

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-graduação em Bioquímica

NICHELLE ANTUNES VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS HUMANAS HAP1
NOCAUTE PARA *FBXO25*: VIA DE SINALIZAÇÃO DA ERK
QUINASE E PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Ribeirão Preto/SP

2017

Nichelle Antunes Vieira

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS HUMANAS HAP1 NOCAUTE
PARA *FBXO25*: VIA DE SINALIZAÇÃO DA ERK QUINASE E
PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Bioquímica como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências, área de concentração
Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

Ribeirão Preto/SP

2017

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.

Vieira, Nichelle Antunes

Caracterização de células humanas Hap1 nocaute para *FBXO25*:
via de sinalização da ERK quinase e proliferação celular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da FMRP/USP. Departamento de Bioquímica e
Imunologia.

Ribeirão Preto – Julho 2017. 65p.

Orientador: Dr. Marcelo Damário Gomes

1-FBXO25 , 2-MAPKs- ,3- ERK1/2, 4- Proliferação celular

FICHA DE APROVAÇÃO

Nichelle Antunes Vieira

Caracterização de células humanas Hap1 nocaute para *FBXO25*: via de sinalização da ERK quinase e proliferação celular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

Ass: _____

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP

Prof^a. Dr^a Flávia Alessandra Guarnier

Ass: _____

Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Andreia Machado Leopoldino

Ass: _____

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP)

Prof. Dr Luis Lamberti Pinto da Silva

Ass: _____

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP

AGRADECIMENTOS

A minha família, por me apoiarem sempre em minhas escolhas, me darem suporte para que eu alcance meus objetivos e sonhos e por serem meu alicerce em todos os momentos. EU AMO VOCÊS.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes, pela confiança em me receber em seu laboratório, pelos seus ensinamentos e por contribuir para minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Cláudio Miguel Costa Neto, por nos permitir fazer uso do seu laboratório, assim como seus alunos por estarem sempre disponíveis a ajudar; em especial a Sarah que me auxiliou incontáveis vezes, pelas discussões científicas e pela amizade incrível.

A Profa. Dra. Munira Baqui pelos ensinamentos e discussões que tanto contribuíram para a conclusão desse trabalho.

A todos os membros do laboratório e grupo de pesquisa, Ana Carla, Priscila, Dimitrius (Dimi) e Felipe pelos ensinamentos, auxílio e paciência que tiveram comigo. Muito Obrigada!! Meu muito obrigada também pela amizade e por me aturem nesse dois anos, em especial a Ana por me aguentar quase que 24h por dia, e ser minha companheira não só de bancada mas também de casa, obrigada Ana por ser um dos meus presentinhos, pela amizade e pela convivência.

Aos meus presentinhos Nathália, Matheus, Israel, Sarah e André, pela amizade, companheirismo, conversas no corredor, conselhos, risadas; as inúmeras histórias construídas nesses dois anos e claro pela troca de experiência científica. Eu sou muito grata pela vida ter me dado vocês, e qualquer coisa que eu venha a escrever não será capaz de expressar o carinho e gratidão que tenho por vocês...

Ao meu super presentinho Dimi... Obrigada, obrigada, obrigada... pelos ensinamentos que tanto contribuíram com meu amadurecimento profissional, pela paciência e eu sei que você teve muita, pela convivência diária, por seu meu parceiro de bancada e fora dela, pelas inúmeras discussões acadêmicas e as não

acadêmicas, pela AMIZADE incrível. Eu sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhado com você e me sinto incrivelmente feliz por ter você como amigo. Obrigada por tudo...

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica pela gentileza de sempre, em especial a Cacilda pelo carinho, cuidado e todo auxílio prestado.

A Capes pelo auxílio;

A FAPESP, pelo auxílio ao projeto

E a todos que de alguma forma contribuíram para conclusão desta etapa, o meu muito obrigada!

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale”.

Marie Curie

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O sistema Ubiquitina-Proteassoma	4
Figura 2- Representação de duas classes de E3 ligases	6
Figura 3- Estrutura representativa do complexo SCF	7
Figura 4 - Representação da sinalização Canônica da via da MAPKs	12
Figura 5- Caracterização da linhagem de células humanas HAP1 nocaute de <i>FBXO25</i>	24
Figura 6- Comparação da taxa de duplicação celular das linhagens parentais e <i>FBXO25</i> ^{KO} estimulada com Trifosfato de Adenosina (ATP) e Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA)	26
Figura 8. Ensaio de proliferação por incorporação de BrdU	27
Figura 9. Distribuição em porcentagem das fases do ciclo celular de células parentais e <i>FBXO25</i> ^{KO} tratadas com ATP e PMA	30
Figura 10- Avaliação dos níveis de ciclina D1 e B1 das células parentais e <i>FBXO25</i> ^{KO}	32
Figura11: Análise por Western blotting dos níveis de ERK1/2 fosforilados em células parentais e <i>FBXO25</i> ^{KO} tratadas ou não com 100ng/ml de PMA	34
Figura12- Ensaio para verificação de apoptose celular	36
FIGURA 13 - Ensaio de toxicidade celular (teste do LDH - Lactato desidrogenase) em células parentais e <i>FBXO25</i> ^{KO}	38

