



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**Caracterização funcional da interação entre a E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7) e  
as proteínas UXT-V1 e UXT-V2**

**VALENTINE SPAGNOL**

**Ribeirão Preto**

**2022**

**VALENTINE SPAGNOL**

**Caracterização funcional da interação entre a E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7) e as proteínas UXT-V1 e UXT-V2**

**Versão corrigida**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.**

**Área de concentração: Bioquímica.**

**Orientador: Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira**

**Ribeirão Preto**

**2022**

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

### FICHA CATALOGRÁFICA

Spagnol, Valentine

**Caracterização funcional da interação entre a E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7) e as proteínas UXT-V1 e UXT-V2**

79 p. Il, 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Teixeira, Felipe Roberti

1. Ubiquitinação. 2. E3 ubiquitina ligases. 3. Fbxo7. 4. UXT.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**VALENTINE SPAGNOL**

**Caracterização funcional da interação entre a E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7) e as proteínas UXT-V1 e UXT-V2**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.**

**Área de concentração: Bioquímica.**

Aprovado em: **22/03/2022** (Defesa realizada por videoconferência)

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. **Felipe Roberti Teixeira (Presidente)**

Instituição: **FMRP/USP** Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. **Iran Malavazi (Titular)**

Instituição: **DGE/UFSCar** Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. **Gabriela Nestal de Moraes (Titular)**

Instituição: **FO/UFRJ** Assinatura: \_\_\_\_\_



ATA DE DEFESA

Anexo: 17131 - 11281837 - 1 \ Páginas 1 de 1

Ata de defesa de Dissertação do(a) Senhor(a) Valdirine Spagnol no Programa: Biológicas, do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 22 dias do mês de março de 2022, no(a) FMRP/USP realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Valdirine Spagnol, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Caracterização funcional da interação entre a E3 ubiquitina ligase SCF (E3) e as proteínas UBT-V1 e UBT-V2

Devido a Pandemia da Covid-19 e as dificuldades da Universidade de São Paulo e à Circ. Co Pq 121/2020 todos os membros da banca avaliaram a defesa por videoconferência e consideraram o aluno aprovado.

22 de Março de 2022.

Felipe Robert Triveiro

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em \_\_\_\_\_ e, portanto, o(a) aluno(a) \_\_\_\_\_ foi ao título de Mestre em Ciências no Programa Biológicas.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

## Dedicatória

A Deus,

“Razão de tudo o que somos e fazemos”

À minha mãe Valquíria e ao meu pai Valter,

“Razão maior de minha existência, exemplo de amor com que fui criada e incentivada a lutar para atingir meus objetivos, preservando os princípios morais e éticos”

Aos meus avós, Marina, Waldemar, Thereza e Antonio (*In memoriam*)

“Quando eu contei que havia sido aprovada no mestrado eles não entenderam muito bem, mas vibraram junto comigo. Acho que essa deve ser a definição mais pura do amor”

À minha tia Ana Paula,

“Dizem que amor de tia é assim, um pouco de mãe, um pouco de amiga, um pouco de irmã”

À minha melhor amiga Ananda,

“A vida não nos uniu por laços de sangue, mas me deu uma irmã para a vida toda”

Aos meus amigos,

“Pessoas especiais que estiveram sempre presentes me impulsionando para frente”

**“Obrigada por fazerem parte do meu mundo!”**

## Agradecimentos

Esta página me fará lembrar das emoções e aflições passadas neste período, das descobertas, das pessoas que me ajudaram e me apoiaram e, principalmente, da satisfação de ter alcançado meu objetivo.

Por isso, sinceramente agradeço,

- À Universidade de São Paulo – USP e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP, por concretizarem o sonho de um título de pós-graduação.
- Ao Departamento de Genética e Evolução – DGE da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, por fornecer todo o suporte físico para a realização dos meus experimentos.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, por fornecer todo o suporte financeiro para a realização deste trabalho.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira, que me aceitou como orientanda em 2016, num gesto que não tenho palavras que exprimam meu agradecimento. Obrigada por todos esses anos, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo apoio nos momentos difíceis da minha vida, tanto profissional como pessoal, pelo incentivo e pelo amigo que sempre foi e certamente sempre será.
- A todos os professores ao longo do mestrado que compartilharam sua sabedoria e seu conhecimento, contribuindo para minha formação e crescimento profissional.
- Aos docentes do Departamento de Genética e Evolução, Dr. Marcos Chiaratti, Dra. Sandra Maruyama e Dr. Iran Malavazi, e também aos seus alunos, pelo fornecimento de reagentes e/ou pela disponibilização de seus laboratórios para a utilização de equipamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho.
- Aos integrantes da Banca Examinadora, Dr. Iran Malavazi e Dra. Gabriela Nestal, por se disponibilizarem a estarem presentes neste momento, contribuindo com comentários e sugestões para melhoria do trabalho.

- Ao meu amado companheiro João Pedro, pela alegria inexplicável que você trouxe à minha família e por ter aceitado seguir ao meu lado nessa longa caminhada pela vida.
- Aos amigos e colegas da UFSCar, em especial à minha querida amiga Solange, cujas palavras me deram a força e a confiança que eu precisei em muitos momentos, obrigada por ter sido meu ombro amigo por todos esses anos; e aos membros do Laboratório de Bioquímica Celular – LBqC, pela troca de experiências e colaboração.
- Às minhas duas “orientandas de coração” Karoline e Luana, porque ensinando vocês eu aprendi muito e pela nossa amizade ter se estendido para muito além das portas do Laboratório.
- À equipe de limpeza do Departamento de Genética e Evolução, em especial à Dona Acileide, a primeira pessoa a me desejar um bom dia todos os dias, pelo trabalho fundamental para que pudéssemos continuar trabalhando durante o período de pandemia.
- E um agradecimento especial à Maria Ivone, pelo trabalho exemplar, por todo o carinho (e paciência) que sempre teve por mim e pela perseverança em continuar trabalhando em prol do Programa e dos alunos.

A todos que, de alguma forma, nos menores gestos, contribuíram para me manter motivada, permitindo que este trabalho se realizasse.

**“Muito obrigada!”**

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



*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,  
mas ao tocar uma alma humana seja apenas  
outra alma humana”*

*Carl Gustav Jung*

## RESUMO

SPAGNOL, V. **Caracterização funcional da interação entre a E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7) e as proteínas UXT-V1 e UXT-V2.** 2022. 79 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Fbxo7 é uma das 69 proteínas do tipo F-box em humanos que interage com SKP1, Culina1 e RBX1 para formar o complexo enzimático E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7), que promove a ubiquitinação de seus substratos. A proteína Fbxo7 é superexpressa em uma variedade de linhagens celulares tumorais humanas, mas não nesses tecidos normais, e é descrita como um regulador negativo da via de sinalização de NF-κB por mediar a ubiquitinação de IAP-1 e TRAF2. Em um estudo de identificação de substratos em larga escala, foi identificada a proteína UXT (*Ubiquitously Expressed Transcript*) como um potencial substrato de SCF(Fbxo7). Esta proteína pertence à família das prefoldinas (PFD) e é amplamente expressa em diversos tecidos humanos. Duas isoformas de UXT, UXT-V1 e UXT-V2, foram descritas com funções distintas, sendo a UXT-V2 um cofator transcrricional que ativa a transcrição de NF-κB no núcleo e a UXT-V1 modulando a apoptose induzida por TNF no citoplasma. Combinamos as técnicas de co-immunoprecipitação, ubiquitinação *in vitro* e em células, análise de restrição de cadeia de ubiquitina, ensaio de estabilidade com cicloheximida, fracionamento celular e microscopia confocal para investigar a interação entre Fbxo7 e ambas as isoformas de UXT. Validamos a UXT-V1 e a UXT-V2 como substratos da E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7) e mostramos que SCF(Fbxo7) realiza uma modificação pós-traducional para regulação de função na UXT-V1 e para degradação do substrato via proteassoma na UXT-V2. Demostramos que a superexpressão de UXT-V2, mas não de UXT-V1, recruta Fbxo7 do citosol para o núcleo das células para mediar a interação entre elas e observamos que as isoformas diferem em suas localizações subcelulares. Também mostramos que o *knockdown* de *FBXO7* ou a superexpressão do mutante Fbxo7-ΔF-box protege a UXT-V2 da degradação proteassomal mediada por Fbxo7, aumentando a resposta dos repórteres da via do NF-κB. Neste trabalho, demonstramos que SCF(Fbxo7) promove a degradação proteassomal da UXT-V2, tendo por consequência funcional a inibição da via de sinalização do NF-κB e caracterizando um novo ponto de regulação da via. Por fim, resultados preliminares demonstraram que a UXT-V2 promove um aumento na ubiquitinação do *Estrogen Receptor* (ER) e, ao contrário, promove uma redução na ubiquitinação do *Androgen Receptor* (AR). A caracterização da interação entre Fbxo7/UXT com os receptores AR e ER será avaliada em ensaios posteriores.

**Palavras-chave:** Ubiquitinação, E3 ubiquitina ligases, Fbxo7, UXT.

## ABSTRACT

SPAGNOL, V. **Functional characterization of the interaction between E3 ubiquitin ligase SCF(Fbxo7) and UXT-V1 and UXT-V2 proteins.** 2022. 79 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Fbxo7 is one of 69 F-box-like proteins in humans that interact with SKP1, Cullin1 and RBX1 to form the E3 ubiquitin ligase SCF(Fbxo7) enzyme complex, which promotes the ubiquitination of its substrates. The Fbxo7 protein is overexpressed in a variety of human tumor cell lines, but not in these normal tissues, and is described as a negative regulator of the NF- $\kappa$ B signaling pathway by mediating the ubiquitination of cIAP-1 and TRAF2. In a large-scale substrate identification study, the UXT (Ubiquitously Expressed Transcript) protein was identified as a potential substrate of SCF(Fbxo7). This protein belongs to the prefoldin family (PFD) and is widely expressed in many human tissues. Two isoforms of UXT, UXT-V1 and UXT-V2, have been described with distinct functions, UXT-V2 being a transcriptional cofactor that activates NF- $\kappa$ B transcription in the nucleus and UXT-V1 modulating TNF-induced apoptosis in the cytoplasm. We combined the techniques of co-immunoprecipitation, in vitro and in-cell ubiquitination, ubiquitin chain restriction analysis, cycloheximide stability assay, cell fractionation and confocal microscopy to investigate the interaction between Fbxo7 and both isoforms of UXT. We validated UXT-V1 and UXT-V2 as substrates of E3 ubiquitin ligase SCF(Fbxo7) and showed that SCF(Fbxo7) performs a functional regulation of UXT-V1 and proteasomal degradation of UXT-V2. We demonstrated that overexpression of UXT-V2, but not UXT-V1, recruits Fbxo7 from the cytosol to the cell nucleus to mediate the interaction between them, and we observed that the isoforms differ in their subcellular locations. We also showed that knockdown of *FBXO7* or overexpression of the Fbxo7- $\Delta$ F-box mutant protects UXT-V2 from Fbxo7-mediated proteasomal degradation, increasing the responsiveness of NF- $\kappa$ B reporter genes. In this work, we demonstrate that SCF(Fbxo7) promotes the proteasomal degradation of UXT-V2, contributing to the inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway and characterizing a new point of regulation of the pathway. Finally, preliminary results showed that UXT-V2 promotes an increase in Estrogen Receptor (ER) ubiquitination and, on the contrary, reduces Androgen Receptor (AR) ubiquitination. The characterization of the interaction between Fbxo7/UXT with AR and ER receptors will be evaluated in further assays.

**Keywords:** Ubiquitination, E3 ubiquitin ligases, Fbxo7, UXT.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
AR	Receptor de andrógeno
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina sérica bovina
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CHX	Cicloheximida
Co-IP	Co-Imunoprecipitação
CRL	<i>Cullin-RING E3 ubiquitina ligase</i>
DUB	Enzima deubiquitinase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
DUB	Deubiquitinase
E1	Enzima ativadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima ligante de ubiquitina
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Receptor de estrógeno
EV	Vetor vazio ( <i>empty vector</i> )
FBP	Proteína tipo F-box
FBS	Soro fetal bovino
Fbxo7	Proteína Fbxo7
<i>FBXO7</i>	Gene que codifica a proteína Fbxo7
GSK3 $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i>
IB	<i>Imunoblotting (Western Blotting)</i>
IgG	Anticorpo do tipo imunoglobulina G
IP	Imunoprecipitação

K	Lisina
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
Lys	Lisina
Met	Metionina
mRNA	RNA mensageiro
MTP	Modificação pós-traducional
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFD	Prefoldina
qPCR	PCR quantitativa
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer</i>
RBX1	RING-box protein 1
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
SCF	Complexo formado pelas proteínas SKP, Culina e F-box
SCF(Fbxo7)	E3 ubiquitina ligase formada pelas proteínas SKP1, Culina1 e F-box 7
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SKP1	<i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
SUP	Sistema Ubiquitina Proteassoma
Tag	Epítopo específico
Tag-FLAG	Epítopo (DYKDDDDK), reconhecido pelo anticorpo anti-FLAG
Tag-HA	Epítopo (YPYDVPDYA) derivado da hemaglutinina da gripe humana (HA), reconhecido pelo anticorpo anti-HA
Tag-myc	Epítopo (EQKLISEEDL) derivado gene C-MYC, reconhecido pelo anticorpo anti-myc
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

TOMM20	<i>Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20</i>
U2OS	Célula epitelial de osteossarcoma humano
Ub	Ubiquitina
UBD	Domínio de ligação à ubiquitina
UXT	<i>Ubiquitously expressed transcript</i>
UXT-V1	<i>Ubiquitously expressed transcript isoform 1</i>
UXT-V2	<i>Ubiquitously expressed transcript isoform 2</i>
HEK293T	Célula de rim embrionário humano
WB	<i>Western Blot</i>
WD	Triptofano-ácido aspártico
WD40	<i>WD-repeat</i> , domínio contendo repetições dos resíduos de aminoácidos triptofano-ácido aspártico
WT	<i>Wild type</i> (selvagem)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> O Sistema Ubiquitina-Proteassoma .....	20
<b>Figura 2.</b> A estrutura da ubiquitina .....	20
<b>Figura 3.</b> Estruturas tridimensionais de diferentes ligações entre duas moléculas de ubiquitina.....	21
<b>Figura 4.</b> Complexo E3 ubiquitina ligase do tipo SCF .....	22
<b>Figura 5.</b> As proteínas F-box.....	23
<b>Figura 6.</b> A estrutura da proteína Fbxo7 humana .....	25
<b>Figura 7.</b> A via de sinalização do NF- $\kappa$ B .....	26
<b>Figura 8.</b> Identificação de três potenciais substratos da E3 SCF(Fbxo7) utilizando microarranjos de proteínas ( <i>Protoarrays</i> <sup>®</sup> ) .....	28
<b>Figura 9.</b> Expressão de UXT em tecidos humanos .....	28
<b>Figura 10.</b> Esquematização dos ensaios realizados em células.....	35
<b>Figura 11.</b> UXT-V2 é poliubiquitinada <i>in vitro</i> por SCF(Fbxo7) .....	45
<b>Figura 12.</b> Fbxo7 interage com UXT-V2 pelo domínio localizado a N-terminal .....	46
<b>Figura 13.</b> UXT-V1 é predominantemente citoplasmática e UXT-V2 predominantemente nuclear .....	47
<b>Figura 14.</b> Fbxo7 interage com UXT-V1 e UXT-V2 .....	48
<b>Figura 15.</b> SCF(Fbxo7) poliubiquitina UXT-V1 e UXT-V2.....	49
<b>Figura 16.</b> E3 ligase SCF(Fbxo7) promove a poliubiquitinação de UXT-V1 e UXT-V2 via cadeias de ubiquitina K63 e K48.....	51
<b>Figura 17.</b> Degradação via proteassoma da UXT-V2, mas não da UXT-V1, é mediada por Fbxo7 .....	53
<b>Figura 18.</b> Níveis de UXT-V2 em extratos celulares obtidos pela lise com dois tampões diferentes.....	54
<b>Figura 19.</b> Níveis intracelulares de UXT-V2 decaem sob superexpressão de Fbxo7.....	55

<b>Figura 20.</b> A superexpressão de UXT-V2, mas não de UXT-V1, promove a translocação de Fbxo7 para o núcleo .....	57
<b>Figura 21.</b> UXT-V2 e Fbxo7 colocalizam no núcleo das células.....	58
<b>Figura 22.</b> A superexpressão de UXT-V2 não afeta os níveis totais de Fbxo7 .....	59
<b>Figura 23.</b> A degradação proteassomal de UXT-V2 mediada por SCF(Fbxo7) inibe a via de sinalização do NF- $\kappa$ B.....	60
<b>Figura 24.</b> Fbxo7 interage com os receptores ER e AR.....	62
<b>Figura 25.</b> SCF(Fbxo7) poliubiquitina o receptor AR .....	63
<b>Figura 26.</b> Mecanismo geral proposto .....	64



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1	O Sistema Ubiquitina-Proteassoma	19
1.2	O complexo E3 ubiquitina ligase do tipo SCF	22
1.3	As proteínas F-box	23
1.3.1	A proteína Fbxo7	24
1.4	A identificação de substratos das E3 ubiquitina ligases	26
1.5	A proteína UXT	28
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos	33
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>35</b>
4.1	Cultura de células	36
4.2	Reagentes e anticorpos	36
4.3	Lista de plasmídeos	36
4.4	Ensaio de ubiquitinação <i>in vitro</i>	37
4.5	Ensaio de interação em células	37
4.6	Ensaio de ubiquitinação em células	38
4.7	Análise de restrição de cadeia de ubiquitina (UbiCRest)	39
4.8	Ensaio de estabilidade com cicloheximida (CHX)	39
4.9	<i>Knockdown</i> de <i>FBXO7</i>	40
4.10	Transcriptase Reversa seguida de PCR Quantitativa (RT-qPCR)	40
4.11	Preparo de extratos totais e subcelulares	40
4.12	Ensaio de gene repórter de NF- $\kappa$ B	41
4.13	Microscopia confocal	41
4.14	Análises estatísticas	42
4.15	Esquematização dos ensaios realizados em células	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
5.1	UXT-V2 é poliubiquitinada <i>in vitro</i> por SCF(Fbxo7)	44

5.2	O domínio Ubl de Fbxo7 é essencial para a interação com UXT-V2.....	45
5.3	UXT-V1 localiza-se no citoplasma e UXT-V2 no núcleo .....	46
5.4	Fbxo7 interage com UXT-V1 e UXT-V2 .....	47
5.5	SCF(Fbxo7) poliubiquitina UXT-V1 e UXT-V2 .....	48
5.6	A poliubiquitinação da UXT-V1 e UXT-V2 ocorre via cadeias de Ub K63 e K48.....	49
5.7	SCF(Fbxo7) promove a degradação de UXT-V2 via proteassoma.....	52
5.8	O <i>knockdown</i> de <i>FBXO7</i> e a superexpressão de Fbxo7- $\Delta$ F-box promovem o acúmulo de UXT-V2 .....	54
5.9	A superexpressão de UXT-V2 promove a translocação de Fbxo7 para o núcleo.....	56
5.10	A degradação proteassomal da UXT-V2 inibe a via de sinalização do NF- $\kappa$ B.....	59
5.11	Fbxo7 interage com os receptores ER e AR.....	61
5.12	SCF(Fbxo7) poliubiquitina o receptor AR.....	62
5.13	Mecanismo geral proposto.....	64
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>74</b>
8.1	Trabalhos científicos publicados, não relacionados à tese de mestrado .....	75
8.1.1	Effect of Tahiti lime ( <i>Citrus latifolia</i> ) juice on the Production of the PGF2 $\alpha$ /PGE2 and Pro-Inflammatory Cytokines involved in Menstruation.....	75
8.1.2	New insights on human Hsp70-escort protein 1: Chaperone activity, interaction with liposomes, cellular localizations and HSPA's self-assemblies remodeling .....	76
8.2	Trabalhos científicos publicados, relacionados à tese de mestrado .....	77
8.2.1	The E3 ubiquitin ligase SCF (Fbxo7) mediates proteasomal degradation of UXT isoform 2 (UXT-V2) to inhibit the NF- $\kappa$ B signaling pathway .....	77
8.2.2	Ubiquitin ligases: Proteolytic signaling, protein turnover, and disease .....	78

## | INTRODUÇÃO

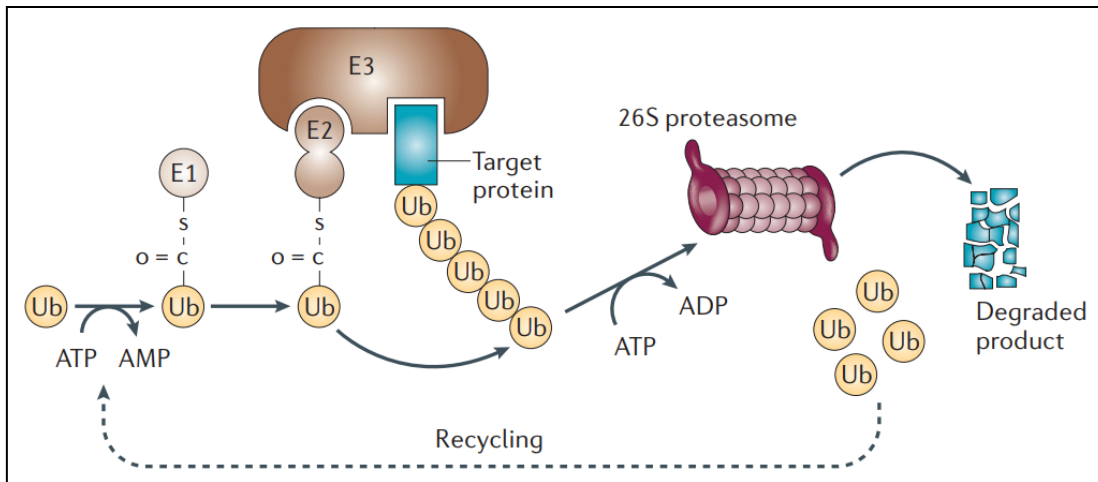
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O Sistema Ubiquitina-Proteassoma

Muitas proteínas recém-sintetizadas apenas adquirem sua conformação final biologicamente ativa após passarem por uma ou mais reações de processamento, denominadas modificações pós-traducionais (MPTs). As MPTs estendem e diversificam a função e a atividade de uma proteína para além do que é determinado pelo transcrito do gene, alterando de forma reversível ou irreversível a estrutura das proteínas por meio de reações bioquímicas. Com base em tais reações, podem ser agrupadas em dois grandes grupos. O primeiro engloba todas as adições covalentes realizadas por enzimas à cadeia lateral de um resíduo de aminoácido da proteína. Estima-se que 5% do proteoma humano compreenda enzimas dedicadas às mais diversas modificações pós-traducionais, sendo as mais abundantes as enzimas quinases, fosfatases e ubiquitina ligases. O segundo grupo engloba as MPTs que surgem da clivagem covalente do esqueleto peptídico pela ação de proteases<sup>1</sup>.

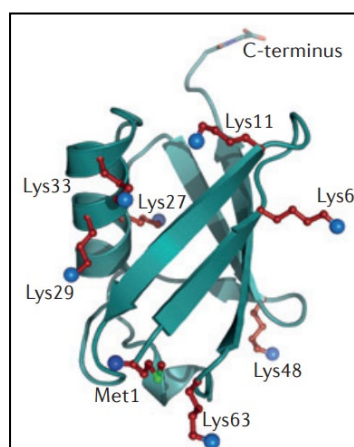
Estatísticas coletadas do banco de dados do *UniProt/SwissProt*, revelaram que as MPTs mais abundantes são: fosforilação, acetilação, glicosilação, amidação, hidroxilação, metilação, glicosilação e ubiquitinação<sup>2</sup>, sendo esta última o foco deste trabalho. A ubiquitinação de proteínas é um processo reversível fundamental para o controle da homeostase proteica, uma vez que a adição de ubiquitinas à uma proteína funciona como uma espécie de “bandeira”, sinalizando para a célula que algo deve ocorrer com aquele substrato, variando desde a modulação de função da proteína marcada à sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma<sup>3</sup>.

