Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos

Huita do Couto Matoso

Estudos estruturais do domínio catalítico da proteína tirosina
fosfatase η de rato

São Carlos - SP
2008

Huita do Couto Matozo

Estudos estruturais do domínio catalítico da proteína tirosina
fosfatase η de rato

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada-
Opção Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

São Carlos- SP
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Matozo; Huita do Couto

Estudos biofísicos e estruturais do domínio catalítico da proteína tirosina fosfatase η de rato / Huita do Couto Matozo; orientador Igor Polikarpov. -- São Carlos, 2008.

142p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física – Área de concentração: Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Proteína tirosina fosfatase η de rato. 2. Dicroísmo. 3. Espectroscopia e anisotropia de fluorescência. 4. Espalhamento de raios X a baixo ângulo. 5. Cristalografia de proteínas. I. Título.

**IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400
13566-590 - São Carlos, SP

Fone/Fax: (16) 3373. 9777
www.ifsc.usp.br
svposgrad@ifsc.usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Huita do Couto Matoso

Dissertação apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada – Opção:
Física Biomolecular.

Aprovado em: 08/12/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Igor Polikarpov

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

Instituição: UnB

Assinatura

Prof. Dr. Marie Togashi

Instituição: UnB

Assinatura

*Dedico aos meus pais: José Firmino
Matozo (in Memorem) e Maria
D'Anunciação Couto Matozo por
mostrar que somos todos semelhantes
e o que nos difere é o amor que
dedicamos ao próximo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter recarregado minhas energias quando se encontravam em fase de descarregamento total.

Aos meus pais, José Firmino Matozo (in Memorem) e Maria D'Anunciação Couto Matozo pelo incentivo a continuar os estudos.

À minha querida esposa Verônica Martins Paula Matozo por deixar que eu participasse de sua vida.

Ao professor Dr. Igor Polikarpov por ter acredito que poderia vencer.

À Dra. Maria Auxiliadora Morim Santos pela paciência, ensinamentos e co-orientação.

Ao Dr. Alexander Golubev pela ajuda na montagem dos experimentos de cristalização.

Ao Professor Dr. Antonio José Costa Filho pelo entusiasmo em lecionar.

Ao Professor Dr. Richard Charles Garratt pelo apoio.

A todos os docentes da Pós-Graduação pelas novas visões sobre a Química e a Física.

Ao Dr. Rodrigo Villares Portugal um amigo.

Ao Dr. Fábio Macêdo Nunes.

Ao Professor Dr. Luís M. T. R. Lima, UFRJ, pelo apoio à pesquisa.

Aos colaboradores Dr. Alfredo Fusco e o Dr. Rodolfo Iuliano.

A Eli Fernando Pimenta pelo incentivo e amizade.

Aos colegas do laboratório de Cristalografia do IFSC: Alessandro Silva Nascimento,

Nádia Helena Martins, Sandra Krauchenco, Lucas Bleicher, Ana Carolina Migliorini Figueira, Mario de Oliveira Neto, Sandra Martha, Adriana Lucely Rojas, Carolina A. Guzzi Cassago, Alexandre Cassago.

A Susana Sculaccio, Norma Bianca Sales e Elizabeth Cristina M. Siqueira pela amizade e suporte técnico.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

E também agradeço aqueles que possa ter esquecido, mas torceram por mais esta fase transposta para aquisição de novas visões.

Deus disse:

*“Que as águas fiquem cheias de seres
vivos e os pássaros voem sobre a terra,
sob o firmamento do céu”.*

(Gênesis Cap. 1 § 20)

RESUMO

MATOZO, H. C. **Estudos estruturais do domínio catalítico da proteína tirosina fosfatase η de rato**. 2008. 142f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

A proteína tirosina fosfatase η de rato (rPTP η), é uma RPTP transmembranar do tipo classe I. A rPTP η e seu homólogo DEP-1 provenientes, respectivamente, de ratos e de humanos, estão inibidas em células neoplásicas. Este fenótipo maligno é revertido após reconstituição exógena, o que sugere que a capacidade restauradora da rPTP η pode ser uma ferramenta importante na terapia de alguns tipos de câncer. Portanto, o objetivo deste projeto incluiu o estudo molecular, biofísico e estrutural do domínio catalítico da rPTP η (rPTP η DC). Para isso, sub-clonamos no vetor pET-28a(+) o inserto que codifica para a região C-terminal da rPTP η . Em seguida, bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo e a proteína recombinante expressada e purificada. A His₆-rPTP η DC purificada teve a cauda de histidina subsequente removida por digestão com trombina. O ponto isoelétrico de 7,3 da proteína de 41kDa foi medido experimentalmente e a sua funcionalidade acessada pelo ensaio de hidrólise do pNPP. A enzima apresentou uma atividade específica de 9nmol/min/ μ g a qual é compatível com as atividades específicas descritas para as RPTP μ , RPTP α , PTPB1 e SHP2. A estrutura secundária e a estabilidade da rPTP η DC recombinante foi analisada por dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência. A rPTP η DC mostrou-se estável a 18°C e propriamente enovelada (Santos, et al., Prot. Expr. Purif., 2005. Anexo A). A proteína foi, em seguida, submetida a diferentes condições de cristalização e a estudos estruturais em solução. Nas condições de 0,1M de MES, pH 6,5 e 20% PEG 10000 cresceram cristais que difrataram na resolução de 1,87Å. Os cristais pertencem ao grupo espacial P2(1)2(1)2(1) com parâmetros de célula unitária: a=46,46; b=63,07; c=111,64 Å, e com uma única molécula por unidade assimétrica (Matozo, et al., Acta crystallogr. F, 2006. Anexo B). A estrutura da rPTP η DC, em solução, foi analisada usando-se a técnica de SAXS e medidas de anisotropia de fluorescência. Os dados de SAXS mostraram que a proteína, forma dímeros alongados, com R_g de 2,65nm e D_{max} de 8,5nm. A conformação da rPTP η DC analisada por modelos de homologia sugere que seu dímero está mais próxima da estrutura cristalográfica dimérica da RPTP α -D1. Além disso, a caracterização da rPTP η DC por anisotropia de fluorescência demonstrou que o K_d do dímero da rPTP η DC é de $21,6 \pm 2,0\mu$ M e o $\Delta G_{\text{dímero-monômero}}$ é de 7,2kcal/mol (Mtozo, et al., Biophys. J., 2007. Anexo C).

Palavras-Chave: Proteína tirosina fosfatase η de rato. Dicroísmo. Espectroscopia e anisotropia de fluorescência. Espalhamento de raios X a baixo ângulo.

ABSTRACT

MATOZO, H. C. **Structural studies of the catalytic domain of the rat protein tyrosine phosphatase η** . 2008. 142f. Dissertation (Master Degree). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

The rat protein tyrosine phosphatase η , rPTP η , is a transmembrane RPTP, with an intracellular portion composed of a unique catalytic region. The rPTP η and the human homolog DEP-1 are down-regulated in rat and human neoplastic cells, respectively. However, the malignant phenotype is reverted after exogenous reconstitution of rPTP η , suggesting that its function restoration could be an important tool for gene therapy of several types of cancer. Therefore, the objective of our project aimed on the molecular, biophysical and structural study of the catalytic domain of rPTP η , rPTP η DC. We began our study cloning the rPTP η DC into PET28a(+) vector, followed by its expression in *Escherichia coli*, and purification. The His₆-tag from the rPTP η DC purified was subsequently removed by thrombin digestion. PhastGel IEF electrophoresis demonstrated that the isoelectric point of the 41kDa was 7.3. To assess the functionality of the rPTP η DC we used the pNPP hydrolysis assay and observed that the enzyme has a specific activity of 9nmol/min/ μ g. The experimentally determined rPTP η DC specific activity showed to be in the same range as the previously reported activities for RPTP μ , RPTP α , PTPB1 and SHP2. The secondary structure and stability of the recombinant protein was analyzed by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. The results demonstrated that rPTP η DC was stable at 18°C and properly folded (Santos, et al., Prot. Expr. Purif., 2005. In attachment A). Then, the purified protein was submitted to different crystallization conditions and structural studies in solution. Crystals appeared at 0.1M MES, pH 6.5 and 20% PEG 10,000 and diffracted with resolution of 1.87Å. The crystals belong to spatial group P2(1)2(1)2(1) with unit cell parameters of a=46.46, b=63.07, c=111.64Å and contained one molecule for asymmetric unit (Matozo, et al., Acta crystallog. F, 2006. In attachment B). Also, the structural of rPTP η DC, in solution, was analyzed by SAXS and fluorescence anisotropy. SAXS data showed that the protein forms elongated dimers in solution with an R_g of 2.65nm and a D_{max} of 8.5nm. The rPTP η DC conformation in solution, studied by homology models, suggested that the rPTP η DC dimer architecture is more closely related to the crystal structure of RPTP α -D1. The characterization of rPTP η DC by fluorescence anisotropy measurements demonstrated that the K_d of the dimer is $21.6 \pm 2.0 \mu$ M and the $\Delta G_{\text{dimer-monomer}}$ is equal to 7.2kcal/mol (Matozo, et al., Bioph. J., 2007. In attachment C).

Keywords: Rat protein tyrosine phosphatase η . Espectroscopy of the fluorescence anisotropy. Small angle X-ray scattering

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Localização da glândula de tireóide no corpo humano. Hormônios tireoidianos -----	25
Figura 2. Esquema geral dos mecanismos de oncogênese pela ativação de proto-oncogene, mutação ou perda de genes supressores tumorais, ativação de genes anti-apoptóticos ou perda de genes pró-apoptóticos -----	30
Figura 3. Progressão tumoral da neoplasia da tireóide -----	33
Figura 4. Diagrama esquemático da conversão de uma desfosforilação protéica para uma fosforilação protéica pela proteína quinase e a reversão desta reação pela proteína fosfatase -----	35
Figura 5. Classificação e especificidades das PTPs aos substratos -----	38
Figura 6. Diagrama esquemático das oito subfamílias das RPTPs clássicas -----	40
Figura 7. A estrutura e a sequência característica do motivo comum das PTPs -----	42
Figura 8. O mecanismo de catálise das PTPs -----	43
Figura 9. Estrutura da proteína tirosina fosfatase 1B -----	45
Figura 10. A região proximal a membrana juntamente com o domínio citoplasmático 1 da RPTP α -----	48
Figura 11. Modelo estrutural da interação entre a forma em cunha do domínio catalítico 1/ sítio ativo no dímero do DC45 -----	50
Figura 12. Diagrama em fita do dímero RPTP μ D1 -----	51
Figura 13. Diagrama e vista estérea da superposição da RPTP α e RPTP μ -----	52

CAPÍTULO 4

Figura 14. Digestão com Enzima de Restrição -----	77
Figura 15. Expressão e purificação da His ₆ -rPTP η DC -----	79
Figura 16. Tratamento com trombina protease da His ₆ -rPTP η DC -----	82
Figura 17. Atividade específica da rPTP η DC -----	83
Figura 18. Análise por dicroísmo circular da rPTP η DC recombinante -----	86
Figura 19. Espectro de fluorescência intrínseca da rPTP η DC -----	86
Figura 20. Cristal da rPTP η DC -----	87
Figura 21. Cristal da rPTP η DC. Padrão de difração do cristal da rPTP η DC -----	87
Figura 22. Curva de espalhamento de raios-X a baixo ângulo -----	90
Figura 23. Dímero da rPTP η DC verificado por eletroforese em gel nativo -----	91
Figura 24. Três vistas estéreo ortogonais da estrutura <i>ab initio</i> de baixa resolução da rPTP η DC superposta com o modelo por homologia dimérico da rPTP η DC baseado na estrutura cristalográfica da RPTP μ -D1 RPTP α -D1 -----	93
Figura 25. Alinhamento das seqüências da RPTP α -D1, RPTP μ -D1, e PTP η DC -----	94
Figura 26. Estrutura cristalográfica da RPTP α -D1 e RPTP μ -D1 -----	95
Figura 27. Anisotropia de fluorescência no equilíbrio -----	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Protocolo de purificação da rPTP η DC -----	81
Tabela 2-	Estatísticas da coleta dos dados de Raios-X -----	88
Tabela 3-	Parâmetros estruturais -----	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	Persulfato de amônia
APSSP	Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server
B220	O mesmo que CD45
<i>Bam</i> HI	Endonuclease de restrição obtida de <i>Bacillus amylo</i> <i>li</i>
BL21(DE3)	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
β -ME	β -mercaptoetanol
°C	Grau(s) Celsius
CA	Anidrase carbônica
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CD	Dicroísmo circular
CD148	O mesmo que DEP-1
CD45	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor encontrado em células do sistema hematopoiético
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDT	Carcinomas diferenciados da tireóide
CFT	Carcinomas folicular da tireóide
CPT	Carcinomas Papilífero de tireóide
CT	Câncer de tireóide

DC	Domínio catalítico (na estrutura da proteína)
DEP-1	High cell density-enhanced protein tyrosine phosphatase 1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
<i>EcoRI</i>	Endonuclease de restrição obtida de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraetânico
EGF	Fator de crescimento da epiderme
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FNIII	Fibronectina do tipo III
GST	Glutathione-S-transferase
h	hora(s)
HGF	Hepatocyte growth factor
HPTP α	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor α obtida a partir de células HeLa
HPTP β	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor obtida a partir de células HeLa
HPTP δ	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor obtida a partir de células HeLa

HPTP ϵ	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor obtida a partir de células HeLa
HPTP γ	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor obtida a partir de células HeLa
HPTP η	O mesmo que DEP-1
HPTP μ	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor obtida a partir de células HeLa
HPTP ζ	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor obtida a partir de células HeLa
http	Hyper text transfer protocol
IEF	Isoelectric focusing electrophoresis
Ig	Imunoglobulinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranoside
L	Litro
LAR	Leukocyte antigen-related protein
LB	Meio Luria–Bertani
L-CA	Antígeno comum dos leucócitos
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
Ly-5	O mesmo que CD45

MAM	Motivo encontrado nas proteínas Meprin, A5 e Mu
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico
min.	Minuto(s)
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NCBI	National center for biotechnology information
nm	Nanômetro
NRPTPs	PTPs não receptores
p27 ^{Kip1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor
PDGFβ	Platelet-derived growth factor
PEG	Polietileno glicol
pET-28a(+)	Vetor de expressão da Novagen
pGEX-2TK	Vetor de expressão da Promega
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
pNPP	p-Nitrofenilfosfato
rpm	Rotações por minuto
PSIPRED	Protein Structure Prediction Server
PTK	Proteína tirosina quinase
PTP	Proteína tirosina fosfatase

PTP1B	Proteína tirosina fosfatase observadas em placenta humana
PTPRH	O mesmo que PTP Sap-1
PTPRJ	O mesmo que DEP-1
PTP Sap-1	Fosfatase associada a câncer de estômago
PTU	Propiltiouracil
PTyr	Fosfotirosinas
RCBP	Registros de câncer de base populacional
RDGS	Arg- Asp-Gly-Ser
RPTP	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor
RPTPD1	Primeiro domínio de fosfatase das RPTPs
RPTP η	O mesmo que DEP-1
RPTP α	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor α obtida a partir de células de cérebro de camundongo
rPTP η	Proteína tirosina fosfatase η de rato homóloga a DEP-1 humana
SAXS	Small-angle X-ray scattering
<i>Sccl</i>	Susceptibility to colon cancer 1
SDS-PAGE	Sódio dodecil sulfato-eletroforese de gel de poliacrilamida
SIM	Sistema de informação sobre mortalidade
SST	Somatostatina
T	Temperatura

T200	O mesmo que CD45
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TCR	Receptore de células T
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
TG	Tiroglobulina
TPA	Tetradecanoil forbol
TRH	Hormônio de liberação de tireotropina
tRNA	Ácido ribonucléico de transferência
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume/volume
www	World wide web

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO AO TEMA DA DISSERTAÇÃO

1.1. A glândula tireoidiana -----	25
1.2.Câncer de tireóide -----	29
1.3.Introdução Geral as Proteínas Tirosina Fosfatase -----	34
1.4.Classificação das Proteínas Tirosina Fosfatase -----	37
1.5.O Domínio de Fosfatase Citoplasmático das RPTPs -----	41
1.6.O Mecanismo de Catálise das RPTPs -----	42
1.7.A Estrutura Tridimensional do Domínio Catalítico das RPTPs -----	44
1.8.A Dimerização como Mecanismo Regulador das RPTPs -----	45
1.9.Proteínas Tirosina Fosfatase η de Rato -----	54

CAPÍTULO 2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

2.1. Objetivos e justificativas -----	58

CAPÍTULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Clonagem do domínio intracelular do gene da rPTP η -----	60
3.2. Expressão do domínio catalítico da rPTP η de rato contendo cauda de histidina -----	61
3.3. Purificação da rPTP η DC recombinante e tratamento com trombina -----	62
3.4. Atividade enzimática -----	63

3.5. Medidas da concentração de proteína e SDS-PAGE -----	64
3.6. Ensaio de Western blot -----	65
3.7. Ponto isoeletrico -----	65
3.8. Espectroscopia de dicroismo circular -----	65
3.9. Espectroscopia de fluorescência -----	66
3.10. Ensaio de Cristalização -----	67
3.11. Coleta de dados e processamento -----	68
3.12. Medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo e análise dos dados de espalhamento -	68
3.13. Determinação da forma molecular ab initio e programa DAMAVER -----	70
3.14. Construção do modelo por homologia para a rPTP η DC -----	71
3.15. Medidas de anisotropia de fluorescência -----	72

CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Clonagem e expressão da rPTP η DC em Escherichia coli -----	77
4.2. Purificação da His ₆ -rPTP η DC -----	79
4.3. Tratamento com trombina da His ₆ -rPTP η DC purificada -----	81
4.4. Ponto isoeletrico e atividade de fosfatase da rPTP η DC recombinante -----	82
4.5. Dicroismo circular e espectroscopia de fluorescência -----	84
4.6. Cristalização do domínio catalítico da rPTP η recombinante -----	87
4.7. Medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo -----	89

4.8. Formas moleculares ab initio da rPTP η DC e seus modelos de alta resolução -----	91
4.9. Medidas de Anisotropia de fluorescência -----	96

CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES

5.1. Conclusões -----	101

REFERÊNCIAS

Referências -----	107

ANEXOS

ANEXO A -----	122

SANTOS, M. A. M. et al. Expression, purification and characterization of rat protein tyrosine phosphatase eta catalytic domain. Protein Expression and Purification, v. 41, n. 1, p. 113-120, 2005. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.018

ANEXO B -----	131

MATOZO, H. C. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of rat protein tyrosine phosphatase eta. Acta Crystallographica. Section F, Crystalization Communications, v. 62, part 9, p. 923-925, 2006. DOI:10.1107/S1744309106031058

MATOSO, H. C. et al. Low-resolution structure of the rat protein tyrosine phosphatase catalytic domain revealed homodimerization in solution. *Biophysical Journal*, v. 92, p. 4424, 2007. DOI: 10.1529/biophysj.106.094961

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO AO TEMA DA DISSERTAÇÃO

Sorte: é saber olhar para os lados e ver
onde estão seus amigos: Porque foi
através do que eles diziam, que os anjos
conseguiram se fazer ouvir.

Paulo Coelho (O Zahir)

1.1 A glândula tireoidiana

A tiróide ou tireóide - termo derivado da palavra grega *thyereos*-escudo oblongo; eidos-forma - recebeu esta denominação por apresentar conformação semelhante à de um escudo. Consiste de dois lóbulos de tecido glandular, vermelho escuro, unidos por uma faixa larga de tecido semelhante, chamada istmo. O istmo repousa sobre o segundo e o terceiro anel cartilaginoso da traquéia, e os lóbulos, em sua maior parte, ajustam-se sobre a frente e em torno das porções laterais da traquéia, imediatamente abaixo da laringe, mas as suas porções superiores estendem-se lateralmente para cima, por curta distância. A função da glândula tireóide é produzir, armazenar e liberar hormônios tireoidianos na corrente sanguínea, Figura 1.

Figura 1. (A) Localização da glândula tireóide no corpo humano: A glândula tireóide se encontra na base do pescoço, tem a forma de uma borboleta e cada asa, ou lóbulo, da tireóide está presente em ambos os lados da traquéia. (B) Hormônios tireoidianos: Triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄), respectivamente (ACD/ChemSketch).

Fonte: <http://www.indatir.org.br/index.html> .

Histologicamente a tireóide apresenta uma estrutura com grandes folículos que permite o armazenamento dos hormônios tireoidianos, o que representa uma vantagem pelo fato do acúmulo proporcionar um funcionamento prolongado da tireóide mesmo na falta temporária do iodo, que é fundamental para a síntese de seus hormônios. Além dos folículos produtores dos hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), Figura 1B, a glândula apresenta tecido interfolicular, vasos, e células que rodeiam os folículos, chamadas de células parafoliculares. Embora, se abriguem na tireóide tais células secretam apenas o hormônio calcitonina. Esse hormônio juntamente com o paratormônio, produzido pelas glândulas paratireóides, localizada posteriormente a glândula tireóide, atuam no metabolismo do íon cálcio. Entretanto, a calcitonina não participa dos fenômenos de retroalimentação negativa que ocorre entre T3/T4 - hipotálamo e hipófise.

Os hormônios T3 e T4 agem em quase todas as células do corpo e seus efeitos são muitos, tais como: - Aumenta o calor corporal; ajuda no crescimento fetal; aumenta o tônus nervoso após o nascimento; reduz a taxa de colesterol e outros lipídeos; aumenta a força e frequência do coração; aumenta a pressão sangüínea; e promove letargia pelo cansaço e fadiga muscular; melhora a produção de leite; é necessário ao ciclo estral normal; melhora e aumenta a gliconeogênese e rápida glicólise; diminui o peso corporal; e aumenta a frequência respiratória. Porém dificulta o concatenar do sono e produz leve tremor muscular.

A secreção dos hormônios tireoidianos é regulada à distância pela hipófise, situada no hipotálamo. O hipotálamo produz o neuro-hormônio chamado Hormônio de Liberação de Tireotropina (TRH), e esta tireotropina age na hipófise estimulando a produção de outro hormônio, o Hormônio Estimulador da Tireóide (TSH). Por sua vez, o TSH se liga aos receptores específicos presentes nas superfícies das células foliculares da glândula tireóide e estimula a produção e liberação dos hormônios diretamente na corrente sanguínea. Quando os níveis dos hormônios tireoidianos já são suficientes na circulação, ocorre a estimulação retro-ativa negativa do hipotálamo e da hipófise para que interrompam a secreção de TSH. Este mecanismo de retroalimentação, portanto permite o controle do nível do TSH e dos hormônios tireoidianos na circulação.

O mau funcionamento da tireóide repercute no organismo como um todo em graus variáveis de severidade, que vai desde: sintomas que muitas vezes podem passar despercebidos até formas extremamente graves que podem trazer risco à vida como:

- hipotireoidismo; hipertireoidismo; bócio; câncer da tireóide (GUYTON ; HALL, 2006).

Hipotireoidismo ocorre quando a tireóide produz uma quantidade de hormônio abaixo dos níveis considerados normais, podendo ser associado a alguns sintomas como:

- Depressão, desaceleração dos batimentos cardíacos, intestino preso, menstruação irregular, diminuição da memória, cansaço excessivo, dores musculares, sonolência excessiva, pele seca, queda de cabelo, ganho de peso, aumento do colesterol no sangue. Como causas do

hipotireoidismo temos a Tireoidite de Hashimoto (causa auto-imune, quando o próprio corpo produz proteínas que “atacam” o órgão), retirada cirúrgica da tireóide ou tratamento com iodo radioativo. Algumas crianças nascem com hipotireoidismo porque não têm a tireóide ou porque a mesma não funciona bem. O popular teste do Pezinho faz o diagnóstico e a criança deve ser tratada o mais rápido possível. O tratamento é para a vida toda.

Hipertireoidismo se desenvolve quando há uma produção excessiva dos hormônios da tireóide, podendo ser associado a alguns sintomas como: - Dificuldade de dormir, aceleração dos batimentos cardíacos, intestino solto, agitação, muita energia, apesar de muito cansaço, queda de cabelos, calor e suor exagerado, menstruação irregular. As causas mais comuns do hipertireoidismo é uma doença auto-imune (o próprio corpo produz proteínas que “atacam” o órgão) chamada Doença de Graves.

Bócio é uma doença definida pela hipertrofia da glândula tireóide e sua manifestação mais marcante é o aumento de volume na região do pescoço, daí ser conhecida vulgarmente como "papo" ou "papeira". O Bócio também pode produzir hormônios em excesso.

O câncer surge de uma mutação inicial em algum gene envolvido na regulação de proliferação e/ou diferenciação celular, ocorrendo, então, expansão clonal da célula geneticamente modificada devido à sua maior capacidade de proliferar e escapar ao controle do ciclo celular e dos sinais que induzem a apoptose, predispondo ao acúmulo de mutações sucessivas (VOGELSTEIN; KINZLER, 1993).

1.2 Câncer de tireóide

Os proto-oncogenes são agrupados de acordo com sua função ou localização na célula: entre eles encontram-se os fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, proteínas nucleares e proteínas de membrana. As localizações subcelulares e as funções das proteínas codificadas por estes genes sugerem que nas células normais, eles desempenham papéis importantes em termos de crescimento, desenvolvimento e diferenciação. Mutações, deleções ou inserções na sequência de DNA de proto-oncogenes pode levar a formação de oncogenes transformantes (DEVLIN, 2004). Os oncogenes quando expressos resulta em uma estimulação anormal da divisão celular, e conseqüentemente em proliferação descontrolada que está relacionada com o surgimento de tumores (WEINBERG, 1989). Alguns oncogenes codificam para receptores, freqüentemente receptores hormonais, como é o caso dos receptores dos hormônios da tireóide e esteróides; outros codificam para receptores de membrana como as proteínas tirosina quinase; enquanto que outros codificam para proteínas de ligação ao DNA, algumas das quais podem ser fatores de transativação ou relacionadas a tais fatores (DEVLIN, 2004).

Oncogene é um gene mutante cuja expressão alterada leva a uma estimulação anormal da divisão celular e à proliferação. Assim, proto-oncogene é o mesmo gene normal, cuja função é a mesma observada no oncogene, porém regulada pela célula. Muitos genes caem

nesta categoria e as designações proto-oncogene e oncogene são coletivos para estes genes. Onde eles codificam para diferentes proteínas e enzimas, desde transdutores transmembranar, receptores até enzimas citoplasmáticas, mitocondriais ou nucleares.

A figura 2 mostra o resumo da ação de vários genes que estão envolvidos no controle da proliferação celular, na morte celular e no câncer.

Figura 2. Esquema geral dos mecanismos de oncogênese pela ativação de proto-oncogene, mutação ou perda de genes supressores tumorais, ativação de genes anti-apoptóticos ou perda de genes pró-apoptóticos. O efeito dos genes que acentuam um processo é indicado pelo sinal (+), enquanto o efeito dos genes que suprimem um processo está indicado pelo sinal (-). A divisão celular e a proliferação são estimuladas pelos produtos dos proto-oncogenes. A ativação dos oncogenes ou dos genes anti-apoptóticos é dominante e requer apenas um alelo mutante, enquanto a ação dos genes supressores de tumor é recessiva.

A conversão de uma célula normal, bem regulada, numa célula cancerígena requer várias etapas independentes, cujo resultado final é a formação de uma célula transformada, capaz de crescer descontroladamente e de metástase. A metástase, e não o tumor primário é a grande ameaça nos cânceres (NICOLSON, 1979; POSTE; FILDER, 1980). O câncer da tireóide pode ser considerado o mais comum da região da cabeça e pescoço e é três vezes mais freqüente no sexo feminino. Nos EUA, a doença corresponde a 3% de todos os cânceres

que atingem o sexo feminino. No Brasil corresponde a 1,3% de todos os casos de câncer relatados no Instituto Nacional do Câncer (INCA) de 1994 a 1998, e a 6,4% de todos os cânceres da cabeça e pescoço. Segundo os Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia cerca de 35% dos cânceres de tireóide podem voltar, e um terço de todas as recorrências só vão surgir com mais de 10 anos após o tratamento inicial. Coeli *et al.* (2005), avaliaram a incidência e a mortalidade por câncer de tireóide (CT) no Brasil através de análise dos dados de sete Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) e do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) e chegaram à conclusão que: a tendência na queda da mortalidade é provavelmente explicada pela melhoria do diagnóstico e do tratamento do CT; enquanto que as incidências em diferentes regiões geográficas estão relacionadas provavelmente à disponibilidade de recursos, cuidados médicos e na qualidade das informações dos registros de câncer. O câncer de tireóide costuma afetar adultos, especialmente mulheres e sua ocorrência em crianças é muito rara. Há quatro tipos principais de câncer de tireóide: - Papilar é o câncer de tireóide de maior prevalência e costuma ocorrer em adultos jovens, especialmente em mulheres. Geralmente, ele envolve apenas um lado da tireóide e pode espalhar-se pelos gânglios linfáticos. Seus índices de cura são elevados. - Folicular é o câncer de tireóide não tão frequente quanto o papilar, porém, bem mais agressivo. Tende a espalhar-se pelas artérias e alojar-se em órgãos distantes como pulmão, ossos e pele. Geralmente, esse tipo de tumor acomete pessoas idosas. - Medular é pouco

comum e costuma originar-se no lóbulo central da tireóide. Esse tipo de tumor é tido como familiar, ou seja, pessoas com familiares acometidos por esse tipo de câncer estão mais propensas a desenvolvê-lo. - Finalmente o anaplásico que é o tipo de câncer de tireóide mais raro e sua incidência é maior em pessoas acima de 65 anos de idade, igualmente em homens e mulheres. Ele tende a desenvolver-se rapidamente, o que diminui consideravelmente as chances de cura.

Os carcinomas diferenciados da tireóide (CDT): papilífero (CPT) ou folicular (CFT), se caracterizam por apresentarem várias funções que são encontradas em células tireoidianas normais e também expressam proteínas que são encontradas nas células foliculares, como a tireoglobulina, e a NIS (natrium sodium symporter, "simportadora").

Os carcinomas papilares são caracterizados pela presença de papilífero que consiste em um caroço fibrovascular, envolvido por uma ou duas camadas de células tumorais.

Os carcinomas foliculares são caracterizados pela presença de folículos de tamanhos variados, revestidos por células epiteliais com graus diferentes de diferenciação.

Os carcinomas anaplásicos são composto por células fusiformes, ou gigantes, mostrando extremo pleomorfismo. São extremamente malignos crescendo rapidamente e se disseminando extensamente.

A figura 3 representa as principais alterações genéticas observadas na tumorigênese da

tiróide, idealizadas segundo o modelo Volgenstein de evolução neoplásica progressiva (VOGELSTEIN; KINZLER, 1993).

Figura 3. Progressão tumoral da neoplasia da tireóide, com indicação dos genes envolvidos por mutação ou rearranjo. Etapa de evolução, baseada em modelo Volgenstein, segundo o conhecimento das alterações genéticas observadas em adenomas e carcinomas da tireóide.

