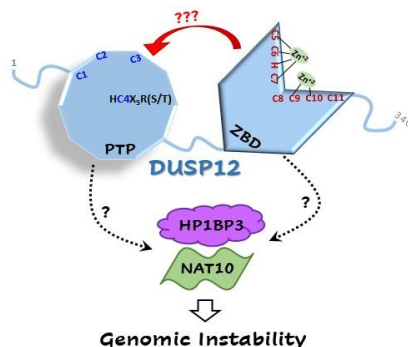


Graphical Abstract



Proteomics evidence pointed to dual specificity phosphatase DUSP12 can interact with proteins HP1BP3 and NAT10 proteins in cellular responses to genotoxic stress. However, how the PTP and/or ZBD domains of this phosphatase can influence its activity towards these targets have not yet been investigated.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS RECOMBINANTES DA TIROSINA FOSFATASE DUAL 12 PARA INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO COM PARCEIROS PROTÉICOS

Ana Laura Chaves Ferreira, Diana Reis Della Corte G. Pacheco, Donna Joe Farfan Hilares e Fábio Luis Forti
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP
laurachaves.alcf1@usp.br

Resumo: Evidências experimentais de anos de pesquisa mostram que algumas proteínas tirosina fosfatases (PTPs) possuem expressão aumentada em tumores e que elas podem estar relacionadas com a regulação da estabilidade genômica, atuando em diferentes pontos do ciclo celular e interferindo na expressão gênica e resistência tumoral. O objetivo deste trabalho é expressar, purificar e caracterizar *in vitro* a tirosina fosfatase dual DUSP12 (e diferentes construções truncadas) para estudos posteriores de interação com as proteínas HP1BP3 e NAT10, as quais tem funções relacionadas a modificações e remodelamento da cromatina, e verificar se há indícios de que estas interações podem afetar mecanismos de estabilidade genômica, resistência e progressão tumoral. O melhor entendimento estrutural e funcional de DUSP12 possibilitará entender melhor processos biológicos relevantes para células tumorais específicas.

Palavras-chave: DUSP12, atividade fosfatásica, HP1BP3, NAT10, interação proteína-proteína

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT FORMS OF DUAL TYROSINE PHOSPHATASE 12 FOR INVESTIGATION OF INTERACTION WITH PROTEIN PARTNERS

Abstract: Experimental evidence from years of research shows that some protein tyrosine phosphatases (PTPs) have increased expression in tumors and that they may be related to the regulation of genomic stability, acting at different points of the cell cycle and interfering with gene expression and tumor resistance. The objective of this work is to express, purify and characterize dual-specificity tyrosine phosphatase DUSP12 (and different truncated constructs) *in vitro* for further studies of interaction with HP1BP3 and NAT10 proteins, which have functions related to chromatin modifications and remodeling, and to verify if there is evidence that these interactions can affect mechanisms of genomic stability, resistance and tumor progression. A better structural and functional understanding of DUSP12 will favor a better understanding of biological processes relevant to specific tumor cells.

Keywords: DUSP12, phosphatase activity, HP1BP3, NAT10, protein-protein interactions

Introdução

O genoma humano expressa 107 genes codificando enzimas tirosina fosfatases (PTP) que desfosforilam preferencialmente resíduos de tirosina, mas também os pares tirosina/serina ou tirosina/treonina. O desequilíbrio entre a ação destas fosfatases e das tirosina quinases (PTK) está diretamente relacionado a diversas patologias^[1], sendo que no caso dos eucariotos multicelulares a ação de PTP e PTK parece estar fortemente ligada com a comunicação e sinalização celular, mas também com processos de replicação, transcrição e reparo de DNA, bem como processamento de RNAm, além de influenciar no transporte intracelular de moléculas e sua motilidade^{[2][3]}. Assim, a ação de tirosina quinases e fosfatases sobre alvos específicos tem forte relação com tumorigênese, influenciando as taxas de proliferação e diferenciação das células^{[4][5]}. DUSP12, também conhecida como hYVH1, é uma fosfatase dual (tirosina/serina, tirosina/treonina) de 340 aminoácidos, sítio ativo dependente da cisteína 115 e tendo íons zinco como cofator - o domínio de ligação a Zn²⁺ presente em sua porção C-terminal está correlacionado à interação com algumas biomoléculas, como RNAr e DNA, podendo até mesmo ser considerado um regulador do domínio de fosfatase presente na porção N-terminal^{[6][3]}. Ela é uma proteína ubíqua que possui relação com retinoblastomas e neuroblastomas (correlação da expressão da proteína com tumorigênese)^[7], e também com hepatocarcinomas (pacientes com alta expressão da proteína possuem pior prognóstico)^[6]. A proteção contra a apoptose e o aumento da proliferação celular em tumores também podem estar correlacionados com as ações da DUSP12^[6]. Nosso grupo trabalhou previamente na identificação proteômica de parceiros protéicos da DUSP12 em linhagens celulares de adenocarcinomas de mama e pulmão submetidas a diferentes tipos de estresse oxidativo e genotóxico, e identificou alvos nucleares importantes de DUSP12, como as proteínas HP1BP3 e NAT10, que tem funções relacionadas com modificação e remodelamento da cromatina^[8]. Uma maior compreensão dos mecanismos biológicos de ação da DUSP12, e a contribuição de seus domínios isolados, pode identificar potenciais relações com distúrbios celulares de diferentes células tumorais, levar ao melhor entendimento das interações subjacentes ao processo patológico, e sugerir terapias que interfiram na atividade desta fosfatase cujo potencial como marcador e alvo clínico de drogas ainda é uma janela aberta para oportunidades terapêuticas^{[6][9]}.

