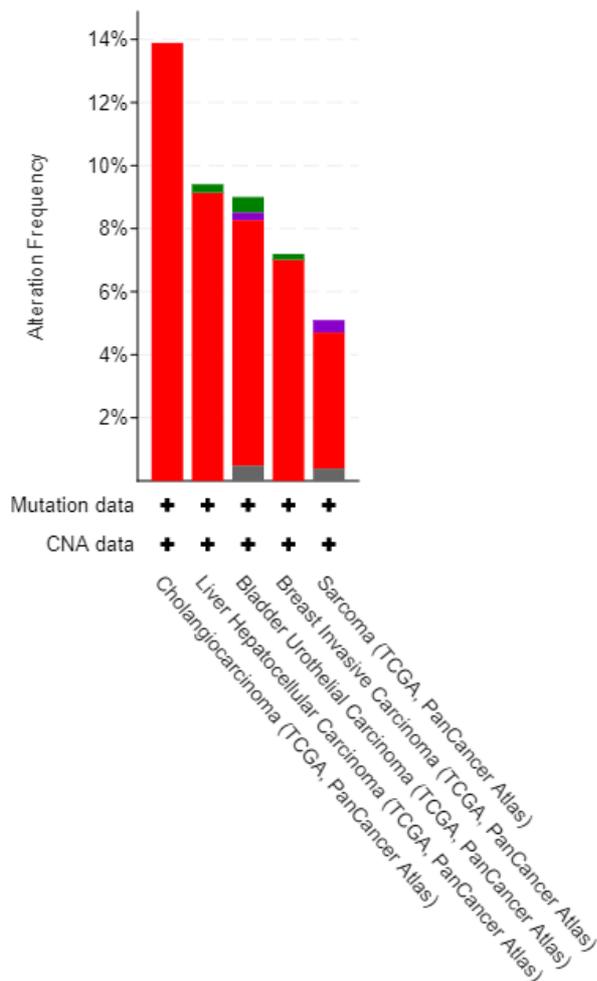
Os dados do banco de dados cbioportal (www.cbioportal.org) confirmam que, de modo geral, TIPRL é superexpressa em câncer por meio da amplificação do gene e da desregulação da expressão do mRNA. Esse banco de tumores de pacientes reúne dados de RNAseq, microarranjo, sequenciamento de DNA e expressão de proteínas e fosfoproteínas de consórcios internacionais, principalmente o TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) de 10953 pacientes e 10967 amostras (Cerami et al, 2012).

Atualmente, o banco conta com 105 estudos, cada um deles envolvendo em geral centenas de amostras de pacientes. Os resultados da busca por TIPRL são mostrados na Figura 13.

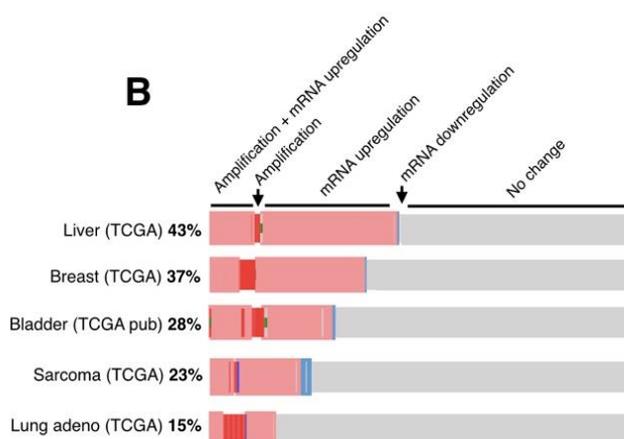
De acordo com os dados do portal, a principal alteração de TIPRL em tumores humanos é a amplificação do gene que codifica essa proteína, indicando um papel positivo de TIPRL no desenvolvimento do câncer. A deleção do gene é relativamente rara, assim como as mutações somáticas.

Considerando-se apenas as alterações genéticas (mutação, amplificação ou deleção do gene), TIPRL se encontra amplificada em 29% dos casos de câncer de próstata neuroendócrino, 21,1% de carcinoma de mama invasivo, 15,5% dos casos de carcinoma hepatocelular, 15% dos casos de carcinoma urotelial de bexiga, 11,3% de adenocarcinoma de pulmão.

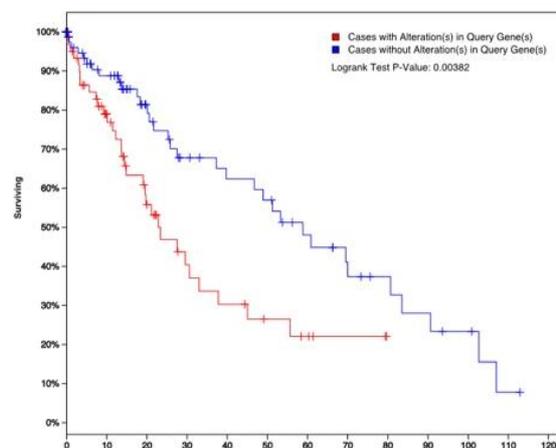
A



B



C



● Mutation ● Fusion ● Amplification ● Multiple Alterations

Figura 13. Alterações de TIPRL em tumores humanos de acordo com informações disponíveis no banco de dados cbioportal (<http://www.cbioportal.org>) A) Análise das alterações no gene que codifica TIPRL em diversos tipos de tumores humanos. Verde: mutação somática, azul: deleção, vermelho: amplificação, cinza: alterações múltiplas. inset: posição das mutações identificadas em tumores ao longo da estrutura primária da proteína TIPRL. B) Representação gráfica (oncoprint) dos tipos de alterações de TIPRL nos tumores humanos com maior incidência de alterações, incluindo alterações genéticas e nos níveis de expressão. Cada tipo de alteração é representado por uma barra de tamanho proporcional à sua incidência. Os números à esquerda indicam a porcentagem total de pacientes que apresentaram alterações em TIPRL para cada tipo de tumor. Os números de pacientes em cada estudo são: carcinoma hepatocelular (Liver TCGA): 377; carcinoma de mama invasivo (Breast TCGA): 1099; carcinoma urotelial de bexiga (Bladder TCGA pub): 131, sarcoma: 262; adenocarcinoma de pulmão (Lung adeno TCGA): 521. C) Curva de sobrevivência Kaplan-Meier dos pacientes de carcinoma hepatocelular separados em dois grupos de acordo com a presença de alterações em TIPRL (curva em vermelho) ou ausência de alterações (curva em azul).

Outros tipos de câncer com frequência de alterações de TIPRL inferior a 10% não mostrados na figura, incluem sarcoma, melanoma, carcinoma de células escamosas de pulmão e carcinoma de útero, próstata e estômago.

Já quando a PP2A é inativada, o seu papel de proteína supressora tumoral é interrompido. Várias alterações genéticas impedem que a subunidade A (*scaffold*) se ligue às subunidades B e/ou C. Geralmente a PP2A é inativada por mutação somática, por fosforilação nos seus resíduos de treonina e tirosina e/ou desmetilação da leucina da cauda C-terminal da subunidade catalítica (TPDYFL). Mutações na PP2A não são tão frequentes (Figura 14), em um estudo observou-se que apenas 8% de um total de 9859 tumores possuía alguma mutação em qualquer uma das subunidades da PP2A (Sangodkar et al, 2015).

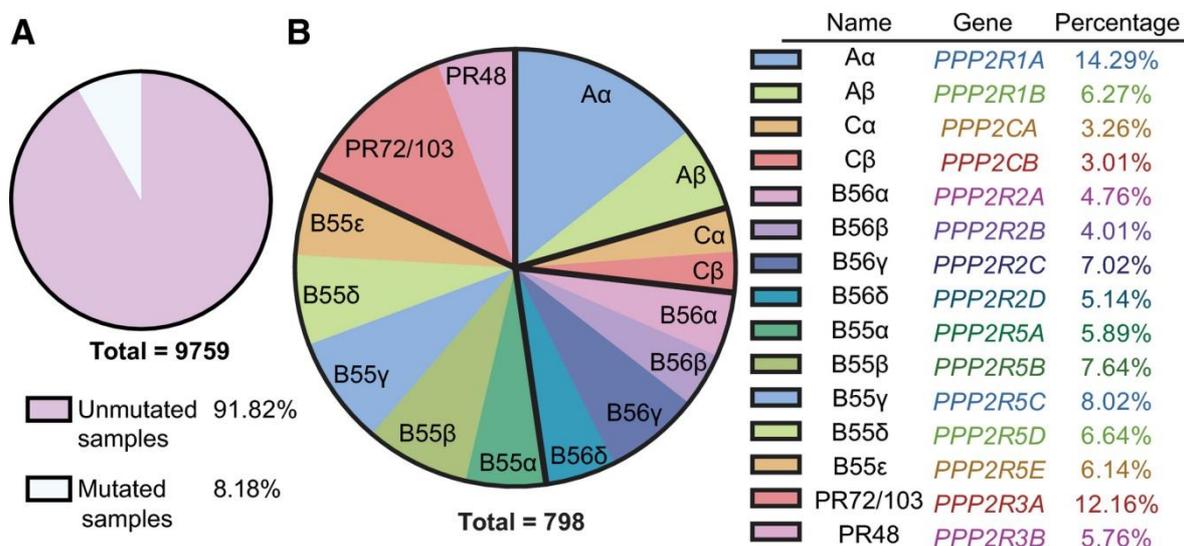


Figura 14. Frequência de mutações nas subunidades da PP2A. (A) 9759 amostras de tumor mostraram que apenas 8% apresentavam mutações na PP2A. (B) frequência de mutações presentes na PP2A subdividindo pelas subunidades A, B, B', B'' e C (Sangodkar et al, 2015).

Destes 8% de mutações, a subunidade mais mutada é a subunidade A α (gene *PPP2R1A*) (Figura 14) em um *hotspot* na repetição HEAT 5 impedindo a interação

especialmente com a subunidade B' (Sablina e Hahn, 2008; Ruediger et al, 2011). Mutações na subunidade A são encontradas em câncer de mama, pulmão, melanoma, ovário, endometrial, uterino, cólon e leucemia mieloide aguda (LMA). Outras subunidades da PP2A também estão mutadas em outros tipos de câncer (Figura 14), por exemplo, no câncer de mama também se observam alterações na subunidade B55, já no melanoma podem ser observadas mutações na subunidade B56. Em compensação, a subunidade C alterada só está presente em câncer próstata e em LMA (Sangodkar et al, 2015).

Apesar da frequência relativamente pequena de mutações das subunidades da PP2A em câncer, seu papel como supressor tumoral vai, além disso, já que a PP2A constitui um dos cinco circuitos que a célula humana precisa romper para que ocorra a transformação maligna, juntamente com Ras, pRb (retinoblastoma), p53 e telômeros (Figura 15). É importante destacar que é possível que também haja perturbação de outras vias distintas dessas cinco, porém, o processo de transformação de células humanas não se completa se um desses cinco circuitos celulares estiver intacto (Weinberg, 2013). Na maioria dos tumores, PP2A é desregulada por mecanismos não genômicos, que incluem a regulação por inibidores endógenos e por modificações pós-traducionais (Kauko e Westermarck, 2018).

pathway	Ras	pRb	p53	telomeres	PP2A
genes/agents used to deregulate pathway	<i>ras</i> , <i>MEK</i> + <i>Akt/PKB</i> , <i>MEK+IKKε</i> , <i>PAK1</i> + <i>Akt/PKB</i>	<i>SV40 LT</i> , <i>CDK4 + D1</i> , <i>HPV E7</i> , <i>Rb shRNA</i>	<i>SV40 LT</i> , <i>DN p53</i> , <i>HPV E6</i> , <i>p53 shRNA</i>	<i>hTERT</i> , <i>myc + SV40 LT</i>	<i>SV40 sT</i> in some cells: <i>myc</i> <i>Akt/PKB+Rac1</i> , <i>PI3K</i> , <i>B56 shRNA</i>

Figura 15. Genes envolvidos nas cinco vias que participam da transformação em células humanas. Ras, pRb, p53, telômeros e PP2A são partes de vias importantes para as células que alteradas pelos genes descritos no quadro acima, podem levar à formação de tumor (Weinberg, 2013).

A modulação da atividade da PP2A pode ser benéfica no tratamento do câncer (Haesen et al, 2014). Dos cânceres hematológicos, grande parte surge pela não repressão de ativação de quinases oncogênicas através de mutações, rearranjos cromossômicos e a ativação de reguladores *upstream* de quinases por inativação das fosfatases correspondentes antioncogênicas (Haesen et al, 2014).

2. OBJETIVOS

Este projeto tem o objetivo geral de compreender o papel da proteína TIPRL na regulação e montagem ou desmontagem das holoenzimas das fosfatases do tipo 2A, especialmente a PP2A, e aprofundar a caracterização da interação TIPRL-PP2Ac utilizando mutantes dessas duas proteínas.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos neste projeto foram:

- a) Desenvolver um modelo de estudo da interação entre TIPRL e PP2Ac em cultura de células, que possibilite a caracterização dessa interação de forma reprodutível e quantificável;
- b) Avaliar o efeito de mutações da subunidade catalítica da PP2A (PP2Ac) na interação com TIPRL, com foco em mutações já caracterizadas no sítio catalítico e na cauda C-terminal dessa fosfatase;
- c) Avaliar o efeito de mutações de TIPRL na interação com as subunidades catalíticas da PP2A, PP4 e PP6;

- d) Padronizar a superexpressão e o silenciamento de TIPRL em cultura de células e analisar seu impacto na metilação e atividade e interações com a PP2Ac;
- e) Analisar os níveis de expressão endógena de TIPRL em diferentes linhagens celulares;

3. METODOLOGIA

3.1 Técnicas de DNA recombinante e mutagênese

Os procedimentos de manipulação de DNA foram realizados de acordo com protocolos estabelecidos (Ausubel et al, 2003) e, no caso de sistemas comerciais, foram seguidas as instruções do fabricante. Para as reações de mutagênese sítio-dirigida foi utilizado o sistema comercial *QuikChange* (*QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*, cód: #200523, *Stratagene*), ou um sistema equivalente utilizando enzimas adquiridas separadamente. As clonagens foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e as reações de mutagênese foram verificadas por sequenciamento de DNA.

O cDNA da subunidade catalítica da PP2A e os mutantes P190F, H118N, Y307F e L309V já se encontravam subclonados no vetor pcDNA-Flag, uma modificação do vetor pcDNA3.1 (Invitrogen) que insere um epítipo Flag na região N-terminal. Os vetores pcDNA-FLAG e pcDNA-HA foram doação do pesquisador Dr. Fernando Moreira Simabuco (FCA/Unicamp). Esses mutantes foram produzidos pela estagiária Ana Luiza Savioli da Silva sob orientação da Dra. Juliana H. C. Smetana. Também foram utilizadas outras mutações utilizando vetor viral pBABE na cauda C-terminal da subunidade PP2Ac

provenientes da colaboração com o pesquisador Dr. Egon Ogris (Universidade Médica de Viena/Instituto Max Perutz, Viena/Áustria) (Tabela 3).

O fenótipo de mutações sítio-dirigidas na TIPRL WT, previamente estudadas por nosso grupo em sistema de duplo-híbrido em leveduras (Smetana e Zanchin, 2007) e em *E. coli* (Scorsato et al, 2016), foi analisado neste estudo em células de mamíferos.

A subclonagem da TIPRL selvagem do vetor pET28a-TEV para o vetor de expressão em mamíferos pcDNA3.1-HA foi realizada com ajuda da aluna de doutorado do nosso grupo Mariana Piccoli Gonçalves. Após a produção do vetor em pcDNA, foram iniciadas as reações de mutagênese sítio dirigida pela Dra. Nadia Rasheed, também pertencente ao nosso grupo de pesquisa. As mutações foram confirmadas por sequenciamento de DNA.

Tabela 3. Mutantes da subunidade catalítica da PP2A, localização na subunidade e possível ação na biogênese.

Construção	Mutante	Localização	Ação esperada
pcDNA 3.1 (+)- neo-FLAG tag	H118N	Sítio Ativo da PP2A	Perda da atividade enzimática
	Y307F	Cauda C-terminal (TPDYFL)	Impede a fosforilação desse resíduo de tirosina
	L309V	Cauda C-terminal	Impede a metilação do resíduo L309 pela LCMT-1
pBABE-puro-HA tag	T304A	Cauda C-terminal	Impede a fosforilação desse resíduo
	T304D	Cauda C-terminal	Mutação fosfomimética
	Y307F	Cauda C-terminal	Impede a fosforilação desse resíduo
	Y307E	Cauda C-terminal	Mutação fosfomimética
	L309Δ	Cauda C-terminal	Deleção do resíduo L309, que impede a metilação

Na Tabela 4 encontram-se as informações detalhadas de cada um dos mutantes utilizados. Todas as mutações foram selecionadas a partir de estudos anteriores do grupo em função de sua capacidade de interferir negativamente na interação com as fosfatases 2A.

Tabela 4. Mutantes da TIPRL, localização e fenótipo esperado.

Construção	Mutante	Localização	Fenótipo esperado
pcDNA 3.1 (+)- neo-HA tag	D71L	Helix $\alpha 2$	Perda da interação com PP2A, PP4 e PP6
	I136T	Fenda de	
	F180A		
	L182A	interação com	Mutante fosfomimético. Perda da interação com PP2A, PP4 e PP6
	R200A	a PP2A	
	S239E		

* D71L e I136T (Smetana e Zanchin, 2007) e F180A, L182A, R200A e S239E (Scorsato et al, 2016)

3.2 Cultura de células de mamíferos

Doze linhagens celulares de humano, macaco (*Cercopithecus aethiops*) e camundongo, foram utilizadas nesta pesquisa. Essas células foram cultivadas em meio de cultura próprio e mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ (Tabela 5).

A manutenção das células foi realizada com trocas periódicas de meio de cultura (aproximadamente a cada 2 ou 3 dias). A confluência das células foi mantida a 70% através de passagens utilizando solução de tripsina/EDTA.

Tabela 5. Descrição das linhagens celulares utilizadas neste estudo.

Linhagem	Origem	Célula neoplásica	Tecido	Meio de cultivo
NIH/3T3	Camundongo	Não	Fibroblastos	DMEM
Balb/3T3	Camundongo	Não	Fibroblastos	DMEM
Neuro2A	Camundongo	Não	Neuronal	DMEM
Vero	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Não	Células epiteliais renais	RPMI
HEK293T	Humano	Não	Células embrionárias renais	DMEM
U2OS	Humano	Sim	Células epiteliais de osteossarcoma ósseo	DMEM
HeLa	Humano	Sim	Células epiteliais de câncer cervical	DMEM
HaCaT	Humano	Não	Queratinócitos	DMEM
K-562	Humano	Sim	Leucemia mieloide (medula óssea)	
HCT116	Humano	Sim	Epitelial de carcinoma colorretal	McCoy's
MDA-MB-231	Humano	Sim	Epitelial de carcinoma ductal de mama invasivo	DMEM
HepG2	Humano	Sim	Fígado (hepatocarcinoma)	DMEM

* Todas as células foram cultivadas com o respectivo meio descrito na tabela acima e suplementados com 10% soro fetal bovino (SFB) e com 1% de penicilina/estreptomicina. Cultivo em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

3.3 Transfecção transiente e produção de clones estáveis

A expressão de proteínas em células de mamíferos pode ser feita de maneira transiente ou permanente, dependendo do objetivo do experimento, neste projeto, para experimentos com transfecção transiente, foi utilizado o vetor pcDNA3.1(+), que contém um promotor forte e é ideal para esse tipo de expressão rápida nas células. Já para a produção de clones permanentes, foi utilizado o vetor pBABE que é inserido nas células através da infecção viral. Esse vetor, embora tenha uma cinética de expressão mais lenta do que o pcDNA 3.1 (O'Keefe, 2013), permitiu que as células mantenham a expressão da PP2Ac estável.

A técnica de transfecção transiente utiliza polietilenimina (PEI) (Polysciences®) para HEK293T e Lipofectamina 2000 (Invitrogen®) para as demais linhagens para a permeabilização da membrana celular, permitindo a entrada do vetor.

Transfecção transiente com PEI em HEK293T: 1×10^6 células foram ressuspendidas e plaqueadas no dia anterior à transfecção em placa de petri de 100 mm com meio DMEM *high glucose* e 10% de soro fetal bovino.

No dia seguinte, com aproximadamente 70% de confluência o meio de cultura era trocado por meio de cultura fresco e as células eram transfectadas com 10 μ g de DNA plasmidial, NaCl 150 mM e 10% de PEI, as células eram mantidas em incubadora por 24 horas e após esse período o meio de cultura era renovado novamente. Após 48 horas de transfecção, as células foram coletadas das placas e utilizadas para os experimentos.

Transfecção transiente com lipofectamina: as linhagens NIH/3T3 e HepG2 foram transfectadas utilizando lipofectamina. O processo de plaqueamento é igual para o protocolo com PEI. As células são no dia seguinte transfectadas com 600 μ l de OptiMEM, 7,5 μ l de Turbofectin 8.0 (OriGene, TF81001) e 5 μ g de DNA. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado, e com 48 horas de transfecção as células foram coletadas.

Clones estáveis: primeiramente, é feito o empacotamento das partículas virais com o vetor pBABE contendo as construções de interesse, utilizando células HEK293 *platinum-E* (Plat-E), que é uma linhagem celular de empacotamento retroviral. As células, previamente mantidas em cultura sob seleção de antibióticos com puromicina (1 μ g/ml) e blasticidina (10 μ g/ml), foram plaqueadas (1×10^6 células) em uma placa de 60 mm; no dia seguinte as células foram transfectadas pelo protocolo de transfecção mediada por cálcio, com 10 μ g de DNA, 2,5 M CaCl_2 , 25 μ M de concentração final de cloroquina diluída em tampão HBS.

Oito horas depois, a mistura de transfecção foi removida e o meio de cultura trocado por meio DMEM fresco com 10% de soro fetal bovino. Após 48 horas, o sobrenadante com vírus foi filtrado em um filtro com poro de 0,2 μ m e baixa ligação de proteínas. As células que iriam ser infectadas foram plaqueadas, Neuro2A (1×10^6) e

NIH/3T3 (4×10^5), no dia anterior, em uma placa de 60 mm. Para a infecção, o meio de cultura das células foi removido e trocado por 3 ml do sobrenadante com vírus preparado e filtrado anteriormente, mais 6 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno (concentração final).

A infecção ocorreu por 4 horas, o sobrenadante foi removido e trocado por meio fresco. Após 24 horas de infecção, as células começaram a ser selecionadas pela resistência ao plasmídeo com antibiótico puromicina (5 $\mu\text{g/ml}$). A expressão da PP2Ac foi monitorada ao longo do tempo pela técnica de *Western blot*.

3.4 Imunoprecipitação e *Western blot*

Os extratos celulares obtidos de células transfectadas transientemente ou de clones estáveis foram analisados por imunoprecipitação seguida de *Western blot* para estudos de interação proteína-proteína.

As células foram removidas da incubadora, lavadas 3x em PBS 1X e a placa foi raspada para a remoção das células aderidas. As células foram ressuspensas em tampão de lise por 30 min, e o sobrenadante separado por centrifugação. O tampão de lise utilizado foi HSB (*High Salt Buffer*) 0,6X (Migueleti et al, 2012) ou *IP Lysis buffer* (20 mM Tris pH 8,0, 135 mM NaCl, 10% glicerol, 1% w/v NP-40). A quantidade total de proteínas do sobrenadante foi medida pelo teste de Bradford usando um reagente comercial (Bio-Rad, Cat.500-0006) conforme recomendações do fabricante, e as quantidades de proteínas totais foram balanceadas entre as amostras para a imunoprecipitação. A concentração final da amostra lisado com tampão de amostra era 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. O lisado com foi incubado com resina FLAG-Agarose (Sigma A2220) ou HA-agarose (A2095) por 2 horas a 4°C. A proporção do volume de resina foi de 1% do volume total de lisado.

Após a incubação, as resinas foram lavadas uma vez em tampão de lise e mais três vezes em TBS 1X pH 7,5. O tampão de lavagem foi totalmente removido e a resina com as proteínas ligadas foram ressuspensas em 50 µl de tampão de amostra e eluídas a 95°C por 5 min.

As interações foram analisadas por meio da técnica de *Western blot*. As amostras da imunoprecipitação (IP) representam de 10 a 20% do total da amostra eluída (5 µl ou 10 µl), a escolha da concentração foi baseada na sensibilidade do anticorpo que seria detectado com aquela amostra. Já as amostras de lisado (WCE) foram 30 µg de proteína. Para isso, as proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,2 µm. As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio composto por 3% de leite sem gordura ou 5% de albumina bovina (BSA) em 1x PBS-T (0,05% Tween-20) ou 1x TBS-T (0,05% Tween-20), por 1 hora. Para anticorpos fosfo-específicos, houve o cuidado de não utilizar tampão fosfato (PBS-T) para as incubações de *Western blot*. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas em PBS-T ou TBS-T e incubadas com anticorpos específicos (Tabela 6) diluídos em PBS-T ou TBS-T, por no mínimo 12 horas a 4°C. Os anticorpos oriundos do laboratório do Dr. Egon Ogris (Max Perutz Laboratories/Universidade Médica de Viena, Áustria) foram gentilmente cedidos por ele. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 3x em PBS-T ou TBS-T e incubadas por uma hora em temperatura ambiente com o anticorpo secundário correspondente.

Tabela 6. Tabela dos anticorpos utilizados nos experimentos de imunolocalização (IF) e *Western blot* (WB).

Anticorpo	Clone	Fornecedor e código	Diluição
Actina	C-2	Santa Cruz (SC-8432)	1:1000
	2A3-6A5-G2	Egon Ogris lab	1:200
	Policlonal	Cell Signalling (4968)	1:1000
AKT total	C67E7	Cell Signalling (4691)	1:1000
AKT p-S473	D9E	Cell Signalling (4060)	1:1000
Alpha4	Policlonal	Egon Ogris lab	1:5000
	Policlonal	Bethyl (A300-471A-T)	1:1000
B/B55 α	2G9	Santa Cruz (81606)	1:1000
	2G9	Egon Ogris lab	1:200
B'/B56 α	Policlonal	Egon Ogris lab	1:5000
FLAG tag	M2	Sigma (F3165)	1:10.000
	6B2-C3	Egon Ogris lab	1:20.000
HA tag	HA-7	Sigma-Aldrich (H3663)	1:10.000
	C29F4	Cell Signalling (3724)	WB: 1:10.000 IF: 1:1600
	12CA5	Egon Ogris lab	1:20.000
LCMT1	C-8	Santa Cruz (365064)	1:1000
Myc tag	Myc.A7	Invitrogen (MA1-21316)	IF (1:2000) WB (1:5000)
PME-1	Policlonal	Bethyl (A304-762A-T)	1:5000
PP2Ac total	1D6	Millipore (05-421)	1:1000
	H8	Egon Ogris lab	1:200
PP2Ac Methyl-L309	7C10	Egon Ogris lab	1:200
PP2Ac non-Methyl-L309	1D7	Egon Ogris lab	1:200
PP2Ac p-T304	6E5-3A6	Egon Ogris lab	1:5
PP2A Subunidade A	Policlonal	Egon Ogris lab	1:5000
	Policlonal	Bethyl (A300-963A-T)	1:1000
PP6c	Policlonal	Bethyl (A300-844A)	1:5000
PP4c	Policlonal	Bethyl (A300-893A)	1:5000
PTPA	Policlonal	Cell Signalling (3330)	1:1000
S6K total	49D7	Cell Signalling (2708)	1:1000
S6K p-T389	108D2	Cell Signalling (8209)	1:1000
Striatina	C-10	Santa Cruz (SC-398242)	1:1000
TIPRL	Policlonal	Sigma (HPA027995)	1:5000
	6E5-3A5	Egon Ogris lab	1:200
	Policlonal	Bethyl (A300-663A)	1:1000
	G-13	Santa Cruz (165701)	1:1000

Os anticorpos secundários utilizados para *Western blot* foram anti-*mouse* (Sigma-Aldrich, cód A9044) e anti-*rabbit* (Cell Signaling, cód 7074p2), ambos na diluição 1:10.000 em PBS-T ou TBS-T (quando o anticorpo primário era fosfoespecífico).

Após a incubação no secundário as membranas foram incubadas com substrato ECL Clarity (BioRad, *Clarity™ Western ECL Substrate #1705060*) conforme instruções do fabricante, e expostas a filme de raio X (GE Healthcare).