Fonte: www.scielo.br/img/revistas/abem/v48n1/19525f1.gif

Alguns mecanismos do desenvolvimento e progressão do câncer de tireóide já foram desvendados, como a hiperexpressão ou ativação descontrolada: do receptor tirosina-quinase, de moléculas sinalizadoras na cascata de sinalização e da inibição da apoptose. Além disso, os fatores responsáveis pela progressão tumoral, angiogênese e disseminação metastática têm sido intensamente investigados (BRAGA-BRASARIA; RINGEL, 2003).

1.3 Proteínas Tirosina Quinases e Proteínas Tirosina Fosfatase

Nas últimas décadas, um grande esforço tem sido feito para se elucidar o controle da

proliferação celular em eucariotos. Em particular, dois sistemas envolvendo a fosforilação e desfosforilação de tirosinas das proteínas têm emergido como eventos chaves na regulação da divisão celular, diferenciação, e desenvolvimento. São eles constituídos pelas proteínas tirosina quinase (PTKs) e proteínas tirosina fosfatase (PTPs).

A maioria dos receptores dos fatores de crescimento possuem domínios semelhantes aos das PTKs, e muitos oncogenes dominantes são mutantes de seus sócios proto-oncogenes codificadores de PTKs transmembranares e citosólicas. Uma família grande de PTKs transmembranares e também intracelulares já foram caracterizadas (HANKS; QUINN; HUNTER, 1988; ULLRICH; SCHLESSINGER, 1990). Nas células normais, a atividade dos receptores PTKs depende da presença de fatores de crescimento específicos, enquanto que os produtos dos oncogenes promovem a atividade PTK não regulada e fosforilação de tirosinas inapropriadas, o que leva a uma proliferação celular descontrolada e oncogênica.

O outro componente importante da rede de fosforilação-desfosforilação de tirosinas das proteínas celulares é a crescente família das PTPs, as quais são capazes de desfosforilar proteínas que contém fosfotirosinas. A descoberta e caracterização desta família heterogênea de enzimas levou a uma melhor compreensão da diversidade e complexidade das vias de transdução de sinais através da fosforilação e desfosforilação de tirosinas das proteínas (SAITO; STREULI, 1991; POT; DIXON, 1992). O nível total de fosforilação das tirosinas, bem como o estado de fosforilação de uma dada proteína, é o resultado de um balanço entre

as atividades das PTKs e PTPs. Por isso, as PTPs têm sido consideradas como elementos reguladores importantes do controle do crescimento celular (HUNTER, 1989), Figura 4.

Figura 4. Diagrama esquemático da conversão de uma desfosforilação protéica para uma fosforilação protéica pela proteína quinase e a reversão desta reação pela proteína fosfatase.

Atualmente, sabe-se que as PTKs e PTPs são igualmente importantes para muitos dos processos biológicos. Em particular, o potencial oncogênico das PTKs e a habilidade das PTPs de contra atacar estes efeitos através de sua ação antiproliferativa sugere que os genes codificadores para as PTPs, em muitos casos, podem ser considerados genes supressores de tumores ou antioncogenes (LAFORGIA *et al.*, 1991). Embora as PTKs tenham sido descobertas e caracterizadas mais de uma década antes das PTPs, nos últimos anos uma grande quantidade de estudos levaram a identificação de novas PTPs.

A primeira proteína citoplasmática com atividade tirosina fosfatase identificada e caracterizada foi a PTP1B purificada a partir de placenta humana (TONKS *et al.*, 1988). Logo em seguida o primeiro receptor com atividade tirosina fosfatase (RPTP) foi descoberto, CD45. O receptor CD45 (também conhecido como L-CA, T200, B220, ou Ly-5) constitui uma família de moléculas de alta massa molecular (180kDa - 220kDa), transmembranares e estruturalmente relacionadas encontradas em todas as células do sistema hematopoiético

exceto nas células vermelhas maduras e seus progenitores imediatos. O CD45 de humanos é similar aos observados em ratos e camundongos. Esta RPTP tem um alto grau de similaridade seqüencial com a PTP1B, e sua caracterização bioquímica confirmou que esta enzima é também uma tirosina fosfatase (THOMAS *et al.*, 1985a; THOMAS *et al.*, 1987b).

A varredura, de uma biblioteca de cDNA obtida de cérebro de camundongo, com uma sonda obtida a partir do domínio intracelular do CD45, resultou na descoberta de clones de cDNAs codificadores para uma proteína transmembranar de 794 aminoácidos que foi nomeada de receptor proteína tirosina fosfatase α (RPTP α). O domínio intracelular desta proteína apresenta 45 % de homologia com o domínio catalítico da CD45 e estudos de Northern blot mostraram um amplo espectro de expressão desta proteína em todos os tecidos analisados exceto no baço, sendo o cérebro e os rins os órgãos onde a expressão é máxima (SAP *et al.*, 1990; KAPLAN *et al.*, 1990).

Utilizando-se da mesma técnica de clonagem sete clones de cDNA de diferentes RPTPs humanas foram obtidos entre eles: L-CA (antígeno comum dos leucócitos), HPTP α , HPTP μ , HPTP β , HPTP γ , HPTP δ , HPTP ϵ e HPTP ζ (KRUEGER; STREULI; SAITO, 1990; GEBBINK *et al.*, 1991). Também foram isolados cDNAs, a partir de uma biblioteca de células HeLa, codificadores para uma proteína tirosina fosfatase do tipo receptor que em duas linhagens celulares distintas tiveram sua expressão aumentada de ≥ 10 vezes a medida que as células se aproximavam da confluência. Essa observação levou os pesquisadores a pensar que

essa proteína poderia estar envolvida no mecanismo de inibição por contato do crescimento celular, e ela foi então denominada de DEP-1 - *high cell density-enhanced PTP 1* (OSTMAN; YANG; TONKS, 1994).

Por outro lado, linhagens de células tireoidianas de rato que têm a capacidade de reter *in vitro* todos os marcadores tireoidianos de diferenciação tais como: síntese e secreção de tiroglobulina, a capacidade de reter iodo presente no meio de cultura e a dependência do hormônio estimulante da tireóide (TSH) para crescimento; e que quando transformadas por oncogenes mostram diferentes graus de malignidade e diferenciação (FUSCO *et al.*, 1987; BERLINGIERI *et al.*, 1988; TRAPASSO *et al.*, 1996), foram usadas no isolamento de um gene específico da tireóide. Esse gene por sua alta homologia com o gene *DEP-1* (conhecido também como *HPTP η* , *PTPRJ*, *RPTP η* , e *CD148*) foi designado de *rPTP η* (HONDA *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1997) e é esta proteína que nos dedicamos a estudar neste projeto.

1.4 Classificação das Proteínas Tirosina Fosfatase

Com base na sequência de aminoácidos dos domínios catalíticos das PTPs, atualmente elas estão agrupadas em quatro famílias distintas (classes I, II, III, e IV). A classe I é formada por PTPs que têm a cisteína como elemento chave do mecanismo catalítico. Elas constituem a maior das famílias com 99 enzimas e entre elas se encontram as 38 bem conhecidas PTPs,

também chamadas de PTPs clássicas (ALONSO *et al.*, 2004; ANDERSEN *et al.*, 2004). Estas PTPs são estritamente específicas para fosfotirosinas (PTyr) e estão subdivididas em 21 transmembranares (RPTPs) e 17 intracelulares ou PTPs não receptores (NRPTPs), Figura 5.

Figura 5. Classificação e especificidades das PTPs aos substratos. As famílias estão codificadas por cor: as que pertencem às classes I (A - verde claro), II (B - amarelo claro), e III (C - azul claro) são baseadas na cisteína; só a classe IV (D – cor de rosa) é baseada no ácido aspártico. A especificidade ao substrato para cada grupo ou classe das PTPs está listada ao lado.

Fonte: (ALONSO *et al.*, 2004).

Embora o domínio citosólico das RPTPs seja conservado em todas as famílias, o domínio extracelular é altamente divergente e consiste de uma variedade grande de motivos estruturais. Algumas têm domínios extracelulares complexos e grandes, outras têm curtos domínios extracelulares com funções desconhecidas. Portanto, baseado nas diferenças estruturais dos domínios extracelulares e intracelulares, as 21 RPTPs foram agrupadas em oito subfamílias distintas - tipo I/VI, IIa, IIb, III, IV, V, VII, VIII (HOOFTVAN HUIJSDUIJNEN, 1998; JOHNSON; VAN VACTOR, 2003).

As RPTPs das subfamílias I/VI, IIa, IIb, IV e V todas apresentam dois domínios de fosfatase citoplasmáticos. Porém, com relação ao domínio extracelular as RPTPs da subfamília I/VI têm um único motivo de fibronectina do tipo III (FNIII), exemplificada pela CD45; a subfamília IIa tem um domínio extracelular bastante grande com três motivos semelhantes ao NH₂-terminal das imunoglobulinas (Ig) e oito motivos de FNIII (RPTP δ); já as RPTPs da subfamília IIb se caracterizam por mostrarem no seu domínio extracelular o motivo MAM (inicialmente identificado na proteínas Meprin/A5/PTPmu) seguido do motivo da Ig e de múltiplos domínios FNIII (RPTP μ); as RPTPs da subfamília IV são as que têm os mais curtos domínios extracelulares, os quais se encontram, com frequência, altamente glicosilados (RPTP α); enquanto nas RPTPs da subfamília V o domínio extracelular contem o motivo da anidrase carbônica (CA) ligada a um único domínio FNIII, RPTP γ , (SAITO, 1993),

Figura 6.

Figura 6. Diagrama esquemático das oito subfamílias das RPTPs clássicas classificadas até o momento.

Fonte: (JOHNSON; VAN VACTOR, 2003).

Por outro lado, as RPTPs do tipo III, VII e VIII diferentemente das anteriores têm um único domínio intracelular de fosfatase, sendo que: as RPTPs do tipo III têm uma série de motivos de FNIII no seu domínio extracelular (DEP-1); enquanto que as RPTPs do tipo VII têm um curto domínio extracelular e as do tipo VIII (embora sejam cataliticamente inativas)

contêm o motivo RDGS (Arg-Asp-Gly-Ser) de reconhecimento de adesão (SAITO, 1993) ,
Figura 6.

1.5 O Domínio de Fosfatase Citoplasmático das RPTPs

O domínio de fosfatase citoplasmático das RPTPs contem 240 resíduos que compartilham uma alta similaridade seqüencial com os membros das outras famílias, além de apresentar o motivo comum ([I/V]HCXAGXXR[S/T]G) (FISCHER; CHARBONNEAU; TONKS, 1991) no qual os resíduos essenciais para catálise, cisteína e arginina, estão separados por cinco resíduos; CX₃R. Nas RPTPs até agora estudadas, este motivo está localizado no centro da molécula, na base do sítio catalítico e constitui o “P-loop” ou alça de ligação do fosfato. Nele os nitrogênios da cadeia principal e o grupo guanidina do resíduo de arginina estão orientados para coordenar os oxigênios equatoriais do grupo fosfato durante a ligação e catálise do substrato. O ácido geral, usualmente um ácido aspártico (D), é importante para a catálise e mutação deste resíduo leva a uma diminuição na velocidade de “turnover” da enzima (TADDEI *et al.*, 1994; ZHANG; WANG; DIXON, 1994; DENU *et al.*, 1995; WU; ZHANG, 1996; LOHSE *et al.*, 1997). Acredita-se que o ácido geral está posicionado numa alça mais ou menos flexível (alça WPD) que se dobra sobre o sítio ativo quando o complexo de Michaelis é formado, Figura 7.

Figura 7. A estrutura e a sequência característica do motivo comum das PTPs C-X_S-R(S/T) e o ácido geral (Asp/D) numa PTP típica. As cadeias laterais dos cinco resíduos entre cisteína (Cys/C) e arginina (Arg/R) estão omitidas para melhor visualização. As ligações de hidrogênio que estabilizam o nucleófilo e o ânion estão indicadas por linhas tracejadas.

Fonte: (KOLMODIN; AQVIST, 2001).

Bioquimicamente, estas fosfatases podem ser identificadas pela falta de dependência a íons metálicos e pela habilidade de hidrolisar *p*-nitrofenil fosfato (pNPP). Além do mais, todas estas fosfatases têm preferência por peptídeos contendo fosfotirosinas e foi constatado que quando mutada a cisteína do sítio ativo para serina ocorre à perda total de sua atividade (FAUMAN; SAPER, 1996; KOLMODIN; AQVIST, 2001).

1.6 O Mecanismo de Catálise das RPTPs

A reação de desfosforilação ocorre em duas etapas: No primeiro instante tem-se um ataque nucleofílico pela cisteína ativa sobre o átomo de fosfato ligado ao substrato. Ao mesmo tempo em que a ligação ester é quebrada, o resíduo do ácido geral doa seu próton para o oxigênio do grupo que está sendo liberado. A primeira reação de substituição deixa o grupo fosfato covalentemente ligado ao nucleófilo via ligação tioester (GUAN; DIXON, 1991;

PANNIFER *et al.*, 1998). A fosfoenzima intermediária é hidrolisada por uma molécula de água numa segunda reação de substituição, liberando a enzima restaurada e fosfato inorgânico. A molécula de água é ativada pela base geral, que é o mesmo resíduo que age como ácido geral no primeiro passo. No segundo passo da reação, o qual envolve hidrólise da fosfoenzima, a molécula de água atua como um nucleófilo. O aspartato ativa a água retirando um de seus átomos de hidrogênio. A molécula de água precisa estar perfeitamente posicionada no sítio ativo para uma hidrólise eficiente (CIRRI *et al.*, 1993; ZHAO *et al.*, 1998; KOLMODIN; AQVIST, 1999), Figura 8.

Figura 8. O mecanismo de catálise das PTPs. Os dois estados propostos de ionização do substrato estão indicados.

Fonte: (KOLMODIN; AQVIST, 2001).

1.7 A Estrutura Tridimensional do Domínio Catalítico das RPTPs

A estrutura tridimensional do domínio catalítico de todas as PTPs conhecidas compartilham uma arquitetura comum, na qual encontramos: no centro uma folha β altamente retorcida composta por nove fitas β de tal modo que quatro fitas β paralelas centrais estão flanqueadas por fitas β antiparalelas (BARFORD; FLINT; TONKS, 1994; STUCKEY *et al.*, 1994). Esta folha β está envolvida por quatro hélices α de um lado e duas do lado oposto. Elementos estruturais secundários adicionais presentes no N- e C-terminal deste domínio conservado das PTPs, estão acomodados dentro deste domínio. Por exemplo, duas hélices α no N-terminal (α -1' e α -2') se encontram empacotadas contra α -5 e α -6 no caso da PTP1B e em outras PTPs de eucarioto. O motivo comum das PTPs localizado na base da fenda do sítio catalítico, está envolvido por quatro alças, três das quais contêm resíduos necessários para catálise e especificidade ao substrato. Uma destas alças, que forma parte da região de reconhecimento da fosfotirosina está localizada no N-terminal com relação à folha β , é crítica para definir a especificidade das PTPs pela fosfotirosina (Y46) (JIA *et al.*, 1995; BARFORD; DAS; EGLOFF, 1998), Figura 9.

Figura 9. Estrutura da proteína tirosina fosfatase 1B. A alça PTP (sombra escura) e a alça WPD estão indicadas, como também a C215 e R221 da alça PTP e a posição do átomo de C α da Y46 da alça de reconhecimento da fosfotirosina.

Fonte: (BARFORD; DAS; EGLOFF, 1998)

1.8 A Dimerização como Mecanismo Regulador das RPTPs

A dimerização é um mecanismo regulador importante para muitas moléculas, em particular, proteínas transmembranares do tipo receptores (SCHLESSINGER; ULLRICH, 1992; WEISS; SCHLESSINGER, 1998). Estudos extensivos estabeleceram que a dimerização induzida por ligante ou oligomerização é crítica para a ativação das PTKs, receptores de antígenos, receptores de citosinas, receptores da família do TGF β , e outros. Embora, as RPTPs frequentemente possuam motivos extracelulares comuns as proteínas do tipo receptores, na maioria dos casos os seus ligantes ainda não foram identificados. Entretanto, se acredita que este mecanismo também esteja envolvido na regulação de RPTPs,

pois evidências aumentam a cada dia indicando que como as PTKs as PTPs também são reguladas por dimerização.

Como o CD45 apresenta uma estrutura similar às dos receptores tirosina quinases (RTKs), foi postulado que este receptor deveria dimerizar e desta maneira ser negativamente regulado por ligantes. Muitos esforços foram feitos, por diferentes laboratórios, na procura destes ligantes sem que houvesse uma identificação definitiva dos mesmos. Por isso, a observação de uma expressão altamente controlada de isoformas do CD45 levou a se pensar em um mecanismo alternativo para a sua regulação.

Em 2002, Xu e Weiss mostraram que as isoformas menores RO do CD45 dimerizavam mais eficientemente e rapidamente que as isoformas maiores (RA+). Além disso, a dimerização não dependia do domínio intracelular da CD45, ao contrário, ela era modulada pela adição de ácido siálico e O-glicosilação nos “exons” do domínio extracelular que sofriam “splice” alternativo. Eles observaram, também, que a homodimerização diferencial das isoformas do CD45 levava a uma regulação diferencial da sinalização pelos receptores de células T (TCR). Baseados nestes dados, esses autores propuseram um modelo no qual sugeriam que após vários dias de estimulação, as células T ativadas passavam a produzir ao invés da isoforma RA+ a isoforma RO, que promoveria a titulação da atividade catalítica do CD45 disponível e conseqüentemente levaria a cessação da resposta primária pelas células T.

A existência de homodímeros do CD45 também foi detectada bioquimicamente em

lisados de células YAC-1 usando-se o agente ditio-bis-succinimidil que permite ligações cruzadas (crosslinking) entre as moléculas; por centrifugação em gradiente de sacarose (TAKEDA; WU; MAIZEL, 1992); e em quimeras de CD45 (as quais possuem a porção extracelular e transmembranar do receptor do fator de crescimento da epiderme, EGF, e a porção intracelular do CD45) expressas em linhagem de células T deficientes de CD45. As quimeras foram capazes de dimerizar após indução com o EGF. Como consequência desta dimerização observou-se à perda de ativação dependente de antígeno o que levou a se postular que a atividade fosfatase do domínio D1 do CD45 é necessária para que aja a ativação das células T e que a dimerização do mesmo leva a esta perda (DESAI *et al.*, 1993; FELBERG; JOHNSON, 1998).

Dados cristalográficos também corroboram com a hipótese da dimerização como mecanismo de regulação das RPTPs, pois o primeiro domínio de fosfatase (RPTPD1) da RPTP α foi cristalizado como dímero. Nas duas formas cristalinas obtidas, as RPTP α D1s de murinos existem como dímeros simétricos, nos quais o elemento formado por uma hélice-volta-hélice em forma de cunha presente no N-terminal do domínio D1 da RPTP α de um dos monômeros se insere na região catalítica do outro monômero que forma o dímero e vice-versa. Como resultado ocorre oclusão mútua dos sítios ativos, indicando que a RPTP α pode ser capaz de formar dímeros que, se formados, devem diminuir a atividade das RPTPs (BILWES *et al.*, 1996), Figura 10.

Figura 10. (A) A região proximal a membrana juntamente com o domínio citoplasmático 1 da RPTP α cristalizam como dímero. A estrutura cristalográfica mostra a formação de dímeros simétricos no qual o sítio catalítico do domínio de fosfatase 1 de uma molécula está bloqueado por contatos específicos com a estrutura em forma de cunha da região N-terminal da outra molécula. Note que a estrutura em forma de cunha da molécula azul está ocupando o sítio ativo da molécula vermelha, cuja cisteína do sítio ativo está indicada em azul. (B) Vista detalhada da interação entre a estrutura em forma de cunha e o sítio catalítico no cristal da RPTP α . Interações por ligações de hidrogênio são detectadas entre múltiplos resíduos da estrutura em forma de cunha (amarelo) e o sítio catalítico oposto (azul). O ácido aspártico (D228) forma ponte de hidrogênio com o “alça móvel” do sítio catalítico; esta interação posiciona a alça para longe do sítio ativo. Como a catálise pelas PTPs requer que esta alça se dobre sobre o sítio ativo quando da ligação do substrato, esta interação gera uma enzima PTP inativa.

Fonte: (BILWES *et al.*, 1996).

O alinhamento da sequência de nucleotídeos do domínio D1 de um conjunto de RPTPs disponíveis foi capaz de identificar uma sequência consenso para a estrutura em forma de cunha observada na estrutura cristalográfica da RPTP α . A varredura do banco de dados com esta sequência consenso, mostrou que todas estão localizadas nas sequências primárias do domínio 1 das RPTPs, inclusive no CD45, mas não se encontram no domínio 2 ou sequências intracelulares das PTPs, o que sugere que esta sequência consenso pode estar relacionada a uma conservação de estrutura e função (MAJETI; WEISS, 2001).

Para testar *in vivo* esta hipótese de que dímeros da RPTP α têm atividade diminuída, pesquisadores geraram dímeros de RPTP α covalentemente estabilizados através de pontes dissulfeto intermoleculares após introduzirem em diferentes posições do domínio extracelular da molécula resíduos únicos de cisteínas (mutações Phe135Cys, Pro137Cys, Asp139Cys e Thr141Cys). Estes mutantes e a proteína nativa foram expressos em células embrionárias RPTP α Null de camundongos. A RPTP α atua nestas células se associando a c-Src, desfosforilando diretamente o resíduo Tyr 529 e como consequência promove a ativação da proteína tirosina kinase c-Src (ZHENG; WANG; PALLAN, 1992; DEN HERTOOG *et al.* 1993; SU; MURANJAN; SAP, 1999; PONNIAH *et al.*, 1999). Somente a mutação extracelular Pro137Cys inativou c-Src. Por outro lado, a mutação Pro210/211Leu na hélice-volta-hélice inibitória dos mutantes extracelulares Pro137Cys restaurou a habilidade de ativação da c-Src, sugerindo que a dimerização pode inibir a atividade da molécula completa da RPTP α de maneira estereoquímica e consistente com as estruturas cristalográficas previamente descritas (JIANG *et al.*, 1999).

Dada a extensa homologia sequencial entre CD45 e RPTP α na região próxima a membrana (domínio 1) codificadora para a estrutura em forma de cunha, a suposta estrutura de interação entre hélice-volta-hélice e sítio ativo no dímero do CD45 foi modelada com base na estrutura cristalográfica da RPTP α . A modelagem mostrou que termodinamicamente é possível para o CD45 formar um dímero inibidor similar ao da RPTP α . Além de que, o ácido

glutâmico 624 do CD45, homólogo ao ácido aspártico 228 presente na ponta da estrutura em forma de cunha da RPTP α , era capaz de fazer interação com a alça móvel através de ligação de hidrogênio similar, levando esta para longe do sítio ativo, Figura 11.

Figura 11. Modelo estrutural da interação entre a forma em cunha do domínio catalítico 1/ sítio ativo no dímero do CD45. Note que o ácido glutâmico 624 (amarelo) pode formar ponte de hidrogênio com a alça móvel do sítio catalítico (azul) levando a alça para longe do bolso catalítico. Esta interação gera um domínio 1 do CD45 inativo.

Fonte: (MAJETI; WEISS 2001).

Coletivamente, estas observações sugerem um modelo para a regulação de CD45, RPTP α , e outras RPTPs, no qual a dimerização inibe a atividade de fosfatase e conseqüentemente sua função, através de interação simétrica entre o sítio catalítico e a estrutura em cunha. Entretanto, a interação inibitória entre a estrutura em forma de cunha e o sítio catalítico detectado na estrutura cristalográfica dimérica da RPTP α D1 não foi detectada nas estruturas cristalográficas da RPTP μ e LAR (HOFFMANN; TONKS; BARFORD, 1997; NAM *et al.*, 1999). Na verdade, somente monômeros foram detectados em ambas as estruturas, pois acredita-se que a pequena região de contato observada no dímero

cristalográfico da RPTP μ -D1 seja um artefato de empacotamento. Portanto, com base nestes resultados os autores concluíram que o dímero inibidor para a RPTP μ e LAR pode não se formar. Entretanto, como a estrutura cristalográfica representa somente conformações seletivas de uma molécula, estes resultados não eliminam totalmente a dimerização como mecanismo regulador para ambas as RPTPs, Figura 12 e Figura 13.

Figura 12. (A) Diagrama em fita do dímero RPTP μ D1. O eixo da díade molecular está indicado pela flecha. A cisteína do sítio catalítico (C1095), o segmento hélice-volta-hélice ($\alpha 1'$, $\alpha 2'$), e a fita- β (βx) do N-terminal que forma juntamente com a fita β folha β dentro dos RPTPs-D1, estão indicadas em uma das subunidades (esquerda). As fitas $\beta 8$ e $\beta 10$ participam da interface dimerica da RPTP μ D1.

Fonte:(HOFFMANN;;TONKS;BARFORD, 1997)

Figura 13. (A) Diagrama em fita do dímero RPTP μ D1. (B) Vista estérea da superposição dos átomos da cadeia principal da RPTP μ (azul) e da RPTP α D1 (vermelho). Várias estruturas das enzimas estão assinaladas: 1- seguimento hélice-volta-hélice com a volta colorida em lilás, D228 e D229 da RPTP α estão nomeadas; 2- Y929 da alça de reconhecimento da Y(P) está em verde; 3 – H1064 da alça WPD (vermelho); 4- resíduos do sítio catalítico C1095 e R1101 estão presentes no motivo conservado das RPTPs (amarelo).

Fonte: (HOFFMANN; TONKS; BARFORD, 1997).

Ao contrário do CD45, RPTP α , RPTP μ e LAR, a PTP Sap-1 (fosfatase associada a câncer de estômago)/ PTPRH possui apenas um único domínio catalítico. Portanto, usando-se tanto compostos que permitem ligações cruzadas entre os dímeros desta proteína como a técnica de imunoprecipitação, foi mostrado que a proteína completa superexpressada se apresenta como homodímeros estáveis. Entretanto, o único domínio catalítico da Sap-1 não está envolvido neste processo de dimerização. Na verdade a dimerização ocorre ao nível dos domínios extracelular e transmembranar. Por outro lado, a exposição de células a um ambiente redutor reversivelmente desfaz o dímero de Sap-1, o que sugere que ligações entre cisteínas devem ter papel importante na formação e estabilização destes dímeros. Observou-se também que a mudança da Sap-1 do estado dimérico para o monomérico é acompanhada de

aumento na sua atividade catalítica julgada pela sua capacidade de desfosforilar e ativar a proteína c-Src, que é o seu substrato (VAN DER WIJK *et al.*, 2003; WALCHLI; ESPANEL; VAN HUIJSDUIJNEN, 2005).

Recentemente, CISMASIU *et al.*, (2004), mostrou que o domínio MAM extracelular da RPTP μ pode dimerizar através de interações independentes *cis* (lateral) e *trans*. Assim sendo, esses autores sugerem que o papel principal de MAM é promover a dimerização lateral da RPTP μ na superfície da célula e que MAM deve está envolvida no mecanismo de transdução de sinal destas PTPs. Entretanto, a influência deste evento sobre a atividade da enzima ainda não foi esclarecida, estudos funcionais se fazem necessários para determinar se estas moléculas são negativamente reguladas pelo processo de dimerização.

No contexto das moléculas completas, a dimerização mediada pelo domínio extracelular ou mesmo transmembranar pode alterar a conformação do domínio citoplasmático, favorecendo interações entre as estruturas em forma de cunha e os sítios catalíticos. Embora seja possível que a regulação negativa por dimerização seja restrita a um subconjunto das RPTPs, no qual se encontram a RPTP α e CD45, a conservação da seqüência primária e da estrutural da hélice-volta-hélice entre as RPTPs, juntamente com os estudos funcionais com CD45 e RPTP α , atualmente, suportam um modelo mais geral para a regulação negativa das RPTPs por dimerização, no qual a inibição seria mediada pela estrutura em forma de cunha.

1.9 Proteínas Tirosina Fosfatase η de Rato

Como a RPTP Sap-1 a rPTP η contém um único domínio intracelular catalítico. Além disso, ela apresenta um domínio curto transmembranar, e uma região extracelular com oito repetições de FNIII, sendo classificada como uma RPTP clássica do tipo III. É sabido que os genes cuja expressão é específica da tireóide são positivamente regulados por tireotrofinas através da via da proteína quinase A (PKA) e negativamente regulados pela ativação da proteína quinase C (PKC). Logo após a descoberta da rPTP η , estudos realizados com ratos alimentados com propiltiouracil (PTU), modelo *in vivo* de crescimento da tireóide dependente de TSH, confirmaram um aumento no nível sérico de TSH ao qual se sobrepôs o aumento da expressão do mRNA da rPTP η nas células tireoidianas. Por outro lado, foi observado que a expressão do mRNA da rPTP η , *in vitro*, em células normais de rato da linhagem PC Cl3, era induzida pelo TSH de maneira tempo- e dose-dependente através da via da proteína quinase A (ROGNONI; PENEL; DUCRET, 1984; DUMONT *et al.*, 1992). Da mesma forma, ao se estimular, *in vitro*, células PC Cl3 normais com acetato de tetradecanoil forbol (TPA), o qual estimula a transdução de sinal dependente da proteína quinase C (PKC), verificou-se que sua ativação inibia a expressão da rPTP η . Estes resultados levaram os autores a concluir que a expressão da rPTP η é regulada pelas duas vias principais de regulação da tireóide, sugerindo o seu envolvimento nos processos de proliferação e de diferenciação das células tireoidianas

(MARTELLI *et al.*, 1998).

A proposta do gene da rPTP η como supressor de tumor surgiu de experimentos realizados inicialmente com DEP-1/HPTP η onde se observou uma redução drástica da expressão deste gene em diferentes tipos de carcinomas tireoidianos. Subseqüentemente, foi notado que a expressão do gene da rPTP η está reduzida em todas as células tireoidianas de rato transformadas por retrovírus que carregam os oncogenes *v-mos* e *v-ras-Ki* e completamente ausente nas células tireoidianas altamente malignas (OKAZAKI; SAGATO, 1995). Tratamento destas células transformadas e de camundongos atímicos transplantados com tumores, com adenovírus carreadores de cDNAs da rPTP η (Ad-rPTP η), foi capaz de suprimir, respectivamente, o fenótipo maligno e reduzir drasticamente os tumores (FUSCO *et al.*, 1985a; FUSCO *et al.*, 1987b; IULIANO *et al.*, 2004). A análise do ciclo celular destas células mostrou que a rPTP η causa a parada do ciclo em G1 e aumento na meia vida da proteína p27^{Kip1} (cyclin-dependent kinase inhibitor). Portanto, os autores propuseram que a atividade supressora de tumor da rPTP η é mediada pela estabilização da proteína p27^{Kip1}, pois a supressão da síntese da p27^{Kip1} com oligonucleotídeos anti-sense específicos para p27^{Kip1} bloqueia o efeito inibidor do crescimento induzido pela rPTP η (TRAPASSO *et al.*, 2000). Também, foi constatado que a inibição da proliferação das células PC Cl3 pela somatostatina (SST) requer a ativação da rPTP η , a qual atua inibindo a atividade da MAPK quinase, causando conseqüentemente a estabilização do inibidor do ciclo celular a proteína p27^{Kip1}

(FLORIO *et al.*, 2001).