Sumário

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Sistema Ubiquitina-Proteassoma (SUP) e E3 ligase do tipo SCF	3
1.2 Proteína FBXO25	9
1.3 Via das MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) sinalização para proliferação.....	11
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivo específico.....	16
3 MATERIAIS E METODOS.....	17
3.1 Linhagem e Cultivo Celular	17
3.2 Avaliação da perda de expressão de <i>FBXO25</i> mediada por CRISPR-Cas9 em células HAP1.....	17
3.3 Caracterização da taxa de duplicação estimulada com Trifosfato de Adenosina (ATP) e Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA)	18
3.4 Avaliação da citotoxicidade celular em células parentais e <i>FBXO25</i> ^{KO} . 19	
3.5 Caracterização do perfil de proliferação celular, ciclo celular e apoptose por meio de citometria de fluxo	20
3.5.1 Mensuração da síntese de DNA pela incorporação de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	20
3.5.2 Ensaio de Ciclo Celular – Iodeto de Propídio.....	21
3.5.3 Ensaio de Apoptose celular Apo-BrdU.....	21
3.6 Western Blot	22
3.6.1 Tratamento das células HAP1 parentais e HAP1 <i>FBXO25</i> ^{KO} com PMA e ATP.....	22

3.6.2	Extração Proteica e Western Blot	22
3.7	Análise estatística	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Avaliação da perda de expressão de FBXO25 mediada por CRISPR-Cas9 em células HAP1.....	24
4.2	Caracterização da taxa de duplicação estimulada com Trifosfato de Adenosina (ATP) e Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA)	26
4.3	Avaliação da síntese de DNA incorporação de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	28
4.4	Análise do ciclo celular das células parentais e FBXO25 ^{KO}	30
4.5	Avaliação dos níveis de de ciclina D1 e B1.....	32
4.6	Avaliação dos níveis de fosforilação de ERK1/2 em células FBXO25..	34
4.7	Verificação dos níveis de Apoptose e citotoxicidade das células parentais e FBXO25 ^{KO}	36
4.8	Ensaio de toxicidade celular (teste do LDH - Lactato desidrogenase) em células parentais e FBXO25 ^{KO}	38
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO.....	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

RESUMO

Caracterização de células humanas Hap1 nocaute para *FBXO25*: via de sinalização da ERK quinase e proliferação celular. Vieira, N. A, 2017. Dissertação de mestrado 65p. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Julho 2017.

A proteína FBXO25 é uma E3-ligase do tipo SCF, responsável pela seletividade da ligação da Ub à proteína substrato e pelo direcionamento da proteína marcada para o barril proteassomal 26s. Sabe-se que FBXO25 é capaz de interagir e ubiquitinar a proteína Elk-1 em células HEK293T e, assim, inibir a expressão de genes importantes na regulação da proliferação celular, como *C-FOS* e *EGR-1*, após estímulo com o mitógeno PMA. Aqui mostramos que FBXO25 atua em um outro ponto da via das MAPKs, modulando os níveis de fosforilação de ERK1/2. Por meio da utilização de células nocaute para *FBXO25* (*FBXO25^{KO}*) foi possível observar que o tratamento com PMA promoveu aumento dos níveis de fosforilação de ERK1/2 nestas células quando comparadas com sua linhagem parental. Observou-se também que o estímulo com os mitógenos PMA ou ATP levou a um aumento da proliferação celular não relacionada à modulação direta do ciclo celular nas células nocautes, sendo que estas apresentaram uma redução significativa dos seus níveis de apoptose. Tomando esses resultados em conjunto, mostramos que FBXO25 atua sobre a sinalização de MAPK por meio de redução da ativação ERK1/2 e, dessa forma, promove uma resposta secundária sobre o fenótipo de proliferação celular.

PALAVRAS CHAVES: 1-FBXO25 , 2-MAPKs- , 3- ERK1/2, 4- Proliferação celular;

ABSTRACT

Characterization of human Hap1 knockout cells for FBXO25: ERK kinase signaling pathway and cell proliferation. Vieira, N.A, 2017. Masters thesis 65p. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, July 2017.

The FBXO25 protein is an SCF-type E3-ligase responsible for the selectivity of Ub binding to the protein and the targeting of the labeled protein to the 26s proteasome barrel. FBXO25 has been long known to be able to interact and ubiquitinate the Elk-1 protein in HEK293T cells, thereby inducing a decrease in the expression of important genes in the regulation of cell proliferation such as *C-FOS* and *EGR-1* after stimulation with the mitogen PMA. Here we show that FBXO25 acts at another point in the MAPK pathway by modulating the ERK1/2 phosphorylation levels. We observed that the treatment with PMA raised the phosphorylated levels of ERK1/2 in knockout cells for FBXO25 (FBXO25^{KO}) when compared to its parental lineage. Stimulation with the mitogens PMA or ATP also led to an increase in cell proliferation unrelated to a direct modulation of the cell cycle in knockout cells, with a significant weight of apoptosis levels being observed. Taking these results together, we show that FBXO25 acts on MAPK signaling by reducing ERK1/2 activation and thus promotes a secondary response on the cell proliferation phenotype.