3.5 Ensaio de atividade da fosfatase PP2A

A atividade catalítica da fosfatase 2A foi quantificada em um ensaio colorimétrico utilizando proteínas isoladas de células transfectadas através de imunoprecipitação com epítipo FLAG. A presença de atividade enzimática comparável a PP2A WT em um mutante atesta que aquela mutação não impediu a montagem correta da holoenzima, ou seja, não comprometeu a biogênese.

Quando a atividade não foi detectada ou foi reduzida, concluímos que: 1) a mutação afetou o sítio ativo, ou 2) a mutação comprometeu a biogênese. É possível distinguir os dois casos com base nas estruturas cristalográficas disponíveis, pois já é conhecida a posição de resíduos do sítio ativo.

Para o ensaio de atividade enzimática foi utilizado pNPP p-nitrofenilfosfato (Sigma 20-106) como substrato. O ensaio enzimático foi realizado como descrito em Migueleti et al, (2012). Este substrato é habitualmente utilizado em ensaios espectrofotométricos de fosfatases. As fosfatases agem catalisando a hidrólise do pNPP liberando fosfato inorgânico e a base conjugada de para-nitrofenol (pNP). O fenolato resultante da hidrólise é amarelo. Quanto maior a atividade da fosfatase, mais amarela a solução ficará, caso contrário a solução permanecerá transparente.

Após a imunoprecipitação, as proteínas foram incubadas em solução pNPP por 30 min a 30°C. O sobrenadante desta reação foi transferido para uma placa e a leitura da intensidade da coloração foi lida em Leitor de Microplacas de Absorbância (EnSpire,

Perkin Elmer) com protocolo de leitura de absorvância 405 nM (o pNPP tem uma absorção máxima a 405 nm) (Lorenz, 2011). O protocolo utilizado no leitor EnSpire, presente no LNBio, foi de 100 *flashes* por amostra (poço da placa), altura da medida 3 mm e comprimento de onda de 405 nm.

Também foi utilizado para mensurar a atividade da PP2A um kit composto por um substrato para proteínas fosfatases cuja intensidade de sinal de fluorescência pode ser analisada por leitor de absorvância. Esse substrato é segundo o fabricante 100x mais sensível que substratos comumente utilizados como pNPP. Diferente do protocolo do pNPP que se pode apenas fazer um ponto de leitura, este kit permite uma leitura contínua da reação por meio da emissão da fluorescência.

O kit *EnzChek® Phosphatase Assay Kit (Thermo Fisher E12020)* é composto por um substrato fluorescente que reage a ação de desfosforilação da PP2A. Para os ensaios, a PP2A foi imunoprecipitada pelo *tag* FLAG e incubada com o substrato fosfato de difluoro-4-metilumbeliferil (DiFMUP) presente no kit, conforme instruções do fabricante. A leitura foi conduzida em leitor de placas EnSpire com protocolo de absorvância ~358/455 nm a 37°C com intervalos regulares a cada 14 segundos por aproximadamente 10 minutos totalizando 40 pontos de leitura.

3.6 Ensaios de imunolocalização

Para os ensaios de imunolocalização, foram utilizadas as linhagens de NIH/3T3 obtidas durante o estágio BEPE (Universidade Médica de Viena/Áustria): pBABE-puro-HA-PP2Ac e pBABE-neo-Myc-TIPRL, expressando, respectivamente, as proteínas HA-PP2Ac e Myc-TIPRL. As células (5×10^5) foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de 13 mm para microscopia em meio apropriado (meio DMEM suplementado

com 10% de soro fetal bovino e os antibióticos: penicilina, streptomina, puromicina e G418). No dia seguinte, as células foram lavadas em tampão PBS 1X por três vezes e fixadas em solução fixadora (3,7% formaldeído com 0,2% Triton X-100 em PBS 1X), por 20 minutos. As células foram então lavadas novamente por três vezes em tampão PBS 1X e bloqueadas em solução bloqueadora (3% *bovine serum albumin* (BSA) com 0,2% Triton X-100 em PBS 1X), por uma hora.

Após a fixação e bloqueio, as células foram incubadas por 16 horas com os anticorpos primários dos *tags* HA da PP2A HA-Tag *rabbit* vide Tabela 6 anticorpo C29F4 e Myc da TIPRL Myc-Tag *mouse*, vide Tabela 6, anticorpo MA1-21316. Após a incubação, as células foram lavadas 3x em PBS 1X e incubadas com os anticorpos secundários anti-*mouse* e anti-*rabbit* marcados com fluoróforo (Alexa 488 ou Alexa 546, *Thermo Fischer Scientific*) por 2 horas. Após a incubação, as lamínulas com as células foram montadas utilizando solução de montagem para microscopia com fluoróforo DAPI para marcar o núcleo celular.

As imagens foram coletadas no microscópio do tipo confocal Leica (TCS SP8) presente no Laboratório de Bioimagens do LNBio (*Biological Imaging Facility*, LBI) sob supervisão da especialista Dra. Marília Meira Dias.

3.7 Diferenciação de células Neuro2A (N2a)

Nos experimentos de diferenciação celular para a formação de neuritos, as células N2a foram mantidas em baixa confluência (aproximadamente 40%) em meio de cultura com baixo nível de soro (soro fetal bovino 0,1% em DMEM) por 72h. A presença das projeções neuritos foi conferida por microscopia de contraste de fase.

Os níveis de TIPRL e da PP2Ac metilada e não metilada no resíduo Leu309 foram avaliados após o tratamento; para isso as células foram lisadas, imunoprecipitadas e analisadas por *Western blot* e anticorpos específicos para PP2Ac total, metil-L309 PP2A e não metil-L309 PP2A. O anticorpo actina foi usado como controle.

3.8 Análise de dados

Para quantificação de resultados de experimentos de IP/*Western blot*, os resultados de três experimentos independentes foram analisados, os níveis de proteínas imunoprecipitadas foram quantificados por densitometria com o *software* ImageJ e o experimento mais representativo foi selecionado para publicação. Os sinais de *Western blot* foram normalizados por HA-PP2A WT. Para controle negativo de IP foram utilizadas células transfectadas com plasmídeo sem o inserto.

4. RESULTADOS

Capítulo 1

Superexpressão e teste de atividade da PP2A selvagem e mutantes

4.1 Expressão da PP2A em transfecções transientes

Mutantes da subunidade catalítica da PP2A, principalmente nos resíduos da cauda C-terminal, são utilizados para estudar a interação com as suas outras subunidades A e B, assim como com as suas proteínas modulatórias da biogênese $\alpha 4$, PTPA, LCMT1, PME-1 e TIPRL.

Mutações sítio-dirigidas foram usadas no plasmídeo pcDNA3.1(+)*neo*-FLAG-PP2Ac (Tabela 3) e pcDNA3.1(+)*neo*-HA-TIPRL (Tabela 4) visando empregar o protocolo de transfecção transiente. Células HEK293T foram transfectadas utilizando polietilenimina (PEI). O PEI atua na célula através da condensação do DNA plasmidial em partículas positivamente carregadas, permitindo assim sua ligação à superfície celular aniônica. O complexo do plasmídeo ligado ao PEI é endocitado pelas células e o DNA é liberado no citoplasma (Longo et al, 2013).

Após 48 horas de transfecção, as células foram coletadas, lisadas, e as proteínas imunoprecipitadas (IP) com resina contendo anticorpo correspondente ao *tag* conjugado. Após a IP, as proteínas imunoprecipitadas foram analisadas em experimentos de *Western blot* ou teste de atividade enzimática. Foram utilizados vetores que incluíam três mutantes da subunidade catalítica da PP2A: FLAG-H118N, FLAG-Y307F e FLAG-L309V (Figura 16).

As transfecções transientes apresentaram variações consideráveis nos níveis de expressão das diferentes construções (PP2Ac WT e mutantes), dificultando as comparações entre elas (Figura 16a), o que se refletiu no erro da quantificação da medida da atividade enzimática (Figura 16b). As amostras transfectadas com FLAG-PP2Ac e FLAG-PP2Ac-Y307F apresentaram atividade enzimática com o substrato pNPP (Figura 16b), demonstrando assim a presença de PP2A na conformação ativa após a imunoprecipitação.

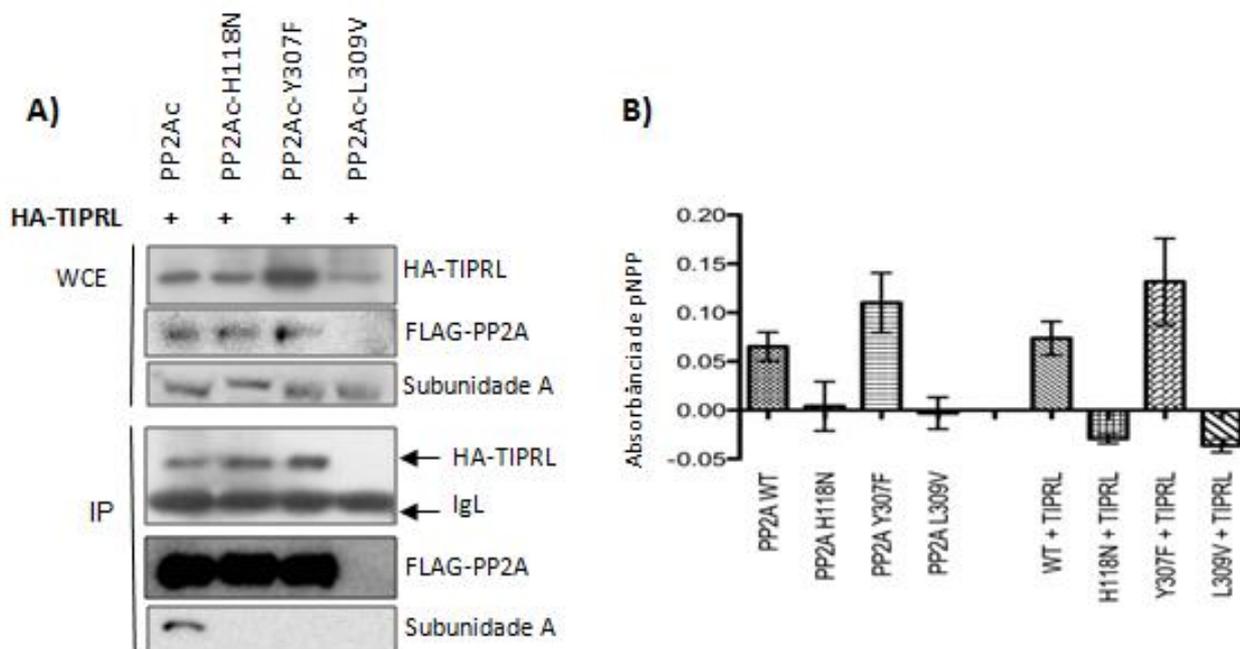


Figura 16. Interações e atividade enzimática dos mutantes da PP2A co-transfectados com TIPRL. Células HEK293T foram transfectadas simultaneamente com vetor HA-TIPRL e um dos vetores FLAG-PP2A, FLAG-H118N, FLAG-Y307F e FLAG-L309V, as células foram mantidas em cultura por 48 horas, coletadas, lisadas com tampão HSB e as proteínas imunoprecipitadas pelo epítipo FLAG. As proteínas foram resolvidas por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de 10% de acrilamida, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anticorpos específicos, HA tag (Sigma), FLAG tag (Sigma) e subunidade A (Bethyl). A) FLAG-PP2Ac, H118N e Y307F interagiram com HA-TIPRL. Não foi observada interação com L309V, porém também não se detectou expressão deste mutante (N=3). Para ensaios de teste de atividade da PP2A este mesmo protocolo de transfecção transiente e imunoprecipitação foi utilizado, B) Amostras da PP2A e os mutantes com e sem cotransfecção de TIPRL tiveram suas atividades mensuradas utilizando como substrato *para-Nitrophenylphosphate* (pNPP). As análises foram feitas no *GraphPad Prism*. O gráfico mostra a média e o erro padrão de três experimentos independentes para cada condição (com ou sem expressão de TIPRL). Os dados se referem à absorbância do pNPP após subtração do branco (n=3).

O mutante do sítio ativo H118N não demonstrou atividade enzimática, conforme esperado, porém seus níveis de expressão foram muito menores do que o controle WT. Já o mutante Y307F fosfomimético mostrou ser mais expresso que o controle selvagem, demonstrando atividade proporcionalmente maior. A mutação L309V teve um grande

impacto na enzima, resultando em níveis de expressão transiente muito baixos e atividade enzimática nula (Figura 16 a,b).

4.2 Expressão da PP2A em clones estáveis

Além das análises experimentais realizadas por meio de transfecção transiente, também foram produzidos clones estáveis da HA-PP2A utilizando o vetor retroviral pBABE. O objetivo da produção e manutenção de clones estáveis é ter uma população de células igualmente expressando um gene exógeno, ensaiando um cenário mais próximo da homeostase celular. Esses clones apresentam como característica a expressão da proteína exógena em níveis menores em comparação à transfecção transiente, porém de forma constante e de maior permanência ao longo do tempo.

Na produção dos clones estáveis, as células passam por um processo de seleção com antibiótico no qual somente células transformadas sobrevivem. Nesse processo uma população de células controle que não expressa o gene de resistência também é mantida em meio de cultura seletivo para um acompanhamento da morte celular e seleção, somente quando todas as células estavam mortas nessa placa controle consideramos a seleção concluída.

Foram produzidos clones estáveis da PP2A em duas linhagens celulares, NIH3T3 e Neuro2A. Para a padronização, foram testadas amostras do lisado celular (WCE) para a checagem da expressão da proteína. O nível de expressão da PP2A com *tag* HA foi apropriado em todos os clones em células NIH-3T3 (NIH-3T3 puro-pBABE-HA) e N2a (N2a puro-pBABE-HA) (Figura 17 a,c), essas células foram mantidas em cultura com meio seletivo com puromicina para experimentos futuros.

A mesma linhagem celular N2a, no entanto, perdeu a expressão da HA-PP2A quando expressava o vetor pcDNA 3.1 (N2a pcDNA3.1-HA) mesmo somente após 21 dias de cultura (Figura 17 b), deste modo pode-se concluir definitivamente que este vetor não é apropriado para o estabelecimento de clones estáveis da PP2Ac.

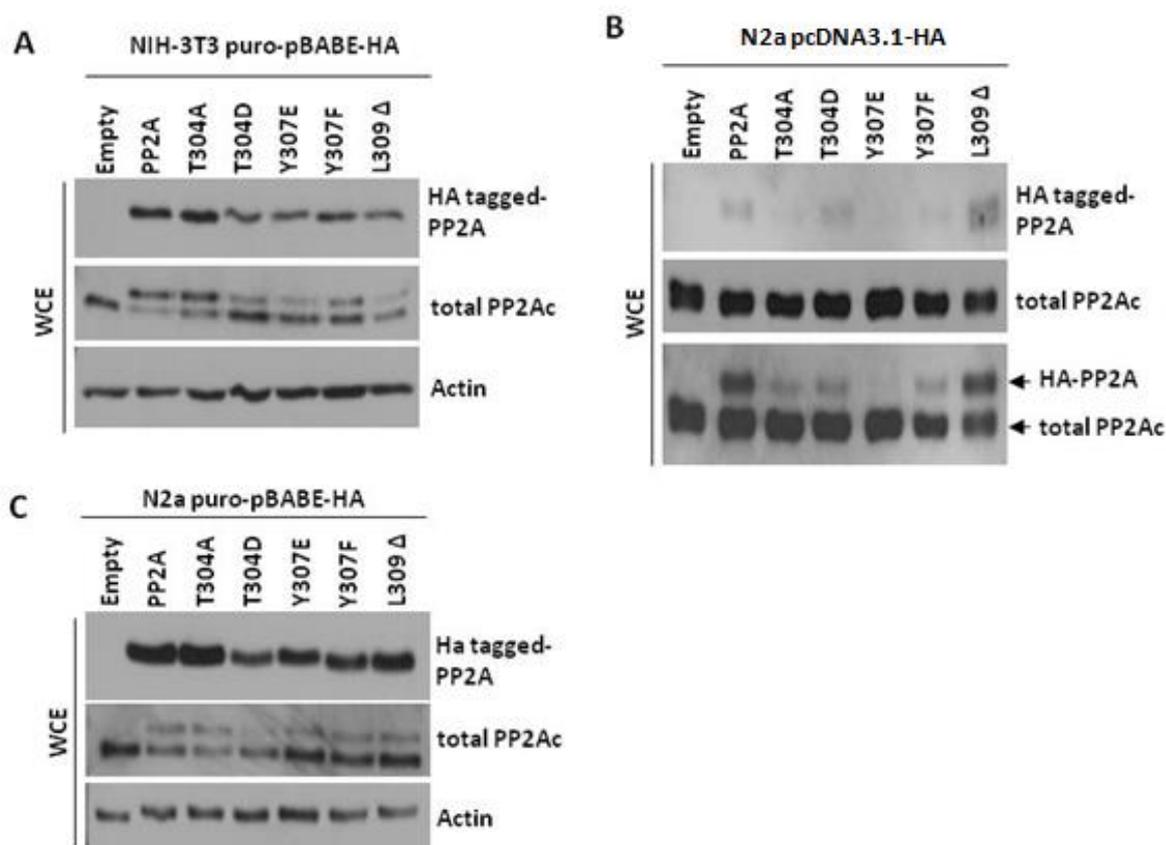


Figura 17. Análise dos níveis de expressão no extrato celular total (WCE) de duas linhagens celulares expressando a PP2Ac e seus mutantes. As células de ambas as linhagens foram coletadas, lisadas com tampão *lysis buffer* e as proteínas resolvidas em gel de 10% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anticorpos específicos para HA *tag*, subunidade catalítica da PP2Ac e actina provenientes do Egon Ogris lab. A) Células NIH3T3 expressando o plasmídeo puro-pBABE-HA-PP2Ac mostraram níveis de expressão equivalentes de HA-PP2Ac e dos mutantes, esses clones foram utilizados em experimentos seguintes. B) Os clones estáveis de Neuro2A com o vetor pcDNA3.1 perderam a expressão da HA-PP2Ac após 21 dias de cultura. C) Os clones estáveis de Neuro2A com o vetor pBABE estavam homogêneos e adequados entre todas as construções após 21 dias.

Esse experimento demonstrou a vantagem dos clones da PP2Ac em pBABE. Este vetor retroviral para clonagem e expressão é, portanto, mais adequado para manter a expressão da PP2A regular em cultura celular. O vetor pBABE é transportado por um vírus murino que é encapsulado em células HEK293-PlatE.

O sobrenadante com vírus foi usado para infectar a célula parental N2a. Após 21 dias da infecção, sob seleção de antibiótico puromicina, a expressão de PP2A foi verificada usando *Western blot* com anticorpos do *tag* HA e da PP2Ac endógena, constando-se que a expressão obteve um nível proporcional entre os clones dos mutantes.

4.3 Estabelecimento de um sistema de coexpressão de PP2Ac e TIPRL

Foram produzidos clones que coexpressavam a Myc-TIPRL com a HA-PP2A selvagem ou um dos dois mutantes fosfomiméticos T304D e Y307F (Figura 18a).

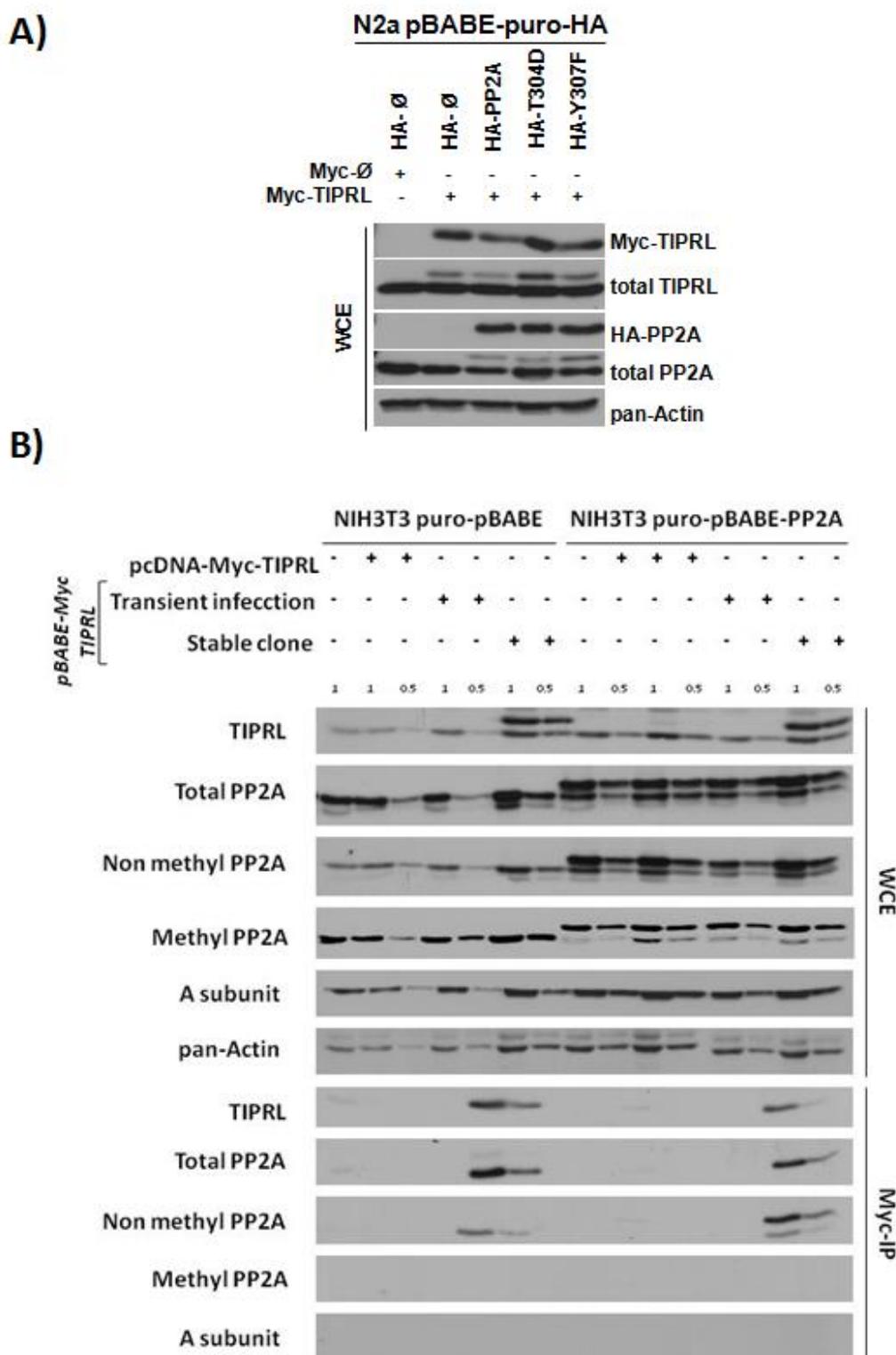


Figura 18. Análise da expressão dos clones estáveis da coexpressão das proteínas Myc-TIPRL e HA-PP2Ac em duas linhagens. A) Células Neuro2a foram mantidas em cultura com meio contendo antibiótico para a seleção dos clones. As células foram coletadas, lisadas com tampão *Lysis buffer* e as proteínas imunoprecipitadas pelo epítipo Myc. As proteínas foram resolvidas em gel de 10% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anticorpos específicos, todos os anticorpos foram provenientes do laboratório Egon Ogris lab. O lisado celular da HA-PP2Ac, controles

(plasmídeos HA e Myc vazios) e os mutantes (HA-PP2A-T304D e HA-PP2A-Y307F) foram analisados com anticorpos dos *tags* HA e Myc, da PP2A endógena e da actina (Egon Ogris lab) como controle de carregamento no gel. B) Teste de coexpressão da HA-PP2A e Myc-TIPRL por meio de transfecção transiente, transdução transiente e clone estável após incubação de 48 horas, o vetor puro-pBABE vazio foi usado como controle. As amostras foram aplicadas no gel em duas concentrações de (1x e 0,5x) para uma melhor definição das bandas.

Esses clones foram analisados simultaneamente pela expressão da PP2Ac e da TIPRL obtidas por três métodos diferentes lado a lado: 1) transfecção transiente, 2) transdução transiente, ou seja, infecção por vetor viral com o plasmídeo pBABE com somente 48 horas de incubação da infecção e 3) clone estável (Figura 18b).

Assim como observado nas padronizações com a HA-PP2Ac, as construções contendo o plasmídeo pcDNA3.1 foram mais vantajosas que o pBABE quando o objetivo do experimento era a rápida e intensa expressão da proteína, por exemplo no caso de transfecções transientes, visando a alteração de fenótipo, no entanto, a variabilidade deste tipo de tratamento é maior dentro do experimento. Já os clones estáveis apresentaram um melhor controle da expressão em comparação à super expressão transiente, sendo, portanto, ideais para a comparação e quantificação das interações.

4.4 Silenciamento da TIPRL

Sabe-se que a proteína TIPRL inibe a atividade de PP2A *in vitro*, no entanto, ainda não há nenhum ensaio que demonstre como o silenciamento da TIPRL pode interferir na montagem final do heterotrímero. Buscando reduzir a quantidade de proteína TIPRL na célula para elucidar sua função na regulação e biogênese da PP2A, foi utilizada inicialmente a estratégia do silenciamento transiente com RNA de interferência (esiRNA).

Em uma primeira etapa, padronizamos a técnica de transfecção com o esiRNA da proteína fluorescente GFP em células HEK293 (Figura 19a). Foram realizadas

transfecções transientes nestas células com o pcDNA3-FLAG-GFP mais o esiRNA-GFP. Foram testadas três concentrações de esiRNA-GFP (100 ng/ml, 200 ng/ml e 400 ng/ml), das quais a concentração 400 ng/ml apresentou a melhor redução na expressão da proteína FLAG-GFP (dados não mostrados)

Na Figura 19b pode-se observar o resultado do silenciamento transiente de FLAG-GFP. A análise por *Western blot* com anticorpo específico para o epítopo FLAG mostrou uma visível redução na quantidade da proteína FLAG-GFP, porém, a ausência de um anticorpo adequado para controle endógeno na época desses experimentos impediu uma quantificação do resultado.

Após a padronização da transfecção de esiRNA usando GFP, foi testada a ação do esiRNA específico da proteína TIPRL (Figura 19c). Após a transfecção das células HEK293 com pCDNA-FLAG-PP2Ac WT e tratamento com esiRNA-TIPRL, pode-se notar que houve uma redução na expressão de TIPRL endógena, confirmando seu silenciamento. Porém, observou-se também uma redução geral na quantidade de células em comparação aos tratamentos controle sem esiRNA-TIPRL e com o esiRNA-GFP, o que indica que a ação do esiRNA-TIPRL possa inibir a proliferação ou provocar a morte celular.

Apesar do sucesso na inibição da expressão de TIPRL endógena em células HEK293 utilizando esiRNA, não foi dado a continuidade ao uso da estratégia devido vários fatores como a baixa reprodutibilidade entre experimentos, o aparente efeito tóxico observado pela redução de número de células, e o alto custo da realização desse tipo de experimento em uma escala maior, que se faz necessária para experimentos de imunoprecipitação com resultados quantificáveis.

