INVESTIGAÇÃO SOBRE A REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE TCF4 (FATOR DE TRANSCRIÇÃO 4)

Palavras-Chave: FOSFORILAÇÃO, FATOR DE TRANSCRIÇÃO, DOENÇAS RARAS

Autores(as):
ERIN OHASHI ALEXANDRINO LEITE, IB – UNICAMP
Me. ISRAEL COSTA VASCONCELOS, IB – UNICAMP
Prof. Dr. FABIO PAPES, IB – UNICAMP
Prof. Dr. MARIO HENRIQUE BENGTSON (orientador), IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Estudos demonstram que o fator de transcrição 4 (TCF4) está envolvido no controle de proliferação e diferenciação de células do sistema nervoso, como NPCs (células progenitoras neurais) e oligodendrócitos (Papes et al., 2022; Phan et al., 2020; Sozańska et al., 2025). Variantes comuns de TCF4 foram ligadas a uma maior predisposição a desenvolver transtornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia, transtorno bipolar e estresse pós-traumático (Steinberg et al., 2011; Forrest et al., 2014; Jung et al., 2018; Teixeira et al., 2021). Além disso, a haploinsuficiência do fator de transcrição 4 causa a Síndrome de Pitt-Hopkins (PTHS) — uma síndrome do neurodesenvolvimento, caracterizada por deficiência intelectual, ausência de linguagem, estrutura facial distinta, problemas respiratórios e hipotonia (Amiel et al., 2007; Papes et al., 2022). Como a haploinsuficiência é a causa da síndrome, um caminho de tratamento possível é a super ativação da pouca quantidade de proteína restante presente nos pacientes, tendo como objetivo o retorno da atividade de TCF4 a níveis típicos. Em contextos celulares, a fosforilação é uma modificação pós-traducional que está associada a ativação e repressão da atividade de proteínas (Ardito et al., 2017), e, portanto, poderia ser responsável pela regulação de TCF4. Apesar da relevância desse fator de transcrição para diversos processos celulares, pouco é conhecido sobre sua regulação, e, portanto, há uma lacuna para estudo acerca das modificações pós-traducionais que podem influenciar em sua atividade, localização subcelular e estabilidade.

Análises em bancos de dados públicos, como o *PhosphoSitePlus*, contendo dados de fosfoproteômica, indicaram que seis resíduos de TCF4 são consistentemente fosforilados em tipos celulares e modelos diferentes (**Figura 1**). Com o objetivo geral de investigar a influência destas fosforilações sobre a atividade de TCF4, nós:

1. Alteramos os resíduos potencialmente fosforilados via mutagênese sítio-dirigida, de forma a gerar mutantes em que cada sítio de fosforilação é bloqueado (trocado por um aminoácido não fosforilável) bem como mutantes fosfomiméticos – em que aminoácidos com carga negativa e

estrutura similar da cadeia lateral em relação ao aminoácido original são introduzidos nas posições dos aminoácidos teoricamente fosforilados para mimetizar o efeito da fosforilação;

2. Testamos os efeitos dessas mutações na atividade de TCF4, usando um sistema repórter em que a expressão de GFP é regulada por um promotor responsivo a TCF4.

