



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Identificación de la Cinasa Dependiente de Ciclina 3 como Nuevo Sustrato de la Fosfatasa de Tirosinas 1B y su Papel en la Progresión del Ciclo Celular en Células de Glioblastoma Humano”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Olga Villamar Cruz

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Alfonso León del Río
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México, enero, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Villamar Cruz Olga
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 21 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctora en Ciencias**, con la réplica de la tesis **"Identificación de la Cinasa Dependiente de Ciclina 3 Como Nuevo Sustrato de la Fosfatasa de Tirosinas 1B y su Papel en la Progresión del Ciclo Celular en Células de Glioblastoma Humano"**, dirigida por el Dr. **Camacho Arroyo Ignacio**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Coello Coutiño Martha Patricia (FQ)
VOCAL	Mauricio Rodríguez Dorantes (Inmegen)
VOCAL	Aurora Lara Nuñez (FQ)
VOCAL	Rocío Ángeles García Becerra (IIBo)
SECRETARIO	Zarain Herzberg Angel Alfonso (FM)

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **30 días hábiles** para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de febrero de 2022
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo, en colaboración con el Laboratorio de Señalización Celular en Cáncer de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, a cargo del Dr. Luis Enrique Arias Romero.

Al comité tutor formado por la Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez y el Dr. Alfonso León del Río por su valiosa asesoría durante la elaboración de este trabajo.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

A los miembros del jurado que tan atinadamente revisaron y corrigieron mi tesis de Doctorado: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño, Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes, Dra. Aurora Lara Nuñez, Dra. Rocío Ángeles García Becerra y al Dr. Ángel Zarain Herzberg, muchísimas gracias por su tiempo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater, que me ha dado tanto y a quien agradezco haber tenido la oportunidad realizar desde mis estudios de licenciatura, maestría y ahora doctorado.

La realización de esta Tesis de Doctorado fue posible gracias al financiamiento de los proyectos PAPIIT-UNAM IN217120, IN211022 y FICDTEM-2021-027.

Agradecimientos y Dedicatorias

Llegar a la culminación de mis estudios de doctorado llegó a ser en algún momento de mi vida casi imposible, las adversidades fueron muchas, pero fueron más las ganas vencerlas y el entusiasmo de lograr esa meta que se había quedado en el tintero.

Quiero agradecer al Dr. Ignacio Camacho Arroyo por aceptar dirigir este proyecto, por permitirme realizar mis estudios de Doctorado bajo su tutela, por siempre compartir sus conocimientos y amistad, te admiro mucho Nacho.

A Jon Chernoff, por ser quien impulsó esta historia de PTP1B, por ser el generador de ideas y presupuesto para que yo siguiera amando la ciencia en una latitud inimaginable para mí, por esas interminables pláticas divertidas e interesantes, de las que aprendí mucho más que ciencia.

Una vez más, gracias al apoyo de mi esposo Luis con quien he compartido toda una vida con experiencias que nos siguen haciendo querer “hacernos viejitos juntos”, trabajando siempre en equipo... ¡Sin tu apoyo esta parte de nuestra historia no hubiera sido posible! ¡GRACIAS LUIS!

También quiero agradecer y dedicar el resultado de todos estos años de trabajo y sacrificios a mis peques María Fernanda, Patricio y Michaela por ser ese motor que me ha impulsado a avanzar y querer ser siempre una mejor persona, por entender que a veces no podía estar con ellos por hacer experimentos o trabajar hasta tarde... ¡Gracias por entender y compartir toda esta experiencia de vida conmigo! (¡Una de las primeras palabras de Micha fue PTP1B!)

A mi mami Solecito, que me demuestra todos los días que la vida sigue y vale la pena vivirla... no me alcanzará la vida para agradecerte todo lo que siempre has hecho por mí y por mis críos, por todo el amor que se traduce en apapacho, en comida rica, en tu compañía... ¡GRACIAS MAMI!

Al resto de mi familia, a mis hermanos Gabriel, Claudia y Edgard, y sus respectivas familias (a pesar de todo, del tiempo y de la distancia), a todos mis primos y familia que he reencontrado...

¡A mi tía Angy que quiero tanto y que gracias a ella veo cosas de la vida que no haría sin ti, gracias por quererme!

¡A la Familia Arias, a todos!

A quienes, sin compartir un vínculo sanguíneo, se vuelven familia y que no paran de echarme porras: Karlita y Lau, Bere, Gaby E, China; Chío y Gena, Gaby y Dan, Edmundo y Ofe, al Dr. Alejandro y Lupe Heredia (nos seguimos encontrando en distintas latitudes y circunstancias), Sergio J, Mayriux y un gran etcétera...

A mis compañeros del laboratorio 220 de la Fac. de Química en especial a Kari y del Lab. 14 de UBIMED, Iztacala, a Iván, todos los alumnos que han pasado por ahí y de quienes he aprendido muchísimo, Xime, Mara, Lucy, Fer, Luis, Sam, Michelle, etc...

Al Dr. I. Terrazas y a la Dra. Miriam Rodríguez, por apoyarnos siempre.

A mis colegas de UBIMED, Leo, Luis E., Damaris, Tecilli e Ime.

Y finalmente, quiero dedicar este trabajo a mi papá y a mi hermana Vicky, a quienes perdí físicamente en el 2021, pero a quienes siento presentes en mi vida más que nunca. Y a la memoria de mi hermano Nacho, mis abuelos Nacho, Mica y Maki, los sigo extrañando...

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
ABREVIATURAS.....	3
1. RESUMEN.....	6
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1 Cáncer.....	8
3.2 Epidemiología del cáncer	9
3.3 Tumores del Sistema Nervioso Central.....	10
3.4 Glioblastoma	11
3.5 Proteínas cinasas de tirosina y proteínas fosfatasas de tirosina (PTPs)	11
3.6 Clasificación de las PTPs.....	12
3.7 La Proteína Fosfatasa de Tirosinas 1B (PTP1B), estructura y regulación.....	13
3.8 Principales vías de señalización reguladas por PTP1B	17
3.9 PTP1B y cáncer	19
3.10 Ciclo celular.....	22
3.11 Cdk3 y otras moléculas reguladoras del ciclo celular.....	24
3.12 Cdk3 y cáncer	25
4. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	27
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
6. HIPÓTESIS	30
7. OBJETIVOS	30

7.1 Objetivo general	30
7.2 Objetivos específicos	30
8. MATERIALES Y MÉTODOS	31
8.1 Generación de un modelo <i>in silico</i> del dominio catalítico de PTP1B en asociación con el fosfopéptido correspondiente a los residuos 9-21 de Cdk3.....	31
8.1.1 Modelado por homología <i>in silico</i> y “docking”	31
8.2 Determinación de la actividad de PTP1B sobre Cdk3 <i>in vitro</i>	32
8.2.1 Ensayo de actividad de fosfatasa <i>in vitro</i>	32
8.3 Evaluación de la asociación física de Cdk3 y PTP1B	32
8.3.1 Cultivo celular	32
8.3.2 Transformación de bacterias competentes	33
8.3.3 Purificación de plásmidos.....	33
8.3.4 Transfección	34
8.3.5 Extracción y cuantificación de proteínas	34
8.3.6 SDS-PAGE	35
8.3.7 Western blot	35
8.3.8 Co-localización	36
8.3.9 Ensayo de ligación por proximidad	36
8.4. Determinación del efecto de la inhibición farmacológica o del silenciamiento con siRNAs de PTP1B en progresión del ciclo celular en células de GB humano.	38
8.5 Evaluación del efecto de la inhibición farmacológica o del silenciamiento con siRNAs de PTP1B en la actividad de Cdk3 y sus efectores	38
8.6 Ensayos RT-qPCR y análisis de expresión de mRNA.....	39

8.7 Análisis estadístico.....	39
9. RESULTADOS	41
9.1 Modelado por homología <i>in silico</i> de la proteína Cdk3 y “docking” local PTP1B-Cdk3.....	41
9.2 Cdk3 es un sustrato de PTP1B <i>in vitro</i>	47
9.3 PTP1B y Cdk3 interactúan en un contexto celular.....	49
9.4 La inhibición farmacológica o el silenciamiento con siRNAs de PTP1B arresta el ciclo celular en células de GB humano	53
9.5 La inhibición farmacológica o el silenciamiento con siRNAs de PTP1B afecta la activación de la ruta de señalización Cdk3/E2F en células de GB humano	55
10. DISCUSIÓN	58
11. CONCLUSIONES	64
12. PERSPECTIVAS	64
13. REFERENCIAS	65
14. ANEXO	80

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PROYECTO

1. **Villamar-Cruz O**, Loza-Mejía MA, Vivar-Sierra A, Saldivar-Cerón HI, Patiño-López G, Olguín JE, Terrazas LI, Armas-López L, Ávila-Moreno F, Saha S, Chernoff J, Camacho-Arroyo I, Arias-Romero LE. 2023. A PTP1B-Cdk3 signaling axis promotes cell cycle progression of human glioblastoma cells through an Rb-E2F dependent pathway. *Mol Cell Biol.* 43(12):631–649

2. **Villamar-Cruz O**, Loza-Mejía MA, Arias-Romero LE, Camacho-Arroyo I. 2021. Recent advances in PTP1B signaling in metabolism and cancer. *Biosci Rep.* 41(11):BSR20211994

PUBLICACIONES ADICIONALES

1. Andrade-Meza A, Arias-Romero LE, Armas-López L, Ávila-Moreno F, Chirino YI, Delgado-Buenrostro NL, García-Castillo V, Gutiérrez-Cirlos EB, Juárez-Avelar I, Leon-Cabrera S, Mendoza-Rodríguez MG, Olguín JE, Perez-Lopez A, Pérez-Plasencia C, Reyes JL, Sánchez-Pérez Y, Terrazas LI, Vaca-Paniagua F, **Villamar-Cruz O**, Rodríguez-Sosa M. 2023. Mexican Colorectal Cancer Research Consortium (MEX-CCRC): Etiology, Diagnosis/Prognosis, and Innovative Therapies. *Int J Mol Sci.* 24(3):2115

2. Saldivar-Cerón HI, **Villamar-Cruz O**, Wells CM, Chernoff J, Patiño-López G, Huerta-Yepez S, Montecillo-Aguado M, Rivera-Pazos CM, Loza-Mejía MA, Vivar-Sierra A, Briseño-Díaz P, Zentella-Dehesa A, León del Río A, López Saavedra A, Padierna-Mota L, Ibarra-Sánchez MJ, Esparza-López J, Hernández Rivas R, Arias-Romero LE. 2022. p21-Activated Kinase 1 Promotes Breast Tumorigenesis Via Phosphorylation and Activation of the Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II. *Front Cell Dev Biol.* 9:759259.

3. Valdés-Rives SA, Arcos-Montoya D, de la Fuente-Granada M, Zamora-Sánchez CJ, Arias-Romero LE, **Villamar-Cruz O**, Camacho-Arroyo I, Pérez-Tapia SM, González-Arenas A. 2021. LPA 1 Receptor Promotes Progesterone

Receptor Phosphorylation through PKC α in Human Glioblastoma Cells. *Cells*. 10(4):807.

4. Cervantes-Badillo MG, Paredes-Villa A, Gómez-Romero V, Cervantes-Roldán R, Arias-Romero LE, **Villamar-Cruz O**, González-Montiel M, Barrios-García T, Cabrera-Quintero AJ, Rodríguez-Gómez G, Cancino-Villeda L, Zentella-Dehesa A, León-Del-Río A. 2020. IFI27/ISG12 Downregulates Estrogen Receptor α Transactivation by Facilitating Its Interaction With CRM1/XPO1 in Breast Cancer Cells. *Front Endocrinol*. 11:568375.

5. Callejas BE, Mendoza-Rodríguez MG, **Villamar-Cruz O**, Reyes S, Sánchez Barrera AC, Rodríguez-Sosa M, Delgado-Buenrostro NL, Martínez-Saucedo D, Chirino YI, León-Cabrera SA, Pérez-Plascencia CG, Vaca-Paniagua F, Arias Romero LE, Terrazas I. 2019. Helminth-derived molecules inhibit colitis associated colon cancer development through NF- κ B and STAT3 regulation. *Int J Cancer*. 1;145(11):3126-3139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capacidades adquiridas en el cáncer.	9
Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial.	10
Figura 3. Representación esquemática de los miembros de la familia PTP en humanos.....	13
Figura 4. Organización genómica y estructura del gen <i>PTPN1</i>	14
Figura 5. Estructura de PTP1B..	15
Figura 6. Principales rutas de señalización reguladas por PTP1B.	18
Figura 7. Ciclo Celular.....	23
Figura 8. Probable estructura del complejo del fosfopéptido de Cdk3 y PTP1B....	43
Figura 9. Probable estructura del complejo entre Cdk3 y PTP1B.....	44
Figura 10. Variación de la distancia entre las posiciones atómicas de PTP1B y el fosfopéptido de Cdk3.	45
Figura 11. Variación de la distancia entre el residuo de Cys215 de PTP1B y el residuo de pTyr15 de Cdk3.	46
Figura 12. Probable estructura del complejo entre el IR β y PTP1B.....	47
Figura 13. Ensayo de actividad enzimática de PTP1B <i>in vitro</i>	48
Figura 14. Curva de saturación de PTP1B con los fosfopéptidos del IR β y Cdk3.	48
Figura 15. Actividad <i>in vitro</i> de PTP1B.....	49
Figura 16. Co-localización de PTP1B y Cdk3 en la Línea Celular HEK293-T.	50
Figura 17. Niveles de expresión relativa de PTP1B y Cdk3 a nivel de mRNA en líneas celulares de GB humano.	51
Figura 18. PTP1B y Cdk3 interactúan físicamente en células de GB humano	52

Figura 19. Efecto de la inhibición farmacológica o del silenciamiento con siRNAs de PTP1B en la progresión del ciclo celular de células de GB humano.	54
Figura 20. La inhibición farmacológica o el silenciamiento con siRNAs de PTP1B regula negativamente la actividad del eje de señalización Cdk3-Rb.	56
Figura 21. La inhibición farmacológica o el silenciamiento con siRNAs de PTP1B regula negativamente la expresión de genes blanco del factor de transcripción E2F.....	57
Figura 22. PTP1B regula la progresión del ciclo celular a través de la activación de la vía Cdk3/Rb/E2F... ..	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las PTPs en el genoma humano.	12
Tabla 2. Sustratos de PTP1B identificados por SILAC.	28
Tabla 3. Resultados del “docking” péptido-proteína.....	42

ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μL	Microlitro
AR	Recepto de andrógenos
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
CDKI	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DUSP	Fosfatasa de especificidad dual
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGR1	Proteína de respuesta temprana al crecimiento
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(b-aminoetileter)-N,N,N,N-tetraacético
ER	Receptor de estrógenos
GB	Glioblastoma
H	Horas
HEPES	Ácido N-2-hidroetilpiperazin-2-etanol-sulfónico
HER2	Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico
IL	Interleucinas
IRβ	Receptor de Insulina β
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina tipo 1
IRS-2	Sustrato del receptor de insulina tipo 2
JAK2	Cinasa Janus 2
kDa	Kilo Daltones
L	Litro
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Miliamperios
Min	Minuto

mM	Mili molar
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
NF κ B	Factor nuclear kappa B
NRPTP	Proteína fosfatasa de tirosinas de tipo no receptor
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIP	Fosfatidilinositol fosfato
PLA	Ensayo de ligación por proximidad
PTK	Proteína cinasa de tirosinas
PTP	Proteína fosfatasa de tirosinas
PTPN1	Proteína fosfatasa de tirosinas 1 de tipo no receptor
PTPR	Proteína fosfatasa de tirosinas de tipo receptor
Rb	Retinoblastoma
RE	Retículo endoplásmico
RMSD	Desviación cuadrática media de las posiciones atómicas
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Seg	Segundos
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SILAC	Marcaje Isotópico Estable en Cultivo Celular
SNC	Sistema Nervioso Central
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α
Tween-20	Polioxietilensorbitan monolaureato

TYK2	Proteína cinasa de tirosinas 2
VH1-like	Semejante al virus de vaccinia H1
YBX1	Proteína de unión a la caja Y

1. RESUMEN

Los glioblastomas (GBs) son los tumores cerebrales malignos más frecuentes y agresivos en individuos adultos, y representan un importante problema de salud debido a su alta tasa de mortalidad y a que no existen terapias efectivas para su tratamiento. Por lo tanto, la identificación de nuevos blancos de intervención farmacológica puede proporcionar alternativas terapéuticas para el tratamiento de este tipo de tumores. Recientemente se ha reportado que PTP1B, una proteína fosfatasa de tirosinas de tipo no receptor, se encuentra sobre-expresada en distintos tipos de tumores y tiene un papel importante durante la carcinogénesis. Sin embargo, aún no se ha identificado cuales de sus sustratos son relevantes durante la carcinogénesis, y el papel que tiene PTP1B en el desarrollo de los GBs es desconocido.

Para identificar sustratos de PTP1B que participen en el desarrollo del cáncer, empleamos la técnica de “Marcaje Isotópico Estable en Cultivo Celular” o SILAC, por sus siglas en inglés, identificamos a la Cinasa Dependiente de Ciclina 3 (Cdk3) como un nuevo sustrato de PTP1B. Estudios de acoplamiento o “docking” local y de dinámica molecular nos permitieron determinar que existe una interacción estable entre el dominio catalítico de PTP1B y Cdk3. Además, un ensayo bioquímico para determinar actividad de fosfatasa *in vitro* confirmó que PTP1B defosforila a Cdk3 en el residuo de Tyr15. De manera interesante, observamos que estas dos proteínas interactúan físicamente en el núcleo y citoplasma de distintas líneas celulares derivadas de GBs humanos. Nuestros resultados mostraron que la inhibición farmacológica o el silenciamiento genético con siRNAs de PTP1B causa un arresto del ciclo celular, la hipofosforilación de Rb, y la regulación negativa de la expresión de los genes blanco de E2F: Cdk1, Ciclina A y Ciclina E1. Estos resultados demuestran la existencia de una ruta de señalización PTP1B-Cdk3, necesaria para una adecuada progresión del ciclo celular dependiente de Rb-E2F en células de GB humano, y proporciona nuevas alternativas terapéuticas para el abordaje de este tipo de tumores.

2. ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is the most common and aggressive malignant brain tumor in adults and represents an important health problem due to its poor prognosis and the lack of effective therapies. Therefore, the identification of novel potential therapeutic targets may provide new pharmacological strategies for the treatment of these tumors. Mounting evidence also indicates that PTP1B, a classical non-transmembrane protein tyrosine phosphatase, is overexpressed in different types of tumors and plays a key role in the development of cancer. However, not all its substrates have been identified and its role in GB development remains to be determined.

To identify molecular targets of PTP1B that mediate its role in carcinogenesis, we undertook a SILAC-based phosphoproteomic strategy, which allowed us to identify Cdk3 as a novel PTP1B substrate. Local docking and molecular dynamics studies revealed stable interactions between the PTP1B catalytic domain and Cdk3. In addition, we confirmed that PTP1B dephosphorylates Cdk3 at Tyrosine residue 15 in an *in vitro* phosphatase assay. In addition, we observed that endogenous PTP1B and Cdk3 interact in the nucleus and cytoplasm of human GB cell lines. Next, we found that inhibition of PTP1B with small-molecule inhibitors or its knockdown with siRNA induces cell cycle arrest with reduced activity of Cdk3, hypophosphorylation of Rb, and the diminished expression of E2F target genes Cdk1, Cyclin A, and Cyclin E1. These findings suggest that a novel signaling pathway from PTP1B to Cdk3 is required for efficient cell cycle progression in an Rb-E2F dependent manner in human GB cells and suggest new therapeutic opportunities for the treatment of these type of brain tumors.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Cáncer

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un conjunto de enfermedades en las que las células crecen de forma descontrolada, pueden invadir otros órganos, y originarse en cualquier órgano o tejido del cuerpo [1].

En el año 2000, Robert Weinberg y Douglas Hanahan propusieron que la mayoría de los tumores compartían al menos seis rasgos moleculares, bioquímicos y celulares denominados capacidades adquiridas o “hallmarks”, los cuales conducen a la transformación de células normales en derivados altamente malignos. Estas capacidades son la inmortalidad replicativa, la capacidad de inducir angiogénesis, resistencia a la muerte celular, proliferación celular sostenida, evasión de la acción de supresores tumorales y, una alta capacidad invasiva y de metástasis [2]. En 2011, se propuso que la capacidad de evasión del sistema inmunológico y la reprogramación del metabolismo celular eran dos capacidades adquiridas emergentes, y que además la tumorigenesis asociada a inflamación y la inestabilidad genética participan de manera importante en el desarrollo tumoral [3]. Finalmente, en 2022 se incluyeron la plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética y la influencia del microbioma como factores importantes en el desarrollo del cáncer, y se reconoce la participación de las células senescentes como actores importantes en el microambiente tumoral (Figura 1) [4]. Esta serie de características en conjunto nos proporcionan un marco para la comprensión de la compleja biología del cáncer.

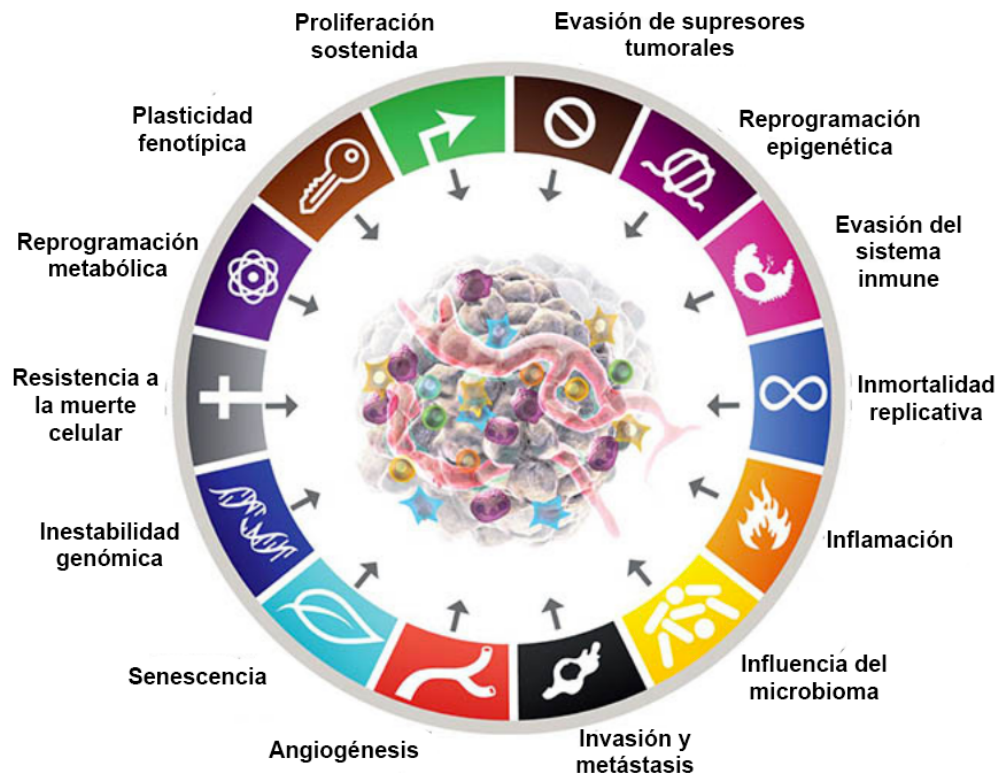


Figura 1. Capacidades adquiridas en el cáncer. Se ilustran las diferentes características adquiridas del cáncer, las cuales están involucradas en el proceso de transformación celular, cada una con un mecanismo que conduce a la formación del fenotipo maligno. Modificado de Hanahan, 2022.

3.2 Epidemiología del cáncer

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) reportó que en 2020 esta enfermedad fue el principal problema de salud pública en el mundo, causando más de 10 millones de muertes [5]. Los tipos de cáncer con mayor incidencia son el de mama, pulmón, colorrectal, próstata, estómago e hígado, aunque otros tipos de cáncer han mostrado un incremento en su incidencia en los últimos años. Tal es el caso de los tumores del sistema nervioso central (SNC), que en 2020 a nivel mundial tuvieron un total de 308,102 nuevos casos registrados y de 251,329 muertes, colocándolo en el lugar 19 en incidencia y el 12 en mortalidad (Figura 2).

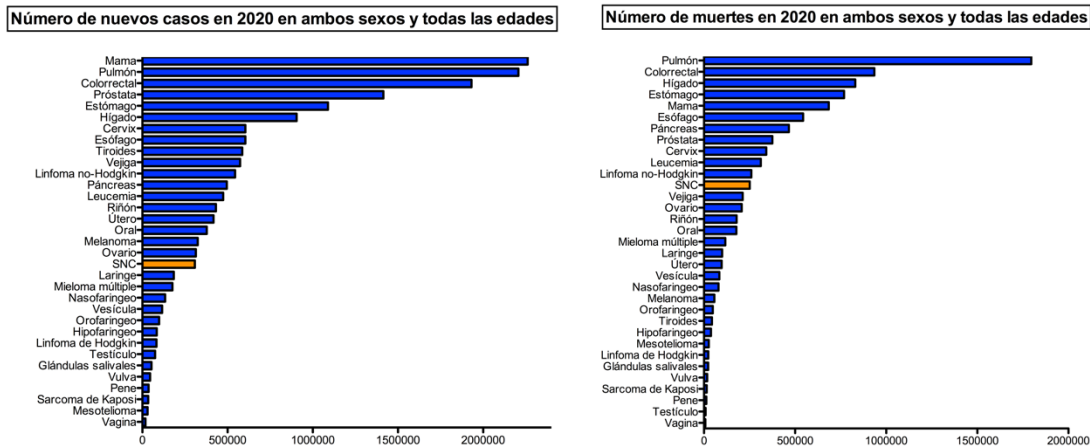


Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial. En 2020, el cáncer fue el principal problema de salud pública en el mundo. La gráfica del lado izquierdo muestra el número total de nuevos casos reportados de cáncer en ambos sexos y en todas las edades, y la gráfica del lado derecho el número total de muertes reportadas. Las barras naranjas muestran el lugar que ocuparon los tumores del SNC en incidencia y mortalidad respectivamente. Datos obtenidos de Globocan, 2020.

3.3 Tumores del Sistema Nervioso Central

Los tumores primarios del SNC representan aproximadamente el 2% del total de casos de cáncer a nivel mundial [6], y constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias que incluyen desde lesiones bien diferenciadas y relativamente benignas, como los meningiomas, hasta lesiones altamente invasivas, infiltrantes y poco diferenciadas, como el GB [7].

El sistema de clasificación de tumores del SNC más completo y actualizado es el de la OMS, el cual divide a los tumores del SNC de acuerdo a su tipo histológico, y además incorpora el uso de marcadores moleculares de citodiferenciación [8]. Entre los distintos tipos de tumores del SNC, los más frecuentes son los que se generan a partir de las células gliales, estos constituyen del 40 al 50% de todos los tumores primarios del SNC y son clasificados en cuatro grados de acuerdo a su malignidad (Grados I-IV) [9]. Los gliomas de grado I y II, también conocidos como astrocitomas, constituyen un grupo heterogéneo de tumores los cuales a menudo se presentan en individuos jóvenes entre la segunda y la cuarta década de la vida y son ligeramente más comunes en hombres de raza blanca. Los gliomas de alto grado (de Grado III, también llamados astrocitomas anaplásicos; y de Grado IV o GB, son muy agresivos con una mediana de

supervivencia de 3 a 6 meses sin tratamiento, y debido a su naturaleza infiltrante y proximidad a estructuras críticas, la resección completa rara vez es posible [6–9].

3.4 Glioblastoma

De todos los tumores cerebrales, el GB es el más letal, con una tasa de supervivencia relativa menor al 33%, y menor al 5% a uno y cinco años a partir de su diagnóstico respectivamente; y con una mediana de edad al tiempo del diagnóstico de 64 años [10]. Recientemente se han desarrollado alternativas terapéuticas para el tratamiento del GB, como por ejemplo esquemas de radiación combinados con quimioterapia [11,12]. Sin embargo, un problema que se presenta frecuentemente es la ineficacia de estos tratamientos y el desarrollo de resistencia a la terapia, por lo que resulta importante identificar moléculas relevantes para el desarrollo y supervivencia de las células de GB que tengan el potencial de ser empleadas como nuevos blancos de intervención terapéutica. En los últimos años, las Proteínas Fosfatasa de Tirosina (PTPs por sus siglas en inglés), han llamado la atención de la industria farmacéutica, ya que se ha demostrado su participación en el desarrollo y progresión no solamente de los gliomas, sino de distintos tipos de cáncer, al regular distintas rutas de señalización importantes para la supervivencia, proliferación, migración y regulación del metabolismo de las células cancerosas [13,14].

3.5 Proteínas cinasas de tirosina y proteínas fosfatasa de tirosina

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, es una de las modificaciones postraduccionales más importantes ya que es fundamental para la regulación de diversos procesos celulares, esta fosforilación favorece cambios conformacionales que son indispensables para la formación de interacciones proteína-proteína, para determinar la localización de una proteína o para modular la actividad enzimática entre otras funciones [15,16]. La fosforilación reversible de proteínas en residuos de tirosina es regulada por dos familias de enzimas, las Proteínas Cinasa de Tirosina (PTKs por sus siglas en inglés) que transfieren un grupo fosfato al grupo OH de los residuos de tirosina de sus proteínas blanco, causando cambios conformacionales-estructurales, e iniciando así cascadas de señalización [17]; y las PTPs, que remueven el grupo fosfato

de los residuos de tirosina fosforilados [16]. Por lo tanto, el desequilibrio entre la actividad de las PTKs y PTPs está íntimamente asociado al desarrollo de diversas enfermedades, como por ejemplo el cáncer [19].

3.6 Clasificación de las PTPs

En el genoma humano, la superfamilia de las PTPs consta de 107 miembros divididos en cuatro distintas clases (Clase I, II, III y IV) de acuerdo a las diferencias en la secuencia de aminoácidos en sus dominios catalíticos y al aminoácido que realiza el ataque nucleofílico durante la reacción de desfosforilación. Las Clases I (PTPs clásicas), II (PTPs de bajo peso molecular – LMPTP) y III (fosfatasas CDC25) están constituidas por las PTPs basadas en Cisteína, mientras que la Clase IV (fosfatasas EYA) está integrada por las PTPs basadas en Aspartato (Tabla 1) [18,20,21].

		P.M. (kDa)		Sustrato
Clase I	Basadas en Cys	PTPs Clásicas	48-213	pTyr, PIPs
		“VH1-like”	21-50	pTyr, pSer, pThr, PIPs, Fosfatidilglicerofosfato, Fosfoglucógeno, 5' CAP-mRNA
Clase II	Basadas en Cys	LMPTP	18	pTyr
Clase III	Basadas en Cys	CDC25	59-65	pTyr, pThr
Clase IV	Basadas en Asp	EYA	59-70	pTyr, pSer

Tabla 1. Clasificación de las PTPs en el genoma humano. Las distintas PTPs se dividen en cuatro clases de acuerdo a la similitud en sus dominios catalíticos, al aminoácido que realiza el ataque nucleofílico y a sus sustratos preferenciales [22].

La clase más grande de PTPs es la I, la cual se subdivide en dos grupos: las PTPs específicas para residuos de fosfotirosina (pTyr) o PTPs clásicas, que incluye a PTPs de tipo receptor (PTPRs por sus siglas en inglés) y a las PTPs de tipo no receptor (NRPTPs por sus siglas en inglés) (Figura 3); y las fosfatasas semejantes al virus de vaccinia H1 o “VH1-like” las cuales son de especificidad dual (DUSPs por sus siglas en inglés), y presentan una mayor diversidad en términos de especificidad por sus sustratos, ya que además de actuar sobre residuos de pTyr, tienen la propiedad de desfosforilar residuos de fosfoserina (pSer), fosfotreonina (pThr), y/o fosfatidilinositoles fosfato (PIPs) [20,23].

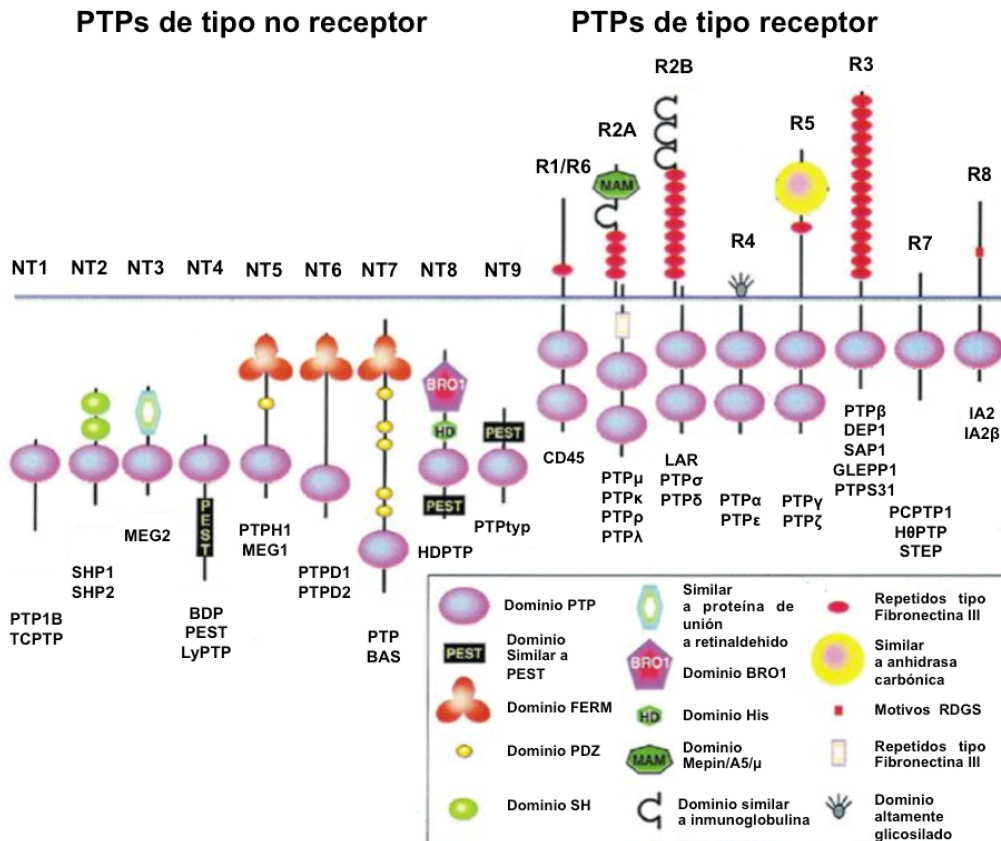


Figura 3. Representación esquemática de los miembros de la familia PTP en humanos. Las PTPs pueden clasificarse en dos distintos tipos de acuerdo a la similitud de sus dominios de fosfatasa, las de tipo no receptor (NT) que consta de 9 subtipos, y las de tipo receptor (R) que consta de 8 subtipos. Modificado de Andersen et al. 2001 [24].

3.7 La proteína fosfatasa de tirosinas 1B (PTP1B), estructura y regulación.

PTP1B es una enzima de expresión ubicua, y es el prototipo de las NRPTPs. Fue la primera fosfatasa de su clase en ser purificada [25,26], clonada [27,28], y cristalizada [29,30]. La mayor parte de los hallazgos sobre el mecanismo de regulación, estructura y función de las PTPs de la Clase I se describieron inicialmente en PTP1B [31]. Esta enzima es codificada por el gen *PTPN1* (Proteína Fosfatasa de Tirosina 1 de Tipo No-Receptor, por sus siglas en inglés) en el genoma humano, y se encuentra localizado en el cromosoma 20q13.1 (Figura 4A), en un locus genético que ha sido asociado a diabetes tipo 2 y obesidad, el gen *PTPN1* tiene un tamaño de mas de 74 kb y su intrón 1 es inusualmente largo. En células humanas, se han identificado dos transcritos de

PTP1B, uno de 4.7 kb que incluye al intrón 9, y otro de menor tamaño (3.5 kb) que carece de este intrón (Figura 4B) [32].

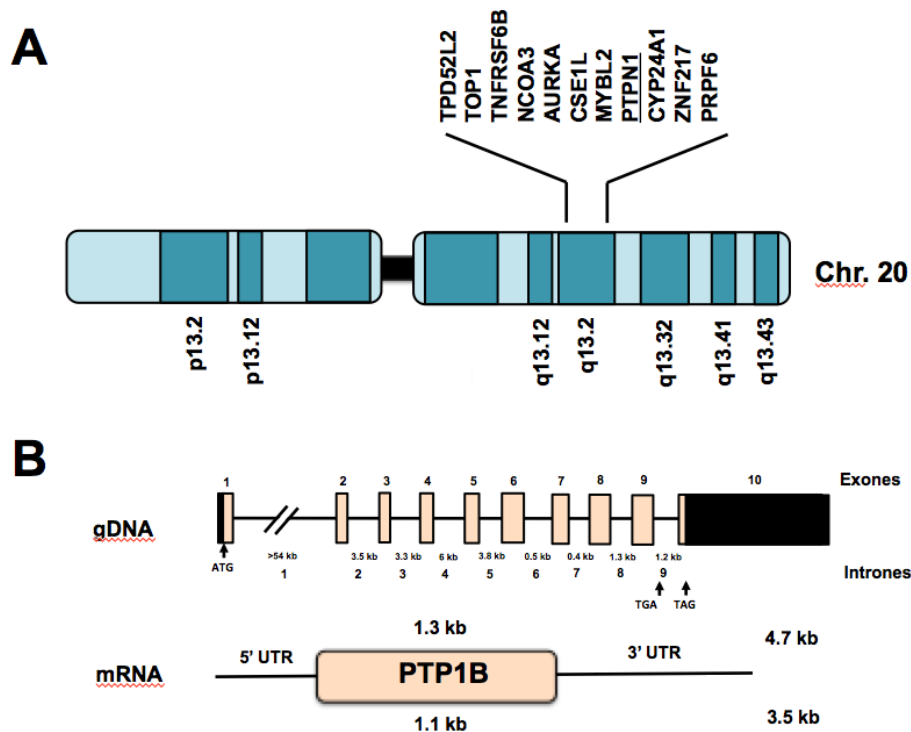


Figura 4. Organización genómica y estructura del gen *PTPN1*. (A) Representación gráfica del cromosoma 20 humano. El gen *PTPN1* se localiza en el locus 20q13.1, una región comúnmente amplificada en cáncer de mama y ovario. (B) La parte superior es la representación gráfica del gen *PTPN1*. Los exones se indican con rectángulos, y las regiones 5' y 3' no traducidas se encuentran marcadas en color negro. Se indica el sitio de inicio de la traducción y la localización de dos sitios de paro, uno en el intrón 9 y otro en el exón 10. La parte inferior de la imagen esquematiza al mRNA de *PTPN1*. En humanos se han descrito dos transcritos, uno de 4.7 kb que incluye al intrón 9, y uno de 3.5 kb en el que este intrón ha sido eliminado por splicing. Modificada de Villamar-Cruz et al. 2021 [22].

De manera interesante, se ha reportado que el locus en donde se localiza el gen *PTPN1* se encuentra comúnmente amplificado en distintos tipos de cáncer y se ha asociado con mal pronóstico [33–36].

El gen *PTPN1* se traduce en una proteína de 435 aminoácidos, en su extremo N-terminal se localiza su dominio catalítico (residuos 30-278), dos regiones ricas en prolina (residuos 278-401), de las que al menos la primera de estas es indispensable para interacciones proteína-proteína; y en su extremo C-terminal posee una secuencia

de 35 aminoácidos (residuos 401-435) que permite el anclaje de PTP1B al retículo endoplásmico (RE) (Figura 5) [37,38]. Aunque PTP1B se encuentra anclada al RE puede actuar sobre sustratos que se encuentran en distintos compartimentos subcelulares, como el citoplasma, núcleo, membrana plasmática, mitocondrias y uniones adherentes [39–41].

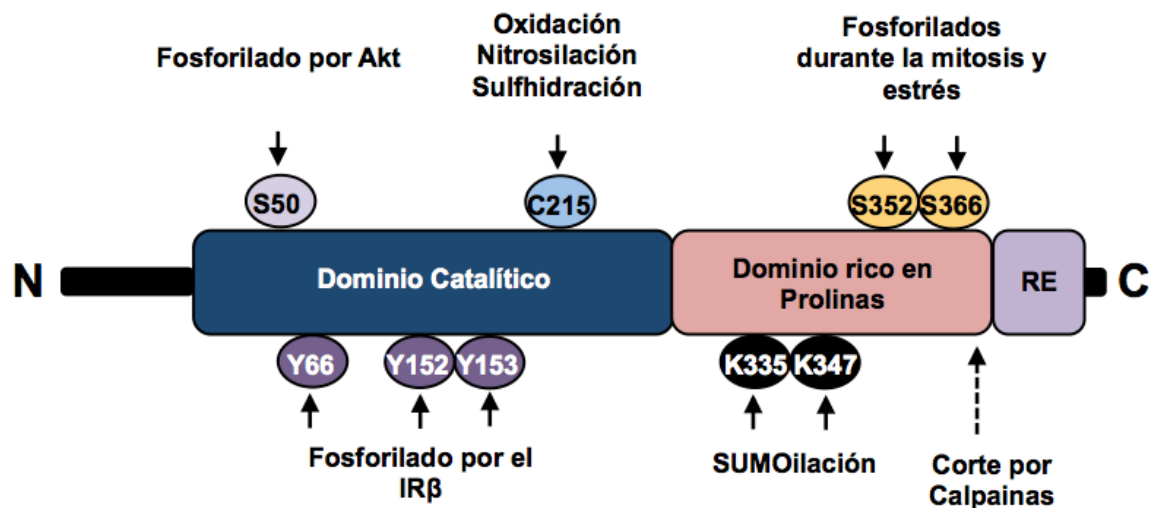


Figura 5. Estructura de PTP1B. Representación gráfica de PTP1B, En color azul se muestra su dominio catalítico, en rosa el dominio rico en prolina y en morado la secuencia de anclaje al RE. Las flechas indican las modificaciones postraduccionales que sufre PTP1B. (S, serina; Y, tirosina; C, cisteína; K, lisina). Modificada de Villamar-Cruz et al. 2021 [22].

Distintos estudios han permitido determinar que tanto el dominio catalítico, como los dominios no catalíticos de PTP1B son importantes para el reconocimiento y asociación con sus sustratos. PTP1B posee regiones ricas en prolina que permiten su interacción con distintas proteínas que poseen Dominios de Homología a Src 3 (SH3 por sus siglas en inglés), como por ejemplo p130^{Cas} y Src [42,43]. Adicionalmente, el dominio catalítico de PTP1B tiene alta especificidad y preferencia por ciertos sustratos. Los estudios cristalográficos de la interacción de PTP1B con el Receptor de Insulina beta (IRβ por sus siglas en inglés) han mostrado que la secuencia E/D-pY-pY-R/K es necesaria para el reconocimiento óptimo del sustrato. De hecho, PTP1B tiene 70 veces más afinidad por péptidos que contienen tándems de pTyr, que por péptidos con mono-pTyr [44]. De manera interesante, la secuencia E/D-pY-pY-R/K ha sido empleada para

identificar nuevos sustratos de PTP1B como la Cinasa Janus 2 (JAK2 por sus siglas en inglés) y la Proteína Cinasa de Tirocinas 2 (TYK2 por sus siglas en inglés) [45]. Aunque el motivo con pTyr en tándem es importante para el óptimo reconocimiento de sus sustratos, no es indispensable, ya que distintos sustratos bien caracterizados de PTP1B no poseen esta secuencia.