O Sistema Ubiquitina-Proteassoma (SUP) é a principal via para o catabolismo de proteínas nas células eucarióticas. A ubiquitina é uma pequena proteína de 76 resíduos de aminoácidos covalentemente ligada à cadeia lateral de um resíduo de lisina na proteína alvo. A conjugação da ubiquitina a substratos proteicos específicos requer a ação conjunta de três componentes enzimáticos: uma enzima ativadora de ubiquitina (E1), uma enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e uma enzima ligante de ubiquitina (E3 ubiquitina ligase). Inicialmente, a ubiquitina será ativada em uma reação de hidrólise de ATP catalisada pela enzima E1 e, então, transferida para a E2. As enzimas E3 fornecem plataformas para a ligação de enzimas E2 e substratos específicos, de modo a catalisar a ligação da porção C-terminal da molécula de ubiquitina à cadeia lateral de um resíduo de lisina na proteína alvo (**Figura 1**). Por se tratar de uma modificação reversível, o substrato também pode ter a molécula de ubiquitina removida pela ação de enzimas deubiquitinases (DUBs), em oposição ao efeito das E3 ubiquitina ligases, alterando o destino do substrato e mantendo a homeostase de ubiquitina na célula<sup>3,4</sup>.



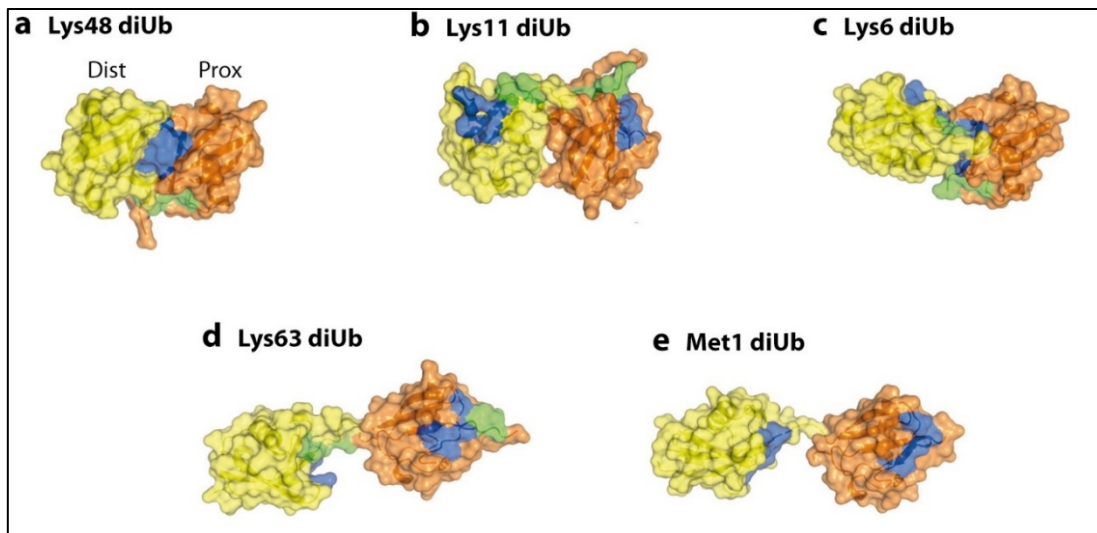
**Figura 1. O Sistema Ubiquitina-Proteassoma.** A ubiquitina é ativada pelo complexo E1 e, posteriormente, é carregada pelo complexo E2 até o complexo E3, que funciona como uma plataforma de ligação para a enzima E2 e um substrato específico (em azul). No complexo E3, ocorre a transferência da ubiquitina para o substrato, que será direcionado para degradação via proteassoma. As moléculas de ubiquitina são recicladas ao final desse processo, mantendo a homeostase de ubiquitina na célula. Fonte: Adaptado de NAKAYAMA (2006).

Uma vez ligada a um substrato, a molécula de ubiquitina pode ser submetida a modificações adicionais, em decorrência de repetidos ciclos de ação das enzimas E1/E2/E3, culminando na ligação de uma nova molécula de ubiquitina à molécula anterior, ou seja, ubiquitinas sendo ubiquitinadas. Isso cria uma infinidade de sinais distintos com resultados celulares distintos, referidos como o “código da ubiquitina”. A ubiquitina possui em sua estrutura sete resíduos de lisina (**Figura 2**) que podem ancorar novas moléculas, gerando cadeias de poliubiquitina que abrangem topologias variando de simples a complexas. A conformação das cadeias de poliubiquitina conjugadas ao substrato determina o destino da proteína marcada na célula<sup>5</sup>.



**Figura 2. A estrutura da ubiquitina.** Estrutura da ubiquitina com destaque para os sete resíduos de lisina (Lys) e Metionina1. As esferas azuis indicam os grupos amino utilizados na formação da cadeia de poliubiquitina. Fonte: KOMANDER (2012).

A caracterização estrutural de cinco tipos de cadeias de poliubiquitina revelou que diferentes posições de ligação entre ubiquitinas resultam em distintas conformações de cadeia. As cadeias ligadas via Lys48, Lys11 e Lys6 adotam conformações globulares e compactas, nas quais, além do sítio de ligação, ocorrem interações entre porções adjacentes, enquanto que as cadeias ligadas via Lys63 e Met1 exibem conformações “abertas”, com elevada flexibilidade conformacional, onde nenhuma interface de interação está presente além do sítio de ligação<sup>5,6</sup> (**Figura 3**). Neste trabalho, daremos ênfase para dois tipos de cadeias de poliubiquitina, as ligadas via lisina 48 (K48) e via lisina 63 (K63). As diferenças notáveis entre ambas as conformações são refletidas em seus papéis celulares: a primeira indica um forte sinal de direcionamento do substrato para degradação via proteassoma, enquanto que a segunda indica um sinal de regulação da função do substrato de uma maneira independente do proteassoma. Por fim, é importante destacar que os três tipos de cadeia restantes também adotam conformações distintas, a fim de servir a funções celulares específicas<sup>6</sup>.



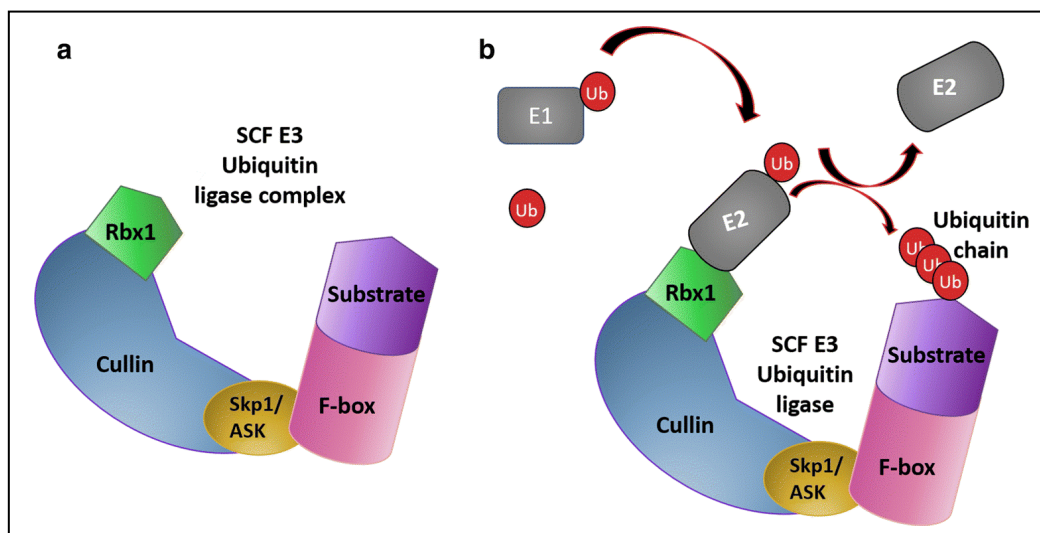
**Figura 3. Estruturas tridimensionais de diferentes ligações entre duas moléculas de ubiquitina. (a)** Diubiquitina ligada a Lys48. **(b)** Diubiquitina ligada a Lys11. **(c)** Diubiquitina ligada a Lys6. **(d)** Diubiquitina ligada a Lys63. **(e)** Diubiquitina ligada a Met1. Fonte: Adaptado de KOMANDER (2012).

As proteínas ubiquitinadas serão, então, reconhecidas por receptores que contêm domínios de ligação à ubiquitina (UBDs)<sup>7</sup>. A flexibilidade conformacional de alguns tipos de cadeia aumenta a possibilidade de que UBDs gerem pequenos ajustes na estrutura a fim de aumentar as interfaces de interação e a especificidade da ligação. A enorme diversidade proporcionada pelas mais variadas conformações forma, portanto, a base do “código da ubiquitina”. Estudos proteômicos identificaram centenas de sítios de ubiquitinação em milhares de proteínas<sup>8,9,10</sup>, indicando que a maioria das proteínas experimentará a ubiquitinação em algum momento da sua vida celular.

## 1.2 O complexo E3 ubiquitina ligase do tipo SCF

O genoma humano codifica duas enzimas do tipo E1, trinta e sete enzimas do tipo E2 e mais de seiscentas enzimas E3 ubiquitina ligases, que são classificadas em duas classes principais com base em seus domínios específicos e a forma de transferência da ubiquitina para o substrato: domínio HECT (*Homologous to E6-associated protein C-terminus*) ou domínio RING finger (*Really Interesting New Gene*). As HECTs E3 ubiquitina ligases catalisam a ubiquitinação do substrato em uma reação de duas etapas: primeiro a ubiquitina ativada é transferida da enzima E2 para a HECT E3 e, em seguida, para o substrato. Já as RING E3 ubiquitina ligases transferem a ubiquitina ativada diretamente da enzima E2 para o substrato, de forma que a RING E3 fornece apenas uma plataforma para a ligação da E2 e do substrato, catalisando a reação de transferência sem uma ligação direta com a ubiquitina<sup>11</sup>.

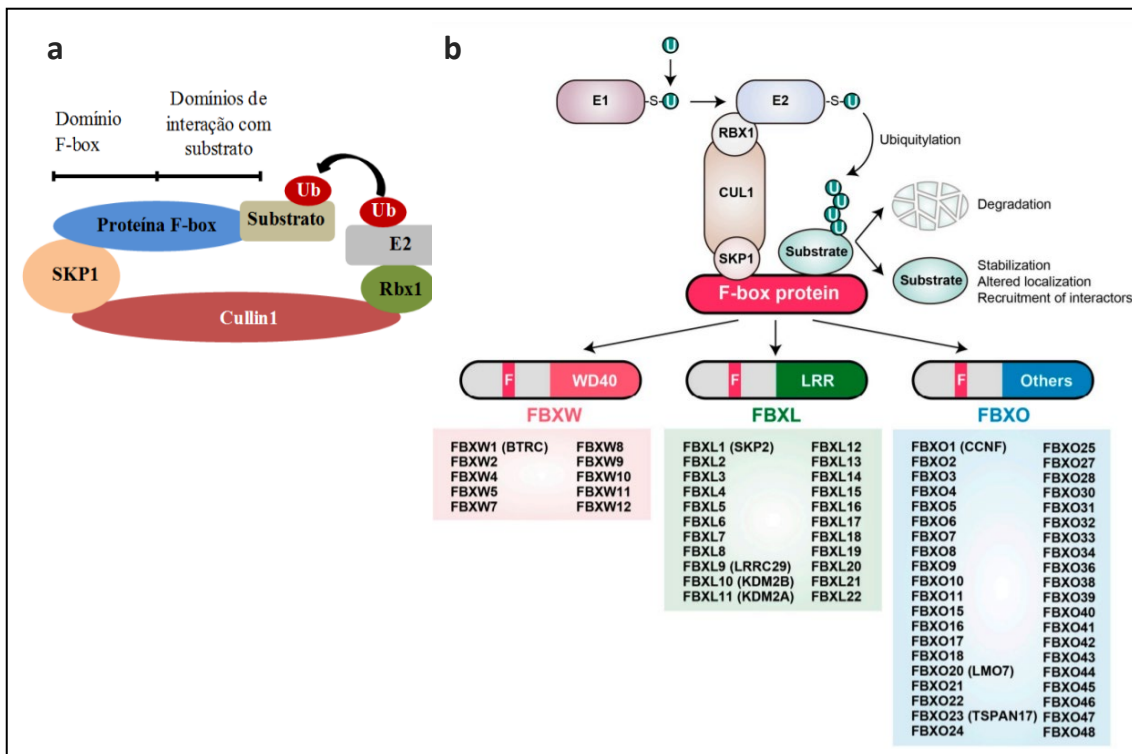
A maior parte das E3 ubiquitina ligases humanas são do tipo RING e, dentre elas, a superfamília das Cullin-RING Ligases (CRLs) é a mais abundante. São compostas pelas proteínas Cullin (1, 2, 3, 4a, 4b, 5, 7 ou 9), uma proteína RING (RBX1/ROC1/HRT1) e uma ou mais proteínas adaptadoras que se ligam à proteína de reconhecimento do substrato<sup>12</sup>. Por fim, a família mais bem estudada de CRLs, e o foco deste trabalho, são as E3 ubiquitina ligases do tipo SCF, cujo complexo enzimático é formado por 4 proteínas: Cullin1, RBX1 (RING box protein 1), SKP1 (*S-phase kinase-associated protein 1*) e uma proteína da família F-box<sup>13</sup> (**Figura 4**). As E3 do tipo SCF desempenham um papel fundamental na ubiquitinação de uma variedade de proteínas reguladoras (e.g. proteínas reguladoras do ciclo celular), destinando-as para degradação via proteassoma<sup>14,15</sup>.



**Figura 4. Complexo E3 ubiquitina ligase do tipo SCF.** (a) Modelo esquemático do complexo SCF e seus componentes Cullin1, RBX1, SKP1 e proteína F-box. (b) Ação conjunta dos três componentes enzimáticos: E1, E2 e SCF E3. Fonte: ABD-HAMID (2020).

### 1.3 As proteínas F-box

As proteínas F-box (FBPs) são componentes das E3 ligases do tipo SCF, responsáveis pelo reconhecimento dos substratos e por conferir especificidade ao complexo SCF. Tal característica se deve à presença de dois domínios funcionais chave: o domínio F-box, que medeia a associação com os demais componentes do complexo via interação direta com SKP1, e o domínio de interação com o substrato (**Figura 5a**). Baseado no conteúdo de resíduos de aminoácidos do domínio de interação com o substrato, as FBPs podem ser classificadas em Fbxw - domínio rico em resíduos triptofano e ácido aspártico, que compreende 10 proteínas descritas; Fbxl - domínio rico em resíduos de leucina, com 22 proteínas; ou Fbxo - domínio rico em demais resíduos ou outro tipo de domínio de interação, que inclui 40 proteínas<sup>16,17</sup> (**Figura 5b**).



**Figura 5. As proteínas F-box. (a)** Modelo esquemático do complexo SCF com destaque para a proteína F-box e seus dois domínios de interação, com SKP1 e com o substrato. Fonte: do autor. **(b)** Cada proteína F-box se agrupa em uma das três classes, Fbxw, Fbxl ou Fbxo, com base no seu domínio de interação com o substrato. Fonte: YUMIMOTO (2020).

Diversas proteínas F-box foram descritas apresentando funções oncogênicas, por promoverem a degradação de supressores tumorais; ou funções supressoras de tumor, por medirem a degradação de proteínas oncogênicas. Por essa razão, vêm sendo propostas como potenciais alvos terapêuticos contra o câncer<sup>18-20</sup>. A proteína Fbxl1, também chamada de SKP2, é um exemplo de uma proteína F-box com função



oncogênica por promover a ubiquitinação de p27, um conhecido supressor tumoral inibidor de CDK (*Cyclin-dependant kinase*), destinando-o ao proteassoma para degradação e permitindo a progressão do ciclo celular; além de ubiquitar e levar à degradação de outros supressores tumorais como p21 e p57<sup>21-23</sup>. Já a proteína Fbxo1, a primeira proteína F-box identificada, apresenta função supressora tumoral por mediar a degradação da proteína promotora da duplicação do centrôssomo CP110, sendo a amplificação do centrôssomo uma marca registrada do câncer. Também tem como alvo para ubiquitinação e posterior degradação a proteína CDC6, integrante do complexo de reconhecimento de origem (ORC), essencial para o início da replicação do DNA<sup>24,25</sup>.

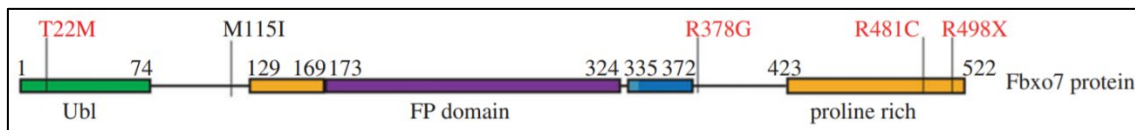
### 1.3.1 A proteína Fbxo7

Fbxo7 é a quinta proteína do tipo F-box mais abundante encontrada em complexos SCF em células humanas, entretanto, muitas de suas funções descritas, como a regulação do ciclo celular<sup>26</sup> e a mitofagia<sup>27</sup>, são independentes de sua atividade de ubiquitina ligase na SCF(Fbxo7) - funções não canônicas. O primeiro substrato canônico identificado de Fbxo7 foi a proteína HURP (*Hepatoma Up-Regulated Protein*)<sup>28</sup>. O gene *HURP* está envolvido no controle do crescimento celular em carcinoma hepatocelular e está altamente associado a câncer de cólon, mama e células do epitélio de transição. Além disso, foi demonstrado que *HURP* é um potencial oncogene em carcinoma hepatocelular por ser um modulador negativo do supressor tumoral p53<sup>29</sup>. A degradação do produto deste oncogene mediada por Fbxo7 evidencia o potencial papel supressor tumoral da proteína em células hepáticas. Um estudo recente associou a expressão reduzida de *FBXO7* à instabilidade cromossômica (INC) em células de câncer colorretal, um evento etiológico precoce que conduz à oncogênese, sugerindo o papel protetor da proteína Fbxo7 na manutenção da estabilidade do genoma<sup>30</sup>.

Em contraste, diversos estudos identificaram a superexpressão do gene *FBXO7* em uma variedade de linhagens celulares tumorais humanas, mas não nesses tecidos normais<sup>31-34</sup>, apoiando um potencial papel oncogênico da proteína Fbxo7. Demonstrou-se que Fbxo7 interage com uma ciclina D responsável por ativar bruscamente as Cdks da fase G1, induzindo células de osteossarcoma humano à entrada na fase S, além de interagir diretamente com Cdk6, induzindo a formação de complexos ciclinaD/Cdk6. Reguladores positivos das fases G1 para S, como o complexo ciclinaD/Cdk6, são proto-oncogenes e, por isso, *FBXO7* foi considerado um potencial proto-oncogene<sup>33</sup>. Entretanto, em linhagens celulares precursoras pró-B e pró-eritroblastos, a expressão de *FBXO7* regulou negativamente a proliferação e diferenciação celular. Nessas células, Fbxo7 não causou aumento de proliferação ou viabilidade e nem afetou os níveis do

complexo ciclinaD/Cdk6<sup>35</sup>. Juntos, esses estudos evidenciam a dualidade funcional da proteína Fbxo7 em desempenhar atividades proliferativas ou anti-proliferativas, a depender rigorosamente do tipo celular.

Quatro mutações no gene *FBXO7* têm sido associadas à manifestação precoce da Doença de Parkinson (DP): T22M, R378G, R481C e R498X<sup>36</sup> (**Figura 6**). Verificou-se em células HEK293T que o mutante R378G possui uma afinidade reduzida por SKP1, indicando a formação de um complexo SCF(Fbxo7) instável, o que implica na perda de função desta E3 ubiquitina ligase e no conseqüente acúmulo de seus substratos<sup>37</sup>. Análises imunohistoquímicas em cortes de cérebros humanos mostraram que a proteína Fbxo7 é amplamente detectada em cérebros de pacientes normais e com DP. Entretanto, nos pacientes com DP encontravam-se predominantemente localizadas nos *Lewy bodies*, inclusões patológicas que caracterizam a DP, sugerindo seu papel na formação destas estruturas<sup>38</sup>.



**Figura 6. A estrutura da proteína Fbxo7 humana.** Representação dos domínios da Fbxo7 humana com destaque para as cinco mutações patogênicas associadas à DP em vermelho. Fonte: Adaptado de NELSON (2013).

A proteína Fbxo7 também tem sido associada à regulação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B<sup>39</sup>, um fator de transcrição nuclear latente presente em todas as células de mamíferos responsável pelo controle de importantes eventos celulares, tais como proliferação celular, diferenciação, apoptose e reposta imune<sup>40</sup>. O principal caminho de ativação da via é pela estimulação por TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória multifuncional pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). Tal estímulo desencadeia uma cascata de reações altamente dependente dos eventos de ubiquitinação, que culminará na ativação e translocação de NF- $\kappa$ B (p50-RELA) do citoplasma para o núcleo e na conseqüente expressão de citocinas pró-inflamatórias.

A ligação de TNF- $\alpha$  ao seu receptor cognato TNF1 (TNF-R1) promove a trimerização do receptor e o rápido recrutamento de um complexo multiproteína, denominado TNF-RSC, constituído por TRADD, TRAF2 ou TRAF5, cIAP1 ou cIAP2 e RIP1<sup>41</sup>. Juntos, recrutam um complexo linear de montagem de cadeia de ubiquitina (LUBAC), composto por uma E3-ligase responsável pela ubiquitinação do modulador essencial de NF- $\kappa$ B (NEMO). A ubiquitinação de NEMO é um passo essencial para a ativação da via, culminando na degradação do inibidor de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) e na translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (p50-RELA) para o núcleo (**Figura 7**)<sup>42</sup>.

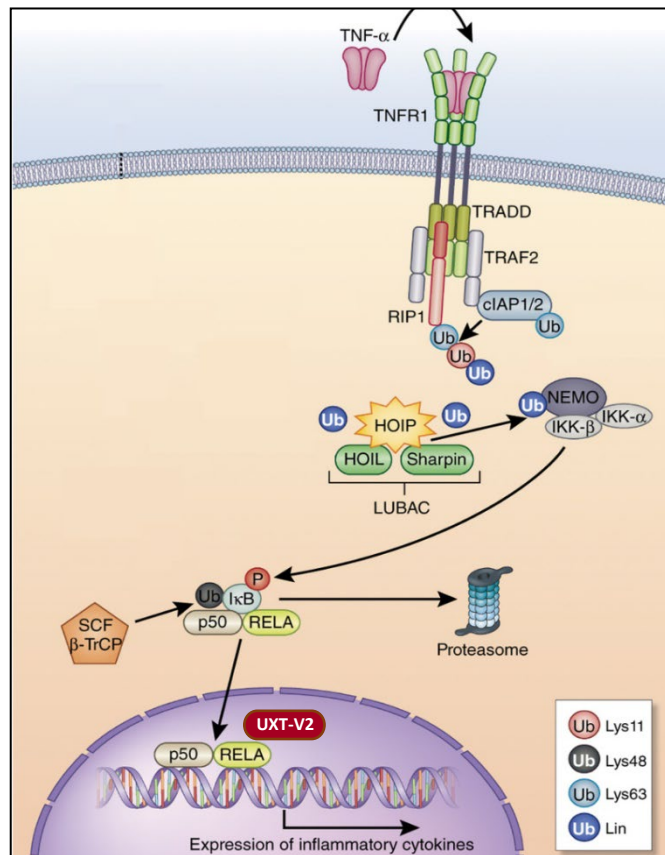


Figura 7. A via de sinalização do NF-κB. Fonte: Modificado de POPOVIC (2014).