O papel da rPTP η como supressora de tumor está em concordância com o observado tanto para o gene homólogo DEP-1 humano, o qual inibe o crescimento de células do câncer de mama atuando através do bloqueio na sinalização pelos fatores de crescimento PDGF β (platelet-derived growth factor) e HGF (hepatocyte growth factor) (KEANE *et al.*, 1996; KOVALENKO *et al.*, 2000; PALKA; PARK; TONKS, 2003); como para o *Ptp η* codificador da proteína tirosina fosfatase J de camundongo, o qual foi identificado como o único gene candidato para o locus *Sccl* (Susceptibility to colon cancer 1) de camundongo. Sua candidatura foi baseada no seu mapeamento na região restrita a *Sccl* e pela presença de cinco variações de aminoácidos na sua sequência codificadora cujo polimorfismo Gln276Pro tem sido implicado na susceptibilidade a cânceres (RUIVENKAMP *et al.*, 2002a; RUIVENKAMP *et al.*, 2003b). Da mesma maneira, PTPRJ tem sido associada a vários cânceres humanos onde o seu gene está freqüentemente deletado: por exemplo, nos cânceres de colon e pulmão. Portanto, a possibilidade de se usar a rPTP η na terapia gênica de cânceres humanos levou-nos a iniciar, neste estudo, a análise biofísica e estrutural do domínio catalítico da rPTP η , cuja meta é avançar na compreensão dos mecanismos de controle da atividade enzimática desta enzima.

CAPÍTULO 2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

*O rio atinge seus objetivos,
porque aprendeu a contornar
seus obstáculos.*

2.1 Objetivos e justificativa

O nível total de fosforilação das tirosinas presentes nas proteínas, bem como o estado de fosforilação de uma dada proteína, é o resultado de um balanço entre as atividades das PTKs e PTPs. Em particular, o potencial oncogênico das PTKs e a habilidade das PTPs de contra atacar estes efeitos através de sua ação antiproliferativa sugere que os genes codificadores para as PTPs, em muitos casos, podem ser considerados genes supressores de tumores. Portanto, dada à importância da expressão do gene da rPTP η na inibição da formação de células tireoidianas altamente malignas, este projeto tem como objetivo o estudo molecular, biofísico e estrutural do domínio citosólico desta proteína o qual possui a atividade de fosfatase. O estudo molecular nos permitirá produzir a proteína recombinante em larga escala; a análise biofísica nos dará indicações sobre a estrutura secundária e a estabilidade da rPTP η DC recombinante purificada; enquanto que as investigações estruturais cristalográfica e em solução fornecerão, respectivamente, dados sobre sua estrutura tridimensional e sobre o seu comportamento oligomérico em solução.

CAPÍTULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Mais do que de máquinas, precisamos de humanidade.

Mais do que de inteligência, precisamos de afeição e doçura.

Sem essas virtudes, a vida será de violência e tudo será perdido.

(filme O Grande Ditador)

Charles Chaplin

3.1 *Clonagem do domínio intracelular do gene da rPTP η*

O vetor de expressão pGEX-2TK (Promega) contendo a sequência codificadora da região intracelular (1026 pb) da proteína tirosina fosfatase η de rato, em fusão com o gene da glutathione-S-transferase (GST) foi doado pelo Professor Dr. Alfredo Fusco, da Universidade de Napoli “Federico II,” Napoli, Italy. O isolamento do inserto da rPTP η para sub-clonagem no vetor pET-28a(+) (Novagen), foi obtido digerindo-se os plasmídeos com *Bam*HI e *Eco*RI. Os produtos da digestão foram purificados por eletroforese em gel de agarose usando-se Perfectprep Gel Clean-up kit (Eppendorf). A ligação ao pET28a(+) foi feita durante a noite a 16°C, na presença de T4-DNA ligase (New England Biolabs), após digestão do mesmo com as enzimas de restrição *Bam*HI–*Eco*RI. Os plasmídeos recombinantes continham a sequência de nucleotídeos codificadora para seis histidinas, posicionada acima e na mesma matriz de leitura da sequência do inserto da rPTP η DC. Estes plasmídeos foram transformados em células competentes BL21 (DE3). Uma única colônia proveniente de placas de meio sólido Luria–Bertani (1% Triptona, 5% Extrato de Levedura, 10% NaCl, 1% Bacto Agar)) mais kanamicina foi então selecionada e crescida em meio LB líquido e o DNA extraído e seqüenciado usando-se ABI PRISM 377 DNA Sequencer (AB Applied Biosystems). Estoques de glicerinados bacterianos (8% em LB) foram também preparados e guardados em freezer - 80°C.

3.2 Expressão do domínio catalítico da proteína tirosina fosfatase de rato contendo cauda de histidina (His₆-rPTP η DC)

Células da linhagem BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo contendo o inserto do rPTP η DC foram crescidas durante a noite em 100mL de meio LB na presença de 50 μ g/mL de kanamicina. Após o crescimento a 37°C, a pré-cultura foi usada para inocular 1L de meio 2xYT (1,6% bacto-triptona, 1,0% extrato de levedura e 0,5% NaCl) mais kanamicina e as células crescidas a 30°C sob agitação constante, até a absorbância a 600nm alcançar valores entre 0,6-0,8. Neste ponto, 0,5mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranoside (IPTG) foi adicionado para induzir a expressão da His₆-rPTP η DC e as células foram incubadas a 30°C por 4h. As bactérias induzidas foram coletadas por centrifugação a 6000g em centrífuga Sorvall RC-5C Plus a 4°C por 20min. Em seguida, os precipitados bacterianos foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C.

3.3 Purificação da rPTP η DC recombinante e tratamento com trombina

Antes da purificação, os precipitados bacterianos provenientes de 5L de cultura foram descongelados e ressuspensos em 100mL de tampão de lise (50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,8; 100mM NaCl; 10% propan-1,2,3-triol (glicerol); 10mM imidazol; 4mM β -mercaptoetanol) contendo 1mM PMSF e 0,5mg/mL de lisozima (Sigma). A suspensão foi

incubada em gelo por 30 min para que ocorresse a lise celular. Para reduzir a viscosidade das amostras, o lisado foi, em seguida, sonificado no gelo, a 60W com 10 pulsos de 30s cada (tendo um tempo de descanso entre os pulsos de 1 min), em um 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific). A centrifugação foi realizada a 10000g por 1h para remover a porção celular insolúvel e o sobrenadante límpido obtido constituiu a preparação total de proteínas solúveis. O sobrenadante foi, em seguida, misturado com 20mL de Talon Superflow resin (Clontech), pré-equilibrada com tampão de equilíbrio (50mM tampão fosfato de sódio pH 7,8; 300mM NaCl; 10% propan-1,2,3-triol (glicerol); 10mM imidazol; 2mM β -mercaptoetanol), e deixada agitando 4°C por 1h. O material foi então derramado dentro de uma coluna c16/10 (GE) que, em seguida, era conectada ao HPLC ÄkTA purifier (GE) e a resina lavada com tampão de equilíbrio até a leitura de absorbância alcançar a linha de base. As proteínas ligadas fortemente à coluna foram eluídas com o tampão de eluição (50mM tampão fosfato de sódio, pH 7,8; 50mM NaCl; 10% propan-1,2,3-triol (glicerol); 300mM imidazol; 2mM β -mercaptoetanol) e o pico de proteína coletado em frações de 1mL cada. Nesta etapa da purificação obtivemos uma preparação 70% pura de His₆-rPTP η DC quando analisada por SDS-PAGE. A obtenção de amostras com grau de pureza > 96% foi alcançada após passagem em cromatografia de exclusão por tamanho (Superdex 200 HL 26/60 - GE), usando-se como eluente o tampão Hepes (20mM Hepes, pH 7,8; 200mM NaCl; 5% propan-1,2,3-triol (glicerol); 1mM DTT). Todo o procedimento de purificação foi realizado a 4°C e as frações

de proteínas visualizadas em 15% SDS–PAGE. As His₆-rPTP η DC solúveis (massa molecular de 43kDa) foram concentradas para 1mg/mL e incubadas, de acordo com as recomendações do fabricante, com 5U de trombina por mL de preparação, durante 16h a 18°C. Em seguida, as amostras foram dialisadas contra tampão Hepes. As rPTP η DCs digeridas com trombina e livres da cauda de histidina foram então congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C.

3.4 Atividade enzimática

A atividade de fosfatase da rPTP η DC foi testada *in vitro* utilizando-se o ensaio de hidrólise do p-nitrofenilfosfato (pNPP) da Sigma. O ensaio foi realizado em placas de ELISA de 96 poços. Em cada poço foi colocado 5 μ L de uma solução de BSA (5 mg/mL - Sigma) juntamente com concentrações diferentes da enzima purificada. O volume final da reação foi ajustado para 80 μ L com o tampão pNPP (25mM Hepes, pH 7,2; 50mM NaCl; 5mM ditioneitol; e 2,5mM EDTA). Cada concentração de proteína foi testada em triplicata. Os controles negativos foram preparados da mesma maneira que as amostras sem a enzima. Para iniciar a reação, 120 μ L de pNPP (1,5mg/mL em tampão pNPP) foi adicionado como substrato por 5-60 min a temperatura ambiente. A reação foi parada adicionando-se 20 μ L da solução de 13% K₂HPO₄ e a leitura feita contra o controle negativo a 405nm em um Spectra max Plus384

(Molecular Devices). A atividade específica (AE) da rPTP η DC foi calculada usando-se a Equação 1, onde ϵ é o coeficiente de extinção para pNPP ($1,78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em nmols/min/ μg após multiplicar a Equação 1 pelo fator 10^9 .

$$\text{AE} = \frac{[(\text{vol. da amostra em litros}) \times (A_{405})]}{[(\epsilon \text{ em } \text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times (\text{caminho óptico em cm}) \times (\text{tempo em min}) \times (\mu\text{g de enzima})]} \quad (\text{Eq. 1})$$

3.5 Medidas da concentração de proteína e SDS-PAGE

A concentração de proteína foi determinada usando-se o ensaio de proteína da Bio-Rad de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad Laboratories). O ensaio se baseia no método de Bradford (BRADFORD, 1976) e usa como padrão de referência a albumina do soro bovino (Sigma). As eletroforeses em géis de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras protéicas foram realizadas em tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) com poliacrilamida a 10 ou 12%. As corridas eletroforéticas foram feitas no Gibco-BRL Vertical Cell Electrophoresis Apparatus (Life Technologies) juntamente com os marcadores padrões de massa molecular (Sigma). Para a visualização das proteínas, os géis foram corados com Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories) e descorados com 10% ácido etanóico.

3.6 Ensaios de Western blot

His₆-rPTP η DC e rPTP η DC foram transferidas para membrana de nitrocelulose que, em seguida, foi bloqueada, a temperatura ambiente, por 1h30min com 5% leite desnatado em tampão Tris-salina (TBS, pH 8,0). Após este tratamento a membrana foi incubada com o conjugado Ni-NTA AP (Qiagen), lavada com TBS contendo 0,05% Tween 20 (TBS-T), e a revelação feita com o substrato do conjugado Ni-NTA AP (kit Bio-Rad Laboratories).

3.7 Ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico da rPTP η DC foi obtido utilizando-se o PhastSystem (GE). O método consistiu de três etapas: Na primeira etapa o gradiente de pH foi formado no meio 3-9 do PhastGel IEF (pH entre 3-9); na segunda etapa, as amostras foram aplicadas ao gel por 15Vh numa voltagem de 200V; e finalmente, na terceira etapa, ocorreu a migração das proteínas ao ponto isoelétrico. A separação levou cerca de 30min após o qual o gel foi corado 0,1% PhastGel Blue R (GE) em 30% metanol e 10% ácido etanóico. A visualização das bandas ocorreu após descorar o gel com 10% ácido etanóico.

3.8 Espectroscopia de dicroísmo circular

rPTP η DC purificada foi dialisada contra 5mM tampão fosfato pH 7,8; 12,5mM NaCl

e 0,25mM DTT. Os espectros de CD foram medidos em cuvetas de quartzo com caminho óptico de 1mm, a 18°C e concentração de proteína 0,08mg/mL, em um espectropolarímetro J-720 Jasco (Jasco). Os espectros da proteína no far-UV foram registrados num intervalo de comprimento de onda que ia de 190nm a 250nm com média de sinal proveniente de 64 espectros. O instrumento foi ajustado para uma velocidade de rastreamento de 100nm/min. O conteúdo de estrutura secundária da proteína foi monitorado seguindo-se o pico de 208nm durante desnaturação térmica (10-80°C) induzida por sistema de controle de temperatura PFD-425S Peltier com uma razão de aumento de temperatura de 1°C/min. As medidas de CD da desnaturação térmica foram feitas em cuvetas de quartzo com 1mm de caminho óptico na concentração de proteína de 0,08mg/mL no mesmo tampão descrito acima. A padronização foi realizada subtraindo-se o espectro da linha de base (só tampão) dos espectros da proteína e os resultados foram expressos como elipticidade residual média $[\theta] = (\theta.MRW) / (10.c.d)$; onde θ é a elipticidade observada; MRW = massa média da proteína/número de resíduos; d é o caminho óptico em cm; e c é a concentração protéica em mg/mL.

3.9 Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência intrínseca da rPTP η DC livre da cauda de histidina foi medida em cuveta de quartzo de 10 x 2mm a 18°C, usando um K2 Multifrequency Phase Fluorometer

(ISS) equipado com um banho com controle de temperatura RTE-111 (thermo-Neslab). As emissões de espectros no intervalo de 300-450nm foram registradas usando-se um comprimento de onda de excitação de 280nm. Os espectros de emissão de fluorescência da rPTP η DC na concentração de 0,3mg/mL foram monitorados num intervalo de rastreamento de 1nm e tempo de integração de 1s. Após cada medida o espectro foi corrigido para a contribuição do tampão (100mM Hepes, pH 7,8; 50mM NaCl e 1mM DTT).

3.10 Ensaios de Cristalização

O método usado para os ensaios de cristalização foi à difusão de vapor em gota suspensa (Hanging drop). Para isso, em cada reservatório da placa de cristalização foram colocados 0,7mL de solução de cristalização. Em seguida, cada reservatório foi selado com uma lâmina de vidro fixada com graxa de silicone, logo após ter sido pipetado nelas 1 μ L de proteína (10mg/mL) e 1 μ L da solução de poço correspondente. A triagem das condições de cristalização foi feita pelo método da matriz esparsa utilizando-se as soluções de cristalização comerciais da Hampton (Crystal Screen 1 e 2) e Nextal Suítes (Classics Suíte, Classics L Suíte, PEG, PEG II Suíte, Suíte, Anions Suíte, Cations Suite).

3.11 Coleta de dados e processamento

Um cristal separado com o auxílio de uma alça de nylon foi transferido para uma solução crioprotetora contendo 20% PEG 10000; 0,1 M MES pH 6,5 e 15% (v/v) de etan-1,2-diol (etileno glicol) e mantido por 1 minuto. O cristal foi em seguida esfriado rapidamente para 100K num jato de vapor de nitrogênio imediatamente antes de ser submetido à coleta de dados. A coleta de dados foi feita no feixe da linha MX-1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) usando radiação síncrotron de comprimento de onda de 1,42Å para otimizar a eficiência de difração do cristal e o fluxo da radiação gerada, dadas as características do anel síncrotron do LNLS (POLIKARPOV; TEPLYAKOV; OLIVA, 1997; TEPLYAKOV; OLIVA; POLIKARPOV, 1998).

3.12 Medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo e análise dos dados de espalhamento

Experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foram realizados na linha SAXS do LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), Campinas, SP, Brasil, usando-se um detector unidimensional sensível à posição (KELLERMANN *et al.*, 1997). Os dados foram coletados utilizando comprimento de onda de 0,148nm e distância

amostra-detector de 1046,3 mm, dando um intervalo de q de $0,28\text{nm}^{-1}$ para $3,40\text{nm}^{-1}$ ($q = 4 \cdot \sin \theta / \lambda$, onde 2θ é o ângulo de espalhamento). Concentrações de rPTP η DC entre 3 e 13mg/mL foram preparadas em tampão Hepes contendo 200mM de NaCl e mantidas a 4°C durante as medições. As curvas de espalhamento das soluções protéicas e tampão foram coletadas em sucessivos intervalos de 100s cada na tentativa de se evitar danos à proteína induzidos pela radiação. Para análise dos dados foi feita a normalização do espalhamento com relação à intensidade do feixe incidente transmitido; correção da resposta do detector; e subtração do espalhamento do tampão. Após escalonar todas as curvas de espalhamento com relação à concentração de proteína, curvas de espalhamento compostas foram construídas fusionando-se os dados a baixo ângulo obtidos a 3mg/mL (nos intervalos de q menores que $0,85\text{nm}^{-1}$) com os dados a alto ângulo medidos a 13mg/mL, as quais foram então usadas na reconstrução do modelo *ab initio*.

A análise de Guinier (GUINIER; FOURNET, 1995) foi aplicada para se determinar o raio de giro (R_g) da rPTP η DC em solução. O R_g e a intensidade de espalhamento, $I(q)$, foram inferidos, respectivamente, a partir da inclinação e da intersecção do ajuste linear de $\ln[I(q)]$ versus q^2 respeitando a condição de $q \times R_g < 1,0$. O mesmo parâmetro foi também obtido a partir do ajuste teórico da curva fusionada através do programa que usa a transformada de Fourier indireta, GNOM (SVERGUN, 1992), o qual também avaliou a função de distribuição de distância, $p(r)$, da rPTP η DC. A dimensão máxima, D_{max} , foi estimada a partir da função

$p(r)$, quando a $p(r)$ tende a zero.

3.13 Determinação da forma molecular *ab initio*

Modelos *ab initio* foram calculados usando-se o bem estabelecido método de reconstrução DAMMIN, para determinar a conformação em solução da rPTP η DC (SVERGUN, 1999). Usando o método de anelamento por simulação, no qual o programa procura o melhor modelo de pseudo-átomos (“dummy atom model” - DAM) que se enquadra aos dados experimentais através da minimização da função de discrepância, $f(X)$, entre as curvas calculadas e experimentais. Uma penalidade de relaxamento permite a compactação e conectividade da solução, Equação 2, onde $\alpha > 0$ é o peso positivo da penalidade de relaxamento, $\alpha P(X)$.

$$f(X) = \chi^2 + \alpha P(X), \quad (\text{Eq. 2})$$

A forma geral da proteína foi restaurada para o intervalo completo de q ($0,28\text{nm}^{-1} < q < 3,40\text{nm}^{-1}$), o qual permitiu uma resolução de $1,85\text{nm}$ para o DAM. Uma sequência de 87 ± 3 passos de minimização foi feita para a obtenção do modelo mais provável sem impor nenhuma restrição de simetria nos cálculos. Durante este processo, uma constante foi subtraída dos dados experimentais para assegurar que a intensidade dos ângulos mais altos decaísse segundo q^{-4} de acordo com a Lei de Porod para as partículas homogêneas

(POROD, 1982). O valor da constante foi derivado automaticamente da parte externa da curva pelo ajuste linear nas coordenadas $q^4 I(0)$ versus q^4 pelo programa DAMMIN.

O programa DAMAVER foi usado para a análise automatizada e obtenção do valor médio das múltiplas reconstruções, permitindo tanto a análise da estabilidade da reconstrução convergente como a produção da estrutura do modelo de partículas mais provável (KOZIN; SVERGUN, 2001; SVERGUN; KOCH, 2002).

Os conjuntos de coordenadas para as estruturas cristalográfica monomérica e dimérica do domínio catalítico (D1) da RPTP α de camundongo e a RPTP μ humana foram obtidas do Protein Data Bank (PDB id 1 YFO e id 1RPM, respectivamente) (BILWES *et al.*, 1996; HOFFMANN; TONKS; BARFORD, 1997). A partir das estruturas diméricas o R_g , D_{max} , e curvas de espalhamento foram calculadas pelo programa CRY SOL (SVERGUN; BARBERATO; KOCH, 1995) para estas proteínas, levando em consideração a influência da camada de hidratação.

3.14 Construção do modelo por homologia para a rPTP η DC

Modelos computacionais para a estrutura 3D da rPTP η DC foram construídos usando-se o método de modelagem por homologia, o qual requer estruturas tridimensionais (3D) disponíveis como moldes. A proteína tirosina fosfatase α de camundongo tem uma identidade

de 43,21% com a sequência da rPTP η DC, e esta foi selecionada como molde para o modelo por homologia gerado pelo programa MODELLER (SALI; BLUNDELL, 1993). Foram produzidos 100 modelos, cada um dos quais foi validado pelo programa PROCHECK (MORRIS *et al.*, 1992; LASKOWSKI *et al.*, 1993), WHATCHECK (HOOFT *et al.*, 1996) e VERIFY3D (BOWIE; LUTHY; EISEMBERG, 1991; LUTHY; BOWIE; EISEMBERG, 1992). O melhor modelo foi escolhido usando-se como critérios a função energia calculada pelo programa MODELLER, o gráfico de RAMACHANDRAN e ausência de anomalias estruturais. O melhor modelo por homologia foi sobreposto às estruturas cristalográficas diméricas da RPTP α -D1 e RPTP μ -D1 usando-se o programa SUPCOMB (KOZIN; SVERGUN, 2001), o qual automaticamente procura a melhor combinação de alinhamento dos modelos tridimensionais. O mesmo programa foi usado para sobrepor os modelos de alta resolução com as estruturas de baixa resolução derivadas por *ab initio* dos dados de espalhamento experimental em solução da rPTP η DC.

3.15 Medidas de anisotropia de fluorescência

Experimentos de anisotropia de fluorescência foram realizados no ISS PC1 espectrofluorímetro equipado com polarizadores Glan-Thompson (ISS, Champaign, IL). A marcação da rPTP η DC na concentração de 0,22mM foi feita com 1mM isotiocianato de

fluoresceína (FITC; Sigma) em tampão Herpes [20mM Hepes, pH 7,8; 200mM NaCl; 5% propan-1,2,3-triol (glicerol); 1mM DTT], a 4°C, por 3 horas. FITC livre foi separada da rPTPηDC marcada usando-se uma coluna Hitrap desalting (GE Healthscience) equilibrada previamente com tampão Hepes. A marcação da proteína foi confirmada por espectroscopia de absorbância, cujos espectros de absorção mostraram ambas as contribuições da proteína e da fluoresceína. A eficiência de marcação foi de cerca de 0,24mol fluoresceína por mol de proteína, calculada a partir da Equação 3,

$$\text{FITC/rPTP}\eta \text{ (mol/mol)} = (A^{494}/\epsilon_{\text{FITC}}^{494})/[(A^{280} - A^{494} * (\epsilon_{\text{FITC}}^{280}/\epsilon_{\text{FITC}}^{494}))/\epsilon_{\text{rPTP}\eta}^{280}] \quad (\text{Eq. 3})$$

onde A^{280} e A^{494} são a absorção a 280nm e 494nm, respectivamente, $\epsilon_{\text{FITC}}^{494} = 68,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{\text{FITC}}^{280} = 20,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ são os coeficientes de extinção da proteína ligada a FITC a 280nm e 494nm respectivamente (www.piercenet.com/files/TR0031dh5-Calc-FP-ratios.pdf; www.markergene.com/product_sheets/pis0955.pdf).

$\epsilon_{\text{rPTP}\eta}^{280} = 63,050\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ é o coeficiente de extinção da rPTPη a 280nm calculado com base na sua seqüência de aminoácidos (resíduos W875-A1216 da rPTPη) assumindo 6 resíduos de triptofano, 20 resíduos de tirosina e no máximo 2 cisteína (PACE *et al.*, 1996). A baixa eficiência de marcação, provavelmente causada pelas condições de pH e temperatura usadas na reação, é vantajosa porque diminui as chances da auto-transferência entre os fluoróforos na mesma molécula de proteína.

Fluoresceína-rPTPηDC na concentração de 10nM foi titulada com rPTPηDC não

marcada a 20°C em tampão Hepes. Anisotropia de fluorescência da solução de rPTPηDC marcada foi excitada a 480nm e a emissão medida através de um filtro com corte de 50% a 515nm, como descrito anteriormente (LIMA; SILVA, 2004). Para cada concentração de proteína não marcada, os dados representam a média de pelo menos 5 medidas após estabilização. A mudança de anisotropia resultante foi usada para calcular a constante de dissociação no equilíbrio através do ajuste da Equação 4 aos dados experimentais:

$$fd = [rPTP\eta DC]/(K_d + rPTP\eta DC) \quad (\text{Eq. 4})$$

onde fd é a fração de dímeros da proteína e K_d é a constante de dissociação. Como a associação leva a um aumento discreto na intensidade de fluorescência (cerca de 40 %), nós aplicamos uma correção, Equação 5:

$$fd = (A_{obs} - A_m) / [(A_{obs} - A_m) + (F_d/F_m)(A_d - A_{obs})] \quad (\text{Eq. 5})$$

onde A_{obs} , A_m e A_d são respectivamente os valores de anisotropia da rPTPηDC-marcada observada numa dada concentração de rPTPηDC não marcada, para rPTPηDC monomérica e rPTPηDC dimérica (MALENCIK e ANDERSON. 1984). As correções realizadas nas mudanças da intensidade de fluorescência faz uso da intensidade total de fluorescência I_T provida diretamente pelo software do instrumento pela Equação 6:

$$I_T = I_{||} + 2I_{\perp} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde $I_{||}$ e $I_{\perp}$ são respectivamente os valores no estado de equilíbrio tempo-independente para a

intensidade polarizada paralela e perpendicular aquela do feixe de excitação. Os dados de ligação foram analisados usando-se SigmaPlot 2002 Windows Version 8,0.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando a gente acha que tem todas as respostas,

vem a vida e muda todas as perguntas ...

Luís Fernando Veríssimo

4.1 Clonagem e expressão da His₆-rPTP η DC em *Escherichia coli*

O inserto codificador do domínio catalítico da rPTP η DC o qual apresenta identidade de 95% e 98%, respectivamente, com o domínio intracelular dos homólogos humano e de camundongo (HPTP η /Ptrpj) foi excisado do vetor pGEX-2TK com *Bam*HI e *Eco*RI e ligado no vetor de expressão pET-28a(+). O produto de ligação foi transformado em células competentes da linhagem BL21(DE3). Por fim, a presença de plasmídeos recombinantes foi confirmada após extração dos DNAs provenientes de diferentes colônias recombinantes serem digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI e visualizados por eletroforese em 1% gel de agarose, Figura 14.

Figura 14. Digestão com Enzima de Restrição. O gel de 1% agarose mostra nas colunas 1-6 os DNAs purificados dos clones, 4, 8, 3, 2, 5 e 6 de *E. coli* cepa BL21 (DE3), respectivamente, após digestão com ambas as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI. O fragmento liberado de cerca de 1023pb corresponde ao inserto codificador do domínio citosólico da His₆-rPTP η DC. A banda maior de cerca de 5369pb contém o vetor de expressão, pET-28a(+). A coluna PM - mostra os marcadores de massas moleculares em pares de base (promega).

O seqüenciamento destes clones positivos feito em seguida revelou a matriz de leitura (ORF) da região intracelular da rPTP η (W875-A1216) precedida de 34 resíduos adicionais (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGS) provenientes do vetor pET28a(+). Entre estes 34 resíduos se encontravam as seis histidinas necessárias para a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade ao níquel.

A expressão da His₆-rPTP η DC em bactérias BL21(DE3) foi obtida crescendo-se a cultura até a densidade óptica atingir um nível de absorbância entre 0,6 e 0,8 no comprimento de onda de 600nm. A melhor condição e tempo de expressão da His₆-rPTP η DC foi avaliada induzindo-se as bactérias recombinantes com concentrações crescentes de IPTG a diferentes temperaturas, sendo coletadas amostras a cada hora por seis horas e a expressão visualizada no lisado total bacteriano por SDS-PAGE. A expressão máxima da His₆-rPTP η DC foi alcançada a 30°C, com 0,5mM de IPTG por 3 horas como mostra a Figura 15A. Nestas condições uma banda de massa molecular de cerca de 43kDa correspondente a His₆-rPTP η DC foi detectada por SDS-PAGE nos lisados de *E. coli* induzidos, enquanto que estavam ausente nos lisados controles de BL21(DE3)/pET-rPTP η DC.

Ao se constatar que sob estas condições de super-expressão a His₆-rPTP η DC se mantinha solúvel, este protocolo foi estabelecido para a produção em larga escala desta proteína recombinante

Figura 15. Expressão e purificação da His₆-rPTP η DC. (A) SDS-PAGE realizado em uma cuba de eletroforese vertical (Mini V8-10 – Life Technology-Gibco-BRL) e detecção de proteína com o corante azul brilhante de Coomassie. Na coluna 1, padrões de massa molecular: 67kDa, albumina do soro bovino; 45kDa, ovalbumina (Sigma); coluna 2, lisado total da cultura controle de BL21 (DE3), antes da indução com IPTG; colunas 3–8, lisados totais das culturas de BL21 (DE3) 1, 2, 3, 4, 5, e 6h, respectivamente, após adição de IPTG. A seta indica uma banda de aproximadamente 43kDa correspondendo a His₆-rPTP η DC. (B) Perfil de eluição da cromatografia por gel filtração da His₆-rPTP η DC realizada em HPLC, mostrando dois picos principais, P1 e P2, e a calibração da coluna Superdex 200HL 26/60 - ferritina (440kDa), catalase (232kDa), albumina (67kDa), ovalbumina (43kDa) e quimotripsinogênio A (25kDa) (Amersham Biosciences). (C) Análise por SDS-PAGE dos picos obtidos nas cromatografias de afinidade e gel filtração. Na coluna 1, padrões de massa molecular: 45kDa, ovalbumina; 30kDa, anidrase carbônica (Sigma); coluna 2, His₆-rPTP η DC após cromatografia de afinidade; coluna 3, pico P1 da gel filtração, constituído somente de proteínas contaminantes; e coluna 4, pico P2, contendo a His₆-rPTP η DC purificada de cerca de 43kDa (seta).

4.2 Purificação da His₆-rPTP η DC

Precipitados bacterianos contendo a His₆-rPTP η DC foram solubilizados em tampão de lise antes de serem sonicados para reduzir o tamanho dos fragmentos celulares e dos ácidos nucleicos. O lisado límpido obtido após centrifugação constituiu a solução total de proteínas solúveis que continha entre outras a His₆-rPTP η DC.

No primeiro passo de purificação, na tentativa de se minimizar as ligações não específicas à coluna, provenientes de proteínas sem cauda de histidina, foi colocado imidazol em baixa concentração, 10mM, no tampão de equilíbrio de coluna, bem como 300mM de NaCl para prevenir interações iônicas indesejadas. Nestas condições a His₆-rPTPηDC presente na solução protéica ligou-se com sucesso a coluna de afinidade e só após aplicação de tampão com concentração alta de imidazol (300mM) foi que obtivemos um produto significativamente enriquecido com His₆-rPTPηDC. O pico cromatográfico que em seguida foi visualizado por SDS-PAGE mostrou que o material apresentava aproximadamente 70% de pureza, Figura 15C.