Key words: 1-FBXO25 , 2-MAPKs- ,3- ERK1/2, 4- Cell proliferation

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Ubiquitina-Proteassoma (SUP) e E3 ligase do tipo SCF

A renovação de proteínas é um importante mecanismo de regulação da função celular. Esse turnover proteico está em fluxo constante e é composto basicamente de dois mecanismos básicos de síntese e degradação, sendo o mecanismo de síntese composto de ribossomos e chaperonas e o sistema de degradação composto de dois sistemas proteolíticos: o lisossomal e o sistema ubiquitina proteassoma (SUP) (Lecker *et al.*, 2006). Esses sistemas são responsáveis pela manutenção da homeostasia celular e modulação de diferentes processos como transdução de sinal, controle da proliferação, da apoptose, ativação de diversos genes, ciclo celular, entre outras vias que são de suma importância para o funcionamento da célula (Lecker *et al.*, 2006; Amm *et al.*, 2014; Sommer e Wolf, 2014)

O SUP foi caracterizado bioquimicamente nos anos 80, sendo descrito como um sistema de duas etapas dependentes de ATP: 1) ocorre a conjugação covalente da ubiquitina (Ub) as proteínas a serem marcadas para degradação, e a segunda ocorre a hidrólise das proteínas marcadas com Ub por ação do complexo proteolítico proteassomal 26s, que é composto por duas subunidades proteolíticas: uma protease multicatalítica (MCP, do inglês multicatalytic protease) multimérica 20S e um atpase 19S. (Tanaka, 1998; Kaiser e Huang, 2005; De Bie e Ciechanover, 2011; Inobe e Matouschek, 2014; Aufderheide *et al.*, 2015). O SUP é considerado o principal responsável pela degradação das proteínas citosólicas e nucleares, sendo que 80 a 90% das proteínas são degradadas por esse sistema. (Nakayama e Nakayama, 2006; Darwin, 2009; Prakash *et al.*, 2009; Uchiki *et al.*, 2009; Schmidt e Finley, 2014; Aufderheide *et al.*, 2015).

A Ub é um pequeno polipeptídeo constituído por 76 resíduos de aminoácidos altamente conservados em eucariotos (Wilkinson, 2000; Kaiser e Huang, 2005; Amm *et al.*, 2014; Sommer e Wolf, 2014). O processo de ubiquitinação, nada mais é, que a ligação covalente entre a ubiquitina e a proteína a ser degradada, e ocorre

por meio de uma série de três reações que ocorrem de modo sequencial (Darwin, 2009; De Bie e Ciechanover, 2011; Collins *et al.*, 2017). Em primeiro lugar, a Ub é ativada por uma E1 (enzima ativadora de Ub) em uma reação dependente de ATP, formando uma ligação tioéster entre o grupo carboxílico C-terminal da Ub e o grupo sulfidrilo cisteína da enzima E1. Essa Ub é então transferida para uma enzima que conjuga a Ub á E2 (enzima conjugadora de Ub), por meio de uma reação de tioesterificação. No passo final, uma E3, Ub proteína ligase, catalisa a transferência da Ub para os substratos específicos, através da ligação do grupo ϵ - amino de um resíduo de lisina (Lys) da proteína alvo e o grupo C-terminal do resíduo de glicina da Ub (Cardozo e Pagano, 2004; Deshaies e Joazeiro, 2009; Lehman, 2009; De Bie e Ciechanover, 2011; Liu e Xue, 2011; Berndsen e Wolberger, 2014; Nath e Lieberman, 2017), como apresentado na figura 1.

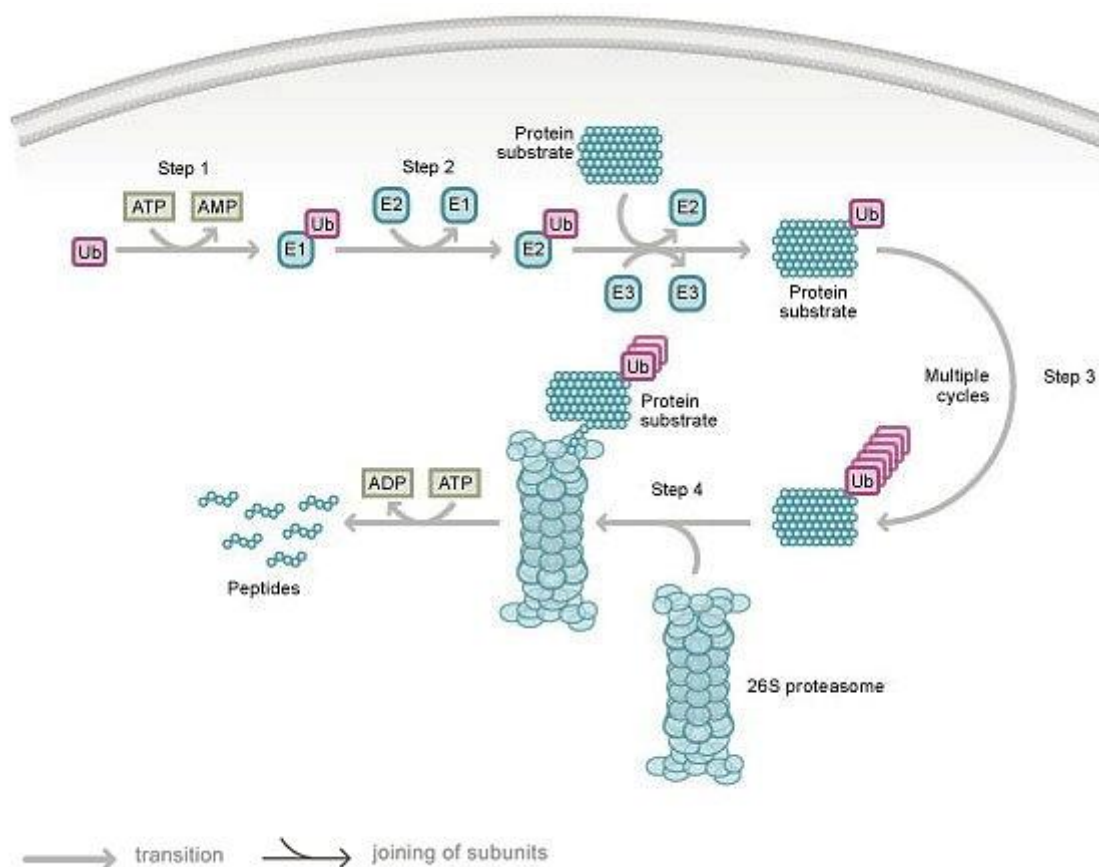


Figura 1. O sistema Ubiquitina-Proteassoma. O processo de ubiquitinação é um processo sequencial que envolve três classes de enzimas (E1, E2 e E3). Inicialmente, a enzima ativadora de Ub (E1) ativa uma Ub. A ubiquitina ativada é então transferida para enzima conjugadora de Ub (E2),

que por sua vez, a transfere para E3, que reconhece e marca o substrato para degradação no proteassoma 26s. (Corn, 2007)