Recentemente, foi demonstrado que Fbxo7 liga-se e medeia a conjugação de ubiquitina em cIAP1 e TRAF2, componentes citoplasmáticos da via. Ambas são E3 ubiquitina ligases que inserem cadeias de ubiquitina via K63 na proteína RIP1. A ubiquitinação de RIP1 leva à ativação do complexo quinase IKK e posterior poliubiquitinação via K48 de IκB por SCF(β-TRCP), destinando-o a degradação via proteossoma e, assim, permitindo a translocação de NF-κB (p50-RELA) para o núcleo. Logo, a ubiquitinação de cIAP1 e TRAF2 por SCF(Fbxo7) resulta na diminuição da ubiquitinação de RIP1 e, conseqüentemente, na redução da expressão dos genes regulados por NF-κB. Fbxo7 é, portanto, um regulador negativo da via, o que implica no envolvimento da proteína nos processos regulados pelo fator de transcrição NF-κB, que incluem inflamação, imunidade e câncer<sup>39</sup>.

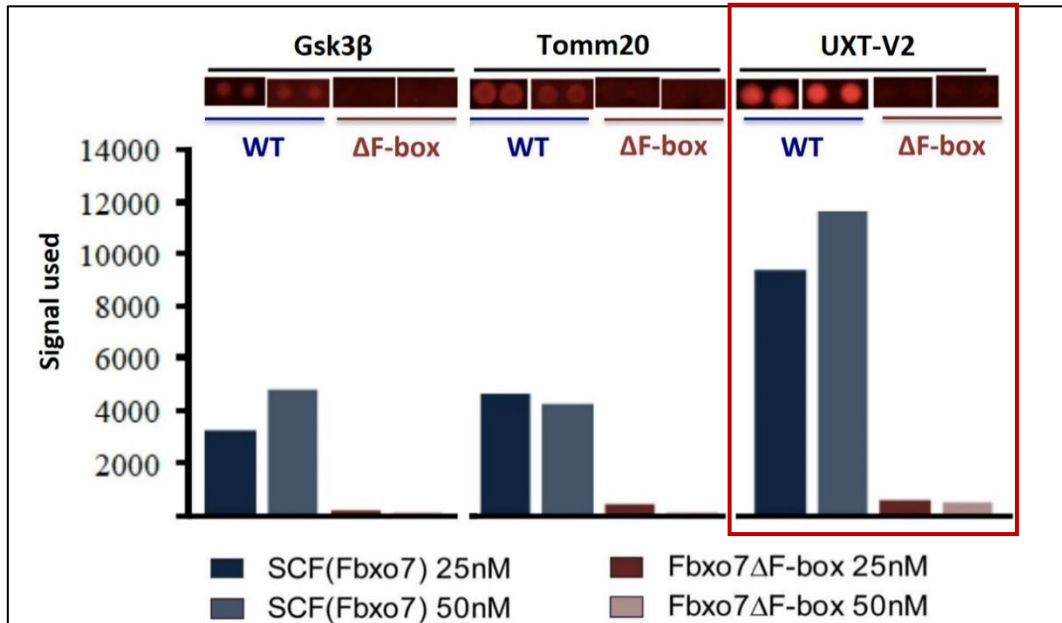
#### 1.4 A identificação de substratos das E3 ubiquitina ligases

Cada vez mais, estudos apontam para o papel fundamental das E3 ubiquitina ligases no controle e regulação das cascatas de sinalização necessárias para a função celular normal. Do mesmo modo, a regulação aberrante desses complexos enzimáticos tem sido implicada à etiologia de diversas doenças, normalmente devido a mutações dentro da própria E3 ou por interagirem com proteínas associadas a

doenças. Dessa forma, a identificação de substratos ubiquitinados por E3 ligases, e a posterior investigação das consequências dessa modificação, tornou-se uma ferramenta crucial na compreensão dos mecanismos patogênicos que levam ao surgimento de determinada patologia, além de auxiliar na busca por novos alvos terapêuticos.

Entretanto, o processo de identificação de substratos de E3 ubiquitina ligases conta com certos desafios, sobretudo devido à natureza das interações enzima-substrato, sendo eles: (1) interações entre E3 ubiquitina ligases e seus substratos são tipicamente transitórias, o que limita o uso de técnicas convencionais como ensaios baseados em imunoprecipitação; (2) proteínas ubiquitinadas por E3 ubiquitina ligases são frequentemente destinadas à degradação, o que requer o uso de estratégias para estabilização do substrato e/ou inativação do proteassoma para posterior identificação; (3) proteínas ubiquitinadas nem sempre serão destinadas a degradação, o que impõe um desafio quando forem utilizadas estratégias úteis para identificar substratos direcionados para degradação, mas não para substratos marcados para outros destinos biológicos, como a simples translocação da proteína; (4) A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional reversível, de forma que a atividade das deubiquitinases (DUBs) pode reverter a modificação antes da mesma ser identificada; e (5) proteínas podem ser ubiquitinadas por mais de uma ligase, o que resulta na necessidade de validar os pares ligase-substrato identificados por outras estratégias complementares<sup>43</sup>.

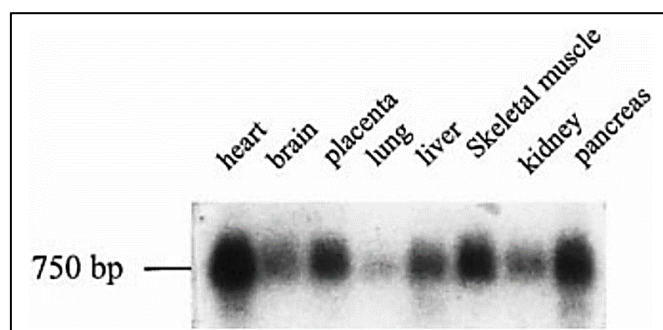
Em colaboração com o *Department of Pathology/University of Cambridge/UK*, nosso grupo de pesquisa demonstrou a eficiência do uso dos microarranjos de proteínas como fonte de substratos (*ProtoArray®*, *Life Technologies*) para a identificação de substratos canônicos da E3 ligase SCF(Fbxo7), com um total de 338 alvos proteicos identificados como possíveis substratos<sup>44</sup>. Vale destacar que vários deles são classificados em funções já descritas para Fbxo7, como a regulação do ciclo celular, morte celular e proteólise, dando embasamento à atuação de Fbxo7 nesses processos pela ubiquitinação de proteínas chave. Dos 388 alvos identificados, 3 deles foram validados: a proteína GSK3 $\beta$  (*Glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ), envolvida na via de sinalização Wnt; a proteína TOMM20 (*Translocase of outer mitochondrial membrane 20*), relacionada à homeostase mitocondrial; e a proteína UXT-V2 (*Ubiquitously expressed transcript isoform 2*), componente chave da via de sinalização do NF- $\kappa$ B e o foco deste trabalho (**Figura 8**).



**Figura 8. Identificação de três potenciais substratos da E3 SCF(Fbxo7) utilizando microarranjos de proteínas (Protoarrays®).** Duas concentrações dos complexos SCF(Fbxo7) ou de seu mutante SCF(Fbxo7-ΔF-box) foram utilizadas para a ubiquitinação *in vitro* utilizando Protoarrays® como fonte de substratos. Ambas as concentrações de SCF(Fbxo7), mas não de seu mutante, promoveram a ubiquitinação de GSK3β, TOMM20 e UXT-V2 (em destaque). Fonte: TEIXEIRA (2016).

### 1.5 A proteína UXT

A proteína UXT (*Ubiquitously Expressed Transcript*) pertence à família de proteínas *prefoldin* (PFD) e foi nomeada como tal devido à sua ampla expressão em diversos tecidos humanos, como coração, cérebro, placenta, pulmão, fígado, músculo, rim e pâncreas (Figura 9)<sup>45</sup>. Por *splicing* alternativo, pode ser encontrada sob duas isoformas, denominadas UXT-V1 e UXT-V2, sendo a última truncada no N-terminal e, portanto, apresentando 12 resíduos de aminoácidos (MVFPLPTQEPI) a menos que a isoforma 1 (UXT-V1).



**Figura 9. Expressão de UXT em tecidos humanos.** Um Northern blot contendo mRNA de vários tecidos humanos adultos (Clontech) foi hibridizado com um clone de cDNA de UXT. Houve detecção da hibridização em todos os tecidos testados, indicando a expressão do gene. Fonte: SCHRÖER (1999).

A superexpressão de UXT-V2 foi descrita em várias linhagens tumorais, incluindo células de mama, bexiga, ovário e tireoide, mas não nas linhagens normais correspondentes, sugerindo que a proteína possa estar envolvida na tumorigênese, e que, em concentrações crescentes, contribui para a agregação mitocondrial<sup>46</sup>. Em centrosomos humanos foi demonstrada a associação de UXT-V2 com  $\gamma$ -tubulina e que a sua superexpressão leva à perda de material pericentriolar, propondo que anormalidades na expressão de UXT-V2 acarretem na disfunção centrossômica<sup>47</sup>. Além disso, foi relatado que a proteína UXT-V2 é um coativador do receptor de andrógeno (AR) que aumenta sua atividade transcricional<sup>48</sup>, sendo mencionada como ART-27 (*Androgen Receptor Trapped clone-27*) em alguns trabalhos; porém a expressão de UXT-V2 no câncer de próstata é menor do que no tecido normal<sup>49</sup>. Em contraste, para o receptor de estrógeno (ER), foi relatado que a associação com a proteína UXT-V2 reprime sua atividade transcricional, entretanto, tumores de mama e linhagens de células derivadas superexpressam UXT-V2<sup>50</sup>.

Em adição, as duas isoformas de UXT têm efeitos opostos na apoptose induzida por SARM (*Sterile- $\alpha$  and HEAT armadillo motif-containing protein*), um adaptador de TLR (*Toll-like receptor*) que induz apoptose intrínseca após a ativação imune. Enquanto a proteína UXT-V1 promove uma redução na atividade da Caspase-8 que protege a célula da apoptose, a UXT-V2 induz um aumento na atividade da Caspase-8, além de intensificar a apoptose pela ativação da via extrínseca e causar a despolarização de mitocôndrias<sup>46,51</sup>. Além disso, a UXT-V1 foi descrita como um novo componente integral do signalossoma de MAVS (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*), um complexo de proteína antiviral presente nas mitocôndrias, modulando a transdução de sinal antiviral inato<sup>52</sup>.

Utilizando o sistema de duplo-híbrido, foi demonstrado que UXT-V2 interage com a subunidade RELA (p65) de NF- $\kappa$ B, sendo essencial para manter o fator no interior do núcleo (**Figura 7**), e que o *knockdown* de UXT-V2 atenua drasticamente a expressão de genes dependentes de NF- $\kappa$ B. Validou-se a proteína UXT-V2 como um componente integral do enhanceossoma transcricional de NF- $\kappa$ B, cuja presença torna-se muito mais proeminente após estímulo, sugerindo que a proteína seja recrutada dinamicamente ao enhanceossoma<sup>53</sup>. Enquanto que a UXT-V2 é um cofator transcricional que ativa a transcrição de NF- $\kappa$ B no núcleo, a UXT-V1 está localizada predominantemente no citoplasma e modula a apoptose induzida por TNF<sup>54</sup>.

Sendo a UXT-V2 um cofator essencial para a montagem do enhanceossoma transcricional de NF- $\kappa$ B e um substrato identificado da E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7), iniciamos a caracterização de um novo ponto de regulação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B, sugerindo, além da atividade de SCF(Fbxo7) no citoplasma já descrita<sup>43</sup>, uma atividade também no interior do núcleo.

| JUSTIFICATIVA

## 2 JUSTIFICATIVA

Sendo mais numerosas que as proteínas quinases, as E3 ligases do tipo SCF regulam diversos processos celulares vitais, como proliferação, diferenciação, sinalização, crescimento, migração e morte celular. No entanto, pouco se sabe sobre a maioria das funções e substratos das E3 ligases. Além disso, diversos esforços têm sido empregados nos últimos anos para elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da transcrição gênica, com destaque para os fatores de transcrição. O fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B destaca-se pela sua vasta gama de ações e pelo fato de diversas proteínas estarem envolvidas na dinâmica de sua ativação. Já foi relatado que o *knockdown* de *UXT-V2* reduz significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias dependentes da ativação de NF- $\kappa$ B. A identificação, pelo nosso grupo de pesquisa, da *UXT-V2* como um potencial substrato de SCF(Fbxo7) nos permitiu propor um novo ponto de regulação da via, resultante da ubiquitinação de *UXT-V2*. Entretanto, apesar de Fbxo7 e *UXT-V2* estarem envolvidos em processos celulares semelhantes, como a via de sinalização do NF- $\kappa$ B e a agregação mitocondrial induzida por estresse, a interação entre essas proteínas ainda não havia sido explorada. Somase ainda o fato de poucos estudos envolvendo a proteína UXT abordarem sua isoforma 1, sendo a grande maioria focados na isoforma 2 (*UXT-V2/ART-27*). Por fim, baseando-se nos dados descritos na literatura correlacionando a proteína *UXT-V2* com ambas as vias de sinalização androgênica e estrogênica pela interação com os receptores de andrógeno (AR) e de estrogênio (ER), e em nossos dados de interação entre Fbxo7 e *UXT-V2*, propusemos explorar uma relação direta entre SCF(Fbxo7) e os receptores AR e ER.



## | OBJETIVOS

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Explorar as consequências funcionais da interação e ubiquitinação das isoformas 1 e 2 da proteína UXT pela E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar se ambas as isoformas de UXT interagem com Fbxo7;
- Avaliar se ambas as isoformas de UXT são ubiquitinadas por SCF(Fbxo7);
- Identificar o tipo de cadeia de ubiquitina inserida em ambas as isoformas de UXT;
- Avaliar a estabilidade de ambas as isoformas de UXT na presença de Fbxo7;
- Avaliar as consequências da ubiquitinação de UXT-V2 por SCF(Fbxo7) na via do NF- $\kappa$ B;
- Avaliar se ambos os receptores AR e ER interagem com Fbxo7 e se a presença de UXT-V2 exerce efeito nessa interação;
- Avaliar se ambos os receptores AR e ER são ubiquitinados por SCF(Fbxo7) e se a presença de UXT-V2 exerce efeito nessa ubiquitinação.



## 4 METODOLOGIA

A modalidade desta pesquisa é experimental, segundo Gil,

A pesquisa experimental constitui o delineamento mais prestigiado nos meios científicos. Consiste essencialmente em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis capazes de influenciá-lo e definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto. Trata-se, portanto, de uma pesquisa em que o pesquisador é um agente ativo, e não um observador passivo. (GIL, 2009).

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Bioquímica Celular – LBqC, situado no Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos – DGE/UFSCar, obedecendo a todos os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) e às Boas Práticas Laboratoriais (BPLs) para a segurança do manipulador e confiabilidade dos resultados experimentais obtidos.

### 4.1 Esquema geral da metodologia

Abaixo, uma representação esquemática dos ensaios celulares, destacando as duas principais técnicas que fundamentaram a parte experimental deste projeto: a imunoprecipitação (IP), quando desejada a purificação de uma das proteínas do extrato proteico total; e o *western blot* (WB), para a imunodeteção com anticorpos específicos. Nos ensaios que não requeriam a purificação de uma das proteínas de interesse e nos *inputs* das imunoprecipitações, os extratos proteicos totais foram diretamente resolvidos por SDS-PAGE 12% e submetidos à *western blot* (Figura 10).

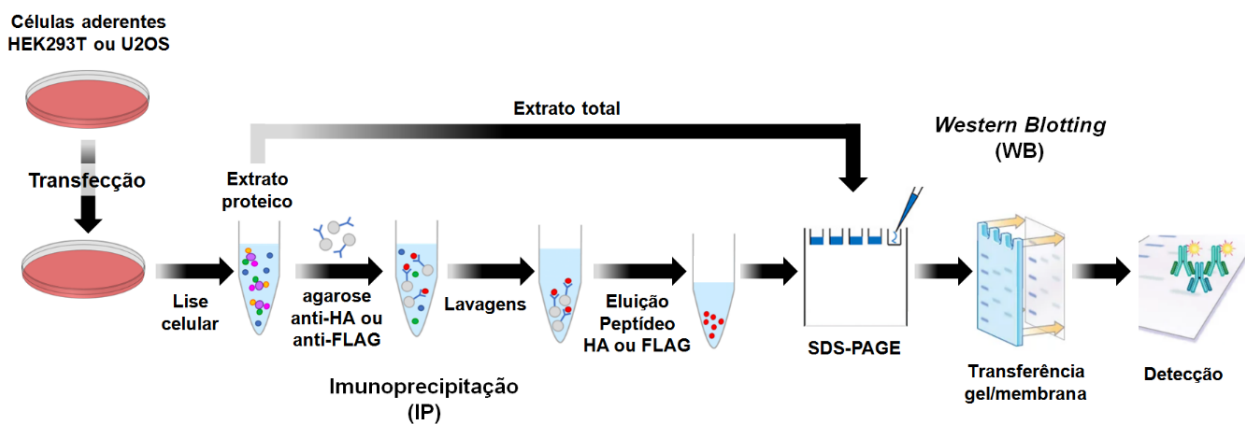


Figura 10. Esquematização dos ensaios realizados em células. Fonte: do autor (2021).

## 4.2 Cultura de células

Para os experimentos realizados em células, foram utilizadas duas linhagens celulares distintas: U2OS (*Human bone osteosarcoma epithelial cells*) ou HEK293T (*Human embryonic kidney 293T cells*), ambas obtidas do ATCC (*American Type Culture Collection*). As células foram cultivadas em DMEM *high glucose* (*Corning*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, *Gibco*), penicilina (100 unidades), estreptomicina (100 µg/mL) e L-glutamina (0,292 mg/mL) (*Thermo Fisher Scientific*) e incubadas a 37°C sob atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Nos repiques, as células foram lavadas uma vez com tampão fosfato-salino 1x (PBS, *HyClone*) e soltas das placas com tripsina (*TrypLe Express, Thermo Fisher Scientific*) para novas passagens celulares.

## 4.3 Reagentes e anticorpos

Cicloheximida (C1988), coquetel inibidor de protease SIGMAFAST™ (S8820), agarose-anti-FLAG® M2 (A2220), agarose-anti-HA (E6779), peptídeo FLAG® (F3290), peptídeo HA (I2149) e todos os *primers* para PCR foram adquiridos da *Sigma-Aldrich*. Agarose-anti-GFP (gta-10) foi adquirida da *Chromotek*. Ubiquitina humana (Ue100H), biotina-ubiquitina (UB-560), enzima E1 (UBE1) (E-304), Enzima E2 UbcH5a/UBE2D1 (E2-616), tampão de reação 10x (B-70), solução Mg-ATP (B-20) e inibidor de proteassoma MG132 (I-130) foram adquiridos da *Boston Biochem*. *Lipofectamine®2000 Transfection Reagent* foi adquirida da *Thermo Fisher Scientific*. Os anticorpos para HA (H3663) (diluição de uso 1:1000), FLAG (F1804) (1:500), Fbxo7 (SAB1407251) (1:1000), GAPDH (G8795) (1:10000) e actina (A3853) (1:2000) foram adquiridos da *Sigma-Aldrich*. Os anticorpos para Myc (#2272) (1:1000), poliubiquitina anti-K63 (#5621) (1:500), poliubiquitina anti-K48 (#8081) (1:1000), AKT (#4691) (1:1000) e Histona H3 (1B1B2) (1:1000) foram adquiridos da *Cell Signaling Technologies*. O anticorpo para Fbxo7 (ARP43128) (1:1000) foi adquirido da *Aviva Systems Biology*. O anticorpo para β-actina foi adquirido da *Merck Millipore* (MAB1501) (1:10000). O anticorpo para GFP foi adquirido da *ABclonal* (AE012) (1:1000). Os anticorpos secundários IgG-mouse (#074-1806) (1:7500) e IgG-rabbit (#074-1516) (1:7500) foram adquiridos da *Sera Care*.

## 4.4 Lista de plasmídeos

- pEGFP-N1 – Obtido da *Clontech*;
- pcDNA3 – Gentilmente doado pela Profa. Dra. Heike Laman;
- pcDNA3-Ub-myc-6xHis – Gentilmente doado pelo Prof. Dr. Marcelo D. Gomes;
- pcDNA3-FLAG-Fbxo7 – Gentilmente doado pela Profa. Dra. Heike Laman;

- pcDNA3-FLAG-Fbxo7-ΔF-box – Gentilmente doado pela Profa. Dra. Heike Laman;
- pcDNA3-UXT-V2-HA – Construído por PCR a partir do plasmídeo pGEX2-UXT, gentilmente doado pelo Prof. Dr. Chris Bartholomew;
- pcDNA3-UXT-V1-HA – Construído por PCR a partir do plasmídeo pcDNA3-UXT-V2-HA. A sequência de 12 aminoácidos N-terminais da UXT-V1 foi adicionada ao *primer forward* e a sequência da tag-HA foi adicionada ao *primer reverse*;
- pcDNA3-UXT-V1-M13G-HA – Obtido da *Epoch Life Science*;
- siRNA-Controle e siRNA-Fbxo7 – Obtidos da *Sigma-Aldrich*;
- pEGFP-C1-AR – Obtido da *Addgene*;
- pEGFP-C1-ER – Obtido da *Addgene*.

#### 4.5 Ensaio de ubiquitinação *in vitro*

Para o ensaio de ubiquitinação *in vitro*, o complexo SCF(Fbxo7) e seu mutante SCF(Fbxo7-ΔF-box) foram purificados de células HEK293T transfectadas com FLAG-Fbxo7 ou FLAG-Fbxo7-ΔF-box em combinação com SKP1-HA, RBX1-myc e Cullin1 (4 μg de cada plasmídeo) por 36 horas, utilizando o agente de transfecção PEI (*Polyethylenimine*, 1 mg/mL). As células foram lisadas com tampão de lise NP-40 (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 225 mM KCl e 1% NP-40) suplementado com um coquetel de inibidores de proteases SIGMAFAST 1x, inibidores de fosfatases NaF 10 mM e Na<sub>3</sub>(VO<sub>4</sub>) 1 mM por 30 minutos em gelo. Os lisados celulares foram centrifugados a 16.900 x g/20 min/4°C e os sobrenadantes foram submetidos à imunoprecipitação (IP) com agarose anti-FLAG durante 3 horas/4°C. A eluição por competição foi feita com peptídeo FLAG (300 μg/mL) em tampão de eluição (HEPES 10 mM, pH 7,9; KCl 225 mM MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e NP-40 0,1%) durante 1 hora/4°C, após as resinas serem lavadas 2 vezes com tampão de lise e 4 vezes com tampão de eluição. SCF(Fbxo7) ou SCF(Fbxo7-ΔF-box) purificados de células HEK293T foram utilizados nas concentrações de 25 e 50 nM, em combinação com uma mistura de enzima E1 (100 nM), enzima E2-UbcH5a (500 nM), biotina-ubiquitina (20 mM), Mg-ATP (2 mM), tampão de reação 10x e UXT-V2 como substrato, purificada de células HEK293T transfectadas com UXT-V2-HA por 36 horas e lisadas seguindo o mesmo protocolo utilizado para os complexos. As reações foram incubadas a 30°C durante 90 minutos e, então, resolvidas em SDS-PAGE 12% e submetidas a *western blot* (WB).