A remoção do restante de contaminantes da preparação de His₆-rPTPηDC purificada por cromatografia de afinidade foi obtida por cromatografia de exclusão por tamanho. Para se determinar o tamanho molecular da proteína eluída na gel filtração, a coluna Superdex 200HL 26/60 foi previamente calibrada com um padrão de proteínas (Amersham Biosciences) e a curva de calibração estabelecida relacionando-se os valores do volume de eluição com um parâmetro de tamanho molecular, raio de Stokes (Rs), Figura 15B. Tanto a His₆-rPTPηDC como a ovalbumina têm a mesma massa molecular de 43 kDa e eluíram da coluna com Rs de aproximadamente 2,97 e 3,05, respectivamente, sugerindo que His₆-rPTPηDC elui da coluna de gel filtração como monômero. A análise por SDS-PAGE da proteína purificada indicou que a preparação estava com mais de 96% de pureza, Figura 15C. A eficiência da purificação

por afinidade e gel filtração está mostrada na Tabela 1, com um rendimento total de proteína na última etapa de purificação de 4mg/L de cultura.

Tabela 1- Protocolo de purificação da rPTP η DC proveniente de 1L cultura

Fração (%)	Rendimento (mg) ^a	Proteína total
I	10,0 ^b	100
II	4,0 ^b	40
III	3,5 ^c	35

Nota: I, Proteína His₆-rPTP η DC após eluição com imidazol; II, proteína His₆-rPTP η DC após cromatografia de gel filtração; III, proteína His₆-rPTP η DC após clivagem com trombina. ^a Rendimento foi determinado usando-se o ensaio de proteína da Bio-Rad baseado no método de Bradford; ^b His₆-rPTP η DC; ^c rPTP η DC livre da cauda de histidina.

4.3 Tratamento com trombina da His₆-rPTP η DC purificada

A sequência de aminoácidos LVPRGS é o alvo da trombina e o sítio de clivagem é a ligação peptídica entre os resíduos R e G. Desta maneira a digestão da proteína recombinante com trombina resultou na eliminação de 17 resíduos de aminoácidos, MGSSHHHHHHSSGLVPR, no terminal amino da His₆-rPTP η DC, incluindo a sequência correspondente a cauda de histidina que não era codificada pelo fragmento digerido com *Bam*HI e *Eco*RI (W875–A1216). A digestão completa pela trombina ocorreu logo após a primeira hora de incubação a 18°C e uma banda única de massa molecular de aproximadamente 41kDa pode ser visualizada em SDS-PAGE como mostra a Figura 16A.

Figura 16. Tratamento com trombina protease da His₆-rPTPηDC. (A) SDS-PAGE. Na coluna 1, padrões de massa molecular: 67kDa, albumina do soro bovino; 45kDa, ovalbumina; 30kDa, anidrase carbônica (Sigma); coluna 3, His₆-rPTPηDC não tratada após 18h de incubação a 18°C, mostrando uma banda de aproximadamente 43kDa (seta); coluna 2, 4, 5 e 6, rPTPηDC após tratamento com trombina por 1, 3, 6, e 18h respectivamente a 18°C. A cabeça de seta indica uma banda de aproximadamente 41kDa correspondendo a rPTPηDC livre da cauda de histidina. (B) Colunas 1 e 2, PAGE nativo usando-se PhastGel de gradiente 8–25%, da His₆-rPTPηDC purificada, não tratada e tratada com 0,5U de trombina / 100μg da proteína recombinante por 18h a 18°C, respectivamente; colunas 3 e 4, o mesmo gel transferido para membrana de nitrocelulose antes de ser corado com azul de Coomassie. O Western blot foi feito usando-se Ni-NTA acoplada a fosfatase alcalina de intestino de bezerro para a detecção da His₆-rPTPηDC recombinante, coluna 3.

A remoção da cauda de histidina da proteína recombinante purificada também foi observada por gel nativo PhastGel 8-25% seguido de ensaio de Western Blot, onde His₆-rPTPηDC mais não rPTPηDC foi reconhecida pelo conjugado Ni-NTA AP, confirmando definitivamente a retirada dos 17 resíduos na posição N-terminal da proteína recombinante, Figura 16B.

4.4 Ponto isoelétrico e atividade de fosfatase da rPTPηDC recombinante

O ponto isoelétrico e a atividade enzimática da rPTPηDC recombinante foram medidos como descrito em Materiais e Métodos. O pI observado experimentalmente de 7,3

foi só um pouco maior que o valor predito teoricamente para a rPTP η DC pelo ProtParam tool, $pI = 7,2$, (GASTEIGER *et al.*, 2003). Quanto a atividade biológica da rPTP η DC esta foi acessada medindo-se a habilidade da proteína em hidrolisar o p-nitrofenilfosfato. A reação libera um composto de cor amarelada, p-nitrofenol, que absorve a 405nm. A rPTP η DC purificada que foi submetida ao ensaio de hidrólise do pNPP, mostrou atividade de fosfatase para o pNPP de maneira dose dependente, enquanto o controle falhou em exibir atividade de fosfatase, Figura 17.

Figura 17. Atividade específica da rPTP η DC. A proteína recombinante purificada rPTP η DC teve sua atividade de fosfatase testada em triplicata utilizando-se como substrato o pNPP, em duas concentrações enzimáticas (0,12 e 0,25 μ M) e tempos de incubação diferentes (5-60 min). A atividade (liberação de fosfato) está expressa como A_{405} . Amostras contendo nenhuma enzima foram usadas como controle negativo (círculos preenchidos).

No ensaio, a rPTP η DC pura mostrou um aumento na liberação de p-nitrofenol e fosfato dependente do tempo de reação que chegou a 60 minutos. Baseado nestes resultados, a média da atividade específica da rPTP η DC foi calculada dando 9nmols/min/ μ g. Isto sugere que após purificação, o tratamento da rPTP η DC com trombina não afeta a estrutura nativa que se

mantém intacta, sem nenhum sinal de degradação proteolítica que poderia ter ocorrido durante o procedimento de clivagem da His₆-rPTP η DC. Os resultados destes experimentos determinaram também que a atividade específica da rPTP η DC se encontra no mesmo intervalo das atividades reportadas anteriormente para a PTP μ (GEBBINK *et al.*, 1993), PTP α (LIM *et al.*, 1997) e para a PTPB1 comercialmente disponível (<http://www.upstate.com/browse/product-detail.q.ProductID.e.14-358>) e SHP2 (<http://www.purelyproteins.com/products/datasheets/ptpn11domain.html>).

4.5 Dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência

A estrutura secundária da rPTP η DC foi investigada por CD e medidas de fluorescência. O espectro de CD no far-UV obtido a 18°C mostrou duas bandas negativas a 222 e 208nm e uma banda positiva próxima a 195nm, Figura 18A.

Análise do espectro foi feito usando-se Dichroweb (LOBLEY *et al.*, 2002) com os programas SELCON3 (SREEREMA; VENYAMINOV; WOODY, 1999), CONTIN (VAN STOKKUM *et al.*, 1999), e K2D (ANDRADE *et al.*, 1993). O conteúdo de α -hélices e folhas β variou de 25-37% e de 15-22%, respectivamente. Estes valores se encontram em concordância com os valores preditos para a estrutura secundária da rPTP η DC usando-se PSIPRED (Protein Structure Prediction Server) (MCGUFFIN; BRYSON; JONES, 2000) e

APSSP (Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server) (RAGHAVA, 2000) os quais encontraram, respectivamente, para o conteúdo de α -hélices 31-36% e para o conteúdo de folhas β valores entre 14-16%. Além disso, os resultados de CD se assemelharam bem com os dados já publicados para as estruturas cristalográficas dos domínios catalíticos de diferentes membros da superfamília das PTPs. Por exemplo, a estrutura do domínio próximo à membrana (D1) da RPTP α determinada por Bilwes et al. (BILWES *et al.*, 1996) tem 28,80% de α -hélices e 17,88% de folhas β . Conteúdo similar de α -hélices (31,65%) e folhas β (20,14%) foi observado também para o domínio D1 da RPTP μ (HOFFMANN; TONKS; BARFORD, 1997).

A desnaturação térmica da estrutura secundária da rPTP η DC mostrou claramente uma transição a partir de uma conformação estável para um estado parcialmente desnaturado ocorrendo entre 45 e 55 graus Celsius. O sinal de CD a 208nm foi monitorado desde os 10°C até os 80°C, Figura 18B. O efeito da temperatura sobre a estrutura secundária da rPTP η DC começou próximo dos 45°C e alcançou um platô ao chegar perto dos 55°C. O perfil sigmóidal da transição térmica é um indicativo do desnovelamento da proteína. Por outro lado, o espectro de CD, monitorado antes e depois da desnaturação térmica, revelou claramente uma mudança conformacional na estrutura secundária da proteína.

Por outro lado, o espectro de emissão de fluorescência intrínseca teve sua fluorescência máxima no comprimento de onda de 330nm após excitação a 280nm, Figura 19.

Dois espectros, registrados em um intervalo de 1h, são virtualmente idênticos o que indica que a proteína é estável a 18°C.

Figura 18. Análise por dicroísmo circular da rPTP η DC recombinante. (A) Espectros de CD da rPTP η DC nativa na concentração de 0,08mg/mL em 5mM tampão fosfato (pH 7,8), 12,5mM NaCl, 0,25mM DTT. Os espectros eram gravados a 18°C entre 190 e 250nm em cuveta de quartzo de 1mm de caminho óptico usando-se um espectropolarímetro Jasco J-720 com uma média de 64 varreduras. (B) Desnovelamento Térmico da rPTP η DC purificada. O conteúdo de estrutura secundária da proteína foi monitorado seguindo-se o pico de 208nm durante a desnaturação térmica (10–80°C) com uma variação de temperatura de 1°C/min. As medidas foram feitas em uma cuveta de quartzo com 1mm caminho óptico usando-se proteína na concentração de 0,08mg/mL em 5mM tampão fosfato (pH 7,8), 12,5mM NaCl, e 0,25mM DTT.

Figuras 19. Espectro de fluorescência intrínseca da rPTP η DC. No comprimento de onda de excitação de 280nm e concentração de proteína de 0,3mg/mL em 100mM tampão Hepes (pH 7,8), 50mM NaCl e 1mM DTT. Os espectros de emissão da rPTP η DC foram gravados em intervalos de 1nm e tempo de integração de 1s. Os experimentos foram realizados em cuvetas de fluorescência de 10 × 2, a 18°C, e com correção para a contribuição do tampão.

4.6 Cristalização do domínio catalítico da *rPTP η* recombinante

Após uma triagem exaustiva utilizando o método da matriz esparsa e as soluções de cristalização comerciais da Hampton Nextal Suítes, a condição de cristalização da *rPTP η* DC foi encontrada e gerou um cristal apropriado para difração, Figura 20.

Figura 20. Cristal da *rPTP η* DC. As dimensões típicas são de aproximadamente $0,2 \times 0,4 \times 0,2$ mm.

O cristal difratou a $1,87\text{\AA}$ de resolução na linha de feixe síncrotron. Com imagens foram registradas com uma oscilação de 1° por imagem em um detector MARC CD, Figura 21.

Figura 21. Padrão de difração do cristal da *rPTP η* DC coletado no feixe de linha MX-1 do LNLS. A resolução máxima na extremidade da imagem é de $1,87\text{\AA}$.

O conjunto de dados foi integrado e escalonado usando *MOSFLM* (LESLIE, 1992) e *SCALA* (EVANS, 1993). As estatísticas dos dados coletados estão mostradas na Tabela 2.

Tabela 2- Estatísticas da coleta dos dados de Raios-X. Os valores em parênteses correspondem à camada de maior resolução (1,97-1,87 Å).

Comprimento de onda (Å)	1,42
Intervalo de resolução (Å)	35,7-1,87
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
Parâmetros da célula unitária (Å)	$a = 46,46; b = 63,07; c = 111,64$
Completeza (%)	99,4 (99,4)
Redundância	3,6 (3,8)
$R_{\text{merge}}^{\#}$ (%)	6,0 (19,3)
Média $I/\sigma(I)$	7,5 (3,7)
Reflexões totais	242862
Reflexões únicas	27816

$R_{\text{merge}}^{\#} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$, onde I_i é a intensidade da i , enésima observação, e $\langle I \rangle$ é a intensidade média das reflexões.

A análise inicial do conteúdo de solvente do cristal foi determinada pelo coeficiente MATTHEWS, 1968, e sugeriu que a unidade assimétrica poderia acomodar uma única molécula com um conteúdo de solvente de 46%. A substituição molecular foi realizada usando-se o programa *MOLREP* (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) e como modelo a cadeia A da estrutura cristalográfica do domínio catalítico da proteína tirosina fosfatase β humana (código do PDB 2ahs). O resultado da substituição molecular resultou numa solução incontestável onde apresenta uma única molécula na unidade assimétrica. A primeira solução após a função de rotação deu um valor de $10,64\sigma$, em contraste com o valor obtido de $4,36\sigma$ para a segunda solução. A melhor solução após a função de translação teve uma pontuação de

0,427 e um fator R de 0,569. O anelamento simulado com o CNS (BRÜNGER *et al.*, 1998) usando esta solução e seguindo um protocolo de resfriamento lento levou a uma estrutura com um fator R de 0,361 e um $R_{\text{livre}} = 0,396$.

4.7 Medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo

Para se obter informação sobre o tamanho, forma molecular e estado oligomérico da rPTP η DC em solução, nós submetemos a proteína a análise de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. A curva de espalhamento de raios-X de rPTP η DC está mostrada na Figura 22A.

A análise de Guinier, no intervalo de q^2 entre 0,08 a 0,24nm⁻², estimou para a rPTP η DC, de maneira reprodutiva, um raio de giro de 2,59nm. A linearidade do gráfico de Guinier indicou que a preparação de rPTP η DC estava monodispersa, Figura 22A, gráfico inserido. A função de distribuição de distância $p(r)$ foi obtida para os dados de espalhamento da rPTP η DC a partir da transformada de Fourier inversa, usando-se o programa GNOM (SVERGUN, 1992). A análise da função $p(r)$ levou a conclusão de que a proteína tem uma forma alongada com D_{max} de $8,50 \pm 1,00$ nm, Figura 22B. O valor de $2,65 \pm 0,02$ nm para o R_g calculado a partir da função de distribuição se encontra em boa concordância com o valor estimado derivado da análise de Guinier, Tabela 3. Para comparar a rPTP η DC com as estruturas cristalográficas já existentes, nós também computamos as curvas de espalhamento

teóricas e as funções de distribuição de distâncias para as estruturas cristalográficas diméricas da RPTP α -D1 e RPTP μ -D1 usando o programa CRY SOL (SVERGUN, D.I. *et al.*, 1995), Figuras 22A e 22B.

Figura 22. Curva de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. (A) Solução da curva de espalhamento experimental da rPTP η DC e resultados dos procedimentos de ajustes. As curvas de intensidade da rPTP η DC estão mostradas como logaritmo ($\log I$) versus o momento de transferência q escalonado. Inserido na figura encontra-se o gráfico de Guinier ($\log I$ vs. q^2) correspondente. A curva experimental (quadrados abertos) denota os dados de SAXS e as barras de erros indicam as incertezas padrão das medidas. A curva tracejada corresponde ao modelo produzido pelo DAMMIN (SVERGUN, 1999) que melhor se ajustou. A linha preta sólida é a intensidade de espalhamento teórica obtida para o modelo de homologia dimérico baseado na RPTP α -D1 (PDB código, 1YFO). A linha cinza sólida é a intensidade de espalhamento computada para o modelo de homologia dimérico baseado na estrutura cristalográfica da RPTP μ -D1 (PDB código, 1RPM). (B) Função de distribuição de distância da rPTP η DC. Os valores da $p(r)$ da rPTP η DC (quadrados abertos) computados a partir das curvas de espalhamento experimentais pelo programa que utiliza a transformada de Fourier indireta GNOM (SVERGUN, 1992). A dimensão máxima ($D_{\max}$) é igual a $8,50 \pm 1,00$ nm. A $p(r)$ derivada do modelo de homologia dimérico baseado na RPTP α -D1 está mostrada como uma linha preta sólida. A $p(r)$ derivada do modelo de homologia dimérico baseado na estrutura cristalográfica da RPTP μ -D1 está representada por uma linha sólida cinza.

Os raios de giro observados para a RPTP α -D1 e RPTP μ -D1 foram 2,72nm e 2,82nm, e o valores de $D_{\max}$ foram 9,95nm e 9,50nm, respectivamente. A comparação destas curvas de

SAXS simuladas com os dados experimentais da rPTP η DC revelaram valores de discrepância para RPTP α -D1 e RPTP μ -D1 de 1,47 e 2,22, respectivamente. Portanto, os resultados de SAXS revelaram que em solução nas concentrações por nós estudadas a rPTP η DC encontra-se como dímero com uma forma molecular mais próxima a encontrada para a RPTP α -D1, Figuras 22A, 22B e Tabela 3. O estado dimérico da rPTP η DC foi também verificado por eletroforese em gel nativo, Figura 23.

Figura 23. PhastGel gradiente de gel nativo 8-25%. Colunas 1-5 da rPTP η CD com concentrações de 0,5mg/mL, 0,7mg/mL, 1,0mg/mL, 3,0mg/mL, 5,0mg/mL respectivamente. As Bandas M corresponde ao estado monomérico e D ao estado dimérico da proteína.

4.8 Formas moleculares *ab initio* da rPTP η DC e seus modelos de alta resolução

As estruturas *ab initio* de baixa resolução da rPTP η DC foram obtidas dos dados de SAXS usando-se o programa DAMMIN (SVERGUN, 1999) sem nenhuma restrição de simetria, Tabela 3. Uma média de 10 modelos de “pseudo-átomos” gerados independentemente e produzidos pelo pacote DAMAVER ajustaram-se bem a curva experimental de espalhamento de raios-X, $\chi = 1,06$, Tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros estruturais.

rPTPηDC				
Parâmetro/amostra	Exp [*]	rPTPα	rPTPμ	DAM [¶]
$D_{\max}$ (nm)	$8,50 \pm 1,00$	9,95	9,5	8,72
R_g (nm)	$2,65 \pm 0,02$	2,72	2,82	3,35
Parâmetros livre	$8^{\perp}$	—	—	1926 [§]
Discrepância	—	1,47	2,22	1,06
Resolução (nm)	1,85 [¶]	—	—	1,85 [¶]

* Exp, calculado a partir dos dados experimentais.

¶ DAM, parâmetros dos modelos de “pseudo-átomos”, médias de 10 modelos.

[⊥] Número de canais de Shannon que é dado por $N_s = [D_{\max}(q_{\max} - q_{\min})]/\pi$.

[§] Simetria não imposta.

O dímero de baixa resolução da rPTPηDC apresentou uma forma alongada semelhante a forma de um charuto com uma razão aproximada de 3:1 entre sua dimensão mais longa e a mais curta, Figura 24. Sabendo que o arranjo dimérico é importante para a função da rPTPη, nós tentamos modelar a rPTPηDC usando como moldes os dímeros da RPTPα-D1 e RPTPμ-D1.

Os modelos por homologia do dímero da rPTPηDC baseados nos moldes das estruturas cristalográficas de RPTPα-D1 e RPTPμ-D1 foram automaticamente superpostos, como corpos rígidos, à estrutura *ab initio* de baixa resolução da proteína, Figuras 24A e 24B, usando-se o programa SUPCOMB (KOZIN; SVERGUN, 2001).

Figura 24. (A) Três vistas estéreo ortogonais da estrutura *ab initio* de baixa resolução da rPTPηDC superposta com o modelo por homologia dimérico da rPTPηDC baseado na estrutura cristalográfica da RPTPα-D1. (B) Três vistas estéreo ortogonais do modelo por homologia do provável dímero da rPTPηDC baseado na estrutura cristalográfica da RPTPμ-D1 superpostas ao envelope *ab initio* de baixa resolução da rPTPηDC. A figura foi construída usando-se o PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA; <http://www.pymol.org>).

Após o procedimento automático de alinhamento da melhor correlação entre eles, a análise visual indicou claramente que o tipo de dímero da RPTP α -D1, Figura 24A, ajusta-se melhor a estrutura de baixa resolução da rPTP η DC que o modelo por homologia baseado na RPTP μ -D1 (Figura 24B). Além do mais, o valor da discrepância espacialmente normalizada (NSD) foi de 0,823 para o caso o tipo de dímero da RPTP α -D1, enquanto que para o tipo de dímero da RPTP μ -D1 o valor da NSD foi de 0,993. Como podemos assumir similaridade estrutural entre modelos com valores de NSD < 1 (MORRIS *et al.*, 1992), estes resultados reforçam a idéia de que em solução a rPTP η DC forma dímeros cuja forma molecular assemelha-se ao arranjo dimérico revelado pela estrutura cristalográfica da RPTP α -D1.

Com o intuito de obter mais detalhes sobre o modo de dimerização da rPTP η DC, nós comparamos a composição da suposta seqüência de aminoácidos das interfaces dos dímeros dos dois modelos propostos com a interface de dimerização da RPTP α -D1 e RPTP μ -D1, Figura 25.

rPTP η	875	924
rPTP α -D1	WRKKRKDAKN NEVSFSQIKP KSKSLIRVEN FEAYFKKQQA DSNCGFAEEY	
rPTP μ -D1	.....SPSTN RKYPPLPVDK LEEEIINRMA DDNKLFRREEF	
rPTP η	925	973
rPTP α -D1	EDLKLIGISL PKYAAEIAEN RGKNRNNVL PYDISRVKLS .VQTHSTDDY	
rPTP μ -D1	NALPACPIQA TCEAASKEEN KEKNRVNITL PYDHSRVHLT PVEGVPSDSY	
rPTP η	974	1023
rPTP α -D1	INANYMPGYH SKKDFIATQG PLPNTLKDFW RMVWEKNVYA IVMLTKCVBO	
rPTP μ -D1	INGNYIDGYH RPNHYIATQG PMQETIYDFW RMVWHENTAS IIMVTNLVEV	
rPTP η	1024	1073
rPTP α -D1	GRITCEEYWP SKQAQDYGGI TVAMTSEVVL PEWTIRDSV KNMQSSESH	
rPTP μ -D1	KECACQYWP DQGCWTYGNV RVSVEDVTVL VDYTVRKFCI QQVGVDVNRK	
rPTP η	1074	1119
rPTP α -D1	...IQFHF TSNPDEGVPD TTDLLINFRY LVRDYMQIP PESPIIVHCS	
rPTP μ -D1	PQRLITQFHF TSNPDEGVPF TPIGMLKFLK KVKA..CNPQ YAGAIIVHCS	
rPTP η	1120	1169
rPTP α -D1	AGVGRGTGTFI AIDRLIYQIE NENTVDVYGI VYDLRMHRPL MDQTEDQYVF	
rPTP μ -D1	AGVGRGTGTFV VIDAMLDMMH SERKVDVYGF VSRIRAQRCQ MVQTEQYVF	
rPTP η	1170	1216
rPTP α -D1	LNQCVLDIIR AQKDSKVDLI YQNTTAMTIY ENLEPVSMTFG KTNGYIA	
rPTP μ -D1	IYQALLEHY. LYGDTELEVY .....L.....	

Figura 25. Alinhamento das seqüências da RPTP α -D1, RPTP μ -D1, e PTP η DC. A seqüência da PTP η DC corresponde ao domínio intracelular da proteína (resíduos W875–A1216). As seqüências das RPTP α -D1 e RPTP μ -D1 são das cadeias polipeptídicas estruturalmente definidas no PDBs 1YFO and 1RPM, respectivamente. Os resíduos encontrados na interface de dimerização estão coloridos em cinza para RPTP α -D1 e em preto para RPTP μ -D1. Os resíduos da interface de dimerização de PTP η DC estão marcados em cinza quando correspondem aos resíduos da interface de dimerização da RPTP α -D1; eles estão em preto quando são idênticos aos resíduos encontrados na interface de dimerização da RPTP μ -D1.

Embora a identidade sequencial total entre rPTP η DC e as duas outras fosfatases seja similar (43,21% para RPTP α -D1 e 45,16% para rPTP η DC), o mesmo não é verdade para as regiões de dimerização: 17 dos 30 resíduos (56,7%) na interface de dimerização da RPTP α -D1 estão conservados na rPTP η DC, enquanto que somente 5 dos 19 resíduos (26,3%) estão conservados na rPTP η DC na interface de dimerização da rPTP η DC, Figura 26.

Figura 26. Estrutura cristalográfica da RPTP α -D1 e RPTP μ -D1. As interfaces de dimerização das RPTP α -D1 e RPTP μ -D1 estão mostrada nesta figura como superfícies. (A) Os resíduos na RPTP α -D1 que estão conservados na rPTP η DC estão coloridos em preto; os não conservados estão mostrados em cinza. (B) A mesma molécula do painel (A) rotacionada de 180° ao longo do eixo vertical. (C) Os resíduos da RPTP μ -D1 que são conservados na rPTP η DC foram marcados em preto; os que não são conservados estão em cinza. (D) A mesma molécula do painel (C) rotacionada de 180° ao longo do eixo vertical. A figura foi preparada usando-se PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA; <http://www.pymol.org>).

Estes resultados fortalecem ainda mais a hipótese de que a dimerização da rPTP η deve ser similar a arquitetura de dimerização da RPTP α -D1, na qual o N-terminal do segmento hélice-volta-hélice de cada monômero que forma o dímero promove um bloqueio estérico do sítio ativo do monômero oposto.

4.9 Medidas de Anisotropia de fluorescência

Para se determinar a constante de equilíbrio de dissociação do dímero da rPTP η DC, nós marcamos a proteína recombinante com isotiocianato de fluoresceína (FITC), o qual reage com o terminal amino da proteína e o grupo ϵ -amino da lisina (MCKINNEY; THACKER; HEBERT, 1976). Os espectros de fluorescência de ambos tampão e rPTP η DC marcada com fluoresceína estão mostrados na Figura 27A. A rPTP η DC purificada marcada com fluoresceína (FITC- rPTP η DC) na concentração de 10nM mostrou um valor de anisotropia de cerca de 0,085 (Figura 26B), o qual é compatível com os valores de proteína ligada a fluoresceína. Porém, muito diferente dos valores típicos de anisotropia para a fluoresceína livre (na ordem de 0,014). O equilíbrio de 10nM FITC- rPTP η DC com quantidades crescentes de rPTP η DC não marcada (7,2nM – 36 μ M) levou a um aumento nos valores da anisotropia de fluorescência da fluoresceína, indicando multimerização (Figura 27B).

Figura 27. Anisotropia de fluorescência no equilíbrio. (A) Espectros de fluorescência do tampão e da rPTPηDC marcada com fluoresceína. (B) Medidas da reação dímero-monômero da rPTPηDC foram feitas como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados de três experimentos independentes estão mostrados como anisotropia não processada. Inseto - Fração de associação calculada a partir dos valores de anisotropia propriamente corrigidos com relação às mudanças na intensidade de fluorescência. Linha sólida corresponde ao melhor ajuste aos dados pela Equação 4, a qual gerou uma constante de dissociação de $21,6 \pm 2,0 \mu\text{M}$ ($r^2 = 0,988$).

Como nós sabemos pelos resultados de SAXS e estudos de eletroforese de gel nativo que a 50μM a rPTPηDC é dimérica, estes valores de anisotropia como função da concentração da rPTPηDC é um indicativo de um equilíbrio entre monômero-dímero. A constante de dissociação do dímero da rPTPηDC de $21,6 \pm 2,0 \mu\text{M}$ foi calculada ajustando-se a Equação 3 aos dados experimentais. Este K_d corresponde a um valor de energia livre de Gibbs de $\Delta G_{293}^{\circ} = 7,2 \text{ kcal/mol}$. Baseado nas avaliações teóricas é esperado que a dissociação da proteína (de 10% a 90%) deverá ocorrer no intervalo de 2,86 unidades log (XU; WEBER, 1982; WEBER, 1992). Nossos dados experimentais demonstraram que a dissociação do dímero da rPTPηDC apresenta um intervalo de unidades log curto de 1,5. Um comportamento

similar que leva a um intervalo reduzido das isotermas de dimerização já tem sido observado para outras proteínas, tais como malato desidrogenase (SHORE; CHAKRABARTI, 1976) enolase de levedura (XU; WEBER, 1982), repressor arc (SILVA *et al.*, 1992) e O2bZIP (MOREAU *et al.*, 2004), só para citar algumas. O desvio esperado da largura das isotermas de dimerização tem sido atribuído a alterações conformacionais da proteína, i.e. mudanças nas interações quaternárias afetando a estrutura e a conformação de cada subunidade durante o processo de dimerização (WEBER, 1992). Portanto, isto sugere que as subunidades das espécies monoméricas e diméricas da rPTP η DC são conformacionalmente diferentes.

Um certo número de proteínas tirosina fosfatases (RPTPs), bem como de proteínas tirosina quinases (RPTKs) do tipo receptores, são conhecidas por funcionarem como dímeros transmembranares, o que leva a se pensar que de maneira geral a dimerização destas proteínas pode ser um fenômeno comum para as RPTPs (JIANG *et al.*, 1999; JIANG; DEN HERTOOG; HUNTER, 2000; STOKER, 2005). Embora, a interação dimérica vista para a rPTP η DC é de cerca de 21,6 μ M, é esperado que esta afinidade aumente substancialmente para o receptor completo presente na membrana plasmática da célula. Na verdade, ambas a concentração e afinidade do monômero-monômero podem ser significativamente mais altas para o dímero funcional da rPTP η DC ligado a membrana celular. Sob estas condições dois domínios extracelulares da rPTP η , cada um formado por oito motivos de fibronectina do tipo 3, também contribuem para a formação do dímero da rPTP η . A ancoragem a membrana, a qual

restringe ambos os movimentos de: translação na direção perpendicular a superfície da membrana como sua liberdade de rotação em volta do eixo dentro do plano da membrana, levam ainda mais ao aumento da afinidade de associação do dímero da rPTP η . No caso de moléculas com difusão em duas dimensões, tem sido argumentado que as afinidades de ligação são significativamente maiores (ordens de magnitude) que as observadas em solução (GRASBERGER *et al.*, 1986; FAN; HENDRICKSON, 2005). Portanto, é esperado que a afinidade de associação dos dímeros esteja substancialmente aumentada, e a constante de dissociação de equilíbrio significativamente diminuída, quando a proteína rPTP η completa esteja ancorada na membrana.

CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES

Gratidão com amor não apenas aquece quem
recebe, como reconforta quem oferece.