La regulación de los niveles de expresión de PTP1B a nivel transcripcional y postranscripcional, así como sus modificaciones postraduccionales han sido ampliamente estudiadas desde su descubrimiento. Las regiones promotoras de *PTPN1* en humano y ratón no poseen una caja TATA, pero contienen secuencias ricas en GC y sitios de unión para diversos factores de transcripción como Sp1, la proteína de respuesta temprana al crecimiento (EGR1 por sus siglas en inglés), el Factor Nuclear kappa B (NFκB por sus siglas en inglés), la proteína de unión a la caja Y 1 (YBX1 por sus siglas en inglés), y el Receptor de Andrógenos (AR por sus siglas en inglés), entre otros [46–48,35].

Recientemente, se ha reportado que la expresión de PTP1B también puede ser regulada a nivel postranscripcional a través de la interacción de múltiples miRNAs, como miR-338-3p, miR-193a-3p, miR-135a, miR-146-b y miR-206 con la región 3' no traducida de su mRNA [49–54].

A nivel postraducciona, la actividad de PTP1B puede ser regulada por distintas modificaciones, entre las que destacan la oxidación, nitrosilación, sumoiliación, fosforilación y corte proteolítico (Figura 5) [55]. Como otros miembros del grupo de las PTPs clásicas, PTP1B es susceptible a oxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) [56]. La oxidación del residuo de Cys215 de PTP1B suprime su actividad catalítica al convertir el ácido sulfénico (S-OH) en una sulfenamida cíclica, en la cual el átomo de azufre de la Cys215 es unido covalentemente al átomo de nitrógeno del aminoácido adyacente. Esta oxidación induce un cambio conformacional en el sitio activo de la enzima que impide la unión a sus sustratos, y es de naturaleza reversible, ya que el ácido sulfénico puede ser reducido y la enzima regresa a su forma activa [57,58]. De manera similar a las ROS, las especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés) también inhiben la actividad de PTP1B [59]. En particular, la S-nitrosilación evita que la Cys215 de PTP1B sea oxidada cuando hay

estrés oxidativo, sugiriendo que esta modificación postraduccional protege a PTP1B de una inactivación permanente, ya que bajo esas condiciones, el ácido sulfénico que se produce durante la oxidación de la Cys215 se convierte en ácido sulfónico en una reacción que es de naturaleza irreversible [59]. Otra modificación postraduccional importante que modula la actividad de PTP1B es la SUMOilación, esta ocurre en los residuos de Lys335 y 347, y la secuencia de anclaje de PTP1B al RE es necesaria para que esta fosfatasa sea completamente SUMOilada y translocada a la membrana nuclear interna en donde se ha reportado que modula la actividad de su sustrato emerina para mantener la arquitectura de la envoltura nuclear [60,41].

La fosforilación en residuos de Ser y Tyr también modula la actividad de PTP1B. Se ha reportado que el IR β puede fosforilar directamente a PTP1B en los residuos de Tyr66, 152 y 153. Se ha propuesto que la fosforilación de las Tyr152 y 153 es importante para que ocurra la posterior desfosforilación del IR β mediada por PTP1B, ya que la mutación de estos residuos disminuye considerablemente la afinidad de esta fosfatasa por la forma activa del IR β [61,62]; además la fosforilación de PTP1B en el residuo de Ser50 por parte de Akt inhibe su actividad y evita que desfosfore al IR β , posiblemente como un mecanismo para potenciar la acción de la insulina [63]. También se ha reportado que PTP1B es fosforilada en múltiples residuos de Ser durante la mitosis, aunque la identidad de las cinasas que la fosforilan no ha sido establecida [64]. Finalmente, se ha reportado que en plaquetas la actividad de PTP1B puede ser regulada por el corte proteolítico de su extremo C-terminal por calpains, lo que genera una enzima constitutivamente activa [65]. La diversidad de modificaciones postraduccionales que modulan la actividad de PTP1B muestra la complejidad de sus mecanismos de regulación.

3.8 Principales vías de señalización reguladas por PTP1B

Durante los últimos 25 años, diversos estudios han demostrado que PTP1B actúa como un regulador de distintas vías de señalización (Figura 6). Los primeros estudios de su actividad *in vitro* mostraron que esta fosfatasa modula negativamente la actividad del IR β y sus elementos río abajo [66]. El mecanismo molecular por el cual PTP1B regula la señalización de la insulina, consiste en la desfosforilación de los residuos de

Tyr972, 1162 y 1163 del IR β [44,61]. Adicionalmente, se ha reportado que en ratones deficientes (KO) del sustrato del receptor de insulina tipo 2 (IRS-2 por sus siglas en ingles), PTP1B modula negativamente la señalización de IR β /IRS-1 [67].

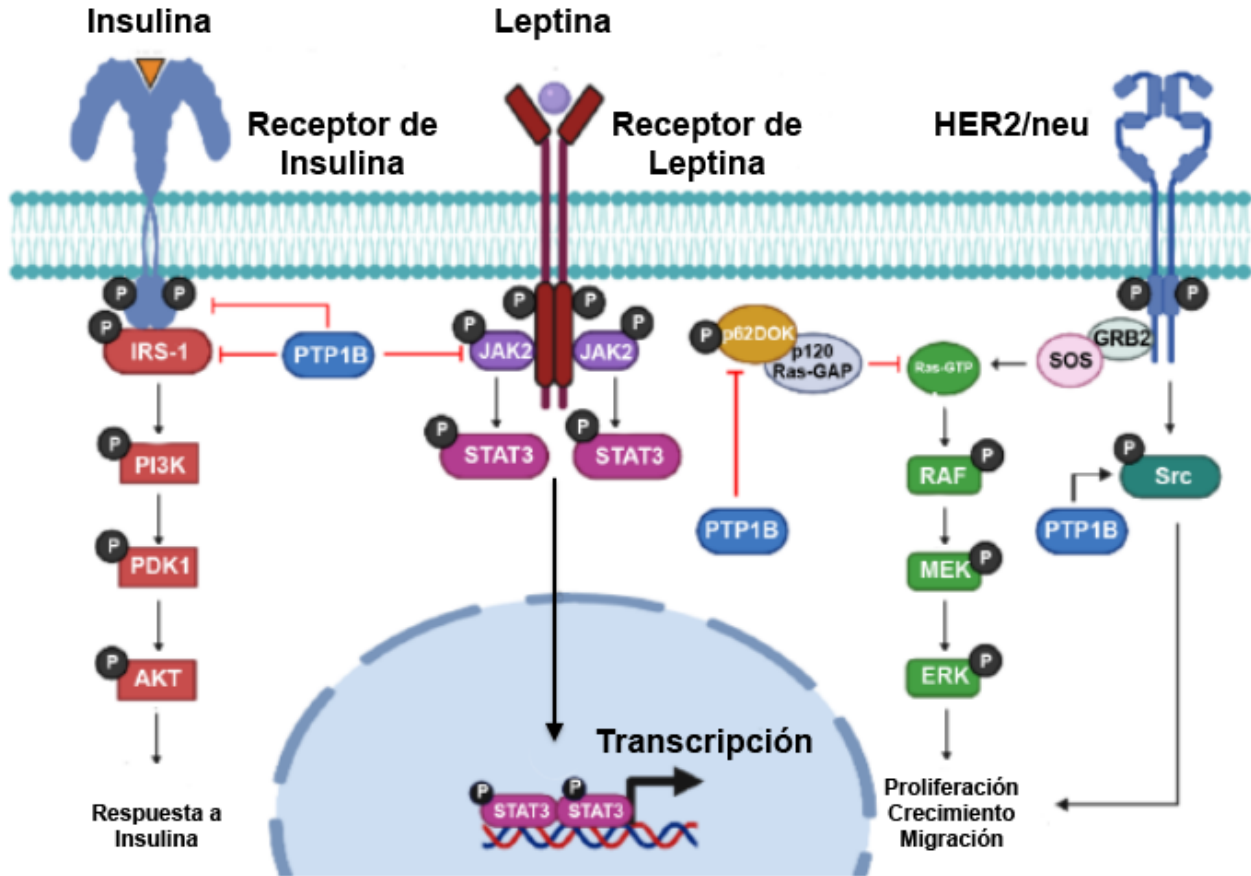


Figura 6. Principales rutas de señalización reguladas por PTP1B. PTP1B es un regulador negativo de los Receptores de Insulina y Leptina, y actúa como un oncogén en el contexto de la tumorigenesis dependiente de HER2/neu. Modificado de Villamar-Cruz et al. 2021 [22].

Además de su papel en la regulación negativa del IR β , se determinó que PTP1B también puede atenuar la señalización del Receptor de Leptina al desfosforilar a JAK2, la cual es indispensable para la señalización de este receptor, y resulta en la inhibición de la síntesis de la hormona estimulante del apetito, el Neuropeptido Y [45]. La confirmación de la importancia de PTP1B en la regulación de estas dos vías de señalización se obtuvo a partir de la generación de modelos murinos KO de *PTPN1*, los cuales al ser sujetos a una dieta hipercalórica presentaban niveles normales de glucosa

e insulina en sangre, a diferencia de sus contrapartes silvestres. Adicionalmente, los ratones silvestres de *PTPN1* desarrollaban resistencia a la insulina y ganaban rápidamente peso, a diferencia de los animales KO y heterocigotos, los cuales permanecieron delgados y sensibles a la acción de la insulina [68].

Debido a que la inflamación y la activación del sistema inmunológico se encuentran estrechamente relacionadas con la obesidad, la patogénesis de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, y a que PTP1B modula la señalización de los receptores de insulina y leptina a través de la regulación de la vía de JAK/STAT, se ha sugerido que existe una relación entre la actividad de PTP1B y las rutas de señalización que desencadenan la respuesta inmune. La expresión de citocinas como el Factor de Necrosis Tumoral α ($TNF\alpha$), así como de las Interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6), es parte de la respuesta inflamatoria del organismo a los cambios metabólicos inducidos por la obesidad [69]. Distintos grupos de investigación han reportado evidencia contundente de la participación de PTP1B en la señalización de JAK-STAT [66], así como del $TNF\alpha$ e IL-6 [70,71]; por lo que se ha propuesto que PTP1B está directamente involucrada en el desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2 a través de la regulación directa de los receptores a insulina y leptina, así como de la modulación de la respuesta inflamatoria y el reclutamiento de células del sistema inmunológico.

3.9 PTP1B y cáncer

La participación de PTP1B en el inicio y progresión del cáncer ha sido ampliamente documentada [32,55,72,73]. En la última década distintos estudios han mostrado que PTP1B puede actuar como un oncogén o un supresor tumoral dependiendo del contexto celular.

Las propiedades supresoras de tumor de PTP1B fueron inicialmente atribuidas a observaciones realizadas en fibroblastos transformados con Neu (el homólogo en rata al oncogén HER2/ErbB2 humano), y los resultados obtenidos mostraron que la sobre expresión de PTP1B suprimía el crecimiento independiente de contacto, la formación de colonias y el desarrollo de tumores [74]; mientras que en fibroblastos transformados con el oncogén v-Src, se observó una reducción de la proliferación al sobre expresar a PTP1B [38]. Finalmente, también se determinó que la sobre expresión de PTP1B

suprime la transformación celular mediada por Bcr-Abl en fibroblastos Rat-1 [75]. Aunque estas observaciones sugerían que PTP1B podría actuar como un supresor tumoral, trabajos de otros grupos de investigación mostraron resultados que contradecían a los estudios hechos en fibroblastos transformados. En dichos trabajos, se determinó que PTP1B actúa como un oncogén en un modelo murino de cáncer de mama dependiente de Neu, ya que los ratones KO y heterocigotos de *PTPN1* son resistentes al desarrollo de tumores de mama. Sin embargo, el mecanismo molecular por el que PTP1B actúa río abajo de Neu para promover la transformación celular aún no está completamente definido. Se ha propuesto que en este modelo PTP1B actúa principalmente sobre dos sustratos, p62^{DOK} y la PTK de tipo no receptor Src. Respecto a p62^{DOK}, se ha establecido que cuando se encuentra fosforilada forma un complejo con p120RasGAP, mantiene a la GTPasa Ras en su forma inactiva y por lo tanto regula negativamente a la vía de RAF/MEK/ERK. Cuando PTP1B desfosforila a p62^{DOK}, esta se disocia de p120RasGAP, conduce a la activación de Ras y a un aumento en la tasa de proliferación celular dependiente de RAF/MEK/ERK [76]. De manera interesante, Julien y colaboradores (2007) observaron niveles elevados de fosforilación de p62^{DOK} y una menor fosforilación de p120RasGAP en los tumores de un modelo murino de cáncer de mama deficiente de PTP1B, lo que es consistente con los resultados *in vitro* antes mencionados [77].

El otro blanco propuesto de PTP1B es Src, y aunque sus niveles de fosforilación no se evaluaron en ninguno de los modelos murinos de cáncer de mama deficientes de PTP1B, una serie de estudios *in vitro* donde se utilizó un sistema de cultivo en 3 dimensiones (3D) demostraron que PTP1B activa a Src de manera dependiente de HER2, al desfosforilar a esta cinasa en el residuo de Tyr527. En este trabajo, se observó que la expresión ectópica de PTP1B silvestre induce cambios en la arquitectura de los cultivos 3D y en la tasa de proliferación de estos esferoides, de manera similar a como lo hace la activación de HER2. Sin embargo, la expresión de un mutante de PTP1B incapaz de unirse a Src no afecta al fenotipo de los esferoides [78]. Aunque el papel oncogénico de PTP1B ha sido extensivamente estudiado en cáncer de mama, estudios recientes han demostrado que PTP1B participa en el desarrollo de otros tipos de cáncer. En pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas

(NSCLC), se ha determinado que existe una asociación entre los niveles de expresión de PTP1B, el grado histológico de los tumores y la supervivencia de los pacientes. En estos tumores, PTP1B desfosforila a la Tyr527 de Src, promueve la activación de la vía de Ras/RAF/MEK/ERK, y favorece que las células proliferen y formen metástasis [79]. En un reporte reciente, se identificaron distintas isoformas de PTP1B generadas por splicing alternativo en aproximadamente el 20% de las muestras de cáncer de colon y de tiroides analizadas. De manera importante, se observó que la isoforma PTP1B Δ E6, no tiene actividad de fosfatasa. Sin embargo, su expresión ectópica induce transformación celular en fibroblastos de manera independiente de Src [80]. Por otra parte, se determinó que en un grupo de 103 pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC), hay una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de PTP1B y el grado histológico del tumor. El mecanismo molecular propuesto para la regulación del crecimiento tumoral del PDAC por PTP1B consiste en la modulación de la vía de PKM2/AMPK/mTORC1. En este modelo, la inhibición farmacológica de PTP1B o su silenciamiento con shRNA promueve un aumento significativo en los niveles de fosforilación de PKM2 en el residuo de Tyr105, lo que favorece la activación de AMPK, que a su vez inhibe a mTORC1 y a la proteína ribosomal p70S6K, lo que conduce a un arresto del ciclo celular en las etapas G0/G1 [81]. Adicionalmente, se ha reportado que la inhibición farmacológica o el silenciamiento de PTP1B en GB disminuyen la adhesión, migración e invasión celulares dependientes de IL-13 a través de la inactivación de las vías de Ras/RAF/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTOR [82]. Finalmente, se ha reportado que PTP1B se encuentra sobre expresada en melanoma, y regula la migración de estas células a través de la activación de Src al desfosforilar a esta cinasa en su residuo de Tyr530 [83].

A pesar de los avances recientes en el estudio del papel oncogénico de PTP1B en distintos tipos de cáncer, los niveles de fosforilación de algunos de los sustratos mejor caracterizados de PTP1B como p62^{DOK} y Src no son consistentes en los modelos animales y celulares reportados hasta la fecha, por lo que resulta indispensable identificar nuevos blancos de PTP1B que pudiesen participar en los mecanismos de migración, supervivencia, proliferación y progresión del ciclo celular de las células cancerosas.

3.10 Ciclo celular

Actualmente, es aceptado que todas las células que se dividen activamente (células cíclicas), lo hacen a través de un conjunto ordenado de eventos denominados ciclo celular, que culmina con el crecimiento de la célula y su posterior división en dos células hijas genéticamente idénticas; mientras que las células terminalmente diferenciadas o que se encuentran en un estado de latencia (no cíclicas), se dice que están en una etapa quiescente, fuera del ciclo celular, denominada G0 (Figura 7).

El ciclo celular típico de una célula humana tiene una duración que varía de 16 a 24 horas y se divide en dos partes.

1) La primera parte es conocida como Interfase, ésta a su vez consta de tres fases:

- Fase G1 (GAP o intervalo 1): Es la fase más larga del ciclo celular, tiene una duración que puede variar de 6-12 horas dependiendo del tipo celular. Da inicio a partir de la citocinesis de la división celular anterior y se caracteriza por tener una gran actividad metabólica en la que la célula incrementa su tamaño, acumula ATP y tiene una alta tasa de síntesis de proteínas y RNA. En esta etapa se encuentra el primer punto de control o “check point” y se determina si hay progresión a la siguiente etapa del ciclo o si la célula entra a un arresto en la fase G0.
- Fase de Síntesis (S): Su duración aproximada es de 6-8 horas. En esta etapa la célula duplica su genoma para transmitir una copia completa de su material genético a cada una de las células hijas. El DNA sintetizado *de novo* durante esta fase queda unido por el centrómero hasta la mitosis (fase M) y reciben el nombre de cromátidas hermanas. En esta fase también se sintetizan altos niveles de proteínas involucradas en la biogénesis de desoxirribonucleótidos, los cuales son esenciales para la replicación del DNA y de histonas, que ayudarán a empaquetar al DNA en nuevos nucleosomas.
- Fase G2 (GAP o intervalo 2): Tiene una duración aproximada de 4 horas. Se sintetizan una gran cantidad de proteínas necesarias para que se lleve a cabo la mitosis. En esta etapa se encuentra el segundo punto de control, en el que la célula verifica que su material genético se encuentre íntegro y completamente

replicado, y de ser necesario, se activa la maquinaria de reparación post-replicativa del DNA.

2) La segunda parte del ciclo celular es la Mitosis (M): En esta fase se reparte el material genético duplicado a cada una de las células hijas a través de la segregación de los cromosomas, y se lleva a cabo la citocinesis, que es propiamente la separación física del citoplasma, en esta etapa se encuentra el tercer punto de control, en el que se verifica si todas las cromátidas hermanas están correctamente unidas a los microtúbulos del huso mitótico [84,85].

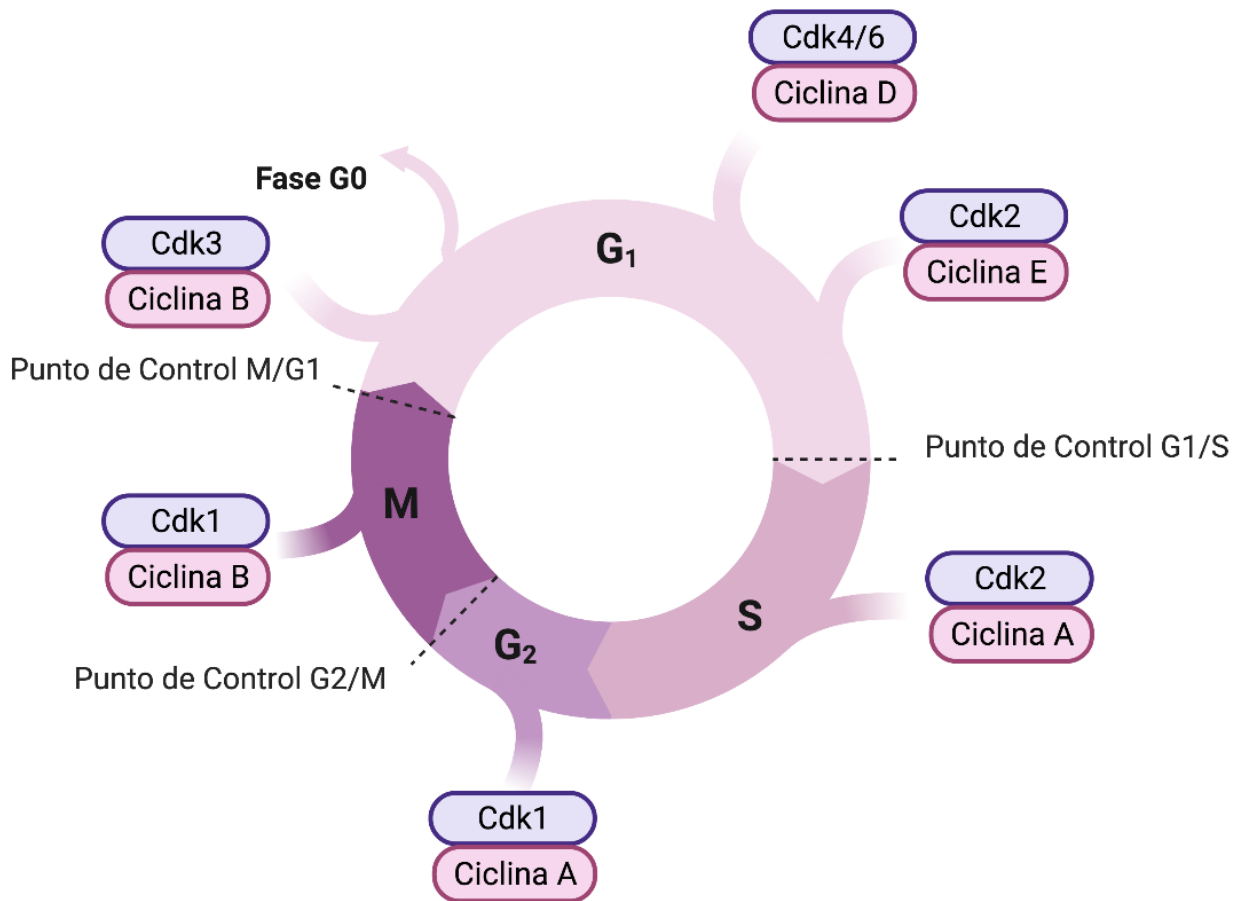


Figura 7. Ciclo Celular. Representación esquemática de las fases del ciclo celular (G0, G1, G2, S y M), localización de los puntos de control G1/S, G2/M y M/G1, así como de los complejos Cdk/Ciclina encargados de regular la transición entre las distintas fases.

3.11 Cdks y otras moléculas reguladoras del ciclo celular

La progresión del ciclo celular está finamente regulada para asegurar que la transición a la siguiente fase del ciclo sólo se lleve a cabo si los eventos de la fase previa han concluido. Este mecanismo de regulación depende de la actividad de complejos proteínicos formados por Ciclinas y Cinasas Dependientes de Ciclina (Cdks por sus siglas en inglés), las cuales actúan como “frenos moleculares” deteniendo la progresión del ciclo en puntos de control o “check points” específicos. A su vez, también existen moléculas inhibitoras de Cdk (CDKIs), las cuales reprimen la actividad de uno o varios complejos de Ciclina–Cdk, por lo que actúan como moduladores negativos del ciclo celular y su función se asocia a la supresión tumoral. Se ha reportado que mutaciones en los genes que codifican a distintas CDKI o la inactivación de la proteína, se encuentran asociados con el desarrollo de diversos tipos de cáncer [84–86].

Las CDKI se han clasificado en dos distintos grupos: las proteínas inhibitoras de cinasa 4 (INK4 por sus siglas en inglés) y las proteínas inhibitoras de Cdk o CIP. Las INK4, sólo se unen y regulan negativamente la actividad de los complejos Ciclina D–Cdk4 y Ciclina D–Cdk6, de éstas, la mejor caracterizada es p16. En contraste, las proteínas CIP se unen y reprimen la actividad de todos los complejos que contengan a Cdk1, 2, 4 y 6, de éstas, las mejor caracterizadas son p21, p27 y p53 [87].

En humanos, se ha reportado la existencia de 29 diferentes Ciclinas y 20 distintas Cdks, las cuales se expresan diferencialmente a través del ciclo celular [88]. Las Cdks pueden clasificarse en dos distintos grupos de acuerdo a su función, Cdk1, 2, 3, 4, 5, 6, 14, 15, 16, 17 y 18 participan en la progresión del ciclo celular, mientras que Cdk7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 19 y 20 son reguladores de la transcripción [89]. Sin embargo, los complejos mejor caracterizados son los de Ciclina D–Cdk4, Ciclina D–Cdk6 y Ciclina E–Cdk2 que son necesarias para que se realice la transición de G1 a S, y los complejos de Cdk2–Ciclina A y Cdk1–Ciclina B que son requeridas para la transición S–G2–M [90]. El mecanismo de regulación postraducciona l de estas cinasas consiste en la fosforilación inhibitora de los residuos de Thr14 y Tyr15 en Cdk1 (o sus posiciones equivalentes en otras Cdks), esta es catalizada por miembros de la familia de cinasas

duales Wee/Mik1 [101–103]. Mientras que la desfosforilación del residuo de Tyr15, necesaria para la actividad de las Cdks, es mediada por la familia de PTPs Cdc25, la cual en humanos consta de tres miembros denominados Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C, los cuales desfosforilan a las Cdks 1, 2, 4 y 6 permitiendo la progresión del ciclo celular. Sin embargo, aunque se ha asumido que la desfosforilación del residuo de Tyr15 de Cdk3 es catalizada por algún miembro de la familia Cdc25, esta no ha sido corroborada [94].

Debido al papel tan importante que tienen las Cdks y moléculas asociadas en la regulación y control de la división celular, no es extraño que un desbalance en su actividad este estrechamente relacionado al desarrollo y progresión de diversas enfermedades como el cáncer [95,96]. Por ejemplo, se ha reportado que en melanoma, cáncer de mama, colon, de pulmón y GB, Cdk4 y Cdk6 se encuentran comúnmente mutadas, lo que conduce a su hiperactividad y a la progresión del ciclo celular de una manera descontrolada [88,97,98]. Además, se ha documentado que la sobre-expresión de ciclinas también se encuentra estrechamente relacionada con el desarrollo de algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, en leucemia, linfomas, cáncer de mama, de colon, de pulmón y GB, es común la amplificación de los genes que codifican a Ciclina D, Ciclina E y Ciclina B1 [98–100]. También se ha observado que en cáncer de pulmón, melanoma, osteosarcoma y cáncer de ovario hay una sobre expresión de las Ciclinas E y A, lo que conduce a una activación constitutiva de Cdk2 [101]. Debido a estos antecedentes, diversas compañías farmacéuticas se han enfocado en desarrollar inhibidores farmacológicos potentes y altamente selectivos contra algunas de las Cdk mejor caracterizadas y estudiadas, como son Cdk4, 6 y 9 [102]. Sin embargo, debido a los mecanismos tan complejos que regulan la actividad de estas enzimas ha resultado un reto el diseño de fármacos dirigidos contra estas moléculas. Además, de que el diseño de inhibidores efectivos contra otras Cdks menos estudiadas no se encuentra en etapas tan avanzadas [103].

3.12 Cdk3 y cáncer

Cdk3 es un miembro de la familia de proteínas Cinasas de Serina y Treonina dependientes de Ciclina. Estudios recientes han demostrado que Cdk3 es activada a

través de su asociación con Ciclina C, lo que permite que fosforile a la proteína Rb en los residuos de Serina 807/811 y que las células quiescentes salgan de la fase G0 para reingresar a G1 [104]. Además, la actividad de Cdk3 es crucial para que se lleve a cabo la transición de la fase G1 a S del ciclo celular [86].

Hasta la fecha son pocos los estudios sobre la participación de Cdk3 en el desarrollo y/o progresión del cáncer. La primera evidencia de la posible participación de Cdk3 en el desarrollo de tumores fue reportada por Bullrich y colaboradores en 1995. En ese trabajo, se analizaron distintas anormalidades cromosómicas asociadas al desarrollo de cáncer de mama y se determinó que los loci 17q25.1, 9q34.11 y 16q24.3, donde se localizan los genes que codifican a las proteínas Cdk3, Cdk9 y Cdk10 presentan rearrreglos cromosómicos que conducen a su sobreexpresión [105]. Un estudio posterior, permitió determinar que Cdk3 se encuentra sobre-expresada a nivel de la proteína en líneas celulares de GB, y que esta cinasa fosforila al factor de transcripción ATF1 en el residuo de Ser63 aumentando su actividad transcripcional. Además, el silenciamiento de Cdk3 con siRNAs reduce significativamente la proliferación y el crecimiento de colonias en agar [106]. Por otra parte, se ha reportado que Cdk3 se encuentra constitutivamente activa en algunos tipos de tumores y que puede regular la expresión del oncogén myc, así como modular la actividad de algunos factores de transcripción como E2F, NFAT y el ER α (Receptor a Estrógenos α , por sus siglas en inglés) para favorecer la proliferación sostenida de células de cáncer de mama y de GB [107–110]. Recientemente, se ha documentado que algunos miRNAs, como miR-873, miR-150, miR125a-3p y miR-4469 regulan postranscripcionalmente a Cdk3 [110–113]. En células de cáncer de mama resistentes a tamoxifen (MCF-7 TamR), se ha reportado que la expresión de miR-873 y miR-125a-3p se encuentra reprimida y que el ER α es fosforilado directamente por Cdk3 en los residuos de Ser104, 106 y 118, lo que incrementa su actividad transcripcional. Adicionalmente, la expresión ectópica de estos miRNAs en las células MCF-7 TamR reduce significativamente la expresión de Cdk3 y restaura la sensibilidad a tamoxifen, lo que sugiere que la inhibición de Cdk3 podría ser benéfica para pacientes con cáncer de mama que han desarrollado resistencia al tratamiento con anti estrógenos [110,112]. Finalmente, se ha reportado que en células de cáncer de pulmón existe una correlación negativa entre los niveles de expresión de

miR-873 y miR-125a-3p, y la expresión de Cdk3. Sin embargo, en este tipo de cáncer aún se desconoce cuáles son los sustratos relevantes de Cdk3 para la adquisición de un fenotipo transformado [114].

Más recientemente, se ha propuesto que Cdk3 podría ser un biomarcador en carcinoma nasofaríngeo, ya que existe una correlación positiva entre los niveles de expresión Cdk3, el grado histológico de los tumores, la infiltración de células tumorales a ganglios linfáticos, y metástasis [115]. Y por último, un estudio de análisis de transcriptoma por RNAseq sugiere que la expresión de Cdk3, Cdk5 y Cdk8 puede ser empleada como un biomarcador en cáncer de colon [116].

4. ANTECEDENTES DIRECTOS

El estudio de moléculas señalizadoras que pudiesen ser empleadas como nuevos blancos de intervención terapéutica en los GBs es prioritario. Una proteína encargada de regular diversas cascadas de señalización implicadas en el inicio y/o progresión del cáncer es PTP1B, la cual se encuentra sobre-expresada y/o amplificada en los GBs [82,98],

Los estudios más detallados de la participación de PTP1B en el desarrollo y progresión del cáncer, han sido en modelos animales y celulares de cáncer de mama, donde se ha demostrado que la inhibición de PTP1B bloquea la transformación celular HER2/ErbB2-dependiente [77,108,109]. Sin embargo, el mecanismo molecular por el que PTP1B actúa río abajo de HER2/ErbB2 para promover la transformación celular aún no está completamente definido. Se ha propuesto que algunos sustratos relevantes de PTP1B en este modelo son p62^{DOK} y Src. Sin embargo, otros estudios que han empleado modelos animales de cáncer de mama que no expresan a PTP1B arrojan resultados inconsistentes en lo que se refiere a los niveles de fosforilación de p62^{DOK} y Src [108,109], por lo que es importante identificar nuevos blancos de esta fosfatasa que pudiesen estar involucrados en el proceso de transformación celular.

Recientemente, realizamos un estudio de fosfoproteómica empleando la técnica de “Marcaje Isotópico Estable en Cultivo Celular” (SILAC, por sus siglas en inglés), lo que permitió identificar a Cdk3 como un potencial nuevo sustrato de PTP1B (Tabla 2, datos no publicados).

Potenciales sustratos de PTP1B	pY que potencialmente desfosforila PTP1B	Secuencia de los fosfopéptidos identificados (pY en negrita y subrayada)	Es un sustrato conocido de PTP1B?	Sitio(s) de pY desfosforilados por PTP1B que han sido reportados
ACTN1	Tyr-12	QQTND <u>Y</u> MQPEE	Si	Tyr-12
DOK1	Tyr-362	KEDPI <u>Y</u> DEPEG	Si	Tyr-362
EGFR	Tyr-1016	VDADE <u>Y</u> LIPQQ	Si	Tyr-1016
GHR	Tyr-487	SNIDF <u>Y</u> AQVSD	Si	Tyr-332, Tyr-487
IGF1R	Tyr-1165	IYETD <u>Y</u> YRKGG	Si	Tyr-1161, Tyr-1165
INSR	Tyr-1177	IYETD <u>Y</u> YRKGG	Si	Tyr-999, Tyr-1185, Tyr-1189, Tyr-1190
INSR	Tyr-1178	YETD <u>Y</u> YRKGGK	Si	Tyr-999, Tyr-1185, Tyr-1189, Tyr-1190
JAK2	Tyr-1007	PQDKE <u>Y</u> YKVKE	Si	Tyr-1007, Tyr-1008
Cdk3	Tyr-15	KIGEG<u>Y</u>GVVYKA	NO	N/A

Tabla 2. Sustratos de PTP1B identificados por SILAC. La tabla muestra algunas de las proteínas que se encuentran fosforiladas en residuos de Tirosina en ausencia de PTP1B, pero desfosforiladas en su presencia, y que fueron identificadas mediante la técnica de SILAC. En negro se muestran algunos de los sustratos conocidos de PTP1B, la posición del residuo de Tirosina (Y) modificado post-traduccionamente por esta fosfatasa y la secuencia blanco de desfosforilación. En rojo se muestra a Cdk3, el potencial nuevo sustrato de PTP1B el cual fue objeto de estudio en este proyecto.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas se ha observado un aumento considerable en las tasas de incidencia y mortalidad por GB tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo [5] y hasta el momento no hay una estrategia terapéutica que incremente el tiempo de vida y la calidad de la misma en los pacientes. Se ha reportado que PTP1B podría estar involucrada en el desarrollo de los GB al regular la actividad de proteínas fundamentales en los procesos de proliferación, supervivencia y migración [13,81,110]. Adicionalmente, los resultados obtenidos en nuestros experimentos de fosfoproteómica nos han permitido identificar aproximadamente 380 potenciales nuevos blancos de PTP1B, algunos de los cuales son relevantes para la supervivencia, migración y proliferación de las células cancerosas.

En este proyecto pretendemos estudiar en células derivadas de GB humanos el efecto que tiene la desfosforilación mediada por PTP1B en la progresión del ciclo celular regulada por Cdk3, la cual se encuentra hiperactiva en distintos tipos de cáncer [105,111–113].

Debido a que en los últimos años el cáncer, y en particular el GB, ha registrado una mayor incidencia en nuestro país, es necesario realizar estudios que potencialmente puedan ser trasladados a la clínica.

En este caso, el estudio detallado de los mecanismos moleculares por los cuales PTP1B promueve la transformación celular, así como los efectos de su inhibición en modelos celulares y animales, potencialmente podría ayudar a mejorar el diseño de terapias combinadas para el tratamiento del cáncer de una manera más efectiva.

6. HIPÓTESIS

La proteína PTP1B desfosforilará al residuo de Tirosina 15 de Cdk3, lo que favorecerá la progresión el ciclo celular en células derivadas de GB humano.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Determinar si Cdk3, es un nuevo sustrato de PTP1B, y evaluar el efecto de su desfosforilación en la progresión del ciclo celular en GB humanos.

7.2 Objetivos Específicos

- 1) Analizar la posible interacción molecular entre PTP1B y Cdk3 utilizando las técnicas de modelaje por homología *in silico* y acoplamiento molecular o “docking”.
- 2) Determinar si PTP1B es capaz de desfosforilar al residuo de Tirosina 15 de Cdk3 empleando un ensayo de actividad de fosfatasa *in vitro*.
- 3) Evaluar si PTP1B y Cdk3 se asocian físicamente en células de GB humano.
- 4) Estudiar el efecto de la desfosforilación de Cdk3 mediada por PTP1B en la progresión del ciclo celular, en los niveles de activación de Cdk3 y su sustrato Rb; y en la expresión de genes blanco de E2F en células de GB humano.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Generación de un modelo *in silico* del dominio catalítico de PTP1B en asociación con el fosfopéptido correspondiente a los residuos 9-21 de Cdk3.

8.1.1 Modelado por homología *in silico* y “docking”

Con el propósito de evaluar la posible interacción molecular entre PTP1B y Cdk3, se diseñó utilizando la técnica de modelado por homología *in silico*, la estructura del péptido correspondiente a Cdk3 fosforilado en el residuo de Tyr15 con el programa PEPstrMOD [119]. Una vez generado el modelo del fosfopéptido, se evaluó su posible interacción *in silico* con PTP1B, para lo cual se siguió la siguiente estrategia:

- I. **Selección de la estructura de PTP1B.** Se seleccionó la estructura cristalográfica de PTP1B con mayor resolución del Protein Data Bank (código 2HNP) [30].
- II. **Acoplamiento molecular o “Docking” péptido-proteína.** El acoplamiento molecular péptido-proteína se generó en el servidor ClusPro [120]. Este servidor requiere un archivo en formato PDB para cada una de las moléculas a evaluar. De manera general, el servidor identificó a los modelos más probables de interacción en tres etapas:
 - a. “Docking” rígido de millones de potenciales conformaciones estructurales en una simulación de un entorno acuoso, a un pH de 7.0 y tomando en cuenta el estado de protonación teórico de los residuos involucrados en la interacción.
 - b. Agrupamiento en clústeres de las 1000 conformaciones estructurales termodinámicamente más estables.
 - c. Refinamiento de estas conformaciones estructurales mediante minimización de energía usando el módulo CHARMM.

Como resultado, el servidor realizó el agrupamiento de estructuras ordenándolas de acuerdo con el número de miembros que contiene cada clúster y entonces seleccionamos al modelo termodinámicamente más estable. Finalmente, los complejos de PTP1B y Cdk3 se visualizaron con el programa YASARA.

8.2 Determinación de la actividad de PTP1B sobre Cdk3 *in vitro*

La secuencia consenso de desfosforilación por PTP1B ha sido reportada previamente [44]. Un análisis del listado de proteínas obtenido de los experimentos de SILAC ha permitido identificar varios potenciales nuevos sustratos de PTP1B que han sido relacionados a algún tipo de cáncer, en este proyecto nos enfocaremos en la cinasa dependiente de ciclina, Cdk3.

8.2.1 Ensayo de actividad de fosfatasa *in vitro*

Con el objetivo de evaluar si Cdk3 es un nuevo sustrato de PTP1B, se utilizó un ensayo colorimétrico para medir la actividad de fosfatasa (Protein Tyrosine Phosphatase 1B Assay Kit, Colorimetric. Merck Millipore) empleando el protocolo sugerido por el proveedor. Brevemente, en una placa de 96 pozos se colocaron 45 μL de Buffer de ensayo 1X para cada reacción, 2.5 ng de PTP1B recombinante diluidos en un volumen final de 5 μL , y 50 μL de un fosfopéptido correspondiente a los residuos 9-21 de Cdk3 fosforilado en el residuo de Tyr15 a una concentración final de 75 μM . Como control positivo, se empleó un fosfopéptido que corresponde a los residuos 1142-1153, del IR β fosforilado en el residuo de Tyr 1146, y como control negativo se incubó la mezcla en ausencia de péptido. Las muestras se incubaron durante 30 min a 30°C, y la reacción se detuvo adicionando 25 μL de Reactivo Rojo. Las muestras se incubaron durante 30 min en la oscuridad, y la absorbancia se midió a 620 nm en un lector de placas. Finalmente, la cantidad de nmoles de PO_4^{2-} liberados por los fosfopéptidos de Cdk3 y del IR β por acción de PTP1B fueron calculados empleando el programa Prism 7.

8.3 Evaluación de la asociación física de Cdk3 y PTP1B en un contexto celular

8.3.1 Cultivo celular

La línea celular HEK-293T y las líneas celulares de GB humano LN229, U87-MG y U251 se cultivaron en medio DMEM/F12 (BIOWEST®) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%. Las células se mantuvieron en una

incubadora con una atmósfera de CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C y se dividieron cuando alcanzaron un 80% de confluencia.

8.3.2 Transformación de bacterias competentes

Los vectores de expresión eucarionte pCMV-neo Cdk3-HA (que contiene el cDNA que codifica a la proteína Cdk3 humana fusionada en su extremo C-terminal a una bandera de HA, plásmido Addgene 1881) y pcDNA4/myc-His PTP1B (que contiene el cDNA que codifica a la proteína PTP1B de ratón fusionada en su extremo C-terminal a una bandera de myc y a una de His(6X), donado por el Dr. Michel Tremblay, McGill University) se utilizaron para transformar bacterias competentes *E. coli* de la cepa XL10 Gold. Se añadieron 100 ng de los plásmidos a 50 µL de bacterias competentes, la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, a continuación se aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 minutos, y se añadió 1 mL de medio LB estéril sin antibióticos. Las bacterias fueron incubadas durante 1 hora a 37°C en agitación, y posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se adicionó 0.1 mL de LB estéril para resuspender el botón de bacterias y finalmente sembrarlas en placas de agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml).

8.3.3 Purificación de plásmidos

Para la purificación del DNA plasmídico, las colonias candidatas se sembraron en 5 mL de medio LB-Amp (100 µg/mL) y se incubaron durante 15 horas a 37 °C con agitación constante. La purificación de los plásmidos se realizó empleando el kit de miniprep GenJet plasmid miniprep kit (Thermo), de acuerdo protocolo sugerido por el proveedor. Brevemente, el cultivo de bacterias se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó durante 2 minutos a 13,500 rpm y el sobrenadante se desechó. El botón de bacterias se resuspendió en 250 µL de buffer de resuspensión suplementado con RNasa A, para a continuación añadir 250 µL de buffer de lisis y mezclar por inversión suave 8 veces, después se agregaron 350 µL de buffer de neutralización, la suspensión se mezcló por inversión y se centrifugó por 10 minutos a 13,500 rpm a temperatura

ambiente. El sobrenadante que contiene al plásmido se recuperó, se transfirió a una columna de afinidad y se centrifugó durante un minuto a 13,500 rpm. Posteriormente, la columna fue lavada con 700 μ L de buffer de lavado 2 veces, se centrifugó a 13,500 rpm durante un minuto, y se desechó la solución que salió a través de la columna. Finalmente, las columnas se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL y los plásmidos se eluyeron de la columna adicionando 30 μ L de buffer de elusión y las muestras se centrifugaron durante un minuto a 13,500 rpm.

La concentración del plásmido se determinó en un espectrofotómetro EPOCH BIOTEK, y su identidad se verificó mediante restricción enzimática.

8.3.4 Transfección

Los vectores de expresión eucarionte pcDNA4/myc-His PTP1B y pCMV-neo Cdk3-HA se co-transfectaron en la línea celular HEK-293T con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogene) y el siguiente protocolo: los complejos de DNA - lípidos catiónicos se prepararon al diluir 5 μ g del vector pcDNA4/myc-His PTP1B junto con 5 μ g del vector pCMV Cdk3-HA y 30 μ L de lipofectamina en 1000 μ L de Opti-MEM®. Las muestras se mezclaron con ayuda de un vortex y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente.

Una caja de cultivo de 10 cm con células HEK-293T al 80% de confluencia se lavó una vez con 5 ml de PBS 1X estéril y se adicionaron 5 mL de medio de cultivo fresco, la mezcla de DNA - lipofectamina se añadió al cultivo por goteo y las células fueron incubadas a 37° C durante 24 hrs. Posteriormente, la expresión de Cdk3-HA se indujo sincronizando en G0 a las células co-transfectadas mediante ayuno de suero durante 48 horas. Finalmente, las células se lavaron y se procesaron para evaluar la co-expresión de PTP1B y Cdk3 por Western blot, o para evaluar la co-localización de ambas proteínas mediante inmunofluorescencia.