#### 4.6 Ensaio de interação em células

Para os ensaios de interação, células HEK293T foram transfectadas com o vetor vazio pcDNA3, FLAG-Fbxo7 ou o mutante FLAG-Fbxo7-ΔF-box e UXT-V2-HA ou UXT-V1-

M13G-HA (4 µg de cada plasmídeo) por 36 horas, utilizando o agente de transfecção PEI (*Polyethylenimine*, 1 mg/mL). As células foram lisadas com tampão de lise NP-40 (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 225 mM KCl e 1% NP-40) suplementado com um coquetel de inibidores de proteases SIGMAFAST 1x, inibidores de fosfatases NaF 10 mM e Na<sub>3</sub>(VO<sub>4</sub>) 1 mM por 30 minutos em gelo. Os lisados celulares foram centrifugados a 16.900 x g/20 min/4°C e os sobrenadantes foram submetidos à imunoprecipitação (IP) com agarose anti-FLAG durante 3 horas/4°C. As proteínas poliubiquitinadas foram eluídas por competição com peptídeo FLAG (300 µg/mL) em tampão de eluição (HEPES 10 mM, pH 7,9; KCl 225 mM MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e NP-40 0,1%) durante 1 hora/4°C, após as resinas serem lavadas 2 vezes com tampão de lise e 4 vezes com tampão de eluição e, então, foram resolvidas por SDS-PAGE 12% e submetidas a *western blot*.

#### 4.7 Ensaio de ubiquitinação em células

Para os ensaios de ubiquitinação, células HEK293T foram transfectadas com o vetor vazio pcDNA3, FLAG-Fbxo7 ou o mutante FLAG-Fbxo7-ΔF-box e UXT-V2-HA ou UXT-V1-M13G-HA, em combinação com Ub-myc-6xHis (4 µg de cada plasmídeo), por 36 horas, utilizando o agente de transfecção PEI (*Polyethylenimine*, 1 mg/mL). As células transfectadas foram tratadas com 10 µM do inibidor de proteassoma MG132 por 6 horas antes da lise. As células foram lisadas com tampão de lise NP-40 (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 225 mM KCl e 1% NP-40) suplementado com um coquetel de inibidores de proteases SIGMAFAST 1x, inibidores de fosfatases NaF 10 mM e Na<sub>3</sub>(VO<sub>4</sub>) 1 mM por 30 minutos em gelo. Os lisados celulares foram centrifugados a 16.900 x g/20 min/4°C e os sobrenadantes foram submetidos à imunoprecipitação (IP) com agarose anti-HA durante 3 horas/4°C. As proteínas poliubiquitinadas foram eluídas por competição com peptídeo HA (300 µg/mL) em tampão de eluição (HEPES 10 mM, pH 7,9; KCl 225 mM MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e NP-40 0,1%) durante 1 hora/4°C, após as resinas serem lavadas 2 vezes com tampão de lise e 4 vezes com tampão de eluição e, então, foram resolvidas por SDS-PAGE 12% e submetidas a *western blot*.

Após a primeira marcação com anticorpo cadeia específica anti-K63 de coelho, as membranas foram incubadas em um tampão de *deblotting* (glicina 200 mM pH 2,0, SDS 0,1%, *Tween* 1%) a 37°C por 15 minutos. Essa incubação foi repetida 3 vezes e a membrana foi lavada com TBST e bloqueada por 1 hora com uma solução de leite em pó desnatado 5% em TBST. Em seguida, a membrana foi testada com o anticorpo anti-HRP de coelho para garantir a remoção dos sinais anteriores. A segunda marcação com anticorpo cadeia específica anti-K48 de coelho foi então realizada.

#### 4.8 Análise de restrição de cadeia de ubiquitina (UbiCRest)

O ensaio de UbiCRest foi realizado conforme descrito no protocolo de Hospenthal *et al.* (2015)<sup>55</sup>. Células HEK293T foram transfectadas com UXT-V2-HA e FLAG-Fbxo7 (4 µg de cada plasmídeo) durante 36 horas, utilizando o agente de transfecção PEI (*Polyethylenimine*, 1 mg/mL), e tratadas com 10 µM do inibidor de proteassoma MG132 6 horas da lise. As células foram lisadas com tampão de lise NP-40 (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 225 mM KCl e 1% NP-40) suplementado com um coquetel de inibidores de proteases SIGMAFAST 1x, inibidores de fosfatases NaF 10 mM e Na<sub>3</sub>(VO<sub>4</sub>) 1 mM por 30 minutos em gelo. Os lisados celulares foram centrifugados a 16.900 x g/20 min/4°C e os sobrenadantes foram submetidos à imunoprecipitação (IP) com agarose anti-HA durante 3 horas/4°C. As proteínas poliubiquitinadas foram eluídas por competição com peptídeo HA (300 µg/mL) em tampão de eluição (HEPES 10 mM, pH 7,9; KCl 225 mM MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e NP-40 0,1%) durante 1 hora/4°C, após as resinas serem lavadas 2 vezes com tampão de lise e 4 vezes com tampão de eluição e, então, armazenadas a - 80°C. Enzimas deubiquitinasas (DUBs) purificadas foram diluídas em tampão de diluição 2x (50 mM Tris, pH 7,4, 300 mM NaCl e 20 mM DTT) e adicionadas às amostras por 30 minutos a 37°C. As reações foram interrompidas com tampão Laemmli e, então, resolvidas por SDS-PAGE 12% e submetidas a *western blot* com anticorpos anti-poliubiquitina.

#### 4.9 Ensaio de estabilidade com cicloheximida (CHX)

Para os ensaios de estabilidade, células U2OS foram transfectadas com FLAG-Fbxo7 ou FLAG-Fbxo7-ΔF-box em combinação com UXT-V2-HA ou UXT-V1-M13G-HA (4 µg de cada plasmídeo) por 36 horas, utilizando o agente de transfecção PEI (*Polyethylenimine*, 1 mg/mL). 12 horas antes da lise foi realizado o *starvation* das células: o meio DMEM completo foi retirado de todos os poços e substituído por meio DMEM sem soro. As células foram tratadas com cicloheximida (40 µg/mL), um inibidor da síntese proteica, por 0, 2 ou 4 horas antes da lise na presença ou ausência do inibidor de proteassoma MG132 (10 µM, 4 horas). As células foram lisadas com tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio e 1% SDS) suplementado com um coquetel de inibidores de proteases SIGMAFAST 1x, inibidores de fosfatases NaF 10 mM e Na<sub>3</sub>(VO<sub>4</sub>) 1 mM por 30 minutos em gelo. O lisado foi centrifugado a 16.900 x g/45 min/4°C e os sobrenadantes contendo o extrato proteico total foram resolvidos por SDS-PAGE 12% e submetidos à *western blot*.



#### 4.10 Knockdown de FBXO7

Células HEK293T foram transfectadas com 100 nM de siRNA-Fbxo7 ou siRNA-controle negativo universal na presença de 0,5 µg de UXT-V2-HA utilizando *Lipofectamine*<sup>®</sup>2000. Após 36 horas, as células foram lisadas com tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sódio e 1% SDS) suplementado com um coquetel de inibidores de proteases SIGMAFAST 1x, inibidores de fosfatases NaF 10 mM e Na<sub>3</sub>(VO<sub>4</sub>) 1 mM por 30 minutos em gelo. O lisado foi centrifugado a 16.900 x g/45 min/4°C e os sobrenadantes contendo o extrato proteico total foram resolvidos por SDS-PAGE 12% e submetidos à *western blot*.

#### 4.11 Transcriptase Reversa seguida de PCR Quantitativa (RT-qPCR)

O RNA total foi extraído de células HEK293T transfectadas com pEGFP-N1 ou UXT-V2-HA com o kit *Direct-zol RNA MiniPrep* (Zymo Research) e tratado com DNase I (*Invitrogen*) para remoção de DNA residual, de acordo com as instruções dos fabricantes. As amostras foram quantificadas em NanoVue™ (*GE Healthcare Life Sciences*) e 300 ng de RNA foram transcritos com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Thermo Fisher Scientific*). As amostras de cDNA foram diluídas 25x para uso como *template* e os *primers* foram usados a 150 nM em reações de 15 µL com *SYBR*<sup>™</sup> *Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). As amplificações foram realizadas no equipamento ABI 7500 Fast Real-Time PCR (*Applied Biosystems*) com os seguintes *primers*:

- FBXO7 forward: 5' AGTCCCTGCTGTGCACCTG 3'
- FBXO7 reverse: 5' CGCTGGAATGTCATCTTGAAGA 3'
- GAPDH forward: 5' AGAAGGCTGGGGCTCATTG 3'
- GAPDH reverse: 5' AGGGGCC ATCCACAGTCTTC 3'

#### 4.12 Preparo de extratos totais e subcelulares

Os extratos proteicos totais foram obtidos pela transfecção de células HEK293T ou U2OS com pcDNA3 ou FLAG-Fbxo7 ou FLAG-Fbxo7-ΔF-box, em combinação com UXT-V2-HA (4 µg de cada plasmídeo), utilizando o agente de transfecção PEI (*Polyethylenimine*, 1 mg/mL). Após 36 horas, as células foram lisadas em tampão de amostra Laemmli 2x e submetidas a SDS-PAGE 12% e *western blot*. Para o enriquecimento da fração subcelular, células U2OS foram transfectadas com o vetor vazio pcDNA3 ou UXT-V2-HA ou UXT-V1-M13G-HA, em combinação com FLAG-Fbxo7, e lisadas com o kit *NE-PER*<sup>®</sup> *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (*Thermo*

*Fisher Scientific*). Para normalização da quantidade de proteínas na fração nuclear foi utilizada a proteína Histona H3 e, para a fração citoplasmática, a proteína AKT. Os sobrenadantes contendo os extratos subcelulares foram submetidos à SDS-PAGE 12% e *western blot*.

#### 4.13 Ensaio de gene repórter de NF- $\kappa$ B

Células HEK293 expressando estavelmente um gene repórter para a via do NF- $\kappa$ B fusionado à *Firefly* luciferase (pBlIx-luc) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Dario Zamboni (FMRP/USP). As células foram cultivadas em placas de 96 poços *Corning Costar*<sup>®</sup> com  $5 \times 10^5$  células por poço e, após 24 horas de cultivo, foram transfectadas com pEGFP-N1 ou FLAG-Fbxo7 ou FLAG-Fbxo7- $\Delta$ F-box, em combinação com UXT-V2-HA, utilizando *Lipofectamine*<sup>®</sup>2000. Após 24 horas, as células foram tratadas com TNF- $\alpha$  10 ng/mL em meio DMEM sem soro e sem fenol (*Gibco*) por 12 horas, lisadas com o kit *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega) e transferidas para uma placa branca de 96 poços *Corning Costar*<sup>®</sup>. A medição das atividades da luciferase *Firefly* e *Renilla* foi realizada no luminômetro SpectraMax i3 (*Molecular Devices*).

#### 4.14 Microscopia confocal

Células U2OS foram cultivadas sobre lamínulas de vidro em meio DMEM e transfectadas com UXT-V2-HA ou UXT-V1-M13G-HA, em combinação com FLAG-Fbxo7, utilizando *Lipofectamine*<sup>®</sup>2000. As células foram lavadas 1 vez com PBS antes de serem fixadas e permeabilizadas às lamínulas com PBS contendo 2% de paraformaldeído e 0,3% de Triton X-100 por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e bloqueadas com PBS contendo 2% de albumina sérica bovina (BSA) por 1 hora em temperatura ambiente. As incubações dos anticorpos primários anti-Fbxo7 e anti-HA foram realizadas por 1 hora à temperatura ambiente em PBS contendo 2% de BSA (diluições: anti-Fbxo7 1:50; anti-HA 1:600), seguido pela incubação dos anticorpos secundários acoplados com Alexa 488 e Alexa 594 (*Thermo Fisher Scientific*) (diluição 1:800). As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com meio de montagem *ProLong Diamond Antifade Mountant* contendo DAPI (*Invitrogen*). As amostras foram analisadas no microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 780 (*Carl Zeiss*) com a objetiva C-Apocromática 63 $\times$ /1,2 W, situado no Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifoton (LMMM) do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

#### 4.15 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao Teste t de *Student* não pareado (quando havia apenas dois grupos), Análise de Variância Unidirecional (ANOVA *one-way*) ou Análise de Variância Bidirecional (ANOVA *two-way*) com Bonferroni ou Newman-Keuls *posttest*. As análises e os gráficos foram gerados no *software* Prism8 (*GraphPad*<sup>®</sup>) e a significância estatística foi aceita para valores de  $p \leq 0,05$ , sendo \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$  e \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Análises densitométricas de bandas foram realizadas no *software* Image J (*National Institutes of Health*). Todas as imagens foram capturadas no ChemiDoc XRS+ (*BioRad*), 1 imagem a cada 3 segundos totalizando 300 segundos, e selecionada para análise a imagem captada imediatamente antes da saturação dos pixels.

## | RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

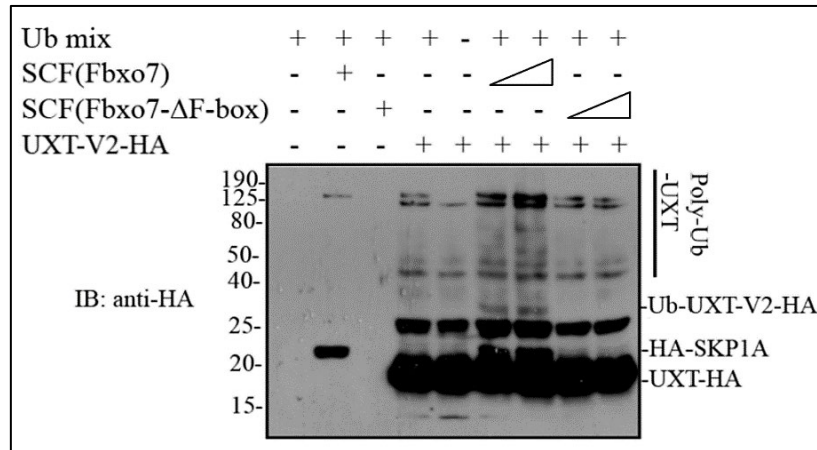
Os resultados dispostos nesta seção, com exceção dos tópicos **5.11** e **5.12** (resultados não publicados), pertencem ao artigo *The E3 ubiquitin ligase SCF(Fbxo7) mediates proteasomal degradation of UXT isoform 2 (UXT-V2) to inhibit the NF- $\kappa$ B signaling pathway*, publicado recentemente (2021) na revista *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects/Elsevier*, no qual a aluna foi primeira autora (**Anexo 8.2.1**).

### 5.1 UXT-V2 é poliubiquitinada *in vitro* por SCF(Fbxo7)

Iniciamos a caracterização bioquímica validando a proteína UXT-V2 como um substrato de SCF(Fbxo7), descrita como um potencial alvo de ubiquitinação pelo uso de microarranjos de proteínas como fonte de substratos (*ProtoArray*<sup>®</sup>)<sup>45</sup>. Para isso, realizamos um ensaio de ubiquitinação *in vitro* utilizando os complexos SCF(Fbxo7) ou seu mutante SCF(Fbxo7- $\Delta$ F-box), em concentrações crescentes de 25 e 50 nM, com a UXT-V2-HA como substrato. O mutante Fbxo7- $\Delta$ F-box é incapaz de formar uma E3 ligase estável devido à ausência do domínio F-box que interage com SKP1 e, portanto, atua como um controle negativo. As reações foram realizadas na presença de uma mistura composta pelas enzimas E1 e E2, biotina-ubiquitina, tampão de ubiquitina e ATP.

A marcação de proteína poliubiquitinada é caracterizada por formar um arraste, em decorrência da adição de cadeias de ubiquitina com comprimentos variados, as quais podem somar > 200 kDa à sua massa molecular original. A revelação com o anticorpo anti-HA exibiu o sinal de arraste correspondente à proteína UXT-V2 poliubiquitinada apenas na presença de SCF(Fbxo7) e intensificado pelo aumento na concentração do complexo, demonstrando a especificidade dos ensaios de ubiquitinação *in vitro* (colunas 6 e 7, **Figura 11**). Observamos que nos controles negativos ausentes da UXT-V2-HA não houve qualquer detecção de sinal, mesmo na presença do complexo selvagem, reforçando a especificidade da relação ligase-substrato (colunas 1, 2 e 3, **Figura 11**). Da mesma forma, os controles negativos com a presença de UXT-V2, porém ausentes do complexo SCF(Fbxo7), também não exibiram o sinal de arraste correspondente à UXT-V2 poliubiquitinada (colunas 4 e 5, **Figura 11**). Este dado indicou que as marcações observadas nas colunas 6 e 7 foram especificamente determinadas por SCF(Fbxo7).

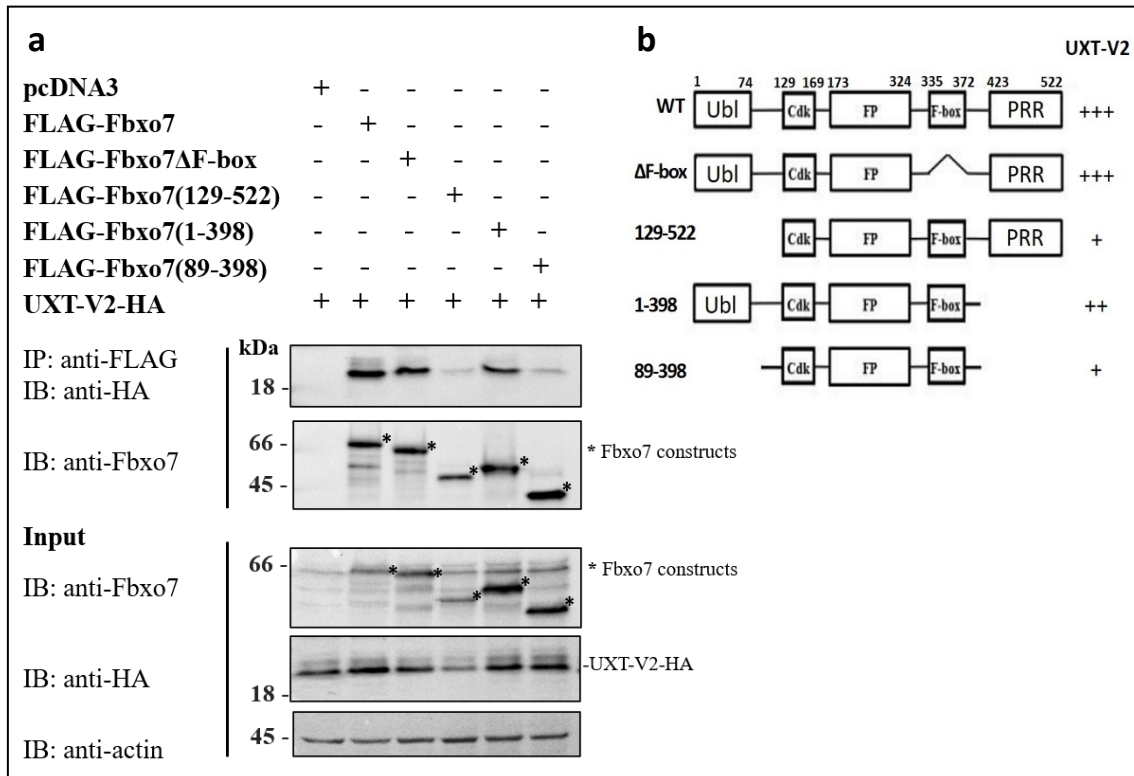
Por fim, o mutante SCF(Fbxo7- $\Delta$ F-box) apresentou um sinal de poliubiquitinação semelhante ao controle negativo da coluna 4 em ambas as concentrações utilizadas (colunas 8 e 9, **Figura 11**), consistente com a incapacidade de formar uma E3 ligase estável por não interagir com SKP1, o que foi confirmado pela detecção da banda correspondente a HA-SKP1 apenas na presença do complexo selvagem (colunas 2, 6 e 7, **Figura 11**). Juntos, esses resultados validaram a UXT-V2 como um substrato de SCF(Fbxo7).



**Figura 11. UXT-V2 é poliubiquitinada *in vitro* por SCF(Fbxo7).** Ubiquitinação *in vitro* com SCF(Fbxo7) ou Fbxo7-ΔF-box e UXT-V2-HA como substrato. As amostras foram submetidas à WB e o anticorpo anti-HA foi usado para visualizar a UXT-V2-HA poliubiquitinada.

## 5.2 O domínio Ubl de Fbxo7 é essencial para a interação com UXT-V2

Para explorar as interações entre Fbxo7 e UXT-V2, células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos codificando UXT-V2-HA e FLAG-Fbxo7 ou os seguintes truncados de Fbxo7 ausentes de domínios específicos: domínio Ubl (1–88), domínio de ligação ao substrato (89–128), domínio F-box (Fbxo7-ΔF-box) (335–372) e região rica em prolina (PRR) (399–522). Em comparação com a construção selvagem, a deleção do domínio F-box não afetou a interação de Fbxo7 com UXT-V2 (colunas 2 e 3, **Figura 12a**), indicando que, apesar de incapaz de formar um complexo E3 estável, este mutante mantém seu domínio de ligação ao substrato. Por outro lado, deleções a N-terminal de Fbxo7 que removeram o domínio Ubl e o domínio de ligação ao substrato reduziram substancialmente a sua interação com UXT-V2 (coluna 4, **Figura 12a**). Já a deleção da região rica em prolina (PRR), situada a C-terminal, não reduziu significativamente a interação Fbxo7/UXT-V2 (coluna 5, **Figura 12a**). Essa construção indicou que, apesar de o mutante truncado a N e a C-terminal (89-398) também ter apresentado uma redução significativa na interação com UXT-V2 (coluna 6, **Figura 12a**), ela decorreu da remoção do domínio Ubl, situado a N-terminal. A coluna 1 - células sem expressão de Fbxo7 - é importante para mostrar a especificidade das esferas de agarose anti-FLAG. Estes resultados, esquematizados na **Figura 12b**, demonstraram que o domínio Ubl de Fbxo7 exerce fundamental importância para sua interação com UXT-V2.



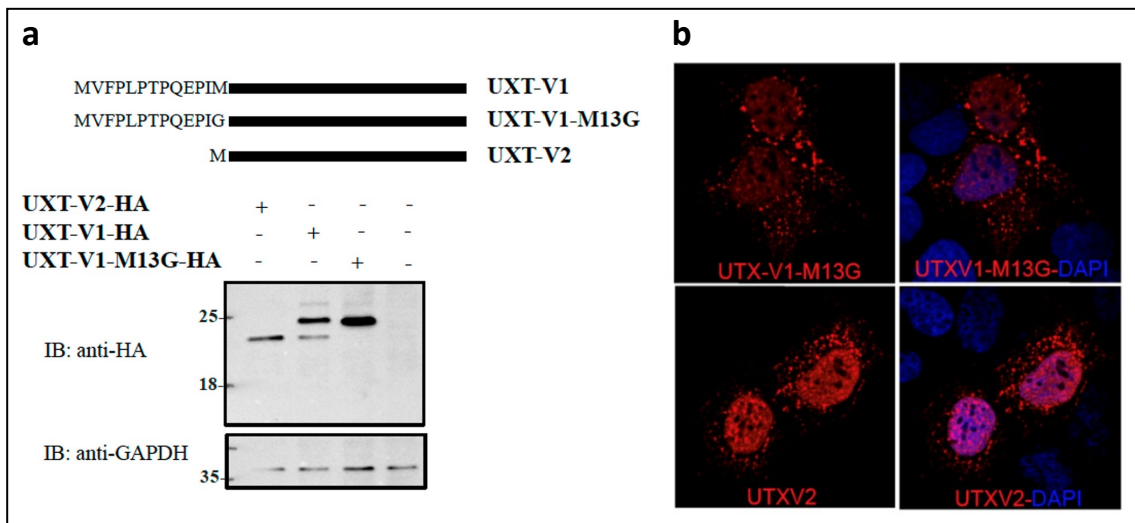
**Figura 12. Fbxo7 interage com UXT-V2 pelo domínio localizado a N-terminal. (a)** Extratos proteicos obtidos de células HEK293T transfectadas com as construções de FLAG-Fbxo7 indicadas e UXT-V2-HA foram imunoprecipitados (IP) com agarose anti-FLAG. Eluído e *input* (extrato total) foram submetidos à *western blot* (IB) com os anticorpos indicados. **(b)** Esquematização das construções de Fbxo7 mostrando a deleção de domínios específicos. Os sinais de (+) indicam a intensidade da interação com UXT-V2 para cada truncado de Fbxo7.