As E3 ligases são enzimas chaves no processo de ubiquitinação, pois essas são encarregadas de realizar a interação substrato ubiquitina, sendo responsáveis pela seletividade da ligação da Ub e pelo direcionamento da proteína marcada para o “barril” proteassomal 26s (Uchiki *et al.*, 2009; Metzger *et al.*, 2014). As proteínas a serem degradadas podem ser mono ou poli-Ubiquitinadas, sendo que na poli-Ub ocorre por meio de ligações isopeptídicas entre o ϵ -amino de um resíduo de lisina da primeira Ub e o C-terminal da segunda Ub. As moléculas de Ub podem se ligar a seu substrato de diversas formas, sendo que a maneira e o local na qual a Ub está ligada pode alterar de forma significativa a sua função. Uma proteína pode apresentar ubiquitinação de um único resíduo de Lys ou de mais de um resíduo de Lys ou ainda apresentar uma combinação das duas formas (Magori e Citovsky, 2011; Berndsen e Wolberger, 2014). A poliubiquitinação de um proteína na Lys 48 levam a degradação via proteassomal (Tanaka, 1998; Kravtsova-Ivantsiv *et al.*, 2013). Enquanto que a Ub em outras lisinas, podem regular não só a degradação da proteína, mas também sua atividade em diversos outros processos celulares. (De Bie e Ciechanover, 2011; Aufderheide *et al.*, 2015).

As E3 Ub-ligases são a classe de enzimas mais heterogêneas na via de ubiquitinação (existem > 600 E3s ligases em seres humanos), pois medeiam a especificidade do substrato. Atualmente, as ligases do tipo E3, são classificadas em três tipos principais, dependendo da presença de domínios característicos e do mecanismo de transferência de ubiquitina para a proteína substrato. São as três classes: E3-ligase do tipo HECT, RING e RBR (Morreale, 2016)

A família HECT (*Homologus to E6-AP COOH-terminus*), E3 ligase monomérica, que possui o domínio HECT, que recebe a Ub ativada por E2 e então a transfere para o substrato, ou seja, as HECT formam uma ligação com a Ub antes que ocorra a transferência dessa para o resíduo de lisina da proteína a ser degradada (Scheffner e Kumar, 2014). A família de E3s tipo RING (*Really Interesting New Gene*), são as ubiquitina ligases mais abundantes. Elas são caracterizados

pela presença de um domínio de ligação ao zinco chamado RING ou por um domínio de U-box, que se assemelha as E3 do tipo RING, mas não contém zinco. Os domínios RING e U-box são responsáveis pela ligação do E2 carregado com ubiquitina auxiliando na transferência de ubiquitina. As E3-ligases do tipo RINGs, que podem ser monoméricas ou oligoméricas e utilizam o domínio RING para interagir com E2 (Deshaies e Joazeiro, 2009; Uchiki *et al.*, 2009; Pruneda *et al.*, 2012; Weathington e Mallampalli, 2013; Metzger *et al.*, 2014; Scheffner e Kumar, 2014).

Em analogia com a família HECT, as E3s ligases do tipo RBR (RING-between RING-RING), catalisam a transferência da ubiquitina através de uma reação de dois passos onde a ubiquitina é primeiro transferida para um catalisador, cisteína na E3- ligase e depois ao substrato. O nome RBR deriva da presença de dois domínios RING (RING1 e RING2), separados por um domínio intermediário (RING ou IBR). RING1 recruta a E2 carregada com ubiquitina e o domínio RING2 é o que possui uma cisteína catalítica. As ligases RBR E3 contêm domínios adicionais que são específicos para cada membro da família.