5.1 Conclusões

A proteína tirosina fosfatase compreende uma família diversa de enzimas que elucidam, em diferentes tipos celulares, uma plethora de efeitos biológicos fundamentais tais como: expressão gênica, divisão celular e diferenciação, e transformações neoplásicas (BISHOP, 1991). A expressão de PTPs tem sido observada em várias áreas do sistema nervoso e células não neurais, onde suas funções permanecem largamente desconhecidas (HYNES; LANDER, 1992; KALNAY *et al.*, 1993; GEBBINK *et al.*, 1993; SAP *et al.*, 1994; SAHIN; DOWLING; HOCKFIELD, 1995; SHOCK *et al.*, 1995). Entretanto, publicações anteriores mostraram que a expressão gênica da rPTP η em linhagens de células tireoidianas transformadas com oncogenes inibe o processo de formação de tumor (MARTELLI *et al.*, 1998), enquanto que mutações nos homólogos humanos e de camundongo (HPTP η /Ptp η) estão relacionadas com a susceptibilidade no desenvolvimento de cânceres de cólon, pulmão, e mama (RUIVENKAMP *et al.*, 2002). Portanto, com o intuito de melhor entender o mecanismo de regulação desta proteína iniciamos este estudo estabelecendo protocolos de expressão heteróloga e purificação do domínio catalítico da rPTP η , bem como a sua caracterização por: SDS-PAGE, eletroforese de gel nativo, cromatografia analítica de gel filtração, e técnicas de dicroísmo circular no UV-distante e fluorescência intrínseca. Além disso, a atividade enzimática do rPTP η DC também foi testada. Os resultados obtidos em

conjunto nos permitiu concluir que o domínio catalítico da rPTP η recombinante purificado se encontrava propriamente enovelado, totalmente ativo, e em condição de ser submetido a estudos estruturais e funcionais.

Portanto, na segunda parte deste trabalho nós nos dedicamos ao estudo estrutural do rPTP η DC recombinante através de ensaios de cristalização com a finalidade de avaliar a conservação da sua estrutura terciária e a presença ou não de uma estrutura quaternária. Pois, os domínios catalíticos de todas as RPTPs cristalizadas até o momento apresentaram uma arquitetura globular que consiste de oito fitas retorcidas de folhas β flanqueadas por quatro α -hélices de um lado e uma outra do lado oposto (STUCKEY *et al.*, 1994; JIA *et al.*, 1995; BARFORD *et al.*, 1998), com o motivo conservado das RPTPs localizado no fundo da fenda do sítio catalítico. Para isso, cristais do rPTP η DC foram obtido nas condições de 20% PEG 10000; 0,1M MES pH 6,5, pelo método de difusão de vapor de gotas suspensas. Um dos cristais que difratou na resolução de 1,87Å pertencia ao grupo espacial P2₁2₁2₁, com parâmetro de célula unitária de a = 46,46, b = 63,07, c = 111,64Å, e apresentava uma única molécula por unidade assimétrica. Entretanto, a resolução da estrutura terciária e a visualização ou não de dímeros cristalográficos ainda estão na dependência do refinamento completo dos dados obtidos para o rPTP η DC que está sendo feito pelo aluno de doutorado Alessandro S. Nascimento.

Já que um dos objetivos deste trabalho era verificar se o domínio catalítico da rPTP η é

capaz de formar dímeros e como a estrutura cristalográfica representa somente conformações seletivas de uma molécula, optamos em estudar também o domínio catalítico da rPTP η em solução. Para isso, usamos a técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo seguida de modelagem por homologia e anisotropia de fluorescência, pois, no caso das PTKs, já está bem estabelecido que a dimerização atua como um mecanismo regulador de atividade, entretanto, para as PTPs a questão ainda se encontra em aberto.

Estudos funcionais com a RPTP α nativa e mutantes expressos em células embrionárias RPTP α Null de camundongos sugerem que a dimerização pode inibir a atividade da molécula completa da RPTP α de maneira estereoquímica e consistente com as estruturas cristalográficas previamente descritas (JIANG *et al.*, 1999). Similarmente, foi mostrado que a PTP Sap-1 completa se apresenta nas células como homodímeros estáveis que quando expostos a um ambiente redutor reversivelmente se desfazem aumentando sua atividade catalítica (VAN DER WIJK *et al.*, 2003; WALCHLI *et al.*, 2005). A regulação das PTPs por dimerização vem tendo suporte também em estudos realizados com RPTP μ cujo domínio MAM extracelular parece ter como papel principal promover a dimerização lateral da RPTP μ na superfície da célula com conseqüente envolvimento no mecanismo de transdução de sinal (CISMASIU *et al.*, 2004); e em dados obtidos por modelagem do domínio D1 da CD45, o qual foi modelado com base na estrutura cristalográfica da RPTP α , mostrando que termodinamicamente é possível para o CD45-D1 formar um dímero inibidor similar ao da

RPTP α . Neste trabalho, fomos capazes de prover a primeira estrutura *ab initio* de baixa resolução para a rPTP η DC em solução obtida a 1,85nm de resolução, a partir de dados de espalhamento de raios-X a baixo ângulo coletados em síncrotron. Os resultados de SAXS juntamente com os de anisotropia de fluorescência mostraram que a forma dimérica do rPTP η DC é a espécie predominante em solução, com um $K_{d_{\text{monômero-dímero}}}$ de $21,6\mu\text{M} \pm 2,0\mu\text{M}$ e um $\Delta G_{293\text{K}}$ correspondente a 7,2kcal/mol. Entretanto, acreditamos que a afinidade entre os monômeros que formam o dímero funcional da rPTP η completa pode ser significativamente mais alta quando a proteína estiver ligada a membrana, pois sob estas condições dois domínios extracelulares da rPTP η , cada um formado por oito motivos de fibronectina do tipo 3, também contribuem para a formação do dímero da rPTP η nativa, bem como a ancoragem a membrana, a qual restringe ambos os movimentos de translação e rotação da proteína podem levar ainda mais ao aumento da afinidade de associação do dímero da rPTP η .

Uma vez observado que sob condições experimentais o rPTP η DC em solução encontrava-se principalmente na forma de dímeros, partimos para verificar a que estrutura quaternária este dímero se assemelhava mais: se ao dímero cristalográfico da RPTP α -D1 ou se ao da RPTP μ -D1. Os resultados do modelo *ab initio* construído a partir do SAXS, juntamente com a modelagem por homologia e os dados da análise da sequência da suposta interface de dimerização do rPTP η DC, todos mostraram que a arquitetura dimérica da rPTP η se encontra mais próxima a da RPTP α -D1. Embora estes resultados não nos deram uma

resposta definitiva sobre o possível mecanismo de regulação da rPTP η , os dados obtidos neste trabalho já proporcionaram um avanço grande no entendimento de sua estrutura quaternária; levando-nos a especular se a dimerização da rPTP η DC pode está envolvida na auto-inibição de sua atividade enzimática e se o mecanismo auto-inibidor poderia ocorrer através da interação da região angular NH₂-terminal-sítio ativo como proposto para a RPTP α -D1. A resposta para estas perguntas virão provavelmente dos resultados provenientes da resolução da estrutura cristalográfica da rPTP η , e de estudos funcionais *in vivo* e *in vitro*.

REFERÊNCIAS

Sonho que se sonha só é apenas um sonho,
mas o sonho que se sonha junto é realidade...

Referências

- ALONSO, A. et al. Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell*, v.117, n.6, p.699–711, 2004.
- ANDERSEN, J.N. et al. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J.*, v.18, n.1, p.8–13, 2004.
- ANDRADE, M.A. et al. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network, *Protein Eng.*, v.6, n.4, p.383–390, 1993.
- BARFORD D.; FLINT A.J.; TONKS N.K. Crystal structure of human proteintyrosine phosphatase 1B. *Science*, v.263, n. 5152, p.1397 – 1404, 1994.
- BARFORD, D.; DAS, A.K.; EGLOFF, M.P. The Structure and Mechanism of Protein Phosphatases: Insights into Catalysis and Regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v.27, p.133–164, 1998. DOI:10.1146/annurev.biophys.27.1.133.
- BERLINGIERI, M. T. et al.Cooperation between the polyomavirus middle-T-antigen gene and the human *c-myc* oncogene in a rat thyroid epithelial differentiated cell line: model of *in vitro* progression. *Mol. Cell. Biol.*, v.8, n. 5, p.2261-2266, 1988.
- BILWES, A.M. et al. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature*, v.382, n.6591, p.555-559, 1996. DOI:10.1038/382555a0
- BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, v.64, n. 2, p.235–248, 1991. DOI:10.1016/0092-8674(91)90636-D
- BOWIE, J.U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, v.253, n. 5016, p.164-170, 1991. DOI: 10.1126/science.1853201
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p. 248-254, 1976.

BRADY-KALNAY, S.M.; FLINT, A.J.; TONKS, N.K. Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell–cell aggregation. *J. Cell Biol.*, v.122, n 4, p.961–972, 1993.

BRAGA-BRASARIA, M.; RINGEL, M. D. Clinical review 158: Beyond radioiodine - a review of potential new therapeutic approaches for thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, v. 88, n. 5, p. 1947-1960. 2003.

BRÜNGER, A. T. et al. Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Cryst. D*, v.54, part 5, p. 905-921, 1998. DOI:10.1107/S0907444998003254

CIRRI, P. et al. The role of Cys12, Cys17 and Arg18 in the catalytic mechanism of low-M(r) cytosolic phosphotyrosine protein phosphatase. *Eur. J. Biochem.*, v.214, n. 3, p.647-657, 1993. DOI:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17965.x

CISMASIU, V.B. et al. The MAM (Meprin/A5-protein/PTPmu) domain is a homophilic binding site promoting the lateral dimerization of receptor-like protein-tyrosine phosphatase micro. *J. Biol. Chem.*, v.279, n 26, p.26922–26931, 2004.

COELI, M. et al. Incidência e mortalidade por câncer de tireóide no Brasil. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 49, n. 4, p 503-508, 2005.

DEN HERTOOG, J. *et al.* Receptor protein tyrosine phosphatase α activates pp60c-src and is involved in neuronal differentiation. *EMBO J.*, v.12, n 10, p.3789–3798, 1993.

DENU, J.M. et al. The catalytic role of aspartic acid-92 in a human dual-specific protein-tyrosine-phosphatase. *Biochemistry*, v.34, n 10, p.3396-3403, 1995.

DESAI, D.M. et al.. Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell*, v. 73, n. 3, p. 541 – 554, 1993. DOI:10.1016/0092-8674(93)90141-C

DEVLIN, T.M. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. 6ª ed. São Paulo, Editora Edgar Blücher Ltda, 2004.

DUMONT, J. E. et al. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol. Rev.*, v.72, n. 3, p.667–697, 1992.

EVANS, P.R. "Data reduction". In: Proceedings of CCP4 Study Weekend, on Data Collection & Processing, 29-20 Jan. 1993. p114-122. Disponível em: <www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=WO2005024013&DISPLAY=DESC>. Acesso em: 17/06/2007.

FAN, Q. R.; HENDRICKSON, W. A. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, v.433, n. 7023, p.269–277, 2005. DOI: 10.1038/nature03206.

FAUMAN, E.B.; SAPER, M.A. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *TIBS*, v.21, n. 11, p.413-417, 1996. DOI:10.1016/S0968-0004(96)10059-1

FELBERG, J.; JOHNSON, P. Characterization of recombinant CD45 cytoplasmic domain proteins. Evidence for intramolecular and intermolecular interactions. *J. Biol. Chem.*, v.273, n 28, p.17839–17845, 1998.

FISCHER, E.H.; CHARBONNEAU, H.; TONKS, N.K.. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science*, v.253, n. 5018, p.401-406, 1991. DOI: 10.1126/science.1650499.

FLORIO, T. et al.. The Activation of the phosphotyrosine phosphatase η (r-PTP η) is responsible for the somatostatin inhibition of PC Cl3 thyroid cell proliferation. *Mol. Endocrinol.*, v.15, n 10, p.1838–1852, 2001.

FUSCO, A. et al. A *mos* oncogene-containing retrovirus, myeloproliferative sarcoma virus, transforms rat thyroid epithelial cells and irreversibly blocks their differentiation pattern. *J. Virol.*, v.56, n 1, p.284–292, 1985.

FUSCO, A. et al. One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol. Cell. Biol.*, v.7, n. 9, p.3365–3370, 1987.

GASTEIGER, E. et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and Analysis. *Nucleic Acids Res.*, v.31, n. 13, p.3784–3788, 2003.

GEBBINK, M.F.B.G. et al. Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett.*, v.290, n. 1-2, p.123-130, 1991. DOI:10.1016/0014-5793(91)81241-Y.

GEBBINK, M.F.B.G. et al. Purification and characterization of the cytoplasmic domain of the human receptor-like protein tyrosine phosphatase rPTP μ . *Biochemistry*, v.32, n. 49, p.13516–13522, 1993. DOI:10.1021/bi00212a017.

GEBBINK, M.F.B.G. et al. Homophilic interactions mediated by receptor tyrosine phosphatases I and J. *J. Biol. Chem.*, v.268, n. 22, p.16101–16104, 1993.

GRASBERGER, B. et al. Interaction between proteins localized in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.83, n. 17, p.6258–6262, 1986.

GUAN, K.-L.; DIXON, J.E. Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J. Biol. Chem.*, v.266, n. 26, p.17026-17030, 1991.

GUINIER, A.; FOURNET, G. *Small-angle Scattering of X-rays*. New York: John Wiley & Sons, 1995.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11ªed. São Paulo: Editora Elsevier, 2006.

HANKS, S. K.; QUINN, A.M.; HUNTER T. The protean kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, v. 241, n. 4861, p. 42-52. 1988. DOI:10.1126/science.3291115.

HOFFMANN, K.M.V.; TONKS, N.K.; BARFORD, D. The crystal structure of domain 1 of receptor protein-tyrosine phosphatase μ . *J. Biol. Chem.*, v.272, n 44 p.27505–27508, 1997.

HONDA, H. et al. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a novel protein-tyrosine phosphatase, HPTP eta. *Blood*. v.84, n. 12, p.4186-4194, 1994.

HOOFT, R.W.W. et al. Errors in protein structures. *Nature*, v.381, n. 6580, p.272-272, 1996.

<http://www.indatir.org.br/index.html>. Acesso em: 22/12/2008

<http://www.scielo.br/img/revistas/abem/v48n1/19525f1.gif>. Acesso em: 26/12/2008.

HUNTER T. Protein tyrosine phosphatases: the other side of the coin. *Cell*, v.58, n. 6, p.1013-1016, 1989. DOI:10.1016/0092-8674(89)90496-0.

HYNES, R.O.; LANDER, A.D.. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*, v.68, n. 2, p.303–322, 1992. DOI:10.1016/0092-8674(92)90472-0

IULIANO, R. et al. The tyrosine phosphatase PTPRJ/DEP-1 genotype affets thyroid carcinogenesis. *Oncogene*, v.23, n. 52, p.8432-8438, 2004.

JIA Z. et al. Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*, v.268, n. 5218, p.1754–1758, 1985. DOI: 10.1126/science.7540771.

JIANG, G. et al. Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase- α . *Nature*, v.401, n.6753, p.606-610, 1999. DOI:10.1038/44170.

JIANG, G.; DEN HERTOOG, J.; HUNTER, T. Receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha homodimerizes on the cell surface. *Mol. Cell. Biol.*, v.20, n 16, p.5917–5929, 2000.

JOHNSON, K.G.; VAN VACTOR, D. Receptor Protein Tyrosine Phosphatases in Nervous System Development. *Physiol. Ver*, v.83, n.1, p.1–24, 2003. DOI: 10.1152/physrev.00016.2002, 0031-9333/03.

KAPLAN, R. et al. Cloning of three human tyrosine phosphatase reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.87, n. 18, p.7000-7004, 1990.

KEANE, M.M., et al. The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer Res.*, v.56, n. 18, p. 4236-4243, 1996.

KELLERMANN, G. et al. The small-Angle X-ray scattering beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory. *J. Appl. Crystallog.*, v.30, part 5, n.2, p.880-883, 1997. DOI:10.1107/S0021889897001829.

KOLMODIN, K.; AQVIST, J. Computational modeling of the rate limiting step in low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett.*, v.456, n. 2, p.301-305, 1999. DOI:10.1016/S0014-5793(99)00974-6.

KOLMODIN, K.; AQVIST, J. The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited. *FEBS Lett.*, v.498, n. 2-3, p.208-213, 2001. DOI:10.1016/S0014-5793(01)02479-6.

KOVALENKO, M. et al.. Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J. Biol. Chem.*, v.275, n. 21, p.16219–16226, 2000.

KOZIN, M. B.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J. Appl. Crystallogr.*, v.34, part 1, p.33–41, 2001. DOI: 10.1107/S0021889800014126.

KRUEGER, N.X.; STREULI, M.; SAITO, H. Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatase. *EMBO J.*, v.9, n. 10, p.3241-3252, 1990.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n 5259, p.680–685, 1970.

LAFORGIA, S. et al. Receptor protein tyrosine phosphatase γ is a candidate tumor suppressor gene at human chromosome region 3p21. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v.88, n. 11, p.5036-5040, 1991.

LASKOWSKI, R.A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, v.26, part 2, p.283-291, 1993. DOI:10.1107/S0021889892009944.

LESLIE, A. G. W. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Jnt. CCP4/ESF-EACBM Newsl Protein Crystallogr.* n. 26, 1992. Disponível em: <www.ccp4.ac.uk/manual.ps>. Acesso em: 19/06/2007.

LIM, K.L. et al. Kinetic analysis of two closely related receptor-like protein-tyrosine phosphatases, PTP α and PTP ϵ . *Eur. J. Biochem.*, v.245, n. 3, p.693–700, 1997.

LIMA, L.M.T.R.; SILVA, J. L. Positive contribution of hydration on DNA binding by E2c protein from papillomavirus. *J. Biol. Chem.*, v.279, n 46, p.47968–47974, 2004.

LOBLEY, A.; WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics*, v.18, n. 1, p-211–212, 2002. DOI:10.1093/bioinformatics/18.1.211.

LOHSE, D.L. et al. Roles of aspartic acid-181 and serine-222 in intermediate formation and hydrolysis of the mammalian protein-tyrosine-phosphatase PTP1. *Biochemistry*. v.36, n. 15, p.4568-6575, 1997. DOI:10.1021/bi963094r.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with threedimensional profiles. *Nature*, v.356, n. 6364, p.83-85, 1992.

MAJETI, R.; WEISS, A. Regulatory Mechanisms for Receptor Protein Tyrosine Phosphatases. *Chem. Rev.*, v.101, n 8, p.2441-2448, 2001.

MALENCIK, D.A.; ANDERSON, S.R. Peptide binding by calmodulin and its proteolytic fragments and by troponin C. *Biochemistry*, v.23, n. 11, p.2420-2428, 1984. DOI:10.1021/bi00306a016.

MARTELLI, M.L. et al. Protein tyrosine phosphatase- η expression is upregulated by the PKA-dependent and is downregulated by the PKC dependent pathways in thyroid cells. *Exp. Cell Res.*, v.245, n. EX984257, p.195-202, 1998.

MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, v.33, n. 2, p.491-497, 1968.

MCGUFFIN, L.J.; BRYSON, K.; JONES, D.T. The PSIPRED protein structure prediction Server. *Bioinformatics*, v.16, n. 4, p. 404–405, 2000. DOI:10.1093/bioinformatics/16.4.404.

MCKINNEY, R.; THACKER, L.; HEBERT, G. A. Conjugation methods in immunofluorescence. *J. Dent. Res.*, v.55, p. A38–A44, 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/54374>>. Acesso em: 10/06/2007.

MOREAU, V. H. et al. The bZIP region of the plant transcription factor opaque-2 forms stable homodimers in solution and retains its helical structure upon subunit dissociation. *Biochemistry*, v.43, n. 16, p.4862–4868, 2004. DOI: 10.1021/bi035905e.

MORRIS, A.L. et al. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, v.12, n. 4, p.345-364, 1992.

NAM, H.J. et al. Crystal structure of the tandem phosphatase domains of RPTP LAR. *Cell*, v.97, n. 4, p.449–457, 1999. DOI:10.1016/S0092-8674(00)80755-2.

NICOLSON, G.L. Cancer metastasis. *Sci. Amer.*, v. 240, n. 3, p. 66-76, 1979.

OKAZAKI, K.; SAGATO N. MAP kinase activation is essential for oncogenic transformation of NIH3T3 cells by Mos. *EMBO J.*, v.14, n. 20, p.5048–5059, 1995.

OSTMAN, A.; YANG, Q.; TONKS, N.K. Expression of DEP-1, a receptor-like proteintyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.91, n.21, p.9680-9684, 1994.

PACE, C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, v.4, n. 11, p.2411-2423, 1995.

PALKA, H.L.; PARK, M.; TONKS, N.K. Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J. Biol. Chem.*, v.278, n. 8, p.5728–5735, 2003.

PANNIFER, A.D.B. et al. Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography. *J. Biol. Chem.*, v.273, n. 17, 10454-10462, 1998.

POLIKARPOV, I., TEPLYAKOV, A., OLIVA, G. The ultimate wavelength for protein crystallography? *Acta Crystallogr D: biol. crystallogr.*, v.53, part 6, p.734-737, 1997. DOI:10.1107/S0907444997007233.

PONNIAH, S. et al. Targeted disruption of the tyrosine phosphatase PTP α leads to constitutive downregulation of the kinases Src and Fyn. *Curr. Biol.*, v.9, n. 10, p.535–538, 1999.

POROD, G. In: GLATTER, O.; KRATKY, O., eds. *Small-angle X-ray Scattering*. London: Academic Press, p.17-51, 1982.

POSTE, G.; FILDER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, v. 283, n. 5743, p.139-146, 1980. DOI:10.1038/283139a0.

POT, D. A.; DIXON, J. E. A thousand and two protein tyrosine phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1136, n. 1, p. 35-43, 1992.

RAGHAVA, G.P.S. Protein secondary structure prediction using nearest neighbor and neural network approach, *CASP4*, p.75–76, 2000. Disponível em: <<http://predictioncenter.org/casp4>>. Acesso em:15/05/2006.

ROGNONI, J. B.; PENEL, C.; DUCRET, F. Vascularization and iodide transport down regulation in rat goitre. *Acta Endocr.*, v.105, n. 1, p. 40–48, 1984.

RUIVENKAMP, C.A.L. et al. *Ptprj* is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus *Sccl* and is frequently deleted in human cancers. *Nat. Genet.*, v.31, p.295–300, 2002. DOI:10.1038/ng903.

RUIVENKAMP, C.A.L. et al. Five new mouse susceptibility to colon cancer loci, *Sccl1–Sccl5*. *Oncogene*, v.22, n.46, p.3472–3474, 2003. DOI:10.1038/sj.onc.1207096.

SAHIN, M.; DOWLING, J.J.; HOCKFIELD, S. Seven protein tyrosine phosphatases are differentially expressed in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.*, v.351, n. 4, p.617–631, 1995.

SAITO, H.; STREULI, M. Molecular characterization of protein tyrosine phosphatases. *Cell Growth Different.*, v. 2, n. 1, p. 59-65, 1991.

SAITO, H. Structural diversity of eukaryotic protein tyrosine phosphatases: functional and evolutionary implications. *Semin. Cell Biol.*, v.4, n. 6, p.379–387, 1993.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, v.234, n. 3, p.779-815, 1993.

SAP, J. et al. Cloning and Expression of a widely expressed receptor tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.87, n. 16, p.6112-6116, 1990.

SAP, J. et al. Receptor tyrosine phosphatase RPTP kappa mediates homophilic binding. *Mol. Cell. Biol.*, v.14, n. 1, p.1-9, 1994.

SCHLESSINGER, J.; ULLRICH, A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* ., v.9, n. 3, p.383-391, 1992.

SHOCK, L.P., et al. Protein tyrosine phosphatases expressed in developing brain and retinal Müllerglia. *Mol. Brain Res.*, v.28, n. 3, p.110-116, 1995.

SHORE, J. D.; CHAKRABARTI, S. K. Subunit dissociation of mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochemistry*, v.15, n. 4, p.875-879, 1976. DOI: 10.1021/bi00649a023.

SILVA, J. L. et al. Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer: effects of pressure and dilution on the association equilibrium of arc repressor. *J. Mol. Biol.*, v.223, n. 2, p.545-555, 1992.

SREEREMA, N.; VENYAMINOV, S.Y.; WOODY, R.W. Estimation of the number of helical and strand segments in proteins using CD spectroscopy. *Protein Sci.*, v. 8, n. 2, p.370-380, 1999.

STOKER, A. W. Protein tyrosine phosphatases and signaling. *J. Endo.* v.185, n.1, p.19-33, 2005. DOI:10.1677/joe.1.06069.

STUCKEY J.A., et al. Crystal structure of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase at 2.5°A and the complex with tungstate. *Nature*, v.370, n. 6490, p.571-575, 1994. DOI:10.1038/370571a0.

SU, J.; MURANJAN, M.; SAP, J. Receptor protein tyrosine phosphatase α activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts. *Curr. Biol.*, v.9, n. 10, p.505-511, 1999.

SVERGUN, D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallog.*, v.25, part 4, p.495-503, 1992. DOI:10.1107/S0021889892001663.

SVERGUN, D.I.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. CRY SOL – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Cryst.*, v.28, part 6, p.768-77, 1995. DOI:10.1107/S0021889895007047.

SVERGUN, D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.*, v.76, n. 6, p.2879-2886, 1999.

SVERGUN, D.I.; KOCH, M.H. Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.12, n. 12, p.654-660, 2002.

TADDEI, N. et al. Aspartic-129 is an essential residue in the catalytic mechanism of the low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase. *FEBS Lett.*, v.350, n. 2-3, p.328-332, 1994. DOI:10.1016/0014-5793(94)00805-1.

TAKEDA, A.; WU, J.J.; MAIZEL, A.L. Evidence for monomeric and dimeric forms of CD45 associated with a 30-kDa phosphorylated protein. *J. Biol. Chem.*, v.267, n. 23, p.16651-16659, 1992.

TEPLYAKOV, A.; OLIVA, G.; POLIKARPOV, I. On the choice of an optimal wavelength in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D: biol. crystallogr.*, v.54, part 4, p.610-614, 1998. DOI:10.1107/S0907444997020295.

THOMAS, M.L. et al. Evidence from cDNA clones that the rat leukocyte-common antigen (T200) spans the lipid bilayer and contains a cytoplasmic domain of 80,000 Mr. *Cell*, v.41, n.1, p. 83-93, 1985. DOI:10.1016/0092-8674(85)90063-7.

THOMAS, M. et al. Structural studies of T200 glycoprotein and the IL-2 receptor. *J. Recept. Res.*, v.7, n. 1-4, p.133-155, 1987.

TONKS, N.K. et al. Demonstration That the Leukocyte Common Antigen CD45 Is a Protein Tyrosine Phosphatase. *Biochemistry*, v.27, n. 24, p.8695-8701, 1988.

TRAPASSO, F. et al. The v-erbA oncogene selectively inhibits iodide uptake in rat thyroid cells. *Oncogene*, v.12, n. 9, p.1879–1888, 1996.

TRAPASSO, F. et al. Rat protein tyrosine phosphatase η suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27^{Kip1}. *Mol. and Cel. Biol.*, v.20, n. 24, p.9236–9246, 2000.

ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.*, v. 61, n. 2, p. 203-212, 1990. DOI:10.1016/0092-8674(90)90801-K.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. *MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst.*, v.30, part 6, p.1022-1025, 1997. DOI:10.1107/S0021889897006766.

VAN DER WIJK, T. et al. Redox-regulated rotational coupling of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha dimers. *J. Biol. Chem.*, v.278, n 16, p.13968–13974, 2003. DOI:10.1074/jbc.M300632200.

VAN HUIJSDUIJNEN, R. H. Protein tyrosine phosphatases: counting the trees in the forest. *Gene*, v.225, n. 1-2, p.1–8, 1998. DOI:10.1016/S0378-1119(98)00513-7.

VAN STOKKUM, I.H.M. et al. Estimation of protein secondary structure and error analysis from CD spectra, *Anal. Biochem.*, v.191, n. 1, p. 110–118, 1999. DOI:10.1016/0003-2697(90)90396-Q.

VOGELSTEIN, B. KINZLER, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, v.9, n. 4, p.138-141, 1993.

XU, G.-J.; WEBER, G. Dynamics and time-averaged chemical potential of proteins: importance in oligomer association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.79, n. 17, p.5268–5271, 1982.

XU, Z.; WEISS, A. Negative Regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat. Immunol.*, v.3, p.764-771, 2002. DOI: 10.1038/ni822. Disponível em: <<http://www.nature.com/ni/journal/v3/n8/full/ni822.html>>. Acesso em: 05/05/2006.

WALCHLI, S.; ESPANEL, X.; VAN HUIJSDUIJNEN, R.H. Sap-1/PTPRH activity is regulated by reversible dimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.331, n. 2, p.497-502, 2005. DOI:10.1016/j.bbrc.2005.03.196.

WEBER, G. *Protein Interactions*. New York: Chapman and Hall, cap. 14, 1992.

WEINBERG, R. A. Oncogenes, anticogenes and the molecular basis of multistepcarcinogenese. *Cancer Res.*, v. 49, n. 14, p.3713- 3721, 1989.

WEISS, A.; SCHLESSINGER, J. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, v.94, n. 3, p.277-280, 1998. DOI:10.1016/S0092-8674(00)81469-5.

WU, L.; ZHANG, Z.Y. Probing the function of Asp128 in the lower molecular weight protein-tyrosine phosphatase-catalyzed reaction. A pre-steady-state and steady-state kinetic investigation. *Biochemistry*, v.35, part 2, p.5426-5434, 1996. DOI: 10.1042/BJ20030565.

ZHANG, Z.-Y.; WANG, Y.; DIXON, J.E. Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.91, n. 5, p.1624-1627, 1994.

ZHANG, L. et al. Thyroid cell transformation inhibits the expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase. *Experimental Cell Research*, v.235, n. 1, p.62–70, 1997.

ZHAO, Y. et al. Altering the nucleophile specificity of a protein-tyrosine phosphatase-catalyzed reaction. Probing the function of the invariant glutamine residues. *J. Biol. Chem.*, v.273, n. 10, p.5484-5492, 1998.

ZHENG, X. M.; WANG, Y.; PALLEN, C. J. Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature*, v.359, n. 6393, p.336-339,1992. DOI:10.1038/359336a0.

ANEXOS

"A igualdade não é fácil, mas a superioridade é dolorosa."