### 5.3 UXT-V1 localiza-se no citoplasma e UXT-V2 no núcleo

Além da UXT-V2, uma variante de *splicing* mais longa em 12 resíduos de aminoácidos a N-terminal, denominada UXT-V1, foi descrita<sup>51,53</sup>. Observamos que o plasmídeo UXT-V1-HA, construído por PCR a partir do plasmídeo UXT-V2-HA, acabava também expressando a isoforma 2 de UXT (coluna 2, **Figura 13a**), em decorrência de um segundo códon de iniciação ATG localizado após os 12 resíduos de aminoácidos iniciais de UXT-V1, utilizado pela maquinaria de tradução da célula para produção de UXT-V2. Isso dificultava os estudos específicos para a isoforma 1. Para contornar este problema, adquirimos uma versão UXT-V1 com a substituição da segunda metionina ATG por uma glicina, produzindo a UXT-V1-M13G, que impediu a expressão de UXT-V2 (coluna 3, **Figura 13a**).

Para analisar a distribuição celular das isoformas de UXT, realizamos a microscopia confocal de linhagens celulares U2OS transfectadas com UXT-V2-HA ou UXT-V1-M13G-HA. Observamos que ambas as isoformas estavam presentes no citosol e no núcleo das células, sendo a UXT-V1 predominantemente citoplasmática e a UXT-V2

predominantemente nuclear (**Figura 13b**). Esses achados corroboram com os resultados descritos na literatura, relacionando a UXT-V2 à via de sinalização do NF- $\kappa$ B como um componente integral do enhanceossoma transcrricional de NF- $\kappa$ B, essencial para manter o fator de transcrição no interior do núcleo, e às vias de sinalização androgênica e estrogênica, regulando a atividade transcrricional dos reguladores de andrógeno e estrógeno, respectivamente<sup>48-50,53</sup>. A localização predominantemente citoplasmática da UXT-V1 está relacionada a sua função de proteção das células contra a apoptose induzida por TNF por meio de sua interação com TRAF2, uma E3 ligase citosólica, e ao complexo de sinalização antiviral MAVS presente nas mitocôndrias<sup>52,54</sup>.



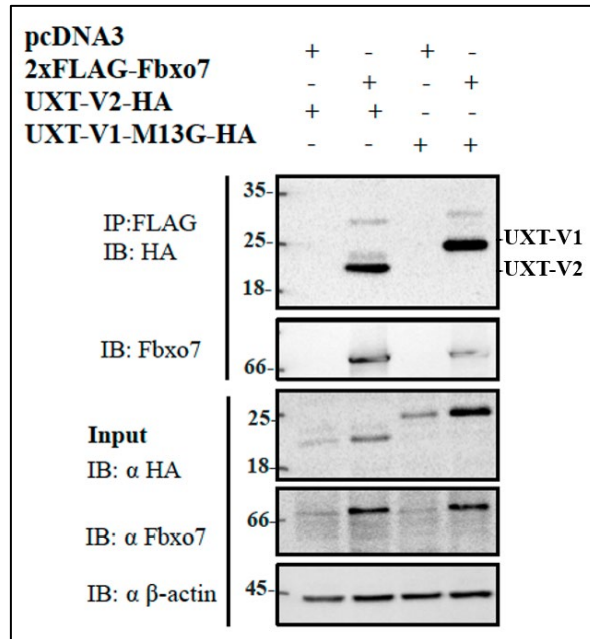
**Figura 13. UXT-V1 é predominantemente citoplasmática e UXT-V2 predominantemente nuclear.** (a) Representação dos plasmídeos para UXT-V1, UXT-V1-M13G e UXT-V2 e sua expressão em células HEK293T transfectadas com cada plasmídeo. (b) Microscopia confocal de células U2OS transfectadas com UXT-V1-M13G-HA ou UXT-V2-HA. As lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-HA e os núcleos marcados por DAPI (azul). Observa-se a colocalização de UXT-V2 com DAPI.

#### 5.4 Fbxo7 interage com UXT-V1 e UXT-V2

As isoformas de UXT possuem diferentes funções e localizações celulares. Para avaliar se a isoforma 1 de UXT (UXT-V1) também interage com Fbxo7, células HEK293T foram transfectadas com FLAG-Fbxo7 em combinação com UXT-V1-M13G-HA ou UXT-V2-HA, utilizada como parâmetro de comparação. Observamos que, semelhante a UXT-V2, a UXT-V1-M13G também interagiu com Fbxo7, sendo imunodetectada pelo anticorpo anti-HA após imunoprecipitação do lisado celular com agarose anti-FLAG (colunas 2 e 4, **Figura 14**). As colunas 1 e 3 - células sem expressão de Fbxo7 - são importantes para mostrar a especificidade das esferas de agarose anti-FLAG. Este resultado demonstrou que os 12 resíduos de aminoácidos adicionais da isoforma 1 não interferiram na interação com Fbxo7, sugerindo que UXT-V1 e UXT-V2 apresentam



elevada identidade estrutural e sendo, ambas, potenciais substratos de SCF(Fbxo7) para ubiquitinação.

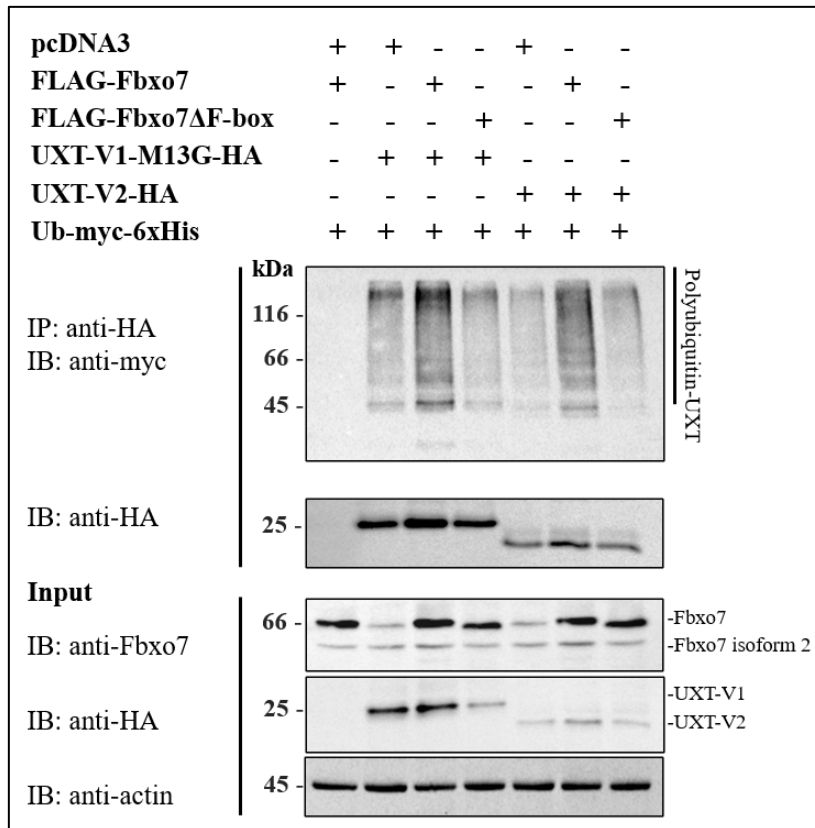


**Figura 14. Fbxo7 interage com UXT-V1 e UXT-V2.** Extratos proteicos de células HEK293T transfectadas com FLAG-Fbxo7 e UXT-V1-M13G-HA ou UXT-V2-HA foram imunoprecipitados (IP) com agarose anti-FLAG. Eluído e *input* (extrato total) foram submetidos à *western blot* (IB) com os anticorpos indicados.

### 5.5 SCF(Fbxo7) poliubiquitina UXT-V1 e UXT-V2

Como vimos que UXT-V1-M13G e UXT-V2 interagem com Fbxo7, e UXT-V2 foi confirmada como substrato de SCF(Fbxo7) pelo ensaio de ubiquitinação *in vitro*, realizamos ensaios de ubiquitinação em células para avaliar se UXT-V1 e UXT-V2 são substratos de SCF(Fbxo7) para ubiquitinação em nível celular. Para isso, células HEK293T foram transfectadas com UXT-V1-M13G-HA ou UXT-V2-HA e FLAG-Fbxo7 ou os controles negativos pcDNA3 e o mutante FLAG-Fbxo7- $\Delta$ F-box, em combinação com ubiquitina-myc. Embora o mutante Fbxo7- $\Delta$ F-box seja capaz de interagir com UXT-V2 (coluna 3, **Figura 12a**), ele é incapaz de ubiquitinar substratos pela formação de uma E3 ligase instável. O inibidor de proteassoma MG132 foi utilizado para permitir o acúmulo de proteínas poliubiquitinadas nas células, evitando que sejam destinadas ao proteassoma, e o lisado celular foi imunoprecipitado com agarose anti-HA. Um forte sinal de arraste de proteína poliubiquitinada foi observado quando Fbxo7 foi co-expresso com UXT-V2 e UXT-V1-M13G (colunas 3 e 6, **Figura 15**), confirmando que ambas as isoformas de UXT são substratos de SCF(Fbxo7) em nível celular. As colunas 2, 4, 5 e 7 - controles negativos - exibiram um fraco sinal de arraste correspondente à UXT poliubiquitinada, que resultou da atividade endógena de SCF(Fbxo7) ou de outras E3

ligases presentes na célula. A coluna 1 - células sem expressão de UXT - mostra a especificidade das esferas de agarose anti-HA.



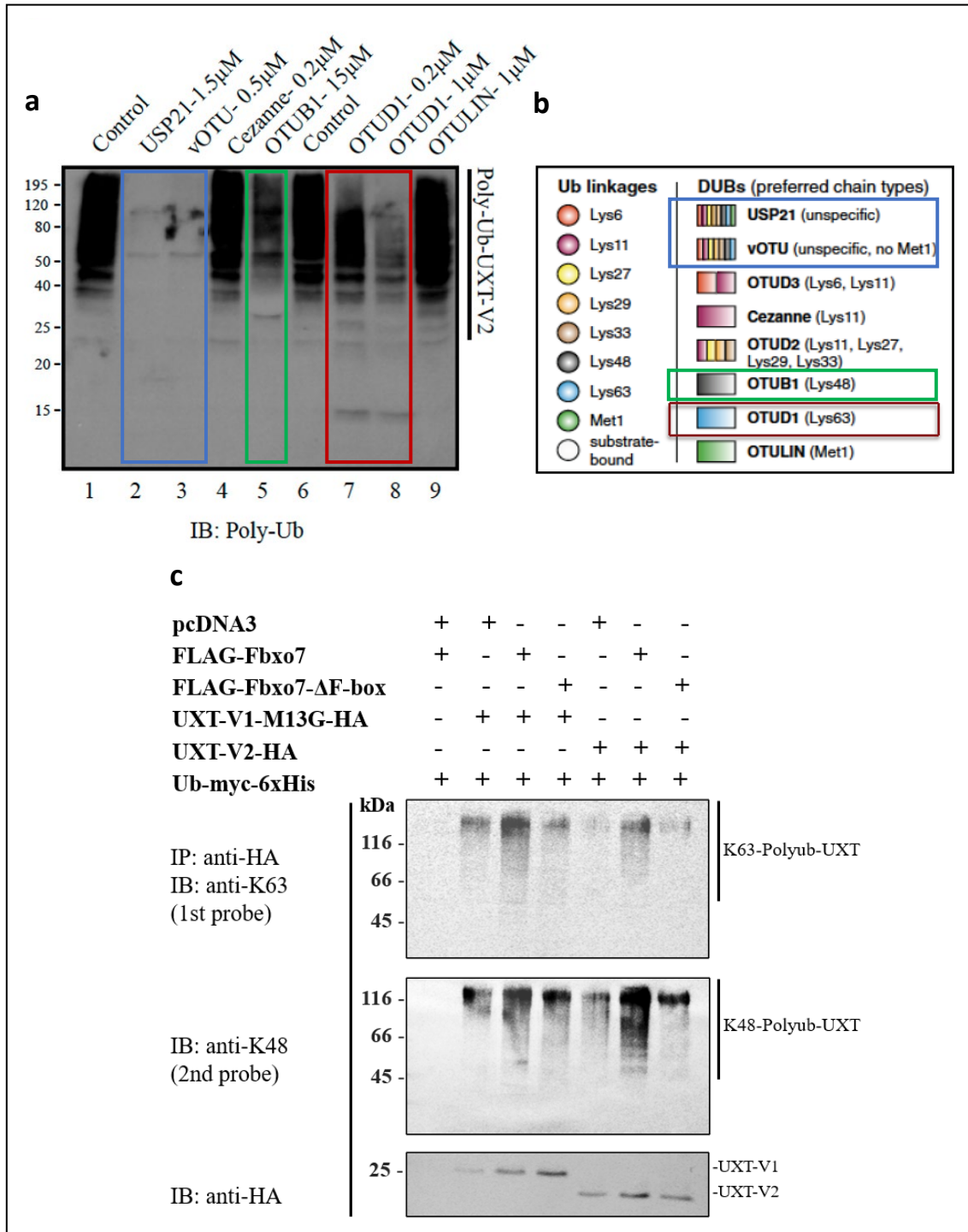
**Figura 15. SCF(Fbxo7) poliubiquitina UXT-V1 e UXT-V2.** Extratos proteicos de células HEK293T transfectadas com FLAG-Fbxo7 ou FLAG-Fbxo7- $\Delta$ F-box e UXT-V1-M13G-HA ou UXT-V2-HA, em combinação com Ub-myc, foram imunoprecipitados (IP) com agarose anti-HA. Eluído e *input* (extrato total) foram submetidos à *western blot* (IB) com os anticorpos indicados.

### 5.6 A poliubiquitinação da UXT-V1 e UXT-V2 ocorre via cadeias de Ub K63 e K48

A ligação entre as ubiquitinas nas cadeias de poliubiquitina adicionadas pelas E3 ligases determina o destino que o substrato seguirá na célula. Cadeias ligadas via lisina 48 (K48) frequentemente regulam a estabilidade das proteínas direcionando-as à degradação via proteassoma, enquanto que cadeias ligadas via lisina 63 (K63) consistem de uma modificação pós-traducional não degradante relacionada à regulação funcional de proteínas. Para determinar o tipo de cadeia de ubiquitina adicionada à UXT-V2 por SCF(Fbxo7), aplicou-se duas abordagens diferentes. A primeira baseada em deubiquitinases (DUBs), enzimas que catalisam a remoção da ubiquitina das proteínas alvo por meio da dissociação das cadeias poliméricas da ubiquitina, pela análise de restrição da cadeia da ubiquitina - UbiCRest (do inglês, **Ubiquitin Chain Restriction**); e a segunda utilizando anticorpos específicos de ligação de ubiquitina anti-K48 ou anti-K63 em um ensaio de ubiquitinação em células.

A UXT-V2-HA utilizada no ensaio UbiCRest foi obtida da imunoprecipitação com agarose anti-HA de células HEK293T transfectadas com UXT-V2-HA e FLAG-Fbxo7, tratadas com 10  $\mu$ M do inibidor de proteassoma MG132. A UXT-V2 poliubiquitinada purificada foi tratada com um painel de DUBs, incluindo dois controles positivos, USP21 e vOTU, que são DUBs inespecíficas capazes de clivar todos os tipos de cadeias de ubiquitina (colunas 2 e 3, **Figura 16a**). O tratamento com OTUB1, uma deubiquitinase específica para K48, reduziu a intensidade do arraste em comparação com o controle negativo não tratado (colunas 5 e 1, respectivamente, **Figura 16a**). Adicionalmente, uma redução de intensidade do arraste da UXT-V2 poliubiquitinada foi observada quando concentrações crescentes de OTUD1, uma deubiquitinase específica para K63, foram utilizadas (colunas 7 e 8, **Figura 16a**). Deubiquitinases específicas para ligações K11 (Cézanne, coluna 4) e M1 (OTULIN, coluna 9) não tiveram atuação. Esses resultados sugeriram que SCF(Fbxo7) insere cadeias de ubiquitina ligadas a K48 e ligadas a K63 em UXT-V2.

Para confirmar esses resultados por uma segunda metodologia, e também investigar o tipo de cadeia de poliubiquitina adicionada à UXT-V1, realizamos um novo ensaio de ubiquitinação. Extratos proteicos de células HEK293T transfectadas com FLAG-Fbxo7 ou o mutante FLAG-Fbxo7- $\Delta$ F-box e UXT-V2-HA ou UXT-V1-M13G-HA, em combinação com ubiquitina-myc, foram imunoprecipitados com agarose anti-HA e os eluídos marcados quanto à presença de cadeias de ubiquitina K48 e K63 por anticorpos específicos. A marcação com anticorpo anti-K63 identificou cadeias de poliubiquitina K63 em UXT-V1 e UXT-V2, embora com intensidade significativamente mais fraca para a UXT-V2 (1st probe, colunas 3 e 6, **Figura 16c**). Em contraste, a marcação com anticorpo anti-K48 também identificou cadeias de poliubiquitina K48 em ambas as isoformas, porém com intensidade significativamente mais fraca para a UXT-V1 (2nd probe, colunas 3 e 6, **Figura 16c**). Esse resultado confirmou que SCF(Fbxo7) adiciona ambas as cadeias de poliubiquitina K63 e K48 à UXT-V1 e UXT-V2, reforçando os resultados do ensaio UbiCRest para a UXT-V2, além de sugerir que as ligações K48 possam estar predominantemente presentes na UXT-V2 e as ligações K63 predominantemente presentes na UXT-V1, o que acarretaria em destinos distintos para cada substrato na célula.

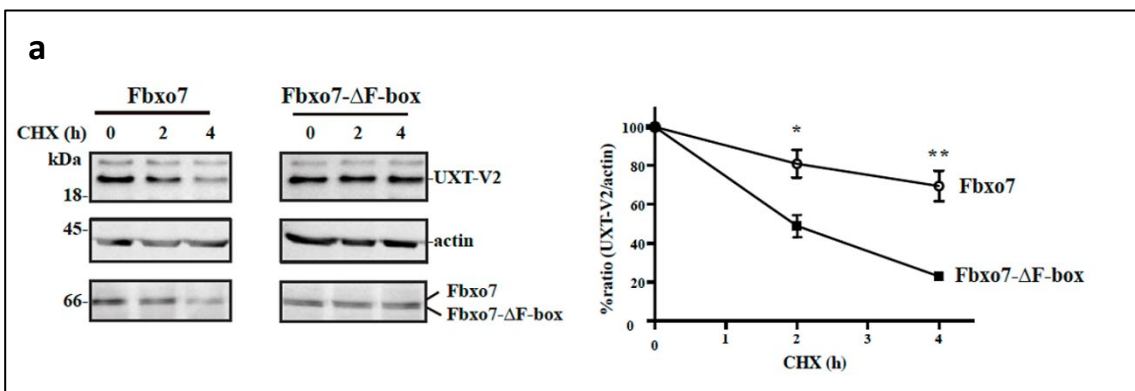


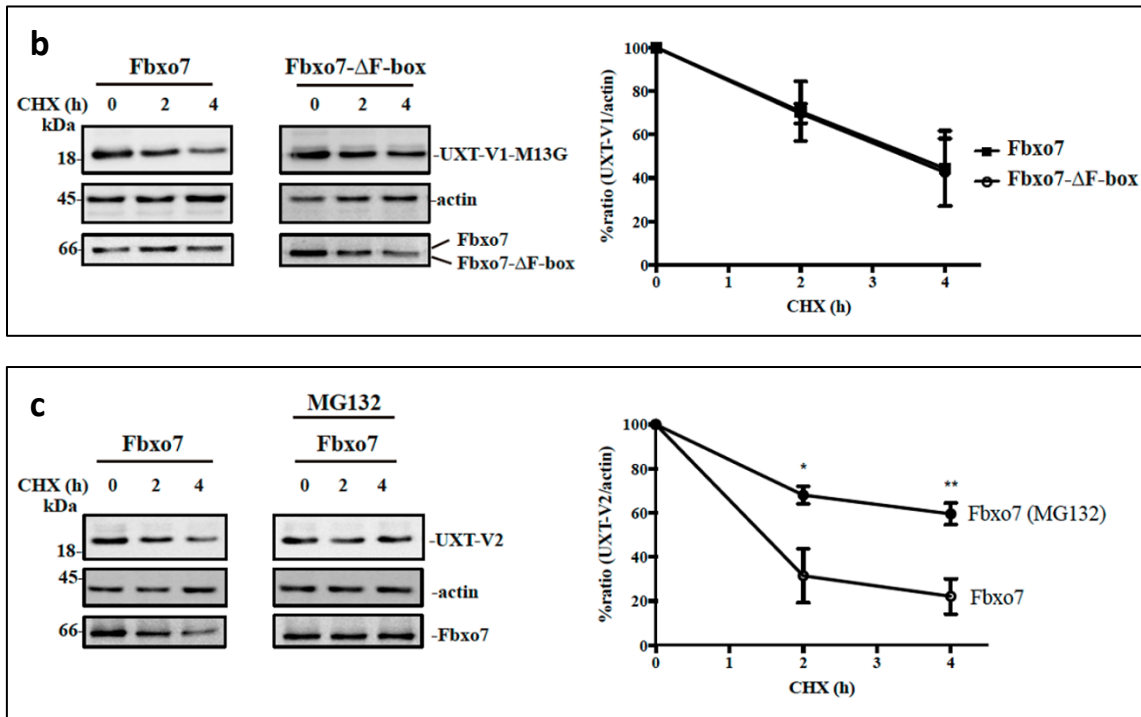
**Figura 16. E3 ligase SCF(Fbxo7) promove a poliubiquitinação de UXT-V1 e UXT-V2 via cadeias de ubiquitina K63 e K48. (a)** Determinação por UbiCRest das cadeias de poliubiquitina inseridas na UXT-V2-HA purificada de células HEK293T. DUBs inespecíficas (USP21 e vOTU) clivam toda as cadeias de ubiquitina; OTUB1 (K48-específica) removeu parcialmente as cadeias de ubiquitina e OTUD1 (K63-específica) mostrou atividade dependente da concentração. **(b)** Tipos de enzimas deubiquitinases e suas cadeias específicas para clivagem. Em destaque, as enzimas que mostraram atividade na UXT-V2 poliubiquitinada. Fonte: HOSPENTHAL (2015) **(c)** Eluído da ubiquitinação da UXT-V1 e UXT-V2 por SCF(Fbxo7) revelado com anticorpos específicos anti-K48 e anti-K63.