Experimental

Produção de plasmídeos

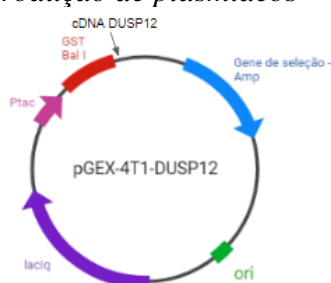


Figura 1– Estrutura esquemática do plasmídeo pGEX-4T1 usado para clonagem de construções DUSP12. O cDNA clonado mostrado é da proteína selvagem, mas as outras construções seguem o mesmo padrão de clonagem (Figura feita no Bio Render).

Construções plasmidiais de DUSP12 (selvagem ou WT, região C-terminal ou CT, região N-terminal ou NT, e mutada em C115S ou MUT) e do tag de GST sozinha (controle negativo dos experimentos) foram produzidas pelo nosso laboratório e também cedidas pelo grupo do Prof. Panayiotis Vacratsis, da University of Windsor Ontario-Canada, foram usadas para transformar bactérias competentes *E.*

coli TOP10 para a amplificação de plasmídeos pGEX-4T1-DUSP12 (Figura 1) contendo gene de resistência a Ampicilina e tag de GST inserido no N-terminal. A extração e purificação dos plasmídeos foi realizada com o kit *Miniprep* (Promega).

Produção de formas recombinantes de DUSP12

Para a produção das proteínas recombinantes de DUSP12, bactérias *E. coli* BL21-DE3 foram transformadas por choque térmico com os plasmídeos de interesse, incubadas em meio LB suplementado com Ampicilina (100 ug/mL) e Cloreto de Zinco (10uM) e induzidas com IPTG (1mM) por 3h após atingirem a OD₆₀₀=0,6. A seguir, a cultura passava por centrifugação por 10 minutos (8.000rpm, 4°C), descarte do sobrenadante e homogeneização do pellet com tampão de lise, seguida de outra centrifugação de 30 minutos (14.000rpm, 4°C). Ao final, o sobrenadante era coletado e purificado utilizando beads de Sepharose-Glutationa (Invitrogen). A quantificação das proteínas purificadas foi feita através de SDS-PAGE comparando suas bandas com as de uma curva padrão de albumina e finalizada com análise das bandas do gel com o uso do software ImageJ.

Ensaio de atividade de tirosina fosfatase

Para avaliar a atividade catalítica fosfatásica das diferentes porções de DUSP12, foram feitos ensaios de atividade usando diferentes substratos específicos como OMFP, DiFMUP ou pNPP (Sigma-Aldrich), avaliando quantitativamente os sinais cromogênicos ou fluorescentes emitidos pela desfosforilação dos substratos e usando outra fosfatase (DUSP3/VHR) como controle positivo.