Provérbio Africano

ANEXO A

SANTOS, M. A. M. ; SANTOS, S. M. ; MATOZO, H. C. ; PORTUGAL, R. V. ; IULIANO, R. ; FUSCO, A. ; POLIKARPOV, I. . Expression, purification and characterization of rat protein tyrosine phosphatase eta catalytic domain. Protein Expression and Purification, v. 41, n. 1, p. 113-120 , 2005. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.018

Available online at www.sciencedirect.com

Protein Expression and Purification 41 (2005) 113–120

Protein
Expression
& Purificationwww.elsevier.com/locate/yprep

Expression, purification, and characterization of rat protein tyrosine phosphatase η catalytic domain

Maria A.M. Santos^a, Silvia M. Santos^a, Huita C. Matozo^a, Rodrigo V. Portugal^a,
Rodolfo Iuliano^b, Alfredo Fusco^c, Igor Polikarpov^{a,*}

^a Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Física e Informática, Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador São Carleense, 400, CEP 13566-590 São Carlos, SP, Brazil

^b Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Catanzaro, 88100 Catanzaro, Italy

^c Centro di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale del Consiglio Nazionale delle Ricerche c/o Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II," 80131 Napoli, Italy

Received 3 November 2004, and in revised form 23 January 2005

Abstract

Receptor-like protein tyrosine phosphatases generally contain one or two conserved intracellular catalytic domains with a conserved sequence motif ([I/V]HCXAGXXR[S/T]G), a single transmembrane domain, and an external highly variable part. Here, we describe cloning of the intracellular catalytic domain of the rat protein tyrosine phosphatase η (rPTP η CD) into pET28a(+) vector, its expression in *Escherichia coli*, purification and initial characterization. The purification of His₆-tagged rPTP η CD to near homogeneity was achieved by a combination of affinity and size exclusion chromatography. The His-tag was subsequently removed by thrombin digestion. PhastGel IEF electrophoresis demonstrated that the isoelectric point of this 41 kDa His₆-tag free recombinant protein was 7.3, which is just slightly higher than the theoretically predicted value of 7.2. To assess the functionality of the rPTP η CD we used the pNPP hydrolysis assay and observed that the enzyme has a specific activity of 9 nmol/min/ μ g. The secondary structure and stability of the recombinant protein was also analyzed by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. In summary, the rPTP η CD is stable at 18 °C, properly folded, and fully active, which makes it a suitable candidate for structural and functional studies.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Rat protein tyrosine phosphatases η ; Intracellular catalytic domain; *E. coli* expression; pNPP hydrolysis assay; Fluorescence; Circular dichroism

The balance between protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine phosphatases (PTPs) activities regulates the intracellular levels of protein tyrosine phosphorylation. The PTPs dephosphorylation of tyrosyl residues plays, in vivo, a major role in controlling cell activities, proliferation, differentiation, and neoplastic transformation [1]. The PTPs represent a diverse family of enzymes that exist in both soluble cytosolic and receptor-like tyrosine phosphatase (RPTP) forms. Gen-

erally, the RPTPs contain one or two conserved intracellular catalytic domains of approximately 240 amino acids with a conserved motif ([I/V]HCXAGXXR[S/T]G), a single transmembrane domain, and an external segment that is highly variable. This ectodomain is believed to harbor binding sites for putative physiological ligands, although the majority of them remains unknown [2]. Based upon their extracellular domains, the receptor-like protein tyrosine phosphatases have been subdivided into eight different classes constituted of various combining functional motifs such as: the immunoglobulin (Ig)-like repeat, the fibronectin type III (FnIII)

* Corresponding author. Fax: +55 16 33739881.

E-mail address: ipolikarpov@ifsc.usp.br (I. Polikarpov).

repeat, the carbonic anhydrase-like domain (CA) [3], and the *Xenopus* A5-like antigen ("MAM" domain) [4].

The RPTPs involved in intercellular communication such as LAR-PTP and PTP δ , bear in their extracellular region the immunoglobulin and the fibronectin III domains [5,6]. As the neural cell adhesion molecules (N-CAM, L1, TAG-1, Ng-CAM, Nr-CAM, and F3/F11) [7], these receptor-like tyrosine phosphatases have been implicated in the processes of nervous system differentiation, development, and axonal guidance. The PTP μ , PTP κ , and PTP λ belong to a subset of adhesion-like RPTPs which carry a third extracellular domain, the MAM domain. These proteins intermediate cells aggregation, in neurons, via homophilic interactions between cell–cell or cell–matrix [8–10]. In the non-neural cells, the rat protein tyrosine phosphatase η (rPTP η) gene is engaged in the process of thyroid cells differentiation and neoplastic cells suppression [11]. The rPTP η gene is highly homologous to human DEP-1/HPTP η and mouse protein phosphatase η , Ptp η [12–15]. The protein structure of rPTP η can be subdivided in only one intracellular catalytic phosphatase domain, a single transmembrane domain, and eight fibronectin type III-like repeats in the extracellular region [16–18]. Similar to thyroid specific genes whose expression is induced by TSH, rPTP η is positively regulated by thyrotropin through the protein kinase A pathway and negatively regulated by protein kinase C activation.

Differently from PTKs whose contribution to tumorigenesis is a subject of intense research, the potential role of PTPs in malignant cell growth is yet poorly explored. Studies involving LAR-PTP and human breast carcinoma cells showed that overexpression of *LAR-PTP* gene is able to slow down the cell proliferation rate [19]. Likewise, the transfection of PTP α in breast carcinoma cells also leads to growth inhibition, suggesting that specific protein tyrosine phosphatases are playing a suppressive regulatory role in malignant cells [20]. Another evidence of the involvement of PTPs in neoplastic transformations is observed with rPTP η . A reduction in the protein expression occurs in all oncogene-transformed thyroid cell lines and is absent in highly malignant thyroid cells [21]. However, it has been shown that inhibition of the tumorigenic process is achieved when rPTP η gene expression is reestablished. The mechanism involved in this process includes increasing levels of the cell-cycle inhibitor p27^{kip1} protein and dephosphorylation of PLC γ 1, a substrate of DEP-1/HPTP η [22]. More recent studies have also implicated the mouse homologue of rPTP η , Ptp η , in susceptibility to mouse colon cancer and missense mutations of this gene have been commonly observed in human colon, lung, and breast cancers [23].

Given the importance of the rat tyrosine phosphatases η and the need to further study its molecular mechanism of signal transduction, we aimed in this work to

establish an expression and purification system capable of providing a large-scale quantity of the functional intracellular catalytic domain of the rPTP η (rPTP η CD). For this purpose, the phosphatase domain of rPTP η gene was cloned into the expression vector pET-28a(+). The His₆-tagged rPTP η CD was expressed at high levels in BL21 (DE3) and the purified protein was obtained by a combination of metal chelate affinity and size exclusion chromatography. The His-tag was removed by thrombin cleavage. To confirm the native conformation of the pure His₆-tag free rPTP η CD, the *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) hydrolysis assay was performed, in addition to fluorescence and circular dichroism spectroscopy studies.

Materials and methods

Cloning of the 3' end of the rPTP η gene

The expression vector pGEX-2TK (Promega) containing the coding sequence of the intracellular region (1026 bp) of rat tyrosine phosphatase η fused in frame to glutathione-S-transferase (GST) gene was obtained from Dr. Alfredo Fusco, Università di Napoli "Federico II," Napoli, Italy. To isolate the rPTP η insert for cloning into pET-28a(+) vector (Novagen), we digested the plasmids with *Bam*HI and *Eco*RI. The digested products were purified by electrophoresis in agarose gel using Perfectprep Gel Clean-up kit (Eppendorf). The ligation was performed overnight to *Bam*HI–*Eco*RI digested pET-28a(+) in the presence of T4-DNA ligase (New England Biolabs). The ligated samples containing a nucleotide sequence coding for six histidines, placed upstream and in frame with the rPTP η CD insert, were transformed into chemically competent BL21 (DE3) cells. A single colony obtained on Luria–Bertani (LB)–kanamycin plates was then selected and grown for sequencing using ABI PRISM 377 DNA Sequencer (AB Applied Biosystems) and for preparation of glycerol freezer stocks.

Expression of His₆-tagged rPTP η catalytic phosphatases domain

BL21 (DE3) cells harboring the plasmid containing the rPTP η CD insert were grown overnight in 100 ml LB medium supplemented with 30 μ g/ml kanamycin. After growth at 37 °C, the pre-culture was used to inoculate 500 ml of 2 $\times$ YT media plus kanamycin in a flask and the cells were grown at 30 °C under continuous shaking, until the absorbance at 600 nm reached 0.6–0.8. At this point, 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to induce rPTP η CD expression and cells were incubated at 30 °C for 1–6 h. The induced bacteria were harvested by centrifugation at 6000g in a Sorvall RC-5C Plus centrifuge at 4 °C for

20 min. Then, cell pellets were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Purification of recombinant rPTP η CD and thrombin treatment

Prior to purification, bacterial pellets from 5 L of culture were thawed and resuspended in 100 ml of lysis buffer (50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.8; 100 mM NaCl; 10% glycerol; 10 mM imidazol; 2 mM β -mercaptoethanol) containing 1 mM PMSF and 0.5 mg/ml of lysozyme (Sigma). The suspension was incubated on ice for 30 min to lyse cells. The lysate was further disrupted by sonication at approximately 60 W for 10×30 s pulses (with 1 min delay between pulses) on ice, with a 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific) to reduce viscosity. Centrifugation was done at 14,000g for 1 h to remove the insoluble cell debris and the clear supernatant obtained constituted the crude protein preparation. The supernatant from the above step was mixed with 20 ml Talon Superflow resin (Clontech), pre-equilibrated with equilibration buffer (50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.8; 300 mM NaCl; 10% glycerol; 10 mM imidazol; 2 mM β -mercaptoethanol), and left rotating at 4°C for 1 h. The mixture of resin and supernatant was poured into a c16/10 glass column (Amersham Biosciences) and the flow-through of the soluble fraction was collected. The column was connected to a HPLC ÄkTA purifier (Amersham Biosciences) and washed with equilibration buffer until the absorbance reading reached the baseline. The tightly bound proteins were eluted with elution buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8; 50 mM NaCl; 10% glycerol; 300 mM imidazol; 2 mM β -mercaptoethanol) and the protein peak was collected in fractions of 1 ml each. At this stage, the rPTP η CD was 70% pure as judged on the basis of 15% SDS–PAGE. It was further purified to >96% by size exclusion chromatography on a Superdex 200 HL 26/60 column (Amersham Biosciences) using as eluent Hepes buffer (20 mM Hepes, pH 7.8; 200 mM NaCl; 5% glycerol; and 1 mM DTT). All purification procedures were carried out at 4°C . The purified protein fractions were visualized on 15% SDS–PAGE. Soluble His₆-rPTP η CD (molecular weight of 43 kDa) was concentrated to 1 mg/ml and incubated, according to manufacturer's recommendation, with 0.5 U/ml bovine thrombin protease for 1–18 h at 18°C followed by dialysis against Hepes buffer. The thrombin cleaved rPTP η CD was, then, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Enzymatic activity

The phosphatases activity of purified rPTP η CD was tested *in vitro* by pNPP (Sigma) hydrolysis assay. The assay was performed mixing in each microtiter well 5 μl of BSA (Sigma) solution (5 mg/ml) with different

concentrations of purified enzyme. The final volume was adjusted to 80 μl with pNPP buffer (25 mM Hepes, pH 7.2; 50 mM NaCl; 5 mM dithiothreitol; and 2.5 mM EDTA). Each concentration of protein was tested in triplicate. The blanks were prepared the same as samples minus the enzyme. To initiate the reaction, 120 μl pNPP (1.5 mg/ml in pNPP buffer) was added as substrate solution and the material was incubated for 5–60 min at room temperature. The reaction was stopped by the addition of 20 μl of 13% K_2HPO_4 solution and the assay was read against blank at 405 nm in a Spectra max Plus³⁸⁴ (Molecular Devices). To calculate the specific activity of rPTP η we used Eq. (1), where ϵ is the extinction coefficient for pNPP ($1.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The results were expressed in nmoles/min/ μg by multiplying the outcome from Eq. (1) by a factor of 10^9 .

$$\begin{aligned} \text{Specific activity} = & [(\text{sample vol. in liters}) \\ & \times (A_{405})] / [(\epsilon \text{ in } \text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \\ & \times (\text{pathlength in cm}) \\ & \times (\text{time in min}) \\ & \times (\mu\text{g of enzyme})]. \end{aligned} \quad (1)$$

Protein concentration measurements and SDS–PAGE

Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay according to manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories). The assay is based on the method of Bradford [24] and uses bovine serum albumin (Sigma) as reference standard. The SDS–PAGE of protein samples was carried out in Laemmli's buffer [25] with 12% polyacrylamide. Electrophoresis was performed in a Gibco-BRL Vertical Cell Electrophoresis Apparatus (Life Technologies) together with standard molecular mass markers (Sigma). For protein visualization, the gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories) and destained with 10% acetic acid.

Western blot assays

The nitro-cellulose membrane, on which the purified recombinant His₆-rPTP η CD protein band had been transferred, was blocked at room temperature for 1:30 h with 5% non-fat dried milk in Tris-buffered saline (TBS, pH 8.0) and then incubated for 1 h with the Ni-NTA AP conjugate (Qiagen). After washes in TBS containing 0.05% Tween 20 (TBS-T), the membrane was incubated with AP conjugate substrate (kit Bio-Rad Laboratories) to visualize the reaction.

Isoelectric focusing (IEF)

Isoelectric focusing was accomplished in a PhastSystem (Amersham Biosciences). The method consisted of

three steps: In the first step the pH gradient is formed on the PhastGel IEF media 3–9 (pH range 3–9) containing pharmalyte carrier ampholytes; at the second step, the samples are applied to the gel for 15 V h at the voltage of 200 V; and finally, at the third step, the proteins migrate to their isoelectric points. Separations took approximately 30 min after which the gel was stained with 0.1% PhastGel Blue R (Amersham Biosciences) solution in 30% methanol and 10% acetic acid. To visualize the bands the gel was destained in a solution containing 30% methanol and 10% acetic acid until the background was clear.

Circular dichroism spectroscopy

Purified rPTP η CD, with His-tag removed by thrombin treatment was dialyzed against 5 mM phosphate buffer, pH 7.8; 12.5 mM NaCl; 0.25 mM DTT. CD spectra were measured in a quartz 1 mm path length cuvette at 18 °C and protein concentration of 0.08 mg/ml, using a Jasco J-720 spectropolarimeter (Jasco). The protein far-UV spectra were recorded over a wavelength range of 190–250 nm by signal averaging of 64 spectra. The instrument was set at scanning speed of 100 nm/min and step resolution of 1 nm. The secondary structure content of the protein was monitored following the 208 nm peak during thermal denaturation (10–80 °C) induced by a PFD-425S Peltier temperature control system with a slope of temperature increase of 1 °C/min. CD measurements of thermal denaturation were performed in quartz 1 mm path length cuvettes at protein concentration of 0.08 mg/ml in the same buffer as described above. For standardization, the baseline spectrum (buffer alone) was subtracted from the spectra and the results were expressed as mean residue ellipticity $[\theta] = (\theta \cdot MRW)/(10 \cdot c \cdot d)$; where θ is observed ellipticity; MRW = protein mean weight/number of residues; d is an optical path length in cm; and c is protein concentration in mg/ml.

Fluorescence spectroscopy

The intrinsic fluorescence of His₆-tag free rPTP η CD was measured in a quartz 10 × 2 mm cuvette at 18 °C, using an K2 Multifrequency Phase Fluorometer (ISS) equipped with a temperature control water bath RTE-111 (Thermo-Neslab). Emission spectra in the range of 300–450 nm were recorded using an excitation wavelength of 280 nm. The fluorescence emission spectra of rPTP η CD at a concentration of 0.3 mg/ml were monitored at a scanning interval of 1 nm and integration time of 1 s. After each measurement the spectrum was corrected for buffer (100 mM Hepes, pH 7.8; 50 mM NaCl, and 1 mM DTT) contribution.

Results and discussion

Cloning and expression of the catalytic phosphatase domain of rPTP η in *Escherichia coli*

The insert coding for the phosphatase domain of rPTP η which shows, respectively, 95 and 98% identity to the intracellular domains of human and mouse homologues (HPTP η /Ptprij), was excised with *Bam*HI and *Eco*RI from pGEX-2TK and ligated into pET-28a(+) vector. The ligation product was then transformed into BL21 (DE3) competent cells. To confirm the presence of pET-rPTP η recombinant plasmids, DNA obtained from different recombinant colonies was digested with both restriction enzymes and examined by electrophoresis in 1% agarose gel. Sequencing of the cloned vectors revealed the open reading frame (ORF) of the intracellular region of rPTP η (W875-A1216) plus the expected 34 additional amino acid residues derived from pET-28a(+) vector at its amino terminus (MGSSHHHHHH HSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGS), including the cluster of six histidine residues for protein purification by metal affinity chromatography.

After several attempts to determine the optimal conditions for rPTP η CD expression in *E. coli* BL21 (DE3), the His₆-rPTP η CD production was optimized at 30 °C with 0.5 mM of IPTG used for induction. Cells were grown until their optical density reached the levels of absorbance between 0.6 and 0.8 at 600 nm. To evaluate the time course for rPTP η CD expression, bacteria were harvested every hour for 6 h following induction and total cell lysates analyzed on SDS-PAGE. A band at the expected molecular mass (43 kDa) was detected and reached high level of expression after 3 h of induction. This band was absent in the control total lysate of *E. coli* BL21 (DE3)/pET-rPTP η CD (Fig. 1A). Since under these conditions the recombinant protein was well over-produced, we established an induction time of 3 h for the large-scale production of His₆-rPTP η CD.

Purification of His₆-tagged rPTP η CD

The over-expressed recombinant His₆-rPTP η CD was solubilized in lysis buffer before sonication to reduce the size of cell debris and nucleic acid. The clear lysate obtained after centrifugation constituted the crude protein solution and contained the His₆-rPTP η CD soluble fraction. His₆-rPTP η CD was successfully bound to and competitively eluted from the metal-chelating affinity column by application of high concentration of imidazole (300 mM) in the elution buffer. The nonspecific binding of nontagged proteins was reduced by including a low concentration of imidazole (10 mM) in the equilibration buffer as well as 300 mM NaCl to prevent undesirable ionic interactions. The purification yielded significant amount of protein with considerable enrich-

Fig. 1. His₆-rPTP η CD expression and purification. (A) SDS-PAGE was carried out on a Mini V8-10 Vertical Gel Electrophoresis Apparatus (Life Technologies-Gibco-BRL) and proteins detected by Coomassie brilliant blue staining. Lane 1, molecular weight standards: 67.00 kDa, bovine serum albumin; 45.00 kDa, egg albumin (Sigma); lane 2, total lysate of control BL21 (DE3) culture before induction with IPTG; lanes 3–8, total lysate of BL21 (DE3) culture 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h, respectively, after IPTG addition. Black arrow indicates a band of approximately 43 kDa corresponding to His₆-rPTP η CD. (B) HPLC elution profile of gel filtration chromatography of His₆-rPTP η CD with two major protein peaks, P1 and P2, and Superdex 200 HL 26/60 column calibration with ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa), albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), and chymotrypsinogen A (25 kDa) (Amersham Biosciences). (C) SDS-PAGE analysis of gel filtration chromatographic peaks. Lane 1, molecular weight standards: 45.00 kDa, albumin from egg; 30.00 kDa, carbonic anhydrase (Sigma); lane 2, pool of His₆-rPTP η CD after affinity chromatography injected on the Superdex 200 HL 26/60 column (Amersham Biosciences); lane 3, gel filtration peak P1, consisting of only protein contaminants; and lane 4, peak P2, containing the purified His₆-rPTP η CD of about 43 kDa (arrow).

ment of the His₆-rPTP η CD. Peak protein fractions from the chromatographic separation were resolved by SDS-PAGE and showed approximately 70% purity (Fig. 1C). To remove the rest of the contaminants, the affinity purified His₆-rPTP η CD was submitted to gel filtration chromatography. In order to determine the molecular size of the eluted protein, the Superdex 200 HL 26/60 column was previously calibrated with standard proteins (Amersham Biosciences) and the calibration curve established by relating their elution volume data to a molecular size parameter, Stokes' radius (Rs). His₆-rPTP η CD and the ovalbumin marker have the same molecular mass of 43 kDa and elute from the column with Rs of, approximately, 2.97 and 3.05 nm, respec-

tively, suggesting that His₆-rPTP η CD elutes from the gel filtration column as a monomer. SDS-PAGE analysis of the purified protein indicates that the preparation was more than 96% pure (Figs. 1B and C). The efficiencies of affinity and gel filtration purifications are shown in Table 1. The total protein yield at the last purification step was around 4 mg/L of cell culture.

Thrombin treatment of purified His₆-rPTP η CD

The amino acid sequence LVPRGS is the target for thrombin and the cleavage site is the peptide bond between the amino acids R and G. Thus, digestion of the recombinant protein by thrombin resulted in elimination of 17 amino acid residues, MGSSHHHHHHSSGLVPR, at the amino terminus of His₆-rPTP η CD, including the His₆-Tag sequence that was not encoded by the *Bam*HI-*Eco*RI fragment (W875–A1216). Complete thrombin digestion occurred after the first hour of incubation at 18 °C. A single protein band with a molecular mass of approximately 41 kDa can be visualized at the SDS-PAGE (Fig. 2A). The His₆-tag removal from the recombinant protein was also observed by PhastGel 8–25% native PAGE followed by Western Blot assay where His₆-rPTP η CD but not rPTP η CD was recognized by Ni-NTA AP conjugate (Fig. 2B).

Table 1
Purification protocol of rPTP η from 1 L culture

Fraction (%)	Yield (mg) ^a	Total protein
I	10.0 ^b	100
II	4.0 ^b	40
III	3.5 ^c	35

Note. I, His-rPTP η protein after imidazole elution; II, His-rPTP η protein after gel filtration; III, rPTP η protein after thrombin cleavage.

^aYield was determined using the Bio-Rad protein assay based on the method of Bradford, and corresponded to ^bHis-tagged rPTP η or ^cHis-tag free rPTP η .

Fig. 2. Thrombin protease treatment of His₆-rPTP η CD. (A) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1, molecular weight standard: 67.00 kDa, bovine serum albumin; 45.00 kDa, egg albumin; 30.00 kDa, carbonic anhydrase (Sigma); lanes 3, untreated His₆-rPTP η CD after 18 h incubation at 18 °C, showing a band of approximately 43 kDa (arrow); lanes 2 and 4–6, His₆-rPTP η CD after thrombin treatment for 1, 3, 6, and 18 h at 18 °C. The arrow head indicates a band of approximately 41 kDa corresponding to His₆-tag free rPTP η CD. (B) Lanes 1 and 2, PhastGel gradient 8–25% native PAGE of purified His₆-rPTP η CD untreated and treated with 0.5 U of thrombin/100 μ g of recombinant protein for 18 h at 18 °C, respectively; lanes 3 and 4, the same gel transferred onto nitro-cellulose membrane prior Coomassie blue staining. The Western blot was performed using Ni-NTA coupled to calf intestinal alkaline phosphatase to detect recombinant His₆-rPTP η CD (lane 3).

Isoelectric focusing and phosphatase activity of recombinant rPTP η CD

The isoelectric point and enzyme activity of recombinant rPTP η CD were measured as described in the Materials and methods. The *pI* was found to be 7.3 which was just slightly higher than the value predicted theoretically for thrombin treated rPTP η by the ProtParam tool (*pI* = 7.2) [26].

The biological activity of rPTP η CD was accessed by measuring the ability of the protein to hydrolyze *p*-nitrophenyl phosphate. This reaction releases a yellow colored compound, *p*-nitrophenol, which absorbs at 405 nm. The purified His₆-tag free rPTP η CD, subjected to pNPP hydrolysis assay, showed phosphatase activity for pNPP in a dose-dependent manner, whereas the control failed to exhibit phosphatase activity (Fig. 3). In the assay, pure rPTP η CD (0.12 and 0.25 μ M) showed a time-dependent increase in release of *p*-nitrophenol and phosphate up to 60 min. Based on these results, the mean rPTP η CD specific activity was calculated to be 9 nmol/min/ μ g suggesting that after purification and thrombin treatment rPTP η CD maintains its native structure and remains intact, with no signs of proteolytic degradation which could occur during the His₆-tag cleavage procedure. The experimentally determined rPTP η CD specific activity is in the same range as the previously reported activities for PTP μ [27], PTP α [28] and for commercial preparations of recombinant PTP-B1 [29] and SHP2 [30].

Fig. 3. rPTP η CD specific activity. The purified recombinant rPTP η CD was assayed in triplicates for phosphatase activity toward a substrate, pNPP, at two enzyme concentrations (0.12 and 0.25 μ M) and different incubation times (5–60 min). The activity (free phosphate release) is expressed as *A*₄₀₅. Samples containing no enzyme were used as negative control (filled circles).

Circular dichroism and fluorescence spectroscopy

The secondary structure of rPTP η CD was investigated by CD and fluorescence measurements. The far-UV CD spectrum at 18 °C displayed two negative bands at 222 and 208 nm and a positive band near 195 (Fig. 4A). Analysis of the spectrum were done using DichroWeb [31] with the programs SELCON3 [32], CONTIN [33], and K2D [34]. The amount of α -helix and β -strands content ranged from 25 to 37% and from 15 to 22%, respectively. It is in a good agreement with the secondary structure prediction using PSIPRED (Protein Structure Prediction Server) [35] and APSSP (Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server) [36] which found, respectively, for α -helix content 31–36% and for β -strands content 14–16%. Furthermore, the CD results are in a good agreement with published reports on the crystal structures of the catalytic domains of different members of the PTP superfamily. For example, the structure of the membrane proximal domain (D1) of RPTP α determined by Bilwes et al. [37] has 29.80% of α -helix and 17.88% of β -strands. Similar content of α -helices (31.65%) and β -strands (20.14%) was found for the RPTP μ D1 domain [38].

The secondary structure thermal denaturation of rPTP η CD shows a clear transition from a stable conformation to a partially denatured state, occurring between 45 and 55 $^{\circ}$ C. The CD signal at 208 nm was monitored from 10 to 80 $^{\circ}$ C (Fig. 4B). The temperature effect on the rPTP η CD secondary structure started at approximately 45 $^{\circ}$ C and reached a plateau at about 55 $^{\circ}$ C. The sigmoidal profile of the thermal transition is an indication of cooperativity as well as a native-like packing of the protein. The CD spectrum, monitored before and after

Fig. 4. Circular dichroism analysis of recombinant rPTPηCD. (A) CD spectra of native rPTPηCD at concentration of 0.08 mg/ml in 5 mM phosphate buffer (pH 7.8), 12.5 mM NaCl, 0.25 mM DTT. The spectra were recorded at 18 °C from 190 to 250 nm in a quartz 1 mm path length cuvette using Jasco J-720 spectropolarimeter as an average of 64 scans. (B) Thermal unfolding of purified rPTPηCD. The secondary structure content of the protein was monitored following the 208 nm peak during thermal denaturation (10–80 °C) with a temperature slope of 1 °C/min. Measurement were carried out in a quartz 1 mm path-length cuvette using protein at concentration of 0.08 mg/ml in 5 mM phosphate buffer (pH 7.8), 12.5 mM NaCl, and 0.25 mM DTT.

Fig. 5. rPTPηCD intrinsic fluorescence spectrum. At the excitation wavelength of 280 nm and protein concentration of 0.3 mg/ml in 100 mM Hepes (pH 7.8), 50 mM NaCl, and 1 mM DTT buffer. The emission spectra of rPTPηCD were recorded with 1 nm interval and 1 s of integration time. Experiments were carried out in a 10 × 2 mm fluorescence cuvette, at 18 °C, and corrected for buffer contribution.

thermal denaturation, reveals clear conformational changes in the protein secondary structure (data not shown).

The rPTPηCD intrinsic fluorescence emission spectrum has a maximum fluorescence wavelength of 330 nm upon excitation at 280 nm (Fig. 5). Two spectra, recorded in an interval of 1 h, are virtually identical which indicated that the protein is stable at 18 °C.

Conclusions

The protein tyrosine phosphatases comprehend a diverse family of enzymes which elicit, in different cell types, a plethora of fundamental biological effects such as gene expression, cell division and differentiation, and neoplastic transformation [1]. The expression of PTPs has been observed in various areas of the nerve system and non-neural cells, where their functions remain largely unknown [5–10]. From previous reports, it is known that the rat protein tyrosine phosphatases η gene expression inhibits the tumorigenic process in oncogene-transformed thyroid cell lines [11], whereas mutations in the human and mouse homologues *HPTPη*/*Ptp η* are related to the susceptibility in developing colon, lung, and breast cancers [23]. In the present paper we describe heterologous expression, purification of intracellular phosphatase domain of rPTPη and its characterization by SDS-PAGE, native gel electrophoresis, analytical gel filtration chromatography, far-UV circular dichroism, and intrinsic fluorescence techniques. In addition, the enzymatic activity of rPTPηCD has been tested. Taken together all the results of these investigations, we conclude that the purified catalytic phosphatase domain of rPTPη was properly folded, fully active, and therefore suitable for further structural and functional studies.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian Agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 99/03387-4), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References

- [1] J.M. Bishop, Molecular themes in oncogenesis, *Cell* 64 (1991) 235–248.
- [2] H. Charbonneau, N.K. Tonks, S. Kumar, C.D. Diltz, M. Harrylick, D.E. Cool, E.G. Trebs, E.H. Fisher, K.A. Walsh, Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 5252–5256.