8.3.5 Extracción y cuantificación de proteínas

Las cajas de cultivo con las diferentes líneas celulares se lavaron en PBS 1X (137 mM NaCl, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) y se rasparon en 300 μ L de buffer RIPA 1X [Tris-HCl, pH 7,4 (50 mM), NaCl (150 mM), NP-40 (1%),

desoxicolato de sodio (0,5%), SDS (0,1%), EDTA (5 mM), cóctel inhibidor de proteinasas (COMPLETE, Roche)]. La suspensión de células se mezcló por agitación con un vórtex, el homogeneizado se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 min a 13,500 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorff nuevo.

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry, empleando el kit BCA Protein Assay (BioRad) de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor. Posteriormente, se construyó una curva estándar con albúmina entre las concentraciones de 0 a 1 mg/ml. Las lecturas de absorbancia se registraron a 750 nm y todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado.

8.3.6 SDS-PAGE

Para evaluar la expresión de las proteínas analizadas en este trabajo, 50 µg de proteínas totales de las distintas líneas celulares fueron mezcladas con un volumen de buffer Laemmli 2X (Tris-HCl 120 mM pH = 6.8, SDS al 4%, glicerol al 20%, beta-mercaptoetanol al 1%, azul de bromofenol al 0.02%). Las muestras se hirvieron a 96°C durante 5 min y se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. El gel separador se preparó empleando una mezcla de acrilamida al 10%, bis-acrilamida al 1%, Tris 375 mM pH = 8.8 y 0.1% de SDS. Para lograr la polimerización del gel se añadieron persulfato de amonio al 0.05% y TEMED al 0.003%. El gel concentrador se preparó con una mezcla de acrilamida al 4%, bis-acrilamida al 0.1%, Tris 125 mM pH = 6.8 y SDS al 0.1%, 0.05% de persulfato de amonio y 0.005% de TEMED. La separación de proteínas se realizó aplicando un voltaje constante de 120 V hasta que el colorante del buffer llegara a la parte baja del gel.

8.3.7 Western blot

Las proteínas separadas electroforéticamente en geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF utilizando el equipo Thermoblot® durante 30 minutos a 400 mA. La transferencia de las proteínas se corroboró mediante una tinción de la membrana de PVDF con una solución de rojo de Ponceau al 0.5% en ácido acético al 2% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se lavaron con TBS-

Tween 0.1% (Tris base 50 mM, pH = 7,5, NaCl 150 mM) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en leche descremada sin grasa al 5% disuelta en TBS-Tween 0.1%, y se incubaron con los anticuerpos primarios en agitación constante durante la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces durante 15 minutos con TBS-Tween al 0,1%. Después del último lavado, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo (1:10,000) acoplados a peroxidasa de rábano durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween al 0.1%, se sumergieron en 0.5 mL de solución del sustrato Clarity Western ECL (BIO-RAD), y se expusieron a una placa autorradiográfica HyBlot ES®.

8.3.8 Co-localización

Las células que fueron co-transfectadas con los plásmidos pcDNA4/myc-His PTP1B y pCMV-neo Cdk3-HA se sembraron sobre cubreobjetos colocados en placas de cultivo de 6 pozos. Posteriormente, las células se fijaron durante 30 min con PFA al 4% en PBS, se lavaron 3 veces con glicina 100 mM en PBS y se permeabilizaron con PBS-Triton X-100 al 0.5% a 4°C durante 15 min, para después bloquear las laminillas con BSA al 5% en PBS-Tritón X-100 al 0.1%. Posteriormente, las laminillas se incubaron con anticuerpos primarios dirigidos contra la bandera de myc generados en ratón, y con anticuerpos primarios dirigidos contra la bandera de HA generados en conejo durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las laminillas se lavaron 3 veces con glicina 100 mM en PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón acoplados a Alexa 594 y anticuerpos secundarios anti-conejo acoplados a Alexa 488 durante 45 min en la oscuridad. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio confocal Leica TCS SP8 y la co-localización de ambas proteínas se calculó empleando el software Image J.

8.3.9 Ensayo de ligación por proximidad

Con el propósito de determinar si las proteínas PTP1B y Cdk3 expresadas de manera endógena en células de GB humano se asocian físicamente, se empleó la técnica de

ensayo de ligación por proximidad (Duolink PLA Technology, Sigma-Aldrich) de acuerdo con el protocolo sugerido por el proveedor. Brevemente, 2500 células de las líneas LN229, U87-MG y U251 se sembraron en laminillas de cultivo de 16 pozos (Nunc-LabTeck Chamber slides) recubiertas con Laminina, y se permitió que se adhirieran durante 16 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron con 50 μ L de PFA al 4% en PBS durante 10 min. A continuación, las células se lavaron 3 veces durante 5 minutos en un vaso Coplin con PBS 1X, se permeabilizaron con PBS-Triton X-100 al 0.5% durante 10 min y se lavaron nuevamente 3 veces durante 5 minutos en un vaso Coplin con TBS-Tween 20 al 0.05%. El bloqueo de las células se realizó con 1 gota de Duolink II Blocking Solution (1x), y la laminilla se incubó durante una hora a 37°C en una cámara húmeda.

Posterior al bloqueo, se adicionaron 40 μ L de los anticuerpos primarios (anti-Cdk3 generado en ratón y anti-PTP1B generado en conejo) previamente diluidos 1:100 en Duolink II Antibody Diluent (1x) por pozo y se incubó la laminilla durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiraron los anticuerpos, la laminilla se lavó 3 veces durante 5 min en Buffer de Lavado A en un vaso Coplin, y a continuación se adicionaron las sondas de PLA (Duolink II anti-Mouse MINUS y Duolink II anti-Rabbit PLUS) previamente diluidas 1:5 en la solución Antibody Diluent 1X. La laminilla se incubó durante una hora a 37°C en una cámara húmeda, y a continuación, se realizó el procedimiento de circularización, para lo cual las sondas se retiraron y la laminilla se lavó dos veces durante 5 min con Buffer de Lavado A en un vaso Coplin y se añadieron 40 μ L de ligasa diluida 1:40 en la solución Duolink II Ligation Stock 1X por pozo y la laminilla se incubó durante 30 min a 37°C en una cámara húmeda. Finalmente, se realizó la amplificación de las sondas circularizadas. En este paso, la ligasa se retiró, la laminilla se lavó dos veces durante 2 min con Buffer de Lavado A en un vaso Coplin, se adicionaron 40 μ L de la polimerasa diluida 1:80 en la solución Duolink II Amplification Stock 1X, y la laminilla se incubó durante 100 min a 37°C en una cámara húmeda. Una vez transcurrido el tiempo, la laminilla se lavó dos veces durante 10 min con Buffer de Lavado B en un vaso Coplin. La parte plástica de los multipozos y el silicón de la laminilla se retiraron, y la muestra se montó con medio

de montaje Duolink II Mounting Medium con DAPI. Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra, se selló con barniz, las células se visualizaron en un microscopio confocal Leica TCS SP8 y las imágenes se analizaron mediante el programa Duolink Image Tool.

8.4 Determinación del efecto de la inhibición farmacológica o del silenciamiento con siRNAs de PTP1B en la progresión del ciclo celular en células de GB humano.

Con el propósito de determinar el efecto que tiene la inhibición farmacológica o el silenciamiento con siRNAs de PTP1B en procesos celulares regulados por Cdk3, se evaluó en primer lugar la progresión del ciclo celular en las cuatro líneas celulares de GB humano mediante citometría de flujo. Brevemente, las células fueron sembradas en placas de 6 pozos y sincronizadas mediante ayuno de suero, y transfectadas con siRNAs dirigidos contra PTP1B, o incubadas en presencia de vehículo o de 5 μ M del inhibidor alostérico de PTP1B, Claramina. Posteriormente se adicionó en el medio de cultivo suero fetal bovino a una concentración final del 10%. Se colectaron células a las 0, 24 y 48 horas después de la estimulación, y las muestras fueron almacenadas en etanol absoluto a -20°C hasta su uso. El día del análisis por citometría, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y fueron teñidas usando el kit de tinción yoduro de propidio/RNasa (BD PharMingen) en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, el análisis de ciclo celular se realizó en un citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) y el programa FlowJo versión 10.6. El experimento se realizó por triplicado, y se analizaron un total de 10,000 células por cada condición experimental.

8.5 Evaluación del efecto de la inhibición farmacológica o del silenciamiento con siRNAs de PTP1B en la actividad de Cdk3 y sus efectores.

Con el propósito de determinar el efecto de la inhibición farmacológica de PTP1B en la actividad de Cdk3 y de sus efectores, se realizaron experimentos de Western blot para detectar las formas fosforiladas de Cdk3 en el residuo de Tyr15 (forma inactiva), y de Rb fosforilado en los residuos de Ser807/811 (forma activa que reprime la transcripción

mediada por E2F). Se determinaron también los niveles de expresión de los genes blanco de E2F: Cdk1, Ciclina A y Ciclina E1 mediante RT-qPCR. Brevemente, las líneas celulares LN229, U87-MG y U251 fueron sembradas en cajas de 10 cm y transfectadas con siRNAs dirigidos contra PTP1B, o incubadas en presencia de vehículo o de 5 μ M de Claramina durante 24 horas. Las células fueron lisadas en buffer RIPA 1X, y mediante Western blot se analizó la actividad de Cdk3 con el anticuerpo anti-fosfo Cdk3 Tyr15, y la de su efector Rb con el anticuerpo anti-fosfo Rb Ser807/811. También se determinaron los niveles de expresión PTP1B, Cdk3 y Rb con anticuerpos primarios dirigidos contra la proteína de interés. GAPDH se utilizó como control de carga.

8.6 Ensayos RT-qPCR y análisis de expresión de mRNA.

Las líneas celulares LN229, U87-MG y U251 fueron sembradas en cajas de 10 cm e incubadas en presencia de vehículo o de 5 μ M de Claramina durante 24 horas. Para la extracción de RNA se utilizó el reactivo TRIzol (Invitrogen). La síntesis de cDNA se generó a partir de 2 μ g de RNA total mediante el sistema de transcripción inversa ImProm-II. La detección de la expresión de los mRNA de los genes blanco de E2F: Cdk1, Ciclina A y Ciclina E1 se realizó con el kit Probe Master (Roche) y sondas de hidrólisis (Universal Probe Library "UPL", Roche) en un equipo de PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de los oligonucleótidos se diseñaron empleando el programa bioinformático de análisis de predicción de secuencias ProbeFinder versión 2.45 para Humano de Roche. Las secuencias de los oligonucleótidos usados fueron las siguientes: Cdk1 Fwd 5' ggaaaccaggaagcctagcatc 3', Rev 5' ggatgattcagtgccattttgcc 3'; Ciclina A Fwd 5' tgtgcacggaaggactttgt 3', Rev 5' tcctcttgagaagatcagccg 3'; Ciclina E1 Fwd 5' tgtgtcctggatgttgactgcc 3', Rev 5' ctctatgtcgcaccactgatacc 3'; y GAPDH Fwd 5' ccccggttctataaattgagc 3', Rev 5' caccttccccatggtgtct 3'. Los niveles de expresión del mRNA se normalizaron respecto a los de GAPDH que se usaron como control de expresión. Los análisis de expresión se llevaron a cabo mediante el método $\Delta\Delta T$. Se usaron secuencias de oligonucleótidos y sondas UPL en las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 40 ciclos de

desnaturalización a 95°C durante 10 s, alineamiento a 60°C durante 15 s y extensión a 72°C durante 1 min.

8.7 Análisis estadístico.

Todos los datos obtenidos fueron analizados y graficados en el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, EUA). Los datos muestran los resultados de tres experimentos independientes. Se hizo una ANOVA de una vía con un post-test de Bonferroni para hacer el análisis entre grupos. Los datos de RT-qPCR y Western Blot fueron analizados con una t de Student de dos colas. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

9. RESULTADOS

9.1 Modelado por homología *in silico* de la proteína Cdk3 y “docking” local PTP1B - Cdk3.

Con el propósito de evaluar la posible formación de un complejo entre PTP1B y Cdk3 *in silico*, se generó la probable estructura de un péptido correspondiente a los aminoácidos 9-21 de Cdk3 con una fosforilación en el residuo de Tyr15, empleando el programa PEPstrMOD, y se realizó un “docking” local con el dominio de fosfatasa de PTP1B obtenido a partir de su estructura cristalográfica a una resolución de 1.5 Å (PDB ID: 2HNP). Esta metodología permitió generar aproximadamente 900,000 probabilidades de interacción que fueron agrupadas en clusters, de acuerdo a la probabilidad de asociación entre ambas moléculas. Los resultados de este agrupamiento y refinamiento de estructuras se muestran en la Tabla 3, dónde se indica el porcentaje de complejos que se agrupan en cada clúster, el score (el cual entre más negativo indica que el complejo es termodinámicamente más estable), si el fosfopéptido de Cdk3 ocupa el sitio activo de PTP1B y si el residuo de pTyr15 de Cdk3 se encuentra a una distancia óptima de los residuos catalíticos Cys215 y Arg221 de PTP1B. De estos resultados destaca que en más del 50% de los modelos de interacción generados, el fosfopéptido de Cdk3 ocupa el sitio activo de PTP1B, y el residuo de pTyr15 se encuentra cerca de los residuos catalíticos Cys 215 y Arg 221 de PTP1B.

Cluster	%	Score	Comentarios
1	23%	-870	<u>El fosfopéptido ocupa el sitio activo de PTP1B y la pTyr está cercana a los residuos catalíticos (Cys 215 y Arg 221)</u>
2	14%	-889	El fosfopéptido queda lejos del sitio activo de PTP1B
3	11%	-889	El fosfopéptido queda lejos del sitio activo de PTP1B
4	10%	-843	El fosfopéptido ocupa el sitio activo de PTP1B pero la pTyr no está cercana a los residuos catalíticos (Cys 215 y Arg 221)
5	8%	-933	El fosfopéptido queda lejos del sitio activo de PTP1B
6	8%	-872	<u>El fosfopéptido ocupa el sitio activo de PTP1B y la pTyr está cercana a los residuos catalíticos (Cys 215 y Arg 221)</u>
7	8%	-845	<u>El fosfopéptido ocupa el sitio activo de PTP1B y la pTyr está cercana a los residuos catalíticos (Cys 215 y Arg 221)</u>
8	6%	-906	El fosfopéptido queda lejos del sitio activo de PTP1B
9	6%	-863	<u>El fosfopéptido ocupa el sitio activo de PTP1B y la pTyr está cercana a los residuos catalíticos (Cys 215 y Arg 221)</u>
10	6%	-878	<u>El fosfopéptido ocupa el sitio activo de PTP1B y la pTyr está cercana a los residuos catalíticos (Cys 215 y Arg 221)</u>

Tabla 3. Resultados del “docking” péptido-proteína realizado con el programa ClusPro

De todos los modelos generados, el más probable es el correspondiente al clúster 1, ya que agrupa a 230 de los 1000 modelos seleccionados, y el residuo de pTyr15 de Cdk3 se encuentra cercano a los residuos catalíticos Cys215 y Arg221 del dominio de fosfatasa de PTP1B (Figura 8).

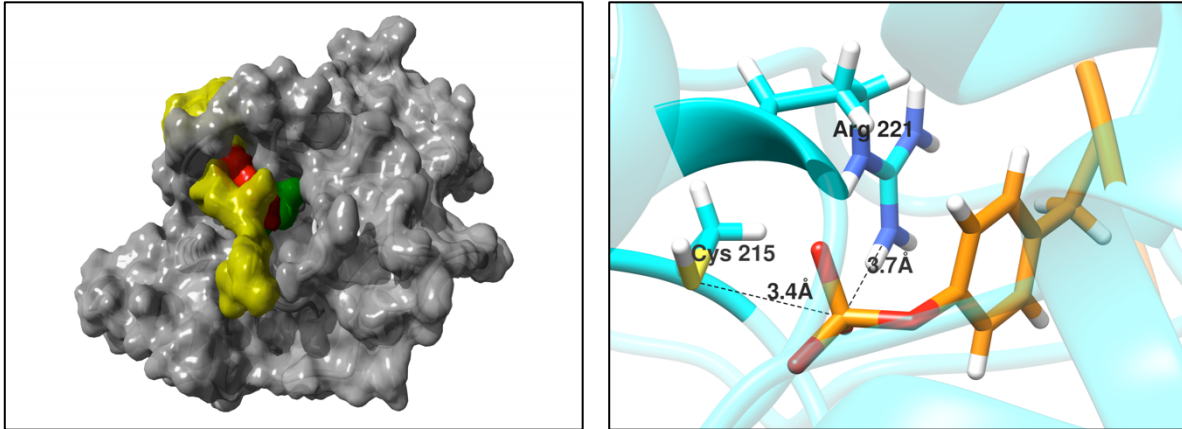


Figura 8. Probable estructura del complejo formado entre el fosfopéptido de Cdk3 y PTP1B. En la imagen del lado izquierdo se muestra la interacción *in silico* entre PTP1B y el fosfopéptido de Cdk3 en condiciones hidrofílicas. En gris se muestra PTP1B con el residuo catalítico de Cys215 en color verde, y en amarillo al fosfopéptido de Cdk3 con el residuo de pTyr15 en rojo. La imagen del lado derecho muestra un acercamiento para visualizar la interacción de los residuos catalíticos Cys 215 y Arg 221 de PTP1B con la pTyr15 de Cdk3 marcada en color naranja.

A continuación, la estabilidad del complejo se evaluó mediante dinámica molecular y se obtuvo un valor de energía de unión a ligando de -458.067 kcal/mol, lo que sugiere que PTP1B tiene una alta afinidad por Cdk3.

Una vez evaluada la estabilidad del complejo péptido-proteína, se generó un modelo de interacción proteína-proteína mediante el uso de las estructuras del dominio catalítico de PTP1B y la estructura completa de Cdk3 con el propósito de determinar si en un contexto de proteínas completas, el complejo PTP1B-Cdk3 es termodinámicamente estable. Debido a que no se ha reportado la estructura cristalográfica de Cdk3, se generó un modelo por homología *in silico*, usando como molde a la estructura cristalográfica de Cdk2, la cual presenta el 74% de identidad con Cdk3. Una vez que el modelo fue obtenido y refinado, se realizó un “docking” local (Figura 9) y un análisis de dinámica molecular (Figura 10), en donde se observó que la energía de unión a ligando entre las proteínas completas es de -1723.93 kcal/mol, y que la distancia entre el residuo de pTyr15 de Cdk3 y el grupo SH de la Cys215 de PTP1B es de 6.9 Å.

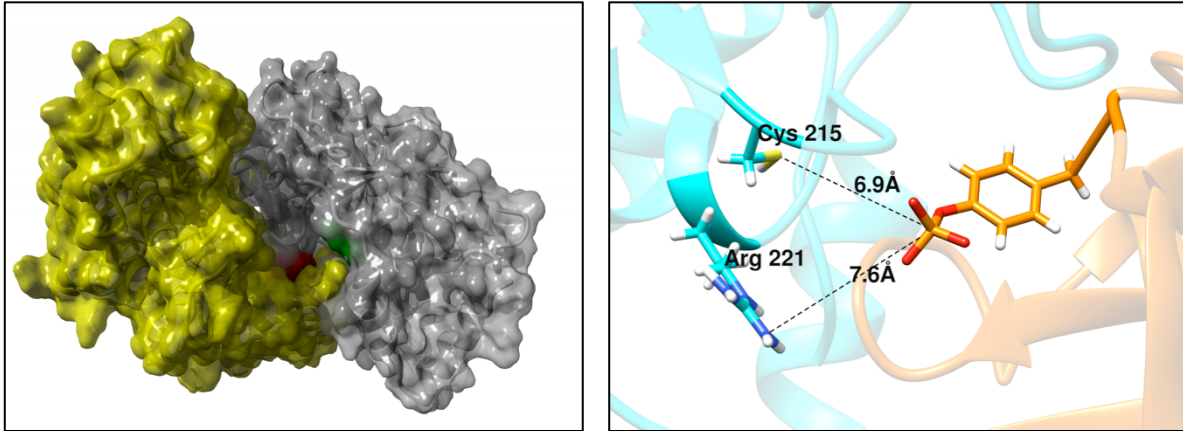


Figura 9. Predicción de la estructura del complejo formado por PTP1B y Cdk3. El acoplamiento molecular de las estructuras completas de las proteínas PTP1B (en gris) y Cdk3 (en amarillo) se muestra en la imagen del lado izquierdo. El residuo de pTyr15 de Cdk3 está indicado en color rojo, y el residuo de Cys215 de PTP1B en verde. La imagen del lado derecho muestra un acercamiento para visualizar la interacción del grupo SH del residuo de Cys 215 de PTP1B con la pTyr15 de Cdk3.

Los valores de RMSD (desviación cuadrática media de las posiciones atómicas, por sus siglas en inglés) obtenidos en el análisis de dinámica molecular indican que este complejo se mantiene estable durante los 80 nanosegundos (ns) de la simulación, y que PTP1B y Cdk3 se encuentran entre 1.2 y 2.0 Å de distancia, sugiriendo que esta distancia es óptima para que ocurra la reacción de desfosforilación (Figura 10).

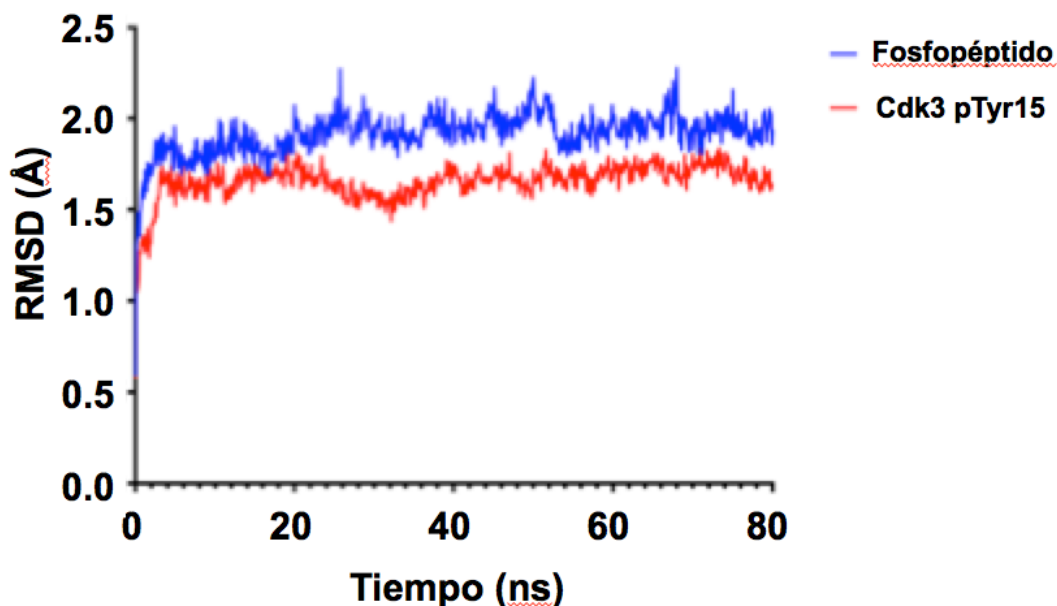


Figura 10. Variación de la distancia entre las posiciones atómicas de PTP1B y el fosfopéptido de Cdk3. La gráfica muestra las variaciones de los valores de RMSD de los C α de PTP1B y el fosfopéptido de Cdk3 (línea roja), y de las estructuras completas de PTP1B y Cdk3 (línea azul) en 80 ns de simulación.

Los datos de la simulación por dinámica molecular de la interacción entre PTP1B y el fosfopéptido de Cdk3 sugieren que el proceso de desfosforilación es un evento rápido, ya que durante los primeros 58 ns de la simulación, la distancia entre el residuo catalítico Cys215 de PTP1B y el residuo de pTyr15 de Cdk3 es menor a 3.8 Å, y después de los 60 ns de simulación, esta distancia aumenta hasta los 4.8 Å, lo que indica que el proceso de desfosforilación ha ocurrido y que ambas proteínas se están alejando para disociarse (Figura 11).

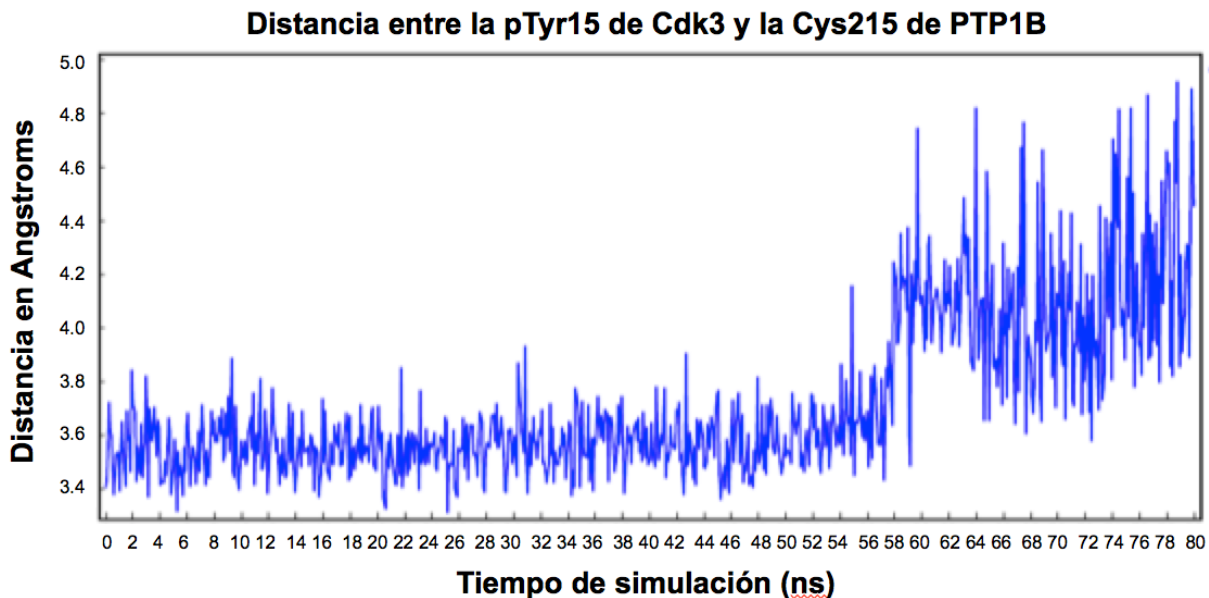


Figura 11. Variación de la distancia entre el residuo de Cys215 de PTP1B y el residuo de pTyr15 de Cdk3. La gráfica muestra las variaciones de la distancia entre el residuo de Cys215 de PTP1B y la pTyr15 Cdk3 durante 80 ns de simulación.

Con el propósito de determinar si los resultados obtenidos son similares a los de algún sustrato conocido de PTP1B, se generó un modelo de interacción proteína-proteína entre esta fosfatasa y uno de sus sustratos mejor caracterizado, el IR β . El análisis de dinámica molecular mostró que la energía de unión a ligando entre las proteínas completas es de -1677.23 kcal/mol, y que la distancia entre la fosfotirosina 1146 del IR β y el grupo SH de la Cys215 de PTP1B es de 5.4 Å (Figura 12). La comparación de los valores de energía de unión a ligando y de la distancia entre el residuo de fosfotirosina de ambos sustratos y los residuos catalíticos de PTP1B nos permiten concluir que Cdk3 es un sustrato óptimo de PTP1B *in silico*.

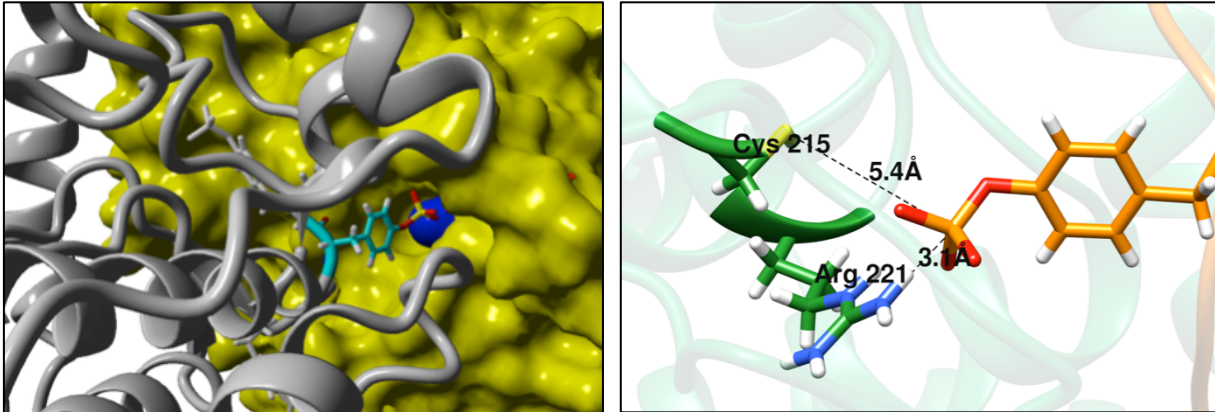


Figura 12. Probable estructura del complejo entre el IR β y PTP1B. En la imagen del lado izquierdo se muestra la interacción *in silico* entre PTP1B (en amarillo) y el IR β (en gris) en condiciones hidrofílicas. El residuo de pTyr1146 del IR β está indicado en color cian, y el residuo de Cys25 de PTP1B en azul rey. La imagen del lado derecho muestra un acercamiento para visualizar la interacción del grupo SH del residuo de Cys215 de PTP1B (en verde) con la pTyr1146 del IR β (en naranja).

9.2 Cdk3 es un sustrato de PTP1B *in vitro*

Una vez que se comprobó *in silico* que PTP1B forma un complejo estable con el fosfopéptido de Cdk3, se procedió a evaluar si esta cinasa es un sustrato de PTP1B *in vitro* mediante un ensayo colorimétrico que permite medir la actividad enzimática de la fosfatasa a través de la determinación de los nmoles de PO_4^{2-} liberados por un fosfopéptido en presencia de PTP1B. En primer lugar, se evaluó la actividad catalítica de PTP1B sobre el fosfopéptido de Cdk3 a diferentes tiempos (0, 5, 10, 20 y 30 min). Como control positivo se utilizó a un péptido del IR β fosforilado en el residuo de Tyr1146, y como control negativo se incubó a PTP1B en ausencia de péptido. Para calcular los nmoles de PO_4^{2-} liberados por los fosfopéptidos de Cdk3 y del IR β en presencia de PTP1B, se midió la absorbancia a 620 nm. Se observó que PTP1B desfosforila a Cdk3 casi con la misma eficiencia que al IR β (Figura 13).

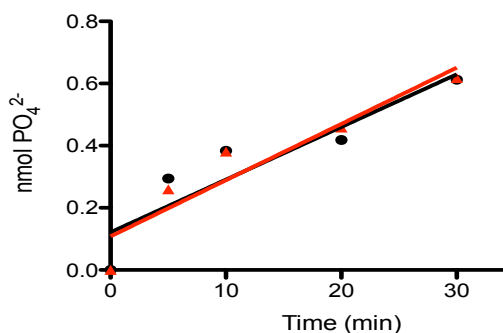


Figura 13. Ensayo de actividad enzimática de PTP1B *in vitro*. Curva de liberación de fosfatos de un fosfopéptido correspondiente a los residuos 9-21 de Cdk3. La gráfica indica nmol PO₄²⁻ liberados del fosfopéptido de Cdk3 a los 0, 10, 20, 30 min después de la adición de PTP1B (línea roja). Como control positivo se utilizó un fosfopéptido del IRβ (línea negra).

A continuación, se calcularon las constantes cinéticas de Velocidad Máxima (V_{max}) y Constante de Michaelis (K_m) empleando un análisis de regresión no lineal de Michaelis-Menten [121]. Los valores de V_{max} obtenidos (36.85 pmol/min y 27.61 pmol/min para el IRβ y Cdk3 respectivamente) indican que PTP1B desfosforila más rápidamente al IRβ que a Cdk3. Sin embargo, los valores de la K_m obtenidos (22.06 μ M y 12.21 μ M para el IRβ y Cdk3, respectivamente) indican que PTP1B presenta mayor afinidad por Cdk3 que por nuestro control positivo, el IRβ (Figura 14).

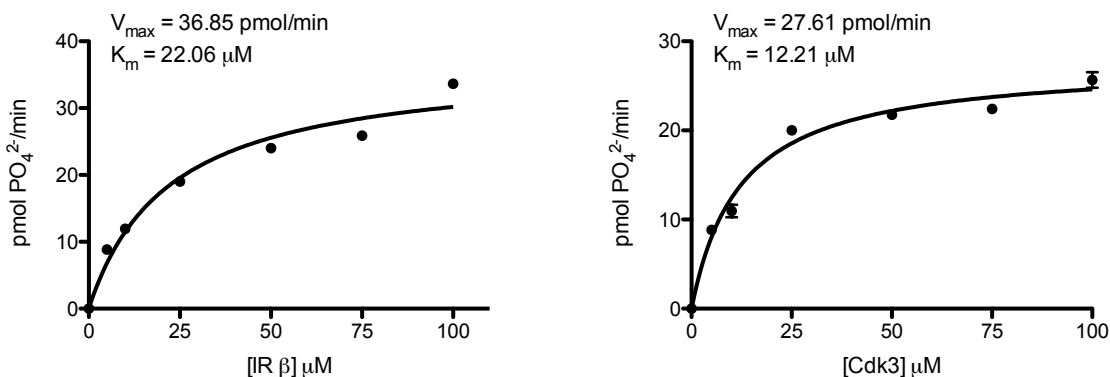


Figura 14. Curva de saturación de PTP1B con los fosfopéptidos del IRβ y Cdk3. La gráfica del lado izquierdo muestra los resultados del experimento de cinética enzimática del IRβ, y la del lado derecho, de Cdk3. PTP1B tiene mayor afinidad enzimática por Cdk3 que por el IRβ al tener una K_m menor. En el eje de las X se indica la cantidad en μ M de sustrato utilizado, y en el eje de las Y se indica la cantidad de PO₄²⁻ liberado.

Los datos obtenidos fueron empleados para calcular la cantidad, expresada en nmoles, de PO_4^{2-} liberados por los fosfopéptidos de Cdk3 y del IR β cuando fueron incubados en presencia de PTP1B. Nuestros resultados indican que PTP1B desfosforila a ambos péptidos con la misma eficiencia (Figura 15).

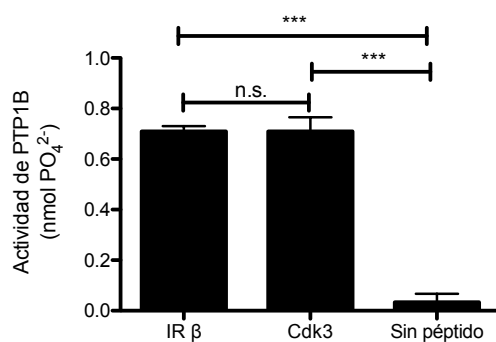


Figura 15. Actividad *in vitro* de PTP1B contra Cdk3. La actividad *in vitro* de PTP1B como un fosfopéptido correspondiente de Cdk3 se determinó empleando un ensayo de fosfatasa con Verde de Malaquita. Como control positivo se utilizó un fosfopéptido del IR β . Cada ensayo se realizó por triplicado y se calcularon los nmol de fosfato liberado. n.s = sin diferencias estadísticamente significativas, *** $p < 0.0001$

Todos estos resultados nos permiten concluir que el residuo de pTyr15 de Cdk3 es un sustrato de PTP1B, y que lo desfosforila casi con la misma eficiencia que a uno de sus sustratos mejor caracterizado y ampliamente estudiado, el IR β .

9.3 PTP1B y Cdk3 interactúan en un contexto celular

Con el propósito de determinar si Cdk3 interactúa con PTP1B en un contexto celular, se realizó una primera aproximación a través de la co-trasfección de células HEK293-T con vectores de expresión eucarionte que contienen los genes que codifican a PTP1B fusionados a una bandera de myc, y a Cdk3 fusionado a una de HA; y su expresión se evaluó mediante la técnica de Western blot, en donde se emplearon anticuerpos primarios anti-myc y anti-HA para la inmunodetección de PTP1B y Cdk3, respectivamente. Una vez confirmada la co-expresión de ambas proteínas, se analizó su posible co-localización mediante inmunofluorescencia, y se observó que co-localizan en la envoltura nuclear de las células HEK293-T (Figura 16).

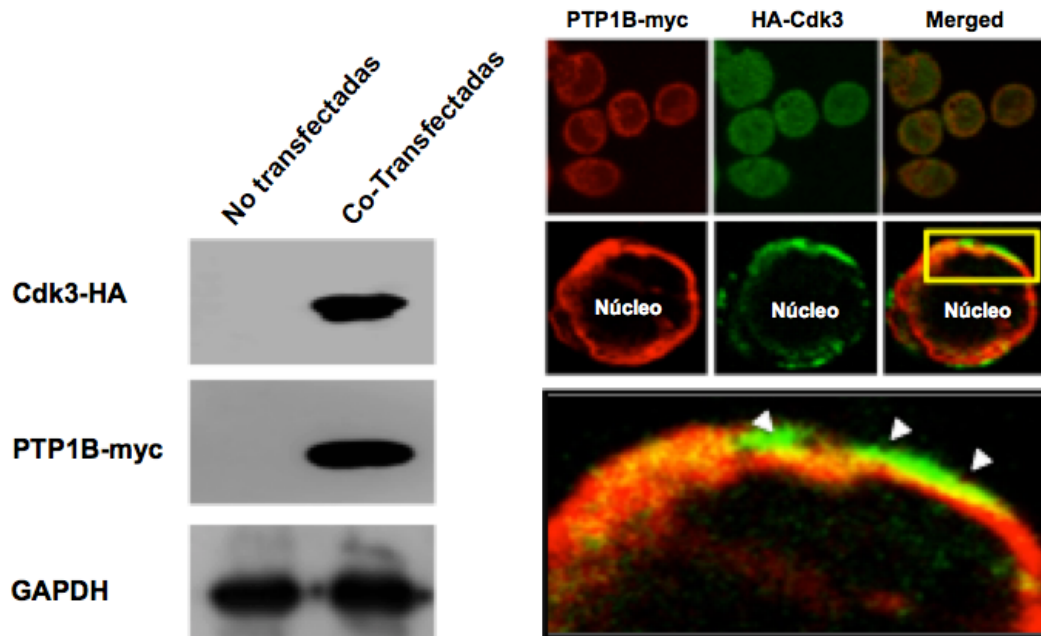


Figura 16. Co-localización de PTP1B y Cdk3 en la línea celular HEK293-T. La imagen del lado izquierdo muestra un Western blot representativo para verificar la expresión de Cdk3-HA y PTP1B-myc en células HEK293-T no transfectadas (carril izquierdo), o co-transfectadas con los vectores pCMV-neo Cdk3-HA y pcDNA4/myc-His PTP1B (carril derecho). Como control de carga se usó GAPDH. En la imagen del lado derecho se muestran células HEK293 co-transfectadas con los vectores pCMV-neo Cdk3-HA y pcDNA4/myc-His y analizadas mediante microscopía confocal. PTP1B fue teñida en color rojo y Cdk3 en verde. El panel superior muestra ambos canales por separado y la sobre-posición de estos. El panel medio muestra el acercamiento de una de las células y se indica la posición del núcleo. Finalmente, el panel inferior muestra un acercamiento al recuadro amarillo del panel de en medio, en donde se señalan con flechas algunas zonas con puntos naranjas o amarillos que indican la co-localización de ambas proteínas.

A continuación, se evaluó si PTP1B y Cdk3 endógenas interactúan físicamente en líneas celulares de GB humano. En primer lugar, se realizó un análisis bioinformático con el objetivo de seleccionar algunas líneas celulares que co-expresen a ambas proteínas. Para este propósito, se descargaron datos de expresión de PTP1B y Cdk3 a nivel del mRNA en un panel de 49 líneas celulares de GB humano del portal Cancer Dependency Map (DepMap: <https://depmap.org/>) [122]. Estos datos fueron graficados y se observó que todas las líneas celulares de GB expresan altos niveles de los mRNAs de PTP1B y Cdk3 (Figura 17).

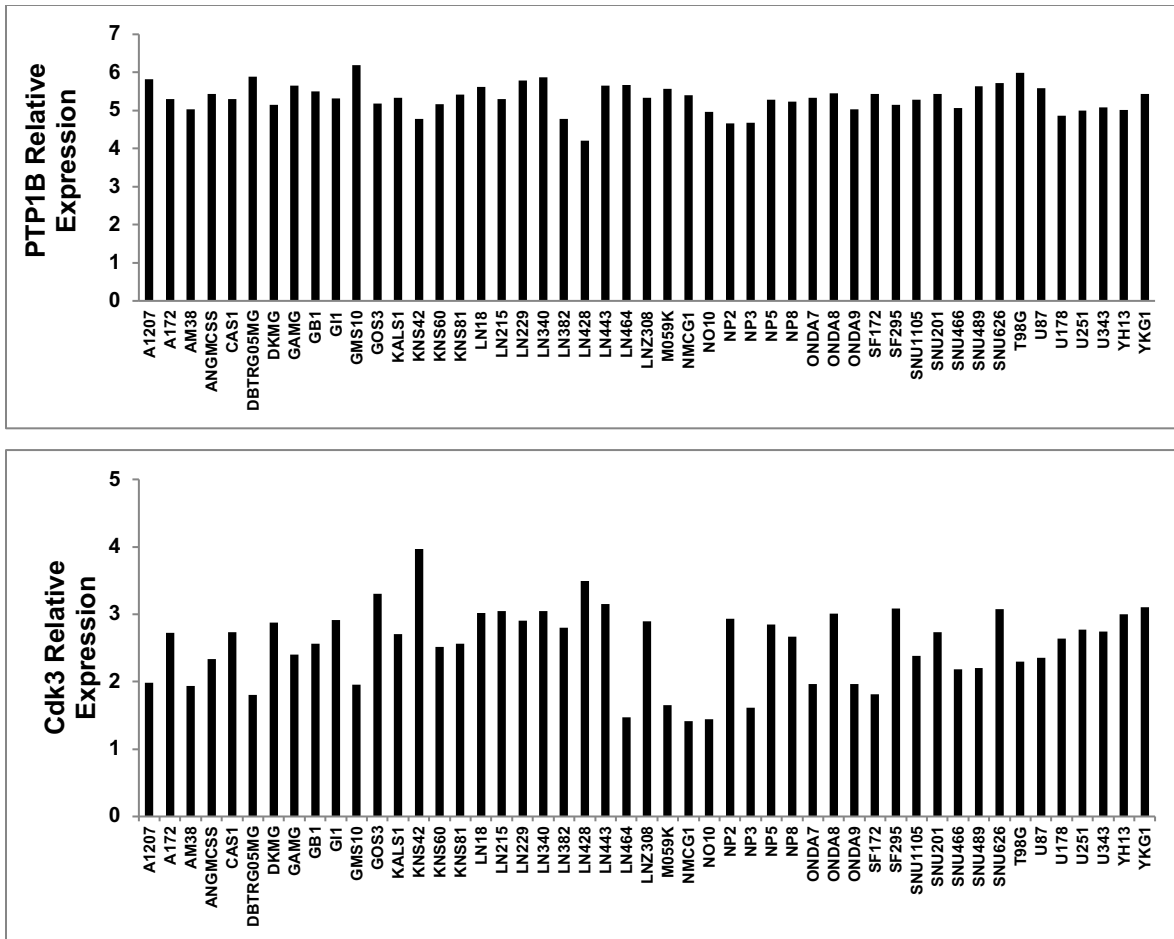


Figura 17. Niveles de expresión relativa de PTP1B y Cdk3 a nivel del mRNA en líneas celulares de GB humano. Los datos de expresión de PTP1B y Cdk3 se descargaron del portal DepMap (<https://depmap.org/>). La gráfica superior muestra los niveles de expresión relativa de PTP1B, y la inferior los de Cdk3.