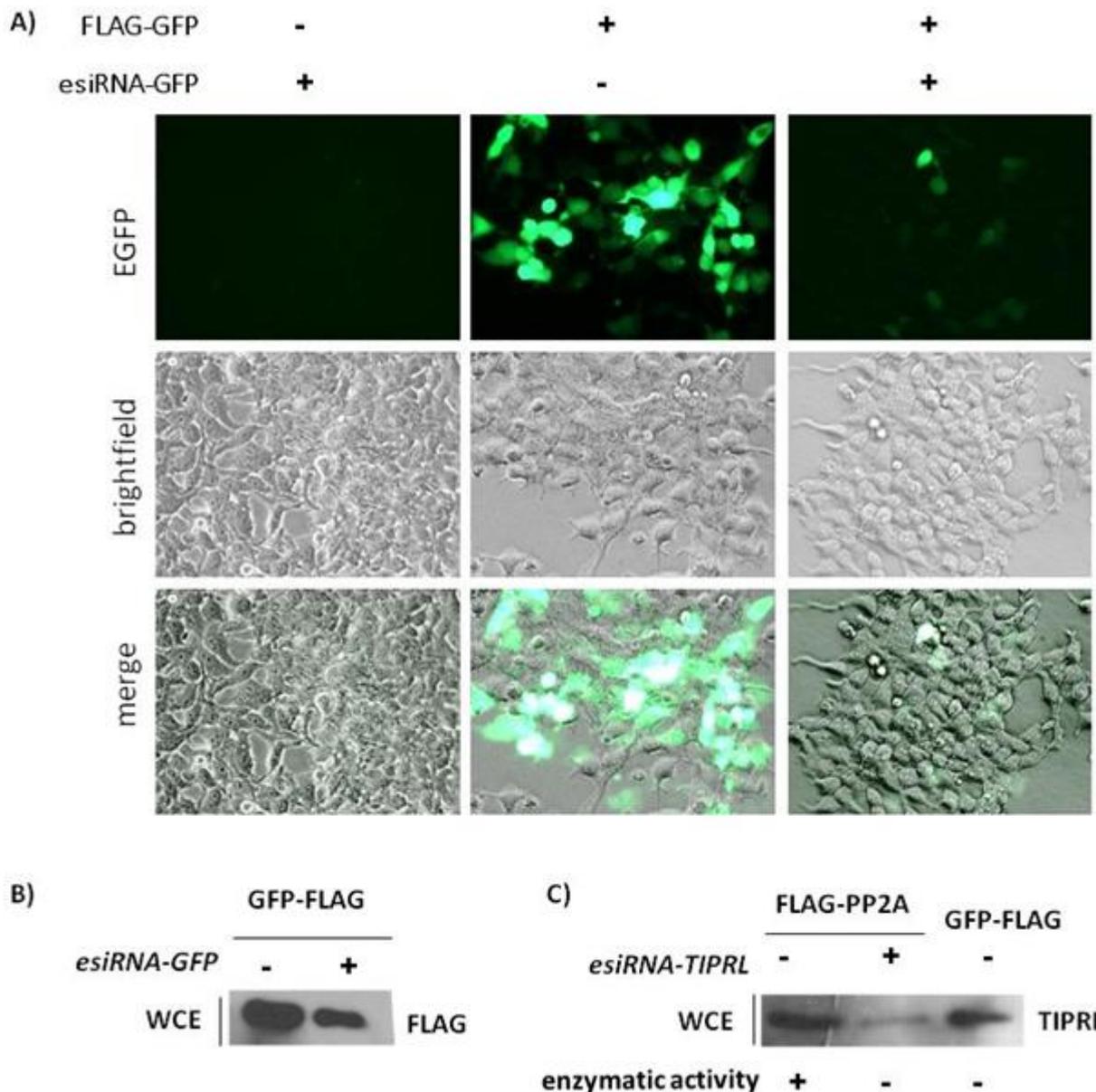


Figura 19. Padronização da transfecção do esiRNA-GFP e esiRNA-TIPRL em células HEK293 com pcDNA-FLAG-GFP e pcDNA-FLAG-PP2Ac. A) Células HEK293 transfectadas com FLAG-GFP com tratamento de esiRNA-GFP foram visualizadas em microscópio de fluorescência com filtro para detecção de GFP, as imagens foram capturadas em campo claro (*Brightfield*) e fluorescência (GFP). B) Estas mesmas células foram lisadas com tampão HSB e as proteínas foram resolvidas em gel de 10% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anticorpos FLAG *tag* (Sigma), houve redução na quantidade da proteína GFP nas células tratadas com esiRNA-GFP. C) células HEK293 foram transfectadas com FLAG-PP2A e tratadas com esiRNA-TIPRL e analisadas por *Western blot* com anticorpo anti-TIPRL (Bethyl) e teste de atividade com pNPP, houve redução da TIPRL endógena na amostra com tratamento esiRNA-TIPRL, e os sinais de “+” e “-” indicam a presença de atividade

enzimática de PP2A nos imunoprecipitados. Tratamento nas células com 400 ng/ml de esiRNA em células previamente transfectadas (N=3).

Foi possível obter apenas resultados qualitativos e preliminares da atividade de FLAG-PP2Ac nos imunoprecipitados (IP FLAG), indicada como “+” (com atividade, coloração amarela no ensaio do pNPP) ou “-” (sem atividade, incolor) na Figura 19c. Aparentemente, o silenciamento de TIPRL resultou em perda da atividade de PP2A nesse experimento, porém, isso pode estar relacionado com o efeito tóxico do siRNA e não necessariamente com a regulação de PP2A por TIPRL.

4.5 Status da TIPRL após diferenciação em linhagem neuronal (Neuro2A)

Para analisar a metilação do último resíduo L309 da cauda C-terminal da PP2A e o possível papel da TIPRL neste evento, foi utilizada a linhagem Neuro2A. Sabe-se que a diferenciação por privação de soro fetal bovino (DMEM + 0,1% de SFB) em células N2a resulta no desenvolvimento de projeções longas semelhantes a neuritos, esse processo depende totalmente de que o resíduo L309 da cauda C-terminal da PP2Ac esteja metilado (Sontag et al, 2008). Com o objetivo de observar a interação da TIPRL sob condição de diferenciação, foi utilizada a linhagem Neuro2A estavelmente expressando a HA-PP2Ac e o respectivo vetor vazio de HA após tratamento de privação de SFB por 72 horas (Figura 20).

Houve uma aparente redução na interação da TIPRL com PP2Ac, mas esse resultado foi devido a uma menor quantidade de PP2A na amostra que contém o tratamento, como pode-se observar em uma exposição menor da banda de *Western blot* da PP2A total. Assim, este experimento indica que a interação entre TIPRL e PP2Ac não

é afetada por essa condição de diferenciação provocada pela privação de SFB. Essa estratégia não foi mais utilizada.

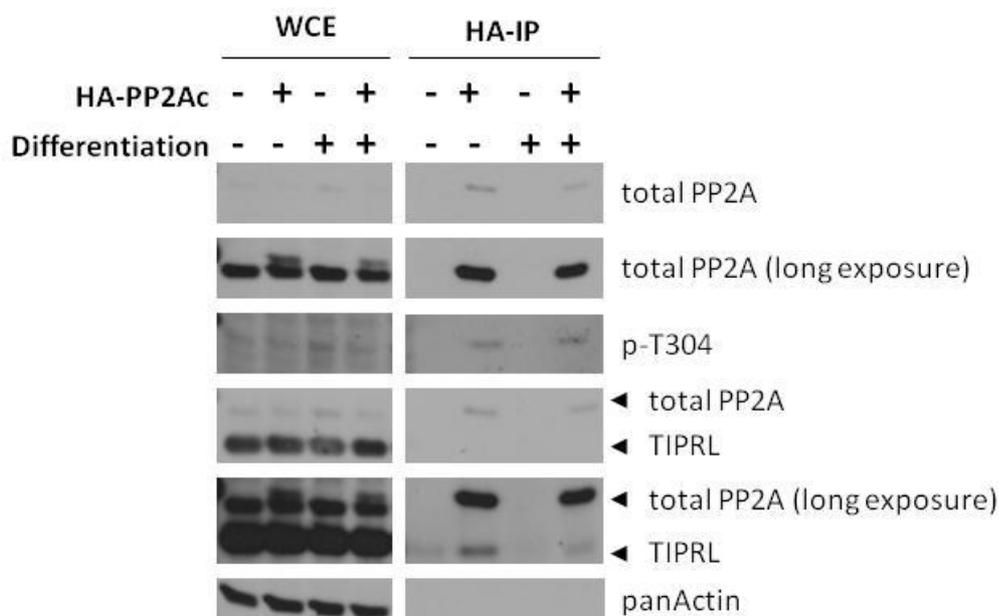


Figura 20. Diferenciação de células Neuro2A pelo tratamento de estresse nutricional não alterou a interação entre TIPRL e PP2Ac. Clones estáveis de Neuro2A que expressavam PP2Ac sofreram estresse por falta de soro fetal bovino, elas foram mantidas em meio DMEM com soro fetal bovino a 0,1% por 72 horas. As células foram coletadas, lisadas com tampão *Lysis buffer* e as proteínas imunoprecipitadas pelo epítipo HA. As proteínas foram resolvidas em gel de 10% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anticorpos específicos. Como controle IP, utilizou-se amostra de vetor vazio e o anticorpo pan-Actina. Todos os anticorpos foram fornecidos pelo Egon Ogris lab. N=1.

4.6 A interação de TIPRL com PP2Ac é sensível ao pH

Durante o protocolo de imunoprecipitação, são feitas quatro lavagens na resina após a incubação, com o objetivo de remover interações inespecíficas entre a proteína marcada (isca) e as proteínas interactoras endógenas. Normalmente, a primeira lavagem é efetuada com o próprio tampão da lise das células e as outras três lavagens são realizadas a com tampão 1X TBS em pH 7,5 fisiológico, todas as lavagens a 4°C.

As mesmas lavagens foram realizadas na resina, porém com o pH do tampão TBS mais elevado (pH 9,6). Surpreendentemente, após essas lavagens apenas a TIPRL perdeu a interação com a PP2A e seus mutantes. Outras interações conhecidas com as subunidades da PP2A, tais como a subunidade A e a B55, não foram afetadas pelo pH elevado (Figura 21). O pH muito elevado é capaz de remover os grupos metil CH₃, por isso foi verificada a reatividade das amostras com anticorpo anti-metil PP2Ac, ainda assim a metilação foi preservada mesmo sob essa condição.

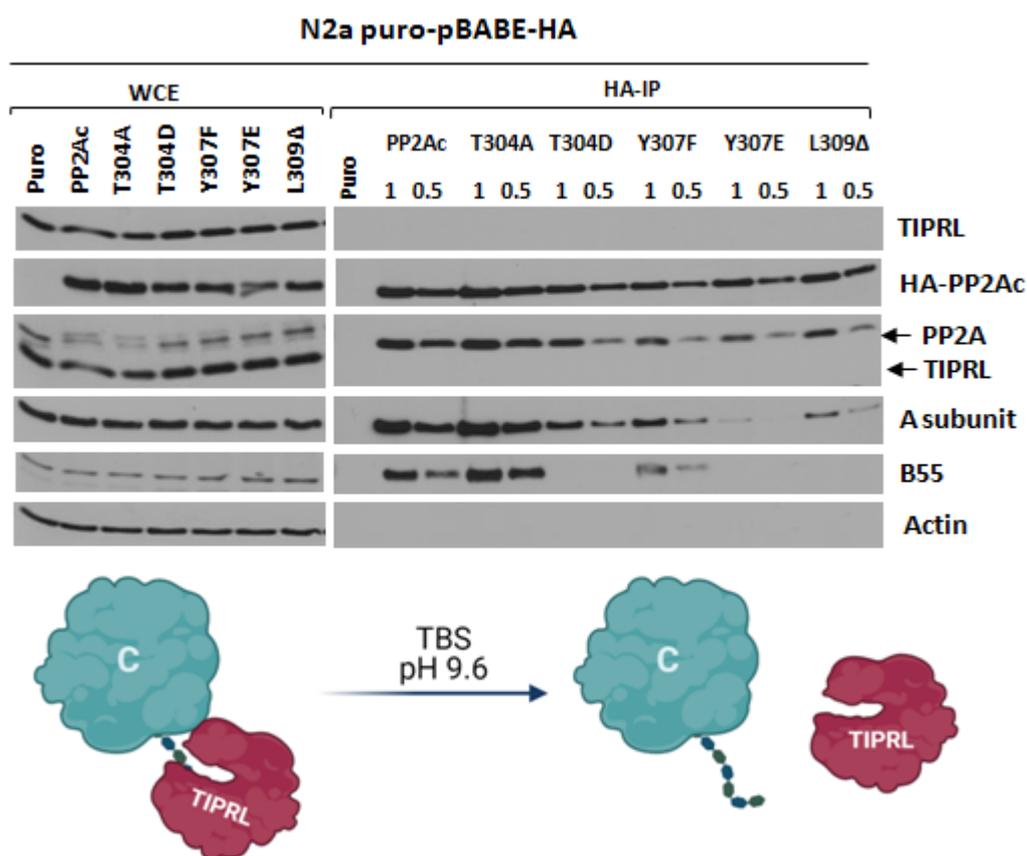


Figura 21. A interação da TIPRL com a PP2Ac realizada em pH 9,6 indicando que essa interação é sensível ao pH. Células Neuro2A expressando estavelmente a HA-PP2A e uma série de mutantes foram coletadas, lisadas com tampão Lysis buffer e as proteínas imunoprecipitadas pelo epítipo HA, nas etapas finais do protocolo de imunoprecipitação, após a incubação do lisado com as resinas sepharose foram realizadas três lavagens finais com tampão 1X TBS buscando a eliminação de interações inespecíficas em tampão com pH 9,6. As proteínas foram resolvidas em gel de 10% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anticorpos específicos provenientes do Egon Ogris Lab. Constatou-se que somente TIPRL perdeu interação com a PP2Ac.

Vetor vazio foi usado como controle de IP e pan-Actin foi usada como controle de carregamento de amostras no gel (n=3).

Assim, este resultado mostra que a interação entre TIPRL e PP2A é sensível ao pH elevado, o que depende diretamente do pH e não de um possível efeito indireto sobre o nível de metilação da PP2Ac, talvez esse comportamento se deva ao bolsão de interação hidrofóbico de PP2A-TIPRL.

Embora este resultado não seja fisiologicamente relevante pois 9,6 não é um pH fisiológico, esta descoberta pode ser útil para a otimização de protocolos para estabelecer condições de purificação ou cristalização deste complexo, além deste resultado indicar que o complexo TIPRL-PP2Ac é particularmente sensível ao pH básico, provavelmente pelas mudanças na carga elétrica das cadeias laterais.

Capítulo 2

Expressão da TIPRL em diferentes linhagens e sua interação com as fosfatases PP4 e PP6

4.7 Expressão da TIPRL endógena em diferentes linhagens celulares

A expressão de uma proteína endógena pode variar entre tecidos e organismos, assim como a interação entre proteínas também pode se relacionar com os níveis de expressão de cada uma delas. No caso da TIPRL, a presença e intensidade da expressão continua incerta para tecidos ou mesmo linhagens celulares.

Visando analisar a expressão da TIPRL endógena em linhagens celulares de diferentes organismos e tecidos neoplásicos ou normais, dez linhagens foram escolhidas (Tabela 4) e os extratos celulares foram equilibrados pela quantidade de proteína total utilizando o teste colorimétrico de Bradford; 30 μ g desse lisado celular foram analisados pela técnica de *Western blot* usando anticorpos específicos (Figura 22).

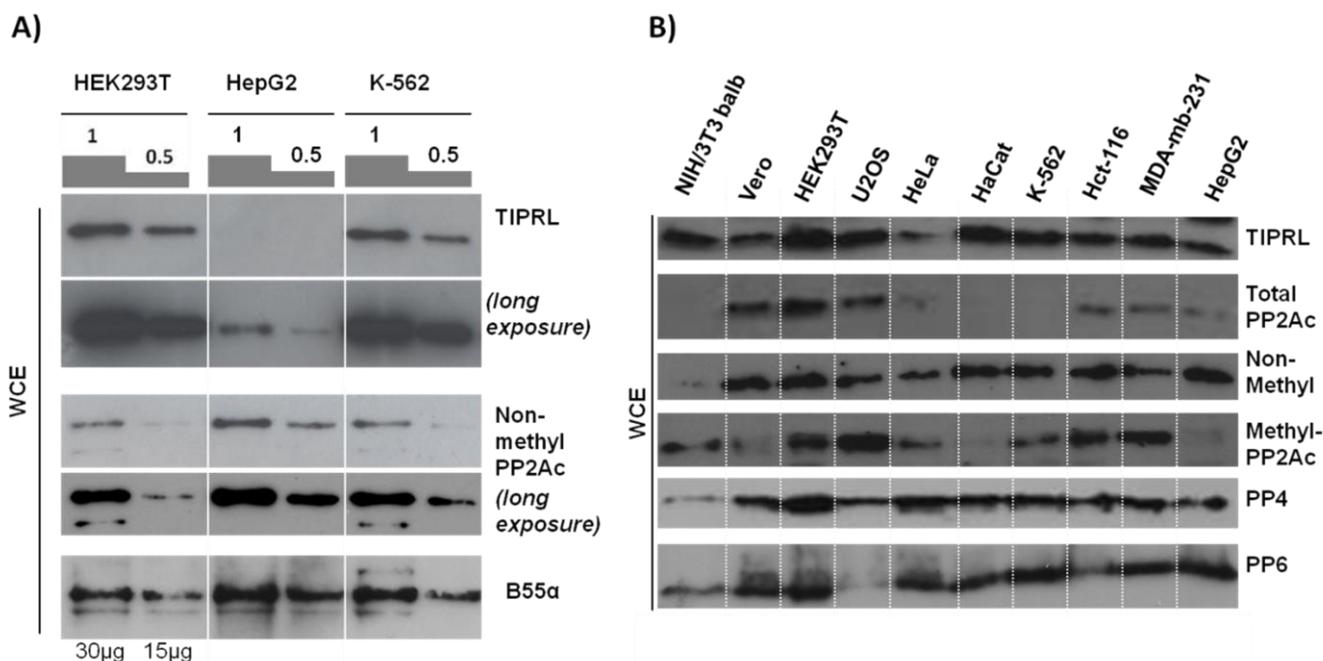


Figura 22. Expressão da TIPRL, PP2Ac, PP4c e PP6c endógenas em 10 linhagens celulares. As células das 10 linhagens foram mantidas em cultura, coletadas, lisadas com tampão *Lysis buffer* e o extrato celular (30 μ g) de cada linhagem foi resolvido em gel de 10% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anticorpos específicos, PP4 e PP6 (Bethyl) e o restante proveniente do Egon Ogris lab. A) Três linhagens foram detectadas com anticorpos TIPRL, PP2A L309 não metilada e B55 α (diluição da amostra em 30 μ g e 15 μ g), TIPRL expressa muito pouco em HepG2. B) Dez linhagens tiveram as mesmas quantidades de proteínas endógenas (30 μ g) detectadas com os mesmos anticorpos, N=3.

Conforme analisado em três repetições independentes, a expressão da TIPRL varia grandemente entre linhagens. Também foi analisada a presença da metilação no resíduo L309 da subunidade catalítica da PP2A.

TIPRL apresentou nível de expressão similar às fosfatases PP4c e PP6c em comparação a PP2A metilada. De modo consistente, TIPRL expressa muito pouco em células HeLa. Na linhagem HaCaT, a expressão da metil PP2A foi baixa e da TIPRL alta, HepG2 no entanto, expressa pouca TIPRL e metil PP2A. Em U2OS e MDA a expressão da metil PP2A foi alta e a TIPRL mediana, não se destacando muito abaixo do que aparentemente parece ser o nível basal de TIPRL (Figura 22).

Não foi possível observar correlação entre a expressão alterada da TIPRL em células malignas e células normais. Em células normais, como da linhagem HaCaT, a expressão da TIPRL foi elevada, e nas células NIH/3T3 e Vero, também normais, foi relativamente baixa. Em HEK293T, também uma linhagem de células não cancerígenas, a expressão foi moderada.

As fosfatases PP4c e PP6c apresentaram uma expressão relativamente homogênea entre a maioria das linhagens (Figura 22). Em U2OS e HCT116, a expressão dessas fosfatases é relativamente baixa, ou mesmo indetectável, em comparação à expressão da PP2Ac metilada. Dentre as linhagens testadas, aquelas com baixa expressão de PP4c tendem a apresentar baixa expressão também de PP6c, o que é coerente com uma certa redundância de funções entre essas duas fosfatases.

4.8 Impacto de mutações de TIPRL na interação com PP2Ac, PP4c e PP6c

Mutações na TIPRL foram uma importante ferramenta de estudo de perda e ganho de funções em suas interações. Smetana e Zanchin, 2007 e Scorsato et al, 2016

utilizaram uma série de mutantes da TIPRL que serviram de base para os experimentos desta pesquisa.

Smetana e Zanchin, 2007, utilizaram a técnica de duplo híbrido reverso em leveduras e encontraram algumas mutações de TIPRL (D71L, I136T, T138S, M196V e D198N) que eram deficientes na interação com PP2Ac e PP4c. Em Scorsato et al, 2016, dois desses mutantes foram utilizados em experimentos de GST *pulldown* com outros dez novos mutantes selecionados a partir da estrutura cristalográfica. Mesmo com essas mutações, a interação de TIPRL com a GST-PP2Ac não foi perdida, portanto essas mutações não foram suficientes para o rompimento desta interação *in vitro*. Já uma versão truncada de PP2Ac contendo somente os resíduos 210 até 309 demonstrou interação reduzida com alguns mutantes, chegando a perder completamente a interação com os mutantes F180A e R200A.

Esse resultado indica que interação da TIPRL com a PP2Ac expressa em *E. coli* pode não ser determinada por um único ponto de ancoragem no extremo C-terminal da PP2Ac. Dados não publicados do nosso grupo indicam que PP2Ac expressa em *E. coli* é inativa, deste modo, ainda havia a falta de informações sobre as interações destes mutantes da TIPRL com PP2Ac obtida em um modelo fisiologicamente relevante (células de mamíferos).

Para isso, foram utilizadas células humanas HEK293T transfectadas transientemente com vetor pcDNA3.1-HA-TIPRL e seus respectivos mutantes analisadas após 48 horas da transfecção. As células foram lisadas e a TIPRL imunoprecipitada pelo tag HA. As proteínas foram resolvidas em gel de poli-acrilamida e detectadas por *Western blot* com anticorpos anti-HA, PP4c, PP6c, PP2Ac total, e PP2Ac não metilada (Figura 23).

De modo geral, a expressão desses mutantes foi suficiente para a imunoprecipitação da TIPRL e de suas principais proteínas interactoras (Figura 23). As

mutações F180A e R200A foram capazes de abolir a interação de TIPRL com PP4c, PP6c e PP2Ac não metilada. Os mutantes F180A e R200A não interferem na expressão de TIPRL e seu efeito é específico sobre as interações.

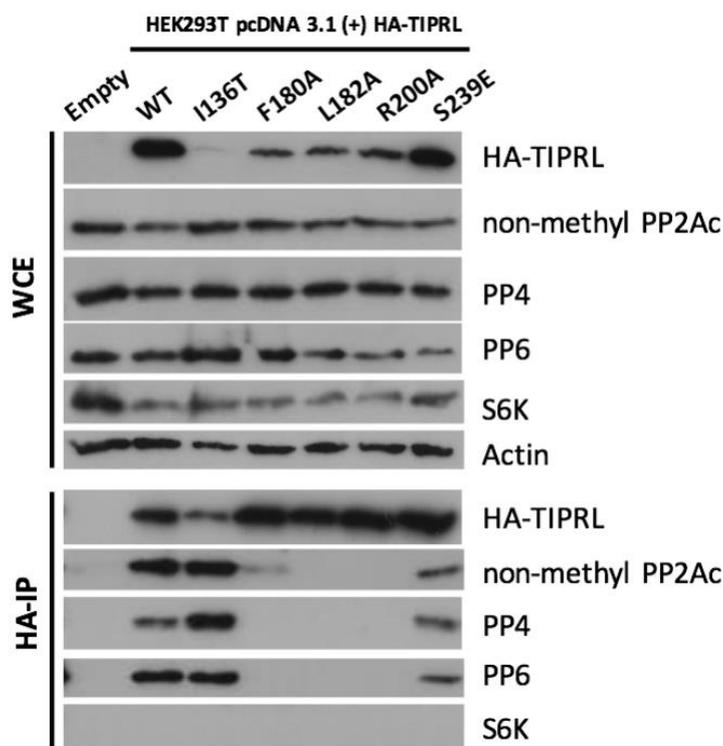


Figura 23. Mutantes da TIPRL e suas interações. Células HEK293T foram transfectadas transientemente por 48 horas, coletadas, lisadas com tampão *Lysis Buffer* e as amostras de extrato total (30 µg) e HA-IP (15% da amostra total) foram resolvidas em gel de 10% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anticorpos específicos, HA tag (Sigma), PP4c e PP6c (Bethyl) e o restante proveniente do Egon Ogris lab. PP4c e PP6c tiveram ganho de interação com pelo menos dois mutantes da TIPRL. S6K foi usada como controle negativo das interações. N=4.

Esses resultados confirmam resultados anteriores do grupo (Scorsato et al, 2016), porém a perda de interação entre PP2Ac e TIPRL que antes só foi observada com uma forma truncada da PP2Ac, agora foi detectada com PP2Ac intacta (endógena). Todavia, algumas reduções na intensidade da interação puderam ser observadas no mutante F180A e no mutante fosfomimético S239E. Além disso, o resultado mais surpreendente

foi o ganho de interação que algumas mutações (I136T e S239E) promoveram com as fosfatases PP4c e PP6c (Figura 23).

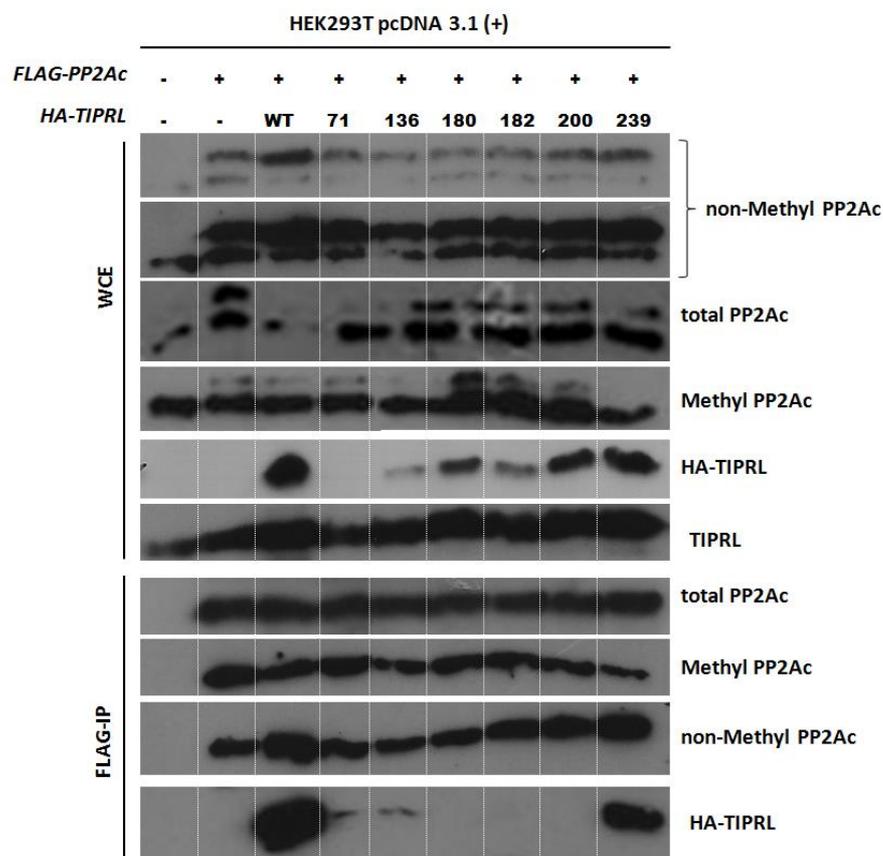
O mutante L182A, desenhado para a perda de interação com essas fosfatases, apresentou ganho de interação intensa com PP4c e fraca com PP6c (Figura 23). Contudo, este resultado não foi consistente dentro das 4 repetições independentes desse experimento. Das quatro repetições, L182A interagiu em 3 delas. Já o mutante S239E, que é uma mutação fosfomimética, também apresentou esse ganho de interação com PP4c, PP6c e com a PP2A-L309 não metilada. Esse resultado indica que uma possível fosforilação nesse resíduo seria capaz de modular as interações com PP4c e PP6c, porém esse sítio de fosforilação ainda não foi validado (Figura 23).

Este mesmo painel de mutantes da TIPRL também foram cotransfectados transientemente com a PP2Ac e tiveram as suas interações e atividade da PP2A analisadas. A IP foi realizada pela HA-PP2A e foram estudadas as interações por *Western blot* e por teste de atividades da PP2A com substrato DiFMUP (Figura 24).

De modo geral, o nível de expressão da HA-TIPRL variou entre os mutantes. Na amostra WCE do mutante D71L não houve expressão da TIPRL, os mutantes I136T e F182A expressaram menos que a TIPRL selvagem e os mutantes R200A e S239E, após a IP a interação de I136T e F182A foi insuficiente para ser detectada (Figura 24a).