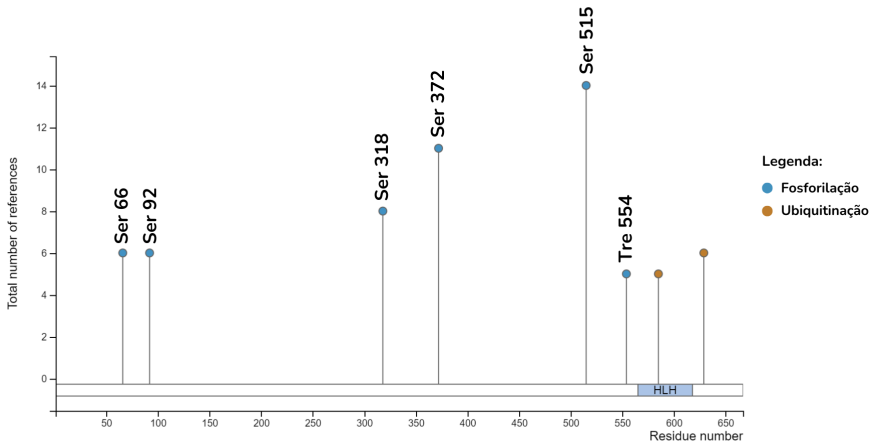

Figura 1: *Registros de fosforilação em TCF4. Adaptado do banco de dados PhosphoSitePlus v. 6.7.4. (27/02/2024)*

METODOLOGIA:

Extração de RNA e geração de cDNA a partir da linhagem celular SH-SY5Y, para gerar o plasmídeo TCF4 selvagem

O RNA total de células SH-SY5Y (Centro de Química Medicinal da Unicamp – CQMED) foi extraído e quantificado. Com base no RNA obtido, foi gerado cDNAs, a partir da transcrição reversa com *primer* oligoDT. Utilizando *primers* específicos para TCF4, realizou-se um PCR para obter o transcrito de TCF4, o qual foi clonado em um plasmídeo pcDNA3-C-FLAG, por meio da técnica LIC.

Gene repórter

O gene repórter se trata de uma construção com doze repetições da sequência reconhecida pelo fator de transcrição 4 (CANNTG) seguido da sequência para expressão de GFP (*Green Fluorescent Protein*). O plasmídeo foi adquirido pela *VectorBuilder.*

Mutação sítio-dirigida baseada em PCR

Um par de *primers* de mutagênese foi desenhado para cada sítio que se desejava modificar. Um PCR em duas etapas foi realizado, obtendo as mutações em apenas um códon como desejado. As mutações foram confirmadas por sequenciamento de Sanger.

Western Blotting

Células HEK293T (Centro de Química Medicinal da Unicamp – CQMED) foram plaqueadas em uma densidade de $1,2 \times 10^5$ células por poço de uma placa de 24 poços, em meio DMEM suplementado com 10% SFB, 1% Penicilina/estreptomicina. Depois de 24h, foi realizada a transfecção transiente com o protocolo de transfecção do reagente Lipofectamine 3000 (cat. L3000150) com os plasmídeos TCF4

(selvagem ou mutante) e Repórter, bem como os controles negativo (pUC19) e positivo (pCDNA3-C-GFP). Juntamente com tais construções, foi feita a transfecção de um plasmídeo mCherry como controle de eficiência de transfecção. Depois de 24h da transfecção, as células foram replaqueadas em placas de 12 poços. Após 48h de transfecção, as células foram lisadas em tampão de lise 1x RIPA e coletadas.

Para quantificar os lisados celulares, foi utilizado o kit Pierce BCA Protein Assay (cat. 23225). Foram carregados 40 ug de proteína total por poço (em Laemmli buffer) no gel de SDS-PAGE 10%. Após a corrida no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF. Para as marcações, foram utilizados os anticorpos primários anti-TCF4 na diluição 1:5000, anti-GFP na diluição 1:10000 e anti-GAPDH na diluição 1:10000. Depois, a incubação com os anticorpos secundários conjugados com fluorescência adequados para serem revelados no Odyssey CLx Imager (LI-COR).