A partir de los resultados anteriores, se seleccionaron las líneas celulares LN229, U87-MG y U251 para determinar si PTP1B interactúa con Cdk3 en células de GB humano. Las células fueron sincronizadas mediante ayuno de suero y se realizó un Ensayo de Ligación por Proximidad, el cual permite detectar la interacción entre dos proteínas endógenas que se encuentran a una distancia de entre 17 y 40 nm, las cuales pueden visualizarse en forma de patrones puntuados. Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal y la interacción entre ambas proteínas se detectó como puntos rojos que fueron cuantificados empleando el programa ImageJ. Todas las líneas celulares mostraron patrones puntuados de interacción entre PTP1B y Cdk3. Las líneas que tuvieron una mayor cantidad de puntos positivos fueron LN229 y U251, y la línea

celular con el menor número de interacciones fue U87-MG. Los datos obtenidos son resultado del conteo en 3 campos representativos con un total 30 células por muestra (Figura 18). Los resultados obtenidos nos indican que PTP1B y Cdk3 co-localizan en el núcleo y citoplasma de distintas líneas celulares de GB humano. Estos resultados nos permiten concluir que PTP1B y Cdk3 interactúan físicamente en un contexto celular.

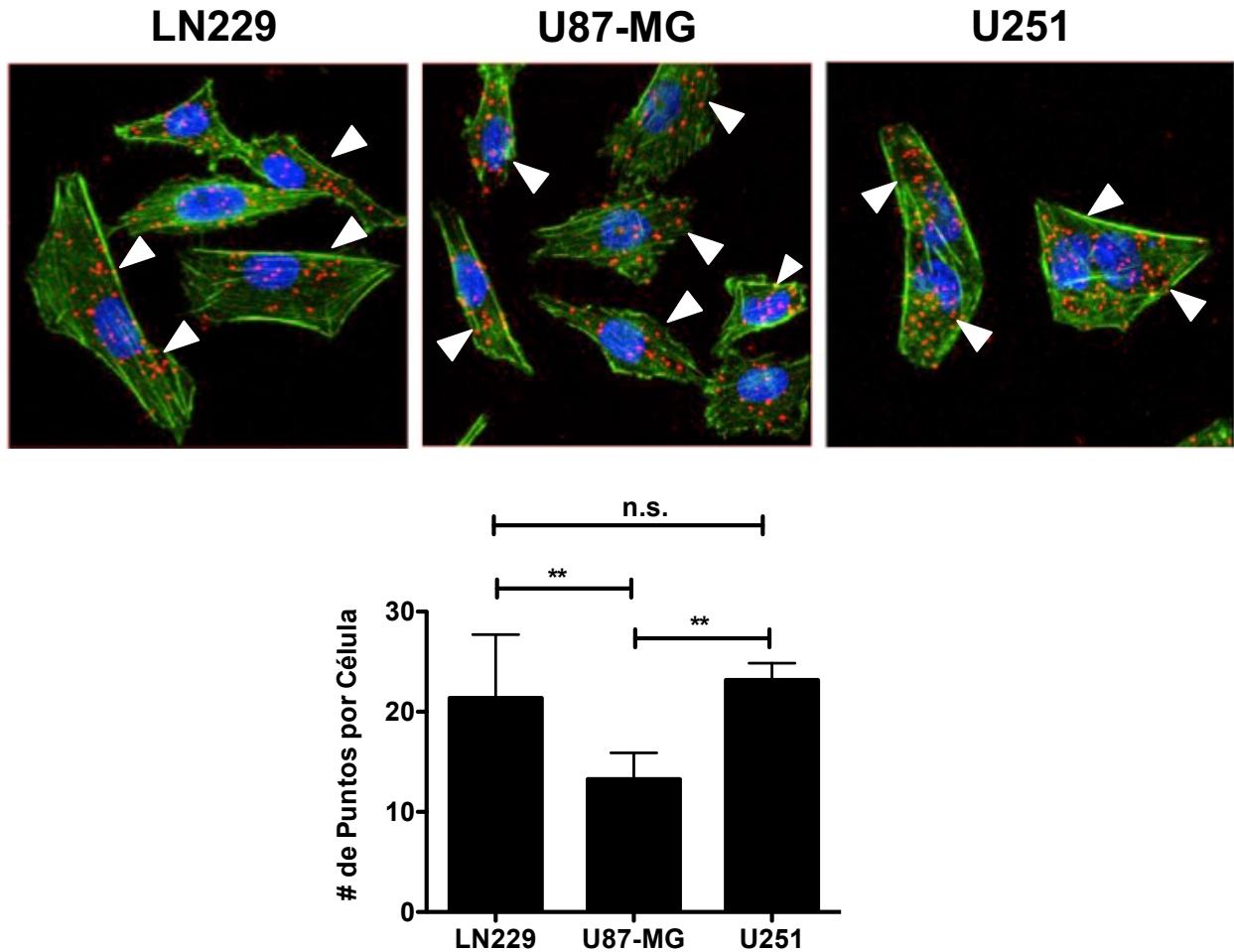


Figura 18. PTP1B y CDK3 interactúan físicamente en células de GB humano. El panel superior muestra una imagen representativa de un ensayo de PLA en las líneas celulares de GB humano LN229, U87-MG y U251. En verde se observa al citoesqueleto de actina, en azul los núcleos y los puntos de color rojo indican los sitios en donde interactúan PTP1B y CDK3. La gráfica inferior corresponde a la cuantificación del número de puntos positivos por célula. Para cada línea celular se contaron tres campos representativos con al menos 30 células cada uno. ** $p < 0.001$

9.4 La inhibición farmacológica o el silenciamiento con siRNAs de PTP1B arresta al ciclo celular en líneas de GB humano

Con el propósito de entender la relevancia biológica de la desfosforilación de Cdk3 mediada por PTP1B, analizamos el efecto de la inhibición farmacológica de esta fosfatasa en la progresión del ciclo celular. Debido a que la actividad de Cdk3 es necesaria para que las células que se encuentran en G0 reingresen al ciclo celular, y para que se de una correcta transición de G1/S en células eucariontes [104,107], nosotros hipotetizamos que la inhibición de PTP1B con su inhibidor alostérico Claramina [123], o su silenciamiento con siRNAs, podría conducir a un arresto del ciclo celular en estas fases. Para comprobar nuestra hipótesis, las líneas celulares LN229, U87-MG y U251 se sincronizaron en G0 mediante ayuno de suero en presencia de vehículo o de 5 μ M de Claramina, o se transfectaron con siRNAs dirigidos contra PTP1B o con un siRNA control; y se colectaron cada 24 horas después de liberar el arresto del ciclo celular. Las células se almacenaron en etanol absoluto a -20°C, y el día del análisis por citometría se trataron con RNasa, y el DNA fue teñido con yoduro de propidio con el propósito de medir el contenido de DNA y así poder cuantificar el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular a los tiempos establecidos. Nuestros resultados mostraron que en las células tratadas con vehículo, o transfectadas con el siRNA control hay una progresión normal del ciclo celular. En contraste, la inhibición de PTP1B o su silenciamiento con siRNAs promueve un arresto en G0/G1 en las tres líneas celulares empleadas, ya que a las 24 horas de haber liberado el arresto del ciclo celular, una alta proporción de las células se encuentra arrestada en esas fases (Figura 19). Con estos resultados podemos concluir que PTP1B promueve la progresión del ciclo celular, específicamente de las fases G1 a S, a través de la activación de Cdk3.

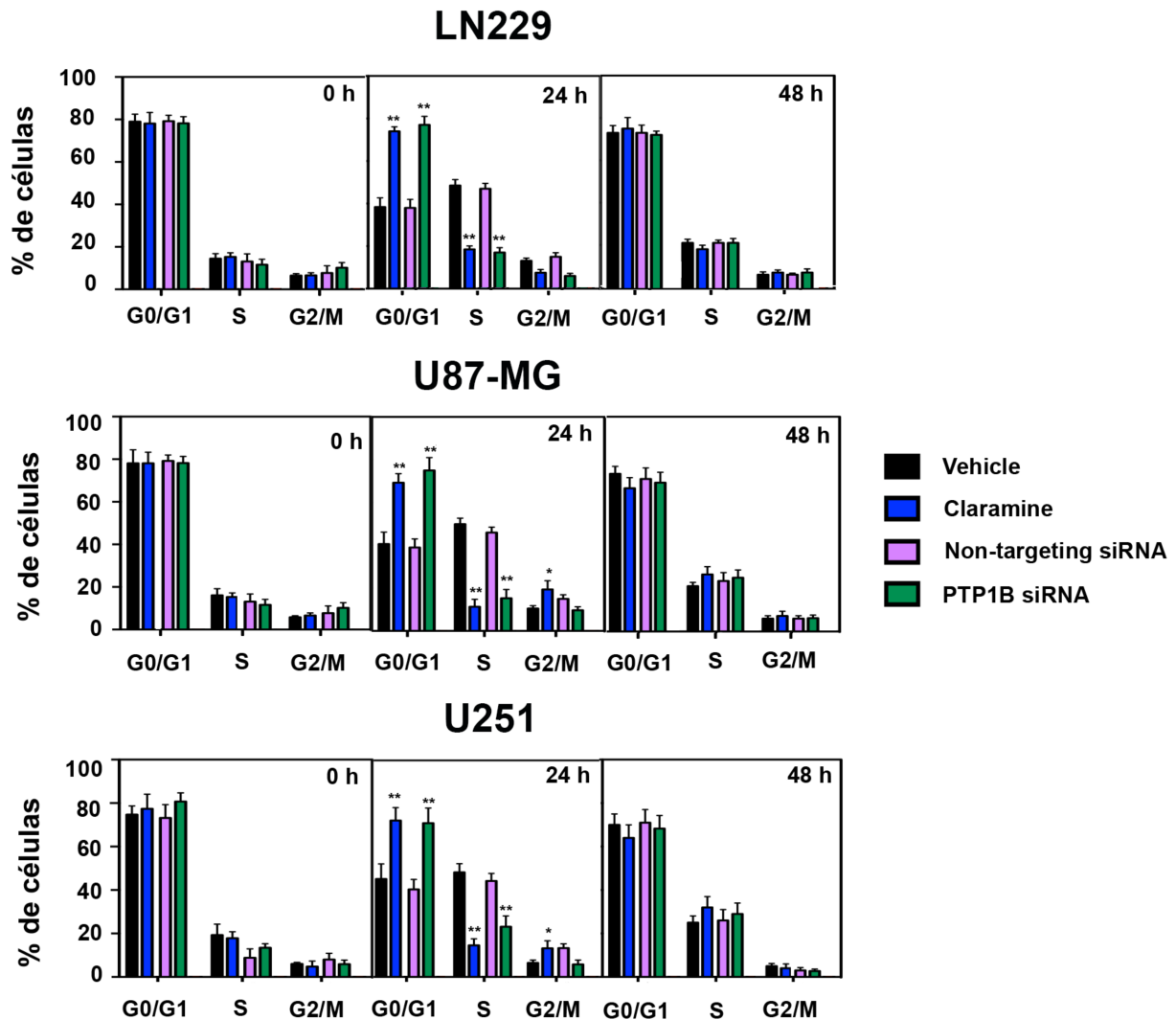


Figura 19. Efecto de la inhibición farmacológica o del silenciamiento con siRNAs de PTP1B en la progresión del ciclo celular de líneas de GB humano. Las líneas celulares LN229, U87-MG y U251 se sincronizaron en las etapas G0/G₁ mediante ayuno de suero y fueron tratadas con vehículo (barras negras) o con 5 μM del inhibidor alostérico de PTP1B Claramina (barras azules), o bien, transfectadas con un siRNA control (barras rosas), o un siRNA dirigido contra PTP1B (barras verdes). El arresto del ciclo celular se liberó mediante la adición de suero y las células se colectaron a las 0, 24 y 48 horas. Las gráficas de barras muestran en color la proporción de células en G0/G₁, en S, y en G2/M. Los asteriscos indican los tiempos en los cuales existe una diferencia significativa en la proporción de células en cada una de las etapas del ciclo celular en las líneas tratadas con Claramina con respecto a su control tratado con vehículo. Y de las células transfectadas con el siRNA dirigido contra PTP1B con respecto a las células transfectadas con un siRNA control. ** $p < 0.01$

9.5 La inhibición farmacológica o el silenciamiento con siRNAs de PTP1B afecta la activación de la ruta de señalización Cdk3/Rb/E2F en células de GB humano

Con el propósito de determinar el mecanismo molecular por el que PTP1B y Cdk3 regula la progresión del ciclo celular, las líneas celulares LN229, U87-MG y U251 se sincronizaron en G0 mediante ayuno de suero en presencia de vehículo o de 5 μ M de Claramina, o se transfectaron con siRNAs dirigidos contra PTP1B o con un siRNA control. Posteriormente, las células se estimularon durante 2 horas con suero para liberar el arresto; y se evaluaron los niveles de activación de Cdk3 y sus efectores mediante Western blot. Los resultados obtenidos indican que en todas las líneas celulares hay un marcado aumento en los niveles de fosforilación de Cdk3 en el residuo de Tyr15 (forma inactiva) en las células tratadas con Claramina en comparación a las células tratadas con vehículo. Además, se observó una disminución significativa en los niveles de fosforilación de Rb, sugiriendo que este supresor tumoral se encuentra activo (Figura 20).

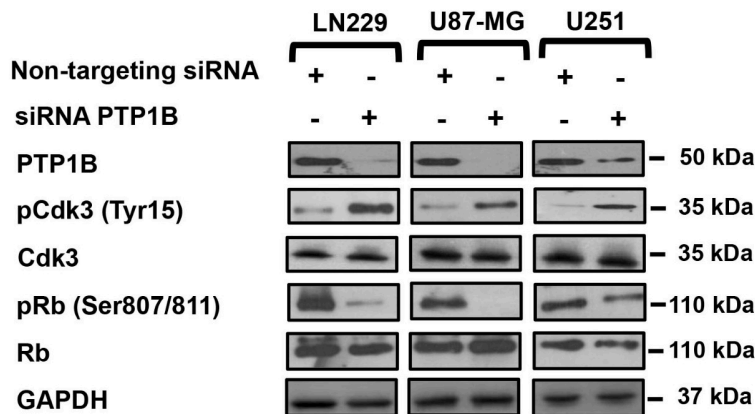
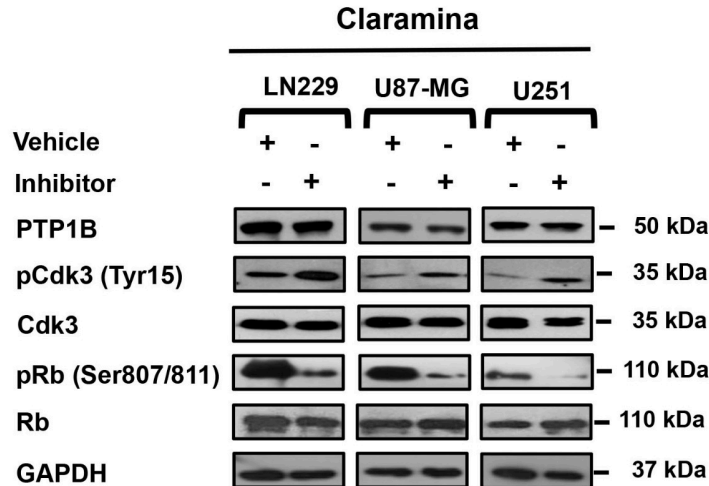


Figura 20. La inhibición farmacológica o el silenciamiento de PTP1B regula negativamente la actividad del eje de señalización Cdk3-Rb. Las líneas celulares de GB humano LN229, U87-MG y U251 fueron puestas en ayuno de suero durante 24 horas y tratadas con vehículo o con el inhibidor alostérico de PTP1B, Claramina, o bien fueron. Posteriormente, las células fueron estimuladas con suero fetal bovino y se analizaron mediante western blot los niveles de fosforilación de Cdk3 en el residuo de Tyr15 (forma inactiva de Cdk3) y de Rb en las posiciones de Ser807/811 (forma activa de Rb). GAPDH se utilizó como control de carga.

Distintos estudios han demostrado que Rb reprime la progresión del ciclo celular al formar un complejo con el factor de transcripción E2F e impide que éste transcriba sus genes blanco que son necesarios para la transición de G1/S [124–126]. Para comprobar que PTP1B regula la progresión del ciclo celular de manera dependiente de Cdk3/Rb/E2F, se determinaron los niveles expresión de tres genes blanco de E2F: Ciclina A, Ciclina E1 y Cdk1 mediante RT-PCR en tiempo real en las líneas celulares

LN229 y U87-MG y U251. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de estos genes disminuye significativamente en las líneas celulares tratadas con el inhibidor de PTP1B (Figura 21).

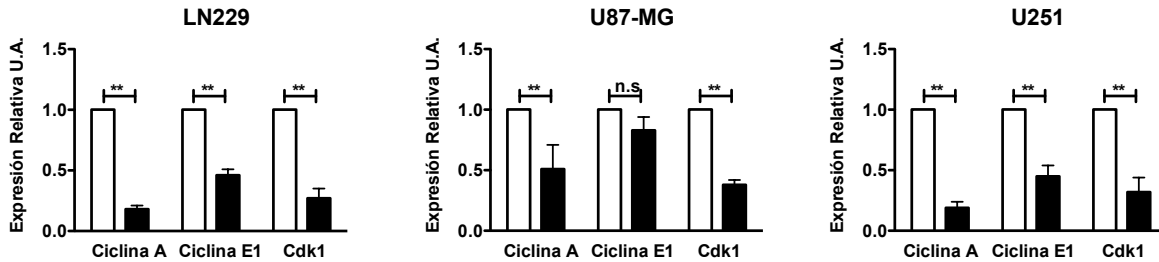


Figura 21. La inhibición farmacológica de PTP1B regula negativamente la expresión de genes blanco del factor de transcripción E2F. Las líneas celulares LN229, U87-MG y U251 fueron puestas en ayuno de suero durante 24 horas y tratadas con vehículo (barras blancas) o con el inhibidor alostérico de PTP1B, Claramina (barras negras). Posteriormente las células fueron estimuladas con suero fetal bovino y se determinó la expresión de los genes blanco de E2F: Ciclina A, Ciclina E1 y Cdk1 mediante RT-PCR en tiempo real. Los niveles de expresión relativa de todos los genes se normalizó empleando a GAPDH como control de expresión. ** $p < 0.01$, n.s. sin diferencias significativas.

10. DISCUSIÓN

El GB es el tumor cerebral más común y con mayor malignidad, tiene una alta tasa de mortalidad, y debido a su naturaleza infiltrante y proximidad a estructuras críticas, la resección completa rara vez es posible [9]. Las alternativas terapéuticas para el tratamiento del GB son esquemas de radiación combinados con quimioterapia [11,12]. Sin embargo, los problemas que se presentan son su ineficacia y el desarrollo de resistencia al tratamiento, por lo que resulta importante identificar moléculas relevantes para el desarrollo y supervivencia de las células de GB que puedan ser empleadas como nuevos blancos de intervención terapéutica. Debido a que la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina regula la proliferación, migración y supervivencia celular entre otros procesos [15]; la actividad aberrante de PTKs y de PTPs ha sido asociada al desarrollo tumoral y desde hace más de dos décadas se ha propuesto su uso como blancos terapéuticos [19,127].

Aunque los inhibidores farmacológicos de PTKs se usan de manera rutinaria para el tratamiento de distintos tipos de cáncer [128], el desarrollo de inhibidores de PTPs es relativamente reciente, y esto se debe en parte a que hasta la fecha son solo tres PTPs las que tienen un papel oncogénico demostrado, Shp2, PRL-3 y PTP1B [33,108,109,124–126]. Además, el diseño de inhibidores farmacológicos de fosfatasa que sean lo suficientemente selectivos implica un gran reto debido al alto grado de conservación en los dominios catalíticos de las PTPs; por lo que una de las estrategias que se ha empleado es el diseño de inhibidores alostéricos que se unan a regiones que se encuentren alejadas al sitio activo de la fosfatasa [132]. Esta estrategia ha sido empleada recientemente para diseñar inhibidores alostéricos altamente selectivos contra la fosfatasa Shp2, la cual activa distintas rutas de señalización implicadas en la proliferación, supervivencia y crecimiento tumoral, entre las que se encuentran las vías de JAK/STAT, Ras/RAF/MEK/ERK, PD-1/PD-L1 y la de PI3K/Akt/mTOR [133–137]. Hasta la fecha, cuatro inhibidores alostéricos de Shp2 se encuentran en ensayos clínicos, el más avanzado es JAB-3068 que ha sido empleado para el tratamiento del cáncer de esófago y se encuentra en la fase clínica IIa, mientras que otros tres inhibidores, llamados TNO155, RLY-1971 y RMC-4630, se han utilizado para el tratamiento de distintos tipos de tumores sólidos y se encuentran en pruebas de fase I

[138]. Otra de las PTPs a la que se le ha atribuido un papel oncogénico es PRL-3, esta fosfatasa se encuentra sobre-expresada en cáncer de colon, ovario, estómago e hígado [139–142]. El fármaco dirigido contra esta molécula es un anticuerpo monoclonal llamado PRL3-zumab, el cual se une a la PLR-3 que se localiza en la membrana plasmática de las células cancerosas y recluta linfocitos B, células NK y macrófagos, para inducir citotoxicidad mediada por anticuerpos [143].

Finalmente, con respecto a PTP1B, esta enzima ha sido asociada al desarrollo de varias neoplasias, y aunque en algunos tumores, como el de mama, se han logrado identificar algunos de sus sustratos más relevantes; en otros tumores como el GB no se ha estudiado con detalle el mecanismo molecular por el cual PTP1B actúa como un oncogén. En 2019, Jin y colaboradores reportaron que PTP1B se encuentra sobre-expresado a nivel del mRNA y de la proteína en muestras de GB humano, y este aumento en sus niveles de expresión es causado por la amplificación del gen que la codifica. Entre las vías de señalización que PTP1B podría regular en GB, se encuentran las de Src/PI3K/Akt/mTOR y la de Ras/RAF/MEK/ERK [118]. Recientemente, se ha reportado que los miRNAs pueden participar en el desarrollo de los gliomas al regular negativamente la expresión de proteínas involucradas en la proliferación, supervivencia y migración de la célula tumoral [144]. Uno de los miRNAs que se encuentra sub-expresado en GB es el miR-34c, el cual tiene la propiedad de unirse de manera canónica a la región 5' no traducida del mRNA de PTP1B y regular negativamente su expresión [145]. Finalmente, un estudio reciente indica que en células de GB humano, PTP1B actúa sobre el receptor de IL-13, IL13R α 2, para activar las vías de Src/PI3K/Akt/mTOR y de Ras/RAF/MEK/ERK. Además, el tratamiento farmacológico con el inhibidor alostérico de PTP1B, Claramina, redujo significativamente el crecimiento tumoral en un modelo animal de xenoinjertos derivados de biopsias de GB humanos [82]. Sin embargo, aunque PTP1B ha sido ampliamente estudiada, hasta la fecha solo hay dos inhibidores farmacológicos de esta enzima en estudios clínicos, Trodusquemina, que se encuentra en estudios de fase I para el tratamiento de diabetes tipo II y obesidad, y MSI-1436C que también se encuentra en fase I, y ha tenido una alta efectividad para el tratamiento de cáncer de mama metastásico [22,146]. Además, algunos estudios sugieren que terapias

combinadas en la que se inhiba a PTP1B y a algunas de sus proteínas reguladoras o efectoras pueden tener un efecto sinérgico y mayores beneficios para el paciente que una monoterapia. De acuerdo a los resultados obtenidos en modelos animales de cáncer de mama, se ha propuesto que inhibidores de PTP1B pueden ser utilizados en combinación con anticuerpos monoclonales como Trastuzumab o Pertuzumab para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo [77]. Por otra parte, también se ha observado que en modelos murinos de diabetes tipo II, la inhibición de PTP1B en combinación con un agonista de PPAR γ mejora significativamente la respuesta a la insulina y aumenta los niveles plasmáticos de adiponectina, resultando en una reducción más rápida de los niveles de glucosa en sangre, en comparación con el grupo control o con la inhibición individual de estas moléculas [147]. A pesar de estos avances, aún es necesario determinar si los sustratos o moléculas reguladas por PTP1B en distintas enfermedades pudieran ser tejido-específicos y si tienen el potencial de ser empleados como blancos de intervención terapéutica.

Debido a que los mecanismos moleculares por los que PTP1B actúa como un oncogén en distintos tipos de tumores requieren de un mayor estudio, realizamos un experimento de fosfoproteómica con el propósito de encontrar nuevos sustratos o proteínas que puedan ser reguladas indirectamente por PTP1B, y que ayuden a comprender mejor su papel oncogénico. Este estudio nos permitió identificar más de 200 sustratos directos o indirectos de PTP1B, algunos de ellos previamente caracterizados, como p62^{DOK}, EGFR y el IR β ; además de otras proteínas que pudieran ser nuevos sustratos de esta enzima y que han sido asociadas al desarrollo del cáncer. De este listado, se seleccionaron algunas oncoproteínas para evaluar si poseían la secuencia consenso de desfosforilación de PTP1B, E/D-pY-pY-R/K, la que si bien no es indispensable para el reconocimiento del sustrato, si confiere una mayor afinidad hacia él [44]. Entre las proteínas identificadas como potenciales sustratos de PTP1B se encontró a Cdk3, la cual no ha sido estudiada con tanto detalle como Cdk4 y Cdk6 a las cuales se les ha atribuido una clara función oncogénica [102], pero que de acuerdo a algunos reportes tiene un papel relevante en el desarrollo de cáncer de mama y GB [107–110].

Nuestra primera aproximación para comprobar que Cdk3 es un nuevo sustrato de PTP1B fue emplear herramientas bioinformáticas que han sido utilizadas previamente para predecir posibles interacciones entre distintas biomoléculas. Esta aproximación nos permitió determinar que el complejo PTP1B-Cdk3 es termodinámicamente estable, y que Cdk3 tiene un buen acoplamiento con el dominio catalítico de PTP1B, de modo que su residuo de pTyr15 se encuentra cercano a los residuos catalíticos Cys215 y Arg221 de PTP1B. Además, la estabilidad de la estructura del complejo PTP1B-Cdk3 y sus valores de energía de unión a ligando se compararon con los del complejo formado por PTP1B con uno de sus sustratos mejor caracterizado, el IR β [61], y observamos que son bastante similares, lo que nos permite concluir que hay una alta probabilidad de que este PTP1B interactúe físicamente con Cdk3 y la desfosforile.

Los ensayos bioquímicos y de biología celular nos permitieron confirmar que PTP1B es capaz de desfosforilar al residuo de pTyr15 de Cdk3 y que ambas proteínas se asocian físicamente en un contexto celular. Estos resultados abren la posibilidad de la existencia de una nueva ruta de señalización en GB, en la que PTP1B podría regular la progresión del ciclo celular a través de la activación de Cdk3 y sus efectores. Existen algunos antecedentes en los que se ha observado que la inhibición farmacológica o el silenciamiento de PTP1B con siRNAs causan un arresto del ciclo celular en las etapas G2/M o en G1 en células de cáncer de páncreas y riñón respectivamente [80,148], pero hasta ahora ese efecto no había sido atribuido a la regulación de la actividad de alguna Cdk por parte de PTP1B. En nuestro caso, observamos que la inhibición farmacológica de PTP1B con Claramina, o su silenciamiento con siRNAs, retrasó la progresión de G1 a S en tres líneas celulares de GB humano, por lo que decidimos analizar si PTP1B regula la progresión del ciclo celular a través de la activación de Cdk3. Para comprobar esta hipótesis, comparamos los niveles de activación de Cdk3 en las líneas celulares de GB humano LN229, U-87MG y U251 después de ser tratadas con vehículo o con Claramina. Los resultados de este experimento mostraron que al inhibir farmacológicamente a PTP1B hay un aumento significativo en los niveles de fosforilación de Cdk3 en su residuo de Tyr15, lo que indica que se encuentra en un estado inactivo, mientras que en las células tratadas con el vehículo, Cdk3 se

encuentra activa, lo cual podemos apreciar a través de sus bajos niveles de fosforilación. Se ha propuesto que cuando Cdk3 es desfosforilada y activada por fosfatasas de la familia Cdc25, esta puede a su vez fosforilar a Rb en los residuos de Ser807 y 811, lo cual permite su disociación del factor transcripcional E2F y la transcripción de los genes necesarios para que se de la transición de G1 a S [104]. Por lo que analizamos los niveles de fosforilación de Rb en esos residuos, así como la expresión de los genes blanco de E2F, Ciclina A1, Ciclina E y Cdk1, y observamos que la inhibición farmacológica de PTP1B o su silenciamiento con siRNAs regula negativamente su expresión.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, en donde se demuestra que Cdk3 es un sustrato de PTP1B, se propone la existencia de una nueva ruta de señalización en células de GB humano, en donde esta fosfatasa promueve la progresión de ciclo celular a través de la desfosforilación del residuo de inhibición Tyr15 de Cdk3, esta cinasa una vez que se encuentra en su forma activa fosforila a Rb y favorece su disociación del factor de transcripción E2F y la expresión de sus genes blanco, los cuales son necesarios para que se lleve a cabo la transición de G1/S (Figura 22). Este es el primer reporte en el que una Cdk es activada por una fosfatasa distinta a Cdc25, lo que abre la posibilidad de que el eje de señalización PTP1B/Cdk3/Rb/E2F pueda ser empleado en un futuro como un nuevo blanco de intervención terapéutica en GB.

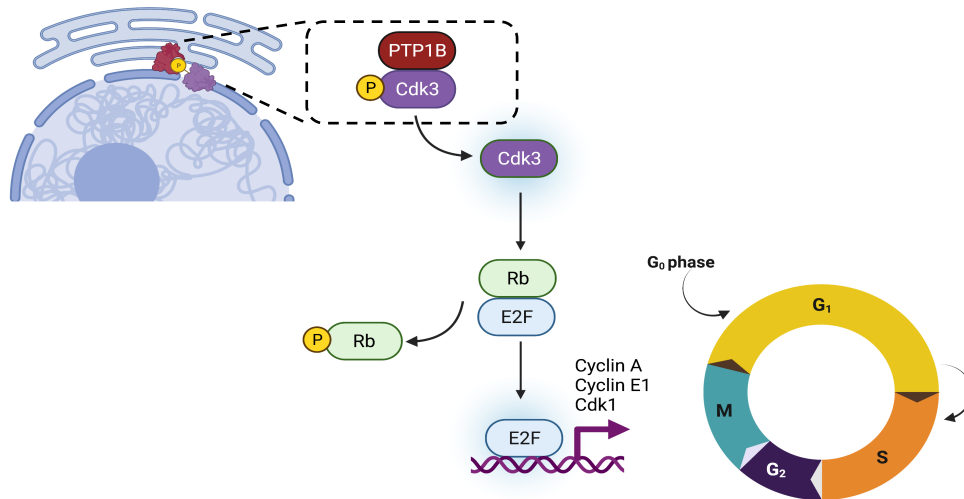


Figura 22. PTP1B regula la progresión del ciclo celular a través de la activación de la vía Cdk3/Rb/E2F. Modelo propuesto para la progresión del ciclo celular dependiente de la vía de señalización PTP1B/Cdk3/Rb/E2F en células de GB humano.

11. CONCLUSIONES

En este trabajo, se identificó a Cdk3 como un nuevo sustrato de PTP1B mediante experimentos de fosfoproteómica y de “docking”, así como de ensayos bioquímicos y de biología celular. Los resultados de nuestros experimentos muestran que PTP1B desfosforila a Cdk3 en su residuo de Tyr15 y activa la ruta de señalización Rb/E2F y la expresión de genes necesarios para el reingreso de las células que se encuentran en G0 a G1; y para que ocurra la transición de G1 a S en células derivadas de GB humano. Este estudio demuestra, que en nuestro sistema. Cdk3 es activada por una fosfatasa que no pertenece a la familia de Cdc25, y que la ruta de señalización PTP1B/Cdk3/Rb/E2F es necesaria para una progresión eficiente del ciclo celular.

12. PERSPECTIVAS

- 1) Evaluar si existe una correlación en los niveles de expresión de PTP1B y Cdk3 a nivel de la proteína en biopsias de GB humano.
- 2) Estudiar el efecto de la inhibición combinada de PTP1B y Cdk3 en la progresión del ciclo celular de células de GB humano.
- 3) Determinar el potencial uso terapéutico de la inhibición individual y combinada de PTP1B y Cdk3 en un modelo animal de GB.

13. REFERENCIAS

- [1] World Health Organization, Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019 Geneva, (2020).
- [2] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100 (2000) 57–70.
- [3] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144 (2011) 646–674.
- [4] D. Hanahan, Hallmarks of Cancer: New Dimensions, *Cancer Discov.*, 12 (2022) 31–46.
- [5] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA. Cancer J. Clin.*, 71 (2021) 209–249.
- [6] Q.T. Ostrom, G. Cioffi, H. Gittleman, N. Patil, K. Waite, C. Kruchko, J.S. Barnholtz-Sloan, CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016, *Neuro-Oncol.*, 21 (2019) v1–v100.
- [7] P. de Robles, K.M. Fiest, A.D. Frolkis, T. Pringsheim, C. Atta, C. St Germaine-Smith, L. Day, D. Lam, N. Jette, The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis, *Neuro-Oncol.*, 17 (2015) 776–783.
- [8] D.N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, D.W. Ellison, The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 131 (2016) 803–820.
- [9] Q.T. Ostrom, H. Gittleman, P.M. de Blank, J.L. Finlay, J.G. Gurney, R. McKean-Cowdin, D.S. Stearns, J.E. Wolff, M. Liu, Y. Wolinsky, C. Kruchko, J.S. Barnholtz-Sloan, American Brain Tumor Association Adolescent and Young Adult Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012, *Neuro-Oncol.*, 18 Suppl 1 (2016) i1–i50.
- [10] J.A. Schwartzbaum, J.L. Fisher, K.D. Aldape, M. Wrensch, Epidemiology and molecular pathology of glioma, *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, 2 (2006) 494–503; quiz 1 p following 516.

- [11] R. Stupp, M. Brada, M.J. van den Bent, J.-C. Tonn, G. Pentheroudakis, ESMO Guidelines Working Group, High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, 25 Suppl 3 (2014) iii93-101.
- [12] R. Stupp, J.-C. Tonn, M. Brada, G. Pentheroudakis, ESMO Guidelines Working Group, High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, 21 Suppl 5 (2010) v190-193.
- [13] A.C. Navis, M. van den Eijnden, J.T.G. Schepens, R. Hooft van Huijsduijnen, P. Wesseling, W.J.A.J. Hendriks, Protein tyrosine phosphatases in glioma biology, *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 119 (2010) 157–175.
- [14] A.M. Bourgonje, K. Verrijp, J.T.G. Schepens, A.C. Navis, J.A.F. Piepers, C.B.C. Palmén, M. van den Eijnden, R. Hooft van Huijsduijnen, P. Wesseling, W.P.J. Leenders, W.J.A.J. Hendriks, Comprehensive protein tyrosine phosphatase mRNA profiling identifies new regulators in the progression of glioma, *Acta Neuropathol. Commun.*, 4 (2016) 96.
- [15] M.L. Taddei, E. Pardella, E. Pranzini, G. Raugei, P. Paoli, Role of tyrosine phosphorylation in modulating cancer cell metabolism, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 1874 (2020) 188442.
- [16] T. Hitosugi, L. Zhou, J. Fan, S. Elf, L. Zhang, J. Xie, Y. Wang, T.-L. Gu, M. Alečković, G. LeRoy, Y. Kang, H.-B. Kang, J.-H. Seo, C. Shan, P. Jin, W. Gong, S. Lonial, M.L. Arellano, H.J. Khoury, G.Z. Chen, et al., Tyr26 phosphorylation of PGAM1 provides a metabolic advantage to tumours by stabilizing the active conformation, *Nat. Commun.*, 4 (2013) 1790.
- [17] L.J. Wilson, A. Linley, D.E. Hammond, F.E. Hood, J.M. Coulson, D.J. MacEwan, S.J. Ross, J.R. Slupsky, P.D. Smith, P.A. Eyers, I.A. Prior, New Perspectives, Opportunities, and Challenges in Exploring the Human Protein Kinome, *Cancer Res.*, 78 (2018) 15–29.
- [18] A. Alonso, R. Pulido, The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family, *FEBS J.*, 283 (2016) 1404–1429.
- [19] X.-M. Qi, F. Wang, M. Mortensen, R. Wertz, G. Chen, Targeting an oncogenic

kinase/phosphatase signaling network for cancer therapy, *Acta Pharm. Sin. B*, 8 (2018) 511–517.

[20] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, Protein tyrosine phosphatases in the human genome, *Cell*, 117 (2004) 699–711.

[21] T. Bhattacharyya, R. Sowdhamini, Genome-Wide Search for Tyrosine Phosphatases in the Human Genome Through Computational Approaches Leads to the Discovery of Few New Domain Architectures, *Evol. Bioinforma. Online*, 15 (2019) 1176934319840289.

[22] O. Villamar-Cruz, M.A. Loza-Mejía, L.E. Arias-Romero, I. Camacho-Arroyo, Recent advances in PTP1B signaling in metabolism and cancer, *Biosci. Rep.*, 41 (2021) BSR20211994.

[23] N.K. Tonks, Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7 (2006) 833–846.

[24] J.N. Andersen, O.H. Mortensen, G.H. Peters, P.G. Drake, L.F. Iversen, O.H. Olsen, P.G. Jansen, H.S. Andersen, N.K. Tonks, N.P.H. Møller, Structural and Evolutionary Relationships among Protein Tyrosine Phosphatase Domains, *Mol. Cell. Biol.*, 21 (2001) 7117–7136.

[25] N.K. Tonks, C.D. Diltz, E.H. Fischer, Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 6731–6737.

[26] N.K. Tonks, C.D. Diltz, E.H. Fischer, Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 6722–6730.

[27] S. Brown-Shimer, K.A. Johnson, J.B. Lawrence, C. Johnson, A. Bruskin, N.R. Green, D.E. Hill, Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87 (1990) 5148–5152.

[28] J. Chernoff, A.R. Schievella, C.A. Jost, R.L. Erikson, B.G. Neel, Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87 (1990) 2735–2739.

[29] D. Barford, J.C. Keller, A.J. Flint, N.K. Tonks, Purification and crystallization of the catalytic domain of human protein tyrosine phosphatase 1B expressed in

- Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 239 (1994) 726–730.
- [30] D. Barford, A.J. Flint, N.K. Tonks, Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B, *Science*, 263 (1994) 1397–1404.
- [31] S.-C. Yip, S. Saha, J. Chernoff, PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis, *Trends Biochem. Sci.*, 35 (2010) 442–449.
- [32] Pontus K.A.L. Forsell, Y. Boie, J. Montalibet, S. Collins, B.P. Kennedy, Genomic characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B genes, *Gene*, 260 (2000) 145–153.
- [33] J.R. Wiener, B.J. Kerns, E.L. Harvey, M.R. Conaway, J.D. Iglehart, A. Berchuck, R.C. Bast, Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression, *J. Natl. Cancer Inst.*, 86 (1994) 372–378.
- [34] S. Zhu, J.D. Bjorge, D.J. Fujita, PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation, *Cancer Res.*, 67 (2007) 10129–10137.
- [35] L. Lessard, D.P. Labbé, G. Deblois, L.R. Bégin, S. Hardy, A.-M. Mes-Masson, F. Saad, L.C. Trotman, V. Giguère, M.L. Tremblay, PTP1B is an androgen receptor-regulated phosphatase that promotes the progression of prostate cancer, *Cancer Res.*, 72 (2012) 1529–1537.
- [36] J. Wang, B. Liu, X. Chen, L. Su, P. Wu, J. Wu, Z. Zhu, PTP1B expression contributes to gastric cancer progression, *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.*, 29 (2012) 948–956.
- [37] J.V. Frangioni, P.H. Beahm, V. Shifrin, C.A. Jost, B.G. Neel, The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence, *Cell*, 68 (1992) 545–560.
- [38] T. Woodford-Thomas, J. Rhodes, J. Dixon, Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts, *J. Cell Biol.*, 117 (1992) 401–414.
- [39] P. Mertins, H.C. Eberl, J. Renkawitz, J.V. Olsen, M.L. Tremblay, M. Mann, A. Ullrich, H. Daub, Investigation of protein-tyrosine phosphatase 1B function by quantitative proteomics, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, 7 (2008) 1763–1777.
- [40] A. Arachiche, O. Augereau, M. Decossas, C. Pertuiset, E. Gontier, T. Letellier, J.

- Dachary-Prigent, Localization of PTP-1B, SHP-2, and Src exclusively in rat brain mitochondria and functional consequences, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 24406–24411.
- [41] S.-C. Yip, S. Cotteret, J. Chernoff, Sumoylated protein tyrosine phosphatase 1B localizes to the inner nuclear membrane and regulates the tyrosine phosphorylation of emerin, *J. Cell Sci.*, 125 (2012) 310–316.
- [42] F. Liu, D.E. Hill, J. Chernoff, Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130(Cas), *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 31290–31295.
- [43] F. Liang, S.-Y. Lee, J. Liang, D.S. Lawrence, Z.-Y. Zhang, The role of protein-tyrosine phosphatase 1B in integrin signaling, *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 24857–24863.
- [44] A. Salmeen, J.N. Andersen, M.P. Myers, N.K. Tonks, D. Barford, Molecular Basis for the Dephosphorylation of the Activation Segment of the Insulin Receptor by Protein Tyrosine Phosphatase 1B, *Mol. Cell*, 6 (2000) 1401–1412.
- [45] M.P. Myers, J.N. Andersen, A. Cheng, M.L. Tremblay, C.M. Horvath, J.P. Parisien, A. Salmeen, D. Barford, N.K. Tonks, TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 47771–47774.
- [46] M. Zapata-Tarres, L.E. Juarez-Villegas, A. Maldonado-Valenzuela, G.J. Baay-Guzman, T.V. Lopez-Perez, L. Cabrera-Muñoz, S. Sadowinski-Pine, S. Huerta-Yepe, Expression of YY1 in Wilms tumors with favorable histology is a risk factor for adverse outcomes, *Future Oncol.*, 15 (2019) 1231–1241.
- [47] T. Fukada, N.K. Tonks, The reciprocal role of Egr-1 and Sp family proteins in regulation of the PTP1B promoter in response to the p210 Bcr-Abl oncoprotein-tyrosine kinase, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 25512–25519.
- [48] T. Fukada, N.K. Tonks, Identification of YB-1 as a regulator of PTP1B expression: implications for regulation of insulin and cytokine signaling, *EMBO J.*, 22 (2003) 479–493.
- [49] F. Sun, M. Yu, J. Yu, Z. Liu, X. Zhou, Y. Liu, X. Ge, H. Gao, M. Li, X. Jiang, S. Liu, X. Chen, W. Guan, miR-338-3p functions as a tumor suppressor in gastric cancer by targeting PTP1B, *Cell Death Dis.*, 9 (2018) 522.
- [50] M. Yu, Z. Liu, Y. Liu, X. Zhou, F. Sun, Y. Liu, L. Li, S. Hua, Y. Zhao, H. Gao, Z. Zhu, M. Na, Q. Zhang, R. Yang, J. Zhang, Y. Yao, X. Chen, PTP1B markedly promotes

breast cancer progression and is regulated by miR-193a-3p, *FEBS J.*, 286 (2019) 1136–1153.

[51] S. Wang, Z. Cheng, X. Chen, H. Xue, microRNA-135a protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by targeting protein tyrosine phosphatase 1B, *J. Cell. Biochem.*, 120 (2019) 10421–10433.

[52] Q. Yang, L. Zhang, Y. Zhong, L. Lai, X. Li, miR-206 inhibits cell proliferation, invasion, and migration by down-regulating PTP1B in hepatocellular carcinoma, *Biosci. Rep.*, 39 (2019).

[53] J. Xu, Z. Zhang, Q. Chen, L. Yang, J. Yin, miR-146b Regulates Cell Proliferation and Apoptosis in Gastric Cancer by Targeting PTP1B, *Dig. Dis. Sci.*, 65 (2020) 457–463.