Aparentemente, nas amostras IP a PP2A-L309 não metilada tem a interação mais afetada pelas mutações do que a PP2A metilada, cujo nível de expressão foi mais constante entre as amostras. Há uma tendência maior de interação da PP2A não metilada somente no mutante fosfomimético S239E (Figura 24a).

A)



B)

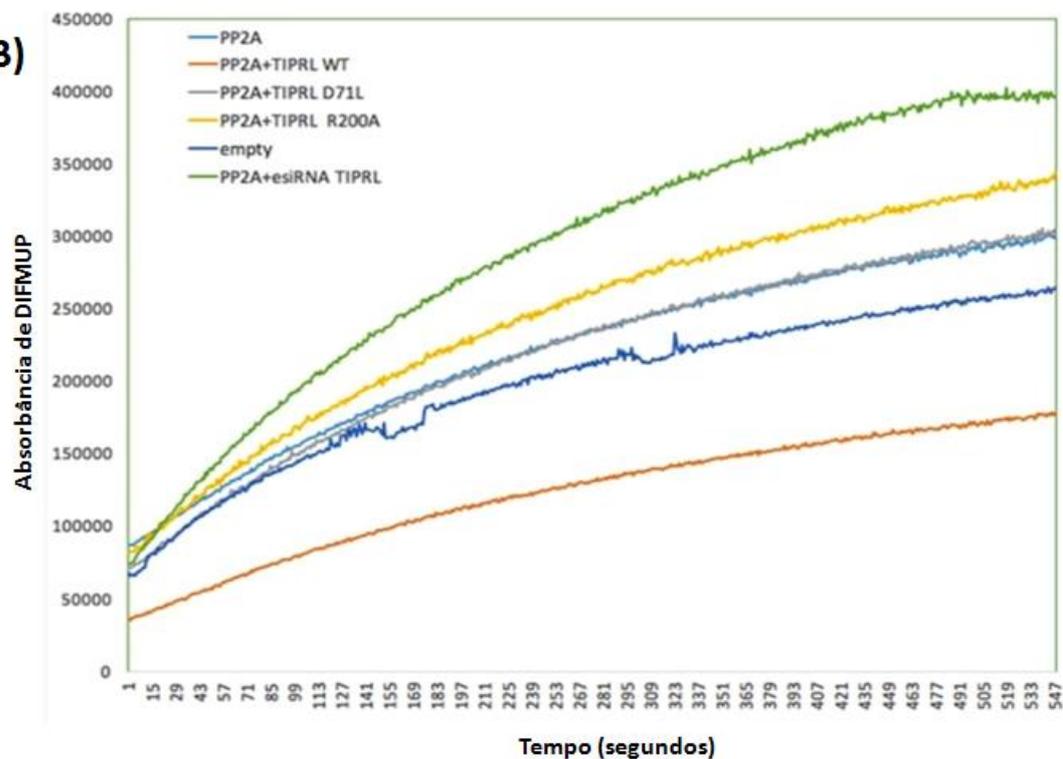


Figura 24. Coexpressão e atividade da PP2Ac com a TIPRL e mais uma série de mutantes. HEK293T foram transfectadas transientemente por 48 horas coletadas, lisadas com tampão *Lysis Buffer* e as amostras de extrato total (30 μ g) e HA-IP (15% da amostra total) foram resolvidas em

gel de 10% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas com anticorpos específicos e as interações foram analisadas por *Western blot* e teste de atividades. A) as proteínas interactoras foram analisadas por *Western blot* com anticorpos específicos, as bandas duplas de PP2Ac na amostra WCE correspondem à proteína endógena (abaixo) e FLAG-PP2Ac transfectada (acima). B) após o protocolo de imunoprecipitação as proteínas foram submetidas a teste de atividade com o substrato DiFMUP nas amostras da PP2A com e sem cotransfecção com a TIPRL e os mutantes D71L e R200A e também com amostra tratada com esiRNA-TIPRL para a análise da redução da TIPRL, N=2.

Foi testada a atividade enzimática da PP2A com dois mutantes da TIPRL e a redução da TIPRL com RNA de interferência (Figura 24b) usando como substrato o DiFMUP. O produto da reação deste substrato são sinais fluorescentes que podem ser mensurados continuamente conforme a atividade da fosfatase progressivamente ocorre. Como vantagem em relação ao pNPP, o DiFMUP é cerca de 100 vezes mais sensível e permite acompanhar em tempo real a atividade, diferente do pNPP que somente permite mensurar um único ponto de leitura após a interrupção da reação.

Assim como o teste de atividade com o substrato pNPP, com DiFMUP igualmente foi observada a atividade da PP2A após a IP da PP2A, desta vez com a visualização da cinética da enzima a cada 14 segundos durante um período total de 10 minutos, quando se aproxima do platô da leitura. No teste pode-se visualizar com distinção as diferentes curvas da leitura, no entanto, assim como ocorre nos resultados de *Western blot* os níveis de expressão desiguais comprometeram a interpretação do experimento.

De modo geral, onde a TIPRL estava reduzida ou mesmo inativada, seja pela atuação do esiRNA ou expressando os mutantes dos resíduos D71 e R200, verifica-se que a atividade da PP2A é aumentada principalmente em comparação a coexpressão da PP2A e TIPRL. Este protocolo de análise de atividade da PP2A demonstrou ter um bom potencial para experimentos futuros em que a expressão da PP2A esteja mais regular.

4.9 Imunolocalização da PP2Ac e TIPRL

A biogênese da PP2A envolve compartimentalização subcelular. A localização subcelular de TIPRL e sua colocalização com PP2Ac ainda não foram estudadas de maneira conclusiva, em parte devido à falta de anticorpos validados para a técnica de imunofluorescência. Foi testada a microscopia confocal para a imunolocalização destas proteínas em clones estáveis de Myc-TIPRL e HA-PP2Ac em células NIH/3T3, estes clones possibilitaram o uso da técnica de imunofluorescência com detecção de anticorpos específicos para os respectivos *tags*.

Os resultados apresentaram boa qualidade na obtenção dos sinais de fluorescência para a HA-PP2Ac (Figura 25). Foi possível observar também que a localização da PP2A é distinta conforme a fase da divisão celular em que a célula se encontrava (Figura 25 a,b). A PP2Ac concentra-se no núcleo durante o ciclo celular, principalmente em fases próximas a metáfase (Figura 25 a) e retorna ao citoplasma após o término da divisão (Figura 25 b,c).

Nasa et al, (2021) apresentaram evidências que mostram que quando a PP2Ac está fosforilada especificamente no resíduo de treonina 304 da cauda C-terminal ela está inativa e não agindo sobre as principais quinases responsáveis pela divisão celular, tais como CDK1, Plk1 e Aurora1.

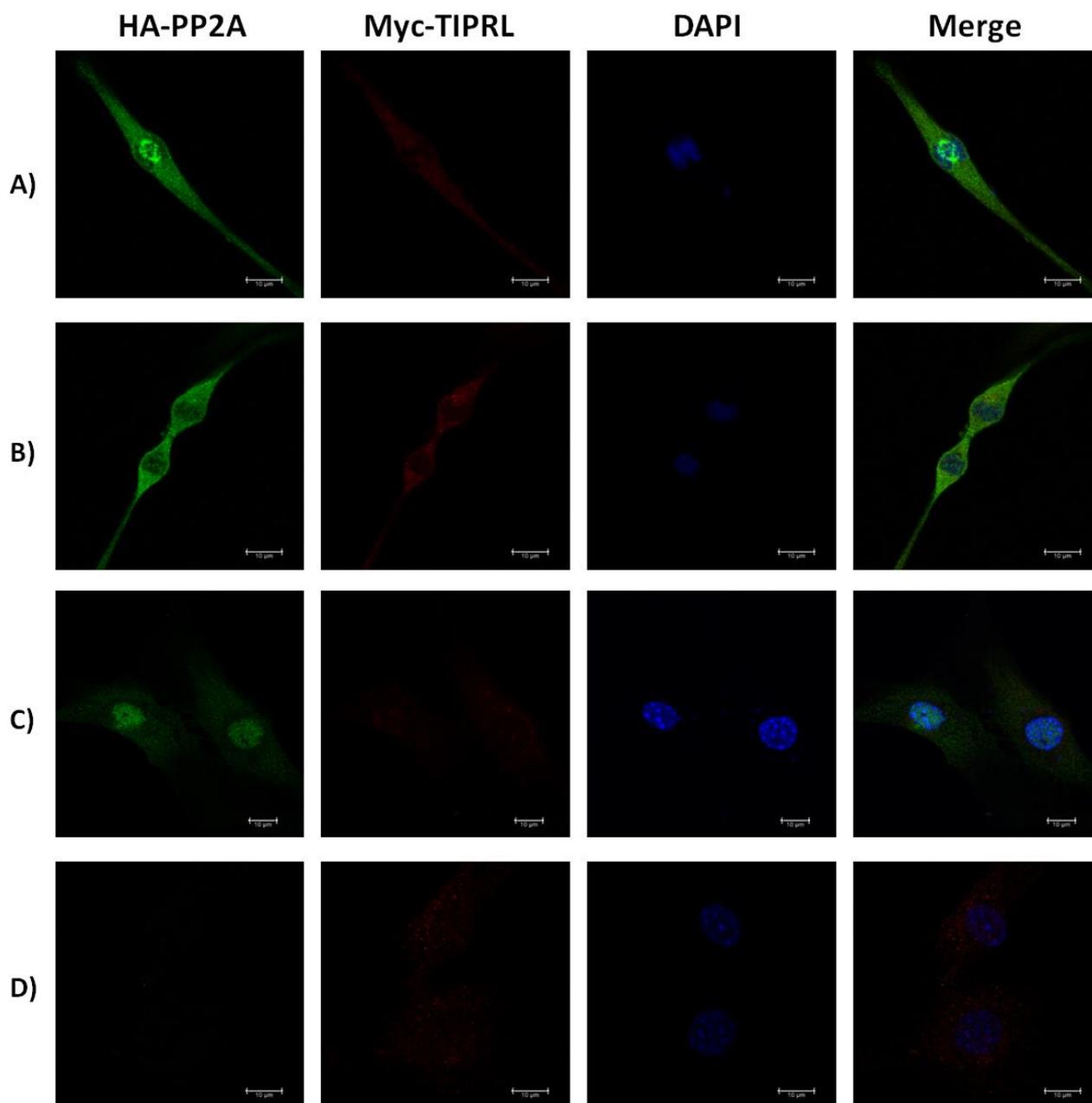


Figura 25. Imunofluorescência (IF) de células NIH/3T3 estavelmente expressando as proteínas HA-PP2A (verde), Myc-TIPRL (vermelho) e controle, em três diferentes fases mitóticas. (A) célula em prófase demonstrando maior concentração de PP2A próximo ao núcleo. (B) células-filhas em fase final de citocinese demonstrando retorno da distribuição de PP2A no citoplasma e (C) células interfásicas demonstrando distribuição difusa de PP2Ac. A marcação de Myc-TIPRL é inespecífica. D) Células controle sem a expressão da HA-PP2A.

No entanto, para Myc-TIPRL os sinais de IF não foram conclusivos, pois o anticorpo do *tag* Myc ligou-se inespecificamente também no controle vazio (*empty vector*). Portanto, seria necessário utilizar outro anticorpo Myc.

Capítulo 3

Análise da interação entre a PP2A selvagem e um conjunto de mutantes da cauda C-terminal com as principais proteínas envolvidas na biogênese

TIPRL interaction with the PP2A catalytic subunit (PP2Ac) is strictly dependent on conserved PP2Ac C-terminal residues and their post-translational modification state

Ana A. S. Iacia,^{1,2,3} Ingrid E. Frohner², Juliana H. C. Smetana^{1*} and Egon Ogris^{2*}

1 Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil

2 Center for Medical Biochemistry, Max Perutz Labs, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

3 Institute of Biology, University of Campinas, Brazil^[1]_[SEP]

*Correspondence:

juliana.smetana@lnbio.cnpem.br

egon.ogris@meduniwien.ac.at

Abstract

TIPRL (TIP41, TOR signaling pathway regulator-like) is a 31 kDa protein originally identified through its interaction with the catalytic subunits of the PP2A, PP4 and PP6 phosphatases. Structural and biochemical studies have shown that TIPRL interacts

directly with the C-terminus of the PP2A catalytic subunit and inhibits its catalytic activity. Phosphorylation and methylation of C-terminal residues affect/regulate holoenzyme composition and substrate specificity. The functional consequences of these modifications on the interaction with TIPRL are unknown. Using a panel of PP2A C-terminal mutants we investigated the TIPRL-PP2Ac interaction. Our analysis revealed that the TIPRL-PP2Ac interaction is sensitive to (was abolished by) Y307F, Y307E and L309 Δ mutations and enhanced approximately 2.5-fold by a phosphomimetic mutation (T304D). Indeed p-T304 PP2Ac was detectable in Myc-TIPRL immunoprecipitates, consistent with a potential phospho- preference of the interaction. Moreover, Myc-TIPRL bound exclusively to non-methylated PP2Ac and its overexpression slightly increased the cellular levels of non-methyl PP2Ac. PR65/A was not detected in TIPRL immunoprecipitates. These results show that TIPRL has a preference non-methylated and T304 phosphorylated PP2Ac and this preference points to a role of TIPRL in the early steps of PP2A holoenzyme maturation/PP2A biogenesis.

Keywords: TIPRL, PP2A, carboxymethylation, protein-protein interaction

Introduction

PP2A belongs to the PPP subfamily of serine/threonine phosphatases, which comprises PP2A, PP4 and PP6. These phosphatases share sequence homology, particularly in the far C-terminus, and possess the same sensitivity to okadaic acid inhibition. PP2A constitutes about 0.3–1% of total protein in human cells and displays a wide range of substrates, acting in various cellular processes such as transcription, translation, cell cycle regulation and apoptosis, and acting as an important tumor suppressor [1-3].

PP2A is predominantly found in the cell as a heterotrimeric holoenzyme formed by a catalytic subunit (PP2Ac), a variable regulatory subunit (B, B', B'' or B''') and a scaffold subunit (PR65/A) [4,5]. This heterotrimer is formed by a coordinated process known as biogenesis, which starts with an inactive, partially unfolded catalytic subunit which is activated and incorporated into active trimers through a series of steps mediated by $\alpha 4$, a protein which acts as a chaperone for PP2Ac and prevents its degradation [6], PTPA, an ATP- dependent activator which loads the active site with cations [7,8], [9] and LCMT1, which carboxymethylates L309. The methylation of L309 is responsible for selectively recruiting a subset of regulatory subunits, which in turn regulate substrate specificity and subcellular targeting of the holoenzyme [10,11]. PME-1 reverses the LCMT1-catalyzed reaction. Throughout PP2Ac biogenesis, its flexible, conserved C-terminal tail (₃₀₄TPDYFL₃₀₉) engages in specific interactions with by PTPA, LCMT1 and PME-1 [12], [13-17].

The variety of regulatory subunits, belonging to four structurally unrelated families (B/B55, B'/B56, B''/PR59, and B'''/striatins), adds complexity to the PP2A repertoire by generating up to 96 different holoenzymes. Several studies relied on PP2Ac C-terminal mutants to elucidate the requirements of different regulatory subunits to bind PP2Ac, indicating a role

for these residues and their post-translational modification state in holoenzyme regulation [10,11,18]. In mammalian cells, LCMT1 downregulation causes up to 70% reduction in PP2Ac methylation and negatively impacts the formation of PP2A heterotrimers containing B55 α [19]. Together, these studies have shown that carboxymethylation is required for the assembly of a majority of trimeric PP2A holoenzymes.

In addition to the methylation site, the PP2Ac C-terminal tail harbors two conserved phosphorylation sites (T304 and Y307). *In vitro* phosphorylation of Y307 inactivated PP2Ac [12], and phosphomimetic mutations of these sites (T304D and Y307E) abolished binding of B-type subunits and enzymatic activity towards cdc2-phosphorylated histone H1 (a B-subunit specific substrate), indicating that these phosphorylations are inhibitory [10]. Although phosphorylation of Y307 has been considered for a long time as a major inactivation mechanism of PP2A, recent studies demonstrated that previous findings were impacted by artifacts from poorly validated antibodies, and this phosphosite is less important than previously thought [20,21]. The available literature related to the physiological relevance of phosphorylation of T304 is scarce compared to Y307, however, contrasting to Y307, the T304 phosphorylation is supported by mass spectrometry data [20,21].

TIPRL (TOR signaling pathway regulator-like) is known to inhibit PP2A activity *in vitro* and interacts directly with the catalytic subunits of PP2A, PP4 and PP6 [22,23]. TIPRL is upregulated in hepatocellular carcinoma and its knockdown induces apoptosis, indicating a positive role in tumorigenesis [24]. The structure of human TIPRL is a unique fold comprised of an antiparallel β -sheet core with an N-terminal α/β region at one of its surfaces and a conserved cleft at the opposite surface which accommodates the C-terminal tail of PP2Ac [25]. The recently published structure of the TIPRL-PP2Ac-PR65/A

trimer revealed that TIPRL binding directly disturbs the PP2Ac active site, displacing a metal ion which is required for catalysis [26]. According to Wu et al, TIPRL interacts only with non-methylated PP2Ac and cooperates with $\alpha 4$ to selectively disassemble the non-methylated PP2Ac trimers. However, previous studies by Nakashima et al suggested that TIPRL interacts only with methylated PP2Ac [27].

In this study, a well characterized panel of PP2Ac C-terminal tail mutations and methylation-sensitive PP2Ac antibodies was applied to study the binding requirements of the PP2Ac-TIPRL interaction in cultured cells. We confirmed that TIPRL only binds to non-methyl PP2Ac and uncovered a potential regulatory mechanism of this interaction by the phosphorylation status of T304. Our results show that TIPRL is sensitive to modifications of the PP2Ac C-terminal tail and its overexpression slightly increases the levels of non-methyl PP2Ac.

Materials and methods

Cell Lines

Neuro2a (N2a), NIH/3T3, Plat-E and HEK293T cell lines were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma. Cat No. D5671) supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS), penicillin/streptomycin antibiotics and glutamine (Glutamax™). These cells were maintained in a humidity incubator with 7.5% of CO₂ at 37°C.

Transient transfection

For transient transfection of HEK293T, 1x10⁶ cells were plated in p60 dishes the day before transfection. A transfection mix containing 7,5 μ l of Turbofectin 8.0 (OriGene,

#TF81001) and 5 µg plasmid DNA in 600 µl Opti-MEM was added to 70% confluent cells for 24 h, after that the cells were plated in a p100 dish and incubated for additional 24 h. The cells were collected 48 h after transfection.

Retroviral packaging of pBABE vectors

Platinum-E (Plat-E) cells were grown in culture medium supplemented with 1 µg/ml puromycin and blasticidin (10 µg/ml). For transfection 1x10⁶ cells were plated in p60 dishes in DMEM, 10% FCS P/S Qmax, the next day the cells were transfected by calcium precipitation using 10 µg DNA, 2.5 M CaCl₂, and 25 µM final concentration of chloroquine diluted in HSB buffer. The transfection mix was removed 8h later and culture medium was changed to DMEM with 10% FCS. After 48h, the supernatants containing viral particles were filtered through 0.22 µm pore.

Infection of NIH3T3 and N2a and generation of stable cell lines

N2a (4x10⁶ cells) and NIH/3T3 (1x10⁵ cells) were plated in p60 dishes one day before infection. The culture medium was changed to 3 mL of the filtered viral supernatant and 6 µg/ml polybren. The medium was changed after 4h, and 24h later, selective antibiotic (5 µg/ml puromycin) was added.

Cell Lysis, Alkaline and Phosphatase Treatment

Cells were washed 3x with PBS and lysed in IP lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 135 mM NaCl, 10% glycerol, 1% w/v NP-40, 1mM PMSF, 0.03 units/mL aprotinin (Sigma), 1x Complete (Roche), 1mM orthovanadate, 10 mM β-glycerophosphate) for 20 min at 4°C. Lysates were scraped from the plates and centrifuged at 13000 x g for 10 min at 4°C. The cleared lysates were quantified using Bradford reagent (Bio-Rad, Cat.500-0006) and normalized for total protein concentration.

For Antarctic phosphatase treatment, cells were lysed in IP lysis buffer without phosphatase inhibitors and EDTA. Lysates were incubated with 0.5 Units of Antarctic phosphatase (NEB, M0289) per mg lysate for 1 hour at room temperature. Control lysate was incubated for 1 hour at room temperature with no phosphatase.

For alkaline treatment, lysates were mixed with NaOH to a final concentration of 0.2M and incubated for 10 min at room temperature. The reaction was neutralized by adding HCl to a final concentration of 0.2M and diluted to 200 μ l with IP lysis buffer.

Immunoprecipitation and Western blot

Cell lysates were incubated with BSA-coated Protein A-Sepharose beads CL-4B (GE-Healthcare #17-0780-01) crosslinked to anti-HA (12CA5) or anti-Myc (4A6) monoclonal antibody for 2h at 4°C. For IP of endogenous proteins, the antibodies (anti-TIPRL polyclonal antibody (Novus Biologicals, NB1001815), anti-pT304 (Egon Ogris lab) and non-methyl PP2Ac 1D7 monoclonals (Egon Ogris lab), or no antibody as negative control), and 20 μ l Protein A beads were pre-incubated for 1 hour and then incubated with the lysate for 1 hour at 4°C. The immune complexes were washed once with IP lysis buffer and 3 x with Tris- buffered saline (TBS) pH 7.5, (or pH 9.6 only in Figure S2), and then incubated for 5 min at 95°C in Laemmli sample buffer. Samples were separated by SDS-PAGE (10%) and transferred to 0.2 μ m nitrocellulose membrane (GE Healthcare) in a wet transfer system. Membranes were blocked at room temperature for one hour with 3% non-fat dry milk (NFDM) in PBS-Tween-20 (0.05%). For phospho-specific antibody (p-T304, Egon Ogris lab), membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS-Tween. Membranes were then incubated with primary antibodies for 12 to 16h at 4°C. The following antibodies were used at the indicated dilutions in PBS-T or TBS-T: HA (16B12, Egon Ogris lab) 1:20000, PP2Ac N-terminal (H8, Egon Ogris lab) 1:200, methyl-C sub

(7C10, Egon Ogris lab) 1:200, non-methyl-C sub (1D7, Egon Ogris lab) 1:200, PP2Ac $\alpha\beta$ (AB32104, Abcam) 1:5000, pan-actin (Egon Ogris lab) 1:200, Myc 4A6 (Egon Ogris lab) 1:2000, TIPRL (8D8-3H6, Egon Ogris lab) 1:200, B55 α /delta (2G9, Egon Ogris lab) 1:200, B56 α (polyclonal, Egon Ogris lab): 1:5000, Striatin (SC-398242, Santa Cruz) 1:5000, PR65/A 4C10 (Egon Ogris lab) 1:5000, α 4 (polyclonal, Egon Ogris lab): 1:5000. Anti-p304-C sub (Egon Ogris lab) was diluted 1:5 in TBS-T. Membranes were then incubated with peroxidase conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody (diluted 1:10000) for 1 hour at room temperature, followed by detection by chemiluminescence.

Quantification and statistical analysis

ImageJ was used for quantification of Western blot signals by densitometry. Statistical analysis was performed in Excel. A p value of < 0.05 was considered statistically significant using Student's T-test. Three independent experiments were performed and data were presented as mean \pm standard deviation.

Results

TIPRL interacts selectively with non-methyl PP2Ac and coprecipitates with pT304-PP2Ac

To study the interaction between TIPRL and PP2Ac we immunoprecipitated tagged-TIPRL from total cell lysates of HEK293 cells transiently expressing HA-TIPRL plasmid and NIH3T3 cells stably expressing Myc-TIPRL and analyzed the immunoprecipitates by Western blot using antibodies specific for total, methylated and nonmethylated PP2Ac. NIH3T3 cells stably expressing HA-PP2Ac were used as a positive control for the immunoprecipitation of PP2A catalytic subunit. In the TIPRL immunoprecipitates, we only

detected the nonmethylated PP2Ac while the HA-PP2Ac immunoprecipitate contained the nonmethylated as well as the methylated form of PP2Ac (Figure 1A).

Although the levels of exogenous TIPRL expression were higher in transiently transfected HEK293 cells compared to stably transfected NIH3T3 cells, the recovery of nonmethyl-PP2Ac was higher in immunoprecipitates obtained from the stable transfection, indicating that stable TIPRL expression might contribute to the stability of TIPRL-PP2Ac complexes, although this could also be due to other differences between these cell lines. In Figure 1A, densitometric analysis of the bands indicated a 17-fold overexpression of HA-TIPRL in HEK293 compared to only 5.3-fold overexpression of Myc-TIPRL in NIH3T3.

PR65/A did not coprecipitate with exogenous TIPRL (Figure 1A). The ternary complex of TIPRL, PP2Ac and PR65/A was reported recently by Wu et al and, although this complex could be assembled in vitro and crystallized, its existence in cells had not been confirmed. Our results indicate that the indirect interaction of TIPRL with PR65/A is either very transient or the complex exists in small amounts which are undetectable by Western blot analysis.

PP2Ac phosphorylated at T304 was also detected in Myc-TIPRL immunoprecipitates using a monoclonal antibody which specifically targets this modification (Figure 1C). The phospho-specificity of p-T304 monoclonal antibody was validated using antartic phosphatase treatment (Figure S1).

To confirm these results under physiologic expression levels of TIPRL, we immunoprecipitated endogenous TIPRL from HEK293T cells. Non-methylated PP2Ac was detected in the TIPRL immunoprecipitates (Figure 1D). However, the reciprocal IP experiments of endogenous PP2Ac with non-methyl (1D7) failed to recover TIPRL despite the ability of this antibody to co-precipitate PR65/A subunit (Figure 1E). The inability of

1D7 to precipitate TIPRL probably indicates that the binding of this antibody and of TIPRL to the PP2Ac C-terminus is mutually exclusive. The p304 antibody failed to precipitate PP2Ac and thus no conclusion about the interaction with TIPRL can be drawn.

TIPRL overexpression increases the levels of non-methyl PP2Ac

Both transient and stable overexpression of TIPRL resulted in approximately 2-fold increase of the nonmethyl-PP2Ac species compared to the respective empty vector controls, while total and methyl-PP2Ac levels remained unchanged (Figure 1A). To confirm this finding, lysates of NIH3T3 Myc-TIPRL or empty vector were analyzed by Western blot (Figure 1B). The intensity of the band detected by 1D7 monoclonal antibody was 50% higher in Myc-TIPRL compared to empty vector control. However, in lysates of NIH3T3 Myc-TIPRL cells that were kept for a month in culture (Figure 1C), the levels of demethyl-PP2Ac had returned to the levels in control cells, indicating that homeostatic mechanisms were probably activated.

The conserved C-terminal tail of PP2Ac is critical for its interaction with TIPRL in stable cell lines

We used NIH3T3 and N2a cells stably expressing HA-tagged PP2Ac WT and C-terminal mutants to evaluate the importance of the PP2Ac C-terminal tail and its post-translational modifications for the interaction with TIPRL. The mutations T304D, T304A, Y307E, Y307F, and L309 Δ have been characterized for the interaction with B-type subunits [10,28,29]. Importantly, all these mutations negatively interfere with the methylation of the carboxy-terminus, either directly (deletion of the methylation site L309) or indirectly by impairing recognition by LCMT1. The methyl group is known to be chemically removed in the presence of 0.2M NaOH [14], which can be used to determine indirectly the methylation levels, by comparing the levels of nonmethylated PP2Ac in the same sample before and

after NaOH treatment using a nonmethyl-specific antibody such as 1D7. Because TIPRL interacted only with nonmethylated PP2Ac, we performed this analysis for the collection of PP2Ac mutants in NIH3T3 cell lysates (Figure 2A).