Resultados e Discussão

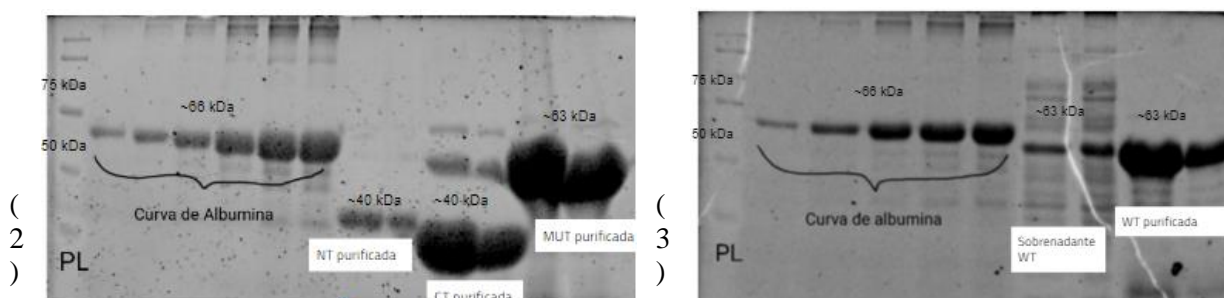
Os resultados da produção das construções plasmidiais estão mostrados na Tabela 1 e de suas correspondentes proteínas recombinantes na Tabela 2. A concentração plasmidial média obtida foi de 116,6 ng/uL, enquanto que os plasmídeos da construção selvagem apresentaram um rendimento mais alto (220,7 ng/uL) comparados àqueles da construção N-terminal, de rendimento muito mais baixo (69 ng/uL), diferenças muito recorrentes em todos os experimentos de produção plasmidial.

Construção plasmidial		Rendimento	Construção proteica		Rendimento
(Wild-type	220.7 ng/uL	(Wild-type	1.8 ug/uL
	Mutant	164.1 ng/uL		Mutant	3.8 ug/uL
	C-terminal	110.6 ng/uL		C-terminal	3.2 ug/uL
	N-terminal	69 ng/uL		N-terminal	0.8 ug/uL
	GST	72,6 ng/uL		GST	2 ug/uL
))		

Tabelas 1 e 2 – Rendimento plasmidial (1) e de proteínas recombinantes (2) das diferentes construções.

Na Tabela 2 vemos que todas as construções apresentaram um rendimento protéico muito superior à N-terminal: a selvagem chegou a render mais de 1,4 ug/uL, enquanto NT não chegou a 0,8 ug/uL. Outro ponto importante explorado na produção e purificação das proteínas recombinantes foi a presença e ausência de Zinco e DTT (Figuras 2 e 3): o resultado observado foi um rendimento superior na presença de Zinco e de DTT ao final destes processos. No caso da N-terminal, a ausência do DTT até mesmo impossibilitou sua purificação, levando a não detecção da proteína no gel. Essas interferências podem estar relacionadas com a presença do domínio ligante de zinco (*Zinc-binding domain ou ZBD*) da DUSP12, no caso da diferença com a suplementação dos meios e tampões com

Zinco e da necessidade de um ambiente redutor para a formação e dobramento adequados da proteína, no caso do DTT. As Figuras 3 e 4 mostram imagens de SDS-PAGE utilizados para quantificação das construções (ImageJ) usando curva padrão de albumina.



Figuras 2 e 3 – SDS-PAGE corado com Coomassie Blue e quantificado usando o leitor Chemidoc e o software ImageJ. Na Figura 2 vê-se uma forte expressão e purificação das formas purificadas CT e MUT de DUSP12 em contraste à forma NT, de expressão baixa. Na Figura 4 uma forte expressão da proteína WT purificada e ainda no sobrenadante após-purificação. Em ambas figuras vê-se o marcador de peso molecular ou Protein Ladder (PL) como referência.

A fim de complementar a caracterização das formas recombinantes de DUSP12, experimentos de atividade enzimática foram realizados através de ensaios de tirosina fosfatase (Figuras 6 e 7).

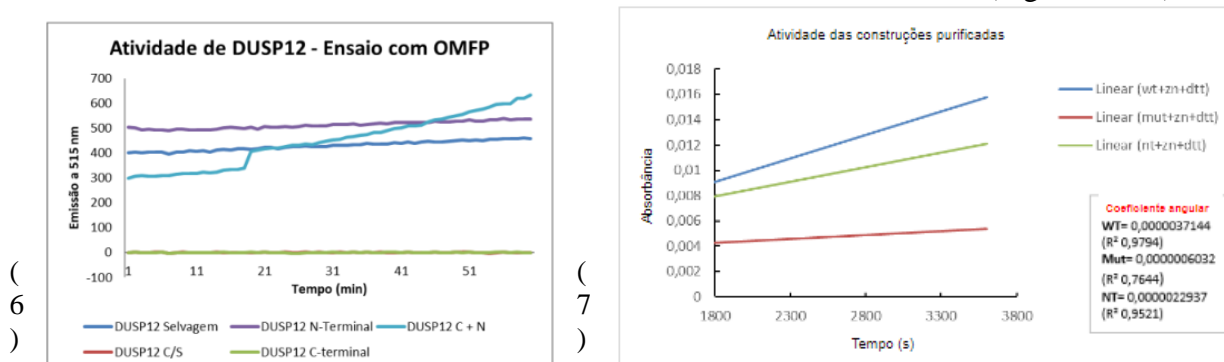


Figura 6 e 7 – Ensaios de atividade enzimática quantificando fluorescência ou absorvância emitida por substratos que mimetizam tirosinas fosforiladas, potenciais alvos da DUSP12. A Figura 6 utiliza OMFP, uma molécula que ao sofrer desfosforilação emite fluorescência no comprimento de onda de 515 nm. A Figura 7 utiliza pNPP, que ao sofrer desfosforilação gera uma molécula que absorve na faixa de 405 nm. Estes ensaios confirmam que as construções estão funcionais após a purificação e com atividades fosfatásicas esperadas.