[54] Q. Han, P. Cheng, H. Yang, H. Liang, F. Lin, miR-146b Reverses epithelial-mesenchymal transition via targeting PTP1B in cisplatin-resistance human lung adenocarcinoma cells, *J. Cell. Biochem.*, (2019).

[55] N.K. Tonks, PTP1B: from the sidelines to the front lines!, *FEBS Lett.*, 546 (2003) 140–148.

[56] S.R. Lee, K.S. Kwon, S.R. Kim, S.G. Rhee, Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 15366–15372.

[57] A. Salmeen, J.N. Andersen, M.P. Myers, T.-C. Meng, J.A. Hinks, N.K. Tonks, D. Barford, Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenylamide intermediate, *Nature*, 423 (2003) 769–773.

[58] R.L.M. van Montfort, M. Congreve, D. Tisi, R. Carr, H. Jhoti, Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B, *Nature*, 423 (2003) 773–777.

[59] Y.-Y. Chen, H.-M. Chu, K.-T. Pan, C.-H. Teng, D.-L. Wang, A.H.-J. Wang, K.-H. Khoo, T.-C. Meng, Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 35265–35272.

[60] S. Dadke, S. Cotteret, S.-C. Yip, Z.M. Jaffer, F. Haj, A. Ivanov, F. Rauscher, K. Shuai, T. Ng, B.G. Neel, J. Chernoff, Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by

sumoylation, *Nat. Cell Biol.*, 9 (2007) 80–85.

[61] D. Bandyopadhyay, A. Kusari, K.A. Kenner, F. Liu, J. Chernoff, T.A. Gustafson, J. Kusari, Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin, *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 1639–1645.

[62] S. Dadke, A. Kusari, J. Kusari, Phosphorylation and activation of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B by insulin receptor, *Mol. Cell. Biochem.*, 221 (2001) 147–154.

[63] L.V. Ravichandran, H. Chen, Y. Li, M.J. Quon, Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, 15 (2001) 1768–1780.

[64] A.J. Flint, M.F. Gebbink, B.R. Franza, D.E. Hill, N.K. Tonks, Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation, *EMBO J.*, 12 (1993) 1937–1946.

[65] J.V. Frangioni, A. Oda, M. Smith, E.W. Salzman, B.G. Neel, Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets, *EMBO J.*, 12 (1993) 4843–4856.

[66] K. Shi, K. Egawa, H. Maegawa, T. Nakamura, S. Ugi, Y. Nishio, A. Kashiwagi, Protein-tyrosine phosphatase 1B associates with insulin receptor and negatively regulates insulin signaling without receptor internalization, *J. Biochem. (Tokyo)*, 136 (2004) 89–96.

[67] A. González-Rodríguez, J.A. Mas Gutierrez, S. Sanz-González, M. Ros, D.J. Burks, A.M. Valverde, Inhibition of PTP1B restores IRS1-mediated hepatic insulin signaling in IRS2-deficient mice, *Diabetes*, 59 (2010) 588–599.

[68] M. Elchebly, P. Payette, E. Michaliszyn, W. Cromlish, S. Collins, A.L. Loy, D. Normandin, A. Cheng, J. Himms-Hagen, C.C. Chan, C. Ramachandran, M.J. Gresser, M.L. Tremblay, B.P. Kennedy, Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene, *Science*, 283 (1999) 1544–1548.

[69] P. Sarkar, K. Thirumurugan, New insights into TNF α /PTP1B and PPAR γ pathway through RNF213- a link between inflammation, obesity, insulin resistance, and

Moyamoya disease, *Gene*, 771 (2021) 145340.

[70] H. Xu, H. An, J. Hou, C. Han, P. Wang, Y. Yu, X. Cao, Phosphatase PTP1B negatively regulates MyD88- and TRIF-dependent proinflammatory cytokine and type I interferon production in TLR-triggered macrophages, *Mol. Immunol.*, 45 (2008) 3545–3552.

[71] J.M. Zabolotny, Y.-B. Kim, L.A. Welsh, E.E. Kershaw, B.G. Neel, B.B. Kahn, Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 14230–14241.

[72] S. Zhang, Z.-Y. Zhang, PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery, *Drug Discov. Today*, 12 (2007) 373–381.

[73] S. Verma, S. Sharma, Protein Tyrosine Phosphatase as Potential Therapeutic Target in various Disorders, *Curr. Mol. Pharmacol.*, 11 (2018) 191–202.

[74] S. Brown-Shimer, K.A. Johnson, D.E. Hill, A.M. Bruskin, Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene, *Cancer Res.*, 52 (1992) 478–482.

[75] K.R. LaMontagne, G. Hannon, N.K. Tonks, Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl-induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95 (1998) 14094–14099.

[76] N.K. Tonks, S.K. Muthuswamy, A brake becomes an accelerator: PTP1B--a new therapeutic target for breast cancer, *Cancer Cell*, 11 (2007) 214–216.

[77] S.G. Julien, N. Dubé, M. Read, J. Penney, M. Paquet, Y. Han, B.P. Kennedy, W.J. Muller, M.L. Tremblay, Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis, *Nat. Genet.*, 39 (2007) 338–346.

[78] L.E. Arias-Romero, S. Saha, O. Villamar-Cruz, S.-C. Yip, S.P. Ethier, Z.-Y. Zhang, J. Chernoff, Activation of Src by Protein Tyrosine Phosphatase 1B Is Required for ErbB2 Transformation of Human Breast Epithelial Cells, *Cancer Res.*, 69 (2009) 4582–4588.

[79] H. Liu, Y. Wu, S. Zhu, W. Liang, Z. Wang, Y. Wang, T. Lv, Y. Yao, D. Yuan, Y. Song, PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer, *Cancer Lett.*, 359 (2015) 218–225.

- [80] W. Mei, K. Wang, J. Huang, X. Zheng, Cell Transformation by PTP1B Truncated Mutants Found in Human Colon and Thyroid Tumors, *PloS One*, 11 (2016) e0166538.
- [81] Q. Xu, N. Wu, X. Li, C. Guo, C. Li, B. Jiang, H. Wang, D. Shi, Inhibition of PTP1B blocks pancreatic cancer progression by targeting the PKM2/AMPK/mTOC1 pathway, *Cell Death Dis.*, 10 (2019) 874.
- [82] R.A. Bartolomé, Á. Martín-Regalado, M. Jaén, M. Zannikou, P. Zhang, V. de los Ríos, I.V. Balyasnikova, J.I. Casal, Protein Tyrosine Phosphatase-1B Inhibition Disrupts IL13R α 2-Promoted Invasion and Metastasis in Cancer Cells, *Cancers*, 12 (2020) 500.
- [83] Q. Wang, Y. Pan, L. Zhao, F. Qi, J. Liu, Protein tyrosine phosphatase 1B(PTP1B) promotes melanoma cells progression through Src activation, *Bioengineered*, 12 (2021) 8396–8406.
- [84] M. Malumbres, M. Barbacid, To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 1 (2001) 222–231.
- [85] P. Nurse, A long twentieth century of the cell cycle and beyond, *Cell*, 100 (2000) 71–78.
- [86] S. van den Heuvel, E. Harlow, Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control, *Science*, 262 (1993) 2050–2054.
- [87] P. Bonelli, F.M. Tuccillo, A. Borrelli, A. Schiattarella, F.M. Buonaguro, CDK/CCN and CDKI alterations for cancer prognosis and therapeutic predictivity, *BioMed Res. Int.*, 2014 (2014) 361020.
- [88] L. Cao, F. Chen, X. Yang, W. Xu, J. Xie, L. Yu, Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages, *BMC Evol. Biol.*, 14 (2014) 10.
- [89] J. Ciceas, M. Valius, The CDK inhibitors in cancer research and therapy, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 137 (2011) 1409–1418.
- [90] S. Lim, P. Kaldis, Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation, *Dev. Camb. Engl.*, 140 (2013) 3079–3093.
- [91] M. Igarashi, A. Nagata, S. Jinno, K. Suto, H. Okayama, Wee1(+)-like gene in human cells, *Nature*, 353 (1991) 80–83.
- [92] K. Lundgren, N. Walworth, R. Booher, M. Dembski, M. Kirschner, D. Beach, mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2, *Cell*, 64 (1991) 1111–1122.

- [93] P.K. Sorger, A.W. Murray, S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34cdc28, *Nature*, 355 (1992) 365–368.
- [94] R. Boutros, C. Dozier, B. Ducommun, The when and wheres of CDC25 phosphatases, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 18 (2006) 185–191.
- [95] T. Otto, P. Sicinski, Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, 17 (2017) 93–115.
- [96] M. Malumbres, Cyclin-dependent kinases, *Genome Biol.*, 15 (2014) 122.
- [97] I. Crespo, A.L. Vital, M. Gonzalez-Tablas, M. del C. Patino, A. Otero, M.C. Lopes, C. de Oliveira, P. Domingues, A. Orfao, M.D. Taberero, Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme, *Am. J. Pathol.*, 185 (2015) 1820–1833.
- [98] The Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways, *Nature*, 455 (2008) 1061–1068.
- [99] D. Senft, J. Qi, Z.A. Ronai, Ubiquitin ligases in oncogenic transformation and cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, 18 (2018) 69–88.
- [100] Z. Zhou, M. He, A.A. Shah, Y. Wan, Insights into APC/C: from cellular function to diseases and therapeutics, *Cell Div.*, 11 (2016) 9.
- [101] U. Asghar, A.K. Witkiewicz, N.C. Turner, E.S. Knudsen, The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 14 (2015) 130–146.
- [102] L. Ding, J. Cao, W. Lin, H. Chen, X. Xiong, H. Ao, M. Yu, J. Lin, Q. Cui, The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (2020) 1960.
- [103] C.I. Wells, J.D. Vasta, C.R. Corona, J. Wilkinson, C.A. Zimprich, M.R. Ingold, J.E. Pickett, D.H. Drewry, K.M. Pugh, M.K. Schwinn, B. Hwang, H. Zegzouti, K.V.M. Huber, M. Cong, P.L. Meisenheimer, T.M. Willson, M.B. Robers, Quantifying CDK inhibitor selectivity in live cells, *Nat. Commun.*, 11 (2020) 2743.
- [104] S. Ren, B.J. Rollins, Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit, *Cell*, 117 (2004) 239–251.
- [105] F. Bullrich, T.K. MacLachlan, N. Sang, T. Druck, M.L. Veronese, S.L. Allen, N. Chiorazzi, A. Koff, K. Heubner, C.M. Croce, Chromosomal mapping of members of the

- cdc2 family of protein kinases, cdk3, cdk6, PISSLRE, and PITALRE, and a cdk inhibitor, p27Kip1, to regions involved in human cancer, *Cancer Res.*, 55 (1995) 1199–1205.
- [106] D. Zheng, Y.-Y. Cho, A.T.Y. Lau, J. Zhang, W.-Y. Ma, A.M. Bode, Z. Dong, Cyclin-dependent kinase 3-mediated activating transcription factor 1 phosphorylation enhances cell transformation, *Cancer Res.*, 68 (2008) 7650–7660.
- [107] J. Lu, Z.L. Zhang, D. Huang, N. Tang, Y. Li, Z. Peng, C. Lu, Z. Dong, F. Tang, Cdk3-promoted epithelial-mesenchymal transition through activating AP-1 is involved in colorectal cancer metastasis, *Oncotarget*, 7 (2016) 7012–7028.
- [108] T. Xiao, J.J. Zhu, S. Huang, C. Peng, S. He, J. Du, R. Hong, X. Chen, A.M. Bode, W. Jiang, Z. Dong, D. Zheng, Phosphorylation of NFAT3 by CDK3 induces cell transformation and promotes tumor growth in skin cancer, *Oncogene*, 36 (2017) 2835–2845.
- [109] K. Braun, G. Hölzl, T. Soucek, C. Geisen, T. Möröy, M. Hengstschläger, Investigation of the cell cycle regulation of cdk3-associated kinase activity and the role of cdk3 in proliferation and transformation, *Oncogene*, 17 (1998) 2259–2269.
- [110] J. Cui, Y. Yang, H. Li, Y. Leng, K. Qian, Q. Huang, C. Zhang, Z. Lu, J. Chen, T. Sun, R. Wu, Y. Sun, H. Song, X. Wei, P. Jing, X. Yang, C. Zhang, MiR-873 regulates ER α transcriptional activity and tamoxifen resistance via targeting CDK3 in breast cancer cells, *Oncogene*, 34 (2015) 3895–3907.
- [111] L. Wang, Y. Xi, C. Sun, F. Zhang, H. Jiang, Q. He, D. Li, CDK3 is a major target of miR-150 in cell proliferation and anti-cancer effect, *Exp. Mol. Pathol.*, 102 (2017) 181–190.
- [112] L. Zheng, X. Meng, X. Li, Y. Zhang, C. Li, C. Xiang, Y. Xing, Y. Xia, T. Xi, miR-125a-3p inhibits ER α transactivation and overrides tamoxifen resistance by targeting CDK3 in estrogen receptor-positive breast cancer, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 32 (2018) 588–600.
- [113] Z. Liu, S. Yang, W. Li, S. Dong, S. Zhou, S. Xu, circRNA_141539 can serve as an oncogenic factor in esophageal squamous cell carcinoma by sponging miR-4469 and activating CDK3 gene, *Aging*, 13 (2021) 12179–12193.
- [114] Y. Zhang, L. Yang, C. Ling, W. Heng, HuR facilitates cancer stemness of lung cancer cells via regulating miR-873/CDK3 and miR-125a-3p/CDK3 axis, *Biotechnol.*

Lett., 40 (2018) 623–631.

- [115] L. Wang, H.-Y. Hu, Y.-L. Lin, Z.-X. Zhao, L. Tan, P. Yu, H.-J. Wan, Z. Jin, D. Zheng, CDK3 expression and its clinical significance in human nasopharyngeal carcinoma, *Mol. Med. Rep.*, 9 (2014) 2582–2586.
- [116] D. Wang, Y. Zhou, L. Hua, J. Li, N. Zhu, Y. Liu, CDK3, CDK5 and CDK8 Proteins as Prognostic and Potential Biomarkers in Colorectal Cancer Patients, *Int. J. Gen. Med.*, 15 (2022) 2233–2245.
- [117] M. Bentires-Alj, B.G. Neel, Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer, *Cancer Res.*, 67 (2007) 2420–2424.
- [118] T. Jin, D. Li, T. Yang, F. Liu, J. Kong, Y. Zhou, PTPN1 promotes the progression of glioma by activating the MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways and is associated with poor patient survival, *Oncol. Rep.*, (2019).
- [119] S. Singh, H. Singh, A. Tuknait, K. Chaudhary, B. Singh, S. Kumaran, G.P.S. Raghava, PEPstrMOD: structure prediction of peptides containing natural, non-natural and modified residues, *Biol. Direct*, 10 (2015) 73.
- [120] A. Alekseenko, M. Ignatov, G. Jones, M. Sabitova, D. Kozakov, Protein-Protein and Protein-Peptide Docking with ClusPro Server, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, 2165 (2020) 157–174.
- [121] K.A. Johnson, R.S. Goody, The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper, *Biochemistry*, 50 (2011) 8264–8269.
- [122] J.S. Boehm, M.J. Garnett, D.J. Adams, H.E. Francies, T.R. Golub, W.C. Hahn, F. Iorio, J.M. McFarland, L. Parts, F. Vazquez, Cancer research needs a better map, *Nature*, 589 (2021) 514–516.
- [123] Z. Qin, N.R. Pandey, X. Zhou, C.A. Stewart, A. Hari, H. Huang, A.F.R. Stewart, J.M. Brunel, H.-H. Chen, Functional properties of Claramine: a novel PTP1B inhibitor and insulin-mimetic compound, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 458 (2015) 21–27.
- [124] R. Roufayel, R. Mezher, K.B. Storey, The Role of Retinoblastoma Protein in Cell Cycle Regulation: An Updated Review, *Curr. Mol. Med.*, 21 (2021) 620–629.
- [125] B. Krishnan, T. Yasuhara, P. Rumde, M. Stanzione, C. Lu, H. Lee, M.S. Lawrence, L. Zou, L.T. Nieman, I. Sanidas, N.J. Dyson, Active RB causes visible changes in nuclear organization, *J. Cell Biol.*, 221 (2022) e202102144.

- [126] A. Doan, J. Arand, D. Gong, A.P. Drainas, Y.T. Shue, M.C. Lee, S. Zhang, D.M. Walter, A.C. Chaikovsky, D.M. Feldser, H. Vogel, L.E. Dow, J.M. Skotheim, J. Sage, RB depletion is required for the continuous growth of tumors initiated by loss of RB, *PLOS Genet.*, 17 (2021) e1009941.
- [127] J. Esteban-Villarrubia, J.J. Soto-Castillo, J. Pozas, M. San Román-Gil, I. Orejana-Martín, J. Torres-Jiménez, A. Carrato, T. Alonso-Gordoa, J. Molina-Cerrillo, Tyrosine Kinase Receptors in Oncology, *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (2020).
- [128] T. Hunter, Discovering the first tyrosine kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112 (2015) 7877–7882.
- [129] S. Bunda, K. Burrell, P. Heir, L. Zeng, A. Alamsahebpour, Y. Kano, B. Raught, Z.-Y. Zhang, G. Zadeh, M. Ohh, Inhibition of SHP2-mediated dephosphorylation of Ras suppresses oncogenesis, *Nat. Commun.*, 6 (2015) 8859.
- [130] R. Xu, Y. Yu, S. Zheng, X. Zhao, Q. Dong, Z. He, Y. Liang, Q. Lu, Y. Fang, X. Gan, X. Xu, S. Zhang, Q. Dong, X. Zhang, G.-S. Feng, Overexpression of Shp2 tyrosine phosphatase is implicated in leukemogenesis in adult human leukemia, *Blood*, 106 (2005) 3142–3149.
- [131] J.R. Wiener, J.A. Hurteau, B.-J.M. Kerns, R.S. Whitaker, M.R. Conaway, A. Berchuck, R.C. Bast, Overexpression of the tyrosine phosphatase PTP1B is associated with human ovarian carcinomas, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 170 (1994) 1177–1183.
- [132] L.R. Bollu, A. Mazumdar, M.I. Savage, P.H. Brown, Molecular Pathways: Targeting Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer, *Clin. Cancer Res.*, 23 (2017) 2136–2142.
- [133] M. You, D.-H. Yu, G.-S. Feng, Shp-2 Tyrosine Phosphatase Functions as a Negative Regulator of the Interferon-Stimulated Jak/STAT Pathway, *Mol. Cell. Biol.*, 19 (1999) 2416–2424.
- [134] E.E. Zhang, E. Chapeau, K. Hagihara, G.-S. Feng, Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101 (2004) 16064–16069.
- [135] J.M. Cunnick, S. Meng, Y. Ren, C. Desponts, H.-G. Wang, J.Y. Djeu, J. Wu, Regulation of the Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway by SHP2, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 9498–9504.

- [136] C.J. Wu, D.M. O'Rourke, G.S. Feng, G.R. Johnson, Q. Wang, M.I. Greene, The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors, *Oncogene*, 20 (2001) 6018–6025.
- [137] J. Li, H.-B. Jie, Y. Lei, N. Gildener-Leapman, S. Trivedi, T. Green, L.P. Kane, R.L. Ferris, PD-1/SHP-2 Inhibits Tc1/Th1 Phenotypic Responses and the Activation of T Cells in the Tumor Microenvironment, *Cancer Res.*, 75 (2015) 508–518.
- [138] X. Yuan, H. Bu, J. Zhou, C.-Y. Yang, H. Zhang, Recent Advances of SHP2 Inhibitors in Cancer Therapy: Current Development and Clinical Application, *J. Med. Chem.*, 63 (2020) 11368–11396.
- [139] P.D. Leiphrakpam, A.J. Lazenby, L.M. Smith, M.G. Brattain, J.D. Black, J. Wang, C. Are, Correlation of PRL3 expression with colorectal cancer progression, *J. Surg. Oncol.*, 123 (2021) 42–51.
- [140] F. Polato, A. Codegoni, R. Fruscio, P. Perego, C. Mangioni, S. Saha, A. Bardelli, M. Broggin, PRL-3 Phosphatase Is Implicated in Ovarian Cancer Growth, *Clin. Cancer Res.*, 11 (2005) 6835–6839.
- [141] K. Imai, A. Takaoka, Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 6 (2006) 714–727.
- [142] W.-B. Zhao, Y. Li, X. Liu, L.-Y. Zhang, X. Wang, Evaluation of PRL-3 expression, and its correlation with angiogenesis and invasion in hepatocellular carcinoma, *Int. J. Mol. Med.*, 22 (2008) 187–192.
- [143] M. Thura, A.Q. Al-Aidaros, A. Gupta, C.E. Chee, S.C. Lee, K.M. Hui, J. Li, Y.K. Guan, W.P. Yong, J. So, W.J. Chng, C.H. Ng, J. Zhou, L.Z. Wang, J.S.P. Yuen, H.S.S. Ho, S.M. Yi, E. Chiong, S.P. Choo, J. Ngeow, et al., PRL3-zumab as an immunotherapy to inhibit tumors expressing PRL3 oncoprotein, *Nat. Commun.*, 10 (2019) 2484.
- [144] Z. Wu, Y. Wu, Y. Tian, X. Sun, J. Liu, H. Ren, C. Liang, L. Song, H. Hu, L. Wang, B. Jiao, Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on the proliferation, apoptosis and invasion of glioma cells, *Oncol. Lett.*, 6 (2013) 1447–1452.
- [145] Y. Shu, S. Yao, S. Cai, J. Li, L. He, J. Zou, Q. Zhang, H. Fan, L. Zhou, S. Yu, miR-34c inhibits proliferation of glioma by targeting PTP1B, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 53 (2021) 325–332.
- [146] K.A. Lantz, S.G.E. Hart, S.L. Planey, M.F. Roitman, I.A. Ruiz-White, H.R. Wolfe,

M.P. McLane, Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice, *Obes. Silver Spring Md*, 18 (2010) 1516–1523.

[147] M. Delibegovic, D. Zimmer, C. Kauffman, K. Rak, E.-G. Hong, Y.-R. Cho, J.K. Kim, B.B. Kahn, B.G. Neel, K.K. Bence, Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress, *Diabetes*, 58 (2009) 590–599.

[148] J. Xie, Y.-Y. Qian, Y. Yang, L.-J. Peng, J.-Y. Mao, M.-R. Yang, Y. Tian, J. Sheng, Isothiocyanate From *Moringa oleifera* Seeds Inhibits the Growth and Migration of Renal Cancer Cells by Regulating the PTP1B-dependent Src/Ras/Raf/ERK Signaling Pathway, *Front. Cell Dev. Biol.*, 9 (2021) 790618.

ANEXO

Review Article

Recent advances in PTP1B signaling in metabolism and cancer

Olga Villamar-Cruz^{1,2}, Marco A. Loza-Mejía³,  Luis E. Arias-Romero² and Ignacio Camacho-Arroyo¹

¹Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, Mexico; ²Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED), Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, Estado de México 54090, Mexico; ³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad La Salle-México. Benjamin Franklin 45 06140, Mexico City, Mexico

Correspondence: Luis E. Arias-Romero (larias@unam.mx) or Ignacio Camacho-Arroyo (camachoarroyo@gmail.com)



Protein tyrosine phosphorylation is one of the major post-translational modifications in eukaryotic cells and represents a critical regulatory mechanism of a wide variety of signaling pathways. Aberrant protein tyrosine phosphorylation has been linked to various diseases, including metabolic disorders and cancer. Few years ago, protein tyrosine phosphatases (PTPs) were considered as tumor suppressors, able to block the signals emanating from receptor tyrosine kinases. However, recent evidence demonstrates that misregulation of PTPs activity plays a critical role in cancer development and progression. Here, we will focus on PTP1B, an enzyme that has been linked to the development of type 2 diabetes and obesity through the regulation of insulin and leptin signaling, and with a promoting role in the development of different types of cancer through the activation of several pro-survival signaling pathways. In this review, we discuss the molecular aspects that support the crucial role of PTP1B in different cellular processes underlying diabetes, obesity and cancer progression, and its visualization as a promising therapeutic target.

Introduction

Protein tyrosine phosphorylation is one of the most important post-translational modifications in eukaryotic cells and plays a fundamental role in cellular physiology, since it can promote allosteric changes essential for protein–protein interactions, protein stability, the proper protein localization, and the enzymatic activity [1,2]. Reversible tyrosine phosphorylation of proteins is reciprocally controlled by protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine phosphatases (PTPs). Consequently, the aberrant activity of these enzymes has been linked to various diseases including cancer [3,4]. PTPs are hydrolases that dephosphorylate phosphotyrosine (pTyr) residues of a large number of proteins producing a dephosphorylated protein at tyrosine residues and inorganic phosphate [5].

In the human genome, the PTP superfamily is divided into four separate families (Class I, II, III, and IV) according to differences in the amino acid sequence at their catalytic domains and the nucleophilic amino acid used in the catalytic reaction. Classes I, II, and III are formed by cysteine (Cys)-based PTPs and Class IV by aspartate (Asp)-based PTPs (Table 1) [5,6]. The largest family is the Class I Cys-based PTPs, which can be further divided into two subfamilies: tyrosine-specific or classical PTPs, which includes receptor-type PTPs (PTPRs) and non-receptor PTPs (NRPTPs); and vaccinia virus H1-like (VH1-like) dual-specificity phosphatases (DUSPs), which are the more diverse group. In terms of substrate specificity, besides pTyr, they have the ability to dephosphorylate phosphoserines (pSer), phosphothreonines (pThr), and/or phosphoinositides (PIPs), in addition to pTyr [7,8].

The Class II Cys-based PTP is represented in the human genome by a single gene termed *ACPI*, which encodes the 18-kDa low molecular weight phosphatase LMPTP, a protein involved in the modulation of various signaling pathways including T-cell receptor activation [9,10]. The Class III Cys-based

Received: 26 August 2021
Revised: 26 October 2021
Accepted: 01 November 2021

Version of Record published:
12 November 2021

Table 1 Classification of human PTPs

			M.W. (kDa)	Substrate
Class I	(Cys)-based	Classical PTPs	48–213	pTyr, PIPs
		VH1-like	21–50	pTyr, pSer, pThr, PIPs, Phosphatidylglycerophosphate, Phosphoglycogen, 5' CAP-mRNA
Class II	(Cys)-based	LMPTP	18	pTyr
Class III	(Cys)-based	CDC25	59–65	pTyr, pThr
Class IV	(Asp)-based	EYA	59–70	pTyr, pSer

PTPs comprises three cell cycle regulators, CDC25A, CDC25B and CDC25C, which regulate cell cycle progression and checkpoint pathways that control the DNA damage response, mainly by activating the cyclin-dependent kinases (Cdks) through dephosphorylation of the Thr¹⁴ and Tyr¹⁵ residues in their ATP-binding loop [11,12]. Finally, the Class IV Asp-based PTPs in humans is represented by the four members of the EYA family (EYA1–4), a group of proteins originally identified as essential transcriptional co-activators of the Six family of homeoproteins [13]. The highly conserved C-terminal domains of the EYA proteins were discovered to act as an Mg²⁺-dependent Tyr phosphatases, making EYAs the first transcriptional activators to harbor intrinsic phosphatase activity [14]. So far, the only validated substrate identified for the Tyr phosphatase activity of EYAs is the histone H2AX [15]. In the next sections, we will focus on PTP1B, a Class I phosphatase that plays a promoting role in the development of different types of cancer through the activation of pro-survival signaling pathways.

PTP1B structure and regulation

PTP1B is a ubiquitous and abundant intracellular enzyme and the prototype of non-receptor phosphatases. It was the first enzyme of its class to be purified to homogeneity [16,17], cloned [18,19], and crystallized [20,21]. Most discoveries about the mechanisms of regulation, structure, and function of this class of phosphatases were described in PTP1B [22]. This enzyme is encoded by the protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1 (*PTPN1*) gene. In humans, it is located at chromosome 20q13.1 (Figure 1A), in a region that has been associated with diabetes and obesity, and spans over 74 kb with an unusually large first intron. In normal human cells, two PTP1B mRNAs were identified, a larger 4.7 kb transcript which includes intron 9, and a smaller 3.5 kb transcript with intron 9 spliced out (Figure 1B) [23]. Interestingly, this genetic locus is commonly amplified in breast cancer and has been associated with poor prognosis [24].

The *PTPN1* gene is translated into a 435-amino acid protein composed of an N-terminal catalytic domain (residues 30–278), two proline-rich domains (residues 278–401), at least one of which is crucial for protein–protein interactions, and a 35 amino acid C-terminal tail (residues 401–435) that targets PTP1B to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum (ER) (Figure 1C) [25,26]. Despite its ER localization, PTP1B can interact with diverse substrates, which include cytosolic, nuclear, plasma membrane-bound, mitochondrial, and adherent junction proteins [27–29]. The non-catalytic motifs and the catalytic domain regulate the interaction between PTP1B and its substrates. PTP1B contains proline-rich motifs that mediate its association with several Src-homology 3 (SH3) domain-containing substrates such as p130^{Cas} and Src [30,31]. In addition, PTP1B catalytic domain has a high specificity and preference towards certain substrates. Crystallographic analysis of PTP1B interaction with the insulin receptor (IR) established that the sequence E/D-pY-pY-R/K is needed for optimal substrate recognition. Indeed, PTP1B exhibits higher affinity (~70 fold) for tandem pTyr containing peptides compared with those with mono-pTyr (Figure 1D) [32]. Remarkably, this motif has been used to predict novel PTP1B substrates such as Janus Kinase 2 (JAK2) and Tyrosine Kinase 2 (TYK2) [33]. Although the tandem pTyr-motif is important for optimal substrate recognition it is not a requirement, as several well-established PTP1B substrates do not possess this sequence.

The regulation of PTP1B expression at transcriptional and post-transcriptional levels or by post-translational modifications has been extensively studied since its discovery. The promoter regions of human and mouse PTP1B genes lack a TATA-box, but are rich in GC sequences, and possess binding sites for a wide variety of transcription factors such as Sp1, Early Growth Response Protein 1 (EGR1), Nuclear Factor κ B (NF- κ B), Y box binding protein 1 (YBX1), and the androgen receptor (AR) among others [34–37]. Recently, it has been reported that PTP1B expression can also be regulated at post-transcriptional level through the interaction of multiple miRNAs such as miR-338-3p, miR-193a-3p, miR-135a, miR-146-b, and miR-206 with its 3'-UTR region [38–43].

At post-translational level, PTP1B function is regulated by several modifications including oxidation, nitrosylation, sumoylation, phosphorylation, and proteolytic cleavage (Figure 1C) [44]. Like other classical PTPs subfamily

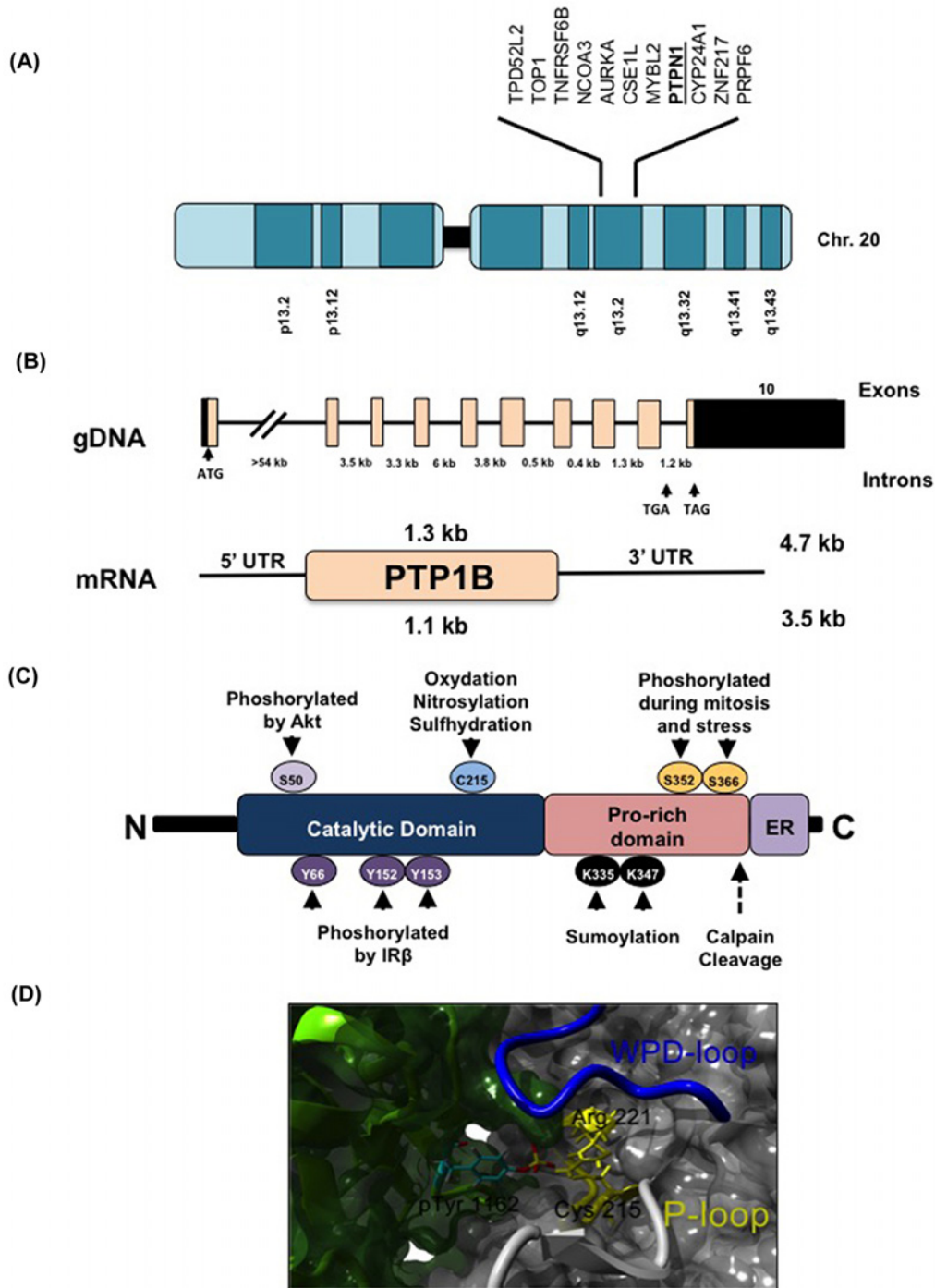


Figure 1. Genomic organization and structure of PTP1B

(A) Graphical representation of the human chromosome 20. The human PTP1B gene is located into the chromosome 20q13.1, a commonly amplified region in breast and ovarian cancers. (B) The upper panel shows the schematic representation of the human PTP1B gene. Exons are boxed, and the black region indicates the coding sequence. The two alternative termination codons, one in intron 9 and the other in exon 10, are indicated. The lower panel shows the schematic representation of PTP1B mRNA. In humans there are two transcripts, a larger 4.7 kb one, which includes intron 9, and a smaller 3.5 kb transcript with the intron 9 spliced out. (C) Structural domains and post-translational modifications of PTP1B. (D) Model of the PTP1B (gray)—Insulin Receptor (green) interaction predicted by protein–protein docking using ClusPro. Interaction of the phosphotyrosine 1162 of IR with the catalytic residues Cys²¹⁵ and Arg²²¹ of PTP1B is highlighted. Abbreviation: IR, insulin receptor.

members, PTP1B is susceptible to oxidation by reactive oxygen species (ROS) [45]. Oxidation of PTP1B Cys²¹⁵ suppresses its activity by converting the sulphenic acid (S–OH) into a cyclic sulphenamide, in which the sulphur atom of the catalytic Cys²¹⁵ is covalently linked to the main chain nitrogen of an adjacent residue. This oxidation is accompanied by significant conformational changes in the architecture of the active site that inhibit substrate binding [46,47]. These structural changes are reversible and protect the enzyme from higher order (S–O₂H and S–O₃H) irreversible oxidation, and facilitate the reduction back to its active form [47]. Similar to ROS, reactive nitrogen species (RNS) suppresses PTP1B activity [48]. In particular, S-nitrosylation prevents PTP1B Cys²¹⁵ from subsequent oxidation when subjected to oxidative stress, suggesting that this post-translational modification protects PTP1B from permanent inactivation caused by oxidative stress [49]. PTP1B is sumoylated in the residues Lys³³⁵ and ³⁴⁷, and its C-terminal tail is required for maximum sumoylation [50]. In addition, sumoylation also affects PTP1B-mediated dephosphorylation of its nuclear substrate, emerin, a protein involved in the maintenance of the nuclear architecture [29]. Ser and Tyr phosphorylation can also regulate PTP1B activity. For instance, insulin promotes PTP1B phosphorylation at Tyr⁶⁶, ¹⁵², and ¹⁵³. It is possible that the phosphorylation of Tyr¹⁵² and ¹⁵³ is more important for its effects on protein interaction since the mutation of these residues markedly impairs the association of PTP1B with activated IR [51,52]. Besides, PTP1B is phosphorylated at multiple Ser residues during mitosis [53]. Moreover, phosphorylation of PTP1B at Ser⁵⁰ by Akt inhibits PTP1B activity and impairs its ability to dephosphorylate the IR, possibly as a positive feedback mechanism to potentiate insulin signaling [54]. Finally, PTP1B activity can also be regulated by proteolytic cleavage. In activated platelets, PTP1B is released from the ER by calpain-cleavage, generating a cytoplasmic constitutively active enzyme [55]. The diversity of PTP1B post-translational modifications, illustrate the complexity of its regulation.

Major signaling pathways regulated by PTP1B and their role in metabolism

During the last 25 years, several reports have shown that PTP1B acts as a critical negative and positive regulator of numerous signaling cascades (Figure 2). Initial *in vitro* evidence suggested that PTP1B was a negative regulator of the IR and its downstream signaling pathways [17]. Confirmation of the importance of PTP1B in metabolism came from PTP1B knockout (KO) mice, which display lower blood glucose and insulin levels than their wildtype (WT) littermates. In addition, when the PTP1B KO and heterozygous mice were subjected to a chronic hypercaloric diet, they remained resistant to weight gain and insulin-sensitive. In contrast, the WT mice rapidly gained weight and developed insulin resistance [56]. At the molecular level, PTP1B KO mice exhibit increased phosphorylation of the IR in liver and muscle tissue upon insulin injection, establishing PTP1B as a key regulator of insulin signaling. Further studies using tissue-specific PTP1B KO animals revealed that despite improved glucose homeostasis and insulin signaling in muscle and liver, these animals gained weight and developed insulin resistance when they were subjected to a high-fat diet [57]. In contrast, neuron-specific PTP1B KO mice were protected from diet-induced obesity and glucose intolerance, indicating that neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity, and leptin signaling [58]. Mechanistically, PTP1B dephosphorylates the IR at the Tyr residues 972, 1162, and 1163 [32,51]. In addition, it has been shown that in the liver of hyperglycemic Insulin Receptor Substrate-2 (IRS-2) deficient mice, PTP1B impairs IR/IRS-1-mediated insulin signaling. Accordingly, deletion of PTP1B promotes insulin sensitivity in the liver these mice through the restoration of IRS-1-mediated PI3K/Akt/Foxo1 phosphorylation and the inhibition of gluconeogenic enzymes [59].

Besides its prominent role in insulin signaling, PTP1B has been linked to leptin regulation. The first evidence that PTP1B attenuates leptin signaling came from PTP1B KO mice. In this animal model, PTP1B is able to dephosphorylate JAK2, a well-known downstream effector of the leptin receptor (LR), resulting in an inhibition of the synthesis of the appetite-stimulating hormone, neuropeptide Y. Moreover, mice lacking both leptin and PTP1B, exhibit reduced weight gain, low amounts of adipose tissue and high resting metabolic rates [36,60]. These effects are mediated by a PTP1B-dependent mechanism for the control of diet-induced obesity [58]. It has been reported that in the brain, there are two distinct populations of first-order neurons, which synthesize two different proteins, agouti-related protein (AgRP) or proopiomelanocortin (POMC), with opposite effects on energy balance [61,62]. Mice with a POMC neuron-specific deletion of PTP1B are thin, even in the presence of a hypercaloric diet, and exhibit improved leptin sensitivity and increased energy expenditure compared with WT mice [63]. However, there were no differences in food intake between WT and PTP1B KO animals, suggesting that PTP1B function is important in other neuronal populations regulating food intake.

Since inflammation and activation of the immune system are involved in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance and type 2 diabetes, and PTP1B modulates insulin and leptin signaling through the regulation of JAKs and STATs, it has been suggested that there is a link between PTP1B and immune signaling. The expression of cytokines,

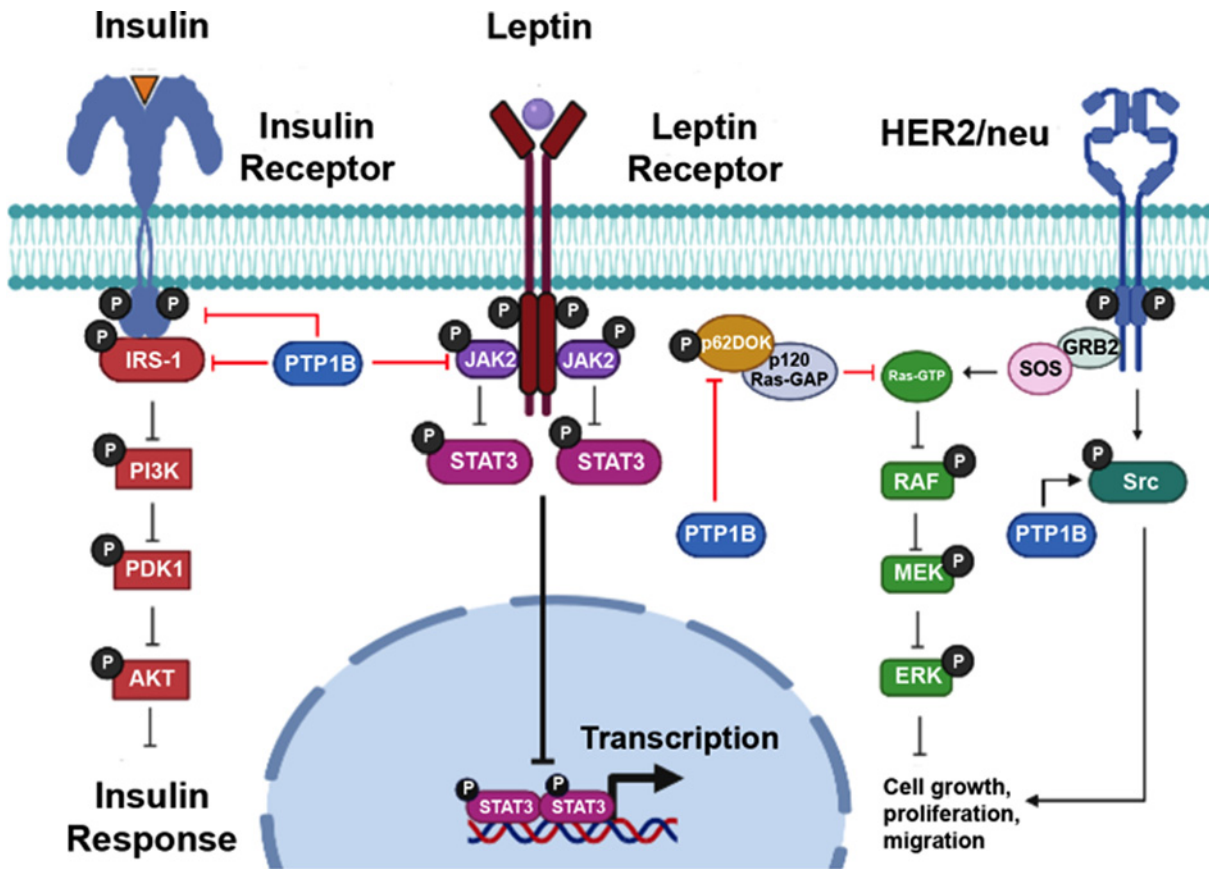


Figure 2. Major signaling pathways regulated by PTP1B

PTP1B exerts a negative role in the insulin and leptin signaling, whereas it has a promoter role on Her2/Neu-induced tumorigenesis. IR activation promotes tyrosine phosphorylation of IRS-1, leading to PI3K and Akt activation. PTP1B attenuates insulin signaling following receptor endocytosis, and it dephosphorylates IRS-1. Activation of the LR leads to tyrosine phosphorylation of JAK2 and subsequent activation of STAT3-mediated transcription. JAK2-STAT3 activity is also negatively regulated by PTP1B. Regarding the oncogenic role of PTP1B signaling, it dephosphorylates p62Dok, which then inhibits p120RasGAP, thereby promoting Ras-MAPK-mediated cell proliferation. Similarly, PTP1B dephosphorylates Src at Y529 to promote cell migration and enables the subsequent activation of small GTPases such as Ras and Rac1. Abbreviation: LR, leptin receptor.

such as the Tumor Necrosis Factor α (TNF α), Interleukin (IL)-1 (IL-1) and IL-6, is part of the body's response to obesity-induced metabolic changes during inflammation [64]. Clear links between PTP1B and several of immune pathways have been established, including the regulation of the JAK-STAT pathway [33], as well as TNF α and IL-6 signaling [65,66]. Therefore, it is feasible to assume that PTP1B is directly involved in the regulation of obesity through its action on both IR and leptin signaling, and indirectly through of the modulation of the inflammatory response and recruitment of immune cells.