NaOH treatment revealed that endogenous PP2Ac as well as HA-PP2Ac WT were almost completely methylated in all cell lines. The mutants T304A and T304D, as well as HA-PP2Ac WT, were detected by the methyl-PP2Ac antibody and all were not recognized by this antibody after NaOH treatment, as expected. Mutants Y307E, Y307F, and L309 Δ showed no reactivity with methyl-PP2Ac antibody. Y307F and L309 Δ were recognized by the nonmethyl-specific 1D7 but did not show increased reactivity upon NaOH treatment, confirming that they were already nonmethylated in the untreated lysate. T304A, T304D and Y307E were not or only weakly detectable with the nonmethyl-PP2Ac antibody, suggesting that these mutations per se interfere with recognition by the antibody. However, upon NaOH treatment signals increased for T304A and T304D but not for Y307E. This analysis confirms previous observations that Y307E, Y307F, and L309 Δ are >90% nonmethylated, while T304A and T304D are > 40-70% methylated in vivo [29].

Mutation of Y307 to either phenylalanine or glutamate, or deletion of the C-terminal leucine (L309 Δ), abrogated the interaction of PP2Ac with endogenous TIPRL in NIH3T3 and N2a. Mutation of T304 to alanine resulted in 49% decrease in N2a cell line (no change in NIH 3T3) and mutation to aspartate resulted in more than two-fold increase of TIPRL binding to PP2Ac in both cell lines. This observation suggests that phosphorylation of PP2Ac T304 might promote its interaction with TIPRL, which is consistent with the detection of p-T304 PP2Ac in Myc-TIPRL immunoprecipitates (Figure 2, Table 1).

The T304D mutant displayed no binding to B55 α , whereas Y307F showed no binding to TIPRL while its interaction with B55 α was comparable to WT PP2Ac, which is in

agreement with previous findings about the impact of these PP2Ac mutations on B55 α binding [10,29]. This indicates that TIPRL may not be required for PP2A B55 holoenzyme biogenesis because in the absence of a stable PP2Ac-TIPRL complex in the Y307F mutant normal levels of active PP2Ac-B55-PR65/A trimer are assembled (10).

Table 1. Quantification of the interactions of endogenous TIPRL and B55 α with PP2Ac WT and C-terminal mutants and methylation levels of these mutants. The numbers represent the averages from densitometric quantification of three independent experiments.

Mutant	TIPRL interaction			B55 α interaction	
	Methylation	3T3	N2a	3T3	N2a
WT	100%	100%	100%	100%	100%
T304A	60,2%	92%	51%	92%	164%
T304D	58,6%	230%	255%	-	-
Y307F	0	-	-	88%	73%
Y307E	0	-	-	-	-
L309 Δ	0	-	-	-	-

The TIPRL - PP2Ac interaction is sensitive to alkaline pH

The immunoprecipitation experiments using stable clones of HA-PP2Ac led to the unexpected finding that the PP2Ac-TIPRL interaction is affected by pH. When the pH of the IP wash buffer (TBS) was set to 9.6, the interaction with TIPRL was completely abolished in both cell lines, while the interactions with PR65/A, B55 α and α 4 remained intact. Although alkaline, this pH was not sufficiently high to remove methylation from PP2Ac, as attested by the reactivity of all the samples with methylation-specific PP2Ac antibody (Figure S2).

Stable overexpression of Myc-TIPRL did not affect PP2A complexes

Previous results from structural and in vitro studies indicate that the TIPRL binding site on PP2Ac overlaps with the binding site of regulatory subunits [25] and that TIPRL can selectively disassemble demethylated PP2A trimers [26]. To investigate this possibility in cell culture, lysates from stable NIH3T3 cell lines expressing only HA-PP2Ac, HA-PP2Ac with Myc-TIPRL, or empty vector, were subjected to HA immunoprecipitation to analyze the effect of Myc-TIPRL expression on PP2A complex assembly (Figure 3). The level of expression of Myc-TIPRL compared to endogenous TIPRL in the TIPRL+PP2Ac stable cell line was ~1.5-fold higher according to densitometric analysis. Interactions of HA-PP2Ac with endogenous subunits and the levels of methylation and T304 phosphorylation were analyzed by Western blot with specific antibodies. Neither the interactions nor post-translational modifications of PP2Ac appeared to be affected by Myc-TIPRL overexpression. Interestingly, even the interaction of endogenous TIPRL with HA-PP2A was unaffected by expression of Myc-TIPRL, indicating that endogenous TIPRL is limiting for the formation of PP2Ac-TIPRL complexes. This result indicates that up to 2.5-fold increase in the cellular levels of TIPRL complex is not sufficient to displace other subunits from PP2Ac, however, this could be affected by HA-PP2Ac overexpression. In this case, experiments with endogenous PP2Ac would be more likely to show a phenotype.

Discussion

Among the PP2Ac regulatory proteins, TIPRL remains the most poorly understood, especially regarding its potential role in PP2A biogenesis. This study found that TIPRL is selective for the catalytic subunit of PP2A in its non-methylated state and that the TIPRL-PP2Ac interaction is sensitive to mutations at the two phosphorylation sites, in a way that indicates a possible preference of TIPRL for PP2Ac phosphorylated at T304. Additionally,

we found no evidence of a stable TIPRL-PR65/A interaction in FLAG-TIPRL immunoprecipitates. These findings indicate that TIPRL might be selective for an inactive state of PP2Ac, which is found either during initial stages of biogenesis or after recycling of the trimeric holoenzymes, in agreement with a recently proposed model [26].

To understand the regulation of the TIPRL-PP2Ac interaction, we performed a comprehensive and semi-quantitative analysis of the effects of a series of PP2Ac C-terminal tail mutations on the interactions with endogenous PP2Ac interaction partners in two cell lines, NIH 3T3 and N2a. In these experiments, PP2Ac interactions with TIPRL and B55 α behaved in opposing ways regarding the PP2Ac mutants T304D, T304A and Y307F. In N2a, T304A mutation significantly increased the PP2Ac interaction with B55 α while simultaneously decreasing its interaction with TIPRL to a similar extent. The same mutation had no effect on these two interactions in NIH 3T3, perhaps reflecting different basal levels of PP2Ac T304 phosphorylation in these cell lines. TIPRL interacted with PP2Ac T304D twice as much as PP2Ac wild type, while the same mutation abolished the PP2Ac interaction with B55 α in both cell lines. In contrast, the Y307E and L309 PP2Ac mutations abolished the interactions with TIPRL and B55 α in both cell lines. Interestingly, the binding of α 4 to PP2Ac was mostly unaffected by all the mutations tested, indicating that the C-terminal tail of PP2Ac is not important for this interaction, which is consistent with the previously reported crystal structure of the PP2Ac- α 4 complex (Jiang et al, 2013).

The effects of C-terminal mutations on the PP2Ac-B subunit interaction were first characterized by Ogris et al [10] using a more comprehensive set of Y307 (F, E, K and Q) and T304 (A, D, K, and N) mutants to understand how different side chains and charges on these positions affect the PP2Ac interaction with B subunit. The T304N/D and Y307E/K/Q mutations abolished the PP2Ac-B subunit interaction, while T304A and Y307F

interacted with B subunit at similar or greater levels than PP2Ac WT and T304K greatly decreased the PP2Ac-B subunit interaction. Thus, our study successfully recapitulates these previous results, further supporting our novel findings on how the same mutations affect TIPRL binding.

The reduced binding of TIPRL to PP2Ac Y307E mutant was reported previously [27]. Interestingly, the present results differ from our previous publication which showed, using recombinant proteins produced in *E. coli*, that the C-terminus of PP2Ac was not required for TIPRL binding [25]. This difference might derive from structural differences between active PP2Ac in mammalian cells and its inactive version expressed in *E. coli*, which might be structurally related to a very early stage of biogenesis.

Post-translational changes in the PP2Ac tail such as methylation and phosphorylation are known mechanisms that activate and deactivate PP2Ac and regulate its subunit selectivity. Carboxymethylation at L309 is essential for the PP2Ac interaction with B55 and B56 subunits, however, other regulatory subunits such as striatin and B" [18] are insensitive to PP2Ac methylation state. In this context, we showed that TIPRL is also extremely sensitive to PP2Ac C-terminal tail modifications, showing a preference for the T304D phosphomimetic mutant, unlike B subunit, has a preference for acidic residue in position 304 and completely loses its interaction with both Y307F and Y307E mutants as well as the L309 Δ mutant indicating that the phenylalanine at position 307 and the nonmethylated carboxyl at position 309 are essential for TIPRL binding. These findings are in agreement with structural studies of the TIPRL-PP2Ac complex [25, 26].

The opposite effects of T304 phosphomimetic mutations and L309 carboxymethylation on TIPRL and B55 α could mean either that these two proteins directly sense these modifications in opposing ways or that TIPRL is the primary sensor of these

modifications and affects B55 α binding to PP2Ac through competition or other indirect mechanism. To distinguish between these possibilities, we investigated how the overexpression of TIPRL impacts on PP2Ac methylation levels and B-subunit binding. Stable overexpression of Myc-TIPRL slightly increased the levels of demethyl-PP2Ac, but eventually the cell achieved a state of equilibrium in which no clear phenotype was distinguishable, either at the level of PP2Ac post-translational modifications or its interactions with B subunits. We found no evidence of selective disruption of demethylated PP2Ac holoenzymes by TIPRL overexpression as described by Wu et al (2017), however, this might have been affected by the low levels of overexpression achieved in the stably infected NIH3T3 cell line. Therefore, the stable overexpression approach was inconclusive and different experiments are required to elucidate whether TIPRL affects PP2Ac methylation levels or competes with B subunits for PP2Ac binding.

The study of PP2A biogenesis and regulation is extremely complex and prone to misinterpretations. Despite decades of study by many groups around the world, recent studies have shown that some widely used research tools were actually flawed, which might retrospectively invalidate major findings in this field of research [20,21,30]. Even the immunoprecipitation of endogenous, active PP2Ac holoenzyme is a major challenge and currently there are no appropriate antibodies for this purpose [30]. This highlights the importance of validated, well-controlled systems to study PP2A interactions. In this study, we showed that the TIPRL-PP2Ac interaction can be studied in great level of detail and reproducibility in stably infected cell lines using retroviral-mediated expression of epitope-tagged proteins. The system described here is a valuable tool to study the factors that regulate PP2Ac binding to TIPRL, such as mutations, post-translational modifications and buffer composition. However, higher expression levels of TIPRL or a loss of function

approach might be necessary to understand its impact on the interactions and post-translational modifications of PP2Ac.

Figure Legends

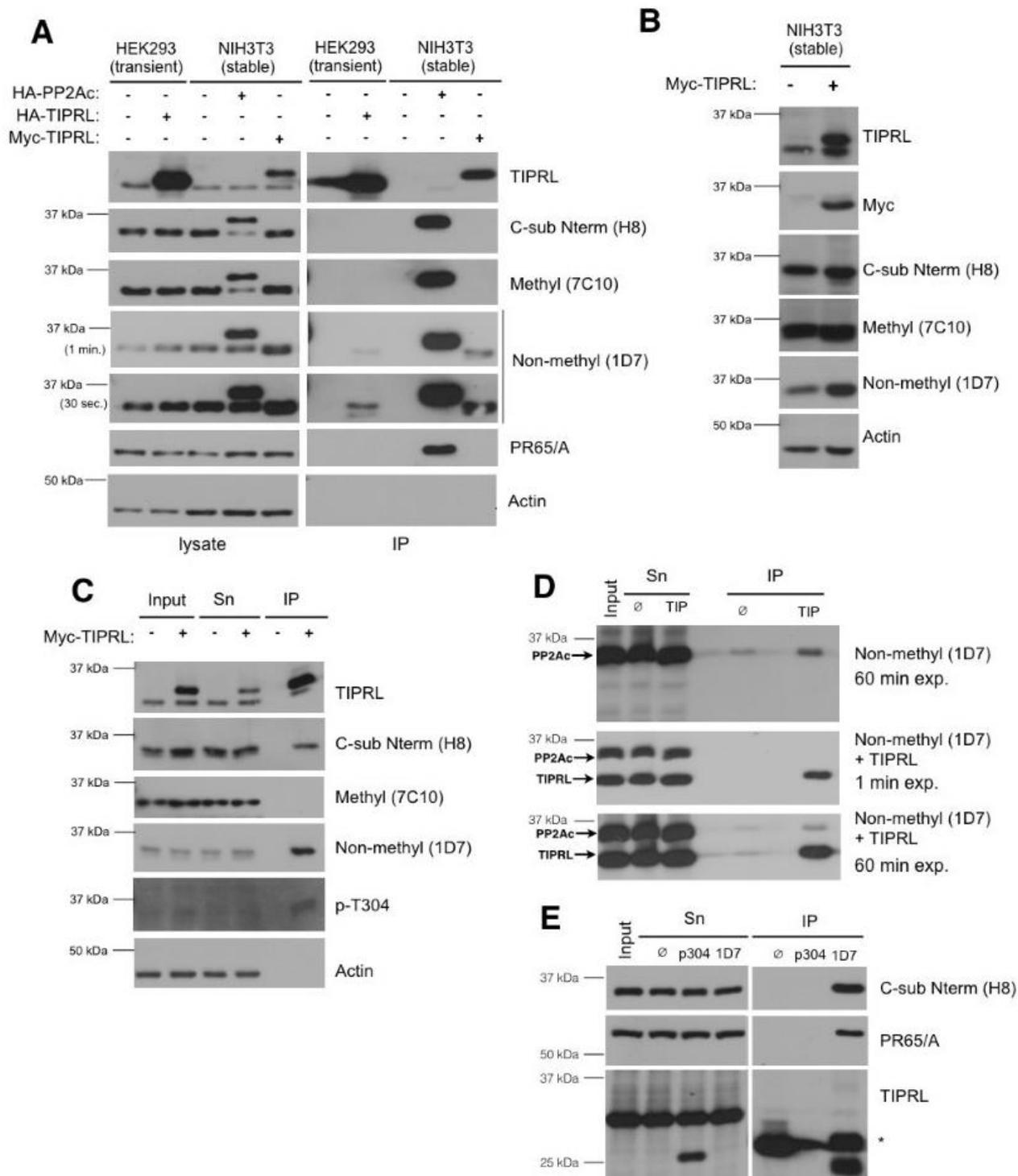
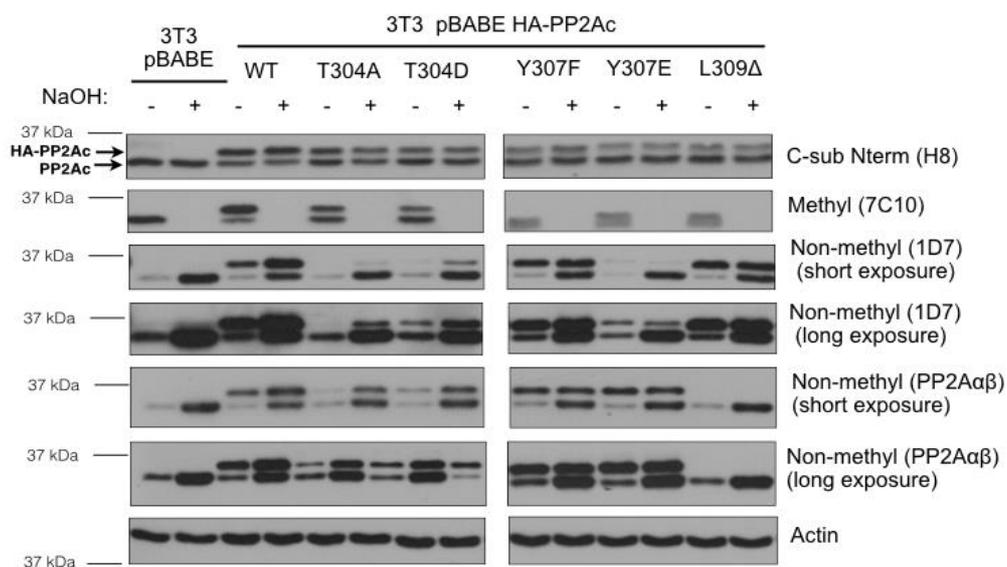
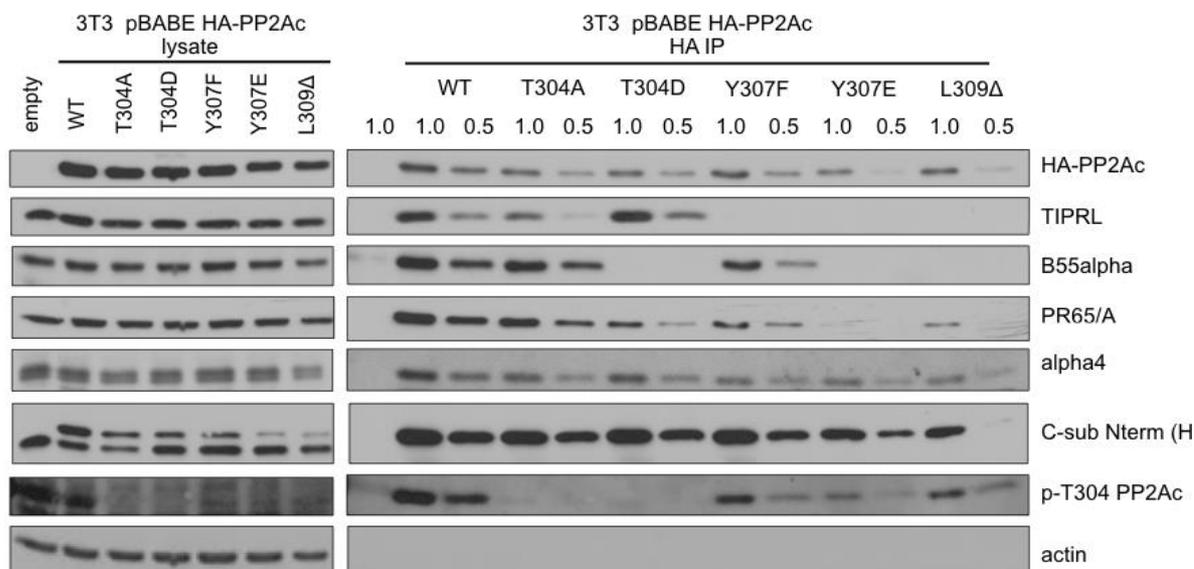
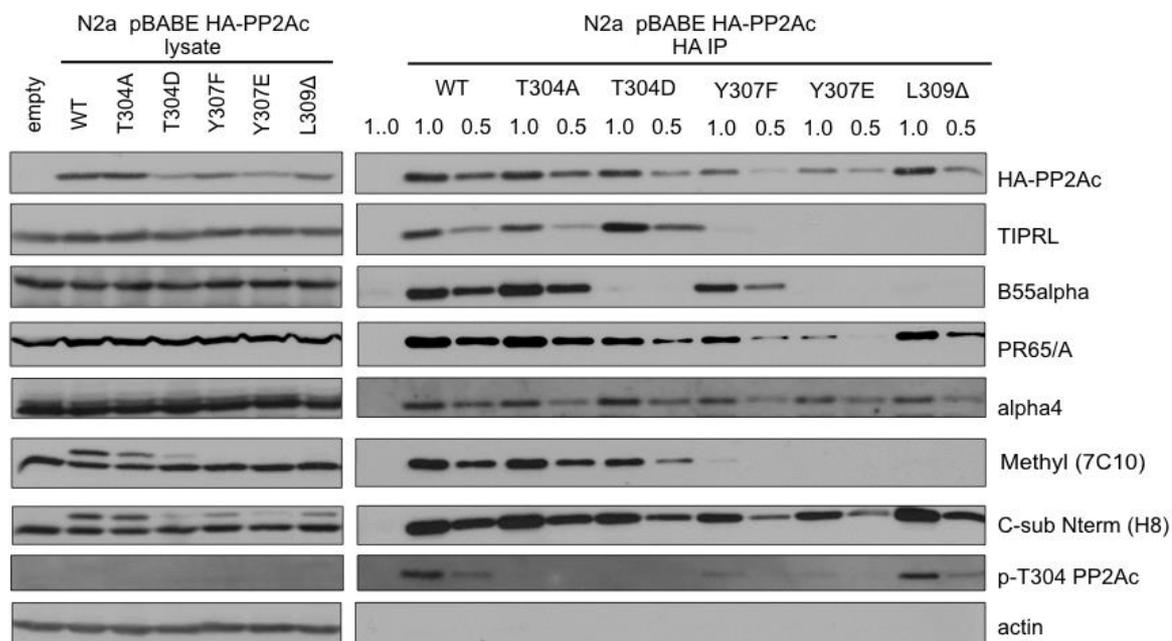


Figure 1. TIPRL interactions in transient and stable TIPRL-expressing cells. Immunoprecipitates (IP) and lysates (WCE) were resolved by SDS-PAGE and detected with the indicated antibodies. **A:** HA-TIPRL (pcDNA3.1-HA-TIPRL) transiently expressed in HEK293T cells, as well the empty vector was compared with NIH3T3 stably infected

with pBABE-neo-myc-TIPRL and its negative (empty vector) and positive controls (pBABE-puro-HA-PP2A WT) (N=3). B: Analysis of PP2Ac methylation in lysates of NIH3T3 cells stably expressing Myc-tagged TIPRL, (+) or with empty vector (-) (N=3). C. Immunoprecipitation from lysates of NIH3T3 cells stably expressing Myc-TIPRL, (+) or with empty vector (-). The interactions of Myc-TIPRL were analyzed for total PP2Ac, non-methyl L309 PP2A, methyl L309 PP2A and pT304. Sn: supernatant, IP: immunoprecipitate (N=3). D, E. Immunoprecipitation of endogenous TIPRL (D) or p-T304 PP2Ac and non-methyl PP2Ac (E) from HEK293T lysate and detection of interacting proteins with indicated antibodies. The asterisk in D indicates the immunoglobulin light chain (N=1).

A**B****C**

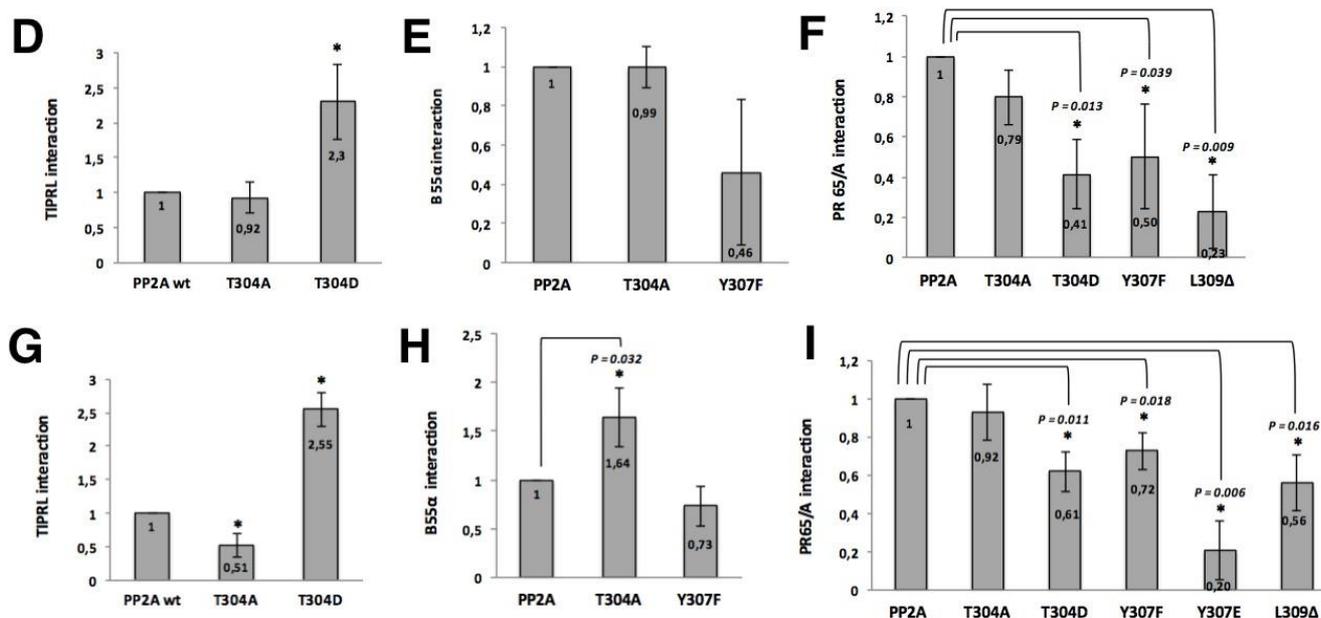


Figure 2. Interaction of PP2Ac C-terminal mutants with TIPRL and other endogenous PP2Ac interacting proteins. A. Analysis of the methylation state of PP2Ac C-terminal mutants. Lysates of NIH3T3 cells stably expressing HA-PP2Ac WT or mutants were treated with NaOH 0.2M and neutralized as described in Materials and Methods (N=3). B, C. Western blot analysis of lysates and HA immunoprecipitates from NIH3T3 (B) or Neuro2A cells (C) stably expressing the indicated proteins and probed with specific antibodies as indicated. pBABE empty vector was used as negative control (N=3). D, E, F: Quantification of coimmunoprecipitated TIPRL, B55 α and A subunit, respectively, from NIH3T3. G, H, I: Quantification of coimmunoprecipitated TIPRL, B55 α and A subunit, respectively, from N2a. The signals were normalized to the amounts of immunoprecipitated HA-PP2Ac. The average and standard deviations are from three independent experiments. Asterisks indicate the results that were statistically significant ($p < 0.05$).

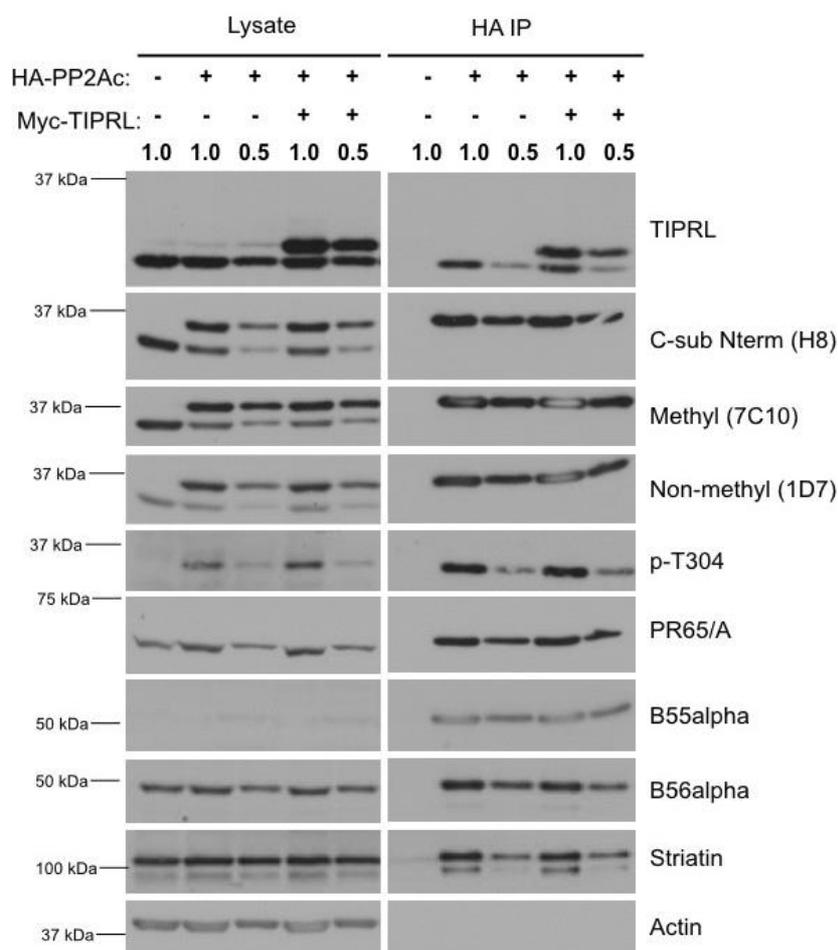


Figure 3. Impact of stable overexpression of Myc-TIPRL on the post-translational modifications and interactions of HA-PP2Ac. Lysates of NIH3T3 cells stably infected with empty vector (first lane) or expression plasmids for HA-PP2Ac (second and third lanes) or, HA-PP2Ac + Myc-TIPRL (fourth and fifth lanes), were subjected to HA immunoprecipitation (HA IP) and detection of PP2Ac-interacting proteins and PP2Ac post-translational modifications using the indicated antibodies. The numbers (1.0 or 0.5) indicate the dilution factors of the samples (N=1).