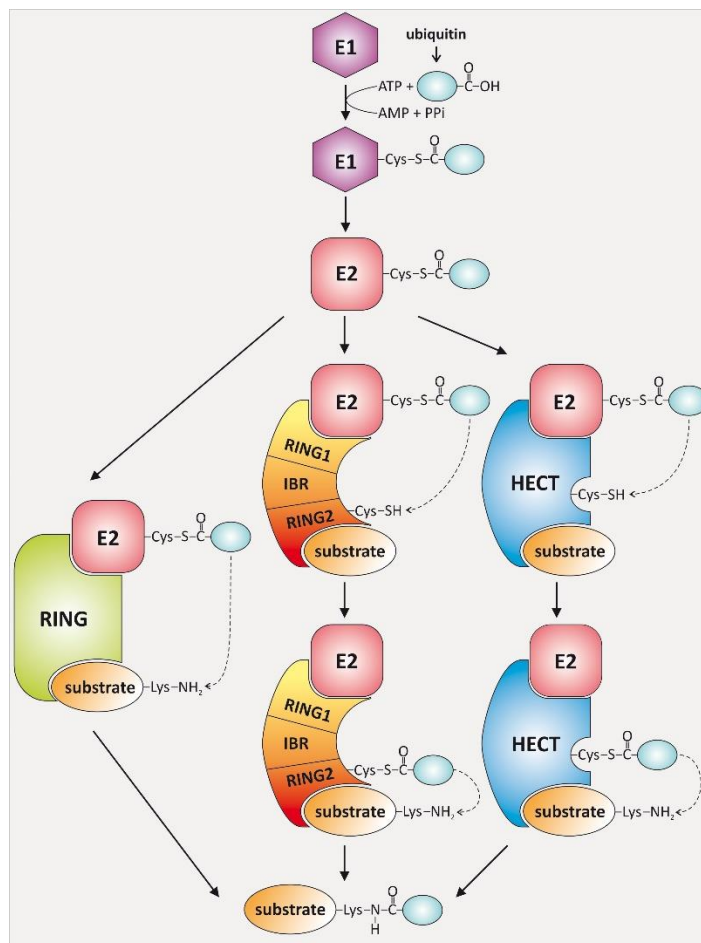


Figura 2. Representação das três classes de E3 ligases. As E3 ligases são classificadas em dois grupos, dependendo do modo de ação: As E3 do tipo RING (esquerda) transferem a Ub de E2 diretamente para o resíduo de lisina da proteína alvo e possuem como subtipo as E3 ligases do tipo U-BOX, que não possuem o domínio de ligação zinco. As E3 da família HECT (direita), conjuga a Ub em duas etapas 1) a Ub é transferida de E2 para o domínio HECT de uma ligase E3 de tipo HECT e, depois, Ub é transferida a um resíduo de lisina da proteína alvo. E a família RBR (RING-between RING-RING) (meio) que é análoga a HECT, porém as E3s do tipo RBR catalisam a transferência de ubiquitina através de uma reação de dois passos onde a ubiquitina é transferida pela primeira vez para uma cisteína na E3 e depois ao substrato. TRENDS in Cell Biology.

As E3 ligases do tipo RING excedem em muito os membros da família HECT e RBR, portanto são a classe mais estudadas. As E3 ligases do tipo RING podem ser enzimas únicas ou pertencerem a um complexo que possui subunidades múltiplas com proteínas adaptadoras capazes de mediar a interação entre o substrato e as ligases E2, como caracterizado pelo agente promotor de anáfase

Complexo (APC) e subfamília SCF1-Skp1-Cullin-F box- (Skp - S phase-kinase-associated protein-1, Cullin - por selecionar “to cull” substratos para degradação e uma proteína tipo F-box que contém um domínio conservado tipo F-box de interação com Skp1) (Cardozo e Pagano, 2004; Nakayama e Nakayama, 2005). A proteína Cullin 1, serve como uma base para o complexo SCF1, havendo em sua porção N-terminal a ligação de Skp1 e no C-terminal a ligação de uma proteína contendo um domínio RING (RBX ou Roc 1-2), como apresentado na Figura 3.