Ensaio de fluorescência com mutantes de TCF4 e plasmídeo repórter visualizado em leitor de placa por fluorescência

Células HEK293T foram plaqueadas em uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células por cm^2 em meio FluoroBrite DMEM suplementado (5% SFB, 0,5x GlutaMAX, 0,5% Penicilina/estreptomicina) em placas de 96 poços. Depois de 24h, foi realizada a transfecção transiente com o protocolo de transfecção do reagente FuGENE (cat. E5912), com os plasmídeos TCF4 (selvagem ou mutante) e Repórter, bem como os controles pUC19, somente TCF4 e somente Repórter. Além dos plasmídeos anteriormente mencionados, foi realizada a transfecção de um plasmídeo mCherry como controle de eficiência de transfecção. Depois de 48h, a placa foi lida no leitor de fluorescência CLARIOstar (BMG Labtech).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após analisar os possíveis sítios de fosforilação, desenhamos primers e realizamos a mutagênese sítio-dirigida. O plasmídeo utilizado como template na mutagênese foi gerado a partir da clonagem do transcrito TCF4, advindo de células da linhagem SH-SY5Y (**Figuras 2A e 2B**). O vetor obtido, pCDNA3 C-Flag-LIC TCF4 wt, foi sequenciado por sequenciamento de Sanger, confirmando a clonagem correta de TCF4. Realizamos um Western Blot para confirmar a expressão da proteína TCF4 em células HEK293T (**Figura 2C**).

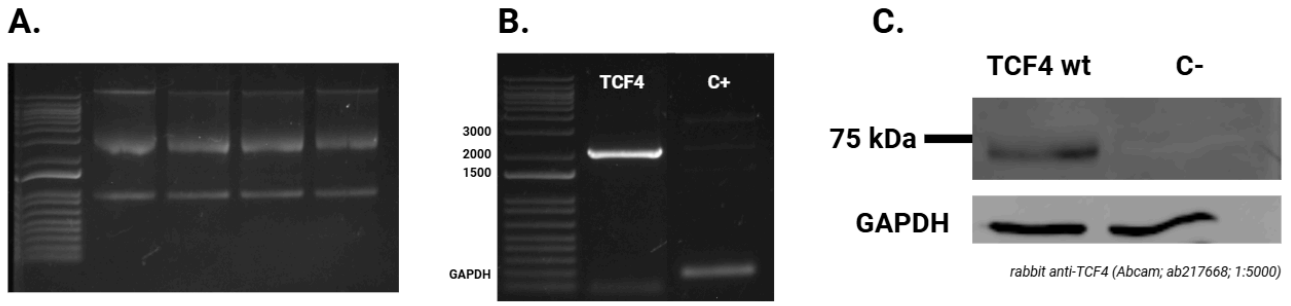

Figura 2: ***A.*** *Integridade do RNA extraído de SH-SY5Y.* ***B.*** *Produto de PCR amplificado utilizando primers para TCF4 após transcrição reversa. O controle positivo (C+) é uma reação para amplificação de GAPDH.* ***C.*** *Teste de expressão da construção TCF4 wt em células HEK293T. A proteína TCF4 tem um peso molecular esperado de 71kDa. O controle negativo (C-) utilizado foi pUC19, um plasmídeo vazio.*

Com essa construção como base, fomos capazes de gerar 18 construções com mutações pontuais nos sítios a serem investigados (**Tabela 1**). Essas construções também foram sequenciadas por sequenciamento de Sanger e confirmadas, garantindo que possuem apenas a mutação de interesse.

Tabela 1: *Relação de mutantes de TCF4 produzidos*

Relação dos dezoito mutantes construídos		
Resíduo	Fosforilação bloqueada	Fosfomimético
Ser 66	S66A	S66D, S66E
Ser 92	S92A	S92D, S92E
Ser 318	S318A	S318D, S318E
Ser 372	S372A	S372D, S372E
Ser 515	S515A	S515D, S515E
Tre 554	T554V	T554D, T554E

Para averiguar os níveis da proteína TCF4 sendo produzida nas células e comparar sua capacidade de transativação, realizamos um experimento de Western Blotting, em que TCF4 wt (selvagem) e mutantes foram superexpressos juntamente com o gene repórter (**Figuras 3A e 3B**). É possível notar os diferentes níveis de expressão de TCF4 entre os mutantes, o que sugere que a fosforilação em alguns resíduos (em particular S66) poderia ser responsável por mudanças na estabilidade da proteína. Além disso, as diferenças de expressão de GFP (que parece confirmar os ensaios de fluorescência) sugerem que a capacidade de transativação de alguns mutantes é diferente, o que poderia mostrar um papel da fosforilação na regulação da atividade deste fator de transcrição.