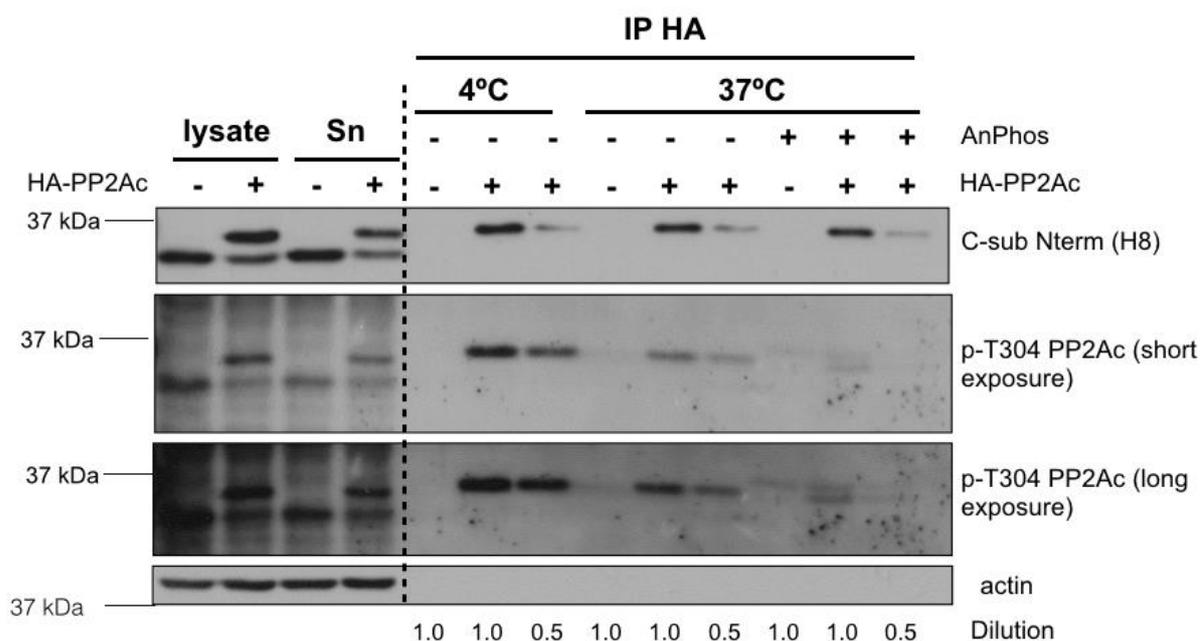


Figure S1: Validation of the phospho-specificity of p-T304 antibody. Samples were incubated with Antarctic Phosphatase (AnPhos) for one hour at the indicated temperatures. Lysates, supernatants (Sn) and HA immunoprecipitates were probed with the indicated antibodies. Actin was used as a loading control (N=1).

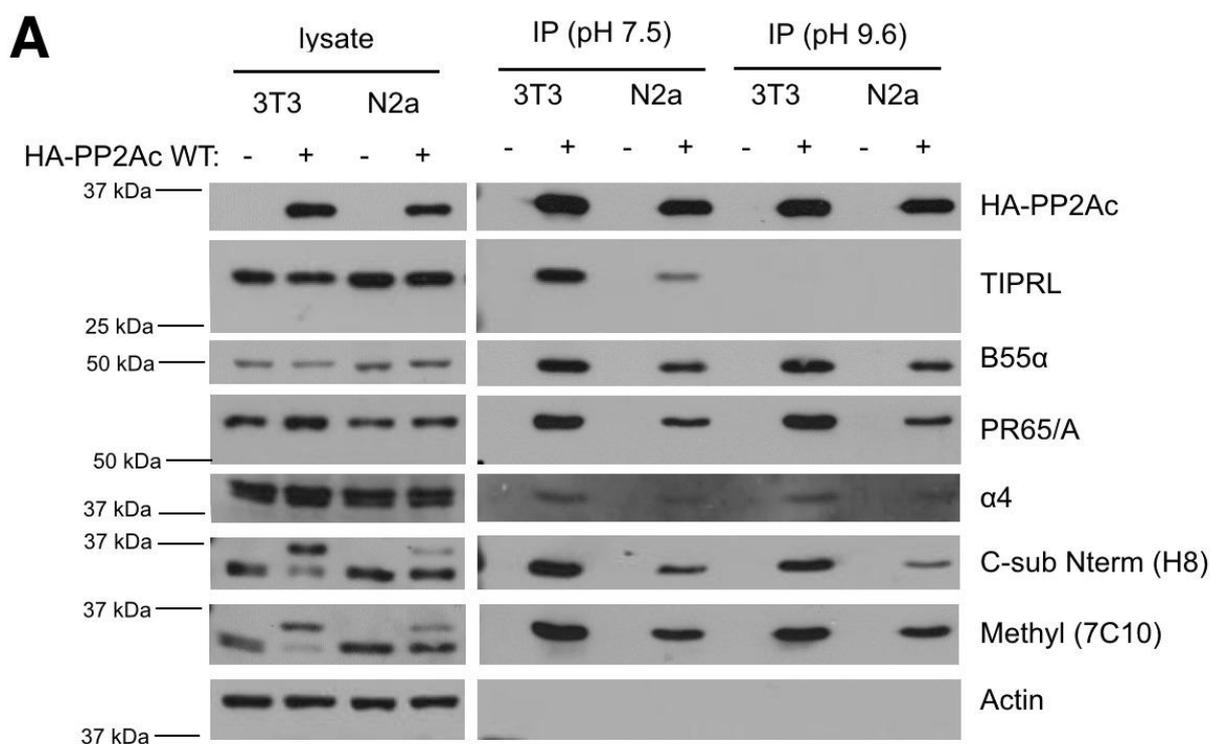


Figure S2. PP2Ac interaction with TIPRL, but not with $\alpha 4$, PR65/A and B55 α , is sensitive to high pH. HA-PP2Ac WT was immunoprecipitated from lysates of NIH3T3 and Neuro2A

expressing HA-PP2Ac WT. After the first wash with lysis buffer, the beads were washed three times with 1X TBS (pH 7.5 or 9.6, as indicated). The lysates, supernatants (after IP) and IP products were analyzed by SDS-PAGE and Western blot with the indicated antibodies. Empty vector was used as IP control. (N=1).

Author contributions

A.A.S.I performed experiments and analyzed data. J.H.C.S, E.O. and I.F. designed experiments and analyzed data. J.H.C.S and E.O designed the project and wrote the manuscript with input from A.A.S.I and I.F.

Acknowledgements

This work was funded by service and royalty fees from antibody licensing agreements and the monoclonal antibody service facility (E.O. lab), and by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) as grant to JHCS (2017/21455-7) and fellowship to AASI (2016/12560-9 and 2018/09337-1). We thank Max Perutz Labs and LNBio/CNPEM for financial support and access to the facilities.

References

- [1] D.M. Virshup, Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes, *Current Opinion in Cell Biology*. 12 (2000) 180–185.
- [2] Y. Shi, Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure, *Cell*. 139 (2009) 468–484. doi:10.1016/j.cell.2009.10.006.
- [3] C. Wurzenberger, D.W. Gerlich, Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 469–482. doi:10.1038/nrm3149.
- [4] H. Usui, M. Imazu, K. Maeta, H. Tsukamoto, K. Azuma, M. Takeda, Three distinct forms of type 2A protein phosphatase in human erythrocyte cytosol, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3752–3761.

- [5] U.S. Cho, W. Xu, Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme, *Nature*. 445 (2006) 53–57. doi:10.1038/nature05351.
- [6] L. Jiang, V. Stanevich, K.A. Satyshur, M. Kong, G.R. Watkins, B.E. Wadzinski, et al., Structural basis of protein phosphatase 2A stable latency, *Nat Commun*. 4 (2013) 1699. doi:10.1038/ncomms2663.
- [7] T. Fellner, D.H. Lackner, H. Hombauer, P. Piribauer, I. Mudrak, K. Zaragoza, et al., A novel and essential mechanism determining specificity and activity of protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo, *Genes Dev*. 17 (2003) 2138–2150. doi:10.1101/gad.259903.
- [8] F. Guo, V. Stanevich, N. Wlodarchak, R. Sengupta, L. Jiang, K.A. Satyshur, et al., Structural basis of PP2A activation by PTPA, an ATP-dependent activation chaperone, *Cell Res*. (2013). doi:10.1038/cr.2013.138.
- [9] W. Sents, E. Ivanova, C. Lambrecht, D. Haesen, V. Janssens, The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity, *Febs J*. 280 (2012) 644–661. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08579.x.
- [10] E. Ogris, D.M. Gibson, D.C. Pallas, 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 (1997) 911–917. doi:10.1038/sj.onc.1201259.
- [11] X.X. Yu, X. Du, C.S. Moreno, R.E. Green, E. Ogris, Q. Feng, et al., Methylation of the protein phosphatase 2A catalytic subunit is essential for association of B_q regulatory subunit but not SG2NA, striatin, or polyomavirus middle tumor antigen, *Mol. Biol. Cell*. 12 (2001) 185–199.
- [12] J. Chen, B.L. Martin, D.L. Brautigan, Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation, *Science*. 257 (1992) 1261–1264.
- [13] J. Lee, J. Stock, Protein phosphatase 2A catalytic subunit is methyl-esterified at its carboxyl terminus by a novel methyltransferase, *J. Biol. Chem*. 268 (1993) 19192–19195.
- [14] B. Favre, S. Zolnierowicz, P. Turowski, B.A. Hemmings, The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo, *J. Biol. Chem*. 269 (1994) 16311–16317.
- [15] H. Xie, S. Clarke, Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain, *J. Biol. Chem*. 269 (1994) 1981–1984.
- [16] I. De Baere, R. Derua, V. Janssens, C. Van Hoof, E. Waelkens, W. Merlevede, et al., Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue, *Biochemistry*. 38 (1999) 16539–16547.

- [17] E. Ogris, X. Du, K.C. Nelson, E.K. Mak, X.X. Yu, W.S. Lane, et al., A protein phosphatase methylesterase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 14382–14391.
- [18] V. Nunbhakdi-Craig, S. Schuechner, J.-M. Sontag, L. Montgomery, D.C. Pallas, C. Juno, et al., Expression of protein phosphatase 2A mutants and silencing of the regulatory B γ subunit induce a selective loss of acetylated and deetyrosinated microtubules, *Journal of Neurochemistry*. 101 (2007) 959–971. doi:10.1006/abbi.1996.9835.
- [19] J.A. Lee, D.C. Pallas, Leucine carboxyl methyltransferase-1 is necessary for normal progression through mitosis in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 30974–30984. doi:10.1074/jbc.M704861200.
- [20] I.E. Frohner, I. Mudrak, S. Schüchner, D. Anrather, M. Hartl, J.-M. Sontag, et al., PP2AC Phospho-Tyr307 Antibodies Are Not Specific for this Modification but Are Sensitive to Other PP2AC Modifications Including Leu309 Methylation, *CellReports*. 30 (2020) 3171–3182.e6. doi:10.1016/j.celrep.2020.02.035.
- [21] S. Mazhar, D. Leonard, A. Sosa, D. Schlatzer, D. Thomas, G. Narla, Challenges and Reinterpretation of Antibody-Based Research on Phosphorylation of Tyr307 on PP2Ac, *CellReports*. 30 (2020) 3164–3170.e3. doi:10.1016/j.celrep.2020.02.012.
- [22] J. Smetana, N.I.T. Zanchin, Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, α phag4 and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL), *Febs J.* 274 (2007) 5891–5904. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06112.x.
- [23] J.L. McConnell, R.J. Gomez, L.R.A. McCorvey, B.K. Law, B.E. Wadzinski, Identification of a PP2A-interacting protein that functions as a negative regulator of phosphatase activity in the ATM/ATR signaling pathway, *Oncogene*. 26 (2007) 6021–6030. doi:10.1038/sj.onc.1210406.
- [24] I.S. Song, S.Y. Jun, H.-J. Na, H.-T. Kim, S.Y. Jung, G.H. Ha, et al., Inhibition of MKK7-JNK by the TOR signaling pathway regulator-like protein contributes to resistance of HCC cells to TRAIL-induced apoptosis, *Gastroenterology*. 143 (2012) 1341–1351. doi:10.1053/j.gastro.2012.07.103.
- [25] V. Scorsato, T.B. Lima, G.L. Righetto, N.I.T. Zanchin, J. Brandão-Neto, J. Sandy, et al., Crystal structure of the human Tip41 orthologue, TIPRL, reveals a novel fold and a binding site for the PP2Ac C-terminus, *Sci. Rep.* 6 (2016) 30813. doi:10.1038/srep30813.
- [26] C.-G. Wu, A. Zheng, L. Jiang, M. Rowse, V. Stanevich, H. Chen, et al., Methylation-regulated decommissioning of multimeric PP2A complexes, *Nat Commun.* 8 (2017) 2272. doi:10.1038/s41467-017-02405-3.
- [27] A. Nakashima, K. Tanimura-Ito, N. Oshiro, S. Eguchi, T. Miyamoto, A. Momonami, et al., A positive role of mammalian Tip41-like protein, TIPRL, in the amino-acid

dependent mTORC1-signaling pathway through interaction with PP2A, FEBS Lett. (2013). doi:10.1016/j.febslet.2013.07.027.

- [28] S. Longin, K. Zwaenepoel, J.V. Louis, S. Dilworth, J. Goris, V. Janssens, Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit, J. Biol. Chem. 282 (2007) 26971–26980. doi:10.1074/jbc.M704059200.
- [29] V. Nunbhakdi-Craig, S. Schuechner, J.-M. Sontag, L. Montgomery, D.C. Pallas, C. Juno, et al., Expression of protein phosphatase 2A mutants and silencing of the regulatory B α subunit induce a selective loss of acetylated and detyrosinated microtubules, Journal of Neurochemistry. 101 (2007) 959–971. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04503.x.
- [30] I.E. Frohner, I. Mudrak, S. Kronlachner, S. Schüchner, E. Ogris, Antibodies recognizing the C terminus of PP2A catalytic subunit are unsuitable for evaluating PP2A activity and holoenzyme composition, Sci Signal. 13 (2020). doi:10.1126/scisignal.aax6490.

5. DISCUSSÃO

5.1 Estudos da interação dos mutantes da PP2Ac com TIPRL

A atividade da PP2A é essencial na regulação de vários processos celulares, porém, nossa compreensão sobre a sinalização regulada pela PP2A permanece incompleta. Uma parte fundamental deste estudo foi a utilização de mutantes bem caracterizados da PP2Ac para analisar o impacto dessas mutações na interação com TIPRL e assim compreender melhor o que regula essa interação. Outros estudos já utilizaram uma abordagem semelhante para estudar essa interação em células HEK293 ou 293T transfectadas transientemente (Nakashima et al., 2013, Wu et al., 2017).

O diferencial do nosso estudo nessa abordagem se deve aos seguintes fatores: 1- buscamos o melhor modelo de estudo, comparando diferentes linhagens, diferentes vetores de expressão e expressão transiente ou estável, 2- a interação dos mutantes com TIPRL foi analisada em paralelo com outras proteínas interactoras da PP2Ac previamente estudadas com essa mesma estratégia (subunidade A e B55) para validar nossos resultados com controles internos, e 3- buscamos uma abordagem semiquantitativa que permitiu observar mudanças mais sutis, porém estatisticamente significativas.

Os mutantes da cauda C-terminal usados neste projeto estão presentes entre os resíduos 304 e 309 em uma sequência não estruturada da PP2Ac. Inicialmente, foram utilizados os mutantes H118N, Y307F e L309V em vetor pCDNA3.1-FLAG transfectado transientemente. Posteriormente, durante o período do BEPE, foram utilizados os mutantes T304D, T304A, Y307E, Y307F e L309 Δ em vetor pBABE com expressão transiente ou estável.

A leucina 309 tem um papel fundamental na atividade da PP2A, pois é no grupo carboxila deste resíduo que ocorre a carboximetilação mediada por LCMT-1. Nesse resíduo, os mutantes mais utilizados na literatura são o L309A, L309V, L309Q e L309 Δ (deleção do último resíduo). Essa metilação interfere no recrutamento de isoformas da subunidade regulatória e algumas dessas isoformas (principalmente B55 α) interagem somente com a subunidade catalítica metilada, enquanto outras (B56 α , B56 β entre outras) também podem se ligar à subunidade desmetilada, embora em proporção menor. O mutante L309A perde totalmente a interação com B55 α tornando a PP2Ac inativa (Bryant et al, 1999). Neste trabalho foram escolhidos os mutantes L309V porque a valina é semelhante à leucina, mas não é igualmente metilada (Figura 16) e a versão deletada deste resíduo L309 Δ , cuja metilação fica totalmente impedida (Capítulo 3, Figura 2).

Apesar da similaridade da mutação de leucina para valina, observamos que o mutante expresso a partir do vetor pCDNA-FLAG-HA-PP2AcL309V foi detectado em níveis muito baixos em células HEK293T e mostrou ausência total de atividade enzimática com o substrato pNPP, desta forma não podemos afirmar se essa mutação realmente inativou a PP2Ac ou se apenas interferiu nos níveis de expressão (Figura 16). Já o mutante pBABE-HA-PP2AcL309 Δ foi expresso em níveis comparáveis com a PP2Ac WT (Capítulo 3, Figura 2).

Ogris et al. (1997) desenvolveram dois mutantes para o resíduo 307 (Y307E e Y307F). O mutante para glutamato, que é um resíduo ácido, impediu a associação da subunidade B ao heterodímero A-C e resultou em uma redução na atividade da PP2Ac. Por outro lado, o mutante para fenilalanina apresentou uma atividade enzimática e quantidade de subunidade B coprecipitada superiores à PP2Ac selvagem. Esses resultados foram fielmente reproduzidos em nossos estudos em sistema de expressão

estável (Capítulo 3, Figura 2). Outro estudo observou que este mutante Y307F igualmente interagiu com a subunidade B'(B56δ) e B'' (Nunbhakdi-Craig et al, 2007).

Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que a fosforilação no resíduo Y307 impede a interação de um peptídeo da cauda da PP2Ac com TIPRL in vitro (Scorsato et al, 2016), sendo assim, inicialmente acreditamos que a mutação Y307F, que impede a fosforilação desse resíduo, deveria resultar em uma maior interação com TIPRL. A mutação para fenilalanina impede a fosforilação, mas preserva o anel aromático também presente na tirosina. No sistema de expressão transiente em HEK293T, o mutante Y307F expressou mais do que o WT e interagiu com TIPRL, mas não com a subunidade A.

Devido à grande variação entre repetições desse experimento, não foi possível determinar se essa mutação afeta a interação com TIPRL quantitativamente. No entanto, no sistema de expressão estável, tanto o mutante fosfomimético Y307D quanto o não fosforilável Y307F perderam interação com a TIPRL, indicando que a presença da hidroxila no anel aromático é imprescindível para a interação com TIPRL nesse modelo de estudo.

No sítio ativo da PP2A, a H118 coordena os dois íons de metal. Mutações buscaram interromper parcialmente os contatos com a subunidade A e B próximas a H118, em estudos anteriores foram observadas a) redução na atividade catalítica na PP2A pela distorção do sítio catalítico impedindo a conclusão da biogênese, b) perda de interação com a subunidade B55 e c) formação de complexos estáveis com PME-1 (Ogris et al, 1999a; Lizotte et al, 2008). Proteínas que interagem de forma estável com esse mutante têm chances de participar da biogênese da PP2A (Egon Ogris, comunicação pessoal). Nos ensaios de transfecção transiente, esse mutante interagiu com TIPRL, mas não com a subunidade A, e não teve atividade enzimática, como esperado.

Esses resultados confirmaram a interação da TIPRL pela cauda C-terminal da PP2Ac e a influência das modificações pós-traducionais que ali ocorrem em células de mamíferos sobre essa interação, e ressaltaram a importância da escolha de um modelo de estudo adequado. A parte desse trabalho que se refere ao uso de mutantes da PP2Ac para caracterizar a interação com TIPRL em cultura de células gerou um manuscrito (Capítulo 3) que deve ser submetido em breve.

Curiosamente, *in vitro* essa cauda não é essencial para a interação com TIPRL. Scorsato et al (2016) utilizaram um conjunto de mutantes da TIPRL provenientes de *E. coli* e nenhum deles perdeu a interação com PP2Ac, porém quando uma versão truncada da PP2Ac foi utilizada, alguns mutantes tiveram a interação reduzida. Provavelmente, a PP2Ac expressa em *E. coli* possui uma estrutura com o sítio ativo desenovelado, e permite uma interação entre PP2A e TIPRL independente das mutações, não havendo regulação e influência das modificações pós-traducionais que ali ocorrem.

5.2 Interação de mutantes da TIPRL com PP2Ac, PP4c e PP6c

Em uma estratégia complementar ao uso de mutantes do C-terminal da PP2Ac, a interação da TIPRL com as fosfatases 2A também foi estudada por meio do efeito de mutações na própria TIPRL, principalmente na fenda de interação com a PP2Ac. Esses experimentos confirmaram a perda de interação de PP2Ac com os mutantes de TIPRL F180A, L182A e R200A, todos localizados na fenda de interação. Esses mesmos mutantes também perderam a interação com PP4c e PP6c, porém sem efeitos aparentes na estabilidade da proteína, confirmando que são bons modelos de estudo de perda de função da TIPRL.

O mutante I136T não teve perda de interação com PP2Ac e ainda teve, aparentemente, um ganho de interação com PP4c e PP6c. Como mencionado anteriormente, a mutação I136T havia sido descrita como uma mutação de TIPRL capaz de bloquear sua interação com PP2Ac e PP4c em experimento de duplo-híbrido em levedura (Smetana e Zanchin, 2007), contudo, utilizando proteínas purificadas em experimentos *in vitro*, não se observa a quebra dessa interação (Scorsato et al, 2016). Essa mutação se localiza em um *loop* adjacente à hélice da TIPRL que faz contato direto com o C-terminal da PP2Ac.

O mutante S239E, que é uma mutação fosfomimética em um possível sítio de ATM/ATR, também apresentou esse ganho de função interagindo mais com PP4c, PP6c em alguns experimentos. Esse resultado indica que uma possível fosforilação nesse resíduo seria capaz de modular as interações com PP4c e PP6c, porém esse sítio de fosforilação ainda não foi validado. O *website* PhosphoSite, que é um banco de dados de acesso a possíveis sítios de fosforilação, não indica fosforilação nessa serina 239 (PhosphoSitePlus®, acesso em 25/03/2021). Contudo, outra serina próxima (S265) e uma treonina anterior (T209) foram identificadas como sítios de fosforilação em experimentos de fosfoproteômica, encontrados inclusive em três tipos de câncer de mama além de ser também sítios de fosforilação para ATM/ATR quinases envolvidas em respostas celulares a danos no DNA (Matsuoka et al, 2007). Mais estudos serão necessários para analisar os sítios de fosforilação da TIPRL, e precisamente qual a quinase que a fosforila.

Resultados mostrados no Capítulo 3 indicam que TIPRL poderia promover o estado desmetilado de PP2Ac. Para confirmar esse resultado, foi feita uma transfecção transiente da PP2Ac WT utilizando a TIPRL WT e uma série de mutantes. Observamos que a expressão de TIPRL WT resultou em um visível aumento nos níveis de não-metil PP2Ac no extrato, assim como na imunoprecipitação (Figura 24). Já os mutantes da

TIPRL não apresentaram o mesmo efeito, exceto o mutante S239 que parece aumentar um pouco os níveis de não-metil PP2Ac em relação ao controle. Isso indica que o efeito de TIPRL nos níveis de demetil-PP2Ac são dependentes da interação com a fosfatase, porém, essa é uma conclusão preliminar já que esses dados não foram quantificados.

5.3 Expressão endógena de TIPRL e fosfatases 2A em diferentes linhagens

Investigamos a expressão endógena da TIPRL, PP4c, PP6c, PP2Ac metilada e não metilada em dez diferentes linhagens celulares de tecido normal e cancerígeno oriundas de humanos, macaco e camundongo. A análise comparativa dos níveis proteicos de TIPRL em diferentes linhagens celulares por *Western blot* é inédita na literatura. Alguns poucos estudos revelaram informações sobre os níveis de mRNA de TIPRL. Por exemplo, a expressão de 8 genes de proteínas inibitórias da PP2A como a SET, CIP2A e TIPRL foi analisada em tecidos hematológicos, cérebro e coração de camundongos (Haesen et al, 2014). Nesse estudo, a expressão da TIPRL em nível de mRNA em camundongos foi muito similar entre diferentes tecidos, diferente do que é observado por exemplo nas proteínas SET ou ANP32e, que variam consideravelmente entre tecidos.

Dentre os resultados obtidos neste experimento, pode-se destacar que a versão não metilada da PP2Ac possui uma expressão uniforme entre essas linhagens, destacando-se que nas células malignas oriundas dos tumores ósseo (U2OS) e de mama triplo negativo (MDA-MB-231) havia uma expressão aumentada. Já nas linhagens HeLa, HaCaT, K562 e HepG2 a expressão apresentou-se diminuída comparando-se com a PP2Ac total, dessas quatro linhagens, três são de células malignas (HeLa, K562 e HepG2) e uma de tecido normal (HaCaT). Alterações na proporção de PP2Ac metilada na célula vêm sendo associadas ao aparecimento de doenças como o câncer e Alzheimer

(Sontag et al, 2014). Portanto, a baixa variação entre linhagens da versão não metilada da PP2A e a presença de variação na versão metilada podem indicar que a versão não metilada esteja num estado basal na célula, possivelmente em *pools* inativos da PP2Ac, como mencionado para $\alpha 4$, estes *pools* podem também ser formados com PME-1 ou TIPRL.

É interessante destacar que $\alpha 4$, PME-1 e TIPRL interagem apenas com a PP2A não metilada na leucina 309, porém em contextos diferentes. $\alpha 4$ atua no começo do processo da biogênese no sítio ativo da subunidade catalítica recém sintetizada do ribossomo, já a PME-1 age em um estágio mais avançado com a versão já ativada da PP2Ac contendo os dois íons de metal e pós ativação por SAM-LCMT1 e, por fim, a TIPRL poderia agir em qualquer estágio da biogênese desde que a PP2Ac esteja desmetilada. O fato de existir um reservatório de PP2Ac não metilada com TIPRL na célula pode relacionar-se à modulação da fosfatase quando a célula se encontra sob diferentes estresses, como por exemplo por estresse nutricional, estresse genotóxico (Sents et al, 2013). Estresse nutricional é comumente encontrado em alguns tipos de câncer que são dependentes de autofagia, pois no microambiente do tumor a oferta de nutrientes é baixa e a célula busca na autofagia a suplementação de nutrientes.

Dentro do conjunto de linhagens analisadas, não foi possível estabelecer um padrão claro de relação entre os níveis de expressão de TIPRL e o estado tumoral ou não tumoral de cada linhagem, ou ainda com os níveis de metilação/demetilação da PP2Ac.

5.4 Um possível mecanismo para a atuação de TIPRL na desmontagem das holoenzimas

Wu et al 2017, assim como nosso grupo em colaboração com o Dr. Egon Ogris, observaram que TIPRL interage exclusivamente com PP2Ac não metilada. Até o início

deste projeto, a única informação disponível na literatura sobre o efeito da carboximetilação da PP2Ac na sua interação com TIPRL indicava o contrário. Nakashima e colaboradores (2013) observaram que em células HEK293, os imunoprecipitados de TIPRL endógena continham muito pouca PP2Ac não metilada, ao contrário de $\alpha 4$ que continha predominantemente PP2Ac não metilada nos imunoprecipitados. Esses mesmos autores também observaram que o mutante Y307E da PP2Ac perdia a interação com TIPRL, que a mutação D71L na TIPRL elimina sua interação com PP2Ac em células transfectadas, e que os complexos de PP2Ac e TIPRL não continham a subunidade A, o que está de acordo com nossos resultados (Nakashima et al, 2013). A discrepância em relação à preferência da TIPRL por PP2Ac metilada ou não metilada pode ser reflexo da escolha dos anticorpos anti-demethyl. Em nosso estudo foi usado o clone do anticorpo PP2Ac não metilada (anticorpo 1D7), que passou pelos mais rigorosos testes de especificidade no grupo do Dr Egon Ogris, (Frohner et al, 2020) enquanto Nakashima e colaboradores usaram o 4b7 (Millipore).