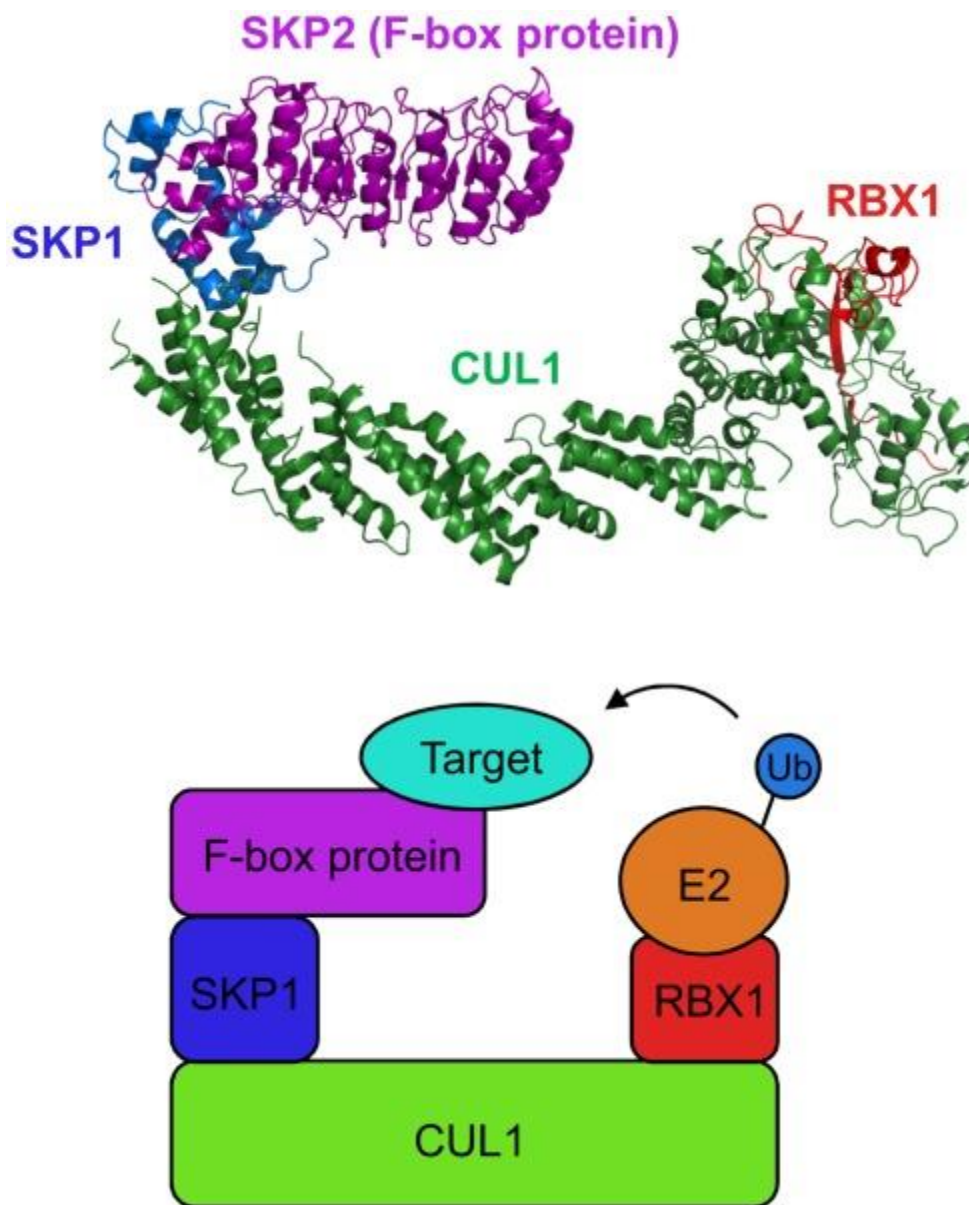


Figura 3. Estrutura representativa do complexo SCF1. A) Estrutura cristalina do complexo SCF/SKP2 de levedura (topo, Zheng et al., 2002, Hao et al., 2005) . O complexo SCF1 (SKP1 / CUL1

/ F-box protein) são montados utilizando a CUL1 como base. A CUL1 recruta E2 através de RBX1. Os substratos são então recrutados para o complexo por SKP1 e uma proteína F-box variável que determina a especificidade com o substrato. (Magori e Citovsky, 2011)

As E3s ligases da subfamília SCF, foram descritas como importantes reguladores de diversos fatores de transcrição e de reguladores da fase do ciclo celular uma vez que realizam ubiquitinação dependente de fosforilação de ciclinas da fase G1, G2 e M e de inibidores de Cdk (Yamasaki e Pagano, 2004; Satyanarayana e Kaldis, 2009; Matsumoto e Nakayama, 2013), e no processo de diversas vias de sinalização celular que ocorre por meio de ativação de quinases (Li e Blow, 2001; Ang e Wade Harper, 2005; Skaar *et al.*, 2013).

As proteínas F-box (Cenciarelli *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2004) fazem parte do complexo SCF e são responsáveis por conferir especificidade ao complexo, uma vez que, são responsáveis pelo reconhecimento do substrato para ubiquitinação (Cardozo e Pagano, 2004; Uchiki *et al.*, 2009; Skaar *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013). As proteínas F-box contêm um domínio C-terminal que interage com substratos e um motivo F-box, que possui de 40-50 aminoácidos que se liga à proteína Skp1 (Liu e Xue, 2011; Magori e Citovsky, 2011; Skaar *et al.*, 2013; 2014; Uddin *et al.*, 2016). As proteínas F-box possuem diferentes domínios de interação com o substratos, e portanto, são divididas em três categorias: FBXL, proteínas que possuem o domínio de interação com o substrato rico em leucina, FBXW, proteínas que possuem domínio WD40, e as FBXO, proteínas que possuem outros domínios de interação com o substrato (Cenciarelli *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2004).

1.2 Proteína FBXO25

A proteína FBXO25 é uma E3-ligase do tipo SCF1, que possui a capacidade de formar um complexo SCF1/FBXO25 estável e ativo, como demonstrado em experimentos de ubiquitinação *in vitro* (Hagens *et al.*, 2006; Maragno *et al.*, 2006). A FBXO25 foi descrita como uma proteína paráloga a FBXO32/Atrogin-1, proteína conhecida por ser um marcador de atrofia muscular (Bodine *et al.*, 2001; Gomes *et*

al., 2001), no entanto, apesar da similaridade de 65% entre elas, e embora FBXO25 esteja presente em abundância em tecidos como: cérebro, rim e intestino, quando avaliado a expressão dessa no tecido muscular, foi observado que nesse tecido FBXO25, apresenta-se pouco expressa, demonstrando assim que essa não foi efeito sobre o músculo e que não participa da sinalização para atrofia muscular (Maragno *et al.*, 2006). Estudos subsequentes, de distribuição subcelular da proteína FBXO25, demonstraram que a forma endógena de FBXO25, encontra-se predominantemente no núcleo de forma extranucleolar, em forma de “agregados” denominados “dots” (Hagens *et al.*, 2006; Maragno *et al.*, 2006; Manfiolli *et al.*, 2008)

Estes corpúsculos nucleares os “dots” parecem estar associados à estrutura da cromatina, estando presentes apenas na fase G1/telófase do ciclo celular (Manfiolli *et al.*, 2008). Através de experimentos de imunofluorescência utilizando dupla-marcação, verificou-se que os corpúsculos de FBXO25, apresentam-se em diferentes localizações e com diferente morfologia, quando comparados aos outros domínios nucleares já bem caracterizados, speckles, corpos de cajal e gems. Sendo assim, um novo corpo nuclear composto de proteínas FBXO25 foi descrito e denominado de “FANDs” (FBXO25 Associated Nuclear Domains) (Manfiolli *et al.*, 2008). Os FANDs são os primeiros e o único corpúsculo nuclear composto de proteínas do tipo F-box descrito até o momento.