- [3] K.M. Walton, J.E. Dixon, Protein tyrosine phosphatases, *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 101–120.
- [4] Y.P. Jiang, H. Wang, P.D. Eustachio, J.M. Musacchio, J. Schlesinger, J. Sap, Cloning and characterization of R-PTP-kappa, a new member of the receptor protein tyrosine phosphatase family with a proteolytically cleaved cellular adhesion molecule-like extracellular region, *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 2942–2951.
- [5] M. Sahin, J.J. Dowling, S. Hockfield, Seven protein tyrosine phosphatases are differentially expressed in the developing rat brain, *J. Comp. Neurol.* 351 (1995) 617–631.
- [6] L.P. Shock, D.J. Bare, S.G. Klinz, P.F. Maness, Protein tyrosine phosphatases expressed in developing brain and retinal Müller glia, *Mol. Brain Res.* 28 (1995) 110–116.
- [7] R.O. Hynes, A.D. Lander, Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons, *Cell* 68 (1992) 303–322.
- [8] S.M. Brady Kalnay, A.J. Flint, N.K. Tonks, Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell-cell aggregation, *J. Cell Biol.* 122 (1993) 961–972.
- [9] J. Sap, Y.P. Jiang, D. Friedlander, M. Grumet, J. Schlesinger, Receptor tyrosine phosphatase RPTP kappa mediates homophilic binding, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 1–9.
- [10] M.F.B.G. Gebbink, G.C.M. Zondag, R.W. Wubbolts, R.L. Beijersbergen, I. van, W.H. Moolenaar, Homophilic interactions mediated by receptor tyrosine phosphatases μ and κ , *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 16101–16104.
- [11] M.L. Martelli, F. Trapasso, P. Bruni, M.T. Berlingieri, C. Battaglia, M.T. Vento, B. Belletti, R. Iuliano, M. Santoro, G. Viglietto, A. Fusco, Protein tyrosine phosphatase- η expression is upregulated by the PKA-dependent and is downregulated by the PKC-dependent pathways in thyroid cells, *Exp. Cell Res.* 245 (1998) 195–202.
- [12] L. Zhang, M.L. Martelli, C. Battaglia, F. Trapasso, J. Cerutti, D. Tramontano, G. Viglietto, A. Porcellini, M. Santoro, A. Fusco, Thyroid cell transformation inhibits the expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase, *Exp. Cell Res.* 235 (1997) 62–70.
- [13] H. Honda, J. Inazawa, J. Nishida, Y. Yazaki, H. Hirai, Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a novel protein-tyrosine phosphatase, HPTP eta, *Blood* 15 (1994) 4186–4194.
- [14] A. Ostman, Q. Yang, K. Tonks, Expression of DEP-1, a receptor-like protein tyrosine phosphatase, is enhanced with increasing cell density, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 9680–9684.
- [15] C.A.L. Ruivenkamp, T. van Wezel, C. Zanon, A.P.M. Stassen, C. Vlcek, Tamás Csikós, A.M. Klous, N. Tripodis, A. Perrakis, L. Boerrigter, P.C. Groot, J. Lindeman, W.J. Mooi, G.A. Meijer, G. Scholten, H. Dauwerse, V. Paces, N. van Zandwijk, G.J.B. van Ommen, P. Demant, *Ptprj* is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus *Sccl* and is frequently deleted in human cancers, *Nat. Genet.* 31 (2002) 295–300.
- [16] N.X. Krueger, M. Streuli, H. Saito, Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases, *EMBO J.* 9 (1990) 3241–3252.
- [17] E.H. Fischer, H. Charbonneau, N.K. Tonks, Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes, *Science* 253 (1991) 401–406.
- [18] H. Saito, Structural diversity of eukaryotic protein tyrosine phosphatases: functional and evolutionary implications, *Semin. Cell Biol.* 4 (1993) 379–387.
- [19] Y. Zhai, J. Wirth, S. Kang, C.W. Welsch, W.J. Esselman, LAR-PTase cDNA transfection suppression of tumor growth of neu oncogene-transformed human breast carcinoma cells, *Mol. Carcinog.* 14 (1995) 103–110.
- [20] E. Ardini, R. Agresti, E. Tagliabue, M. Greco, P. Aiello, L.T. Yang, S. Ménard, J. Sap, Expression of protein tyrosine phosphatase alpha (RPTP α) in human breast cancer correlates with low tumor grade, and inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo, *Oncogene* 19 (2000) 4979–4987.
- [21] K. Okazaki, N. Sagato, MAP kinase activation is essential for oncogenic transformation of NIH3T3 cells by Mos, *EMBO J.* 14 (1995) 5048–5059.
- [22] F. Trapasso, R. Iuliano, A. Boccia, A. Stella, R. Visconti, P. Bruni, G. Baldassarre, M. Santoro, G. Viglietto, A. Fusco, Rat protein tyrosine phosphatase η suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27Kip1, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 9236–9246.
- [23] C.A. Ruivenkamp, T. van Wezel, C. Zanon, A.P. Stassen, C. Vlcek, T. Csikos, A.M. Klous, N. Tripodis, A. Perrakis, L. Boerrigter, P.C. Groot, J. Lindeman, W.J. Mooi, G.A. Meijer, G. Scholten, H. Dauwerse, V. Paces, N. van Zandwijk, G.J. van Ommen, P. Demant, *Ptprj* is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus *Sccl* and is frequently deleted in human cancers, *Nat. Genet.* 31 (2002) 295–300.
- [24] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [25] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [26] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3784–3788.
- [27] M.F.B.G. Gebbink, M.H.G. Verheijen, G.C.M. Zondag, I. van Etten, W.H. Moolenaar, Purification and characterization of the cytoplasmic domain of the human receptor-like protein tyrosine phosphatase rPTP η , *Biochemistry* 32 (1993) 13516–13522.
- [28] K.L. Lim, D.S.Y. Lai, M.B. Kalousek, Y. Wang, C.J. Pallen, Kinetic analysis of two closely related receptor-like protein-tyrosine-phosphatases, PTP α and PTP ϵ , *Eur. J. Biochem.* 245 (1997) 693–700.
- [29] Available from: <<http://www.upstate.com/browse/productdetail.q.ProductID.e.14-358>>.
- [30] Available from: <<http://www.purelyproteins.com/products/datasheets/ptpn11domain.html>>.
- [31] A. Lobley, L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *Bioinformatics* 18 (2002) 211–212.
- [32] N. Sreerama, S.Y. Venyaminov, R.W. Woody, Estimation of the number of helical and strand segments in proteins using CD spectroscopy, *Protein Sci.* (1999) 370–380.
- [33] I.H.M. Van Stokkum, H.J.W. Spoelder, M. Bloemendal, R. Van Grondelle, F.C.A. Groen, Estimation of protein secondary structure and error analysis from CD spectra, *Anal. Biochem.* 191 (1999) 110–118.
- [34] M.A. Andrade, P. Chacón, J.J. Merelo, F. Morán, Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network, *Protein Eng.* 6 (1993) 383–390.
- [35] L.J. McGuffin, K. Bryson, D.T. Jones, The PSIPRED protein structure prediction server, *Bioinformatics* 16 (2000) 404–405.
- [36] G.P.S. Raghava, Protein secondary structure prediction using nearest neighbor and neural network approach, *CASP4* (2000) 75–76.
- [37] A.M. Bilwes, J. den Hertog, T. Hunter, J.P. Noel, Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatases-alpha by dimerization, *Nature* 382 (1996) 555–559.
- [38] K.M.V. Hoffmann, N.K. Tonks, D. Barford, The crystal structure of domain 1 of receptor protein-tyrosine phosphatases μ , *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 27505–27508.

ANEXO B

MATOZO, H. C. ; NASCIMENTO, A. S. ; SANTOS, M. A. M. ; IULIANO, R. ; FUSCO, A. ; POLIKARPOV, I. . Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of rat protein tyrosine phosphatase eta. Acta Crystallographica. Section F, Crystalization Communications, v. 62, part 9, p. 923-925 , 2006. DOI:10.1107/S1744309106031058

Huita C. Matoso,^a Alessandro S. Nascimento,^a Maria A. M. Santos,^a Rodolfo Iuliano,^b Alfredo Fusco^{c,d} and Igor Polikarpov^{a,e*}

^aInstituto de Física de São Carlos, Departamento de Física e Informática, Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador São Carleense 400, CEP 13566-590 São Carlos, SP, Brazil,

^bDipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Catanzaro, 88100 Catanzaro, Italy,

^cDipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, c/o Istituto di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale del CNR, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli 'Federico II', Via Pansini 5, 80131 Naples Italy, ^dNOGEC (Naples Oncogenomics Center)—CEINGE, Biotecnologie Avanzate, Via Comunale Margherita 482, 80145 Naples, Italy, and ^eLaboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP, Brazil

Correspondence e-mail:
ipolikarpov@ifsc.usp.br

Received 30 May 2006
Accepted 7 August 2006

© 2006 International Union of Crystallography
All rights reserved

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of rat protein tyrosine phosphatase η

The rat protein tyrosine phosphatase η (rPTP η) is a cysteine-dependent phosphatase which hydrolyzes phosphoester bonds in proteins and other molecules. rPTP η and its human homologue DEP-1 are involved in neoplastic transformations. Thus, expression of the protein is reduced in all oncogene-transformed thyroid cell lines and is absent in highly malignant thyroid cells. Moreover, consistent with the suggested tumour suppression role of PTP η , inhibition of the tumorigenic process occurs after its exogenous reconstitution, suggesting that PTP η might be important for gene therapy of cancers. In this study, the catalytic domain of rPTP η was produced in *Escherichia coli* in soluble form and purified to homogeneity. Crystals were obtained by the hanging-drop vapour-diffusion method. Diffraction data were collected to 1.87 Å resolution. The crystal belongs to space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 46.46$, $b = 63.07$, $c = 111.64$ Å, and contains one molecule per asymmetric unit.

1. Introduction

The dephosphorylation of tyrosyl residues by protein tyrosine phosphatases plays a major role in controlling cell activities such as embryogenesis, proliferation, differentiation, fertilization and neoplastic transformation *in vivo* (Chagnon *et al.*, 2004; den Hertog, 1999; Mustelin *et al.*, 2002). The PTPs represent a diverse family of enzymes that exist in both soluble cytosolic and receptor-like tyrosine phosphatase (RPTP) forms. In humans, the classical tyrosine-specific PTPs are encoded by 38 genes. Generally, the RPTPs contain one or two conserved intracellular catalytic domains of approximately 240 amino acids with a conserved motif [(I/V)HCXAGXXR(S/T)G], a single transmembrane domain and a highly variable external segment. These cysteine-dependent phosphatases utilize the conserved C(X)₅R sequence motif to hydrolyze phosphoester bonds in proteins and non-protein substrates (Alonso *et al.*, 2004; Kolmodin & Åqvist, 2001). The tertiary structure of the catalytic domains of all crystallized RPTPs revealed an architecture comprised of a globular fold that consists of an eight-stranded twisted β -sheet flanked by four α -helices on one side and another on the opposite side (Jia *et al.*, 1995; Stuckey *et al.*, 1994; Barford *et al.*, 1998). The PTP-signature motif is conservatively located at the bottom of the catalytic site cleft.

rPTP η is a ubiquitous gene that is highly homologous to human DEP-1, also known as RPTP η , PTPRJ and CD148, as well as mouse protein phosphatase η , Ptp η (Zhang *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1994; Ostman *et al.*, 1994; Ruivenkamp *et al.*, 2002). The protein structure of PTP η contains only one intracellular phosphatase domain, a single transmembrane domain and eight fibronectin type III-like repeats in the extracellular region (Krueger *et al.*, 1990; Fischer *et al.*, 1991; Saito, 1993). Similar to thyroid-specific genes, rPTP η expression is induced by TSH and is positively regulated by thyrotropin through the protein kinase A pathway and negatively regulated by protein kinase C activation (Martelli *et al.*, 1998). Further evidence has demonstrated the involvement of rPTP η and human DEP-1 in neoplastic transformations of rat and human cells, respectively. A reduction in expression of the protein is observed in all oncogene-transformed thyroid cell lines and expression is absent in highly malignant thyroid cells (Okazaki & Sagato, 1995). Moreover, the

crystallization communications

malignant phenotype can be reverted when *PTP η* gene expression is re-established. The mechanism involved in this process includes increasing levels of the cell-cycle inhibitor p27^{Kip1} protein and dephosphorylation of PLC γ 1, a substrate of DEP-1/HPTP η (Trapasso *et al.*, 2000). Recently, it has been shown that the PTP η protein is capable of binding to c-Src in living cells. The dephosphorylation of the negative regulatory tyrosine (Tyr529 of the c-Src family protein tyrosine kinases) increases c-Src tyrosine kinase activity in malignant rat thyroid cells stably transfected with rPTP η (Ardini *et al.*, 2000). Additionally, studies have also implicated the mouse homologue of rPTP η , *Ptp η* , in susceptibility to mouse colon cancer, reinforcing the idea that restoration of PTP η function could be a useful tool for gene therapy of human cancers (Ruivenkamp *et al.*, 2002).

In order to better understand the molecular mechanism of the catalytic activity and substrate specificity of rPTP η we have expressed the catalytic domain (CD) of rPTP η in *Escherichia coli*, purified it to homogeneity and crystallized it. Here, we describe the crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of rPTP η CD.

2. Materials and methods

2.1. Expression and purification of recombinant rPTP η phosphatase domain

BL21 (DE3) cells harbouring the plasmid containing the rPTP η intracellular domain insert were grown at 303 K in 2 $\times$ YT media plus kanamycin with shaking until the absorbance at 600 nm reached 0.6–0.8. At this point, 0.5 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to induce rPTP η expression and cells were incubated for 4 h. The induced bacteria were harvested by centrifugation at 6000g in a Sorvall RC-5C Plus centrifuge at 277 K for 20 min. The bacterial pellets from 2.5 l culture were resuspended in 100 ml lysis buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.8, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM imidazole, 2 mM β -mercaptoethanol) containing 1 mM PMSF and 0.5 mg ml⁻¹ lysozyme (Sigma). The suspension was incubated on ice for 30 min to lyse cells. The lysate was further disrupted by sonication on ice with a 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific) to reduce the viscosity. Centrifugation was performed at 14 000g for 1 h and the clear supernatant obtained constituted the crude protein preparation. The supernatant from the above step was mixed with 20 ml Talon Superflow resin (Clontech) pre-equilibrated with equilibration buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.8, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM imidazole, 2 mM β -mercapto-

ethanol) and left rotating at 277 K for 1 h. The mixture of resin and supernatant was poured into a c16/10 glass column (Amersham Biosciences) connected to a HPLC ÄKTA purifier (Amersham Biosciences) and the tightly bound proteins were eluted with elution buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.8, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 300 mM imidazole, 2 mM β -mercaptoethanol). The protein was further purified to >96% by size-exclusion chromatography on a Superdex 200HL 26/60 column (Amersham Biosciences) using HEPES buffer (20 mM HEPES pH 7.8, 200 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT) as eluent. All purification procedures were carried out at 277 K. The purified protein fractions were visualized on 15% SDS-PAGE. Soluble His₆-rPTP η (molecular weight 43 kDa) was concentrated to 1 mg ml⁻¹ and incubated, according to the manufacturer's recommendation, with 0.5 U ml⁻¹ bovine thrombin protease for 1–18 h at 291 K followed by dialysis against HEPES buffer. The thrombin-cleaved rPTP η was then frozen in liquid nitrogen and stored at 193 K (Santos *et al.*, 2005).

2.2. Crystallization

Crystallization conditions were screened by the sparse-matrix method with hanging-drop vapour diffusion using Hampton Crystal Screen 1 and 2 and Nextal Suites. Suitable crystals appeared using Nextal PEGs Suite condition No. 35 (20% PEG 10 000, 0.1 M MES pH 6.5) after 30 d (Fig. 1).

2.3. Data collection and processing

A single crystal was harvested in a nylon loop and transferred to a cryoprotectant solution containing 20% PEG 10 000, 0.1 M MES pH 6.5 and 15% (v/v) ethylene glycol for one minute. The crystal was then flash-cooled to 100 K in a nitrogen stream for data collection. Data collection was carried out at the MX-1 beamline of the Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil; Polikarpov, Oliva *et al.*, 1997; Polikarpov *et al.*, 1998) using synchrotron radiation of wavelength 1.42 Å to optimize both the diffraction

Figure 1
Crystal of rPTP η CD. Typical dimensions are approximately 0.2 $\times$ 0.4 $\times$ 0.2 mm.

Figure 2
Diffraction pattern of the rPTP η CD crystal collected on the MX-1 beamline at LNLS. The maximum resolution at the edge of the image is 1.87 Å.

crystallization communications

Table 1

X-ray data-collection statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell (1.97–1.87 Å).

Wavelength (Å)	1.42
Resolution range (Å)	35.7–1.87
Space group	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 46.46, b = 63.07, c = 111.64$
Completeness (%)	99.4 (99.4)
Redundancy	3.6 (3.8)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	6.0 (19.3)
Average $I/\sigma(I)$	7.5 (3.7)
Total reflections	242862
Unique reflections	27816

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$, where I_i is the intensity of the i th observation and $\langle I \rangle$ is the mean intensity of the reflections.

efficiency of the crystal and the synchrotron-radiation flux of the LNLS storage ring (Polikarpov, Teplyakov *et al.*, 1997; Teplyakov *et al.*, 1998). 100 images were recorded with an oscillation of 1° per image on a MAR CCD detector (Fig. 2). The data set was integrated and scaled using *MOSFLM* (Leslie, 1992) and *SCALA*. Data-collection statistics are given in Table 1.

3. Results and discussion

Initial screening of crystallization conditions resulted in a crystal appropriate for data collection, which diffracted to 1.9 Å resolution at a synchrotron beamline. Initial analysis of the solvent content by determining the Matthews coefficient (Matthews, 1968) suggested that the asymmetrical unit could accommodate one molecule with 46% solvent content. Molecular replacement using *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 1997) and chain A of the crystal structure of the catalytic domain of human tyrosine-protein phosphatase β (PDB code 2ahs) as a search model resulted in a clear solution with a single molecule in the asymmetric unit. The top solution after rotation function had a value of 10.64 σ , in contrast to 4.36 σ for the second solution. The best solution after translation function had a score of 0.427 and an R factor of 0.569. Simulated annealing performed with *CNS* (Brünger *et al.*, 1998) using this solution and following a slow-cooling protocol led to a structure with an R factor of 0.361 and $R_{\text{free}} = 0.396$. Structural refinement is in progress.

SCALA and *MOLREP* are programs from the *CCP4* suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

This work was supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant Nos. 04/08070-9 and 06/00182-8 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientí-

fico e Tecnológico (CNPq). The authors thank Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) for technical support during data collection.

References

- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. & Mustelin, T. (2004). *Cell*, **117**, 699–711.
- Ardini, E., Agresti, R., Tagliabue, E., Greco, M., Aiello, P., Yang, L. T., Ménard, S. & Sap, J. (2000). *Oncogene*, **19**, 4979–4987.
- Barford, D., Das, A. K. & Egloff, M. P. (1998). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 133–164.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). *Acta Cryst.* **D54**, 905–921.
- Chagnon, M. J., Uetani, N. & Tremblay, M. L. (2004). *Biochem. Cell Biol.* **82**, 664–675.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- den Hertog, J. (1999). *Mech. Dev.* **85**, 3–14.
- Fischer, E. H., Charbonneau, H. & Tonks, N. K. (1991). *Science*, **253**, 401–406.
- Honda, H., Inazawa, J., Nishida, J., Yazaki, Y. & Hirai, H. (1994). *Blood*, **15**, 4186–4194.
- Jia, Z., Barford, D., Flint, A. J. & Tonks, N. K. (1995). *Science*, **268**, 1754–1758.
- Kolmodin, K. & Åqvist, J. (2001). *FEBS Lett.* **498**, 208–213.
- Krueger, N. X., Streuli, M. & Saito, H. (1990). *EMBO J.* **9**, 3241–3252.
- Leslie, A. G. W. (1992). *Jnt CCP4/ESF-EAMCB Newsl. Protein Crystallogr.* **26**.
- Martelli, M. L., Trapasso, F., Bruni, P., Berlingieri, M. T., Battaglia, C., Vento, M. T., Belletti, B., Iuliano, R., Santoro, M., Viglietto, G. & Fusco, A. (1998). *Exp. Cell Res.* **245**, 195–202.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Mustelin, T., Abraham, R. T., Rudd, C. E., Alonso, A. & Merlo, J. J. (2002). *Front. Biosci.* **7**, 918–969.
- Okazaki, K. & Sagato, N. (1995). *EMBO J.* **14**, 5048–5059.
- Ostman, A., Yang, Q. & Tonks, K. (1994). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 9680–9684.
- Polikarpov, I., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. C., Arruda, P., Leite, A. & Craievich, A. (1997). *Nucl. Instrum. Methods A*, **405**, 159–164.
- Polikarpov, I., Perles, L. A., de Oliveira, R. T., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. & Craievich, A. (1998). *J. Synchrotron Rad.* **5**, 72–76.
- Polikarpov, I., Teplyakov, A. & Oliva, G. (1997). *Acta Cryst.* **D53**, 734–737.
- Ruivenkamp, C. A. L. *et al.* (2002). *Nature Genet.* **31**, 295–300.
- Saito, H. (1993). *Cell Biol.* **4**, 379–387.
- Santos, M. A. M., Santos, S. M., Matoso, H. C., Portugal, R. V., Iuliano, R., Fusco, A. & Polikarpov, I. (2005). *Protein Expr. Purif.* **41**, 113–120.
- Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Fauman, E. B., Zhang, Z. Y., Dixon, J. E. & Saper, M. A. (1994). *Nature (London)*, **370**, 571–575.
- Teplyakov, A., Oliva, G. & Polikarpov, I. (1998). *Acta Cryst.* **D54**, 610–614.
- Trapasso, F., Iuliano, R., Boccia, A., Stella, A., Visconti, R., Bruni, P., Baldassarre, G., Santoro, M., Viglietto, G. & Fusco, A. (2000). *Mol. Cell Biol.* **20**, 9236–9246.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022–1025.
- Zhang, L., Martelli, M. L., Battaglia, C., Trapasso, F., Cerutti, J., Tramontano, D., Viglietto, G., Porcellini, A., Santoro, M. & Fusco, A. (1997). *Exp. Cell Res.* **235**, 62–70.

ANEXO C

MATOZO, H. C. ; SANTOS, M. A. M. ; Mario de Oliveira Neto ; BLEICHER, L. ; Lima L.M.T.R. ; FUSCO, A. ; IULIANO, R. ; POLIKARPOV, I. . Low-resolution structure of the rat protein tyrosine phosphatase eta catalytic domain revealed homodimerization in solution. Biophysical Journal, v. 92, p. 4424, 2007. DOI: 10.1529/biophysj.106.094961

Low-Resolution Structure and Fluorescence Anisotropy Analysis of Protein Tyrosine Phosphatase η Catalytic Domain

Huita C. Matozo,* Maria A. M. Santos,* Mario de Oliveira Neto,* Lucas Bleicher,* Luís Mauricio T. R. Lima,[†] Rodolfo Iuliano,[‡] Alfredo Fusco,[§] and Igor Polikarpov*[¶]

*Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Física e Informática, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil; [†]Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; [‡]Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Catanzaro, Catanzaro, Italy; [§]Centro di Endocrinologia e Oncologia Sperimentale del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II", Naples, Italy; and [¶]Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, Brazil

ABSTRACT The rat protein tyrosine phosphatase η , rPTP η , is a class I "classical" transmembrane RPTP, with an intracellular portion composed of a unique catalytic region. The rPTP η and the human homolog DEP-1 are downregulated in rat and human neoplastic cells, respectively. However, the malignant phenotype is reverted after exogenous reconstitution of rPTP η , suggesting that its function restoration could be an important tool for gene therapy of human cancers. Using small-angle x-ray scattering (SAXS) and biophysical techniques, we characterized the intracellular catalytic domain of rat protein tyrosine phosphatase η (rPTP η CD) in solution. The protein forms dimers in solution as confirmed by SAXS data analysis. The SAXS data also indicated that rPTP η CD dimers are elongated and have an average radius of gyration of 2.65 nm and a $D_{\max}$ of 8.5 nm. To further study the rPTP η CD conformation in solution, we built rPTP η CD homology models using as scaffolds the crystallographic structures of RPTP α -D1 and RPTP μ -D1 dimers. These models were, then, superimposed onto ab initio low-resolution SAXS structures. The structural comparisons and sequence alignment analysis of the putative dimerization interfaces provide support to the notion that the rPTP η CD dimer architecture is more closely related to the crystal structure of autoinhibitory RPTP α -D1 dimer than to the dimeric arrangement exemplified by RPTP μ -D1. Finally, the characterization of rPTP η CD by fluorescence anisotropy measurements demonstrates that the dimer dissociation is concentration dependent with a dissociation constant of $21.6 \pm 2.0 \mu\text{M}$.

INTRODUCTION

Protein tyrosine phosphorylation is a reversible posttranslational modification involved in regulation of physiological processes as well as human health and disease. The antagonistic activities of protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine phosphatases (PTPs) dictate the intracellular levels of protein tyrosine phosphorylation, one of the most important eukaryotic cell signaling mechanisms (1–4). The increasing number and diversity of protein tyrosine kinases and phosphatases has been directly related to the increase in eukaryotic complexity. In recent years it became evident that, like PTKs, the PTPs play important roles in many cellular processes such as embryogenesis, organ development, tissue homeostasis, the immune system, fertilization, cell migration, and proliferation (5–7). The protein tyrosine phosphatases belong to a large group of enzymes that are subdivided into four main families based on the amino acid sequence of their catalytic domains and substrate specificity (8). The class I cysteine-based PTPs constitute by far the largest group and contain the 38 strictly tyrosine-specific PTPs. The "classical PTPs" can be further divided into transmembrane, receptor-like enzymes (RPTPs), and the intracellular, nonreceptor PTPs (NRPTPs), all sharing an intracellular catalytic domain

of ~240 residues. Its active site bears a signature motif (PIVVHCSAGvGRTG) where the catalytically essential cysteine and arginine are separated by five residues (9,10). The crystal structures of all known RPTP catalytic domains revealed a common architecture comprising: a globular fold that consists of an eight-stranded twisted β -sheet flanked by four α -helices on one side and another one on the opposite side; the PTP signature motif located at the bottom of the catalytic site cleft; and four loops, three of which provide residues needed for catalysis and substrate specificity (11–13).

The rat protein tyrosine phosphatase η , rPTP η , is a class I "classical" transmembrane RPTP, and like its human counterpart (also known as DEP-1, PTPRJ, RPTP η , and CD148) it is a ubiquitous gene. In fact, rPTP η is expressed in all studied tissues, including brain, liver, spleen, thyroid, and endothelial cells. The receptor-like rPTP η consists of an extended extracellular region containing eight fibronectin type III motifs, a short transmembrane domain, and an intracellular portion composed of a unique catalytic region (14). Soon after its discovery, it was reported that rPTP η expression is regulated by the two main thyroid regulatory pathways, suggesting its involvement in both growth and differentiation of thyroid cells (15). Further observations demonstrated that rPTP η and the human homolog DEP-1 are downregulated in rat and human neoplastic cells, respectively. However, the malignant phenotype can be reverted after exogenous reconstitution of rPTP η through increasing levels of cell cycle inhibitor p27^{Kip1} and dephosphorylation of PLC γ 1, a substrate

Submitted August 12, 2006, and accepted for publication February 22, 2007.

Address reprint requests to Igor Polikarpov, Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Física e Informática, Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador São Carleense, 400, CEP 13566-590 São Carlos, SP, Brazil. Tel.: 55-16-3373-8088; Fax: 55-16-33739881; E-Mail: ipolikarpov@ifsc.usp.br.

© 2007 by the Biophysical Society

0006-3495/07/06/4424/09 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.106.094961

of DEP-1 (16–19). It was also demonstrated that the PTP η protein is capable of binding to c-Src in living cells. The dephosphorylation of the negative regulatory tyrosine (Tyr-529 of the c-Src family protein tyrosine kinases) increases c-Src tyrosine kinase activity in malignant rat thyroid cells stably transfected with rPTP η (20). Besides, the implication of PTP η as a possible candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus, *Sec1*, came to reinforce the idea that restoration of rPTP η function could be a useful tool for gene therapy of human cancers (21–23).

Although the process of RPTP activity regulation remains elusive, one of the proposed structural mechanisms involves formation of an autoinhibitory dimeric quaternary structure. Structural evidence supporting such a mechanism came from the crystal structure of RPTP α -D1 (24). RPTP α -D1 was crystallized as a dimer with two active sites facing each other and the amino-terminal helix-turn-helix wedge-like segment of each monomer blocking the opposing active site (24). In addition, functional inhibition of RPTPs was observed in ligand-induced dimerization of EGFR/CD45, a chimeric protein containing the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR), and the intracellular domain of the RPTP, CD45 (25), as well as in the full-length mutants of RPTP α assembled as stable disulphide-bonded homodimers (26,27). By contrast, the crystal structures of both RPTP μ -D1 that shares 46% sequence identity with RPTP α -D1 reveal completely different dimer formation. The RPTP μ -D1 dimer has neither the catalytic sites nor the amino-terminal helix-turn-helix segment participating in protein-protein interactions (28). Taking these results together one can conclude that although dimerization seems likely to be of physiological relevance in blocking the biological activity of RPTP α and CD45, it might not be a general mechanism of RPTP inhibition.

In this study, we conducted a structural and biophysical characterization of rPTP η catalytic domain with use of small angle x-ray scattering (SAXS), homology modeling, amino acid sequence alignment, and fluorescence anisotropy techniques, aiming to determine the protein molecular shape and its oligomeric state in solution and to shed more light onto the putative autoinhibitory mechanism that might control rPTP η enzymatic activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein expression and purification

The catalytic domain of rPTP η has been subcloned, expressed, and purified as described in Santos et al. (29). Briefly, the cloned construct contained the open reading frame of the intracellular region of rPTP η (W875-A1216) fused at its N-terminus with the 34 additional amino acid residues (MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGS) derived from pET-28a(+) vector that included the cluster of six histidine residues for protein purification by metal affinity chromatography. BL21 (DE3) cells harboring the plasmid containing rPTP η CD insert were grown at 30°C in 2 $\times$ YT plus 50 μ g/ml kanamycin with shaking until the absorbance at 600

nm reached 0.6–0.8. At this point, 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside was added to induce His⁶-rPTP η CD expression and cells were incubated at 30°C for 4 h. The induced bacteria were harvested by centrifugation at 6000 $\times$ g in a Sorvall RC-5C Plus centrifuge at 4°C for 20 min. Bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8; 100 mM NaCl; 10% glycerol; 10 mM imidazol; 2 mM β -mercaptoethanol) containing 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride and 0.5 mg/ml of lysozyme (Sigma, St. Louis, MO). The suspension was incubated on ice for 30 min to lyse cells. The lysate was further disrupted by sonication to reduce viscosity. Centrifugation was done at 14,000 $\times$ g for 1 h to obtain the clear crude protein preparation. Talon Superflow resin (Clontech, Palo Alto, CA), pre-equilibrated with equilibration buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8; 300 mM NaCl; 10% glycerol; 10 mM imidazol; 2 mM β -mercaptoethanol) was mixed with the clear lysate and left rotating at 4°C for 1 h. The mixture of resin and supernatant was mounted into a c16/10 glass column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and connected to a high-performance liquid chromatography ÄKTA purifier (Amersham Biosciences). The tightly bound proteins were eluted with buffer containing 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8; 50 mM NaCl; 10% glycerol; 300 mM imidazol; 2 mM β -mercaptoethanol. The His⁶-rPTP η CD was further purified by size exclusion chromatography on a Superdex 200 HL 26/60 column (Amersham Biosciences) using as eluent Hepes buffer (20 mM Hepes, pH 7.8; 200 mM NaCl; 5% glycerol; 1 mM dithiothreitol). All purification procedures were carried out at 4°C. Soluble His⁶-rPTP η CD (molecular weight of 43,000) was concentrated to 1 mg/ml and incubated with 0.5 units/ml bovine thrombin protease for 18 h at 18°C followed by dialysis against Hepes buffer. The thrombin cleaved rPTP η CD (molecular weight of 41,000) was, then, frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C (29).

Protein concentration measurements

Protein concentration was determined by the method of Bradford (30) with bovine serum albumin (Sigma) as reference standard, using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Small-angle x-ray scattering measurements and scattering data analysis

Small-angle x-ray scattering experiments were carried out at the SAS beam line on the Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (Campinas, São Paulo, Brazil), using a one-dimensional position-sensitive detector (31). SAXS data were collected at a wavelength 0.148 nm for sample-detector distance of 1046.3 mm to give a q -range from 0.28 nm^{–1} to 3.40 nm^{–1} ($q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, where 2θ is the scattering angle). rPTP η CD concentrations between 3 and 13 mg/ml were prepared in Hepes containing 200 mM NaCl and maintained at a constant temperature of 4°C during the measurements. The scattering curves of the protein solutions and buffers were collected in several successive frames of 100 s each to avoid radiation-induced protein damage. The data reduction included normalization of the one-dimension scattered data to the intensity of the transmitted incident beam; correction for the detector response; and subtraction of the scattering of the buffers. After scaling all scattered curves for protein concentration, the composed scattering curves were constructed by merging the low angle data (<0.85 nm^{–1}) obtained at 3 mg/ml with the high angle data, measured at 13 mg/ml, which were, then, used in ab initio model reconstruction.