### 5.7 SCF(Fbxo7) promove a degradação de UXT-V2 via proteassoma

Para avaliar a estabilidade dos substratos nas células realizou-se um ensaio com a droga cicloheximida (CHX), um inibidor da síntese proteica. Células U2OS foram transfectadas com UXT-V2-HA ou UXT-V1-M13G-HA e FLAG-Fbxo7 ou seu mutante FLAG-Fbxo7- $\Delta$ F-box como controle negativo. As células foram tratadas por 2 ou 4 horas com cicloheximida e os níveis intracelulares de UXT-V2 e UXT-V1 foram avaliados nos lisados celulares. Observou-se que, quando co-expressa com Fbxo7, os níveis de UXT-V2 foram reduzidos para 50% de sua quantidade inicial após 2 horas de tratamento e apenas 20% da proteína permaneceu após 4 horas. Em contraste, mesmo após 4 horas de tratamento, 80% dos níveis de UXT-V2 estavam presentes nos lisados celulares quando co-expressos com o mutante Fbxo7- $\Delta$ F-box (**Figura 17a**). Esses resultados indicaram que Fbxo7 diminui significativamente a estabilidade da UXT-V2 de um modo dependente do domínio F-box. Por outro lado, a diminuição de UXT-V1-M13G após 2 e 4 horas de tratamento foi semelhante para Fbxo7 e Fbxo7- $\Delta$ F-box, indicando que sua degradação não é mediada por Fbxo7 (**Figura 17b**). Esses resultados estão de acordo com a observação de cadeias de poliubiquitina K63 majoritariamente presentes na isoforma 1 de UXT no tópico 5.6, sugerindo que Fbxo7 regula a função da UXT-V1 independente de sua degradação.

Como foi observada a adição de cadeias de poliubiquitina K48 na proteína UXT-V2 no tópico 5.6 e a posterior diminuição de sua estabilidade por Fbxo7 WT (**Figura 17a**), levantamos a hipótese de que a poliubiquitinação da UXT-V2 estaria direcionando o substrato para degradação via proteassoma. Para testar essa hipótese, foi realizado um novo ensaio de cicloheximida em células U2OS transfectadas com FLAG-Fbxo7 na presença do inibidor de proteassoma MG132. Surpreendentemente, o tratamento com MG132 inibiu a degradação de UXT-V2-HA pelo proteassoma mesmo quando co-expressa com Fbxo7 (**Figura 17c**), indicando que a E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7) promove a degradação proteassomal de UXT-V2 nas células.

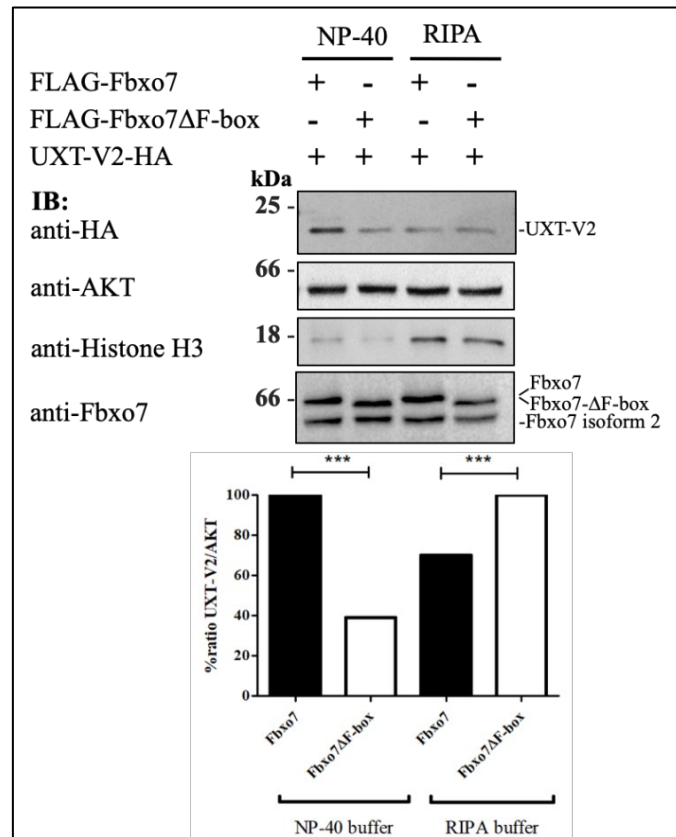




**Figura 17. Degradação via proteassoma da UXT-V2, mas não da UXT-V1, é mediada por Fbxo7.** (a) Células U2OS transfectadas com Fbxo7 ou Fbxo7-ΔF-box em combinação com UXT-V2-HA foram tratadas com CHX 2 ou 4 horas antes da lise. Extratos proteicos foram submetidos à WB com os anticorpos indicados. (b) Da mesma forma, células U2OS foram transfectadas com Fbxo7 ou Fbxo7-ΔF-box em combinação com UXT-V1-M13G-HA e tratadas com CHX. (c) Similarmente, ensaio de estabilidade da UXT-V2 com CHX na presença ou ausência do inibidor de proteassoma MG132. Os gráficos mostram a análise densitométrica da razão UXT/actina e foram gerados no software Prism8 (GraphPad®). Análises densitométricas realizadas no software Image J (National Institutes of Health); n = 3; \*: p ≤ 0,05 e \*\*: p ≤ 0,01.

Ao compararmos os resultados obtidos na **Figura 17** com os da **Figura 15** (colunas 3 e 6, IB anti-HA) observamos que, ao contrário do observado na **Figura 17**, a presença de Fbxo7 promoveu o acúmulo de UXT na **Figura 15**. Para explicar esse possível resultado contraditório é importante destacar que os resultados contidos na **Figura 17** foram obtidos pela lise das células em tampão RIPA, enquanto que todas as lises celulares dos ensaios anteriores haviam sido feitas com tampão NP-40. Avaliamos o conteúdo de UXT-V2 na presença de Fbxo7 em extratos celulares obtidos pela lise com tampão NP-40 em comparação com o tampão RIPA. Observamos que o tampão de lise NP-40 é menos eficiente para romper os núcleos celulares quando comparado com o tampão RIPA, como evidenciado na revelação de lisados celulares provenientes dos dois tampões com o marcador nuclear Histona H3, cuja marcação foi claramente mais intensa quando o RIPA foi utilizado (colunas 3 e 4, **Figura 18**). Por outro lado, verificamos que o conteúdo citoplasmático extraído por ambos tampões foi semelhante, como evidenciado pelo uso do marcador citoplasmático AKT (**Figura 18**). Estes resultados indicam que Fbxo7 aumenta

o conteúdo citoplasmático de UXT-V2 de uma maneira dependente do domínio F-box e que o tampão RIPA fornece o conteúdo proteico total real por promover a lise completa do núcleo celular. Corroborando os resultados da **Figura 17**, quando o RIPA foi utilizado, a expressão de UXT-V2 foi maior na presença de Fbxo7- $\Delta$ F-box em comparação com Fbxo7 WT (**Figura 18**).

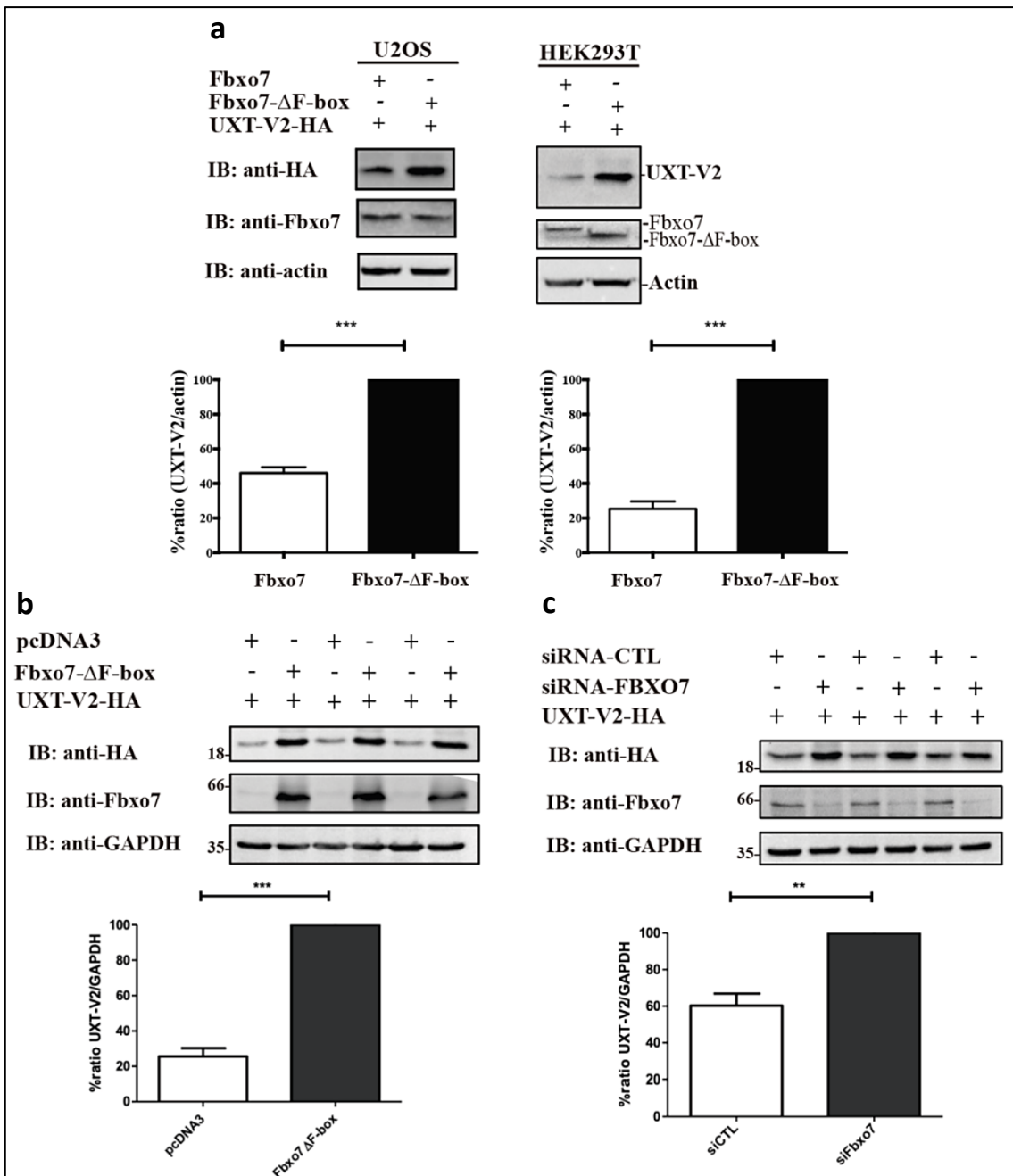


**Figura 18. Níveis de UXT-V2 em extratos celulares obtidos pela lise com dois tampões diferentes.** As células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados e lisadas com tampão NP-40 ou RIPA. Histona e Akt foram utilizados como marcadores nuclear e citoplasmático, respectivamente. Os gráficos mostram a análise densitométrica da razão UXT-V2/AKT e foram gerados no *software* Prism8 (*GraphPad*<sup>®</sup>). Análises densitométricas realizadas no *software* Image J (*National Institutes of Health*); n = 2; \*\*\*: p  $\leq$  0,001.

### 5.8 O *knockdown* de **FBXO7** e a superexpressão de Fbxo7- $\Delta$ F-box promovem o acúmulo de UXT-V2

Para explorar o efeito da superexpressão de Fbxo7 nos níveis de proteína UXT-V2 em diferentes linhagens celulares, células HEK293T ou U2OS foram transfectadas com FLAG-Fbxo7 ou FLAG-Fbxo7- $\Delta$ F-box em combinação com UXT-V2-HA. Quando UXT-V2 foi co-expresso com o mutante Fbxo7- $\Delta$ F-box, houve um acúmulo deste substrato em comparação a Fbxo7 WT em ambas as linhagens celulares (**Figura 19a**). Esses resultados sugeriram que Fbxo7- $\Delta$ F-box interage com UXT-V2 mas, devido a não formação de um

complexo E3 estável, previne sua degradação mediada por Fbxo7. Para demonstrar o efeito protetor do mutante Fbxo7-ΔF-box na UXT-V2, células HEK293T foram transfectadas com o vetor vazio pcDNA3 ou Fbxo7-ΔF-box na presença de UXT-V2-HA. Surpreendentemente, Fbxo7-ΔF-box promoveu um acúmulo de UXT-V2 em comparação com o vetor vazio (**Figura 19b**). Por fim, para confirmar que os níveis de UXT-V2 foram especificamente controlados por Fbxo7, realizamos o *knockdown* de *FBXO7* e avaliamos os níveis de UXT-V2 nos lisados celulares totais. Observamos um acúmulo de UXT-V2-HA no siRNA *FBXO7* (**Figura 19c**), reforçando que Fbxo7 regula os níveis da proteína UXT-V2 ao promover sua degradação pela ação da E3 ligase SCF(Fbxo7).



**Figura 19. Níveis intracelulares de UXT-V2 decaem sob superexpressão de Fbxo7. (a)** Células HEK293T ou U2OS foram transfectadas com os plasmídeos indicados e os lisados celulares foram

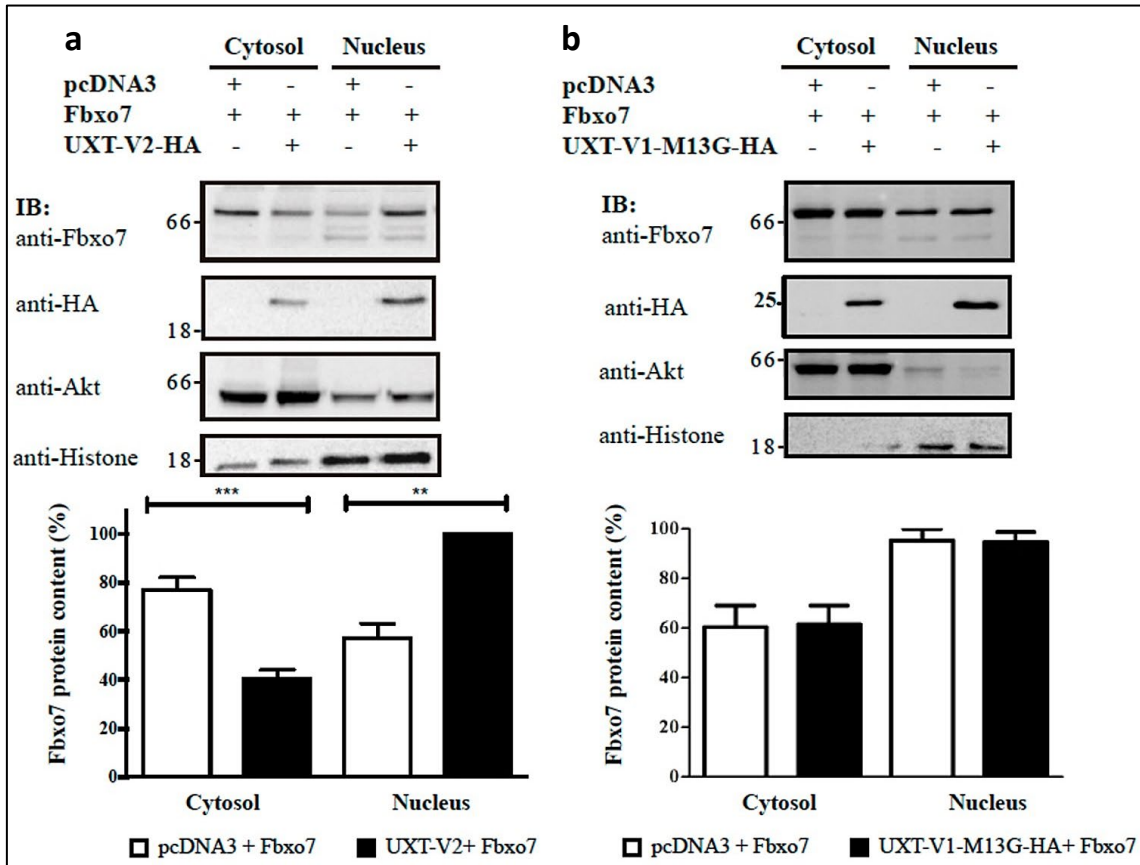


submetidos à WB com os anticorpos indicados. **(b)** Células HEK293T foram transfectadas com o vetor vazio pcDNA3 ou Fbxo7- $\Delta$ F-box em combinação com UXT-V2-HA e os lisados celulares foram submetidos à WB com anticorpos indicados. **(c)** Células U2OS foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA *FBXO7* e os lisados celulares foram submetidos à WB com os anticorpos indicados. Os gráficos mostram a análise densitométrica da razão UXT/actina ou UXT/GAPDH e foram gerados no *software* Prism8 (*GraphPad*<sup>®</sup>). Análises densitométricas realizadas no *software* Image J (*National Institutes of Health*); n = 3; \*\*: p  $\leq$  0,01 e \*\*\*: p  $\leq$  0,001.

### **5.9 A superexpressão de UXT-V2 promove a translocação de Fbxo7 para o núcleo**

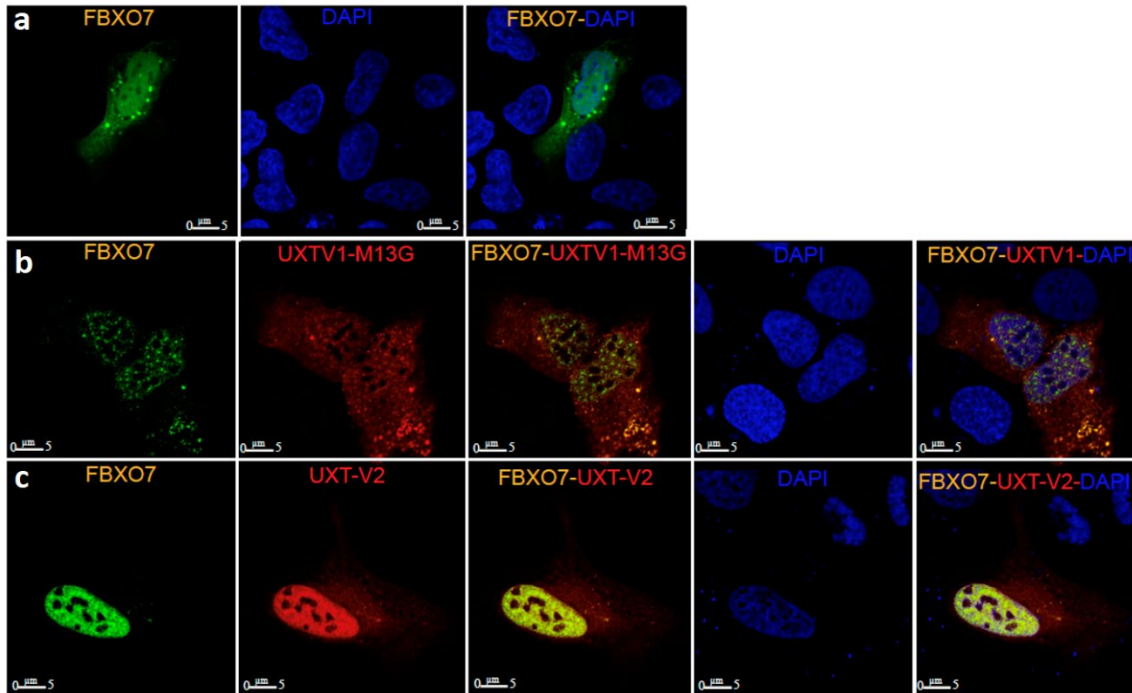
Fbxo7 tem uma sequência de exportação nuclear rica em leucina (NES) incorporada ao domínio F-box que se liga à exportina 1 (CRM1), permitindo que Fbxo7 migre para o citoplasma. A interação com CRM1 compete com SKP1 inibindo a formação do complexo SCF(Fbxo7), de forma que este mecanismo competitivo permite que Fbxo7 esteja presente em diferentes compartimentos celulares<sup>56</sup>. Quando fusionada à Tag-FLAG no N-terminal, existem descrições da Fbxo7 localizada tanto no núcleo como no citoplasma das células. A localização de FLAG-Fbxo7 é dependente da fase do ciclo celular, sendo citoplasmática durante o G0/G1 e acumulando-se no núcleo à medida que as células passam para a fase S/G2<sup>56</sup>.

Como a UXT-V2 é uma proteína predominantemente nuclear, avaliamos se ela medeia o acúmulo de Fbxo7 no núcleo. Para investigar a interação entre Fbxo7 e UXT-V2 em um nível subcelular, realizamos um ensaio de fracionamento em células U2OS transfectadas com UXT-V2-HA ou pcDNA3 em combinação com FLAG-Fbxo7, e os níveis de Fbxo7 em cada compartimento celular foram quantificados. A superexpressão de UXT-V2 diminuiu os níveis de Fbxo7 no citoplasma e aumentou significativamente os níveis de Fbxo7 na fração nuclear em comparação com o vetor controle (**Figura 20a**). Para confirmar que esse efeito é específico para UXT-V2, avaliamos a localização de Fbxo7 em cada compartimento celular após superexpressão de UXT-V1-M13G. Notavelmente, a expressão de UXT-V1 não alterou a distribuição subcelular de Fbxo7 (**Figura 20b**). Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de que a superexpressão de UXT-V2 estabilize Fbxo7 no núcleo da célula, impedindo sua associação com a maquinaria de exportação nuclear ou impedindo sua autoubiquitinação.



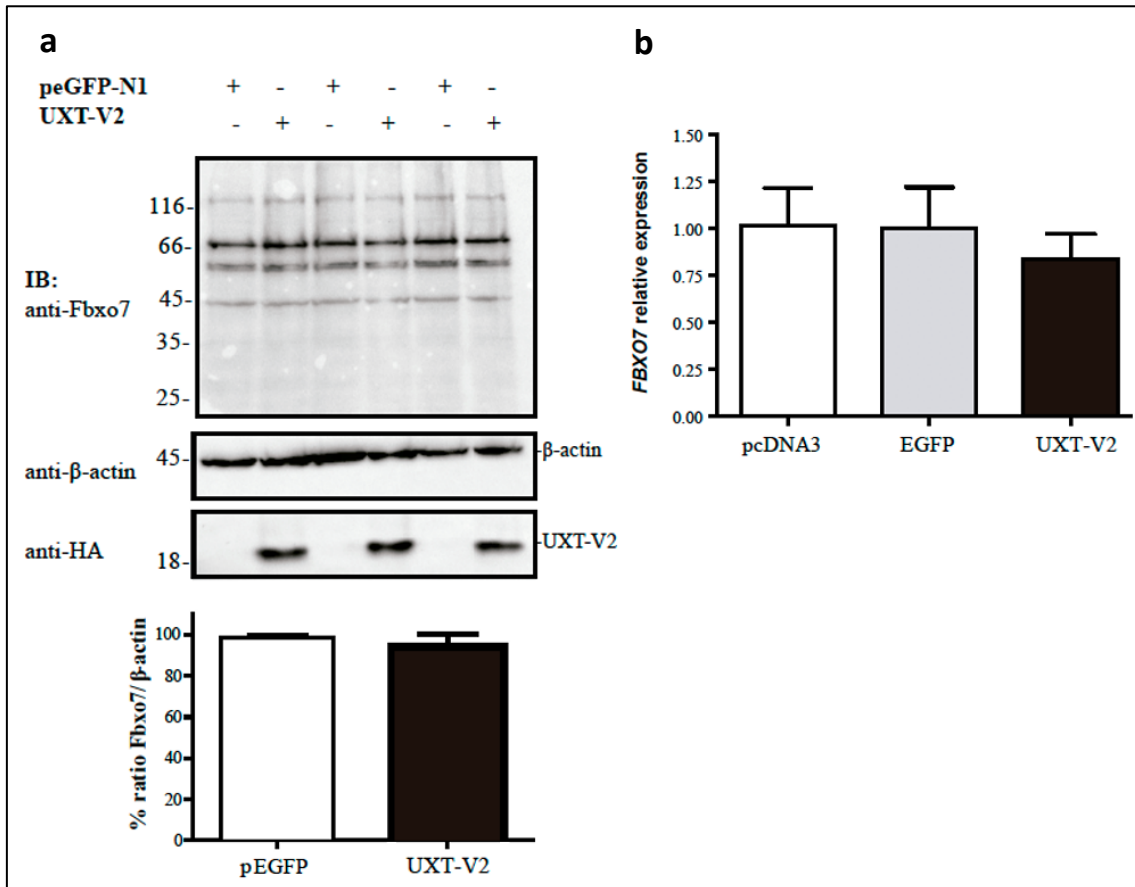
**Figura 20. A superexpressão de UXT-V2, mas não de UXT-V1, promove a translocação de Fbxo7 para o núcleo.** Células U2OS foram transfectadas com os plasmídeos indicados e as frações nuclear e citosólica enriquecidas foram submetidas à WB com os anticorpos indicados. Histona e Akt foram utilizados como marcadores nuclear e citoplasmático, respectivamente. Gráficos gerados no software Prism8 (GraphPad®) e análises densitométricas das bandas de Fbxo7 realizadas no software Image J (National Institutes of Health); n = 3; \*\*: p ≤ 0,01 e \*\*\*: p ≤ 0,001.