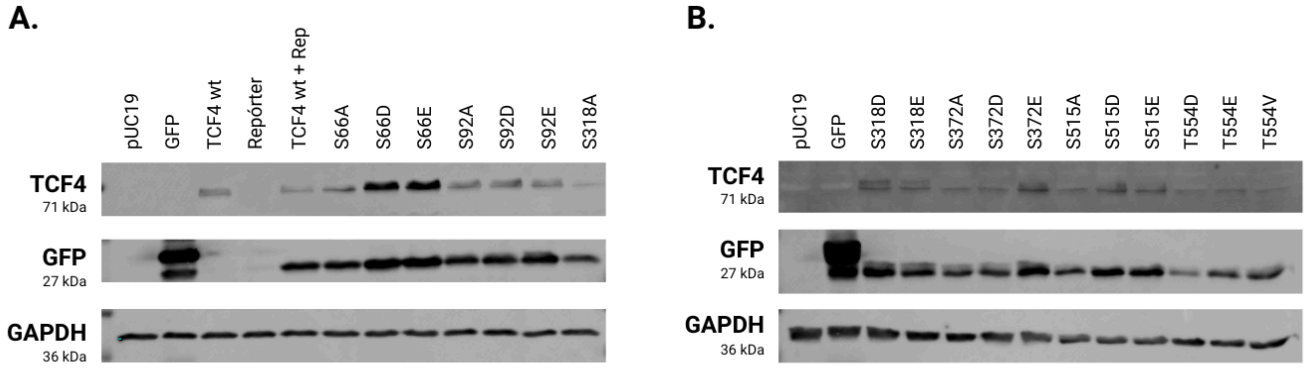

Figura 3: *TCF4 wt e mutantes foram superexpressos em células HEK293T e posteriormente coletados para Western Blotting. Todos os mutantes foram transfectados juntamente com o gene repórter.*

Em paralelo, realizamos o ensaio utilizando o gene repórter, com um promotor responsivo à TCF4, para quantificar a diferença na atividade da proteína promovida pela mutação em cada caso (**Figura 4**). As primeiras quatro barras no gráfico indicam os controles negativos do ensaio: condições em que não deve haver a produção de GFP, pois, como o GFP só é produzido sob a regulação de TCF4, somente no caso de haver TCF4 e o Repórter presentes deve haver fluorescência de GFP. Todos os mutantes foram transfectados juntamente com o Repórter.

Comparando os níveis de fluorescência em relação a TCF4 + Rep, é possível notar a presença de alguns mutantes que possuem quase o dobro de fluorescência, como S66D e S66E. Como esses mutantes mimetizam a fosforilação, tal modificação pode ser importante para a regulação positiva de TCF4. Isso é

mais pronunciado pela relação inversa em que se observa no caso de seu mutante de fosforilação bloqueada correspondente, S66A. O mutante S515A — fosforilação bloqueada — também parece interessante, já que demonstrou o menor nível de fluorescência dentre os testados.