A fim de se obter informações funcionais da FBXO25, e identificar as proteínas que interagem com esta, uma combinação de técnicas proteômicas que avaliam a interação proteína- proteína foram aplicadas (TAP-*Tandem Affinity Purification* e duplo-híbrido em leveduras). A partir da combinação dessas duas estratégias, foram identificadas 132 proteínas ligantes de FBXO25. Sendo que um dos ligantes caracterizados foi β -actina, que interagiu diretamente com FBXO25. A utilização de inibidores da polimerização da actina induziu uma redistribuição significativa dos FANDs, indicando que esses compartimentos são influenciados pelo estado de organizacional da β -actina nuclear. Os ensaios de transcrição realizado *in vitro* (*cell free system*) combinado com a interferência de anticorpos anti-FBXO25, demonstrou que está não só responde ao estado transcricional

celular, mas que está diretamente envolvida no processo de transcrição da célula, sendo este dependente ou não da via da β -actina nuclear. (Teixeira *et al.*, 2010)

Outros estudos realizados em nosso laboratório, utilizando “chips” de proteínas humana (Human ProtoArray®-Invitrogen), demonstrou que FBXO25 interage, ubiquitina e medeia a degradação proteossomal do fator de transcrição Elk-1, promovendo assim a redução da ativação dos genes como: *C-FOS* e *EGR-1* em células HEK293T estimuladas pelo mitógeno PMA. (Teixeira *et al.*, 2013) A fim de investigar a associação de FBXO25 com outros componentes da via de sinalização de ELK-1, o perfil de fosforilação de 43 substratos de quinases foi avaliado por meio de FosfoArrays (Phospho-KinaseAntibody Array- comercializado pela R&D Systems, EUA), hiperexpressando FBXO25. Os dados obtidos, demonstraram haver redução significativa dos níveis de fosforilação de ERK1/2 (pERK1/2), sugerindo o envolvimento de FBXO25 na regulação da via das MAPKs (Mitogen-activated protein kinases), via fosforilação de ERK1/2 (Teixeira *et al.*, 2013).

1.3 Via das MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) sinalização para proliferação

A regulação da proliferação celular é um processo complexo, que pode ser ativado por diversos fatores externos de crescimento, uma das vias que tem sido descritas como reguladoras da proliferação celular é a via das MAPKs (Mitogen-activated protein kinases). A via das MAPKs é uma das vias de sinalização mais conservadas, sendo essa via responsável por sinalizar para diversos processos celulares entre eles a proliferação celular, diferenciação, migração, apoptose e respostas ao estresse. (Shaul e Seger, 2007)

A via das MAPKs é formada por três famílias de quinase, MAPK (ERK1/2), MAPKK/MAP2K (MEK1/2) e MAPKKK/MAP3K (Raf-1). Essas proteínas são responsáveis por gerar uma cascata de três a cinco quinases, sendo que dessas, três subníveis são bem caracterizados, a via da ERK (*Extracellular signal- regulated kinase*), JNK (*c-jun amino N- terminal Kinase*) e a via do p38, como apresentado

na figura 4 (Legendre *et al.*, 2003; Galaria *et al.*, 2004; Katz *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008)

A ativação dessas vias ocorre por meio de fosforilação sequencial levando a ativação dos diversos componentes da via (Katz *et al.*, 2007). As Raf-1 são os primeiros componentes da via a serem ativados, essa ativação pode se dar tanto pela fosforilação de resíduos específicos de serina/treonina quanto por interação dessa proteína com uma proteína de ligação chamada GTP da família Ras ou Rho (Katz *et al.*, 2007; Roberts e Der, 2007; Ramos, J. W., 2008; Dworakowska *et al.*, 2009; Steelman *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2013) As MAPKKs são proteínas quinases serina/treonina que quando ativadas, fosforilam e ativam a próxima quinase da via, a MAPKK (MEK1/2), essas por sua vez, fosforilam resíduos específicos de treonina e tirosina ativando assim as MAPK (ERK1/2). Por fim, a MAPK pode fosforilar diversos substratos importantes para a resposta celular, pois depois de ativadas, essas proteínas fosforilam diversos substratos em todos os compartimentos celulares, incluindo proteínas na membrana, substratos nucleares e proteínas do citoesqueleto, além de outras quinases (Alldridge e Bryant, 2003; Katz *et al.*, 2007; Roberts e Der, 2007; Shaul e Seger, 2007; Liu *et al.*, 2008).

A ativação da cascata das MAPKs por Ras, outras formas de ativação, envolvendo mecanismos de sinalização bem conhecidos como Ca^{2+} , proteínas G, PKC. Parece que uma via de sinalização central foi mantida durante a evolução, sendo que as formas de ativação e os componentes ativados foram sendo diversificados, isto é, muitos receptores sinalizam através das MAPKs e muitos efetores podem ser regulados por ela, figura 4 (Roberts e Der, 2007; Tzivion, 2007; Liu *et al.*, 2008; Ramos, J. W., 2008; Rose *et al.*, 2010).