Guinier analysis (32) was applied to determine the radii of gyration (R_g) of rPTP η CD in solution. The R_g and the scattered intensity, $I(q)$, were inferred, respectively, from the slope and the intercept of the linear fit of $\ln[I(q)]$ vs. q^2 in the q -range $q \times R_g < 1.0$. The same parameter was also obtained from the theoretical fit of the merged curve by the indirect Fourier transform program GNOM (33), which also evaluated the distance distribution function, $p(r)$, of rPTP η CD. The maximum dimension, $D_{\max}$, was estimated from the $p(r)$ function as the distance, r , where $p(r)$ goes down to zero.

Ab initio molecular shape determination and DAMAVER program

Ab initio models were calculated using the well-established reconstruction method DAMMIN, to determine the conformation in solution of rPTP η CD (34). Using the simulated annealing method, the program searches for the best dummy atom model (DAM) that fits the experimental data through minimizing the discrepancy function, $f(X)$, between the calculated and experimental curves. A looseness penalty ensures the compactness and connectivity of the solution, Eq. 1, where $\alpha > 0$ is the positive weight of the looseness penalty, $\alpha P(X)$.

$$f(X) = \chi^2 + \alpha P(X). \quad (1)$$

The overall shape of the protein was restored from the complete range of q ($0.28 \text{ nm}^{-1} < q < 3.40 \text{ nm}^{-1}$), which allowed a reasonable resolution for the discrete DAM. In each of 20 independent low-resolution reconstructions of molecular shape, a sequence of 87 ± 3 independent runs was carried out to obtain the most probable model without imposing any symmetry constraints. During this procedure, a constant was subtracted from the experimental data to ensure that the intensity at higher angles decays as q^{-4} following Porod's law for the homogeneous particles (35). The value of the constant was derived automatically from the outer part of the curve by linear fitting in coordinates $q^4 I(0)$ versus q^4 by the program DAMMIN.

DAMMAVER was used for automated analysis and averaging of multiple reconstructions, permitting both to analyze the stability of the reconstruction convergence and to yield the most probable particle model (36,37).

Homology model building of rPTP η CD

The coordinate sets for the monomeric and dimeric crystallographic structures of the catalytic domain (D1) of mouse RPTP α and human RPTP μ were obtained from the Protein Data Bank (PDB) codes 1YFO and 1RPM, respectively (24,28). The R_g , D_{max} , and scattering curves were calculated from the dimeric structures by the program CRYSOLO (38), taking into account the influence of the hydration shell.

Computer models for the three-dimensional (3D) structure of rPTP η CD were constructed using homology modeling, which requires available 3D structures as templates. The mouse protein tyrosine phosphatase α has 43.21% identity to the rPTP η CD sequence, and it was selected as the template for homology model generation with the Modeller program (39). We produced 100 models, each of which was validated using the programs Procheck (40,41), Whatcheck (42), and Verify3D (43,44). The best model was chosen using as criteria the energy function calculated by the Modeller program, the Ramachandran plot, and absence of structural anomalies. The best homology model was superimposed with the dimeric crystallographic structures of RPTP α -D1 and RPTP μ -D1 using SUPCOMB (36), which computes and carries out best-matching alignment of the 3D models. The same program was used for superpositions of high-resolution models with ab initio low-resolution structures derived from experimental solution-scattering data.

Fluorescence anisotropy measurements

Fluorescence anisotropy experiments were carried on the ISS PC1 spectrofluorimeter equipped with Glan-Thompson polarizers (ISS, Champaign, IL). rPTP η CD at a concentration of 0.22 mM was labeled by incubation with 1 mM fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma) in Hepes buffer (20 mM Hepes, pH 7.8; 200 mM NaCl; 5% glycerol; 1 mM DTT), at 4°C for 3 h. Free FITC was separated from labeled rPTP η CD using Hitrap desalting column (GE Healthcare, Madison, WI) equilibrated with Hepes buffer. Protein labeling was confirmed by absorbance spectrophotometry, showing both protein and fluorescein contributions in the absorption spectra. The labeling efficiency was of ~ 0.24 mol fluorescein per mol protein, as calculated from

$$\text{FITC/rPTP}\eta(\text{mol/mol}) = (A^{494}/\epsilon_{\text{FITC}}^{494}) / [(A^{280} - A^{494}) * (\epsilon_{\text{FITC}}^{280}/\epsilon_{\text{FITC}}^{494})] / \epsilon_{\text{rPTP}\eta}^{280}, \quad (2)$$

where A^{280} and A^{494} are the absorption at 280 and 494 nm, respectively, $\epsilon_{\text{FITC}}^{494} = 68,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, and $\epsilon_{\text{FITC}}^{280} = 20,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ are the extinction coefficient for protein-bound FITC at 280 and 494 nm, respectively (45,46). $\epsilon_{\text{rPTP}\eta}^{280} = 63,050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ is the extinction coefficient for rPTP η catalytic domain at 280 nm calculated on the basis of its amino acid sequence (residues W875-A1216 of rPTP η ; "Protein expression and purification" section) assuming six tryptophan residues, 20 tyrosine residues, and at most two cysteines (47). The low efficiency of labeling, probably due to the pH and temperature conditions used in the reactions, is advantageous because it diminishes the chances of self-transfer between fluorophores on the same protein molecule.

Fluorescein-rPTP η CD at a concentration of 10 nM was titrated with unlabeled rPTP η CD at 20°C in Hepes buffer. Fluorescence anisotropy of the labeled solution of rPTP η CD was excited at 480 nm and emission measured through a band-pass filter with a cutoff of 50% at 515 nm, as previously described (48). For each concentration of unlabeled protein, the data point represents the mean of at least five measurements after stabilization. The resulting anisotropy change was used to calculate the dissociation equilibrium constant by adjusting Eq. 3 to the experimental data:

$$f_d = [\text{rPTP}\eta\text{CD}] / (K_d + [\text{rPTP}\eta\text{CD}]), \quad (3)$$

where f_d is the fraction of protein dimers and K_d is the dissociation constant. As the association led to a discrete increase in fluorescence intensity ($\sim 40\%$), we applied correction:

$$f_d = (A_{\text{obs}} - A_m) / [(A_{\text{obs}} - A_m) + (F_d/F_m)(A_d - A_{\text{obs}})], \quad (4)$$

where A_{obs} , A_m , and A_d are, respectively, the rPTP η CD-labeled anisotropy values observed at a given concentration of unlabeled rPTP η CD, for the monomeric rPTP η CD and dimeric rPTP η CD (49). The corrections performed on changes in fluorescence intensity make use of the total fluorescence intensity I_T directly provided by the instrument software, according to:

$$I_T = I_{\parallel} + 2I_{\perp}, \quad (5)$$

where $I_{\parallel}$ and $I_{\perp}$ are, respectively, the time-independent steady-state values for fluorescent intensity polarized parallel and perpendicular to that of the excitation beam. Binding data were analyzed using SigmaPlot 2002 Windows Version 8.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Small-angle x-ray scattering measurements demonstrate that rPTP η CD is capable of dimer formation

The biological activity of the purified rPTP η CD was tested in vitro by hydrolysis assay. The results demonstrated that rPTP η CD was active and able to hydrolyze p-nitrophenyl phosphate (29). To obtain information about the size, molecular shape, and oligomeric state of rPTP η CD in solution, we submitted the protein to small-angle x-ray scattering analysis. rPTP η CD x-ray scattering curve is shown in Fig. 1 A. The Guinier analysis, in the q^2 -range from 0.08 to 0.24 nm^{-2} , reproducibly gave estimates of 2.59 nm for the radius of gyration of rPTP η CD. The linearity of the Guinier plot indicated that rPTP η CD preparation was monodisperse and constituted mainly by unique oligomeric species (Fig. 1 A, inset).

The pair-distance distribution function $p(r)$ was obtained by the inverse Fourier transform of the rPTP η CD scattering data, using the program GNOM (33). Analysis of the $p(r)$

FIGURE 1 Small angle x-ray scattering curves. (A) Experimental solution scattering curve of rPTP η CD and results of the fitting procedures. Intensity curves from rPTP η CD are shown as logarithm (log I) versus the momentum transfer q scale, with an inset containing the correspondent Guinier plots (log I vs. q^2). The desmeared experimental curve (open squares) denotes the SAXS data and the error bars indicate the standard uncertainty in the measurement. The dashed curve corresponds to the best-fit model produced by DAMMIN (34). The black solid line is the theoretical scattering intensity from the dimer homology model based on the RPTP α -D1 (PDB code, 1YFO). The gray solid line is the scattering intensity computed from the dimer homology model based on the RPTP μ -D1 crystal structure (PDB code, 1RPM). (B) Distance distribution function of rPTP η CD. The $p(r)$ values of rPTP η CD (open squares) computed from the experimental scattering curves by the indirect Fourier transform program GNOM (33). The maximum dimension ($D_{\max}$) is equal to 8.50 ± 1.00 nm. The black solid curve corresponds to $p(r)$ derived from dimer homology model based on the RPTP α -D1 dimer. The $p(r)$ derived from dimer homology model based on the dimer of RPTP μ -D1 is given as a gray solid line. The distance distribution function for RPTP α -D1 dimer is clearly more similar to the experimentally derived $p(r)$ for rPTP η CD than the one calculated on the basis of RPTP μ -D1 dimer model.

function led us to conclude that the protein has an elongated form with a $D_{\max}$ of 8.50 ± 1.00 nm (Fig. 1 B). The value of 2.65 ± 0.02 nm for R_g calculated from the distance distribution function is in good agreement with the estimate

derived from the Guinier analysis (Table 1). To compare rPTP η CD with the existing high-resolution structures, we also computed the theoretical scattering curves and the pair-distance distribution function for the crystal structures of RPTP α -D1 and RPTP μ -D1 dimers by using the program CRY SOL (38) (Fig. 1, A and B). The radii of gyration observed for RPTP α -D1 and RPTP μ -D1 were 2.72 and 2.82 nm, and the $D_{\max}$ values were 9.95 and 9.50 nm, respectively. Comparison of these simulated SAXS curves with the experimental data for rPTP η CD revealed discrepancy values for RPTP α -D1 and RPTP μ -D1 of 1.47 and 2.22, respectively, for RPTP α -D1 and RPTP μ -D1. SAXS results reveal that in solution at the concentrations studied the rPTP η CD appears predominantly as dimers with a molecular shape similar to that of RPTP α -D1 (Fig. 1, A and B, and Table 1). The dimeric state of rPTP η CD also was confirmed by native gel electrophoresis (not shown).

Ab initio molecular shapes of rPTP η CD and its high-resolution models

The ab initio low-resolution structure of rPTP η CD was determined from the SAXS data using the program DAMMIN (34) without any symmetry constraints (Table 1). An average of 10 independently generated dummy atom models produced by the DAMAVER package fitted well the experimental x-ray scattering curve ($\chi = 1.06$; Table 1). The low-resolution rPTP η CD dimer has an elongated “cigar-like” shape with $\sim 3:1$ ratio between its longest and shortest dimensions (Fig. 2). Given that the dimeric arrangement is important for rPTP η function, we attempted to model it using as templates the homologous RPTP α -D1 and RPTP μ -D1 dimer.

The rPTP η CD dimer homology models based on the RPTP α -D1 and RPTP μ -D1 crystal structures templates were automatically superposed, using the program SUPCOMB (36), as rigid bodies with the ab initio low-resolution structure of the protein (Figs. 2 and 3). After automated best-matching alignment procedure, visual analysis clearly indicates that RPTP α -style dimer (Fig. 2) fits the rPTP η CD low-resolution structure better than the RPTP μ -D1-based homology model (Fig. 3). Furthermore, in the case of the RPTP α -D1-type

TABLE 1 Structural parameters

Parameter/sample	rPTP η CD			
	Exp ^a	rPTP α	rPTP μ	DAM [†]
$D_{\max}$ (nm)	8.50 ± 1.00	9.95	9.5	8.72
R_g (nm)	2.65 ± 0.02	2.72	2.82	3.35
Free parameters	8 [‡]	—	—	1926 [§]
Discrepancy χ	—	1.47	2.22	1.06
Resolution (nm)	1.85 [¶]	—	—	1.85 [¶]

^aExp, calculated from the experimental data.

[†]DAM, parameters of the dummy atoms models averaged over 10 models.

[‡]Number of Shannon channels is given $N_s = [D_{\max}(q_{\max} - q_{\min})]/\pi$.

[§]Symmetry not imposed.

[¶]Resolution is calculated as $2\pi/q_{\max}$.

FIGURE 2 Three orthogonal stereoviews of the ab initio low-resolution rPTP η CD structure superposed with the dimeric homology model of rPTP η CD based on the crystallographic structure of RPTP α -D1. The figure was prepared using PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA; <http://www.pymol.org>).

dimer, the normalized spatial discrepancy (NSD) value is equal to 0.823, whereas for the dimer of RPTP μ -D1-type the NSD value was 0.993. Because we can assume structural similarity between models with NSD values <1 (41), these results provide further support to the idea that in solution rPTP η CD forms dimers with the molecular shape resembling the dimer arrangement revealed by the crystallographic structure of RPTP α -D1.

To gain more data with respect of rPTP η CD dimerization mode, we compared amino acid sequence composition at the putative dimer interfaces of the two proposed models with that of the dimerization interface of RPTP α -D1 and RPTP μ -D1 (Fig. 4). Although the overall sequence identity between rPTP η CD and these two phosphatases is similar (43.21% for

FIGURE 3 Three orthogonal stereoviews of the homology model of the putative rPTP η CD dimer based on the crystallographic structure of RPTP μ -D1 superposed on the low-resolution ab initio rPTP η CD molecular envelope. The figure was prepared using PyMOL (DeLano Scientific).

RPTP α -D1 and 45.16% for RPTP μ -D1), the same is not true for the dimerization regions: 17 out of 30 residues (56.7%) on the dimerization interface of RPTP α -D1 are conserved in rPTP η CD, whereas only five out of 19 residues (26.3%) are conserved in rPTP η CD at the dimerization interface of RPTP μ -D1 (Fig. 5). This lends further support to the hypothesis that rPTP η dimerization might be similar to the RPTP α dimer architecture in which the N-terminal helix-turn-helix segment of the dyad-related monomer sterically blocks the opposite active site.

Fluorescence anisotropy measurements provide an equilibrium dissociation constant of the rPTP η CD dimers

To determine the equilibrium dissociation constant of the rPTP η CD dimer, we labeled the recombinant protein with

	875		924
rPTP η	WPKKRPDAFN	NEVSFSQIKP	KKSKLIMVEN
rPTP α -D1	.....SPSTN	RKYPLPVDK	LEERINRMA
rPTP μ -D1	.....AIRVAD	LLQHITQMKC	AEYGFKEEY
	925		973
rPTP η	EDKLIGISL	PKYAAIAEN	RGKRYVMVL
rPTP α -D1	NALPACPIQA	TCEAASKEN	KEKRYVMVL
rPTP μ -D1	ESFFEGQ.SA	PWDSAKKDN	RMKRYGNII
	974		1023
rPTP η	INANYMPCYH	SKEDFIATQC	PLENTLEDFW
rPTP α -D1	INASFINGYQ	EKNKPIAAQC	PKERTVMDFW
rPTP μ -D1	INGNYIDCYH	RPNHYIATQC	PMQRTIYDFW
	1024		1073
rPTP η	GRITCEHYWP	SHQAQDYCDI	TVAHTSEVVL
rPTP α -D1	KECKCAQYWP	DQGCWTYGNV	RVSVEDUTVL
rPTP μ -D1	GRVCKCKYWP	DEHRIYKDI	HTLITELL
	1074		1119
rPTP η	....LRQFHF	TSQPDHGVDP	TTDLLINFRY
rPTP α -D1	PQRLLIQFHF	TSQPDHGVDP	TPICMLKFLK
rPTP μ -D1	....LRQFHF	TSQPDHGVDP	HATGLLGVR
	1120		1169
rPTP η	ACVGRGTGTFI	AIDRLIYQIE	NENTVDVYCI
rPTP α -D1	ACVGRGTGTFV	VIDAMLDMMH	SEKVDVYCF
rPTP μ -D1	ACAGRTGCFI	VIDIMLDMAE	REGVVDIYNC
	1170		1216
rPTP η	LNQCVDLIIR	AGKSKVDLI	YQNTTAMTIY
rPTP α -D1	IYQALLEHY	LYGDTLEVT	ENLEPVSMFG
rPTP μ -D1	IHDAILAAC	L.....	.....

FIGURE 4 Sequence alignment for RPTPa-D1, RPTP μ -D1, and PTP η CD. The sequence of PTP η CD corresponds to the intracellular domain of the protein studied in current work (residues W875–A1216). The sequences of RPTPa-D1 and RPTP μ -D1 are of the polypeptide chains structurally defined in PDBs 1YFO and 1RPM, respectively. The residues at the dimerization interfaces are marked in gray (RPTPa-D1) and black (RPTP μ -D1). Residues in rPTP η CD amino acid sequence are gray when they match the correspondent residues of the RPTPa-D1 dimerization interface; they are black when identical to residues at the dimerization interface of RPTP μ -D1.

fluorescein isothiocyanate (FITC), which reacts with amino terminus of proteins and the α -amino group of lysines (50). Fluorescence spectra of both buffer and fluorescein-labeled rPTP η CD are shown in Fig. 6 A. Purified fluorescein-labeled rPTP η CD (FITC-rPTP η CD) at 10 nM shows an anisotropy value of ~ 0.085 (Fig. 6 B), which is compatible with a protein-bound fluorescein value but largely different from the typical values of free fluorescein anisotropy (of the order of 0.014). Equilibration of 10 nM FITC-rPTP η CD with increasing amounts of unlabeled rPTP η CD (from 7.2 nM to 36 μ M) led to an increase in fluorescein fluorescence anisotropy values, indicating multimerization (Fig. 6 B). Because we know from SAXS and native gel electrophoresis studies that at 50 μ M rPTP η CD is dimeric, these changes in anisotropy values as a function of rPTP η CD concentration are indicative of a monomer-dimer equilibrium. The rPTP η CD dimer dissociation constant of 21.6 ± 2.0 μ M was calculated by adjusting Eq. 3 to experimental data. This K_d corresponds to a Gibbs free-energy value of $\Delta G_{293K}^0 = 6.2$ kcal/mol.

On the basis of theoretical evaluations, it is expected that protein dissociation (from 10 to 90%) would occur within a protein concentration log span of 2.86 (51,52). Our experimental data demonstrate that rPTP η CD dimers dissociation presents a significantly shortened log span of 1.5. A similar behavior leading to a reduced span in the dimerization isotherms has already been observed for a number of proteins, such as malate dehydrogenase (53), yeast enolase (51), arc

repressor (54), and O2bZIP (55), to name a few. The deviations from the expected span in dimerization isotherms have been attributed to a conformational drift of the protein, i.e., a change in quaternary interactions affecting the structure and conformation of each subunit upon dimerization process (52). This indicates that subunits of the dimeric and monomeric species of rPTP η CD are conformationally different.

A number of RPTPs, as well as RPTKs, are known to function as transmembrane dimers and dimerization could be a common phenomenon for RPTPs in general (26,27,56). Although the dimeric interaction seen for soluble rPTP η CD is ~ 22 μ M, this affinity is expected to be enhanced substantially for the full-length receptors in the cell membrane. In fact, both local protein concentrations and monomer-monomer affinities could be significantly higher for the functional rPTP η dimers bound to the membrane of cell. Under these settings two extracellular domains of PTP η , each composed of eight fibronectin type 3 motifs, will also contribute to PTP η dimer formation. Membrane anchoring, which restricts both PTP η translational movement in the direction perpendicular to the membrane surface, and its rotational freedom around the axes within the membrane plane, will lead to further increase in association affinity of PTP η dimer. It has been argued that the binding affinities of the molecules in two-dimensional diffusion case are significantly (orders of magnitude) higher than observed in solution (57,58). Therefore, affinities of dimers association are

4430

Matozo et al.

FIGURE 5 Crystallographic structures of RPTP α -D1 and RPTP μ -D1. The dimerization interfaces of RPTP α -D1 and RPTP μ -D1 are shown as surfaces. (A) The residues of RPTP α -D1 that are conserved in rPTP η CD are shown in black; the nonconserved residues are painted in gray. (B) The same molecule as in panel A rotated by 180° across the vertical axis. (C) The residues of RPTP μ -D1 that are conserved in rPTP η CD are depicted in black; the ones that are nonconserved are given in gray. (D) The same molecule as in panel C rotated by 180° across the vertical axis. The figure was prepared using PyMOL (DeLano Scientific).

expected to be substantially enhanced, and equilibrium dissociation constants significantly diminished, under conditions of the full-length rPTP η s anchored in the membrane.

CONCLUSIONS

Dimerization is a well-established regulatory mechanism for activation of RPTKs and is likely to be involved in regulation of RPTPs. Although many protein tyrosine phosphatases have two intracellular domains, only the plasma membrane-proximal domain (D1) has significant catalytic activity. Dimeric crystallographic structure of RPTP α -D1 revealed the presence of an NH₂-terminal helix-turn-helix segment interacting with the opposing monomer, in such a manner that both catalytic sites in the dimer are blocked (24). On the other hand, it has been shown that dimerization of Sap-1/PTPRH, a single intracellular domain RPTP, does not occur through its catalytic domain (59). Given a fact that rPTP η also has a unique catalytic domain, we studied its behavior in solution using synchrotron small-angle x-ray scattering, homology modeling, sequence alignment, and fluorescence anisotropy. Here, we provide the first *ab initio* low-resolution structure of rPTP η CD in solution restored at 1.85-nm resolution from synchrotron small-angle x-ray scattering data. The results from SAXS reveal that rPTP η CD forms dimers in solution. The fluorescence anisotropy demonstrates that the dimeric form of rPTP η CD is the predominant species in solution with a monomer-dimer equilibrium dissociation con-

FIGURE 6 Equilibrium fluorescence anisotropy. (A) Fluorescence spectra of buffer and fluorescein-labeled rPTP η CD. (B) Measurements of rPTP η CD dimer-monomer reaction were performed as described in experimental procedures. The results of three independent experiments are shown as raw anisotropy. (Inset) Fraction of association calculated from anisotropy values properly corrected for changes in fluorescence intensity. Solid line corresponds to the best fit of Eq. 3 to data, which yields a dissociation constant of $21.6 \pm 2.0 \mu\text{M}$ ($r^2 = 0.988$).

stant of $21.6 \pm 2.0 \mu\text{M}$ and a corresponding $\Delta G_{293\text{K}}^0$ equal to 6.2 kcal/mol. *Ab initio* SAXS model building, homology modeling, and sequence analysis data of the putative rPTP η CD dimeric interfaces taken together strongly indicate that rPTP η dimeric architecture might be closely related to that of RPTP α -D1. It is tempting to speculate that dimerization of rPTP η CD could be involved in the self-inhibition of its enzymatic activity. In this case the autoinhibitory mechanism would occur through the N-terminal wedge region-active site interactions as proposed for RPTP α -D1, a hypothesis amenable to further site-directed mutagenesis analysis, and *in vivo* and *in vitro* functional studies.

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grants No. 99/03387-4 and No. 06/00182-8) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- Hunter, T. 1987. A 1001 protein-kinases. *Cell*. 50:823–829.
- Hunter, T. 1995. Protein-kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein-phosphorylation and signaling. *Cell*. 80:225–236.
- Tonks, N. K., and B. G. Neel. 1996. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell*. 87:365–368.
- Neel, B. G., and N. K. Tonks. 1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:193–204.
- Chagnon, M. J., N. Uetani, and M. L. Tremblay. 2004. Functional significance of the LAR receptor protein tyrosine phosphatase family in development and diseases. *Biochem. Cell Biol.* 82:664–675.
- den Hertog, J. 1999. Protein-tyrosine phosphatases in development. *Mech. Dev.* 85:3–14.
- Mustelin, T., R. T. Abraham, C. E. Rudd, A. Alonso, and J. J. Merlo. 2002. Protein tyrosine phosphorylation in T cell signaling. *Front. Biosci.* 7:918–969.
- Fauman, E. B., and M. A. Saper. 1996. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 21:414–417.
- Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, and T. Mustelin. 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 117:699–711.
- Kolmodin, K., and J. Åqvist. 2001. The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited. *FEBS Lett.* 498:208–213.
- Jia, Z., D. Barford, A. J. Flint, and N. K. Tonks. 1995. Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*. 268:1754–1758.
- Stuckey, J. A., H. L. Schubert, E. B. Fauman, Z. Y. Zhang, J. E. Dixon, and M. A. Saper. 1994. Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate. *Nature*. 370:571–575.
- Barford, D., A. K. Das, and M. P. Egloff. 1998. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:133–164.
- Zhang, L., M. L. Martelli, C. Battaglia, F. Trapasso, D. Tramontano, G. Viglietto, A. Porcellini, M. Santoro, and A. Fusco. 1997. Thyroid cell transformation inhibits the expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase. *Exp. Cell Res.* 235:62–70.
- Martelli, M. L., F. Trapasso, P. Bruni, M. T. Berlingieri, C. Battaglia, M. T. Vento, B. Belletti, R. Iuliano, M. Santoro, G. Viglietto, and A. Fusco. 1998. Protein tyrosine phosphatase- ϵ expression is upregulated by the PKA-dependent and is downregulated by the PKC-dependent pathways in thyroid cells. *Exp. Cell Res.* 245:195–202.
- Trapasso, F., R. Iuliano, A. Boccia, A. Stella, R. Visconti, P. Bruni, G. Baldassare, M. Santoro, G. Viglietto, and A. Fusco. 2000. Rat protein tyrosine phosphatase ϵ suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27(Kip1). *Mol. Cell Biol.* 20:9236–9246.
- Florio, T., S. Arena, S. Thellung, R. Iuliano, A. Corsaro, A. Massa, A. Pattarozzi, A. Bajetto, F. Trapasso, A. Fusco, and G. Schettini. 2001. The activation of phosphotyrosine phosphatase ϵ (r-PTP ϵ) is responsible for the somatostatin inhibition of PC C13 thyroid cell proliferation. *Mol. Endocrinol.* 15:1838–1852.
- Iuliano, R., F. Trapasso, I. Le Pera, F. Schepis, I. Samà, A. Clodimiro, K. R. Dumon, M. Santoro, L. Chiariotti, G. Viglietto, and A. Fusco. 2003. An adenovirus carrying the rat protein tyrosine phosphatase ϵ suppresses the growth of human thyroid carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 63:882–886.
- Trapasso, F., S. Yendamuri, K. R. Dumon, R. Iuliano, R. Cesari, B. Feig, R. Seto, L. Infante, H. Ishii, A. Vecchione, M. J. During, C. M. Croce, and A. Fusco. 2004. Restoration of receptor-type protein tyrosine phosphatase ϵ function inhibits human pancreatic carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*. 25:2107–2114.
- Le Pera, I., R. Iuliano, T. Florio, C. Susini, F. Trapasso, M. Santoro, L. Chiariotti, G. Schettini, G. Viglietto, and A. Fusco. 2005. The rat tyrosine phosphatase ϵ increases cell adhesion by activating c-Src through dephosphorylation of its inhibitory phosphotyrosine residue. *Oncogene*. 24:3187–3195.
- Iuliano, R., I. Le Pera, C. Cristofaro, F. Baudi, F. Arturi, P. Pallante, M. L. Martelli, F. Trapasso, L. Chiariotti, and A. Fusco. 2004. The tyrosine phosphatase PTPRJ/DEP-1 genotype affects thyroid carcinogenesis. *Oncogene*. 23:8432–8438.
- Ruivenkamp, C. A., T. van Wezel, C. Zanon, A. P. M. Stassen, C. Vlcek, T. Csikos, A. M. Klous, N. Tripodis, A. Perrakis, L. Boerrigter, P. C. Groot, J. Lindeman, et al. 2002. Ptp η is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus Sccl and is frequently deleted in human cancers. *Nat. Genet.* 31:295–300.
- Ruivenkamp, C. A., M. Hermesen, C. Postma, A. Klous, J. Baak, G. Meijer, and P. Demant. 2003. LOH of PTPRJ occurs early in colorectal cancer and is associated chromosomal loss of 18q12–21. *Oncogene*. 22:3472–3474.
- Bilwes, A. M., J. den Hertog, T. Hunter, and J. P. Noel. 1996. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- α by dimerization. *Nature*. 382:555–559.
- Majeti, R., A. M. Bilwes, J. P. Noel, T. Hunter, and A. Weiss. 1998. Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science*. 279:88–91.
- Jiang, G., J. den Hertog, J. Su, J. Noel, J. Sap, and T. Hunter. 1999. Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase- α . *Nature*. 401:606–610.
- Jiang, G., J. den Hertog, and T. Hunter. 2000. Receptor-like protein tyrosine phosphatase α homodimerizes on the cell surface. *Mol. Cell Biol.* 20:5917–5929.
- Hoffmann, K. M. V., N. K. Tonks, and D. Barford. 1997. The crystal structure of domain 1 of receptor protein-tyrosine phosphatase μ . *J. Biol. Chem.* 272:27505–27508.
- Santos, M. A. M., S. M. Santos, H. C. Matozo, R. V. Portugal, R. Iuliano, A. Fusco, and I. Polikarpov. 2005. Expression, purification, and characterization of rat protein tyrosine phosphatase ϵ catalytic domain. *Protein Exp. Purif.* 41:113–120.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Kellermann, G., F. Vicentin, E. Tamura, M. Rocha, H. Tolentino, A. Barbosa, A. Craievich, and I. Torriani. 1997. The small-angle x-ray scattering beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory. *J. Appl. Crystallogr.* 30:880–883.
- Guinier, A., and G. Fournet. 1995. Small-Angle Scattering of X-rays. John Wiley & Sons, New York.
- Svergun, D. I. 1992. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using percentual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* 25:495–503.
- Svergun, D. I. 1999. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* 76:2879–2886.
- Porod, G. 1982. General theory. In *Small-Angle X-ray Scattering*. O. Glatter and O. Kratky, editors. Academic Press, London, UK. 17–51.
- Kozin, M. B., and D. I. Svergun. 2001. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J. Appl. Crystallogr.* 34:33–41.
- Svergun, D. I., and M. H. Koch. 2002. Advances in structural analysis using small-angle scattering in solution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:654–660.
- Svergun, D. I., C. Barberato, and M. H. Koch. 1995. CRYSOLE: a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* 28:768–773.
- Sali, A., and T. L. Blundell. 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234:779–815.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss, and J. M. Thornton. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26:283–291.
- Morris, A. L., M. W. MacArthur, E. G. Hutchinson, and J. M. Thornton. 1992. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*. 12:345–364.