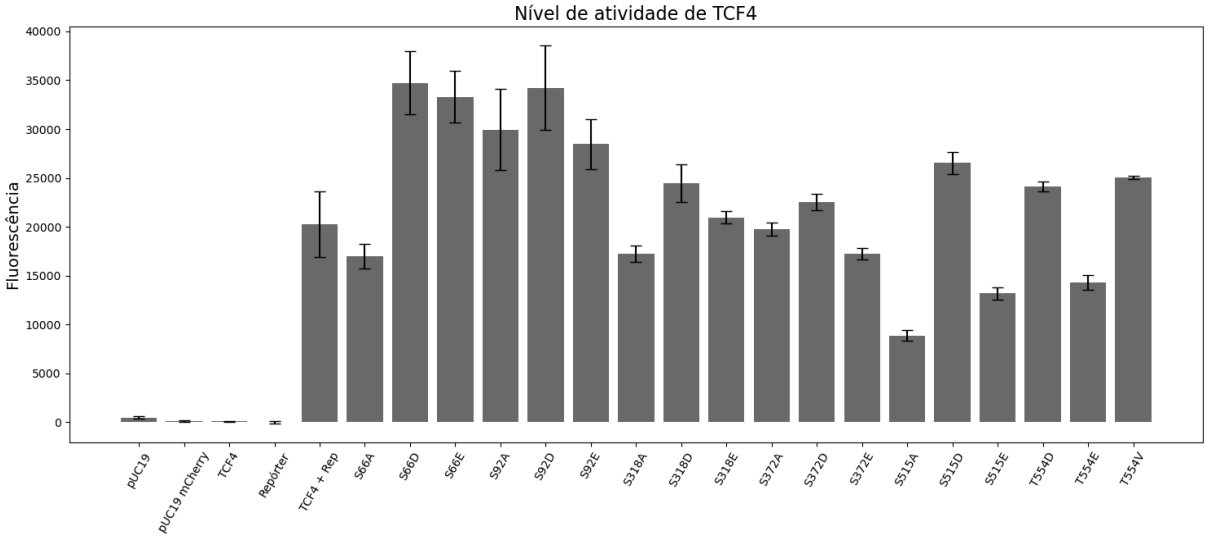

Figura 4: *Ensaio com gene repórter com promotor responsivo à TCF4. A fluorescência é dada em RFU (Relative Fluorescence Unit).*

CONCLUSÕES:

Os resultados preliminares sugerem que a fosforilação de TCF4 em alguns resíduos pode ser importante para a regulação de sua estabilidade e atividade. Posteriormente, novos experimentos serão realizados para confirmar estes achados, além de analisar se essas modificações alteram a localização subcelular de TCF4.

BIBLIOGRAFIA

AMIEL, Jeanne *et al.* Mutations in TCF4, Encoding a Class I Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Are Responsible for Pitt-Hopkins Syndrome, a Severe Epileptic Encephalopathy Associated with Autonomic Dysfunction. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 5, p. 988–993, maio 2007.

ARDITO, Fatima *et al.* The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 40, n. 2, p. 271–280, ago. 2017.

FORREST, Marc P. *et al.* The emerging roles of TCF4 in disease and development. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 6, p. 322–331, jun. 2014.

JUNG, Matthias *et al.* Analysis of the expression pattern of the schizophrenia-risk and intellectual disability gene TCF4 in the developing and adult brain suggests a role in development and plasticity of cortical and hippocampal neurons. **Molecular Autism**, v. 9, n. 1, p. 20, dez. 2018.

PAPES, Fabio *et al.* Transcription Factor 4 loss-of-function is associated with deficits in progenitor proliferation and cortical neuron content. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 2387, 2 maio 2022.

PHAN, BaDoi N. *et al.* A myelin-related transcriptomic profile is shared by Pitt–Hopkins syndrome models and human autism spectrum disorder. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 375–385, mar. 2020.

SOZAŃSKA, Nikola *et al.* An attempt to explain what intrinsically disordered TCF4 does in its spare time when PTHS-related mutations prevent it from doing its job. **Cell Communication and Signaling**, v. 23, n. 1, p. 258, 1 jun. 2025.

STEINBERG, Stacy *et al.* Common variants at VRK2 and TCF4 conferring risk of schizophrenia. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 20, p. 4076–4081, 15 out. 2011.

TEIXEIRA, José R. *et al.* Transcription factor 4 and its association with psychiatric disorders. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 19, 5 jan. 2021.