PTP1B in cancer

The role of PTP1B in cancer has been extensively reviewed [22,44,67,68]. In the last decade several reports pointed out that PTP1B plays a key role in cancer, serving as both tumor suppressor and tumor promoter depending on the cellular context. Here, we will briefly discuss some of the most recent findings regarding PTP1B signaling in cancer.

The tumor suppressing properties of PTP1B were initially attributed to observations from cell culture experiments demonstrating that its overexpression prevents cell transformation and decreases tumorigenicity in v-Src [26] and Neu (the rat ortholog to the human epidermal growth factor receptor 2 [Her2]) [18] transformed fibroblasts. In addition, PTP1B also suppresses Bcr-Abl transformation in Rat-1 cells [69]. Despite these initial observations, two independent studies confirmed that PTP1B acts as an oncogene in a mouse model of Neu-driven breast cancer [70,71]. What is not completely understood, however, is the mechanism by which PTP1B cooperates with Neu during the

transformation of breast epithelial cells. Two potential substrates, p62Dok and Src, have been proposed to mediate the oncogenic signaling effects of PTP1B, but no systematic evaluation has been carried out to confirm whether these proteins explain the function of PTP1B in Neu signal transduction. Regarding p62Dok, it has been established that in breast and colon cancer, it inhibits p120RasGAP when it is dephosphorylated by PTP1B, thus leading to elevated levels of GTP-bound Ras [72]. In immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking PTP1B, there is an increase in p62Dok tyrosine phosphorylation levels, which promotes the activation of p120RasGAP and the consequent inhibition of Ras signaling [73]. Consistent with this *in vitro* evidence, Julien et al. observed enhanced p62Dok phosphorylation in PTP1B-deficient tumors, correlating with diminished p120RasGAP phosphorylation in a Neu transgenic mouse model [71]. Other possible PTP1B target is Src, however, changes in Src phosphorylation were not reported in either of the aforementioned tumor models. Nevertheless, recent *in vitro* evidence showed that in a 3D cell culture setting, PTP1B-mediated Src activation is a prime target in Her2 (Neu)-induced human breast cancer cells. In these studies, activated Src bypasses the requirement of PTP1B for Her2-mediated transformation. Furthermore, exogenous expression of PTP1B, but not a catalytically active PTP1B mutant that cannot bind or activate Src, recapitulated the effects of activated Her2 on the architecture of the 3D spheroids, including loss of luminal apoptosis and maintenance of cell proliferation [74].

Although the oncogenic role of PTP1B has been extensively studied in breast cancer, some evidence demonstrates that PTP1B plays an important role in the development of some other types of cancer. PTP1B is highly overexpressed and it has been associated with tumor stage and overall survival of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. In this model, PTP1B dephosphorylates the Tyr⁵²⁷ of Src with the subsequent activation of the Ras/RAF/MEK/Erk pathway, promoting cell proliferation and metastasis in an Src-dependent manner [75]. In a recent study, splice mutations of PTP1B were found in approximately 20% of the human colon and thyroid cancer specimens analyzed. Importantly, the splice variant PTP1B Δ E6, which is expressed in colon and thyroid tumors, lacks phosphatase activity. However, its expression induced transformation of rat fibroblasts without Src activation, indicating that it is involved in signaling pathways independent of Src [76].

PTP1B is highly expressed in pancreatic ductal adenocarcinoma, and its expression is correlated with distal metastasis and tumor staging. Mechanistically, PTP1B regulates the PKM2/AMPK/mTOC1 signaling pathway to regulate cell growth. PTP1B inhibition significantly increased the phosphorylation of PKM2 at the residue Tyr¹⁰⁵, resulting in the activation of AMPK which in turn decreased mTOC1 activity and led to the inhibition of p70S6K, inducing cell death [77]. Interestingly, there is evidence that PTP1B acts as a tumor suppressor in NSCLC, and in some other tumors, such as esophageal cancer, lymphoma, glioblastomas, and melanoma [78–82]. The molecular mechanism by which PTP1B acts as a tumor suppressor has only been described in detail in melanoma and glioblastoma. In melanoma, PTP1B dephosphorylates caveolin and down-regulates an Rab5/Rac1 signaling axis, which is essential in cell migration. In glioblastomas, PTP1B knockdown or treatment with a PTP1B small-molecule inhibitor, causes a significant decrease in IL-13-mediated adhesion, migration and invasion by inhibiting the dephosphorylation of Src and consequently, the inactivation of the Src/Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways [81]. The tumor suppressing function of PTP1B in NSCLC, esophageal cancer and lymphoma remains unknown. Thus, the dual role of PTP1B in cancer is tissue-specific. Finally, a recent study showed that PTP1B is overexpressed in melanoma, where it promotes migration and metastasis by binding Src and dephosphorylating the inhibitory site Tyr⁵³⁰, thus leading to the activation of this kinase [82].

Recent advances in PTP1B inhibitor development

The implication of PTP1B in several pathological conditions, varying from metabolic disorders to cancer, has placed it under the spotlight as being a promising therapeutic target. However, the identification of selective PTP1B small molecule inhibitors with appropriate pharmacokinetic properties has proven extremely challenging. Many competitive PTP1B inhibitors are phosphotyrosine mimetics that contain a carboxylic or phosphonic acid and a large lipophilic tail in order to maximize the binding energy of the enzyme–inhibitor complex (Figure 3A) [83]. These small molecule inhibitors generally possess low ligand efficiency, poor cell permeability, low bioavailability, and sub-optimal pharmacokinetic properties. To overcome these challenges, several approaches have been used, including the application of acidic isosteres, which have improved some of the absorption, distribution, metabolism and elimination (ADME) properties, and the design of bidentate ligands, which bind not only to the catalytic site, but also to an allosteric site or side pockets as well. This strategy allowed the development of more potent inhibitors with enhanced selectivity towards PTP1B over other PTPs [84]. In addition, trodusquemine (MSI-1436), a cholesterol metabolite originally identified in the liver of the dogfish shark *Squalus acanthia*, directly targets the C-terminus region of PTP1B blocking its phosphatase activity (Figure 3B) [85]. As trodusquemine showed promising effects in cellular

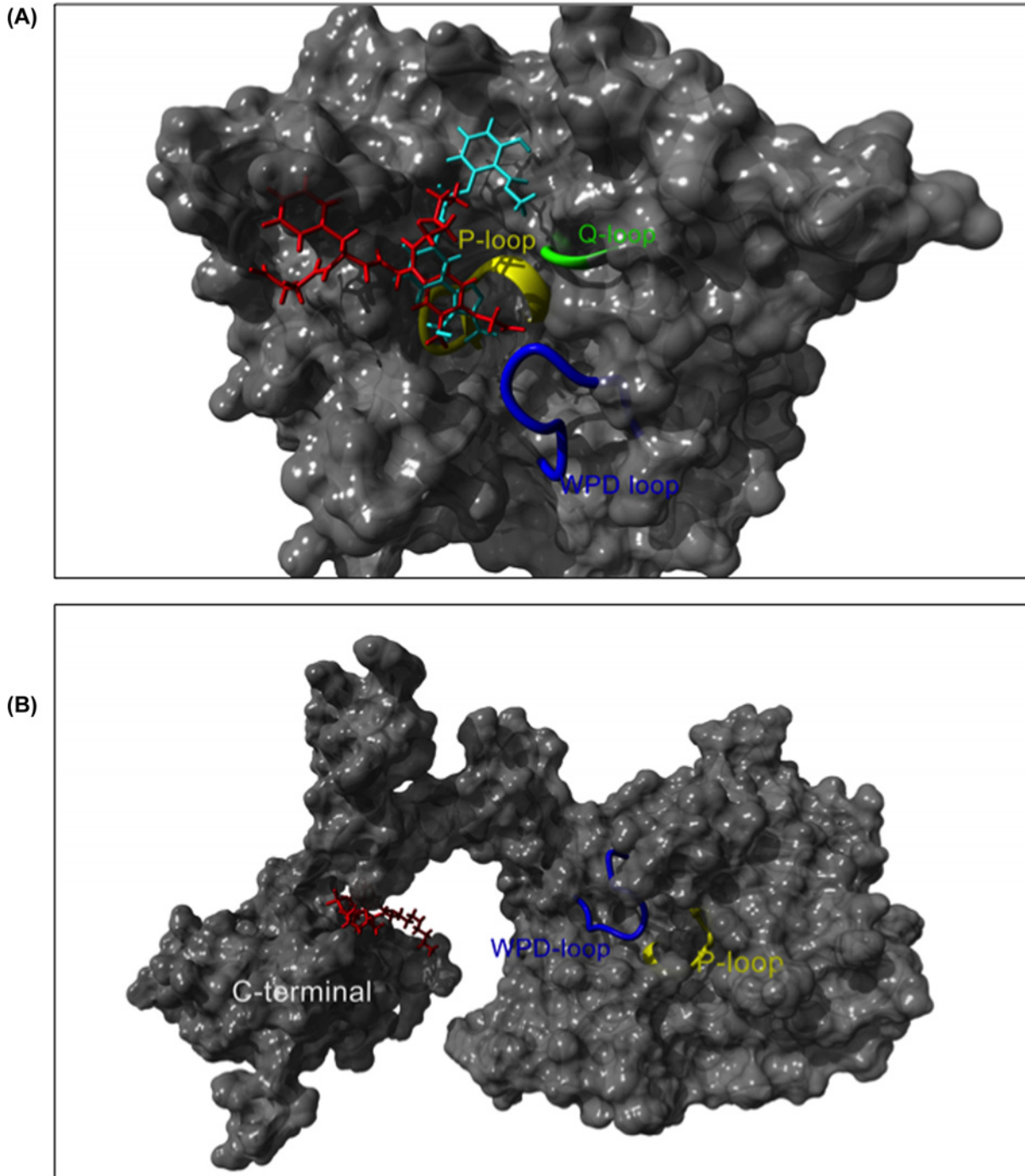


Figure 3. Schematic representation of PTP1B interaction with competitive and allosteric inhibitors

(A) Small molecule phosphotyrosine mimetics like PNU 179326 (in red, PDB code: 1G7G) and DB08001 (in cyan, PDB code: 1XBO) are competitive inhibitors of PTP1B. These molecules usually bind between the WPD loop and P-loop. (B) Predicted interaction of the allosteric inhibitor trodusquemine (in red) in the C-terminal domain of PTP1B.

and animal models, other derivatives have been developed including claramine, a polyaminosteroid which is easier to synthesize and showed similar effects than trodusquemine, restoring glycemic control in diabetic mice as determined by glucose and insulin tolerance tests [86]. More recently, *in vivo* studies using high fat diet-induced obese mice treated with the chemical compound DPM-1001, a potent, specific, and orally bioavailable analog of trodusquemine, showed a significant reduction in fat and insulin levels as a consequence of improved energy metabolism in the obese

Table 2 Examples of PTP1B inhibitors

Drug	Effect	Reference
FU	FU increases glucose uptake in insulin-resistant HepG2 cells and decreases the expression of PTP1B	[88]
Mulberrofuran	Enhances glucose uptake significantly and decreases PTP1B expression in a dose-dependent manner	[89]
Infliximab	Restores phosphorylation of IRS-2 and Akt by attenuating PTP1B activation	[90]
Tanshinones derivatives	Potent PTP1B inhibitory activity <i>in vitro</i>	[91]
Benzoylsulfonamide derivatives	Selective inhibitory activity against PTP1B <i>in vitro</i>	[92]
Oleanolic acid derivatives	Enhanced inhibitory effect over PTP1B activity by increasing molecular interactions with either catalytic or allosteric sites	[93]
Triventric acid	Potent PTP1B inhibitory activity <i>in vitro</i>	[94]
Asperentin B	Selective inhibitor of PTP1B <i>in vitro</i>	[95]
1,2-Naphtho-quinine derivative	Selective inhibitory activity against PTP1B <i>in vitro</i>	[96]

animals [87]. Despite these efforts, none of the available inhibitors have made their way through to Phase II clinical trials yet. However, in the last decade, some of these molecules have been used to generate more potent PTP1B inhibitors. In addition, some other chemical compounds such as Fumosorinone (FU), and Mulberrofuran decreased PTP1B expression attenuating its effects (Table 2) [88–89]. Moreover, several promising PTP1B inhibitors have been developed, although their efficacy has only been tested *in vitro* (Table 2) [90–95].

Another strategy to modulate PTP1B activity has been its genetic targeting using antisense oligonucleotides (ASOs) that bind PTP1B mRNA reducing protein translation. Swarbrick et al. investigated the effect of inhibiting of PTP1B with the subcutaneous administration of the PTP1B ASO, ISIS 113715, in monkeys. ISIS 113715 improved insulin sensitivity during a glucose tolerance test, and caused a rise in adiponectin levels [96]. Furthermore, PTP1B ASO ISIS113715 was advanced into Phase II clinical trials and shown to reduce plasma glucose and LDL-cholesterol in diabetic patients without causing weight gain [97]. Development of ASO ISIS113715 has been reportedly suspended and replaced by the new ASO PTP1BRX. Currently the Phase II trial for diabetes is complete (IONIS PTP1BRX, Ionis Pharmaceuticals, <https://clinicaltrials.gov/> ID NCT01918865). The results of this clinical trial showed that in combination with metformin alone or with a sulfonylurea, PTP1BRX improved glycemic parameters and suppressed leptin signaling [98].

Conclusions

It is clear that PTP1B signaling plays an important role in the pathogenesis and development of a wide array of human diseases. Efforts to block PTP1B activity directly are ongoing, based on structural considerations and on a better understanding of PTP1B processing and cellular localization. In parallel, new ways of identifying critical effectors of PTP1B for malignant transformation are being evaluated. While Src and Ras/Raf/MEK/ERK signaling represent the best characterized pathways used during tumor development, several additional PTP1B effectors such as the IR, IRS-1, and JAKs/STATs have been implicated in type 2 diabetes, obesity, and interestingly in the modulation of immune response, thus representing a very attractive and complicated therapeutic target.

There is accumulating evidence indicating that the function and signaling pathways regulated by PTP1B are tissue- and cell-specific, and that the general principles of PTP1B function defined by *in vitro* methods or from one cell type may not apply to another cell type *in vivo*. Future mouse genetic studies of PTP1B, combined with specific regulator and effector knockout studies, will be useful to better understand specific signaling pathways regulated by this phosphatase.

Finally, we are now at the beginning of understanding the diverse roles of PTP1B and the promising effects of PTP1B inhibitors in human diseases. In the future we will have a better understanding of the multifunctions and the complex regulatory mechanism of PTP1B, which could be of great significance in the development of more specific targeted therapeutic strategies.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [grant number 252444]; and the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA-UNAM [grant numbers IN213218 (to L.E.A.-R.), IN217120 (to I.C.-A.)].

Abbreviations

ASO, antisense oligonucleotide; ER, endoplasmic reticulum; Her2, human epidermal growth factor receptor 2; IL, interleukin; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; JAK, Janus Kinase; KO, knockout; NSCLC, non-small cell lung cancer; POMC, proopiomelanocortin; PTP, protein tyrosine phosphatase; *PTPN1*, protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1; pTyr, phosphotyrosine; ROS, reactive oxygen species; TNF α , tumor necrosis factor α ; WT, wildtype.

References

- 1 Taddei, M.L., Pardella, E., Pranzini, E., Raugeri, G. and Paoli, P. (2020) Role of tyrosine phosphorylation in modulating cancer cell metabolism. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1874**, 188442, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188442>
- 2 Hitosugi, T., Zhou, L., Fan, J., Elf, S., Zhang, L., Xie, J. et al. (2013) Tyr26 phosphorylation of PGAM1 provides a metabolic advantage to tumours by stabilizing the active conformation. *Nat. Commun.* **4**, 1790, <https://doi.org/10.1038/ncomms2759>
- 3 Esteban-Villarrubia, J., Soto-Castillo, J.J., Pozas, J., San Román-Gil, M., Orejana-Martín, I., Torres-Jiménez, J. et al. (2020) Tyrosine kinase receptors in oncology. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–49, <https://doi.org/10.3390/ijms21228529>
- 4 Qi, X.-M., Wang, F., Mortensen, M., Wertz, R. and Chen, G. (2018) Targeting an oncogenic kinase/phosphatase signaling network for cancer therapy. *Acta. Pharm. Sin. B* **8**, 511–517
- 5 Alonso, A. and Pulido, R. (2016) The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family. *FEBS J.* **283**, 1404–1429, <https://doi.org/10.1111/febs.13600>
- 6 Bhattacharyya, T. and Sowdhamini, R. (2019) Genome-wide search for tyrosine phosphatases in the human genome through computational approaches leads to the discovery of few new domain architectures. *Evol. Bioinform. Online* **15**, 1176934319840289, <https://doi.org/10.1177/1176934319840289>
- 7 Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A. et al. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699–711, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.018>
- 8 Tonks, N.K. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 833–846
- 9 Bottini, N., Bottini, E., Gloria-Bottini, F. and Mustelin, T. (2002) Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* **50**, 95–104
- 10 Bottini, N., Stefanini, L., Williams, S., Alonso, A., Jascur, T., Abraham, R.T. et al. (2002) Activation of ZAP-70 through specific dephosphorylation at the inhibitory Tyr-292 by the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase (LMPTP). *J. Biol. Chem.* **277**, 24220–24224, <https://doi.org/10.1074/jbc.M202885200>
- 11 Karlsson-Rosenthal, C. and Millar, J.B.A. (2006) Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol.* **16**, 285–292, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.04.002>
- 12 Boutros, R., Dozier, C. and Ducommun, B. (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 185–191, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.02.003>
- 13 Xu, P.X., Woo, I., Her, H., Beier, D.R. and Maas, R.L. (1997) Mouse Eya homologues of the Drosophila eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Dev. Camb. Engl.* **124**, 219–231
- 14 Jemc, J. and Rebay, I. (2007) The eyes absent family of phosphotyrosine phosphatases: properties and roles in developmental regulation of transcription. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 513–538, <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.164916>
- 15 Krishnan, N., Jeong, D.G., Jung, S.-K., Ryu, S.E., Xiao, A., Allis, C.D. et al. (2009) Dephosphorylation of the C-terminal tyrosyl residue of the DNA damage-related histone H2AX is mediated by the protein phosphatase eyes absent. *J. Biol. Chem.* **284**, 16066–16070, <https://doi.org/10.1074/jbc.C900032200>
- 16 Tonks, N.K., Diltz, C.D. and Fischer, E.H. (1988) Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* **263**, 6722–6730, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68702-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68702-2)
- 17 Tonks, N.K., Diltz, C.D. and Fischer, E.H. (1988) Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* **263**, 6731–6737, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68703-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68703-4)
- 18 Brown-Shimer, S., Johnson, K.A., Lawrence, J.B., Johnson, C., Bruskin, A., Green, N.R. et al. (1990) Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 5148–5152, <https://doi.org/10.1073/pnas.87.13.5148>
- 19 Chernoff, J., Schievella, A.R., Jost, C.A., Erikson, R.L. and Neel, B.G. (1990) Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2735–2739, <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2735>
- 20 Barford, D., Flint, A.J. and Tonks, N.K. (1994) Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **263**, 1397–1404, <https://doi.org/10.1126/science.8128219>
- 21 Barford, D., Keller, J.C., Flint, A.J. and Tonks, N.K. (1994) Purification and crystallization of the catalytic domain of human protein tyrosine phosphatase 1B expressed in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **239**, 726–730, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1409>
- 22 Yip, S.-C., Saha, S. and Chernoff, J. (2010) PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 442–449, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.004>

- 23 Forsell, P.A., Boie, Y., Montalibet, J., Collins, S. and Kennedy, B.P. (2000) Genomic characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B genes. *Gene* **260**, 145–153, [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00464-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00464-9)
- 24 Tanner, M.M., Tirkkonen, M., Kallioniemi, A., Isola, J., Kuukasjärvi, T., Collins, C. et al. (1996) Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res.* **56**, 3441–3445
- 25 Frangioni, J.V., Beahm, P.H., Shifrin, V., Jost, C.A. and Neel, B.G. (1992) The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* **68**, 545–560, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90190-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90190-N)
- 26 Woodford-Thomas, T., Rhodes, J. and Dixon, J. (1992) Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* **117**, 401–414, <https://doi.org/10.1083/jcb.117.2.401>
- 27 Mertins, P., Eberl, H.C., Renkawitz, J., Olsen, J.V., Tremblay, M.L., Mann, M. et al. (2008) Investigation of protein-tyrosine phosphatase 1B function by quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 1763–1777, <https://doi.org/10.1074/mcp.M800196-MCP200>
- 28 Arachiche, A., Augereau, O., Decossas, M., Pertuiset, C., Gontier, E., Letellier, T. et al. (2008) Localization of PTP-1B, SHP-2, and Src exclusively in rat brain mitochondria and functional consequences. *J. Biol. Chem.* **283**, 24406–24411, <https://doi.org/10.1074/jbc.M709217200>
- 29 Yip, S.-C., Cotteret, S. and Chernoff, J. (2012) Sumoylated protein tyrosine phosphatase 1B localizes to the inner nuclear membrane and regulates the tyrosine phosphorylation of emerin. *J. Cell Sci.* **125**, 310–316, <https://doi.org/10.1242/jcs.086256>
- 30 Liu, F., Hill, D.E. and Chernoff, J. (1996) Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130(Cas). *J. Biol. Chem.* **271**, 31290–31295, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31290>
- 31 Liang, F., Lee, S.-Y., Liang, J., Lawrence, D.S. and Zhang, Z.-Y. (2005) The role of protein-tyrosine phosphatase 1B in integrin signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 24857–24863, <https://doi.org/10.1074/jbc.M502780200>
- 32 Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Tonks, N.K. and Barford, D. (2000) Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol. Cell* **6**, 1401–1412, [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00137-4)
- 33 Myers, M.P., Andersen, J.N., Cheng, A., Tremblay, M.L., Horvath, C.M., Parisien, J.P. et al. (2001) TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* **276**, 47771–47774, <https://doi.org/10.1074/jbc.C100583200>
- 34 Fukada, T. and Tonks, N.K. (2001) The reciprocal role of Egr-1 and Sp family proteins in regulation of the PTP1B promoter in response to the p210 Bcr-Abl oncoprotein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 25512–25519, <https://doi.org/10.1074/jbc.M101354200>
- 35 Fukada, T. and Tonks, N.K. (2003) Identification of YB-1 as a regulator of PTP1B expression: implications for regulation of insulin and cytokine signaling. *EMBO J.* **22**, 479–493, <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg067>
- 36 Zabolotny, J.M., Bence-Hanulec, K.K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y. et al. (2002) PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell* **2**, 489–495, [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00148-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00148-X)
- 37 Lessard, L., Labbé, D.P., Deblois, G., Bégin, L.R., Hardy, S., Mes-Masson, A.-M. et al. (2012) PTP1B is an androgen receptor-regulated phosphatase that promotes the progression of prostate cancer. *Cancer Res.* **72**, 1529–1537, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2602>
- 38 Sun, F., Yu, M., Yu, J., Liu, Z., Zhou, X., Liu, Y. et al. (2018) miR-338-3p functions as a tumor suppressor in gastric cancer by targeting PTP1B. *Cell Death Dis.* **9**, 522, <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0611-0>
- 39 Yu, M., Liu, Z., Liu, Y., Zhou, X., Sun, F., Liu, Y. et al. (2019) PTP1B markedly promotes breast cancer progression and is regulated by miR-193a-3p. *FEBS J.* **286**, 1136–1153, <https://doi.org/10.1111/febs.14724>
- 40 Wang, S., Cheng, Z., Chen, X. and Xue, H. (2019) microRNA-135a protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by targeting protein tyrosine phosphatase 1B. *J. Cell. Biochem.* **120**, 10421–10433, <https://doi.org/10.1002/jcb.28327>
- 41 Yang, Q., Zhang, L., Zhong, Y., Lai, L. and Li, X. (2019) miR-206 inhibits cell proliferation, invasion, and migration by down-regulating PTP1B in hepatocellular carcinoma. *Biosci. Rep.* **39**, BSR20181823, <https://doi.org/10.1042/BSR20181823>
- 42 Xu, J., Zhang, Z., Chen, Q., Yang, L. and Yin, J. (2020) miR-146b regulates cell proliferation and apoptosis in gastric cancer by targeting PTP1B. *Dig. Dis. Sci.* **65**, 457–463, <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05771-8>
- 43 Han, Q., Cheng, P., Yang, H., Liang, H. and Lin, F. (2019) miR-146b Reverses epithelial-mesenchymal transition via targeting PTP1B in cisplatin-resistance human lung adenocarcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* **121**, 3901–3912, <https://doi.org/10.1002/jcb.29554>
- 44 Tonks, N.K. (2003) PTP1B: from the sidelines to the front lines!. *FEBS Lett.* **546**, 140–148, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00603-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00603-3)
- 45 Lee, S.R., Kwon, K.S., Kim, S.R. and Rhee, S.G. (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 15366–15372, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15366>
- 46 Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Meng, T.-C., Hinks, J.A., Tonks, N.K. et al. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **423**, 769–773, <https://doi.org/10.1038/nature01680>
- 47 van Montfort, R.L.M., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R. and Jhoti, H. (2003) Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* **423**, 773–777, <https://doi.org/10.1038/nature01681>
- 48 Chen, Y.-Y., Huang, Y.-F., Khoo, K.-H. and Meng, T.-C. (2007) Mass spectrometry-based analyses for identifying and characterizing S-nitrosylation of protein tyrosine phosphatases. *Methods* **42**, 243–249, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.03.002>
- 49 Chen, Y.-Y., Chu, H.-M., Pan, K.-T., Teng, C.-H., Wang, D.-L., Wang, A.H.-J. et al. (2008) Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation. *J. Biol. Chem.* **283**, 35265–35272, <https://doi.org/10.1074/jbc.M805287200>
- 50 Dadke, S., Cotteret, S., Yip, S.-C., Jaffer, Z.M., Haj, F., Ivanov, A. et al. (2007) Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nat. Cell Biol.* **9**, 80–85, <https://doi.org/10.1038/ncb1522>
- 51 Bandyopadhyay, D., Kusari, A., Kenner, K.A., Liu, F., Chernoff, J., Gustafson, T.A. et al. (1997) Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin. *J. Biol. Chem.* **272**, 1639–1645, <https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1639>
- 52 Dadke, S., Kusari, A. and Kusari, J. (2001) Phosphorylation and activation of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B by insulin receptor. *Mol. Cell. Biochem.* **221**, 147–154, <https://doi.org/10.1023/A:1010909031310>














- 53 Flint, A.J., Gebbink, M.F., Franza, B.R., Hill, D.E. and Tonks, N.K. (1993) Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation. *EMBO J.* **12**, 1937–1946, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05843.x>
- 54 Ravichandran, L.V., Chen, H., Li, Y. and Quon, M.J. (2001) Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol. Endocrinol.* **15**, 1768–1780, <https://doi.org/10.1210/mend.15.10.0711>
- 55 Frangioni, J.V., Oda, A., Smith, M., Salzman, E.W. and Neel, B.G. (1993) Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J.* **12**, 4843–4856, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06174.x>
- 56 Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L. et al. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544–1548, <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1544>
- 57 Delibegovic, M., Zimmer, D., Kauffman, C., Rak, K., Hong, E.-G., Cho, Y.-R. et al. (2009) Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* **58**, 590–599, <https://doi.org/10.2337/db08-0913>
- 58 Bence, K.K., Delibegovic, M., Xue, B., Gorgun, C.Z., Hotamisligil, G.S., Neel, B.G. et al. (2006) Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med.* **12**, 917–924, <https://doi.org/10.1038/nm1435>
- 59 González-Rodríguez, A., Mas Gutierrez, J.A., Sanz-González, S., Ros, M., Burks, D.J. and Valverde, A.M. (2010) Inhibition of PTP1B restores IRS1-mediated hepatic insulin signaling in IRS2-deficient mice. *Diabetes* **59**, 588–599, <https://doi.org/10.2337/db09-0796>
- 60 Cheng, A., Uetani, N., Simoncic, P.D., Chaubey, V.P., Lee-Loy, A., McGlade, C.J. et al. (2002) Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev. Cell* **2**, 497–503, [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00149-1)
- 61 Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G. and Schwartz, M.W. (1998) Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* **1**, 271–272, <https://doi.org/10.1038/1082>
- 62 Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J. and Baskin, D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661–671, <https://doi.org/10.1038/35007534>
- 63 Banno, R., Zimmer, D., De Jonghe, B.C., Atienza, M., Rak, K., Yang, W. et al. (2010) PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 720–734, <https://doi.org/10.1172/JCI39620>
- 64 Sarkar, P. and Thirumurugan, K. (2021) New insights into TNF α /PTP1B and PPAR γ pathway through RNF213- a link between inflammation, obesity, insulin resistance, and Moyamoya disease. *Gene* **771**, 145340, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145340>
- 65 Xu, H., An, H., Hou, J., Han, C., Wang, P., Yu, Y. et al. (2008) Phosphatase PTP1B negatively regulates MyD88- and TRIF-dependent proinflammatory cytokine and type I interferon production in TLR-triggered macrophages. *Mol. Immunol.* **45**, 3545–3552, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.05.006>
- 66 Zabolotny, J.M., Kim, Y.-B., Welsh, L.A., Kershaw, E.E., Neel, B.G. and Kahn, B.B. (2008) Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J. Biol. Chem.* **283**, 14230–14241, <https://doi.org/10.1074/jbc.M800061200>
- 67 Verma, S. and Sharma, S. (2018) Protein tyrosine phosphatase as potential therapeutic target in various disorders. *Curr. Mol. Pharmacol.* **11**, 191–202, <https://doi.org/10.2174/1874467211666180226161846>
- 68 Pike, K.A. and Tremblay, M.L. (2016) TC-PTP and PTP1B: regulating JAK-STAT signaling, controlling lymphoid malignancies. *Cytokine* **82**, 52–57, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.12.025>
- 69 LaMontagne, K.R., Hannon, G. and Tonks, N.K. (1998) Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl-induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14094–14099, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14094>
- 70 Bentires-Alj, M. and Neel, B.G. (2007) Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer Res.* **67**, 2420–2424, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4610>
- 71 Julien, S.G., Dubé, N., Read, M., Penney, J., Paquet, M., Han, Y. et al. (2007) Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat. Genet.* **39**, 338–346, <https://doi.org/10.1038/ng1963>
- 72 Kashige, N., Carpino, N. and Kobayashi, R. (2000) Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 2093–2098, <https://doi.org/10.1073/pnas.040547997>
- 73 Dubé, N., Cheng, A. and Tremblay, M.L. (2004) The role of protein tyrosine phosphatase 1B in Ras signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 1834–1839, <https://doi.org/10.1073/pnas.0304242101>
- 74 Arias-Romero, L.E., Saha, S., Villamar-Cruz, O., Yip, S.-C., Ethier, S.P., Zhang, Z.-Y. et al. (2009) Activation of Src by protein tyrosine phosphatase 1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells. *Cancer Res.* **69**, 4582–4588, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4001>
- 75 Liu, H., Wu, Y., Zhu, S., Liang, W., Wang, Z., Wang, Y. et al. (2015) PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **359**, 218–225, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.020>
- 76 Mei, W., Wang, K., Huang, J. and Zheng, X. (2016) Cell transformation by PTP1B truncated mutants found in human colon and thyroid tumors. *PLoS ONE* **11**, e0166538, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166538>
- 77 Xu, Q., Wu, N., Li, X., Guo, C., Li, C., Jiang, B. et al. (2019) Inhibition of PTP1B blocks pancreatic cancer progression by targeting the PKM2/AMPK/mTOC1 pathway. *Cell Death Dis.* **10**, 874, <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2073-4>
- 78 Warabi, M., Nemoto, T., Ohashi, K., Kitagawa, M. and Hirokawa, K. (2000) Expression of protein tyrosine phosphatases and its significance in esophageal cancer. *Exp. Mol. Pathol.* **68**, 187–195, <https://doi.org/10.1006/exmp.2000.2303>
- 79 Dubé, N., Bourdeau, A., Heinonen, K.M., Cheng, A., Loy, A.L. and Tremblay, M.L. (2005) Genetic ablation of protein tyrosine phosphatase 1B accelerates lymphomagenesis of p53-null mice through the regulation of B-cell development. *Cancer Res.* **65**, 10088–10095, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1353>

- 80 Martínez-Meza, S., Díaz, J., Sandoval-Bórquez, A., Valenzuela-Valderrama, M., Díaz-Valdivia, N., Rojas-Celis, V. et al. (2019) AT2 receptor mediated activation of the tyrosine phosphatase PTP1B blocks Caveolin-1 enhanced migration, invasion and metastasis of cancer cells. *Cancers* **11**, 1299, <https://doi.org/10.3390/cancers11091299>
- 81 Bartolomé, R.A., Martín-Regalado, Á., Jaén, M., Zannikou, M., Zhang, P., de los Ríos, V. et al. (2020) Protein tyrosine phosphatase-1B inhibition disrupts IL13R α 2-promoted invasion and metastasis in cancer cells. *Cancers* **12**, 500, <https://doi.org/10.3390/cancers12020500>
- 82 Wang, Q., Pan, Y., Zhao, L., Qi, F. and Liu, J. (2021) Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) promotes melanoma cells progression through Src activation. *Bioengineered* **12**, 8396–8406, <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1988376>
- 83 Popov, D. (2011) Novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: interaction requirements for improved intracellular efficacy in type 2 diabetes mellitus and obesity control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 377–381, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.009>
- 84 Zhang, S. and Zhang, Z.-Y. (2007) PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discov. Today* **12**, 373–381, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.03.011>
- 85 Lantz, K.A., Hart, S.G.E., Planey, S.L., Roitman, M.F., Ruiz-White, I.A., Wolfe, H.R. et al. (2010) Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring)* **18**, 1516–1523, <https://doi.org/10.1038/oby.2009.444>
- 86 Qin, Z., Pandey, N.R., Zhou, X., Stewart, C.A., Hari, A., Huang, H. et al. (2015) Functional properties of Claramine: a novel PTP1B inhibitor and insulin-mimetic compound. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458**, 21–27, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.040>
- 87 Krishnan, N., Konidaris, K.F., Gasser, G. and Tonks, N.K. (2018) A potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of the protein-tyrosine phosphatase PTP1B improves insulin and leptin signaling in animal models. *J. Biol. Chem.* **293**, 1517–1525, <https://doi.org/10.1074/jbc.C117.819110>
- 88 Liu, Z.Q., Liu, T., Chen, C., Li, M.Y., Wang, Z.Y., Chen, R.S. et al. (2015) Fumosorinone, a novel PTP1B inhibitor, activates insulin signaling in insulin-resistance HepG2 cells and shows anti-diabetic effect in diabetic KKAY mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **285**, 61–70, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.03.011>
- 89 Paudel, P., Yu, T., Seong, S.H., Kuk, E.B., Jung, H.A. and Choi, J.S. (2018) Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition and glucose uptake potentials of Mulberrofuran G, Albandol B, and Kuwanon G from root bark of *Morus alba* L. in insulin-resistant HepG2 Cells: an in vitro and in silico study. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1542, <https://doi.org/10.3390/ijms19051542>
- 90 Méndez-García, L.A., Trejo-Millán, F., Martínez-Reyes, C.P., Manjarrez-Reyna, A.N., Esquivel-Velázquez, M., Melendez-Mier, G. et al. (2018) Infliximab ameliorates tumor necrosis factor- α induced insulin resistance by attenuating PTP1B activation in 3T3L1 adipocytes in vitro. *Scand. J. Immunol.* **88**, e12716, <https://doi.org/10.1111/sji.12716>
- 91 Kim, D.H., Paudel, P., Yu, T., Ngo, T.M., Kim, J.A., Jung, H.A. et al. (2017) Characterization of the inhibitory activity of natural tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* roots on protein tyrosine phosphatase 1B. *Chem. Biol. Interact.* **278**, 65–73, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.013>
- 92 Morishita, K., Shoji, Y., Tanaka, S., Fukui, M., Ito, Y., Kitao, T. et al. (2017) Novel non-carboxylate benzoylsulfonamide-based protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors with non-competitive actions. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **65**, 1144–1160, <https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00635>
- 93 Ramírez-Espinosa, J.J., Rios, M.Y., Paoli, P., Flores-Morales, V., Camici, G., de la Rosa-Lugo, V. et al. (2014) Synthesis of oleanolic acid derivatives: In vitro, in vivo and in silico studies for PTP-1B inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* **87**, 316–327, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.036>
- 94 Wiese, J., Aldemir, H., Schmaljohann, R., Gulder, T.A.M. and Imhoff, J.F. (2017) Asperentin B, a new inhibitor of the protein tyrosine phosphatase 1B. *Mar. Drugs* **15**, 191, <https://doi.org/10.3390/md15060191>
- 95 Ahn, J.H., Cho, S.Y., Ha, J.D., Chu, S.Y., Jung, S.H., Jung, Y.S. et al. (2002) Synthesis and PTP1B inhibition of 1,2-naphthoquinone derivatives as potent anti-diabetic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 1941–1946, [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00331-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00331-1)
- 96 Swarbrick, M.M., Havel, P.J., Levin, A.A., Bremer, A.A., Stanhope, K.L., Butler, M. et al. (2009) Inhibition of protein tyrosine phosphatase-1B with antisense oligonucleotides improves insulin sensitivity and increases adiponectin concentrations in monkeys. *Endocrinology* **150**, 1670–1679, <https://doi.org/10.1210/en.2008-0885>
- 97 Geary, R.S., Bradley, J.D., Watanabe, T., Kwon, Y., Wedel, M., van Lier, J.J. et al. (2006) Lack of pharmacokinetic interaction for ISIS 113715, a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting protein tyrosine phosphatase 1B messenger RNA, with oral antidiabetic compounds metformin, glipizide or rosiglitazone. *Clin. Pharmacokinet.* **45**, 789–801, <https://doi.org/10.2165/00003088-200645080-00003>
- 98 Gao, H.X., Regier, E.E. and Close, K.L. (2016) Diabetes News: Diabetes News. *J. Diabetes* **8**, 177–182, <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12352>

RESEARCH ARTICLE



A PTP1B-Cdk3 Signaling Axis Promotes Cell Cycle Progression of Human Glioblastoma Cells through an Rb-E2F Dependent Pathway

 Olga Villamar-Cruz,^{a,b}  Marco Antonio Loza-Mejía,^c  Alonso Vivar-Sierra,^c  Héctor Iván Saldivar-Cerón,^d
 Genaro Patiño-López,^e  Jonadab Efraín Olguín,^{a,f}  Luis Ignacio Terrazas,^{a,f}  Leonel Armas-López,^a
 Federico Ávila-Moreno,^{a,g}  Sayanti Saha,^h  Jonathan Chernoff,^h  Ignacio Camacho-Arroyo,^b  Luis Enrique Arias-Romero^a

^aUnidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED), Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM Tlalnepantla, Estado de México, Mexico

^bUnidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

^cDesign, Isolation, and Synthesis of Bioactive Molecules Research Group, Chemical Sciences School, Universidad La Salle-México, Mexico City, Mexico

^dCarrera de Médico Cirujano, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, Mexico

^eLaboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de Mexico Federico Gómez, Mexico City, Mexico

^fLaboratorio Nacional en Salud FES-Iztacala, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM Tlalnepantla, Estado de México, Mexico

^gUnidad de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

^hCancer Signaling and Microenvironment Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA

ABSTRACT PTP1B plays a key role in developing different types of cancer. However, the molecular mechanism underlying this effect is unclear. To identify molecular targets of PTP1B that mediate its role in tumorigenesis, we undertook a SILAC-based phosphoproteomic approach, which allowed us to identify Cdk3 as a novel PTP1B substrate. Substrate trapping experiments and docking studies revealed stable interactions between the PTP1B catalytic domain and Cdk3. In addition, we observed that PTP1B dephosphorylates Cdk3 at tyrosine residue 15 *in vitro* and interacts with it in human glioblastoma cells. Next, we found that pharmacological inhibition of PTP1B or its depletion with siRNA leads to cell cycle arrest with diminished activity of Cdk3, hypophosphorylation of Rb, and the downregulation of E2F target genes Cdk1, Cyclin A, and Cyclin E1. Finally, we observed that the expression of a constitutively active Cdk3 mutant bypasses the requirement of PTP1B for cell cycle progression and expression of E2F target genes. These data delineate a novel signaling pathway from PTP1B to Cdk3 required for efficient cell cycle progression in an Rb-E2F dependent manner in human GB cells.

KEYWORDS Protein tyrosine phosphatase 1B, cell cycle, Cdk3, cancer, glioblastoma

INTRODUCTION

Glioblastomas (GB) or grade IV gliomas are the most common and aggressive malignant primary tumors in the central nervous system (CNS), with an incidence rate of 3.23 per 100,000 persons and a median age of 64 years.¹ GB patients have an overall survival rate of 15 months, even when receiving the standard therapy consisting of the maximum bearable surgical removal followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide.² Therefore, it is necessary to understand better the molecular mechanisms underlying GB initiation and progression; and identify novel prognostic molecular markers to provide new therapeutic strategies. Recent studies on GB biology have revealed multiple alterations in pro-survival and anti-apoptotic signaling pathways. These include the Ras/RAF/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR, and Src/Fak networks.^{3–6}

© 2023 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

Address correspondence to Jonathan Chernoff, Jonathan.Chernoff@fcc.edu; Ignacio Camacho-Arroyo, camachoarroyo@gmail.com; Luis Enrique Arias-Romero, larias@unam.mx.

Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/10985549.2023.2273193>.

Received 17 June 2023
Revised 24 August 2023
Accepted 11 September 2023

PTP1B is a classical nontransmembrane protein tyrosine phosphatase that plays a key role in metabolic signaling and is a promising drug target for type 2 diabetes and obesity.^{7–9} Recent evidence indicates that PTP1B is overexpressed in different types of cancer. However, the role of PTP1B in GB development remains unclear.¹⁰ For instance, it has been reported that PTP1B might be involved in the progression of different types of tumors by dephosphorylating and activating numerous oncogenic substrates. Moreover, several groups have recently shown that PTP1B dephosphorylates the inhibitory Y529 site in Src, thereby activating this kinase.^{11–13} Another PTP1B substrate, p62^{Dok}, might be involved in the positive effects of PTP1B on tumorigenesis. When p62^{DOK} is phosphorylated, it forms a complex with p120^{RasGAP} leading to decreased Ras/RAF/MEK/ERK activity.^{14,15}

In contrast, when PTP1B dephosphorylates p62^{Dok}, it can no longer bind to p120^{RasGAP} with the consequent hyperactivation of Ras/RAF/MEK/ERK signaling, promoting cell proliferation and tumor growth. However, tissue samples from PTP1B-deficient breast cancer mouse models gave inconsistent results regarding the tyrosine phosphorylation status of p62^{Dok}.^{16,17} For all the reasons above, it is essential to identify novel targets of PTP1B that could account for its protumorigenic effects.