Para confirmar o resultado anterior, reforçando os efeitos opostos das isoformas de UXT na distribuição subcelular de Fbxo7, realizamos a microscopia confocal de células U2OS transfectadas com FLAG-Fbxo7 em combinação com UXT-V1-M13G-HA ou UXT-V2-HA. Consistente com os resultados descritos na literatura, Fbxo7 é distribuída no citosol e no núcleo das células<sup>56</sup> (**Figura 21a**). Quando Fbxo7 foi co-expressa com UXT-V1-M13G (**Figura 21b**), observamos colocalizações tanto citosólicas quanto nucleares entre essas proteínas, concentradas em pequenos *dots* (em amarelo), embora a distribuição original de Fbxo7 não tenha se alterado consideravelmente. Por outro lado, uma forte concentração de Fbxo7 nos núcleos das células foi observada quando co-expressa com UXT-V2 (**Figura 21c**), confirmando a capacidade dessa isoforma de UXT de promover a translocação de Fbxo7 do citosol para o núcleo das células.



**Figura 21. UXT-V2 e Fbxo7 colocalizam no núcleo das células.** Células U2OS foram transfectadas com (a) FLAG-Fbxo7, (b) FLAG-Fbxo7 e UXT-V1-M13G-HA ou (c) FLAG-Fbxo7 e UXT-V2-HA. As lâminas foram incubadas com anticorpos anti-HA ou anti-Fbxo7 e visualizadas pela incubação de anticorpos secundários acoplados com Alexa 488 (verde) ou Alexa 594 (vermelho). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Colocalizações são observadas em amarelo. Imagens capturadas pela lente objetiva de 63x.

Juntos, os resultados das **Figuras 20 e 21** sugerem duas hipóteses alternativas: UXT-V2 está promovendo uma translocação citoplasma/núcleo e acúmulo nuclear de Fbxo7 ou está levando a um aumento dos níveis totais de Fbxo7 na célula. Para responder essa questão, analisamos os níveis de Fbxo7 endógeno de lisados de células HEK293T transfectadas com pEGFP-N1 ou UXT-V2-HA e também a expressão de *FBXO7* em células HEK293T transfectadas com pcDNA3, pEGFP-N1 ou UXT-V2-HA por RT-qPCR. Observamos que a superexpressão de UXT-V2 não afetou os níveis de proteína ou o mRNA de Fbxo7 em células HEK293T (**Figuras 22a e 22b**, respectivamente), sugerindo que a translocação e acúmulo nuclear de Fbxo7 se deveu à ação da UXT-V2.

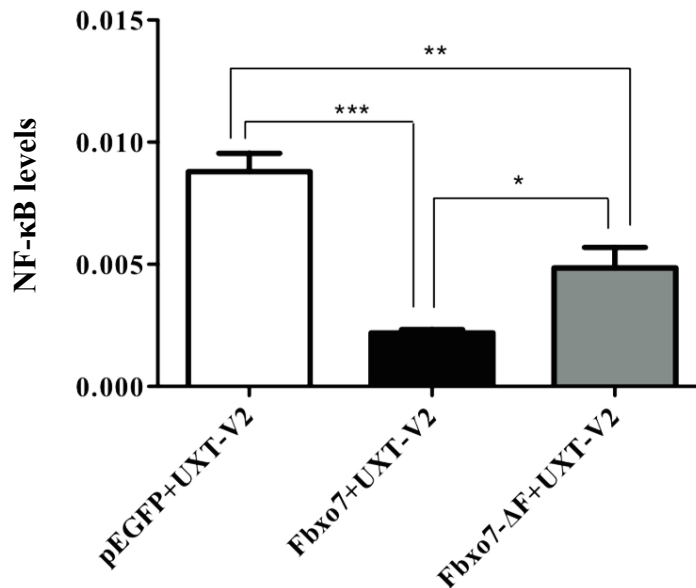


**Figura 22. A superexpressão de UXT-V2 não afeta os níveis totais de Fbxo7.** (a) Células HEK293T foram transfectadas com pEGFP-N1 ou UXT-V2-HA e os lisados celulares foram submetidos à WB com os anticorpos indicados. O gráfico mostra a análise densitométrica da razão Fbxo7/actina e foram gerados no *software* Prism8 (*GraphPad*<sup>®</sup>). Análises densitométricas realizadas no *software* Image J (*National Institutes of Health*). (b) O mRNA foi purificado a partir de células HEK293T transfectadas com pcDNA3, pEGFP-N1 ou UXT-V2-HA. A análise de RT-qPCR foi realizada para a expressão de *FBXO7* e avaliada em comparação com *GAPDH*. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos; n = 3; ANOVA *one-way* (p = 0,4807).

### 5.10 A degradação proteossomal da UXT-V2 inibe a via de sinalização do NF-κB

A proteína UXT-V2 é um componente essencial do enhanceossoma transcrricional de NF-κB no núcleo, interagindo com a subunidade p65 (RELA) e modulando a resposta ao TNF-α. O *knockdown* de *UXT-V2*, mas não a sua superexpressão, diminui a ativação transcrricional de genes-alvo de NF-κB induzida por TNF-α<sup>53</sup>. Para avaliar as consequências funcionais da degradação proteossomal da UXT-V2 mediada por Fbxo7 na via de sinalização do NF-κB, células HEK293 que expressam estavelmente um gene repórter para a via do NF-κB fundido à *Firefly* luciferase (células HEK-NF-κB) foram transfectadas com UXT-V2-HA ou UXT-V2-HA em combinação com FLAG-Fbxo7 ou o mutante FLAG-Fbxo7-ΔF-box. Surpreendentemente, a co-expressão com Fbxo7 WT

reduziu significativamente os níveis de NF- $\kappa$ B em comparação com os grupos expressando somente UXT-V2 ou UXT-V2 em combinação com Fbxo7 mutante (**Figura 23**). Esses resultados são consistentes com a degradação proteossomal de UXT-V2 mediada por Fbxo7, impedindo sua chegada ao enhanceossoma transcricional de NF- $\kappa$ B no núcleo e, conseqüentemente, diminuindo a expressão de genes dependentes da ligação do fator transcricional, uma vez que a função da proteína UXT-V2 consiste em estabilizar essa ligação<sup>53</sup>.



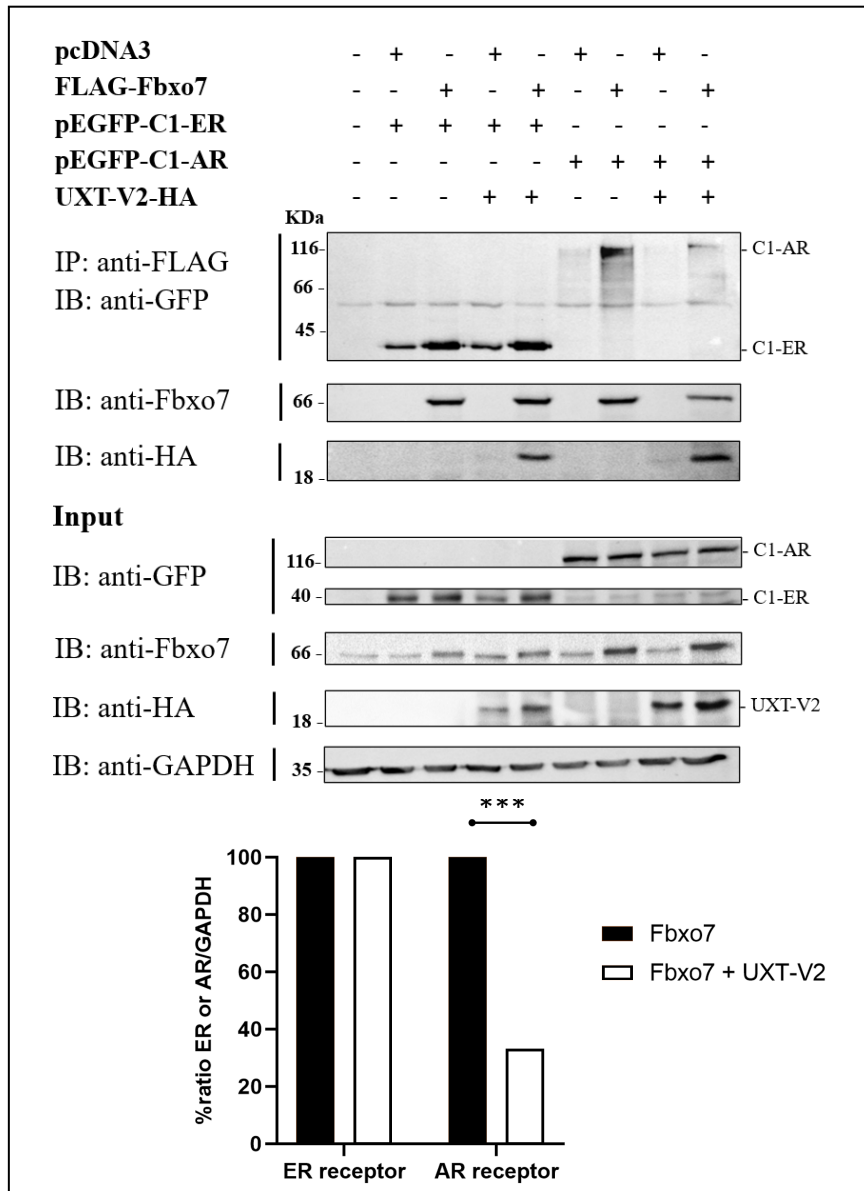
**Figura 23. A degradação proteossomal de UXT-V2 mediada por SCF(Fbxo7) inibe a via de sinalização do NF- $\kappa$ B.** Células HEK-NF- $\kappa$ B foram transfectadas com os plasmídeos indicados, juntamente com um repórter *Renilla* luciferase como controle de transfecção, e estimuladas com TNF- $\alpha$ . Após 48 horas, as células foram recolhidas das placas e os níveis de expressão da luciferase foram avaliados nos lisados celulares. Os níveis de *Firefly* foram normalizados pelos níveis de *Renilla* (razão *Firefly/Renilla*) e os gráficos foram gerados no software Prism8 (*GraphPad*<sup>®</sup>); n = 5; \*: p < 0,05, \*\*: p = 0,01 e \*\*\*: p < 0,001; ANOVA two-way, pós-teste Newman-Keuls.

Esse resultado une os achados de KUIKEN *et al.* (2012) e de SUN *et al.* (2007), tendo o primeiro relacionado a Fbxo7 à regulação negativa da via de sinalização do NF- $\kappa$ B pela ubiquitinação de cIAP1 e TRAF2 por SCF(Fbxo7), dois importantes componentes citoplasmáticos da via; e o segundo identificado a proteína UXT-V2 como um componente integral do enhanceossoma transcricional de NF- $\kappa$ B, essencial para manter o fator no núcleo. Nossos dados demonstraram, além da atividade de SCF(Fbxo7) no citoplasma já descrita<sup>43</sup>, uma atividade também no interior do núcleo por meio da ubiquitinação da UXT-V2. Propomos, portanto, uma dupla regulação negativa da via de sinalização do NF- $\kappa$ B por Fbxo7, a primeira no citoplasma e a segunda no núcleo.

### **5.11 Fbxo7 interage com os receptores ER e AR**

A proteína UXT-V2/ART-27 é descrita como um cofator tanto do receptor de andrógeno (AR), estimulando sua atividade transcricional, quanto do receptor de estrógeno (ER), no qual desempenha um papel oposto, reprimindo sua atividade transcricional<sup>48,50</sup>. Neste trabalho, validamos a proteína UXT-V2 como um substrato da E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7) e demonstramos que essa modificação tem por consequência a diminuição da estabilidade da proteína, promovendo sua degradação na célula. Baseando-se nos estudos que relataram a interação entre UXT-V2 e os receptores de andrógeno e estrógeno e em nossos achados de interação entre UXT-V2 e Fbxo7, propusemos explorar uma relação direta entre Fbxo7 e os receptores ER e AR e investigar se a superexpressão de UXT-V2 exerce influência nessa interação.

Para avaliar se ambos os receptores interagem com Fbxo7, células HEK293T foram transfectadas com FLAG-Fbxo7 em combinação com EGFP-C1-ER ou EGFP-C1-AR, na presença ou ausência de UXT-V2-HA. Observou-se que ambos os receptores foram mais fortemente imunodetectados pelo anticorpo anti-GFP quando em co-expressão com FLAG-Fbxo7, após imunoprecipitação do lisado celular com resinas agarose anti-FLAG (colunas 3 e 7, **Figura 24**), demonstrando que Fbxo7 foi capaz de interagir com ER e AR e sugerindo que ambos possam ser substratos de SCF(Fbxo7) para ubiquitinação. Além disso, observou-se que a co-expressão de UXT-V2 não interferiu na interação de Fbxo7 com o receptor ER (coluna 5 em comparação com a coluna 3, **Figura 24**), enquanto que, para o receptor AR, a proteína UXT-V2 diminuiu significativamente sua interação com Fbxo7 (coluna 9 em comparação com a coluna 7, **Figura 24**).



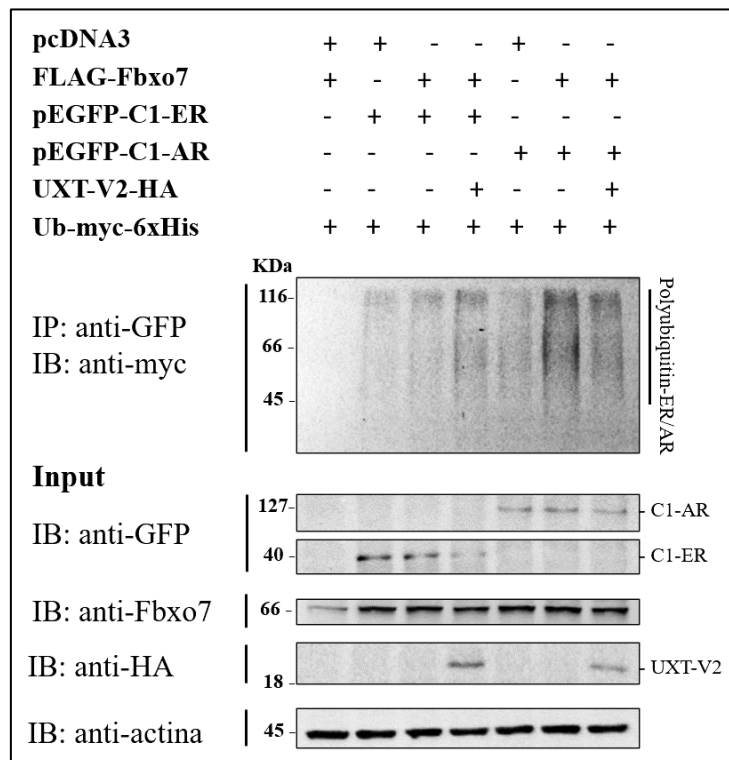
**Figura 24. Fbxo7 interage com os receptores ER e AR.** Extratos proteicos de células HEK293T transfectadas com os plasmídeos indicados foram imunoprecipitados (IP) com agarose anti-FLAG. Eluído e *input* foram submetidos à WB com os anticorpos indicados. O gráfico mostra a análise densitométrica da razão ER ou AR/GAPDH e foram gerados no *software* Prism8 (*GraphPad*<sup>®</sup>). Análises densitométricas realizadas no *software* Image J (*National Institutes of Health*); n = 2.

### 5.12 SCF(Fbxo7) poliubiquitina o receptor AR

Dada a interação dos receptores ER e AR com Fbxo7, observada no tópico 5.11, realizou-se um ensaio de ubiquitinação em células HEK293T para avaliar se ambos são substratos de SCF(Fbxo7) para ubiquitinação. As células foram transfectadas com pcDNA3 ou FLAG-Fbxo7, em combinação com PEGFP-C1-ER ou pEGFP-C1-AR e Ub-myc. Os extratos proteicos foram imunoprecipitados com agarose anti-GFP. Assim como no tópico 5.5, o inibidor de proteassoma MG132 foi utilizado para permitir o acúmulo de

proteínas poliubiquitinadas nas células. Um forte sinal de arraste de proteína poliubiquitinada foi observado quando Fbxo7 foi co-expresso com o receptor AR (coluna 6, **Figura 25**), mas teve sua intensidade atenuada quando em presença da UXT-V2 (colunas 7, **Figura 25**). Esse resultado é condizente com a interação AR/Fbxo7 observada na **Figura 22**, na qual a proteína UXT-V2 diminuiu a interação de AR com Fbxo7, sugerindo que AR é um substrato de SCF(Fbxo7).

Para o receptor ER, observamos um aumento de intensidade no arraste quando a interação ER/Fbxo7 ocorreu na presença de UXT-V2 (coluna 4, **Figura 25**) sugerindo que UXT-V2 possa favorecer esta modificação pós-traducional mediada por Fbxo7. No entanto, experimentos adicionais devem ser realizados para confirmação destes resultados, adicionando um controle com pcDNA3, ER e UXT-V2 e realizando um ensaio de ubiquitinação *in vitro* para confirmar que a poliubiquitinação de ER observada no ensaio celular é específica para SCF(Fbxo7), e não pela ação de outras E3 ubiquitin-ligases presentes na célula. Embora preliminares, os resultados dos ensaios de interação e ubiquitinação sugerem que, na presença de Fbxo7, UXT-V2 promove um aumento na ubiquitinação de ER e, ao contrário, reduz a interação de Fbxo7 com AR, promovendo uma redução na sua ubiquitinação. Além de validar estes resultados com mais experimentos, realizaremos a avaliação do tipo de cadeia de poliubiquitina adicionada aos receptores através de ensaios de mapeamento de cadeia por DUBs e anticorpos específicos.



**Figura 25. SCF(Fbxo7) poliubiquitina o receptor AR.** Extratos proteicos de células HEK293T transfectadas com os plasmídeos indicados foram imunoprecipitados (IP) com agarose anti-GFP. Eluído e *input* (extrato total) foram submetidos à WB com os anticorpos indicados. n = 1.



5.13 Mecanismo geral proposto

Com os resultados discutidos ao longo deste trabalho, propusemos um esquema geral das interações entre as proteínas estudadas, destacando a interação de Fbxo7 com UXT-V1 no citoplasma e sua translocação nuclear para a interação com UXT-V2, cuja modificação pós-traducional realizada por SCF(Fbxo7) leva à inibição da via de sinalização do NF-κB. Destaca-se ainda a possível interação direta de Fbxo7 com os receptores AR e ER, potencialmente influenciada pela ação da UXT-V2 (Figura 26).

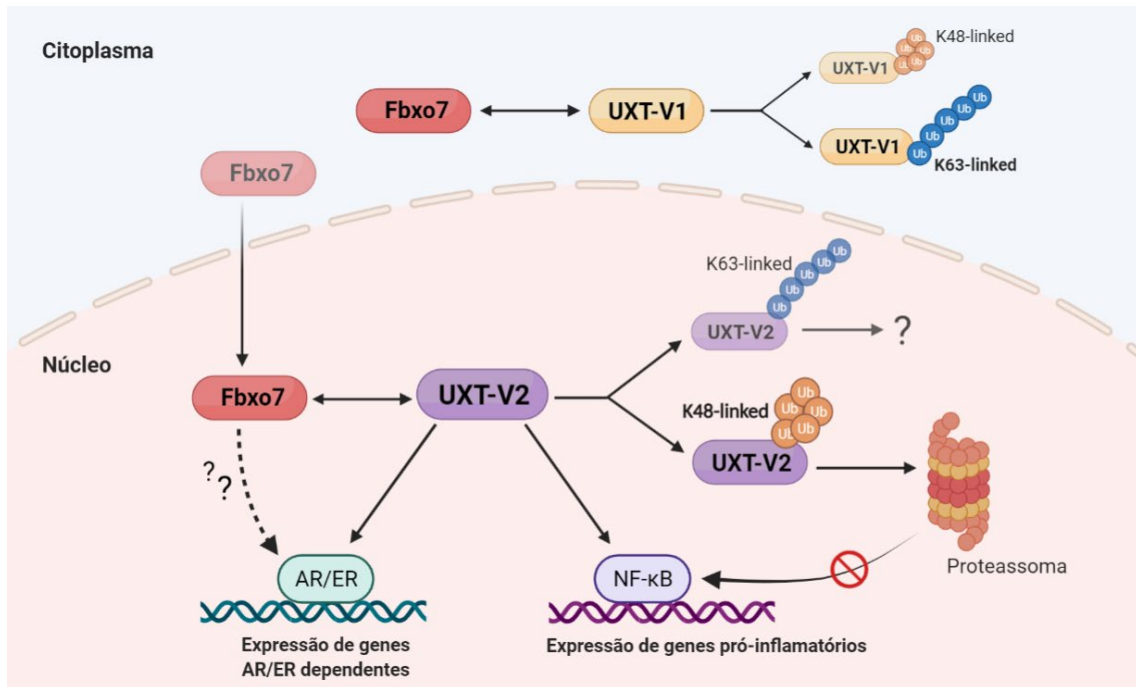


Figura 26. Mecanismo geral proposto. Fonte: do autor (2022). Criado em BioRender.com

| CONCLUSÕES

## 6 CONCLUSÕES

Validamos ambas as isoformas da proteína UXT como substratos da E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7) e determinamos que as ligações entre ubiquitinas nas cadeias de poliubiquitina ocorrem majoritariamente via lisina 63 (K63) para a isoforma 1 e via lisina 48 (K48) para a isoforma 2, indicando que SCF(Fbxo7) realiza uma modificação pós-traducional para regulação de função na UXT-V1 e para degradação do substrato via proteassoma na UXT-V2.

Demostramos que a superexpressão de UXT-V2, mas não de UXT-V1, recruta Fbxo7 do citosol para o núcleo das células para mediar a interação entre elas e observamos que ambas as isoformas de UXT estão presentes no citosol e no núcleo das células, sendo a UXT-V1 predominantemente citoplasmática e a UXT-V2 predominantemente nuclear. Nossos achados corroboraram com diversos resultados descritos na literatura, que demonstraram a associação da proteína UXT-V2 com fatores de transcrição na via de sinalização do NF- $\kappa$ B e nas vias de sinalização androgênica e estrogênica; e que relacionaram a UXT-V1 à proteção das células contra a apoptose por meio da sua interação com proteínas citosólicas e mitocondriais<sup>48-54</sup>.

Também mostramos que a superexpressão de Fbxo7- $\Delta$ F-box, um dominante negativo de Fbxo7 incapaz de formar um complexo SCF estável, protege a UXT-V2 da degradação proteassomal mediada por Fbxo7, aumentando a resposta dos repórteres da via do NF- $\kappa$ B. A caracterização bioquímica da interação Fbxo7/UXT-V2 realizada neste trabalho permitiu a identificação de um novo ponto de regulação na via de sinalização do NF- $\kappa$ B pela degradação proteassomal da UXT-V2 por SCF(Fbxo7), que tem por consequência funcional a inibição da via.