Como esperado, as construções MUT e CT de DUSP12 não apresentaram atividade fosfatásica, diferentemente da proteína WT e o NT (Figuras 6 e 7). Entretanto, a porção NT contendo o domínio PTP por si só apresentou atividade enzimática maior que a DUSP12 WT e, ainda mais intrigante foi o fato de mistura CT e NT apresentar um aumento de atividade fosfatásica diferenciado e não-linear com o tempo. Por usarmos a mesma quantidade em massa das construções nestes ensaios, e não condições equimolares, pondera-se assim a maior atividade de NT em relação a WT, embora a influência da CT sobre o domínio catalítico é sugestivo de uma possível regulação alostérica na DUSP12. Essas informações das condições de produção e purificação, rendimento, atividade

enzimática e funções da DUSP12 *in vitro* podem ser correlacionadas *in vivo* nas células ao padrão de interação dos domínios entre si e/ou com outras proteínas parceiras, como HP1BP3 e NAT10.

Conclusões

As diferenças no rendimento das construções de DUSP12 são relevantes e funcionalmente relacionadas à sua estabilidade estrutural e a uma possível dependência do domínio PTP ao ZBD. Também é possível concluir que os efeitos redutores do DTT no dobramento e atividade destas construções influenciam seus rendimentos. Considerando a atividade fosfatásica e funções celulares relacionadas ao domínio ZBD, como na resposta a danos oxidativos, há um grande interesse em entender melhor as funções da DUSP12, bem como seus domínios, na interação com outras proteínas, algo que é reiterado em recentes publicações que demonstram o papel protetivo da DUSP12 durante o estresse oxidativo ocasionado pela cardiomiopatia diabética^[10]. Embora ainda em andamento, este trabalho ainda trará resultados interessantes para o significado biológico das interações das proteínas DUSP12-HP1BP3/NAT10 em células tumorais diversas a serem estudadas.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da FAPESP (Auxílios: 2022/00348-6 e 2022/04243-4).

Referências

1. CORDEIRO, Marília Henriques; SMITH, Richard John; SAURIN, Adrian Thomas. A fine balancing act: A delicate kinase-phosphatase equilibrium that protects against chromosomal instability and cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 96, p. 148-156, 2018.
2. KOST, Gina Chun et al. Protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibition enhances chromosomal stability after genotoxic stress: Decreased chromosomal instability (CIN) at the expense of enhanced genomic instability (GIN)?. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 735, n. 1-2, p. 51-55, 2012.
3. KOZAROVA, A; HUDSON, J. W; VACRATSI, P. O. The dual-specificity phosphatase hYVH1 (DUSP12) is a novel modulator of cellular DNA content. **Cell Cycle**, v. 10, n. 10, p. 1669-1678, 2011.
4. SHI, Yigong. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 468-484, 2009.
5. ALONSO, Andres et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699-711, 2004.
6. JU, G et al. DUSP12 regulates the tumorigenesis and prognosis of hepatocellular carcinoma. **PeerJ**, v. 9, p. e11929, 2021.
7. UNIPROT. Q9UNI6 (DUS12_HUMAN) - Dual specificity phosphatase 12.
8. MONTEIRO, L F; FORTI, F L. Network analysis of DUSP12 partners in the nucleus under genotoxic stress. **Journal of Proteomics**, v. 197, p. 42-52, 2019.
9. DE VRIENDT, Veerle et al. DUSP 4 expression identifies a subset of colorectal cancer tumors that differ in MAPK activation, regardless of the genotype. **Biomarkers**, v. 18, n. 6, p. 516-524, 2013.
10. Li H, Yang Q, Huang Z, Liang C, Zhang DH, Shi HT, Du JQ, Du BB, Zhang YZ. Dual-specificity phosphatase 12 attenuates oxidative stress injury and apoptosis in diabetic cardiomyopathy via the ASK1-JNK/p38 signaling pathway. **Free Radic Biol Med**. 2022 Nov 1;192:13-24. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.004. Epub 2022 Sep 13. PMID: 36108935.