We identified novel molecular targets of PTP1B that could mediate its promoting role in cancer using a SILAC-based strategy. This proteomic approach allowed us to identify more than 200 potential novel targets of PTP1B. This work focused on the cyclin-dependent kinase 3 (Cdk3), a protein involved in G0/G1 reentry and into G1/S transition in mammalian cells through the specific phosphorylation of Rb, which promotes its dissociation of the transcription factor E2F and activates the transcription of E2F responsive genes.^{18,19} Different research groups have demonstrated that CDC25 phosphatases activate Cdks through dephosphorylation of the Thr14 and Tyr15 residues in their ATP binding loop.^{20,21} However, the identity of the CDC25 family member responsible for the activation of Cdk3 remains unknown. Our results from the phosphoproteomics experiment point to the possibility that Cdk3 might be activated by PTP1B in a CDC25-independent manner. To test this hypothesis, we first performed local docking and molecular dynamics studies that revealed stable interactions between the PTP1B catalytic domain and Cdk3. In addition, *in vitro* phosphatase assays confirmed that a phosphopeptide corresponding to the residues 9–21 of Cdk3 is dephosphorylated by PTP1B at Tyr15. Next, we observed that a substrate trapping mutant of PTP1B co-immunoprecipitates with Cdk3 in HEK293 cells, that endogenous PTP1B and Cdk3 also co-immunoprecipitate in human GB cell lines, and that PTP1B interacts with Cdk3 in the nucleus and cytoplasm of human GB cells by using a proximity ligation assay. In addition, we found that the pharmacological inhibition of PTP1B with the allosteric inhibitors claramine and trodusquemine,²² or its depletion with siRNAs leads to cell cycle arrest with the diminished activity of Cdk3 and its downstream effectors Rb and E2F. Finally, we observed that the expression of a constitutively active Cdk3 mutant in GB cells bypasses the requirement of PTP1B for cell cycle progression and expression of E2F target genes. These data delineate a novel signaling pathway from PTP1B to Cdk3 required for efficient cell cycle progression in an Rb-E2F-dependent manner in human GB cells.

RESULTS

Loss of PTP1B leads to increased phosphorylation of proteins involved in cell proliferation. PTP1B occupies a central position in oncogenic signaling. In the last decade, several substrates of this phosphatase have been validated.^{23–25} However, additional substrates that mediate the oncogenic effects of PTP1B in different types of cancer remain to be determined. In order to identify potential PTP1B substrates that might explain its promoting role in tumorigenesis, we used a quantitative proteomics approach based on high-resolution LC-MS upon differential labeling of wild-type and KO fibroblasts²⁶ with SILAC media (Fig. 1A and B). This phosphoproteomic approach allowed the identification of more than 200 potential direct or indirect targets of PTP1B with diverse cellular functions, including cell signaling, cell cycle progression

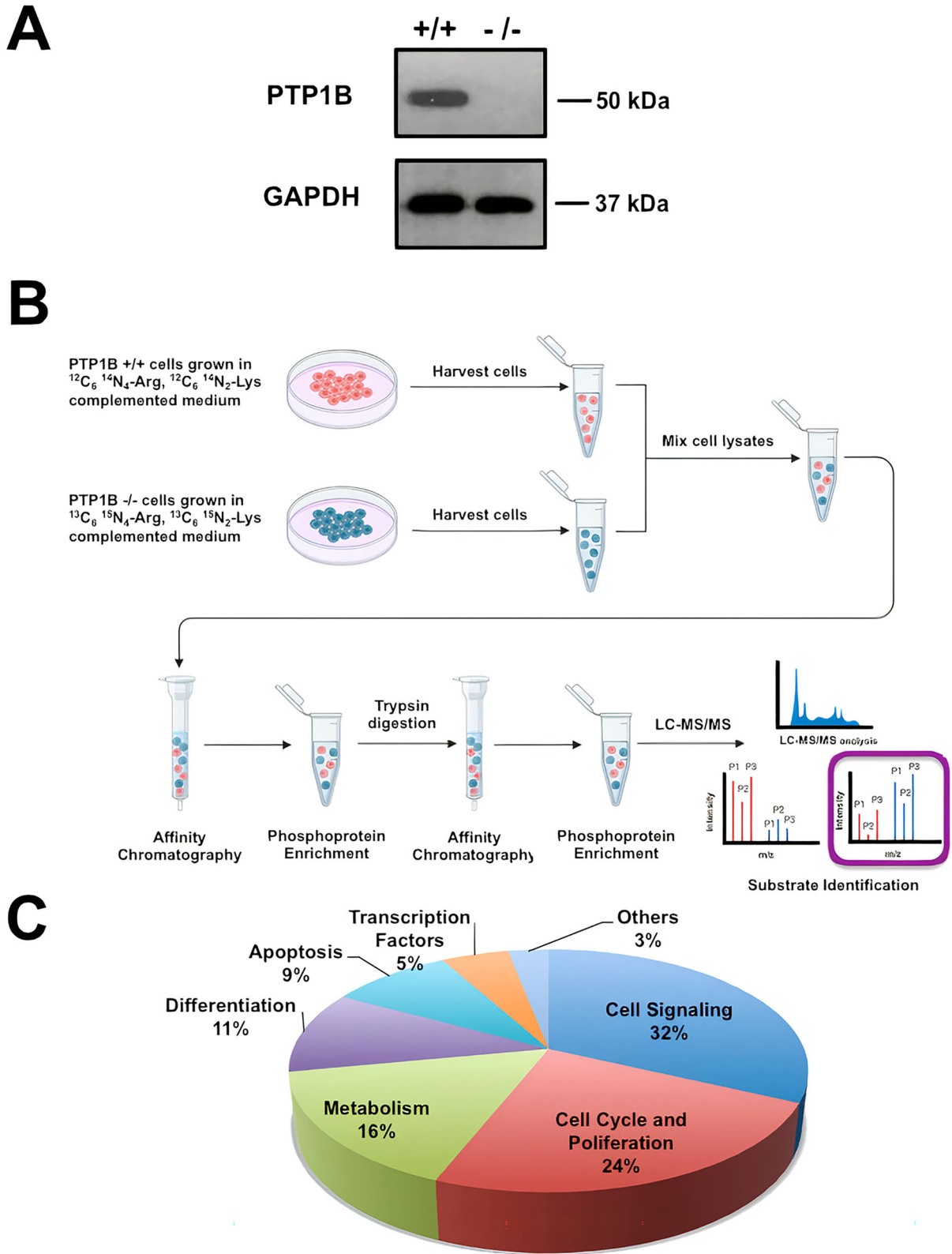


FIG 1 Schematic illustration of the SILAC-based quantitative phosphoproteomic approach. (A) Representative Western blot of *Ptp1b* +/+ and *Ptp1b* -/- cells. (B) *Ptp1b* +/+ and *Ptp1b* -/- cells were cultured in “light” (red) or “heavy” (blue) medium and stimulated with EGF for 15 min. After lysis, the samples were mixed and incubated with antiphosphotyrosine antibodies for enrichment of tyrosine-phosphorylated proteins. Then, the phosphoprotein fraction was digested with trypsin, and phosphopeptides were enriched again with TiO₂ beads. Phosphopeptides were analyzed by LC-MS/MS. (C) Proteins identified in this assay were classified according to their cellular function.

and proliferation, metabolism, differentiation, apoptosis, and transcription (Fig. 1C and Supplemental Tables S1 and S2). Among the proteins predicted to be PTP1B enzymatic targets, we focused on those known to be involved in tumorigenesis (Table 1). In particular, we decided to investigate further Cdk3, a protein involved in G0/G1 reentry and into G1/S transition in mammalian cells that recently has been linked to the development of breast, colon, and esophageal cancer.^{19,27,28}

The cyclin-dependent kinase 3 (Cdk3) is a novel substrate of PTP1B. In order to determine if PTP1B dephosphorylates Cdk3 we performed peptide-protein docking experiments followed by molecular dynamics simulations. First, PEPstrMOD online platform²⁹ was used to predict the structure of the sequence of the Cdk3 peptide (KIGEGTpYGVVYKA), where the underlined residue corresponds to phosphoTyr15. Next, we generated the interaction model by docking in the ClusPro online server,^{30,31} using the crystal structure of PTP1B catalytic domain (PDB ID: 2HNP).³² The image of the predicted complex shows that the phosphorylated Tyr15 of Cdk3 is in close proximity to the catalytic residue Cys215 located in the phosphatase domain of PTP1B, with a predicted distance of 3.4 Å, being within the distance range for the transition state of the dephosphorylation reaction (Supplementary Fig. 1A and B). Motivated by these results, we decided to perform protein-protein molecular docking studies with the complete structures of PTP1B and Cdk3. Since Cdk3 crystallographic structure has not been reported, its full structure was generated by homology modeling using Cdk2, (PDB ID: 1B38)³³ as a template due to the high identity between these two enzymes. Our results indicated that the ligand-binding energy for the complex was -1723.932 kcal/mol, and the catalytic residues Cys215 and Arg221 on PTP1B's phosphatase domain were in close proximity to the phosphorous atom of Cdk3 phospho-Tyr15, with an estimated minimal distance of 4.21 Å (Table 2 and Fig. 2A and B). In the proposed model, some basic residues such as Asp38 and Glu12 of Cdk3 interact with Arg 221, a critical residue of the catalytic site of PTP1B. This interaction seems to bring closer pTyr15 to the catalytic residue Cys 215 in PTP1B (Supplementary Fig. 1C). Similar values were obtained for a protein-protein docking model of PTP1B in complex with the IR β and DOK1, two well-characterized substrates of this phosphatase; and with the ephrin receptor EphA, one of the novel potential PTP1B substrates identified in our SILAC assay (ligand binding energies of -1677.228 kcal/mol, -1616.39 kcal/mol and -1304.71 kcal/mol, respectively, minimal distance from the catalytic residues on PTP1B's phosphatase domain to the phosphorous atom of IR β phospho-Tyr1146,

TABLE 1 Identification of cell cycle related substrates of PTP1B

Protein Name	pY Site	Sequence	PTM Score	KO/wt Ratio	P values	FDR
EGFR	Tyr1172	LDNPDYQQDFF	83.7	1.09	0.0258	0.0486
EphA	Tyr772	DPEATYTTSGGKI	148.55	1.52	0.0116	0.0462
p38	Tyr182	DEMTGYVATRL	114.49	1.6	0.0118	0.0451
CTNND	Tyr904	LDNNYSTPNER	127.75	2.02	0.0018	0.0033
Cdk3	Tyr15	KIGEGTYGVVYKA	83.47	1.98	0.0046	0.0128

Significance testing was carried out using Student's *t* test on log 2 transformed ratios and controlled with a Benjamini-Hochberg FDR threshold of 0.05. Peptides quantified in three or more experimental repeats were deemed significantly changed and regulated by PTP1B if they had a *P* value of < 0.05 and a ratio of > 1.5 (at least a 1.5-fold change in abundance).

TABLE 2 Minimal distance from the catalytic residues on PTP1B's phosphatase domain to the phosphorous atom of its substrates

Model	Initial distance Cys215-pTyr (Å)	Minimum distance Cys215-pTyr after MD simulation (Å)	Ligand Binding Energy (kcal/mol)
PTP1B—Cdk3	6.93	4.21	-1723.93
PTP1B—IR β	5.41	4.18	-1677.23
PTP1B—DOK1	4.56	4.18	-1616.39
PTP1B—EphA	4.46	4.45	-1304.71

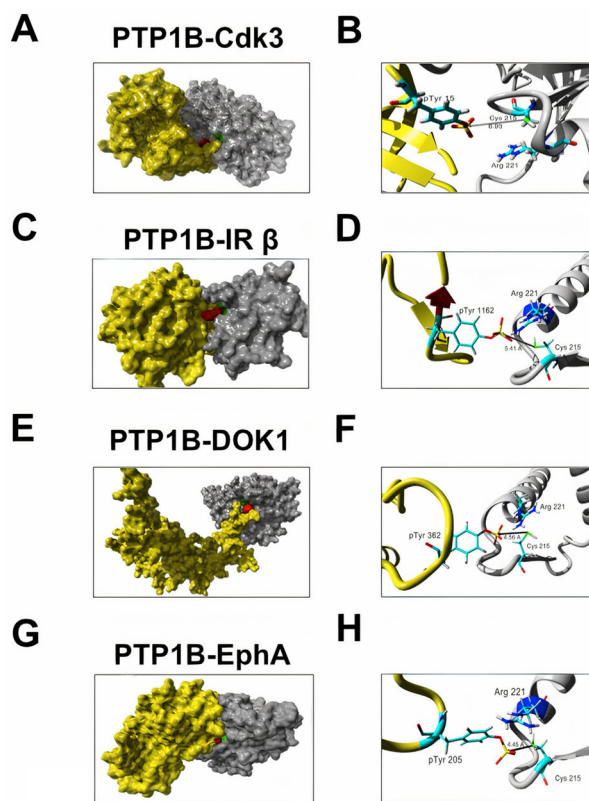


FIG 2 Predicted structure of PTP1B in complex with some of the putative substrates identified by SILAC-based phosphoproteomics. (A) Visualization of the complex of Cdk3 (yellow) and the catalytic domain of PTP1B (grey). The catalytic residue Cys215 of PTP1B and pTyr15 of Cdk are indicated in green and red, respectively. (B) Closer view of the PTP1B-Cdk3 interaction. The distance between pTyr15 of Cdk3 and Cys215 of PTP1B is indicated. (C) Visualization of the complex of IR β (yellow) and PTP1B (grey). The catalytic residue Cys215 indicated in green is close to IR β pTyr1146 indicated in red. (D) Closer view of the PTP1B-IR β interaction. The distance between Cdk3 pTyr1146 and PTP1B Cys215 is indicated. (E) Visualization of the complex of DOK1 (yellow) and PTP1B (grey). The catalytic residue Cys215 indicated in green is close to DOK1 pTyr362 indicated in red. (F) Closer view of the PTP1B-DOK1 interaction. The distance between DOK1 pTyr362 and PTP1B Cys215 is indicated. (G) Visualization of the complex of EphA (yellow) and PTP1B (grey). The catalytic residue Cys215 indicated in green is close to EphA pTyr205 indicated in red. (H) Closer view of the PTP1B-EphA interaction. The distance between EphA pTyr205 and PTP1B Cys215 is indicated.

4.18 Å, to the phosphorous atom of DOK1 phospho-Tyr362, 4.18 Å, and to the phosphorous atom of EphA phospho-Tyr772, 4.45 Å, respectively. Fig. 2C to G and Table 2). These results suggest that Cdk3 should be a suitable substrate for PTP1B. In addition, the plot of the RMSD variations indicates that the complexes predicted by molecular docking have a stable conformation during the simulation. The analysis of the variations in the distance between PTP1B and Cdk3 showed that it is lower than 2.5 Å, suggesting that PTP1B forms a stable complex with Cdk3 and theoretically can dephosphorylate it (Supplementary Fig. 1D).

Next, we explored if Cdk3 is a PTP1B substrate using an in vitro phosphatase assay. To this end, purified PTP1B was incubated with a phosphopeptide corresponding to residues 9–21 of Cdk3 or a phosphopeptide derived from the IR β as a positive control. We observed that PTP1B dephosphorylated both peptides with the same efficiency, suggesting that Cdk3 is a substrate of PTP1B (Fig. 3A).

PTP1B interacts with Cdk3 in a cellular context. Since PTP1B dephosphorylates a Cdk3 derived peptide in vitro, we confirmed by immunoblot whether PTP1B $-/-$ MEFs display increased Cdk3 phosphorylation. Given the fact that most inbred strains of mice lack a functional Cdk3 protein because of the presence of a premature termination codon in the *cdk3* gene,³⁴ we observed the expression of a C-terminal truncated kinase. However, this enzyme still possess the Cdk regulatory residues Thr14 and Tyr15 in their ATP binding loop, and displays an estimated molecular weight of 20 kDa (Fig. 3B). Next, we confirmed whether both proteins interact in a cellular context. To

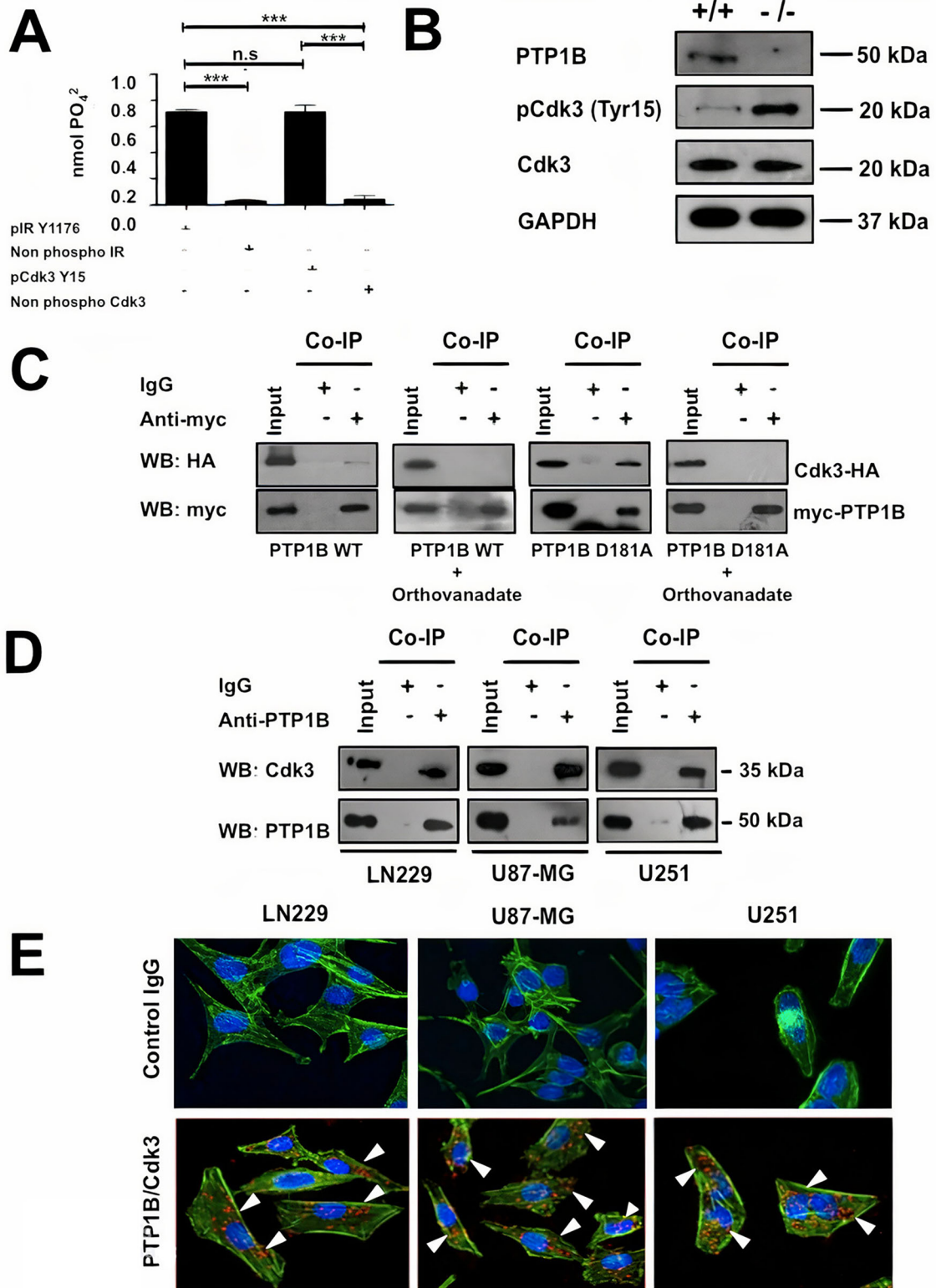


FIG 3 PTP1B dephosphorylates a Cdk3 derived peptide in vitro and both proteins interact in GB cells. (A) The in vitro activity of PTP1B against a phosphopeptide corresponding to residues 9-21 of Cdk3 (KIGEGT_pYGVVYKA) was determined by using a malachite-green based assay. An IR β phosphopeptide (TRDl_pYETDYRK) was used as positive control and the nonphosphorylated peptides of Cdk3 and IR β were used as negative controls. Each assay was independently repeated with four replicates and the nmol of phosphate released were calculated. Data are presented as means ± SE. (B). Assessment of Cdk3 activity in *Ptp1b* +/+ and *Ptp1b* -/- MEFs. Cell lysates were subjected to Western blot with anti-PTP1B, anti-Cdk3 or anti-phospho Cdk3 antibodies. GAPDH was used as loading control. (C) Co-immunoprecipitation of ectopically expressed wild-type or trapping mutant PTP1B and Cdk3.

(Continued on next page)

this end, we examined the physical association between an ectopically expressed wild-type PTP1B or substrate-trapping mutant PTP1B D181A and a HA tagged Cdk3 in HEK293 cells by co-immunoprecipitation, our results showed a stable interaction between PTP1B D181A and Cdk3. As expected, treatment with orthovanadate, a general PTP inhibitor that covalently modifies the nucleophilic Cys, disrupted complex formation between PTP1B-D181A and Cdk3 (Fig. 3C). Peptide-protein docking experiments followed by molecular dynamics simulations showed that the substrate-trapping mutant PTP1B-Cdk3 complex is very similar to the wild-type PTP1B-Cdk3 model. However, the pTyr15 residue of Cdk3 remains in close proximity to the catalytic Cys215 of PTP1B D181A (Supplemental Fig. 1E). In addition, endogenous PTP1B and Cdk3 complexes were also co-immunoprecipitated from human LN229, U87-MG and U251 GB cell lines (Fig. 3D). We then examined the interaction of endogenous PTP1B and Cdk3 in LN229, U87-MG, and U251 GB cells by proximity ligation assays using the corresponding two primary antibodies raised in different species. Then, the cells were incubated with species-specific secondary antibodies attached to a unique DNA strand (PLA probes). If the PLA probes are located less than 40 nm apart in the cell, the DNA strands can interact, forming a circle that can be amplified by DNA polymerase. Hybridization with complementary fluorescent oligonucleotide probes allows the visualization of PTP1B-Cdk3 interactions as fluorescent red dots. The results revealed multiple loci of interactions between endogenous PTP1B and Cdk3 in the cytoplasm and nucleus in LN229, U87-MG, and U251 cells. The highest number of PTP1B and Cdk3 interactions was observed in LN229 and U251 cells. The number of PTP1B-Cdk3 interaction events in U-87 MG cells was 30% and 35% lower ($P < 0.05$) than in LN229 and U251 cells, respectively. Mouse and rabbit IgGs were used as negative controls (Fig. 3E).

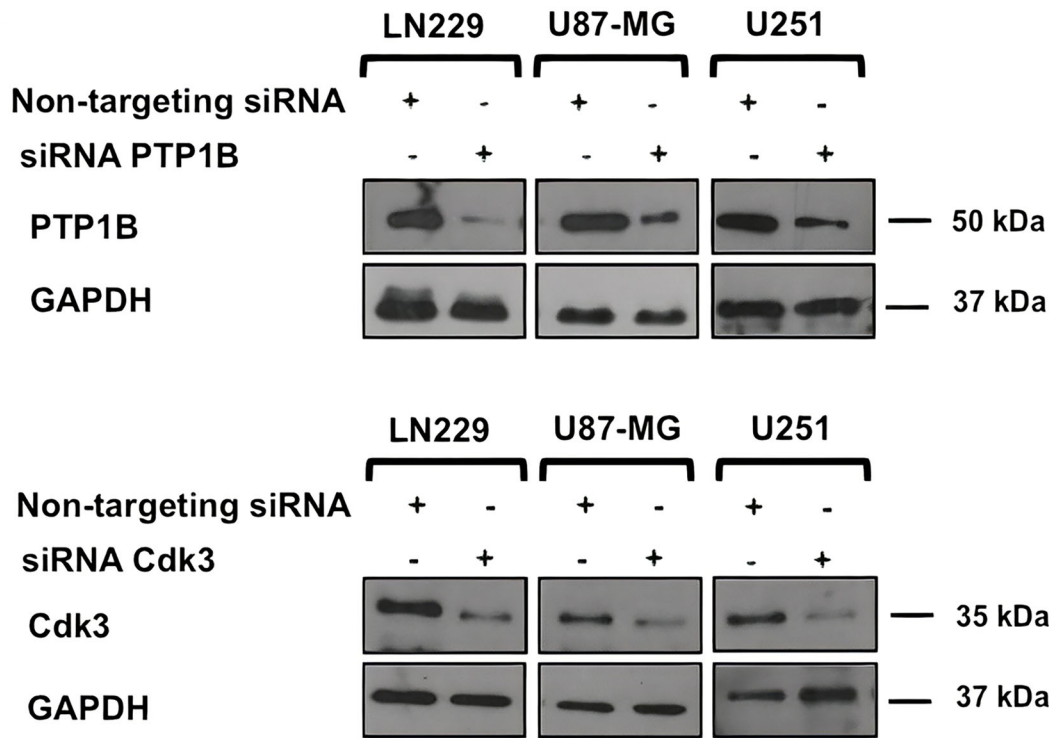
Altogether, our results suggest that Cdk3 is a novel substrate of PTP1B and that both proteins physically interact in a cellular context.

Inhibition of PTP1B induces G1/S arrest and impairs Cdk3 activity in human glioblastoma cells. Since Cdk3 is involved in G0/G1 reentry and into G1/S transition in mammalian cells,^{18,19} we hypothesized that PTP1B inhibition might lead to a decrease in Cdk3 activity with the consequent reduced cell proliferation and/or cell cycle arrest. To test this idea, LN229, U87-MG, and U251 cells were first transfected with siRNAs targeting PTP1B or Cdk3, 48 h posttransfection the cells were lysed and analyzed by western blot, where we observed the specific loss of the intended target (Fig. 4A). Next, we tested the effect of PTP1B pharmacological inhibition or depletion in cell proliferation. Our results showed that LN229, U-87 MG and U251 cells treated with 2 μ M of the allosteric PTP1B inhibitors claramine or trodusquemine had a significant reduction in cell proliferation compared with vehicle treated cells. Moreover, PTP1B and Cdk3 depleted cells displayed a more dramatic reduction in cell proliferation compared with nontargeting siRNAs transfected cells (Fig. 4B). In addition, the effect of both PTP1B inhibitors in the proliferation of wild-type and PTP1B deficient MEFs was also assessed. Our results showed a significant reduction in the proliferation of wild-type fibroblast, but no effect in the proliferative activity of the PTP1B deficient fibroblast (Fig. 4C). To further understand the biological relevance of PTP1B-Cdk3 interaction, we analyzed the effect of PTP1B pharmacological inhibition on Cdk3 activity and cell cycle progression. First, LN229, U-87 MG, and U-251 cells were synchronized by serum deprivation for

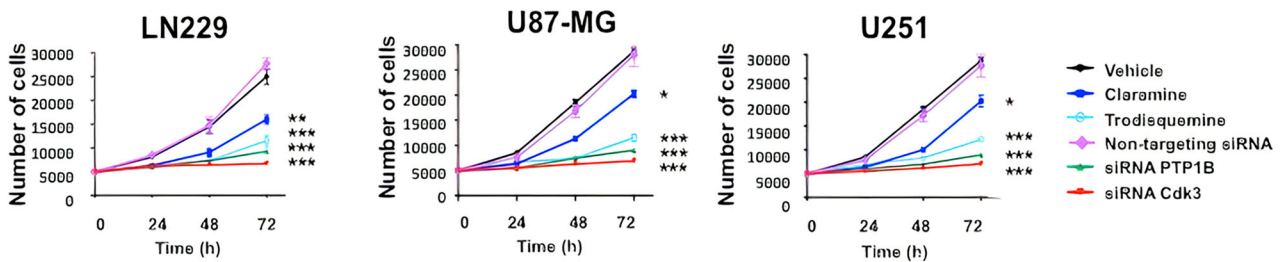
FIG 3 Legend (Continued)

Cell lysates of transfected cells incubated with or without 1 mM of sodium orthovanadate were subjected to immunoprecipitation with anti-myc or isotype control IgG antibodies and the presence of Cdk3 in the complex was assessed with anti-HA antibodies. The presence of PTP1B and Cdk3 in cell extracts prior to immunoprecipitation was verified using specific antibodies (input). (D) Co-immunoprecipitation of endogenous PTP1B and Cdk3. LN229, U87-MG and U251 cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-PTP1B or isotype control IgG antibodies and the presence of Cdk3 in the complex was assessed with anti-Cdk3 antibodies. The presence of PTP1B and Cdk3 in cell extracts prior to immunoprecipitation was verified using specific antibodies (input). (E) The physical interaction between endogenously expressed PTP1B and Cdk3 in LN229, U87-MG and U251 GB cells was determined using proximity ligation assays. The figure shows representative confocal microscopy images in which PTP1B-Cdk3 interactions appear as individual fluorescent red dots (lower panels). Anti-mouse and anti-rabbit isotype IgG antibodies were used as negative controls (upper panels).

A



B



C

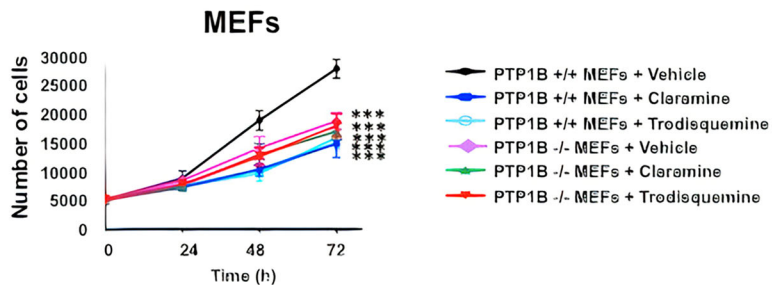


FIG 4 PTP1B and Cdk3 depletion impairs cell proliferation. (A) GB cells were transfected with siRNAs targeting PTP1B or Cdk3, and the expression of both proteins was assessed by immunoblot. GAPDH was used as loading control. (B) GB cells were synchronized at G0 by serum deprivation and incubated 3 h with vehicle, claramine 2 μ M, trodesquimine 2 μ M, or transfected with nontargeting siRNAs or siRNAs targeting PTP1B or Cdk3. Cells were counted every 24 h. Proliferation of LN229, U87-MG and U251 cells is represented as mean \pm SE of three independent experiments. (C) *Ptp1b* +/+ and *Ptp1b* -/- MEFs were synchronized at G0 by serum deprivation and incubated 3 h with vehicle, claramine 2 μ M, trodesquimine 2 μ M. Cells were counted every 24 h. Proliferation of *Ptp1b* +/+ and *Ptp1b* -/- MEFs is represented as mean \pm SE of three independent experiments.

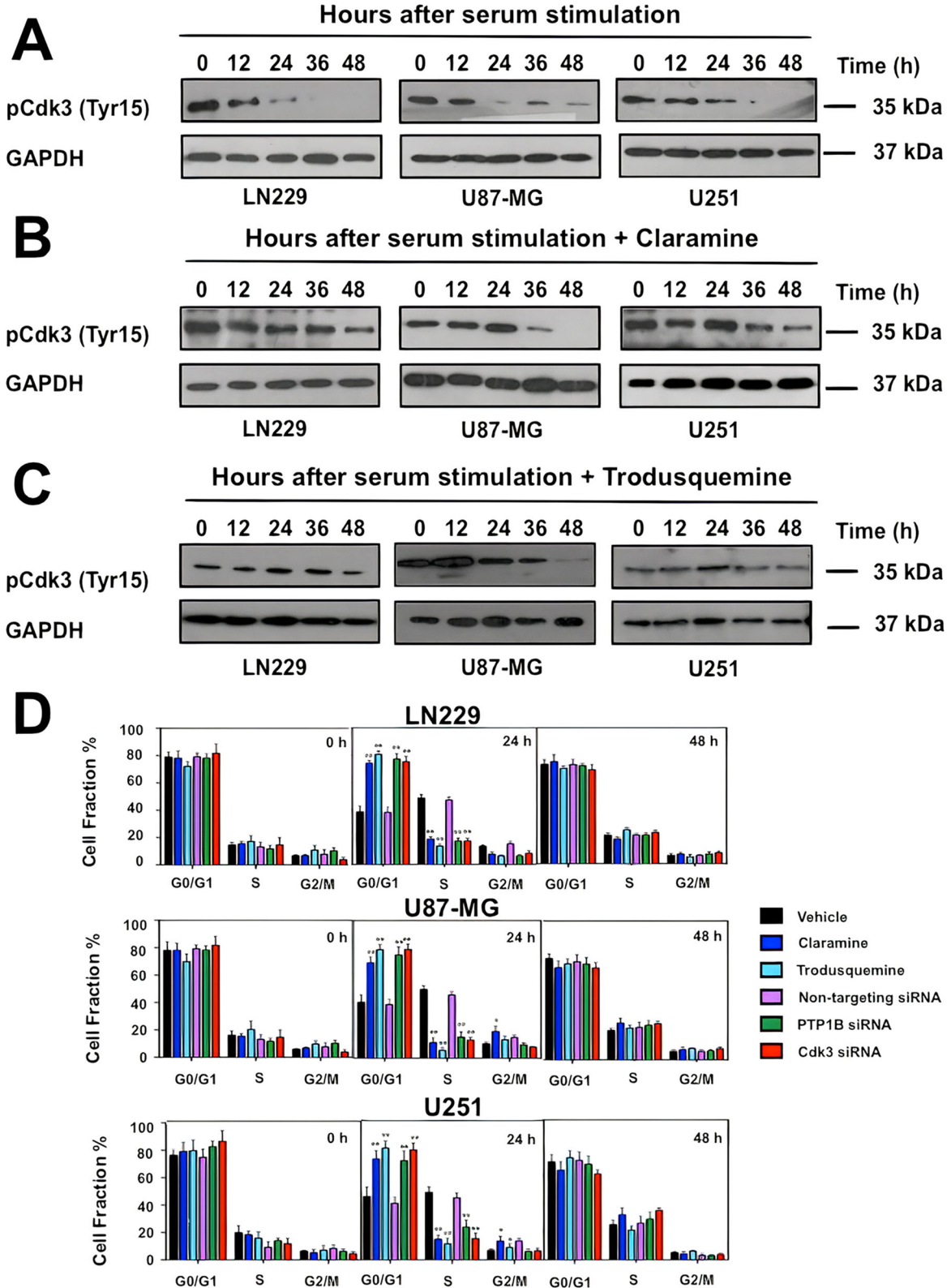
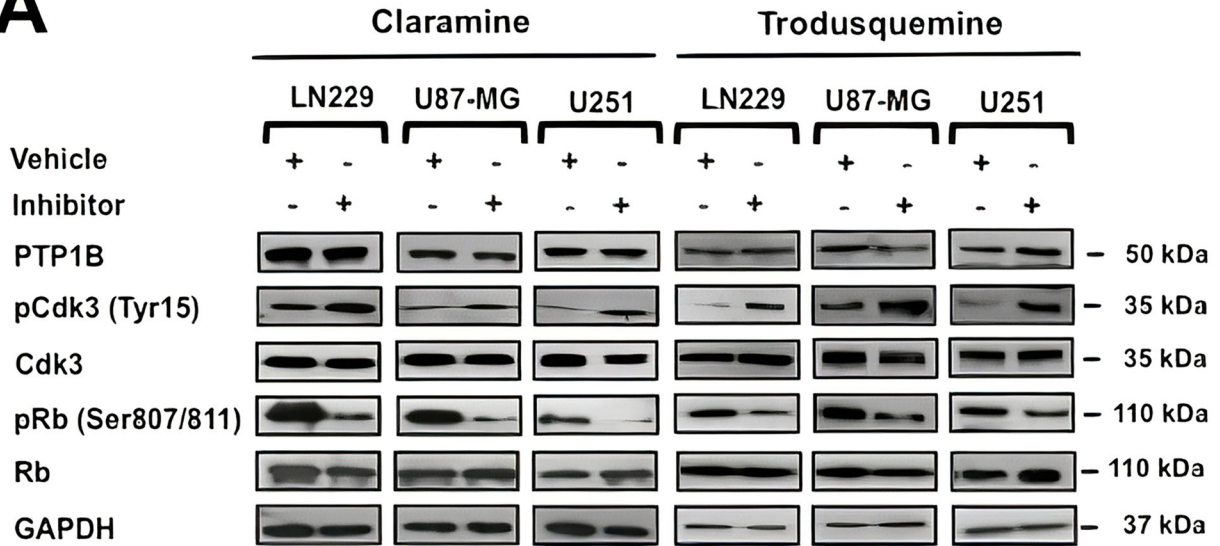
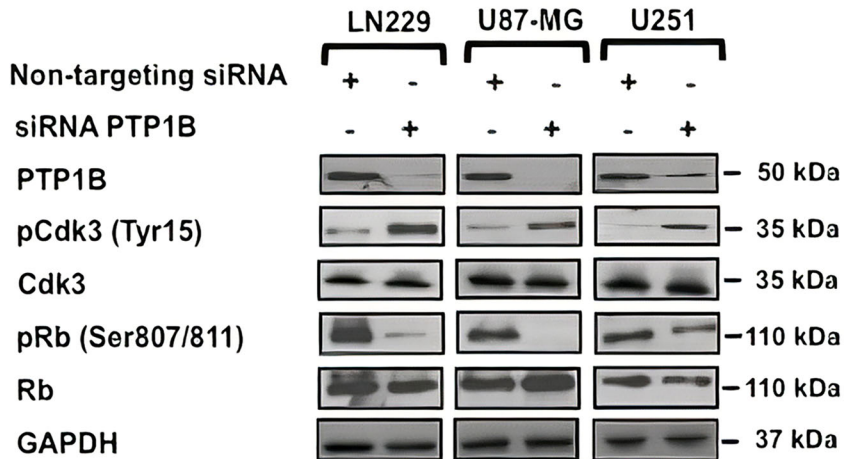


FIG 5 PTP1B reduced activity impairs Cdk3 activation and induces cell cycle arrest in human GB cells. GB cells were synchronized at G0 by serum deprivation for 48 h and incubated 3 h with vehicle (A), claramine 2 μ M (B), or trodusquemine 2 μ M. Cell cycle arrest was released by the addition of 10% FBS and cells were collected at the indicated times. The activity of Cdk3 was assessed by immunoblot. GAPDH was used as loading control. (D) GB cells were synchronized at G0 and incubated 3 h with vehicle, claramine 2 μ M or trodusquemine 2 μ M as previously mentioned, or transfected with nontargeting siRNAs or siRNAs targeting PTP1B or Cdk3. Cell cycle arrest was released by the addition of 10% FBS, cells were fixed at indicated time points and stained with propidium iodide. Quantification of the percentage of cells at each phase is represented. Statistical differences between control and experimental groups of cells are indicated (* $P < 0.05$). Data are representative of three independent experiments.

A



B



C

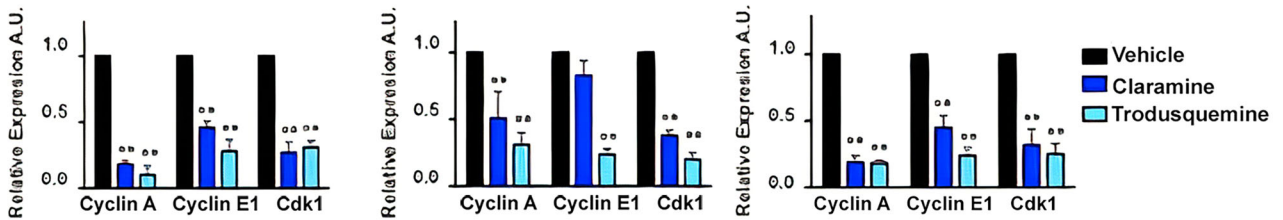


FIG 6 PTP1B reduced activity negatively affects Cdk3/Rb/E2F signaling in human GB cells. (A) The activities of Cdk3 and Rb in GB cells treated with vehicle, claramine 2 μM or trodusquemine 2 μM were assessed by immunoblot using total and phospho-specific antibodies. (B) The activities of Cdk3 and Rb in GB cells transfected with siRNAs targeting PTP1B were assessed by immunoblot using total and phospho-specific antibodies. (C) The expression levels of the E2F target genes: Cdk1, Cyclin A, and Cyclin E1 were assessed by RT-qPCR. All data were normalized to control GAPDH. Fold changes were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Data are representative of three independent experiments.

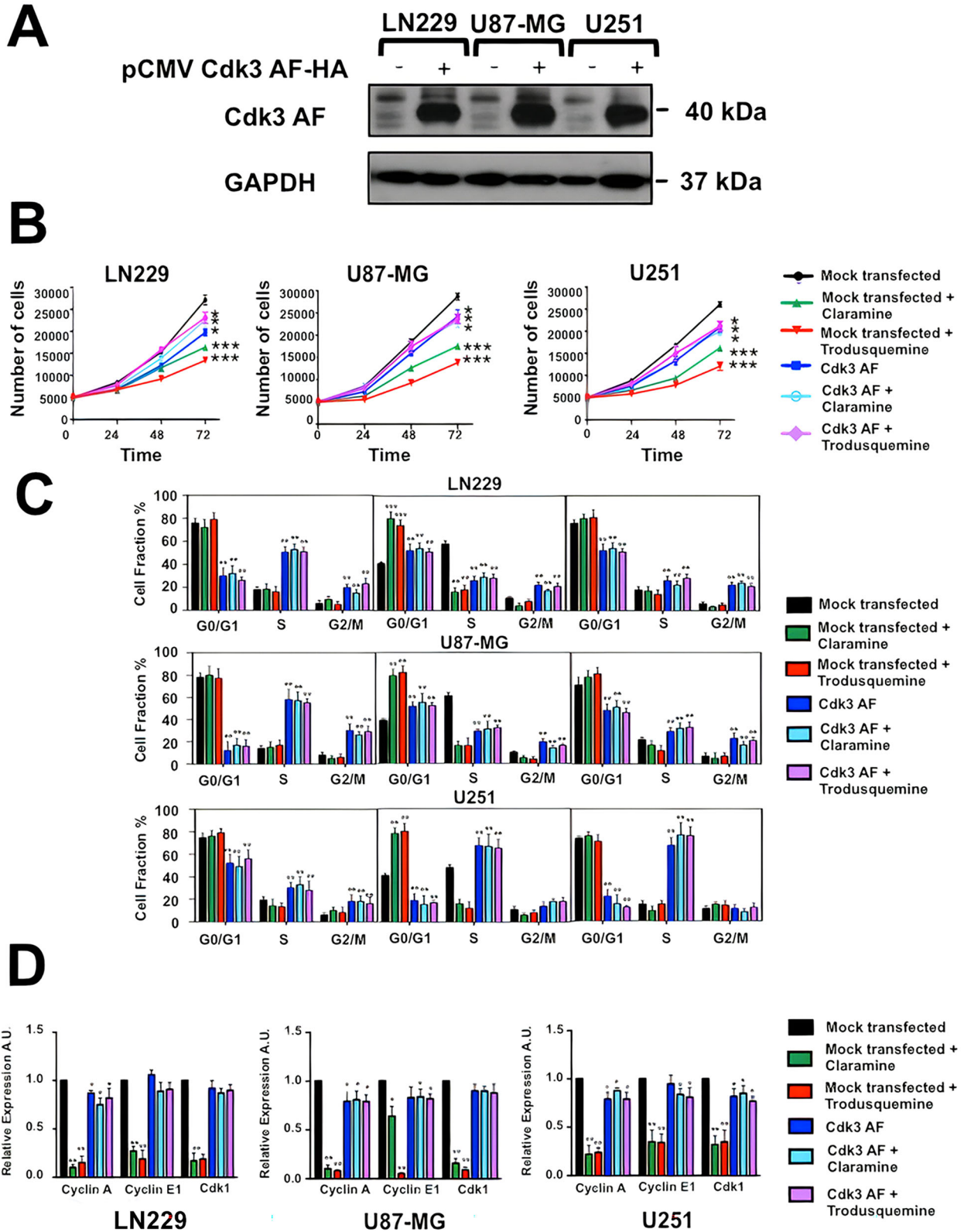


FIG 7 Activated Cdk3 bypasses requirement for PTP1B for proliferation and cell cycle progression. (A) GB cells were transfected with a plasmid encoding a constitutively active Cdk3 mutant. The presence of Cdk3 AF in cell extracts was verified by Western blot using anti-HA antibodies. (B) GB cells were mock transfected or transfected with a plasmid encoding a constitutively active Cdk3 mutant and incubated 3 h with vehicle, claramine 2 μ M or trodusquemine 2 μ M. Cells were counted every 24 h. Proliferation of LN229, U87-MG and U251 cells is represented as mean \pm SE of three independent experiments. (C) GB cells were mock transfected or transfected with a plasmid encoding a constitutively active Cdk3 mutant, synchronized at G0 and incubated 3 h with vehicle, claramine 2 μ M or trodusquemine 2 μ M as previously described. Cell cycle arrest was released by the addition of 10% FBS, cells were fixed at (Continued on next page)

48 h. Then, the cells were treated with vehicle or 2 μ M of claramine or trodusquemine during 3 h and the cell cycle arrest was released by the addition of serum. The cells were lysed at the indicated time points and the activity of Cdk3 was assessed by Western blot. Our results indicated that 12 h after serum stimulation Cdk3 is active in vehicle treated cells, whereas it remains on its inactive phosphorylated form in claramine and trodusquemine treated cells, suggesting that PTP1B inhibition impairs Cdk3 activation (Fig. 5A to C).