Um segundo eixo deste trabalho explorou a interação entre SCF(Fbxo7) e os receptores de andrógeno (AR) e estrógeno (ER). Nossos resultados preliminares mostraram que Fbxo7 interage com ambos os receptores e sugerem que a superexpressão de UXT-V2 promove um aumento na ubiquitinação de ER e uma redução na ubiquitinação de AR. Apesar de não validados por outras metodologias, nossos resultados fornecem indícios de que, além da atuação indireta de SCF(Fbxo7) nas vias de sinalização androgênica e estrogênica pela ubiquitinação da proteína UXT-V2, com a qual ambos os receptores interagem diretamente; SCF(Fbxo7) pode estar atuando em ambas as vias por uma interação direta com AR e ER.

Juntos, os resultados obtidos ao longo deste trabalho forneceram uma caracterização bioquímica da relação entre a E3 ubiquitina ligase SCF(Fbxo7) e as proteínas UXT-V1 e UXT-V2, esta última com consequências funcionais na via de sinalização do NF- $\kappa$ B<sup>57</sup>, além de dar embasamento para estudos futuros envolvendo a relação entre SCF(Fbxo7) e os receptores de andrógeno e estrógeno.

## | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 WALSH, Christopher. **Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory**. Roberts and Company Publishers, 2006.

2 KHOURY, George A.; BALIBAN, Richard C.; FLOUDAS, Christodoulos A. **Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database**. Scientific reports, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2011.

3 SWATEK, Kirby N.; KOMANDER, David. **Ubiquitin modifications**. Cell research, v. 26, n. 4, p. 399-422, 2016.

4 NAKAYAMA, Keiichi I.; NAKAYAMA, Keiko. **Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer**. Nature Reviews Cancer, v. 6, n. 5, p. 369, 2006.

5 KOMANDER, David; RAPE, Michael. **The ubiquitin code**. Annual review of biochemistry, v. 81, p. 203-229, 2012.

6 KOMANDER, David. **The emerging complexity of protein ubiquitination**. Biochemical Society Transactions, v. 37, n. 5, p. 937-953, 2009.

7 HUSNJAK, Koraljka; DIKIC, Ivan. **Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions**. Annual review of biochemistry, v. 81, p. 291-322, 2012.

8 PENG, Junmin et al. **A proteomics approach to understanding protein ubiquitination**. Nature biotechnology, v. 21, n. 8, p. 921-926, 2003.

9 KIM, Woong et al. **Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome**. Molecular cell, v. 44, n. 2, p. 325-340, 2011.

10 WAGNER, Sebastian A. et al. **A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles**. Molecular & Cellular Proteomics, v. 10, n. 10, 2011.

11 METZGER, Meredith B. et al. **RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, v. 1843, n. 1, p. 47-60, 2014.

- 12 FOUAD, Shahd et al. **Cullin ring ubiquitin ligases (CRLs) in cancer: responses to ionizing radiation (IR) treatment.** *Frontiers in physiology*, v. 10, p. 1144, 2019.
- 13 ZHENG, Ning et al. **Structure of the Cul1–Rbx1–Skp1–F box Skp2 SCF ubiquitin ligase complex.** *Nature*, v. 416, n. 6882, p. 703-709, 2002.
- 14 DESHAIES, R. J. **SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases.** *Annual review of cell and developmental biology*, v. 15, n. 1, p. 435-467, 1999.
- 15 KIPREOS, Edward T.; PAGANO, Michele. **The F-box protein family.** *Genome biology*, v. 1, n. 5, p. 1-7, 2000.
- 16 WINSTON, Jeffrey T. et al. **A family of mammalian F-box proteins.** *Current Biology*, v. 9, n. 20, p. 1180-S3, 1999.
- 17 YUMIMOTO, Kanae; YAMAUCHI, Yuhei; NAKAYAMA, Keiichi I. **F-Box proteins and cancer.** *Cancers*, v. 12, n. 5, p. 1249, 2020.
- 18 WANG, Zhiwei et al. **Roles of F-box proteins in cancer.** *Nature reviews Cancer*, v. 14, n. 4, p. 233-247, 2014.
- 19 SKAAR, Jeffrey R.; PAGAN, Julia K.; PAGANO, Michele. **Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins.** *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 14, n. 6, p. 369-381, 2013.
- 20 DENG, Lu et al. **The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery.** *Signal transduction and targeted therapy*, v. 5, n. 1, p. 1-28, 2020.
- 21 SUTTERLÜTY, Hedwig et al. **p45 SKP2 promotes p27 Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells.** *Nature cell biology*, v. 1, n. 4, p. 207-214, 1999.
22. KAMURA, Takumi et al. **Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 18, p. 10231-10236, 2003.
23. BORNSTEIN, Gil et al. **Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 28, p. 25752-25757, 2003.

24. D'ANGIOLELLA, Vincenzo et al. **SCF Cyclin F controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity through CP110 degradation.** Nature, v. 466, n. 7302, p. 138-142, 2010.
25. WALTER, David et al. **SCF Cyclin F-dependent degradation of CDC6 suppresses DNA re-replication.** Nature communications, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2016.
26. PATEL, Shachi P. et al. **Opposing effects on the cell cycle of T lymphocytes by Fbxo7 via Cdk6 and p27.** Cellular and Molecular Life Sciences, v. 74, n. 8, p. 1553, 2017.
27. BURCHELL, Victoria S. et al. **The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy.** Nature neuroscience, v. 16, n. 9, p. 1257-1265, 2013.
28. HSU, Jung-Mao et al. **Fbx7 functions in the SCF complex regulating Cdk1-cyclin B-phosphorylated hepatoma up-regulated protein (HURP) proteolysis by a proline-rich region.** Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 31, p. 32592-32602, 2004.
29. KUO, Tzu-Ching et al. **Knockdown of HURP inhibits the proliferation of hepatic carcinoma cells via downregulation of gankyrin and accumulation of p53.** Biochemical pharmacology, v. 83, n. 6, p. 758-768, 2012.
30. PALMER, Michaela CL et al. **The F-box protein, FBXO7 is required to maintain chromosome stability in humans.** Hum. Mol. Genet, 2021.
31. CHANG, Yung-Fu et al. **The F-box protein Fbxo7 interacts with human inhibitor of apoptosis protein cIAP1 and promotes cIAP1 ubiquitination.** Biochemical and biophysical research communications, v. 342, n. 4, p. 1022-1026, 2006.
32. KANG, Jengmin; CHUNG, Kwang Chul. **The F-box protein FBXO7 positively regulates bone morphogenetic protein-mediated signaling through Lys-63-specific ubiquitination of neurotrophin receptor-interacting MAGE (NRAGE).** Cellular and molecular life sciences, v. 72, n. 1, p. 181-195, 2015.
33. LAMAN, Heike et al. **Transforming activity of Fbxo7 is mediated specifically through regulation of cyclin D/cdk6.** The EMBO journal, v. 24, n. 17, p. 3104-3116, 2005.
34. NELSON, David E.; RANDLE, Suzanne J.; LAMAN, Heike. **Beyond ubiquitination: the atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins.** Open biology, v. 3, n. 10, p. 130131, 2013.

- 35 MEZIANE, El Kahina et al. **Knockdown of Fbxo7 reveals its regulatory role in proliferation and differentiation of haematopoietic precursor cells.** *Journal of cell science*, v. 124, n. 13, p. 2175-2186, 2011.
36. DI FONZO, Alessio et al. **FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome.** *Neurology*, v. 72, n. 3, p. 240-245, 2009.
37. NELSON, David E.; LAMAN, Heike. **A competitive binding mechanism between Skp1 and exportin 1 (CRM1) controls the localization of a subset of F-box proteins.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 22, p. 19804-19815, 2011.
38. ZHAO, Tianna et al. **FBXO7 Immunoreactivity in  $\alpha$ -Synuclein—Containing Inclusions in Parkinson Disease and Multiple System Atrophy.** *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 72, n. 6, p. 482-488, 2013.
- 39 KUIKEN, Hendrik J. et al. **Identification of F-box only protein 7 as a negative regulator of NF-kappa B signalling.** *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 16, n. 9, p. 2140-2149, 2012.
- 40 CHEN, Guoqing; GOEDDEL, David V. **TNF-R1 signaling: a beautiful pathway.** *Science*, v. 296, n. 5573, p. 1634-1635, 2002.
- 41 CHAN, Francis Ka-Ming. **Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling.** *Cytokine*, v. 37, n. 2, p. 101-107, 2007.
- 42 POPOVIC, Doris; VUCIC, Domagoj; DIKIC, Ivan. **Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment.** *Nature medicine*, v. 20, n. 11, p. 1242-1253, 2014.
- 43 RAYNER, Stephanie L. et al. **Using proteomics to identify ubiquitin ligase–substrate pairs: how novel methods may unveil therapeutic targets for neurodegenerative diseases.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 76, n. 13, p. 2499-2510, 2019.
- 44 TEIXEIRA, Felipe Roberti et al. **Gsk3 $\beta$  and Tomm20 are substrates of the SCFFbxo7/PARK15 ubiquitin ligase associated with Parkinson's disease.** *Biochemical Journal*, v. 473, n. 20, p. 3563-3580, 2016.
- 45 SCHRÖER, Andreas et al. **Cloning and characterization of UXT, a novel gene in human Xp11, which is widely and abundantly expressed in tumor tissue.** *Genomics*, v. 56, n. 3, p. 340-343, 1999.



- 46 MOSS, Tijuana N. et al. **UXT (Ubiquitously Expressed Transcript) causes mitochondrial aggregation.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 43, n. 3, p. 139-146, 2007.
- 47 ZHAO, Huiwu et al. **UXT is a novel centrosomal protein essential for cell viability.** *Molecular biology of the cell*, v. 16, n. 12, p. 5857-5865, 2005.
- 48 MARKUS, Steven M. et al. **Identification and characterization of ART-27, a novel coactivator for the androgen receptor N terminus.** *Molecular biology of the cell*, v. 13, n. 2, p. 670-682, 2002.
- 49 TANEJA, Samir S. et al. **ART-27, an androgen receptor coactivator regulated in prostate development and cancer.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 14, p. 13944-13952, 2004.
- 50 SÁNCHEZ-MORGAN, Nuria et al. **UXT Is a LOX-PP Interacting Protein That Modulates Estrogen Receptor Alpha Activity in Breast Cancer Cells.** *Journal of cellular biochemistry*, v. 118, n. 8, p. 2347-2356, 2017.
- 51 SETHURATHINAM, Shalini et al. **UXT plays dual opposing roles on SARM-induced apoptosis.** *FEBS letters*, v. 587, n. 20, p. 3296-3302, 2013.
- 52 HUANG, Yuefeng et al. **UXT-V1 facilitates the formation of MAVS antiviral signalosome on mitochondria.** *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 1, p. 358-366, 2012.
- 53 SUN, Shaogang et al. **UXT is a novel and essential cofactor in the NF-κB transcriptional enhanceosome.** *The Journal of cell biology*, v. 178, n. 2, p. 231-244, 2007.
- 54 HUANG, Yuefeng et al. **UXT-V1 protects cells against TNF-induced apoptosis through modulating complex II formation.** *Molecular biology of the cell*, v. 22, n. 8, p. 1389-1397, 2011.
- 55 HOSPENTHAL, Manuela K.; MEVISSEN, Tycho ET; KOMANDER, David. **Deubiquitinase-based analysis of ubiquitin chain architecture using Ubiquitin Chain Restriction (UbiCRest).** *Nature protocols*, v. 10, n. 2, p. 349-361, 2015.

56 NELSON, David E.; LAMAN, Heike. **A competitive binding mechanism between Skp1 and exportin 1 (CRM1) controls the localization of a subset of F-box proteins.** Journal of Biological Chemistry, v. 286, n. 22, p. 19804-19815, 2011.

57 SPAGNOL, Valentine et al. **The E3 ubiquitin ligase SCF (Fbxo7) mediates proteasomal degradation of UXT isoform 2 (UXT-V2) to inhibit the NF-κB signaling pathway.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, v. 1865, n. 1, p. 129754, 2021.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa.** São Paulo: Atlas, 4ed. 2009.

JUNG, Carl Gustav. **Estudos sobre psicologia analítica.** Petrópolis: Vozes, 1978. (Obras completas de C. G. Jung v. VII).



## 8 ANEXOS

## 8.1 Trabalhos científicos publicados, não relacionados à tese de mestrado

- 8.1.1 Robeldo, T., Canzi, E. F., de Andrade, P. M., Santana, J. P. P., Teixeira, F. R., Spagnol, V., ... & Borra, R. C. (2020). Effect of Tahiti lime (*Citrus latifolia*) juice on the Production of the PGF2 $\alpha$ /PGE2 and Pro-Inflammatory Cytokines involved in Menstruation. *Scientific Reports*, 10(1), 1-16.

SCIENTIFIC  
REPORTS

nature research



OPEN

## Effect of Tahiti lime (*Citrus latifolia*) juice on the Production of the PGF2 $\alpha$ /PGE2 and Pro-Inflammatory Cytokines involved in Menstruation

Thaiane Robeldo<sup>1,5</sup>, Edione Fatima Canzi<sup>2,3</sup>, Priscila Maria de Andrade<sup>4,5</sup>, Jhonne Pedro Pedotte Santana<sup>1</sup>, Felipe Roberti Teixeira<sup>1</sup>, Valentine Spagnol<sup>1</sup>, Beatriz Helena Lameiro Noronha Sales Maia<sup>2</sup>, Maristela Carbol<sup>4</sup>, Erika Gonçalves Caneira<sup>4</sup>, Maria Fátima das Graças Fernandes Da Silva<sup>1,3</sup> & Ricardo Carneiro Borra<sup>1</sup>✉

Tahiti lemon juice (*Citrus latifolia*) (TLJ), as a natural source of flavonoids, has been used as an alternative to anti-inflammatory drugs for the treatment of dysmenorrhea and menstrual excessive bleeding, often associated with an imbalance of the prostaglandins (PG) levels. However, despite the positive effects, the mechanisms that rule menstruation control are still unknown. Therefore, the objectives were to characterize the TLJ and analyze its effect on the production of PGF2 $\alpha$ , PGE2 and pro-inflammatory cytokines involved in menstruation. Flavonoids from TLJ were discriminated by UPLC-DAD-MS/MS (Qq-TOF) and the effects of TLJ were studied *in vitro* by quantification of the contraction of myoblasts in culture and PGF2 $\alpha$  and PGE2 productions. Further, the systemic and menstrual fluid levels of PGF2 $\alpha$ , PGE2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, AK1B1 and AK1C3 enzymes produced by women during the menstrual period were compared after exposition or not to TLJ or meloxicam. The results showed that TLJ induces an increase in the contraction of myoblasts and the PGF2 $\alpha$  supernatant level. Regarding *in vivo* analysis, a higher concentration of PGF2 $\alpha$  and an unaltered PGE2 level was also found in the menstrual blood of women treated with TLJ, in contrast with a lower level of PGE2 and PGF2 $\alpha$  observed in the meloxicam group. Concerning cytokines, only menstrual TNF- $\alpha$  levels decrease after treatment with TLJ or meloxicam. In conclusion, TLJ may favor the control of menstruation events via a PGF2 $\alpha$  mediated muscle contractile response.

- 8.1.2** Dores-Silva, P. R., Kiraly, V. T. R., de Oliveira Moritz, M. N., Serrão, V. H. B., Dos Passos, P. M. S., Spagnol, V., ... & Borges, J. C. (2021). **New insights on human Hsp70-escort protein 1: Chaperone activity, interaction with liposomes, cellular localizations and HSPA's self-assemblies remodeling.** International Journal of Biological Macromolecules, 182, 772-784.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



## New insights on human Hsp70-escort protein 1: Chaperone activity, interaction with liposomes, cellular localizations and HSPA's self-assemblies remodeling



Paulo Roberto Dores-Silva<sup>a,b,1</sup>, Vanessa Thomaz Rodrigues Kiraly<sup>a,1</sup>, Milene Nóbrega de Oliveira Moritz<sup>a</sup>, Vitor Hugo Balasco Serrão<sup>c</sup>, Patrícia Maria Siqueira dos Passos<sup>d</sup>, Valentine Spagnol<sup>d</sup>, Felipe Roberti Teixeira<sup>d</sup>, Lisandra Marques Gava<sup>d</sup>, David Mario Cauvi<sup>b</sup>, Carlos Henrique Inácio Ramos<sup>e</sup>, Antonio De Maio<sup>b,f,g</sup>, Júlio César Borges<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Sao Carlos Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, Sao Carlos, SP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Surgery, School of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, USA

<sup>c</sup> Department Laboratory of Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

<sup>d</sup> Department of Genetics and Evolution, Federal University of Sao Carlos, SP, Brazil

<sup>e</sup> Institute of Chemistry, State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

<sup>f</sup> Center for Investigations of Health and Education Disparities, University of California, San Diego, La Jolla, USA

<sup>g</sup> Department of Neurosciences, School of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 November 2020

Received in revised form 9 April 2021

Accepted 9 April 2021

Available online xxxxx

#### Keywords:

Hsp70

hHep1

HSPA9

Human mortalin

HSPA1A

Protein interaction

### ABSTRACT

The 70 kDa heat shock proteins (Hsp70) are prone to self-assembly under thermal stress conditions, forming supramolecular assemblies (SMA), what may have detrimental consequences for cellular viability. In mitochondria, the cochaperone Hsp70-escort protein 1 (Hep1) maintains mitochondrial Hsp70 (mtHsp70) in a soluble and functional state, contributing to preserving proteostasis. Here we investigated the interaction between human Hep1 (hHep1) and HSPA9 (human mtHsp70) or HSPA1A (Hsp70-1A) in monomeric and thermic SMA states to unveil further information about the involved mechanisms. hHep1 was capable of blocking the formation of HSPA SMAs under a thermic treatment and stimulated HSPA ATPase activity in both monomeric and preformed SMA. The interaction of hHep1 with both monomeric and SMA HSPAs displayed a stoichiometric ratio close to 1, suggesting that hHep1 has access to most protomers within the SMA. Interestingly, hHep1 remodeled HSPA9 and HSPA1A SMAs into smaller forms. Furthermore, hHep1 was detected in the mitochondria and nucleus of cells transfected with the respective coding DNA and interacted with liposomes resembling mitochondrial membranes. Altogether, these new features reinforce that hHep1 act as a “chaperone for a chaperone”, which may play a critical role in cellular proteostasis.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 8.2 Trabalhos científicos publicados, relacionados à tese de mestrado

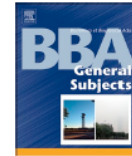
- 8.2.1** Spagnol, V., Oliveira, C. A., Randle, S. J., Passos, P. M., Correia, C. R., Simaroli, N. B., ... & Teixeira, F. R. (2021). **The E3 ubiquitin ligase SCF (Fbxo7) mediates proteasomal degradation of UXT isoform 2 (UXT-V2) to inhibit the NF-κB signaling pathway.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1865(1), 129754.



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

BBA - General Subjects

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbagen](http://www.elsevier.com/locate/bbagen)



### The E3 ubiquitin ligase SCF(Fbxo7) mediates proteasomal degradation of UXT isoform 2 (UXT-V2) to inhibit the NF-κB signaling pathway



Valentine Spagnol<sup>a</sup>, Caio A.B. Oliveira<sup>a</sup>, Suzanne J. Randle<sup>c</sup>, Patrícia M.S. Passos<sup>a</sup>, Camila R.S.T.B. Correia<sup>a</sup>, Natália B. Simaroli<sup>a</sup>, Joice S. Oliveira<sup>a</sup>, Tycho E.T. Mevissen<sup>d,e</sup>, Ana Carla Medeiros<sup>b</sup>, Marcelo D. Gomes<sup>b</sup>, David Komander<sup>d,f</sup>, Heike Laman<sup>c</sup>, Felipe Roberti Teixeira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Genetics and Evolution, Federal University of Sao Carlos, Brazil

<sup>b</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, Brazil

<sup>c</sup>Department of Pathology, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QP, UK

<sup>d</sup>MRC Laboratory of Molecular Biology, Francis Crick Avenue, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge CB2 0QH, UK

<sup>e</sup>Harvard Medical School, Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, 250 Longwood Ave, Boston, MA 02115, USA

<sup>f</sup>The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Ubiquitin Signalling Division, 1G Royal Parade, Parkville 3052, VIC, Australia

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
E3 ubiquitin ligase  
NF-kappa B (NF-κB)  
SCF(Fbxo7)  
UXT-V2  
UXT-V1  
Ubiquitylation (ubiquitination)

#### ABSTRACT

**Background:** Ubiquitously expressed Transcript isoform 2 (UXT-V2) is a prefoldin-like protein involved in NF-κB signaling, apoptosis, and the androgen and estrogen response. UXT-V2 is a cofactor in the NF-κB transcriptional enhanceosome, and its knockdown inhibits TNF-α-induced NF-κB activation. Fbxo7 is an F-box protein that interacts with SKP1, Cullin1 and RBX1 proteins to form an SCF(Fbxo7) E3 ubiquitin ligase complex. Fbxo7 negatively regulates NF-κB signaling through TRAF2 and cIAP1 ubiquitination.

**Methods:** We combine co-immunoprecipitation, ubiquitination *in vitro* and *in vivo*, cycloheximide chase assay, ubiquitin chain restriction analysis and microscopy to investigate interaction between Fbxo7 and overexpressed UXT-V2-HA.

**Results:** The Ubl domain of Fbxo7 contributes to interaction with UXT-V2. This substrate is polyubiquitinated by SCF(Fbxo7) with K48 and K63 ubiquitin chain linkages *in vitro* and *in vivo*. This post-translational modification decreases UXT-V2 stability and promotes its proteasomal degradation. We further show that UXT-V1, an alternatively spliced isoform of UXT, containing 12 additional amino acids at the N-terminus as compared to UXT-V2, also interacts with and is ubiquitinated by Fbxo7. Moreover, *FBXO7* knockdown promotes UXT-V2 accumulation, and the overexpression of Fbxo7-ΔF-box protects UXT-V2 from proteasomal degradation and enhances the responsiveness of NF-κB reporter. We find that UXT-V2 colocalizes with Fbxo7 in the cell nucleus.

**Conclusions:** Together, our study reveals that SCF(Fbxo7) mediates the proteasomal degradation of UXT-V2 causing the inhibition of the NF-κB signaling pathway.

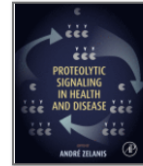
**General significance:** Discovering new substrates of E3 ubiquitin-ligase SCF(Fbxo7) contributes to understand its function in different diseases such as cancer and Parkinson.

- 8.2.2** dos Passos, P. M. S., de Oliveira, C. A. B., Spagnol, V., Martins, I. F. M., & Teixeira, F. R. (2022). **Ubiquitin ligases: Proteolytic signaling, protein turnover, and disease**. In *Proteolytic Signaling in Health and Disease* (pp. 11-40). Academic Press.
- 



## Proteolytic Signaling in Health and Disease

2022, Pages 11-40



### CHAPTER 2

## ***Ubiquitin ligases: Proteolytic signaling, protein turnover, and disease***

Patrícia Maria Siqueira dos Passos<sup>a</sup>, Camila Rolemberg Santana Travaglini Berti de Correia<sup>a</sup>, Caio Almeida Batista de Oliveira<sup>a</sup>, Valentine Spagnol, Isabela Fernanda Morales Martins, and Felipe Roberti Teixeira

*Department of Genetics and Evolution, Federal University of Sao Carlos, Brazil*

---