Além de interagir exclusivamente com PP2Ac desmetilada, TIPRL mostrou uma preferência pela PP2Ac fosforilada no resíduo T304. Assim, com base em nossos resultados e dados da literatura, podemos propor que TIPRL seleciona os complexos não metilados da PP2A (heterotrímeros ou *core dimer*) ao interagir com a cauda da PP2Ac somente quando está desmetilada, e estabiliza essa cauda em uma conformação que coloca o resíduo T304 em contato com uma região da subunidade A com alta densidade de cargas negativas (resíduos E32, D24, D61, E62, D63, E64, E100, E101). Por esse mecanismo, TIPRL é capaz de “verificar” se os complexos desmetilados estão também fosforilados na T304, e nesse caso, promover a dissociação entre PP2Ac e a subunidade A mediada por repulsão de cargas negativas entre o fosfato e as cadeias laterais de

aspartato e glutamato da subunidade A. Ou seja, a TIPRL desmonta o *core dimer* somente se a PP2Ac estiver desmetilada e fosforilada (Figura 26).

Esse mecanismo proposto implica que a fosforilação da T304 promove a dissociação entre PP2Ac e subunidade A na presença de TIPRL. De fato, em nossos resultados, podemos constatar que houve uma redução de 38% na interação da subunidade A com o mutante fosfomimético T304D em comparação à PP2A selvagem (Figura 2, Capítulo 3).

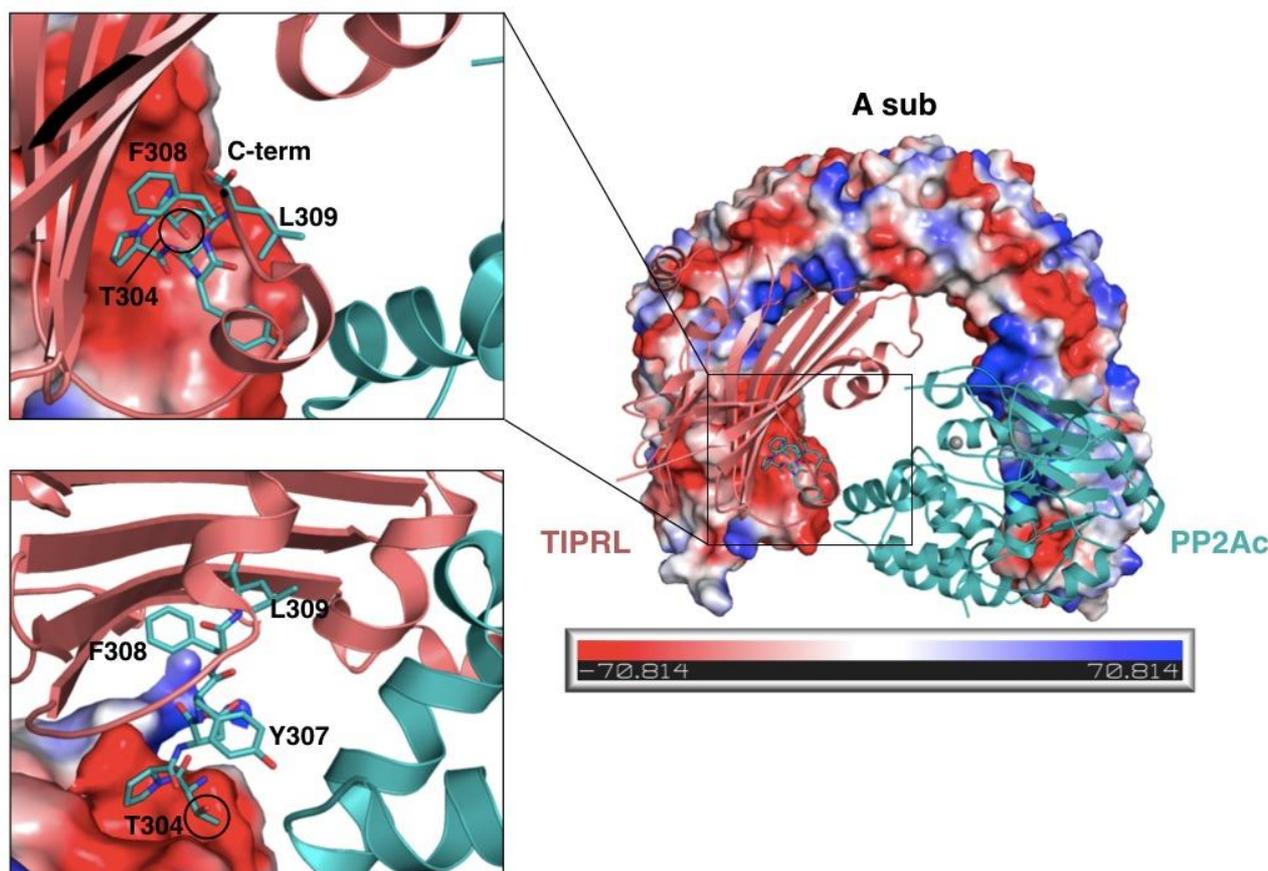


Figura 26. Estrutura do trímero TIPRL-PP2Ac-A (PDB: 5W0W, Wu et al, 2017) com a subunidade A representada como superfície de potencial eletrostático, as duas outras subunidades em *cartoon* (TIPRL em salmão e PP2Ac em ciano) e o C-terminal da PP2Ac em *sticks* mostrando as cadeias laterais. No *zoom* mostrado à esquerda em diferentes orientações, destaca-se a posição da cadeia lateral do resíduo T304 da PP2Ac em proximidade com uma região do N-terminal da subunidade A rica em cargas negativas (E32, D24, D61, E62, D63, E64, E100, E101). Figura gerada no Pymol.

Essa mesma região rica em cargas negativas no N-terminal da subunidade A já havia chamado a atenção dos autores de uma das primeiras estruturas cristalográficas da holoenzima, que propuseram que a cauda C-terminal da PP2Ac só consegue se ancorar nessa região se estiver carboximetilada, já que a metilação neutraliza parcialmente a carga negativa da carboxila do C-terminal (Cho e Xu, 2007). Nessa estrutura do trímero com a subunidade B56 γ 1, o C-terminal da PP2Ac adota uma conformação na qual o resíduo T304 está distante da subunidade A. Já no trímero com a subunidade B55, não existe densidade eletrônica na região da cauda da PP2Ac, então é impossível determinar sua conformação (Xu et al, 2008). Apesar da escassez de estruturas cristalográficas nas quais a densidade eletrônica da cauda está definida, com base na comparação com o trímero AB56 γ 1C, podemos propor que a conformação adotada pela cauda da PP2Ac na presença da TIPRL é única (Figura 27).

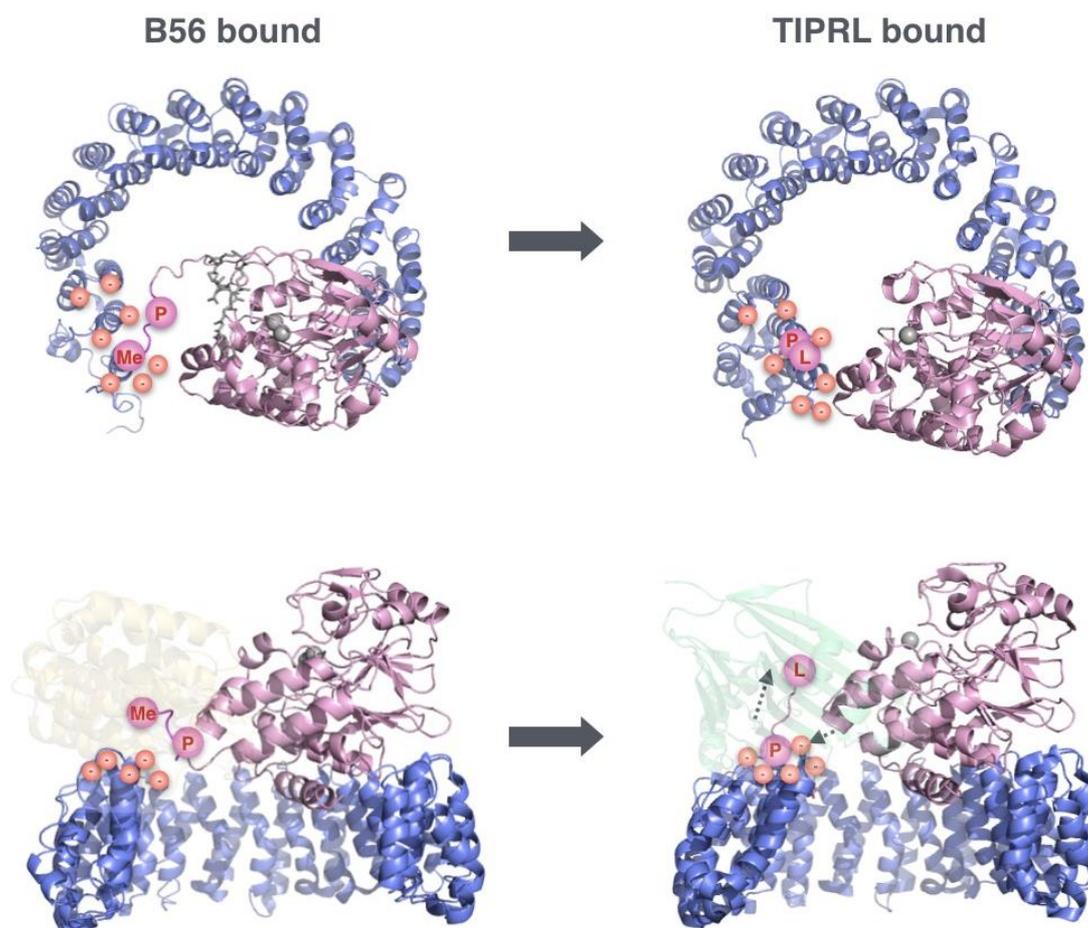


Figura 27. Comparação entre a conformação do C-terminal da PP2Ac (rosa) e subunidade A (azul) em complexo com a subunidade B56 γ 1 (*B56 bound*, PDB:2IAE) e com TIPRL (*TIPRL bound*, PDB:5W0W). Na estrutura com TIPRL, os resíduos 296 a 303 não aparecem na densidade eletrônica. Os complexos são mostrados em vista “superior” (acima) e “lateral” (abaixo). O resíduo pT304 é identificado como **P**, L309 não metilado como **L**, e L309 metilado como **Me**. As cargas negativas do N-terminal da subunidade A são representadas como círculos vermelhos. B56 γ 1 e TIPRL foram removidas na vista superior e aparecem com transparência na vista lateral (em amarelo e verde, respectivamente), para maior clareza na representação de C-terminal da PP2Ac. De acordo com esse modelo, a interação com TIPRL coloca a cauda da PP2Ac em uma conformação única, na qual o resíduo T304 fica próximo das cargas negativas da subunidade A. Se esse resíduo estiver fosforilado, haverá repulsão eletrostática. Figura gerada no Pymol.

Usando proteínas purificadas em um ensaio de GST *pulldown* (GST- α 4, TIPRL e a holoenzima AB56 γ 1C), Wu et al (2017) mostraram que α 4 é capaz de capturar a subunidade catalítica presente na holoenzima desmetilada apenas após incubação a 37°C e na presença de TIPRL ou de PPI (pirofosfato inorgânico). Na presença de TIPRL,

o *pull-down* resulta em um trímero TIPRL-PP2Ac- $\alpha 4$, confirmando a existência desse trímero identificado inicialmente por Smetana e Zanchin (2007). Já a $\alpha 4$ sozinha tem essa capacidade de captura muito reduzida, e quando a holoenzima é metilada está se torna imune ao ataque de $\alpha 4$ e TIPRL. Esse mesmo artigo descreve a estrutura do trímero TIPRL-PP2Ac-A, porém, em nenhuma das condições testadas houve a captura da subunidade A pôr $\alpha 4$ junto com PP2Ac e TIPRL (Wu et al, 2017). Pela ausência de interação com a subunidade A nos nossos resultados, sugerimos que o complexo TIPRL-PP2Ac-A é um estado de transição no processo de dissociação completa da holoenzima mediado por TIPRL. (Figura 28). Esse trímero só pode existir de forma estável se a PP2Ac estiver desmetilada e não fosforilada, e possivelmente essa combinação de modificações é rara na célula.

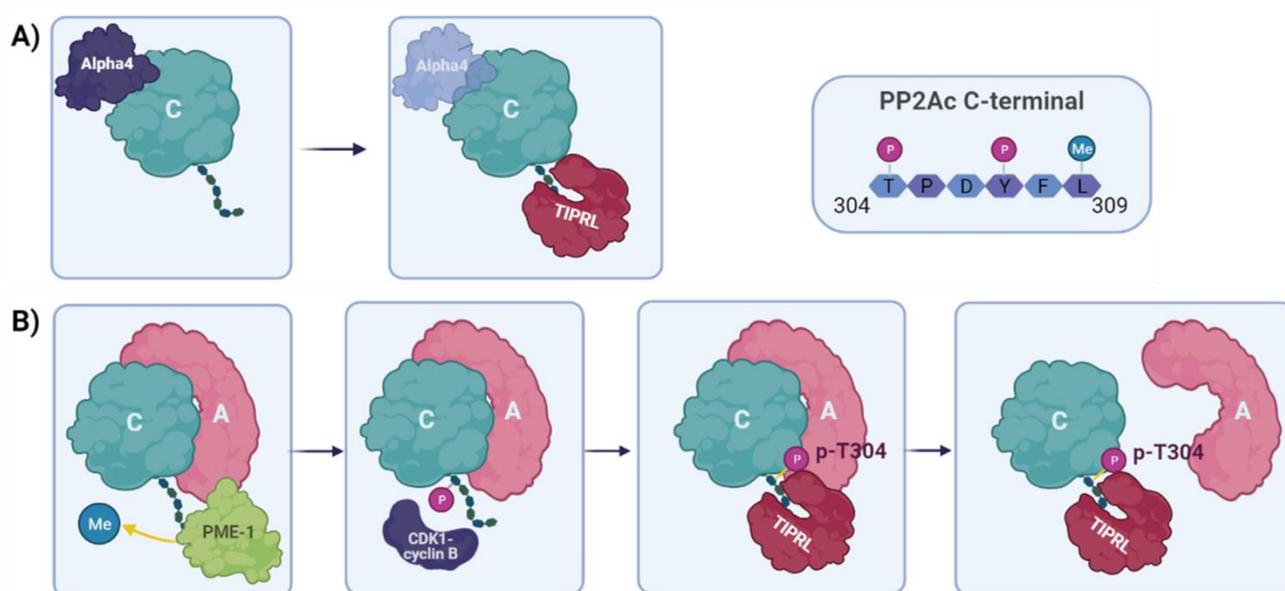


Figura 28. TIPRL é sensível a modificações pós-traducionais na cauda C-terminal da subunidade catalítica da PP2A. A) TIPRL interage exclusivamente com a PP2Ac não metilada no resíduo L309, esta interação pode ocorrer em fases iniciais da biogênese com a interação com $\alpha 4$ no sítio ativo da PP2A. B) TIPRL interage 2X mais com a PP2Ac fosforilada no resíduo 304 (p-T304), esta fosforilação está associada a inativação da PP2A e uma possível repulsão da subunidade A.

Portanto, sugerimos um código para os efeitos da interação da TIPRL com PP2Ac

(Tabela 7):

Tabela 7. Proposta de como a TIPRL interage com a subunidade catalítica da PP2A sob influência de modificações pós-traducionais específicas nos resíduos T304 e L309 na cauda C-terminal.

PP2A (<i>core dimer</i>)		TIPRL
<i>p-304</i>	<i>Me-L309</i>	
-	+	Não interage
+	+	Não interage
-	-	Interação forma o trímero A-TIPRL-C
+	-	Interage e gera repulsão de cargas, dissociando a subunidade A

O fato de TIPRL interagir com PP4c e PP6c por uma cauda C-terminal muito parecida com a da PP2Ac levanta a possibilidade de uma regulação semelhante para essas fosfatases. Verificamos que a PP6c é fosforilada no resíduo T301 (PhosphoSitePlus®, acesso em 25/03/2021), que é equivalente ao resíduo T304 da PP2Ac. Essa observação sugere que os complexos ativos de PP6c podem ser desmontados também por um mecanismo dependente de TIPRL e da fosforilação do resíduo T301. Já PP4c aparentemente não tem um sítio de fosforilação equivalente. Isso pode estar relacionado ao fato de que TIPRL interage com os complexos de PP4c inibindo sua atividade, porém sem provocar a dissociação desses complexos, já que subunidades regulatórias da PP4 (PP4R2 e PP4R3 β) interagem também com TIPRL (Rosales et al, 2015).

Até pouco tempo atrás, não se sabia qual quinase fosforila o resíduo T304 da PP2Ac, e nem o contexto funcional dessa fosforilação. Porém, recentemente, foi demonstrado por experimentos de fosfoproteômica, fosforilação *in vitro* e *Western blot*

com anticorpo fosfoespecífico anti-pT304 que a quinase CDK1 no complexo com ciclina B é responsável por fosforilar esse resíduo, e que essa fosforilação ocorre predominantemente na fase M do ciclo celular. Quando fosforilada pela CDK1–ciclina B, PP2Ac é inativada pela remoção da subunidade B55, permitindo assim a entrada e manutenção da mitose, resultado esse suportado pelo mutante T304D que não interage com as subunidades B (Nasa et al, 2021).

Portanto, a fosforilação do resíduo T304 da PP2Ac está ligada ao ciclo mitótico, no qual proteínas quinases pró mitóticas são ativadas e as fosfatases inativadas. Durante a progressão da mitose, especificamente no final da divisão, as fosfatases PP1 e PP2A controlam as mitose-quinases através da desfosforilação, permitindo a saída da Anáfase I. Na fosfatase PP1, a T320 é fosforilada pela quinase CDK1 para iniciar a mitose, após a progressão celular a ciclina B é degradada e a PP1 volta a estar ativa na fase de anáfase (Nasa e Kettenbach, 2018). Conforme nossos resultados, a TIPRL pode ser um inibidor da PP2Ac na fase M, em razão de sua interação 2,5x maior com o mutante fosfomimético T304D. Dentro desse modelo, o mecanismo de dissociação das holoenzimas descrito na seção anterior seria uma forma de inativar PP2A durante a fase M sob o controle da fosforilação via CDK1-ciclina B.

6. CONCLUSÕES

Resumidamente, concluímos que a TIPRL interage exclusivamente com a versão não metilada da PP2Ac e que a superexpressão de TIPRL promove o aumento de PP2Ac não metilada na célula. Observamos também que a interação de TIPRL com PP2Ac é sensível a pH alcalino. Estudos com mutantes e com o anticorpo fosfo-específico sugerem que a interação entre TIPRL e PP2Ac é positivamente regulada por fosforilação da PP2Ac no resíduo T304. Além disso, caracterizamos a interação de uma série de mutantes da TIPRL com PP2Ac, PP4c e PP6c endógenas. Como principal conclusão, esses resultados sugerem um modelo de desmontagem da holoenzima ou do *core dimer* mediado por TIPRL e dependente da demetilação da PP2Ac e da fosforilação no resíduo T304, possivelmente no contexto da inibição da PP2Ac por CDK1 na progressão mitótica.

7. BIBLIOGRAFIA

AUSUBEL FM. Current protocols in Molecular Biology. Unites States of. America, John Willey and sons. P.75-77, 82-83, 2003.

BIALOJAN C, TAKAI A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J.* 1988, 15;256(1):283-90. doi: 10.1042/bj2560283.

BRYANT JC, WESTPHAL RS, WADZINSKI BE. Methylated C-terminal leucine residue of PP2A catalytic subunit is important for binding of regulatory Balpha subunit. *Biochem J.* 1999, 15;339(Pt 2):241-6.

CASTILHO PV, WILLIAMS BC, MOCHIDA S, ZHAO Y, GOLDBERG ML. The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Mol Biol Cell.* 2009, 20(22):4777-89. doi:10.1091/mbc.e09-07-0643.

CERAMI E, GAO J, DOGRUSOZ U, GROSS BE, SUMER SO, AKSOY BA, JACOBSEN A, BYRNE CJ, HEUER ML, LARSSON E, ANTIPIN Y, REVA B, GOLDBERG AP, SANDER C, SCHULTZ N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012, 2(5):401-4. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.

CHEN J, MARTIN BL, BRAUTIGAN DL. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science.* 1992, 28;257(5074):1261-4. doi: 10.1126/science.1325671.

CHEN H, XU J, WANG P, SHU Q, HUANG L, GUO J, ZHANG X, ZHANG H, WANG Y, SHEN Z, CHEN X, ZHANG Q. Protein phosphatase 2 regulatory subunit B"Alpha silencing inhibits tumor cell proliferation in liver cancer. *Cancer Med.* 2019, 8(18):7741-7753. doi: 10.1002/cam4.2620.

CHO US, XU W. Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature.* 2007, 4;445(7123):53-7. doi: 10.1038/nature05351.

CHUNG H, NAIRN AC, MURATA K, BRAUTIGAN DL. 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.* 1999, 10;38(32):10371-6. doi: 10.1021/bi990902g.

COHEN PT, PHILP A, VÁZQUEZ-MARTIN C. Protein phosphatase 4-from obscurity to vital functions. *FEBS Lett.* 2005, 13;579(15):3278-86.

DEGRANDE ST, LITTLE SC, NIXON DJ, WRIGHT P, SNYDER J, DUN W, MURPHY N, KILIC A, HIGGINS R, BINKLEY PF, BOYDEN PA, CARNES CA, ANDERSON ME, HUND TJ, MOHLER PJ. Molecular mechanisms underlying cardiac protein phosphatase 2A regulation in heart. *J Biol Chem.* 2013, 11;288(2):1032-46. doi: 10.1074/jbc.M112.426957.

DOVEGA R, TSUTAKAWA S, QUISTGAARD EM, ANANDAPADAMANABAN M, LÖW C, NORDLUND P. Structural and biochemical characterization of human PR70 in isolation and in complex with the scaffolding subunit of protein phosphatase 2A. *PLoS One*. 2014, 9;9(7):e101846. doi: 10.1371/journal.pone.0101846.

EICHHORN PJA, CREYGHTON MP, BERNARDS R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009, 1795(1):1-15. doi: 10.1016/j.bbcan.2008.05.005.

FAN YL, CHEN L, WANG J, YAO Q, WAN JQ. Over expression of PPP2R2C inhibits human glioma cells growth through the suppression of mTOR pathway. *FEBS Lett*. 2013, 11;587(24):38927. doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.029.

FORESTER CM, MADDOX J, LOUIS JV, GORIS J, VIRSHUP DM. Control of mitotic exit by PP2A regulation of Cdc25C and Cdk1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 11;104(50):19867-72. doi: 10.1073/pnas.0709879104.

FROHNER IE, MUDRAK I, KRONLACHNER S, SCHÜCHNER S, OGRIS E. Antibodies recognizing the C terminus of PP2A catalytic subunit are unsuitable for evaluating PP2A activity and holoenzyme composition. *Sci Signal*. 2020, 28;13(616):eaax6490. doi: 10.1126/scisignal.aax6490.

GINGRAS AC, CABALLERO M, ZARSKE M, SANCHEZ A, HAZBUN TR, FIELDS S, SONENBERG N, HAFEN E, RAUGHT B, AEBERSOLD R. A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics*. 2005, 4(11):1725-40. doi: 10.1074/mcp.M500231-MCP200.

GOGUET-RUBIO P, AMIN P, AWAL S, VIGNERON S, CHARRASSE S, MECHALI F, LABBÉ JC, LORCA T, CASTRO A. PP2A-B55 Holoenzyme Regulation and Cancer. *Biomolecules*. 2020, 22;10(11):1586. doi: 10.3390/biom10111586.

GONG FR, WU MY, SHEN M, ZHI Q, XU ZK, WANG R, WANG WJ, ZONG Y, LI ZL, WU Y, ZHOU BP, CHEN K, TAO M, LI W. PP2A inhibitors arrest G2/M transition through JNK/Sp1- dependent down-regulation of CDK1 and autophagy-dependent up-regulation of p21. *Oncotarget*. 2015, 30;6(21):18469-83. doi: 10.18632/oncotarget.4063.

GOUDREULT M, D'AMBROSIO LM, KEAN MJ, MULLIN MJ, LARSEN BG, SANCHEZ A, CHAUDHRY S, CHEN GI, SICHERI F, NESVIZHSHKII AI, AEBERSOLD R, RAUGHT B, GINGRAS AC. A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Mol Cell Proteomics*. 2009, 8(1):157-71. doi: 10.1074/mcp.M800266-MCP200.

GROVES MR, HANLON N, TUROWSKI P, HEMMINGS BA, BARFORD D. The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell*. 1999, 8;96(1):99-110. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80963-0.

GUO J, ZHOU YJ, HILLWIG ML, SHEN Y, YANG L, WANG Y, ZHANG X, LIU W, PETERS RJ, CHEN X, ZHAO ZK, HUANG L. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013, 16;110(29):12108-13. doi: 10.1073/pnas.1218061110.

GURAN T, YESIL G, TURAN S, ATAY Z, BOZKURTLAR E, AGHAYEV A, GUL S, TINAY I, ARU B, ARSLAN S, KOROGLU MK, ERCAN F, DEMIREL GY, EREN FS, KARADEMIR B, BERKET A. PPP2R3C gene variants cause syndromic 46, XY gonadal dysgenesis and impaired spermatogenesis in humans. *Eur J Endocrinol*. 2019, 1;180(5):291309. doi: 10.1530/EJE-19-0067.

HAESEN D, SENTS W, LEMAIRE K, HOORNE Y, JANSSENS V. The basic biology of PP2A in hematologic cells and malignancies. *Front Oncol*. 2014, 11;4:347. doi: 10.3389/fonc.2014.00347.

HAHN K, MIRANDA M, FRANCIS VA, VENDRELL J, ZORZANO A, TELEMANN AA. PP2A regulatory subunit PP2A-B' counteracts S6K phosphorylation. *Cell Metab*. 2010, 5;11(5):438-44. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.015.

HERZIG JK, BULLINGER L, TASDOGAN A, ZIMMERMANN P, SCHLEGEL M, TELEANU V, WEBER D, RÜCKER FG, PASCHKA P, DOLNIK A, SCHNEIDER E, KUCHENBAUER F, HEIDEL FH, BUSKE C, DÖHNER H, DÖHNER K, GAIDZIK VI. Protein phosphatase 4 regulatory subunit 2 (PPP4R2) is recurrently deleted in acute myeloid leukemia and required for efficient DNA double strand break repair. *Oncotarget*. 2017, 21;8(56):95038-95053. doi: 10.18632/oncotarget.21119.

HYODO T, ITO S, ASANO INAMI E, CHEN D, SENG T. A regulatory subunit of protein phosphatase 2A, PPP2R5E, regulates the abundance of microtubule crosslinking factor 1. *FEBS J*. 2016, 283(19):3662-3671. doi: 10.1111/febs.13835.

HØJLUND K, POULSEN M, STAEHR P, BRUSGAARD K, BECK-NIELSEN H. Effect of insulin on protein phosphatase 2A expression in muscle in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest*. 2002, 32(12):918-23. doi: 10.1046/j.1365-2362.2002.01098.x.

HWANG J, PALLAS DC. STRIPAK complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014, 47:118-48. doi: 10.1016/j.biocel.2013.11.021

HWANG J, LEE JA, PALLAS DC. Leucine Carboxyl Methyltransferase 1 (LCMT-1) Methylates Protein Phosphatase 4 (PP4) and Protein Phosphatase 6 (PP6) and Differentially Regulates the Stable Formation of Different PP4 Holoenzymes. *J Biol Chem*. 2016, 30;291(40):21008-21019. doi: 10.1074/jbc.M116.739920.

HU MC, TANG-OXLEY Q, QIU WR, WANG YP, MIHINDUKULASURIYA KA, AFSHAR R, TAN TH. Protein phosphatase X interacts with c-Rel and stimulates c-Rel/nuclear factor kappaB activity. *J Biol Chem*. 1998, 11;273(50):33561-5. doi: 10.1074/jbc.273.50.33561.

IVANOV SV, GOPARAJU CM, LOPEZ P, ZAVADIL J, TOREN-HARITAN G, ROSENWALD S, HOSHEN M, CHAJUT A, COHEN D, PASS HI. Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. *J Biol Chem*. 2010, 23;285(30):22809-17. doi: 10.1074/jbc.M110.100354.

JACINTO E, GUO B, ARNDT KT, SCHMELZLE T, HALL MN. TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell*. 2001, 8(5):1017-26. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00386-0.