Next, we studied the effect of PTP1B inhibition or depletion in cell cycle progression. To this end, LN229, U87-MG, and U251 cells were synchronized by serum deprivation for 48 h, incubated with vehicle, 2 μ M of claramine or trodusquemine, or transfected with nontargeting siRNAs or with siRNAs targeting PTP1B or Cdk3. The cell cycle arrest was released by the addition of serum and the cells were collected every 12 h. Our results indicated that human GB cells treated with claramine or trodusquemine presented a marked arrest in G0/G1 phase compared to vehicle-treated cells. This effect was also observed in PTP1B and Cdk3 depleted cells, suggesting that PTP1B and Cdk3 are essential regulators of cell cycle progression in human GB cells (Fig. 5D).

We next proved the effect of PTP1B inhibition on the activation of Cdk3 and its downstream effectors in human GB cells. LN229, U87-MG, and U251 cells were serum-starved during 48 h, incubated for 3 h in the presence of vehicle, claramine or trodusquemine, and stimulated with 10% of FBS. Cells were collected and the phosphorylation levels of Cdk3 and Rb were analyzed by Western blot. Our results indicate that PTP1B inhibition prevented the activation of Cdk3 with the consequent hypophosphorylation of its downstream target Rb (Fig. 6A). Similarly, PTP1B knock down with siRNAs had a similar effect on Cdk3 and Rb phosphorylation levels (Fig. 6B). Considering that the phosphorylation of Rb is crucial to E2F transcription factor activity, we analyzed the expression levels of some E2F target genes necessary for G1/S transition by RT-qPCR. Since Cdk3 pTyr15 levels were significantly decreased at 24 h after cell cycle release in all the vehicle treated GB cell lines but not in claramine or trodusquemine treated cells (Fig. 5A to C), we selected this time point for measuring the expression of Cyclin A, Cyclin E1 and Cdk1. We observed that PTP1B inhibition with either claramine or trodusquemine repressed the expression of Cyclin A, Cyclin E1, and Cdk1 in all GB cell lines (Fig. 6C), suggesting that PTP1B regulates cell cycle progression through the activation of Cdk3-Rb signaling. In order to confirm this idea, we asked if constitutively activated Cdk3 bypasses the requirement for PTP1B in cell cycle progression. Since in HeLa cells, the expression of a Cdk1 Thr14Ala/Tyr15Phe mutant (Cdk1 AF), allows S phase arrested cells enter into G2/M,³⁵ we created a HA-tagged Cdk3 expression vector containing the same mutations by site-directed mutagenesis. LN229, U-87MG and U251 cells were transfected with the Cdk3 AF plasmid, and the expression of mutant Cdk3 was assessed by Western blot using an anti-HA antibody (Fig. 7A). These cells displayed a partial rescue in cell proliferation and serum starvation did not induce cell cycle arrest. The differences observed in the percentage of cells in G0/G1, S and G2/M in the different cell lines might be the result of expressing a constitutively active Cdk3 mutant. Therefore, the expression levels of E2F target genes are higher in Cdk3 AF expressing cells, even in the presence of claramine or trodusquemine (Fig. 7B to D). In contrast, mock transfected cells treated with claramine or trodusquemine displayed reduced levels of cyclin A, cyclin E1 and Cdk1. Together, our results suggest that PTP1B regulates G1/S transition and promotes the expression of E2F

FIG 7 Legend (Continued)

indicated time points and stained with propidium iodide. Quantification of the percentage of cells at each phase is represented in the bar graphics. Statistical differences between control and experimental groups of cells are indicated (* $P < 0.05$). Data are representative of three independent experiments. (D) GB cells were mock transfected or transfected with a plasmid encoding a constitutively active Cdk3 mutant, synchronized at G0 and incubated 3 h with vehicle, claramine 2 μ M or trodusquemine 2 μ M as previously mentioned. Cell cycle arrest was released by the addition of 10% FBS. The expression levels of the E2F target genes: Cdk1, cyclin A, and cyclin E1 were assessed by RT-qPCR. All data were normalized to control GAPDH. Fold changes were calculated using the Δ Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Data are representative of three independent experiments.

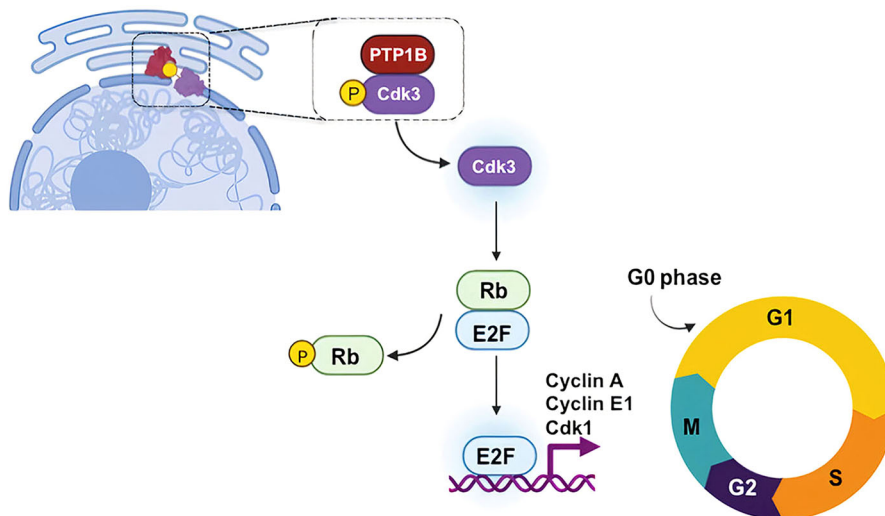


Figure 8 Proposed model for PTP1B regulation of cell cycle. PTP1B dephosphorylates and activates Cdk3, which in turn phosphorylates Rb, favoring its dissociation from E2F and promoting the expression of genes needed for the progression to S phase.

downstream targets through the activation of Cdk3-Rb signaling, supporting the view that PTP1B is crucial for cell cycle regulation in GB (Fig. 8).

DISCUSSION

Recent evidence suggests that PTP plays an essential role in the development and progression of different types of cancer.^{10,36,37} For example, *Ptpn1* gene is commonly amplified in breast, colon, prostate and gastric cancer.^{38–41} In addition, recent reports indicate that PTP1B overexpression is associated with poor prognosis in several solid tumors, with a high PTP1B expression linked to poor outcome, including shortened progression-free and overall survival.^{41–44} However, the molecular mechanisms that explain the contribution of PTP1B and its downstream targets to carcinogenesis are not entirely understood. For example, it is well documented that PTP1B dephosphorylates and activates some oncogenic substrates, such as Src,^{11–13} and p62^{Dok}, leading to increased Ras/RAF/MEK/ERK activity.^{14,15} Previous reports have also shown that PTP1B inhibition is associated with the induction of G0/G1 cell cycle arrest in pancreatic cancer cells,^{44–46} and that PTP1B inhibition induces a G2 cell cycle arrest in renal cell carcinoma, pancreatic and hepatic cancer cells.^{47,48} Accordingly, several cell cycle regulators of the G1/S transition, such as Cdk2, Cdk4 and Cyclin D1, were downregulated in PTP1B depleted cells. Interestingly, the molecular mechanism by which PTP1B regulates cell cycle progression in these cellular models has not been explored.

In this work, we identified some novel substrates of PTP1B that could explain its role in cell cycle progression by using a SILAC-based phosphoproteomic approach. Our results indicate that Cdk3 is a new PTP1B target in GB cells. This conclusion is supported by our docking and molecular dynamics simulations, the ability of PTP1B to dephosphorylate in vitro a Cdk3 derived phosphopeptide, and to interact with it in the cytoplasm and nuclei of different human GB cell lines. In addition, the pharmacological inhibition or knockdown with siRNAs of PTP1B promoted a G0/G1 cell cycle arrest in vitro in the four human GB cell lines used in this study. Previous reports have shown that Cdk3 activity fluctuates from the G0 to S phase and reaches its peak in the mid G1 phase, driving Rb phosphorylation at Ser807/811, and modulating the transcriptional activity of E2F.¹⁸ Moreover, Cdk3 regulates the activity of several transcription factors such as c-Jun, ATF-1 and NFAT3 among others.^{49–52} In that regard, the observed anti-proliferative effect, the G0/G1 cell cycle arrest, and the consequent downregulation of some cell cycle regulators needed for the G1/S transition after PTP1B inhibition was not totally unexpected. These findings are compatible with recent experiments in

which loss of PTP1B induced a G0/G1 cell cycle arrest in some types of cancer.^{44–46} Conversely, another report indicates that during mitotic arrest in chronic myeloid leukemia cells, PTP1B is phosphorylated by Cdk1 and Plk1, increasing its catalytic activity and inducing mitotic catastrophe, suggesting that in this model, PTP1B acts as a tumor-suppressor.⁵³ However, our results show for the first time that PTP1B regulates cell cycle progression through the activation of a Cdk, and acts as an oncogene in human GB cells.

Moreover, our results showed that PTP1B inhibition or depletion downregulates the expression of some E2F genes required for G1/S transition, indicating that in our model, cell cycle progression may be regulated in part by a PTP1B/Cdk3/Rb/E2F signaling pathway. Finally, we showed that activated Cdk3 bypasses the need for PTP1B in human GB cells. These results suggest that Cdk3 is a key target in mediating the oncogenic role of PTP1B in human GB cells. While no cell line faithfully recapitulates GB biology, the three cell lines used in this study share some of its cellular and molecular features, regardless of some important genetic differences among them. Our findings may serve as new therapeutic avenues for the treatment of GB. However, further *in vivo* studies are needed in order to demonstrate that PTP1B inhibition would be useful for the treatment of these tumors.

Finally, the activation mechanism of Cdk3 needs to be studied in more detail. For instance, there are no previous reports showing a CDC25-independent activation of other Cdks, and the identity of the CDC25 family member responsible for the activation of this Cdk remains unknown. Further studies are needed in order to determine if PTP1B and some CDC25 family member cooperatively or competitively regulate Cdk3 activation.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents. Antibodies used for Western blot or PLA included anti PTP1B (sc-133258) from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), HA-tag (#3724), myc-tag (#2276), Rb (#9309), phospho-Rb (Ser807/811) (#8516), and GAPDH (#5174) from Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA). Anti-Cdk3 (ab191503) and anti-phospho Cdk1/2/3 (Tyr15) (ab133463) from Abcam (Cambridge, MA, USA). Secondary antibodies conjugated to peroxidase (Goat anti-mouse cat #115-035-003 and Goat anti-rabbit cat #111-035-003) were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratory (West Grove, PA, USA). The allosteric PTP1B inhibitors claramine and trodusquemine (MSI-1436) were purchased from Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA) and MedChem Express (Princeton, NJ, USA), respectively.

DNA constructs and siRNAs. The pcDNA4.1 myc/His PTP1B wild-type and pcDNA4.1 myc/His PTP1B D181A plasmids were a gift from Dr Michel L. Tremblay (McGill University).⁵⁴ The pCMV Cdk3-HA plasmid was a gift from Dr Sander van den Heuvel (Utrecht University) (Addgene plasmid # 1881).⁵⁵ The pCMV Cdk3 AF-HA plasmid was generated using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The primer sequences for mutagenesis were Cdk3 AF Fwd: 5' aagatcgga-gagggcgccttgggggtggtgacaa 3' and Cdk3 AF Rev: 5' ttgtacaccaccacaaggcgcctctccgatctt 3'. siRNAs targeting human PTP1B (sc-36328) and Cdk3 (sc-37578) were obtained from Santa Cruz (Dallas, TX, USA).

Cell culture. *Ptp1b*^{-/-} and *Ptp1b*^{+/+} MEFs were a gift from Dr Benjamin Neel (New York University)²⁶; these cells were maintained in DMEM (Gibco BRL, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS, 50 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin. HEK293T, LN-229, U251, and U-87 MG cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), and maintained in DMEM (Gibco BRL, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS, 50 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin.

For SILAC experiments, *Ptp1b*^{-/-} and *Ptp1b*^{+/+} cells were grown in media containing ¹²C₆, ¹⁴N₄-Arg and ¹²C₆, ¹⁴N₂-Lys, or ¹³C₆, ¹⁵N₄-Arg and ¹³C₆, ¹⁵N₂-Lys (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) until the populations went through six passages. Then, cells were starved for 3 h prior to ligand stimulation with EGF (50 ng/mL, 10 min; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), and were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 0.1 µg/mL aprotinin, 10 mM NaF) for 20 min. Lysates were pre-cleared by centrifugation at 16,500 × *g* for 15 min. Protein amount determination was performed using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). In SILAC experiments, cell lysates were mixed 1:1 (double labeling).

Anti-phosphotyrosine immunoprecipitation. For immunoprecipitation, 200 µg of anti-phosphotyrosine 4G10 antibody (cat # ZMS16282, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were added together with 40 µL of protein A-Sepharose (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) to mixed cell lysates containing up to 20 mg of total labeled proteins and incubated at 4 °C for 4 h. Precipitates were washed four times with lysis buffer, and precipitated proteins were eluted twice with urea buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 50 mM HEPES, pH 7.5, 1% *n*-octyl glucoside) at 37 °C for 10 min.

In-solution protein digestion. After anti-phosphotyrosine immunoprecipitation, precipitated proteins were denatured in the urea buffer described above, and protein amount was measured using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were reduced by adding 2 mM DTT (final concentration) at 25 °C for 45 min, and thiols were carboxymethylated with 5.5 mM iodoacetamide at room temperature for 30 min. Endoproteinase Lys-C was added in an enzyme/substrate ratio of 1:100, and the proteins were digested at room temperature for 4 h. The resulting peptide mixtures were diluted with water to reach a final urea concentration below 2 M. For double digestion, modified trypsin (sequencing grade, Promega, Madison, WI, USA) was added in an enzyme/substrate ratio of 1:100, and the digest was incubated at room temperature overnight. Trypsin activity was quenched by adding TFA to a final concentration of 1%.

Titansphere enrichment of phosphopeptides. After trypsin digest, phosphopeptides were enriched using Titansphere chromatography (TiO₂) columns as previously described.^{56,57} Peptide samples were diluted 1:6 with 30 g/L 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) in 80% ACN, 0.1% TFA. 5 µg of TiO₂ beads (GL Sciences Inc., Torrance, CA, USA) were washed once with elution buffer (NH₃ water in 20% ACN, pH 10.5) and equilibrated with washing buffer (50% ACN, 0.1% TFA). TiO₂ beads were loaded with DHB by washing with loading buffer (6 g/L DHB in 15% ACN). Peptide samples were loaded onto TiO₂ beads for 30 min at room temperature on a rotating wheel. Subsequently, beads were washed three times with washing buffer, and bound phosphopeptides were eluted twice with 50 µL of elution buffer at room temperature for 10 min. The eluates were filtered through STAGE Tips in 200-µL pipette tips. 30 µL of 80% ACN, 0.5% acetic acid was applied to the STAGE Tips after filtering,⁵⁸ and the flow-through was combined with the filtered sample. The pH value of the sample was adjusted with TFA to a value of approximately pH 7, and the eluates were concentrated in a vacuum concentrator. Before MS analysis, 5% ACN and 0.1% TFA (final concentrations) were added to the samples.

LC-MS/MS analysis. Mass spectrometric analysis was performed by nanoscale LC-MS/MS using an LTQ-Orbitrap Velos instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) coupled to an Ultimate U3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) via a Proxeon nanoelectrospray source (Proxeon Biosystems, Denmark). Peptides were separated on a 75 µM PepMap C18 nano column.

Data were acquired in data-dependent mode: full scan spectra were acquired with a resolution of 60,000 after accumulation of 1,000,000 ions. The “lock mass” option was used to improve the mass accuracy of precursor ions. The ten most intense ions were fragmented by collision-induced dissociation (CID) with a normalized collision energy of 35% and recorded in the linear ion trap (target value of 5000) based on the survey scan and in parallel to the orbitrap detection of MS spectra. Peptide identification was performed using the MASCOT search engine. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE⁵⁹ partner repository with the dataset identifier PXD046000.

Model of the binding complex of PTP1B catalytic domain and Cdk3. To generate a model that could show the interaction of Cdk3 and its derived peptide (sequence: KIGEGTpYGVVYKA where the underlined pY corresponds to phospho-Tyr15), we decided to perform peptide-protein and protein-protein docking experiments followed by molecular dynamics simulations. First, PEPstrMOD online platform²⁹ was used to predict the structure of the sequence of Cdk3 phosphopeptide while Cdk3 full structure was generated using Cdk2 (PDB ID: 1B38)³³ as a template due to the high identity (76.43%) between these two enzymes with the homology modeling module implemented as part of Yasara Structure v.18.4.24. The resulting 3D model for Cdk3 was then used for protein-protein docking experiments. The catalytic domain of PTP1B was also downloaded from the PDB with the accession code (PDB ID: 2HNP).³²

ClusPro online server <https://cluspro.bu.edu/>^{31,60,61,62} was used for the docking experiments. ClusPro 2.0 generates conformations based on different desolvation and electrostatic potential; those conformations are categorized through clustering.

Molecular dynamics simulations were performed in duplicate using Yasara Structure v. 18.4.24^{63,64} using the AMBER 14 force field using a previously reported protocol.⁶⁵ Briefly, each complex was embedded within a TIP3 water box with 10 Å to the box boundary. Periodic boundary conditions were considered. The temperature was set to 298 K, pH to 7.4, with the addition of sodium and chlorine ions for charge neutralization. A Particle Mesh Ewald (PME) algorithm with a cut-off radius of 8 Å was applied. Steepest descent energy minimization was performed, and then a total simulation time of 100 ns with a time step of 2.5 fs was carried out, recording snapshots at intervals of 500 ps. The analysis of the resulting trajectories was performed with a script included as part of Yasara software and included the root mean square deviation (RMSD) and the distance of the catalytic Cys215 and Arg221 on PTP1B's phosphatase domain and the phosphorus atom on Cdk3 phospho-Tyr15.

For the models of IR β, DOK1 and EphA, the initial structures were retrieved from AlphaFold.⁶⁶ These structures were minimized using the same protocol in molecular dynamics as described before, for a total simulation time of 100 ns. Then, the complexes of PTP1B and these optimized structures were predicted using ClusPro under the same conditions as explained for the complexes with Cdk3.

In vitro phosphatase assay. According to the manufacturer's suggested protocol, the in vitro phosphatase assays were performed using the Protein Tyrosine Phosphatase 1B Assay Kit, Colorimetric (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). We designed a phosphopeptide for the PTP1B-dependent phosphosite on Cdk3 (pY15: KIGEGTpYGVVYKA). In addition, we included a known PTP1B substrate peptide derived from the IR β (pY1146: TRDIpYETDYRKY), as a positive control, and the nonphosphorylated peptides of Cdk3 and IR β as negative controls. These peptides were synthesized (95% purity, PROBIOTEK, San Nicolás de los Garza, NL, Mexico) and, prior to assays, and freshly diluted to 150 µM final concentration in 1 × Assay Buffer (150 mM NaCl, 50 mM MES, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.05% NP-40, pH 7.2). The

reactions were performed in triplicate in a 96-well plate at 30 °C, adding 75 μ M of each phosphopeptide and 2.5 ng of recombinant PTP1B for 30 min. The addition of malachite green solution terminated the reactions, and the absorbance was measured at 620 nm on an Epoch 2 microplate reader (Tekan, Winoosky, VT, USA).

Immunoblotting and co-immunoprecipitation. GB cells were lysed in RIPA buffer (20 nM Tris-HCl pH 7.4, 150 nM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1X protease inhibitor Cocktail and 1X PhosSTOP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Immunoblots on Immobilon-P membranes (Millipore, Burlington, MA, USA) were blocked in 5% nonfat dried milk in TBS-Tween-20 0.5% or 1% BSA, incubated with primary and secondary antibodies, and visualized using enhanced chemiluminescence reagents (ECL, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK).

For co-immunoprecipitation cells were lysed in the presence or absence of 1 mM of sodium orthovanadate for 30 min in PBSCM buffer (100 mM Na₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.2, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ and 5 μ M ATP), homogenized and centrifuged at 13,500 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatants were recovered, clarified and incubated with primary antibodies or mouse or rabbit IgG isotype control antibodies for 4 h at 4 °C, and incubated with Protein G Sepharose beads (GE Healthcare, Braunschweig, Germany). The immune complexes were washed three times with PBSCM buffer and the bound material was eluted using sample buffer for 5 min at 90 °C. The eluate was resolved on 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblot. All the antibodies were used at concentrations as recommended by the supplier.

Proximity ligation assay. According to the manufacturer's instructions, PLA experiments were performed using Duolink® kit (DUO92101, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A total of 4000 cells of each cell line were plated in 16 well chambers (178599, Nunc Lab-Teck, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in DMEM medium with 10% fetal bovine serum and incubated at 37 °C under a 95% air and 5% CO₂ atmosphere for 24 h. Cells were fixed with PBS/PFA 4% for 15 min and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 30 min. Then, cells were blocked with 40 μ L of blocking solution in a humidity chamber at 37 °C for 1 h, and incubated with the primary antibodies: polyclonal rabbit antibody against PTP1B (2 μ g/mL; #5311; Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) and monoclonal mouse antibody against Cdk3 (2 μ g/mL; sc-81836; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) at 4 °C overnight. To detect the primary antibodies, secondary proximity probes binding rabbit and mouse immunoglobulin (PLA probe rabbit PLUS and PLA probe mouse MINUS, Olink Bioscience, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were diluted 1:15 and 1:5 in blocking solution, respectively. Cells were then incubated with the proximity probe solution at 37 °C for 1 h, washed three times in 50 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 (TBS-T), and incubated with the hybridization solution containing connector oligonucleotides (Olink Bioscience, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 37 °C for 45 min. Samples were washed with TBS-T and subsequently incubated in the ligation solution at 37 °C for 45 min. The ligation solution contained T4 DNA ligase (Fermentas, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), allowing the ligation of secondary proximity probes and connector oligonucleotides to form a circular DNA strand. Subsequently, the samples were washed in TBS-T and incubated with the amplification solution containing phi29 DNA polymerase (Fermentas, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for rolling circle amplification at 37 °C for 90 min, and washed three times with TBS-T. Finally, the samples were incubated with the detection mix solution containing Texas Red-labeled detection probes that recognize the amplified product (Olink Bioscience, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 37 °C for 1 h, washed twice in SSC-T buffer (150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, 0.05% Tween-20, pH 7), and were coverslipped with a fluorescence mounting medium (Biacore Medical, Pacheco, CA, USA). Fluorescent signals were detected by laser scanning microscopy (Leica TCS SP8, Wetzlar, Germany), and PLA-positive signals were quantified using MetaMorph software.

Cell cycle analyses. LN229, U87-MG and U251 cells (2×10^5) were seeded in six-well cell culture plates, synchronized by serum deprivation for 48 h, incubated with vehicle, 2 μ M of claramine or trodusquemine as previously reported,^{67,68} or transfected with siRNAs targeting PTP1B, Cdk3, or with the pCMV Cdk3 AF-HA plasmid. The cells were collected at the indicated time points after release of cell cycle arrest. Cells were washed with PBS and fixed in 70% ethanol overnight. Cells were then washed twice with PBS and stained using a Propidium Iodide/RNase Staining kit (BD PharMingen, Franklin Lakes, NJ, USA) in the dark at room temperature for 30 min. Cell cycle analysis was carried out using an Attune NxT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and FlowJo software version 10.6. A total of 10,000 cells were collected for each sample for analysis.

RT-qPCR. Total RNA was extracted from cells treated with vehicle, 2 μ M of claramine, trodusquemine, or transfected with the pCMV Cdk3 AF-HA plasmid, using RNeasy Mini kits, quantified by Nanodrop ND-1000, and reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). 1 ng cDNA was amplified by real-time PCR using Universal ProbeLibrary (UPL) probes (Roche). The primer sequences for real-time qPCR were: Cdk1 Fwd: 5' ggaacaccaggaagcctagcatc 3', Rev: 5' ggatgattcagtgccattttgccc 3'; Cyclin A Fwd: 5' tgtgcacggaaggactttgt 3', Rev: 5' tcctcttgagaagatcagccg 3'; Cyclin E1 Fwd: 5' tgtgtctctggatggttgacc 3', Rev: 5' ctctatgtgcaccactgatacc 3'; and GAPDH Fwd: 5' ccccggttctataaattgagc 3', Rev: 5' cacttccccatggtgtct 3'. UPL probes used were #80 for Cdk1, #69 for cyclin A, #19 for cyclin E1 and #63 for GAPDH. Each sample was run in 20 μ L reaction using 2 \times FastStart Universal Probe Master with ROX (Roche). Reactions were performed in an ABI real-time PCR 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Ratios of mRNA levels to control values were calculated using the Δ Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) at a threshold of 0.02.⁶⁹ All data were normalized to control GAPDH. PCR conditions used: hold at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C.

Statistics. Statistical analysis was conducted using a two-way ANOVA or the unpaired Student's *t* test using the Prism software package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For the SILAC experiments, significance testing was carried out using Student's *t* test on log 2 transformed ratios and controlled with a Benjamini-Hochberg FDR threshold. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Biol. Luis Enrique Florencio-Martinez for technical assistance, Dr Norma Laura Delgado-Buenrostro for assistance in PLA confocal microscopy analysis, and Alison Kurimchak, Lynn Spruce and Steven Seeholzer for their valuable help in mass spectrometry data analysis. Olga Villamar-Cruz is a graduate student of Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

FUNDING

This work was supported by grants from the NIH (R01CA117884) to JC, from the Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, project FICDTEM-2021-027 to OVC, FICDTEM-2023-130 to LEAR and FICDTEM-2023-131 to HISC and from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA-UNAM, project IN201823 to ICA and IN211022 to LEAR.

ORCID

Olga Villamar-Cruz  <http://orcid.org/0000-0003-4265-9367>
 Marco Antonio Loza-Mejía  <http://orcid.org/0000-0002-8449-0806>
 Alonso Vivar-Sierra  <http://orcid.org/0000-0002-9267-2669>
 Héctor Iván Saldivar-Cerón  <http://orcid.org/0000-0002-9125-9100>
 Genaro Patiño-López  <http://orcid.org/0000-0002-8716-722X>
 Jonadab Efraín Olguín  <http://orcid.org/0000-0002-7255-1667>
 Luis Ignacio Terrazas  <http://orcid.org/0000-0003-4649-4117>
 Leonel Armas-López  <http://orcid.org/0000-0001-9490-4294>
 Federico Ávila-Moreno  <http://orcid.org/0000-0002-0252-7899>
 Jonathan Chernoff  <http://orcid.org/0000-0002-4803-7836>
 Ignacio Camacho-Arroyo  <http://orcid.org/0000-0003-2978-1253>
 Luis Enrique Arias-Romero  <http://orcid.org/0000-0001-5676-2483>

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE⁵⁹ partner repository with the dataset identifier PXD046000; further inquiries can be directed to the corresponding authors. Data availability statement given based on an openly available basis under open license in a public repository that does not issue DOIs.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

REFERENCES

1. Miller KD, Ostrom QT, Kruchko C, Patil N, Tihan T, Cioffi G, Fuchs HE, Waite KA, Jemal A, Siegel RL, et al. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:381–406. doi:10.3322/caac.21693.
2. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008;359:492–507. doi:10.1056/NEJMra0708126.
3. Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet.* 2000;25:55–57. doi:10.1038/75596.
4. Chen J, Zeng Y, Wu R, Xuan Y, Jiang M, Teng H. Decreased DUSP26 expression promotes malignant behavior in glioblastoma cells via deregulation of MAPK and Akt signaling pathway. *Front Oncol.* 2021;11:676647. doi:10.3389/fonc.2021.676647.
5. Ou A, Ott M, Fang D, Heimberger AB. The role and therapeutic targeting of JAK/STAT signaling in glioblastoma. *Cancers.* 2021;13:437. doi:10.3390/cancers13030437.
6. Nešović M, Divac Rankov A, Podolski-Renić A, Nikolić I, Tasić G, Mancini A, Schenone S, Pešić M, Dinić J. Src inhibitors pyrazolo[3,4-d]pyrimidines, Si306 and Pro-Si306, inhibit focal adhesion kinase and suppress human glioblastoma invasion in vitro and in vivo. *Cancers.* 2020;12:1570. doi:10.3390/cancers12061570.
7. Ito Y, Fukui M, Kanda M, Morishita K, Shoji Y, Kitao T, Hinoi E, Shirahase H. Therapeutic effects of the allosteric protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor KY-226 on experimental diabetes and obesity via enhancements in insulin and leptin signaling in mice. *J Pharmacol Sci.* 2018;137:38–46. doi:10.1016/j.jphs.2018.03.001.
8. Sharma B, Xie L, Yang F, Wang W, Zhou Q, Xiang M, Zhou S, Lv W, Jia Y, Pokhrel L, et al. Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications. *Eur J Med Chem.* 2020;199:112376. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112376.
9. Prabhakar PK, Sivakumar PM. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: a novel therapeutic strategy for the management of type 2 diabetes mellitus. *Curr Pharm Des.* 2019;25:2526–2539. doi:10.2174/1381612825666190716102901.
10. Lessard L, Stuiblé M, Tremblay ML. The two faces of PTP1B in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804:613–619. doi:10.1016/j.bbapap.2009.09.018.

11. Bjorge JD, Pang A, Fujita DJ. Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem.* 2000;275:41439–41446. doi:10.1074/jbc.M004852200.
12. Dadke S, Chernoff J. Protein-tyrosine phosphatase 1B mediates the effects of insulin on the actin cytoskeleton in immortalized fibroblasts. *J Biol Chem.* 2003;278:40607–40611. doi:10.1074/jbc.M306772200.
13. Arias-Romero LE, Saha S, Villamar-Cruz O, Yip S-C, Ethier SP, Zhang Z-Y, Chernoff J. Activation of Src by protein tyrosine phosphatase 1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 2009;69:4582–4588. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4001.
14. Yamanashi Y, Baltimore D. Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell.* 1997;88:205–211. doi:10.1016/s0092-8674(00)81841-3.
15. Kashige N, Carpino N, Kobayashi R. Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:2093–2098. doi:10.1073/pnas.040547997.
16. Julien SG, Dubé N, Read M, Penney J, Paquet M, Han Y, Kennedy BP, Muller WJ, Tremblay ML. Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet.* 2007;39:338–346. doi:10.1038/ng1963.
17. Benties-Alj M, Neel BG. Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer Res.* 2007;67:2420–2424. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4610.
18. Ren S, Rollins BJ. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell.* 2004;117:239–251. doi:10.1016/s0092-8674(04)00300-9.
19. Lu J, Zhang ZL, Huang D, Tang N, Li Y, Peng Z, Lu C, Dong X, Tang F. Cdk3-promoted epithelial-mesenchymal transition through activating AP-1 is involved in colorectal cancer metastasis. *Oncotarget.* 2016;7:7012–7028. doi:10.18632/oncotarget.6875.
20. Karlsson-Rosenthal C, Millar JBA. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol.* 2006;16:285–292. doi:10.1016/j.tcb.2006.04.002.
21. Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:185–191. doi:10.1016/j.jceb.2006.02.003.
22. Qin Z, Pandey NR, Zhou X, Stewart CA, Hari A, Huang H, Stewart AFR, Brunel JM, Chen H-H. Functional properties of Claramine: a novel PTP1B inhibitor and insulin-mimetic compound. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;458:21–27. doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.040.
23. Ferrari E, Tinti M, Costa S, Corallino S, Nardozza AP, Chattrayamontri A, Ceol A, Cesareni G, Castagnoli L. Identification of new substrates of the protein-tyrosine phosphatase PTP1B by Bayesian integration of proteome evidence. *J Biol Chem.* 2011;286:4173–4185. doi:10.1074/jbc.M110.157420.
24. Ren L, Chen X, Luechapanichkul R, Selner NG, Meyer TM, Wavreille A-S, Chan R, Iorio C, Zhou X, Neel BG, et al. Substrate specificity of protein tyrosine phosphatases 1B, RPTP α , SHP-1, and SHP-2. *Biochemistry.* 2011;50:2339–2356. doi:10.1021/bi1014453.
25. Schwarz JJ, Grundmann L, Kokot T, Kläsener K, Fotteler S, Medgyesi D, Köhn M, Reth M, Warscheid B. Quantitative proteomics identifies PTP1B as modulator of B cell antigen receptor signaling [Internet]. *Biochemistry.* 2021 10.1101/2021.03.30.437652.
26. Haj FG, Markova B, Klamann LD, Bohmer FD, Neel BG. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem.* 2003;278:739–744. doi:10.1074/jbc.M210194200.
27. Zhang X, Zhang B, Zhang P, Lian L, Li L, Qiu Z, Qian K, Chen A, Liu Q, Jiang Y, et al. Norcantharidin regulates ER α signaling and tamoxifen resistance via targeting miR-873/CDK3 in breast cancer cells. *PLoS One.* 2019;14:e0217181. doi:10.1371/journal.pone.0217181.
28. Liu Z, Yang S, Li W, Dong S, Zhou S, Xu S. circRNA_141539 can serve as an oncogenic factor in esophageal squamous cell carcinoma by sponging miR-4469 and activating CDK3 gene. *Aging.* 2021;13:12179–12193. doi:10.18632/aging.103071.
29. Singh S, Singh H, Tuknait A, Chaudhary K, Singh B, Kumaran S, Raghava GPS. PEPstrMOD: structure prediction of peptides containing natural, non-natural and modified residues. *Biol Direct.* 2015;10:73. doi:10.1186/s13062-015-0103-4.
30. Alekseenko A, Ignatov M, Jones G, Sabitova M, Kozakov D. Protein-protein and protein-peptide docking with ClusPro server. *Methods Mol Biol.* 2020;2165:157–174.
31. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorna D, Yueh C, Beglov D, Vajda S. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc.* 2017;12:255–278. doi:10.1038/nprot.2016.169.
32. Wiesmann C, Barr KJ, Kung J, Zhu J, Erlanson DA, Shen W, Fahr BJ, Zhong M, Taylor L, Randal M, et al. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:730–737. doi:10.1038/nsmb803.
33. Brown NR, Noble MEM, Lawrie AM, Morris MC, Tunnah P, Divita G, Johnson LN, Endicott JA. Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J Biol Chem.* 1999;274:8746–8756. doi:10.1074/jbc.274.13.8746.
34. Ye X, Zhu C, Harper JW. A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:1682–1686. doi:10.1073/pnas.98.4.1682.
35. Hagting A, Karlsson C, Clute P, Jackman M, Pines J. MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.* 1998;17:4127–4138. doi:10.1093/emboj/17.14.4127.
36. Yip S-C, Saha S, Chernoff J. PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem Sci.* 2010;35:442–449. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.004.
37. Villamar-Cruz O, Loza-Mejía MA, Arias-Romero LE, Camacho-Arroyo I. Recent advances in PTP1B signaling in metabolism and cancer. *Biosci Rep.* 2021;41:BSR20211994. doi:10.1042/BSR20211994.
38. Wiener JR, Kerns BJ, Harvey EL, Conway MR, Iglehart JD, Berchuck A, Bast RC. Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:372–378. doi:10.1093/jnci/86.5.372.
39. Zhu S, Bjorge JD, Fujita DJ. PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. *Cancer Res.* 2007;67:10129–10137. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4338.
40. Lessard L, Labbé DP, Deblois G, Bégin LR, Hardy S, Mes-Masson A-M, Saad F, Trotman LC, Giguère V, Tremblay ML. PTP1B is an androgen receptor-regulated phosphatase that promotes the progression of prostate cancer. *Cancer Res.* 2012;72:1529–1537. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2602.
41. Wang J, Liu B, Chen X, Su L, Wu P, Wu J, Zhu Z. PTP1B expression contributes to gastric cancer progression. *Med Oncol.* 2012;29:948–956. doi:10.1007/s12032-011-9911-2.
42. Jin T, Li D, Yang T, Liu F, Kong J, Zhou Y. PTPN1 promotes the progression of glioma by activating the MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways and is associated with poor patient survival. *Oncol Rep.* 2019;42:717–725. doi:10.3892/or.2019.7180.
43. Liu H, Wu Y, Zhu S, Liang W, Wang Z, Wang Y, Lv T, Yao Y, Yuan D, Song Y. PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2015;359:218–225. doi:10.1016/j.canlet.2015.01.020.
44. Wang N, She J, Liu W, Shi J, Yang Q, Shi B, Hou P. Frequent amplification of PTP1B is associated with poor survival of gastric cancer patients. *Cell Cycle.* 2015;14:732–743. doi:10.1080/15384101.2014.998047.
45. Flint AJ, Gebbink MF, Franza BR, Hill DE, Tonks NK. Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation. *EMBO J.* 1993;12:1937–1946. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05843.x.
46. Xu Q, Wu N, Li X, Guo C, Li C, Jiang B, Wang H, Shi D. Inhibition of PTP1B blocks pancreatic cancer progression by targeting the PKM2/AMPK/mTOC1 pathway. *Cell Death Dis.* 2019;10:874. doi:10.1038/s41419-019-2073-4.
47. Carmona S, Brunel J-M, Bonier R, Sbarra V, Robert S, Borentain P, Lombardo D, Mas E, Gerolami R. A squalamine derivative, NV669, as a novel PTP1B inhibitor: in vitro and in vivo effects on pancreatic and hepatic tumor growth. *Oncotarget.* 2019;10:6651–6667. doi:10.18632/oncotarget.27286.
48. Xie J, Qian Y-Y, Yang Y, Peng L-J, Mao J-Y, Yang M-R, Tian Y, Sheng J. Isothiocyanate from *Moringa oleifera* seeds inhibits the growth and migration of renal cancer cells by regulating the PTP1B-dependent Src/Ras/Raf/ERK signaling pathway. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:790618. doi:10.3389/fcell.2021.790618.
49. Braun K, Hölzl G, Soucek T, Geisen C, Mörröy T, Hengstschlagger M. Investigation of the cell cycle regulation of cdk3-associated kinase activity and the role of cdk3 in proliferation and transformation. *Oncogene.* 1998;17:2259–2269. doi:10.1038/sj.onc.1202145.
50. Cho Y-Y, Tang F, Yao K, Lu C, Zhu F, Zheng D, Pugliese A, Bode AM, Dong Z. Cyclin-dependent kinase-3-mediated c-Jun phosphorylation at Ser63 and Ser73 enhances cell transformation. *Cancer Res.* 2009;69:272–281. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3125.
51. Zheng D, Cho Y-Y, Lau ATY, Zhang J, Ma W-Y, Bode AM, Dong Z. Cyclin-dependent kinase 3-mediated activating transcription factor 1 phosphorylation enhances cell transformation. *Cancer Res.* 2008;68:7650–7660. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1137.

52. Xiao T, Zhu JJ, Huang S, Peng C, He S, Du J, Hong R, Chen X, Bode AM, Jiang W, et al. Phosphorylation of NFAT3 by CDK3 induces cell transformation and promotes tumor growth in skin cancer. *Oncogene*. 2017;36:2835–2845. doi:10.1038/onc.2016.434.
53. O'Donovan DS, MacFhearraigh S, Whitfield J, Swigart LB, Evan GI, Mc Gee MM. Sequential Cdk1 and Plk1 phosphorylation of protein tyrosine phosphatase 1B promotes mitotic cell death. *Cell Death Dis*. 2013;4:e468. doi:10.1038/cddis.2012.208.
54. Dubé N, Cheng A, Tremblay ML. The role of protein tyrosine phosphatase 1B in Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:1834–1839. doi:10.1073/pnas.0304242101.
55. van den Heuvel S, Harlow E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science*. 1993;262:2050–2054. doi:10.1126/science.8266103.
56. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 2006;127:635–648. doi:10.1016/j.cell.2006.09.026.
57. Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJD. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4:873–886. doi:10.1074/mcp.T500007-MCP200.
58. Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem*. 2003;75:663–670. doi:10.1021/ac026117i.
59. Perez-Riverol Y, Bai J, Bandla C, García-Seisdedos D, Hewapathirana S, Kamatchinathan S, Kundu DJ, Prakash A, Frericks-Zipper A, Eisenacher M, et al. The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res*. 2022;50:D543–D552. doi:10.1093/nar/gkab1038.
60. Desta IT, Porter KA, Xia B, Kozakov D, Vajda S. Performance and its limits in rigid body protein-protein docking. *Structure*. 2020;28:1071–1081.e3. doi:10.1016/j.str.2020.06.006.
61. Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, Vajda S. How good is automated protein docking? *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2013;81:2159–2166. doi:10.1002/prot.24403.
62. Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, Kozakov D. New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2017;85:435–444. doi:10.1002/prot.25219.
63. Krieger E, Vriend G. YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. *Bioinformatics*. 2014;30:2981–2982. doi:10.1093/bioinformatics/btu426.
64. Krieger E, Vriend G. New ways to boost molecular dynamics simulations. *J Comput Chem*. 2015;36:996–1007. doi:10.1002/jcc.23899.
65. Vivar-Sierra A, Araiza-Macías MJ, Hernández-Contreras JP, Vergara-Castañeda A, Ramírez-Vélez G, Pinto-Almazán R, Salazar JR, Loza-Mejía MA. In silico study of polyunsaturated fatty acids as potential SARS-CoV-2 spike protein closed conformation stabilizers: epidemiological and computational approaches. *Molecules*. 2021;26:711. doi:10.3390/molecules26030711.
66. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596:583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
67. Bartolomé RA, Martín-Regalado Á, Jaén M, Zannikou M, Zhang P, de los Ríos V, Balyasnikova IV, Casal JI. Protein tyrosine phosphatase-1B inhibition disrupts IL13R α 2-promoted invasion and metastasis in cancer cells. *Cancers*. 2020;12:500. doi:10.3390/cancers12020500.
68. Lantz KA, Hart SGE, Planey SL, Roitman MF, Ruiz-White IA, Wolfe HR, McLane MP. 2010 Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice. *Obesity*. 18(8):1516–1523.
69. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.