JANSSENS V, GORIS J, VAN HOOFF C. PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev*. 2005, 15(1):34-41. doi: 10.1016/j.gde.2004.12.004.

JAYARAJ RL, AZIMULLAH S, BEIRAM R. Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease in the Middle East and its shared pathological mediators. *Saudi J Biol Sci.* 2020, 27(2):736-750. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.12.028.

JEON SJ, AHN JH, HALDER D, CHO HS, LIM JH, JUN SY, LEE JJ, YOON JY, CHOI MH, JUNG CR, KIM JM, KIM NS. TIPRL potentiates survival of lung cancer by inducing autophagy through the eIF2 α -ATF4 pathway. *Cell Death Dis.* 2019, 20;10(12):959. doi: 10.1038/s41419-019-2190-0.

JIANG L, STANEVICH V, SATYSHUR KA, KONG M, WATKINS GR, WADZINSKI BE, SENGUPTA R, XING Y. Structural basis of protein phosphatase 2A stable latency. *Nat Commun.* 2013, 4:1699. doi: 10.1038/ncomms2663.

JOSEPH BK, LIU HY, FRANCISCO J, PANDYA D, DONIGAN M, GALLO-EBERT C, GIORDANO C, BATA A, NICKELS JT Jr. Inhibition of AMP Kinase by the Protein Phosphatase 2A Heterotrimer, PP2A^{pp2r2d}. *J Biol Chem.* 2015, 24;290(17):1058898. doi: 10.1074/jbc.M114.626259.

KAJINO T, REN H, IEMURA S, NATSUME T, STEFANSSON B, BRAUTIGAN DL, MATSUMOTO K, NINOMIYA-TSUJI J. Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem.* 2006, 29;281(52):39891-6. doi: 10.1074/jbc.M608155200.

KAMNASARAN D, CHEN CP, DEVRIENDT K, MEHTA L, COX DW. Defining a holoprosencephaly locus on human chromosome 14q13 and characterization of potential candidate genes. *Genomics.* 2005, 85(5):608-21. doi: 10.1016/j.ygeno.2005.01.010.

KAUKO O, WESTERMARCK J. Non-genomic mechanisms of protein phosphatase 2A (PP2A) regulation in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018, 96:157-164. doi: 10.1016/j.biocel.2018.01.005.

KETTENBACH AN. *Effects of carboxyl-terminal methylation on PP2A, PP4 and PP6 holoenzyme function.* Europhosphatase: From Molecular Mechanisms to System-wide Responses. Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Debrecen/Hungria, Julho de 2019.

KITAJIMA TS, SAKUNO T, ISHIGURO K, IEMURA S, NATSUME T, KAWASHIMA SA, WATANABE Y. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature.* 2006, 4;441(7089):46-52. doi: 10.1038/nature04663.

KONG M, DITSWORTH D, LINDSTEN T, THOMPSON CB. Alpha4 is an essential regulator of PP2A phosphatase activity. *Mol Cell.* 2009, 9;36(1):51-60. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.025.

KUO YC, HUANG KY, YANG CH, YANG YS, LEE WY, CHIANG CW. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55 α regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem.* 2008, 25;283(4):1882-92. doi: 10.1074/jbc.M709585200.

LEE DH, GOODARZI AA, ADELMANT GO, PAN Y, JEGGO PA, MARTO JA, CHOWDHURY D. Phosphoproteomic analysis reveals that PP4 dephosphorylates KAP-1 impacting the DNA damage response. *EMBO J.* 2012, 16;31(10):2403-15. doi: 10.1038/emboj.2012.86.

LEE J, STOCK J. Protein phosphatase 2A catalytic subunit is methyl-esterified at its carboxyl terminus by a novel methyltransferase. *J Biol Chem.* 1993, 15;268(26):19192-5.

LEE J, LEE DH. Leucine methylation of protein phosphatase PP4C at C-terminal is critical for its cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, 452:42–47. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.045.

LEONARD D, HUANG W, IZADMEHR S, O'CONNOR CM, WIREDJA DD, WANG Z, ZAWARE N, CHEN Y, SCHLATZER DM, KISELAR J, VASIREDDI N, SCHÜCHNER S, PERL AL, GALSKY MD, XU W, BRAUTIGAN DL, OGRIS E, TAYLOR DJ, NARLA G. Selective PP2A Enhancement through Biased Heterotrimer Stabilization. *Cell.* 2020, 30;181(3):688-701.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.038.

LEONG W, XU W, WANG B, GAO S, ZHAI X, WANG C, GILSON E, YE J, LU Y. PP2A subunit PPP2R2C is downregulated in the brains of Alzheimer's transgenic mice. *Aging.* 2020, 14;12(8):68806890. doi: 10.18632/aging.103048.

LETOURNEUX C, ROCHER G, PORTEU F. B56 containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *EMBO J.* 2006, 22;25(4):727-38. doi: 10.1038/sj.emboj.7600980.

LI HH, CAI X, SHOUSE GP, PILUSO LG, LIU X. A specific PP2A regulatory subunit, B56gamma, mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *EMBO J.* 2007, 24;26(2):402-11. doi: 10.1038/sj.emboj.7601519.

LI M, LI X, XU S, XUE P, LI Q, LU Q, JIA Q, ZHANG L, LI X, LI X. Protein phosphatase 4 catalytic subunit is overexpressed in glioma and promotes glioma cell proliferation and invasion. *Tumour Biol.* 2016, 37(9):11893-11901. doi: 10.1007/s13277-016-5054-6.

LI X, LIANG L, HUANG L, MA X, LI D, CAI S. High expression of protein phosphatase 4 is associated with the aggressive malignant behavior of colorectal carcinoma. *Mol Cancer.* 2015, 28;14:95. doi: 10.1186/s12943-015-0356-7.

LI X, ZHANG J, MA D. PPP2R2A binds and dephosphorylates GFPT2 in breast cancer cells. *Chinese Journal of Biotechnology,* 2018, 25;34(6):956-963. doi: 10.13345/j.cjb.170471.

LIU E, KNUTZEN CA, KRAUSS S, SCHWEIGER S, CHIANG GG. Control of mTORC1 signaling by the Opitz syndrome protein MID1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011, 24;108(21):8680-5. doi: 10.1073/pnas.1100131108.

LONGIN S, JORDENS J, MARTENS E, STEVENS I, JANSSENS V, RONDELEZ E, DE BAERE I, DERUA R, WAELEKENS E, GORIS J, VAN HOOFF C. An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methylesterase and can be re-activated by the phosphotyrosyl phosphatase activator. *Biochem J.* 2004, 15;380(Pt1):111-9. doi: 10.1042/BJ20031643.

LONGIN S, ZWAENEPOEL K, LOUIS JV, DILWORTH S, GORIS J, JANSSENS V. Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit. *J Biol Chem.* 2007, 14;282(37):26971-26980. doi: 10.1074/jbc.M704059200.

LONGO PA, KAVRAN JM, KIM MS, LEAHY DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 2013, 529:227-40. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5.

LORENZ U. Protein tyrosine phosphatase assays. *Curr Protoc Immunol.* 2011, 11:11.7. doi: 10.1002/0471142735.im1107s93.

MCCONNELL JL, GOMEZ RJ, MCCORVEY LR, LAW BK, WADZINSKI BE. Identification of a PP2A-interacting protein that functions as a negative regulator of phosphatase activity in the ATM/ATR signaling pathway. *Oncogene.* 2007, 6;26(41):6021-30. doi: 10.1038/sj.onc.1210406.

MATSUOKA S, BALLIF BA, SMOGORZEWSKA A, MCDONALD ER, HUROV KE, LUO J, BAKALARSKI CE, ZHAO Z, SOLIMINI N, LERENTHAL Y, SHILOH Y, GYGI SP, ELLEDGE SJ. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* 2007, 25;316(5828):1160-6. doi: 10.1126/science.1140321.

MCCRIGHT B, RIVERS AM, AUDLIN S, VIRSHUP DM. The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem.* 1996, 6;271(36):22081-9. doi: 10.1074/jbc.271.36.22081. PMID: 8703017.

MIGUELETI DL, SMETANA JH, NUNES HF, KOBARG J, ZANCHIN NI. Identification and characterization of an alternatively spliced isoform of the human protein phosphatase 2A catalytic subunit. *J Biol Chem.* 2012, 10;287(7):4853-62. doi: 10.1074/jbc.M111.283341.

MORITA K, HE S, NOWAK RP, WANG J, ZIMMERMAN MW, FU C, DURBIN AD, MARTEL MW, PRUTSCH N, GRAY NS, FISCHER ES, LOOK AT. Allosteric Activators of Protein Phosphatase 2A Display Broad Antitumor Activity Mediated by Dephosphorylation of MYBL2. *Cell.* 2020, 30;181(3):702-715.e20. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.051.

MUMBY M. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell.* 2007, 13;130(1):21-4. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.034.

NADER CP, CIDEM A, VERRILLS NM, AMMIT AJ. Protein phosphatase 2A (PP2A): a key phosphatase in the progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) to lung cancer. *Respir Res.* 2019, 17;20(1):222. doi: 10.1186/s12931-019-1192-x.

NAGARAJ N, WISNIEWSKI JR, GEIGER T, COX J, KIRCHER M, KELSO J, PÄÄBO S, MANN M. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol.* 2011, 8;7:548. doi: 10.1038/msb.2011.81.

NAKASHIMA A, TANIMURA-ITO K, OSHIRO N, EGUCHI S, MIYAMOTO T, MOMONAMI A, KAMADA S, YONEZAWA K, KIKKAWA U. A positive role of mammalian Tip41-like protein, TIPRL, in the amino-acid dependent mTORC1-signaling pathway through interaction with PP2A. *FEBS Lett.* 2013, 17;587(18):2924-9. doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.027.

NANAHOSHI M, TSUJISHITA Y, TOKUNAGA C, INUI S, SAKAGUCHI N, HARA K, YONEZAWA K. Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases. *FEBS Lett.* 1999, 5;446(1):108-12. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00189-1.

NASA I, KETTENBACH AN. Coordination of Protein Kinase and Phosphoprotein Phosphatase Activities in Mitosis. *Front Cell Dev Biol.* 2018, 22;6:30. doi: 10.3389/fcell.2018.00030.

NASA I, CRESSEY LE, KRUSE T, HERTZ EPT, GUI J, GRAVES LM, NILSSON J, KETTENBACH AN. Quantitative kinase and phosphatase profiling reveal that CDK1 phosphorylates PP2Ac to promote mitotic entry. *Sci Signal.* 2021, 8;13(648):eaba7823. doi: 10.1126/scisignal.aba7823.

NOBUMORI Y, SHOUSE GP, WU Y, LEE KJ, SHEN B, LIU X. B56 γ tumor-associated mutations provide new mechanisms for B56 γ -PP2A tumor suppressor activity. *Mol Cancer Res.* 2013, 11(9):995-1003. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0633.

NUNBHAKDI-CRAIG V, SCHUECHNER S, SONTAG JM, MONTGOMERY L, PALLAS DC, JUNO C, MUDRAK I, OGRIS E, SONTAG E. Expression of protein phosphatase 2A mutants and silencing of the regulatory B alpha subunit induce a selective loss of acetylated and detyrosinated microtubules. *J Neurochem.* 2007; 101(4):959-71. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04503.x.

OGO H, TANUMA N, MATSUI Y, HAYAKAWA N, INAGAKI A, SUMIYOSHI M, MOMOI Y, KISHIMOTO A, SUZUKI M, SASAKI N, OHUCHI T, NOMURA M, TERUYA Y, YASUDA K, WATANABE T, SHIMA H. The protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c) is indispensable for proper post implantation embryogenesis. *Mech Dev.* 2016, 139:1-9. doi: 10.1016/j.mod.2016.02.001.

OGRIS E, DU X, NELSON KC, MAK EK, YU XX, LANE WS, PALLAS DC. A protein phosphatase methylesterase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 1999, 14;274(20):14382-91. doi: 10.1074/jbc.274.20.14382.

OHAMA T. The multiple functions of protein phosphatase 6. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019, 1866(1):74-82. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.015.

O'KEEFE, EP. *Nucleic Acid Delivery: Lentiviral and Retroviral Vectors.* Mater Methods. 2013, 3:174. doi: //dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.174.

PALLAS DC, SHAHRIK LK, MARTIN BL, JASPERS S, MILLER TB, BRAUTIGAN DL, ROBERTS TM. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell.* 1990, 12;60(1):167-76. doi: 10.1016/0092-8674(90)90726-u.

PARK J, LEE J, LEE DH. Identification of Protein Phosphatase 4 Inhibitory Protein That Plays an Indispensable Role in DNA Damage Response. *Mol Cells.* 2019, 31;42(7):546-556. doi: 10.14348/molcells.2019.0014.

PARK J, LEE DH. Functional roles of protein phosphatase 4 in multiple aspects of cellular physiology: a friend and a foe. *BMB Rep.* 2020, 53(4):181-190. doi: 10.5483/BMBRep.2020.53.4.019.

PRICKETT TD, BRAUTIGAN DL. The alpha4 regulatory subunit exerts opposing allosteric effects on protein phosphatases PP6 and PP2A. *J Biol Chem.* 2006, 13;281(41):30503-11. doi: 10.1074/jbc.M601054200.

REID MA, WANG WI, ROSALES KR, WELLIVER MX, PAN M, KONG M. The B55 α subunit of PP2A drives a p53-dependent metabolic adaptation to glutamine deprivation. *Mol Cell*. 2013, 25;50(2):200-11. doi: 10.1016/j.molcel.2013.02.008.

RIEDEL CG, KATIS VL, KATOU Y, MORI S, ITOH T, HELMHART W, GÁLOVÁ M, PETRONCZKI M, GREGAN J, CETIN B, MUDRAK I, OGRIS E, MECHTLER K, PELLETIER L, BUCHHOLZ F, SHIRAHIGE K, NASMYTH K. Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature*. 2006, 4;441(7089):53-61. doi: 10.1038/nature04664.

ROCHER G, LETOURNEUX C, LENORMAND P, PORTEU F. Inhibition of B56-containing protein phosphatase 2As by the early response gene IEX-1 leads to control of Akt activity. *J Biol Chem*. 2007, 23;282(8):5468-77. doi: 10.1074/jbc.M609712200.

RODGERS JT, VOGEL RO, PUIGSERVER P. Clk2 and B56 β mediate insulin-regulated assembly of the PP2A phosphatase holoenzyme complex on Akt. *Mol Cell*. 2011, 18;41(4):471-9. doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.007.

ROSALES KR, REID MA, YANG Y, TRAN TQ, WANG WI, LOWMAN X, PAN M, KONG M. TIPRL Inhibits Protein Phosphatase 4 Activity and Promotes H2AX Phosphorylation in the DNA Damage Response. *PLoS One*. 2015, 30;10(12):e0145938. doi: 10.1371/journal.pone.0145938.

RUEDIGER R, RUIZ J, WALTER G. Human cancer-associated mutations in the A α subunit of protein phosphatase 2A increase lung cancer incidence in A α knock-in and knockout mice. *Mol Cell Biol*. 2011, 31(18):3832-44. doi: 10.1128/MCB.05744-11.

SABLINA AA, HAHN WC. SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation. *Cancer Metastasis Rev*. 2008, 27(2):137-46. doi: 10.1007/s10555-008-9116-0.

SANGODKAR J, FARRINGTON CC, MCCLINCH K, GALSKY MD, KASTRINSKY DB, NARLA G. All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase. *FEBS J*. 2016, 283(6):1004-24. doi: 10.1111/febs.13573.

SATO N, FUKUSHIMA N, MAITRA A, IACOBUZIO-DONAHUE CA, VAN HECK NT, CAMERON JL, YEO CJ, HRUBAN RH, GOGGINS M. Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol*. 2004, 164(3):903-14. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63178-1.

SCHMITZ MH, HELD M, JANSSENS V, HUTCHINS JR, HUDECZ O, IVANOVA E, GORIS J, TRINKLE-MULCAHY L, LAMOND AI, POSER I, HYMAN AA, MECHTLER K, PETERS JM, GERLICH DW. Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55 α and importin- β 1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nat Cell Biol*. 2010, 12(9):886-93. doi: 10.1038/ncb2092.

SCORSATO V, LIMA TB, RIGHETTO GL, ZANCHIN NI, BRANDÃO-NETO J, SANDY J, PEREIRA HD, FERRARI AJ, GOZZO FC, SMETANA JH, APARICIO R. Crystal structure of the human Tip41 orthologue, TIPRL, reveals a novel fold and a binding site for the PP2Ac C-terminus. *Sci Rep*. 2016, 4;6:30813. doi: 10.1038/srep30813.

SENTS W, IVANOVA E, LAMBRECHT C, HAESSEN D, JANSSENS V. The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating

phosphatase specificity. *FEBS J.* 2013, 280(2):644-61. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08579.x.

SESHACHARYULU P, PANDEY P, DATTA K, BATRA SK. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett.* 2013, 10;335(1):9-18. doi: 10.1016/j.canlet.2013.02.036.

SHEN Y, WANG Y, SHENG K, FEI X, GUO Q, LARNER J, KONG X, QIU Y, MI J. Serine/threonine protein phosphatase 6 modulates the radiation sensitivity of glioblastoma. *Cell Death Dis.* 2011, 8;2(12):e241. doi: 10.1038/cddis.2011.126.

SHI Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell.* 2009, 30;139(3):468-84. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.006.

SMETANA JHC, ZANCHIN NIT. Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, alpha4 and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL). *FEBS J.* 2007, 274, 5891–5904, doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06112.x.

SONG IS, JUN SY, NA HJ, KIM HT, JUNG SY, HA GH, PARK YH, LONG LZ, YU DY, KIM JM, KIM JH, KO JH, KIM CH, KIM NS. Inhibition of MKK7-JNK by the TOR signaling pathway regulator-like protein contributes to resistance of HCC cells to TRAIL-induced apoptosis. *Gastroenterology.* 2012, 143(5):1341-1351. doi: 10.1053/j.gastro.2012.07.103.

SONTAG JM, NUNBHAKDI-CRAIG V, MONTGOMERY L, ARNING E, BOTTIGLIERI T, SONTAG E. Folate deficiency induces in vitro and mouse brain region-specific downregulation of leucine carboxyl methyltransferase-1 and protein phosphatase 2A B(alpha) subunit expression that correlate with enhanced tau phosphorylation. *J Neurosci.* 2008, 5;28(45):11477-87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2816-08.2008.

SONTAG JM, WASEK B, TALESKI G, SMITH J, ARNING E, SONTAG E, BOTTIGLIERI T. Altered protein phosphatase 2A methylation and Tau phosphorylation in the young and aged brain of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficient mice. *Front Aging Neurosci.* 2014, 22;6:214. doi: 10.3389/fnagi.2014.00214.

STANEVICH V, JIANG L, SATYSHUR KA, LI Y, JEFFREY PD, LI Z, MENDEN P, SEMMELHACK MF, XING Y. The structural basis for tight control of PP2A methylation and function by LCMT-1. *Mol Cell.* 2011, 4;41(3):331-42. doi: 10.1016/j.molcel.2010.12.030.

STANEVICH V, ZHENG A, GUO F, JIANG L, WLODARCHAK N, XING Y. Mechanisms of the scaffold subunit in facilitating protein phosphatase 2A methylation. *PLoS One.* 2014, 23;9(1):e86955. doi: 10.1371/journal.pone.0086955.

STEFANSSON B, BRAUTIGAN DL. Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets I κ B β . *J Biol Chem.* 2006, 11;281(32):22624-34. doi: 10.1074/jbc.M601772200.

STEFANSSON B, BRAUTIGAN DL. Protein phosphatase PP6 N terminal domain restricts G1 to S phase progression in human cancer cells. *Cell Cycle.* 2007, 1;6(11):1386-92. doi: 10.4161/cc.6.11.4276.

STEFANSSON B, OHAMA T, DAUGHERTY AE, BRAUTIGAN DL. Protein phosphatase 6 regulatory subunits composed of ankyrin repeat domains. *Biochemistry.* 2008, 5;47(5):1442-51. doi: 10.1021/bi7022877.

STONE SR, HOFSTEENGE J, HEMMING BA. Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Biochemistry*. 1987, 17;26(23):7215-20. doi: 10.1021/bi00397a003.

TAN B, LONG X, NAKSHATRI H, NEPHEW KP, BIGSBY RM. Striatin 3 gamma inhibits estrogen receptor activity by recruiting a protein phosphatase. *J Mol Endocrinol*. 2008, 40(5):199-210. doi: 10.1677/JME-07-0132.

TAN J, LEE PL, LI Z, JIANG X, LIM YC, HOOI SC, YU Q. B55 β -associated PP2A complex controls PDK1-directed myc signaling and modulates rapamycin sensitivity in colorectal cancer. *Cancer Cell*. 2010, 16;18(5):459-71. doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.021.

TANG Y, FANG G, GUO F, ZHANG H, CHEN X, AN L, CHEN M, ZHOU L, WANG W, YE T, ZHOU L, NIE P, YU H, LIN M, ZHAO Y, LIN X, YUAN Z, JIAO S, ZHOU Z. Selective Inhibition of STRN3-Containing PP2A Phosphatase Restores Hippo Tumor-Suppressor Activity in Gastric Cancer. *Cancer Cell*. 2020, 13;38(1):115-128.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2020.05.019.

TANG Z, SHU H, QI W, MAHMOOD NA, MUMBY MC, YU H. PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev Cell*. 2006, 10(5):575-85. doi: 10.1016/j.devcel.2006.03.010.

TOYOOKA K, MORI D, YANO Y, SHIOTA M, IWAO H, GOTO H, INAGAKI M, HIRAIWA, MURAMATSU M, WYNshaw BORIS A, YOSHIKI A, HIROTSUNE S. Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J Cell Biol*. 2008, 24;180(6):1133-47. doi: 10.1083/jcb.200705148.

VIRSHUP DM. Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Opin Cell Biol*. 2000, 12(2):180-5. doi: 10.1016/s0955-0674(99)00074-5.

VOSS M, CAMPBELL K, SARANZEWA N, CAMPBELL DG, HASTIE CJ, PEGGIE MW, MARTIN-GRANADOS C, PRESCOTT AR, COHEN PT. Protein phosphatase 4 is phosphorylated and inactivated by Cdk in response to spindle toxins and interacts with γ -tubulin. *Cell Cycle*. 2013, 1;12(17):2876-87. doi: 10.4161/cc.25919.

WALLACE AM, HARDIGAN A, GERAGHTY P, SALIM S, GAFFNEY A, THANKACHEN J, ARELLANOS L, D'ARMIENTO JM, FORONJY RF. Protein phosphatase 2A regulates innate immune and proteolytic responses to cigarette smoke exposure in the lung. *Toxicol Sci*. 2012, 126(2):589-99. doi: 10.1093/toxsci/kfr351.

WANDZIOCH E, PUSEY M, WERDA A, BAIL S, BHASKAR A, NESTOR M, YANG JJ, RICE LM. PME-1 modulates protein phosphatase 2A activity to promote the malignant phenotype of endometrial cancer cells. *Cancer Res*. 2014, 15;74(16):4295-305. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3130.

WANG B, ZHAO A, SUN L, ZHONG X, ZHONG J, WANG H, CAI M, LI J, XU Y, LIAO J, SANG J, CHOWDHURY D, PFEIFER GP, YEN Y, XU X. Protein phosphatase PP4 is overexpressed in human breast and lung tumors. *Cell Res*. 2008, 18(9):974-7. doi: 10.1038/cr.2008.274.

WEI H, ZHANG HL, XIE JZ, MENG DL, WANG XC, KE D, ZENG J, LIU R. Protein Phosphatase 2A as a Drug Target in the Treatment of Cancer and Alzheimer's Disease. *Curr Med Sci*. 2020, 40(1):1-8. doi: 10.1007/s11596-020-2140-1.

WEINBERG RA. *The Biology of Cancer*. Editora: Garland Publishing; 2ª edição, 960 páginas, 2013.

WENG S, WANG H, CHEN W, KATZ MH, CHATTERJEE D, LEE JE, PISTERS PW, GOMEZ HF, ABBRUZZESE JL, FLEMING JB, WANG H. Overexpression of protein phosphatase 4 correlates with poor prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012, 21(8):1336-43. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0223.

WILLIAMS AP, GARNER EF, WATERS AM, STAFMAN LL, AYE JM, MARKERT H, STEWART JE, BEIERLE EA. Investigation of PP2A and Its Endogenous Inhibitors in Neuroblastoma Cell Survival and Tumor Growth. *Transl Oncol*. 2019, 12(1):84-95. doi: 10.1016/j.tranon.2018.09.011.

WLODARCHAK N, GUO F, SATYSHUR KA, JIANG L, JEFFREY PD, SUN T, STANEVICH V, MUMBY MC, XING Y. Structure of the Ca²⁺-dependent PP2A heterotrimer and insights into Cdc6 dephosphorylation. *Cell Res*. 2013, 23(7):931-46. doi: 10.1038/cr.2013.77.

WLODARCHAK N, XING Y. PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016, 51(3):162-84. doi: 10.3109/10409238.2016.1143913.

WONG M, HYODO T, ASANO E, FUNASAKA K, MIYAHARA R, HIROOKA Y, GOTO H, HAMAGUCHI M, SENGA T. Silencing of STRN4 suppresses the malignant characteristics of cancer cells. *Cancer Sci*. 2014, 105(12):1526-32. doi: 10.1111/cas.12541.

WU CG, ZHENG A, JIANG L, ROWSE M, STANEVICH V, CHEN H, LI Y, SATYSHUR KA, JOHNSON B, GU TJ, LIU Z, XING Y. Methylation-regulated decommissioning of multimeric PP2A complexes. *Nat Commun*. 2017, 22;8(1):2272. doi: 10.1038/s41467-017-02405-3.

WURZENBERGER C, GERLICH DW. Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011, 13;12(8):469-82. doi: 10.1038/nrm3149.

XING Y, XU Y, CHEN Y, JEFFREY PD, CHAO Y, LIN Z, LI Z, STRACK S, STOCK JB, SHI Y. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*. 2006, 20;127(2):341-53. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.025.

XU X, ZHU H, YANG M, ZHENG E, ZHOU Y, NI J, LI R, YANG Z, HE T, ZHAO G. Knockdown of TOR signaling pathway regulator suppresses cell migration and invasion in non-small cell lung cancer via the regulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *Exp Ther Med*. 2020, 19(3):1925-1932. doi: 10.3892/etm.2019.8358.

XU Y, XING Y, CHEN Y, CHAO Y, LIN Z, FAN E, YU JW, STRACK S, JEFFREY PD, SHI Y. Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell*. 2006, 15;127(6):1239-51. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.033.

XU Y, CHEN Y, ZHANG P, JEFFREY PD, SHI Y. Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation. *Mol Cell*. 2008, 26;31(6):873-85. doi: 10.1016/j.molcel.2008.08.006.

YABE R, MIURA A, USUI T, MUDRAK I, OGRIS E, OHAMA T, SATO K. Protein Phosphatase Methyl-Esterase PME-1 +Protects Protein Phosphatase 2A from Ubiquitin/Proteasome Degradation. *PLoS One*. 2015, 17;10(12):e0145226. doi: 10.1371/journal.pone.0145226.

YAN Z, FEDOROV SA, MUMBY MC, WILLIAMS RS. PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells. *Mol Cell Biol*. 2000, 20(3):1021-9. doi: 10.1128/mcb.20.3.1021-1029.2000.

ZHANG X, OZAWA Y, LEE H, WEN YD, TAN TH, WADZINSKI BE, SETO E. Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes Dev*. 2005, 1;19(7):827-39. doi: 10.1101/gad.1286005.

8. ANEXOS

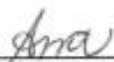


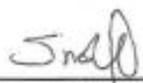
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA TIPRL COM FOSFATASES TIPO 2A EM CULTURA DE CÉLULAS**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Ana Amélia Sanchez Iacia

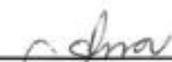
Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Dra. Juliana Helena Costa Smetana

Data: 04 de agosto de 2021

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA TIPRL COM FOSFATASES TIPO 2A EM CULTURA DE CÉLULAS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 04 de agosto de 2021

Assinatura :  _____

Nome do(a) autor(a): **Ana Amélia Sanchez Iacia**

RG n.º 41812012

Assinatura :  _____

Nome do(a) orientador(a): **Dra. Juliana Helena Costa Smetana**

RG n.º 322216497