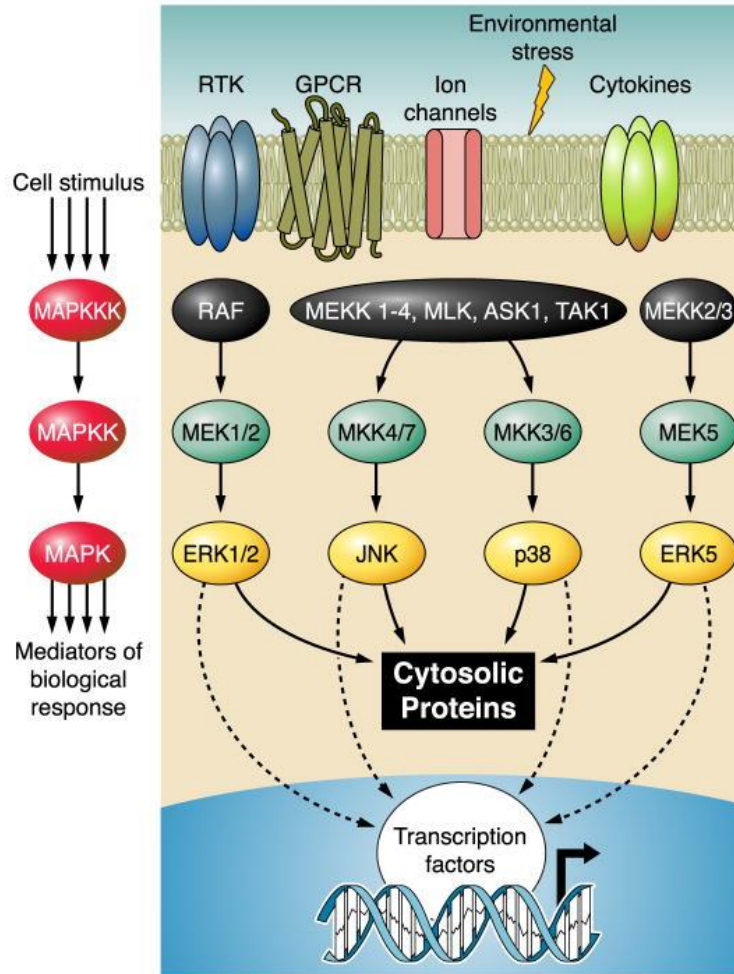


Figura 4. Representação da sinalização Canônica da via da MAPKs. Essa via é tipicamente ativada por eventos de fosforilação sequencial de três níveis: 1) fosforilação das MAPKKK 2) fosforilação das MAPKK, e 3) fosforilação das MAPK, no entanto diversas outras quinases já foram identificadas como participantes dessa via. Além disso, já se sabe da existência de múltiplos passos entre o estímulo celular, a ativação da MAPKKK até a resposta biológica (Rose *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos tem apresentado a participação da via ERK em processos biológicos como proliferação, senescência e morte celular (Lu e Xu, 2006; Katz *et al.*, 2007; Ramos, J. W., 2008; Dworakowska *et al.*, 2009; Srinivasan *et al.*, 2009; Kehat e Molkenin, 2010; Wortzel e Seger, 2011; Roskoski, 2012; Busca *et al.*, 2016). ERK tem sido apontada como um importante agente modulador da resposta a proliferação, uma vez que, essa possui a capacidade de induz a repressão do inibidor celular p27, aumento assim a expressão de ciclina D1, demonstrando a participação direta dessa via no ciclo celular (Alldridge e Bryant, 2003; Chambard *et al.*, 2007). Outros estudos demonstraram ainda que a serotonina, que não é um

mitogénio por si só, atua de forma sinérgica com o fator de crescimento de fibroblastos, uma vez que, contribui para a manutenção da atividade de ERK na fase tardia e demonstrando aumento da síntese de DNA e assim a progressão do ciclo celular (Nebigil *et al.*, 2000; Chambard *et al.*, 2007; Drozdov *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2010). Evidências recentes indicam ainda, que a ativação de ERK ao longo de G1 é necessária para que a célula possa realizar a entrada na fase S (Liu e Greene, 2001; Chambard *et al.*, 2007; Meloche e Pouyssegur, 2007), demonstrando que ERK atua como modulador chave da indução da proliferação (Meloche e Pouyssegur, 2007; Drozdov *et al.*, 2009; Dworakowska *et al.*, 2009; Srinivasan *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstram que mais de uma via das MAPKs podem ser ativadas simultaneamente de modo que uma via venha se sobrepor sobre a outra. Esse efeito depende diretamente do tipo de ativação, da intensidade dos mesmos e dos receptores celulares presentes na célula. (Katz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008)

ERK1/2 quando fosforiladas possuem a capacidade de translocar para o núcleo ativando diversos genes como *C-FOS*, *EGR-1* e *MCL-1*, *C-MYC* (Evan *et al.*, 1994; Cassimere *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2009; Roskoski, 2012). Em resposta à ativação MAPK esse genes quando ativados regulam diversos eventos celulares incluindo proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e apoptose. Além da fosforilação proteica, a ubiquitinação tem sido descrita como um regulador chave de diferentes vias de transdução de sinal, incluindo a ativação de ERK (Lu *et al.*, 2002; Katz *et al.*, 2007; May e Hill, 2008; Maruyama *et al.*, 2010).

Texeira *et al.*, (2013) demonstrou que a E3 ligase FBXO25, promove ubiquitinação e degradação proteossomal do fator de transcrição Elk-1 levando a diminuição da expressão de genes que induzem crescimento. Diferentes E3 ligases, atuam sobre a sinalização da via das MAPKs, seja interferindo diretamente sobre as proteínas da via ou respondendo aos estímulos provindos dessa sinalização, o que permite modular respostas que levam a proliferação ou morte celular por exemplo. (Wei *et al.*, 2013; Zhao, J. *et al.*, 2013; Zhao, Jing *et al.*, 2013;

Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Uddin *et al.*, 2016). Dessa forma a hipótese desse trabalho é que FBXO25 pode de alguma forma contribuir por meio de ubiquitinação na regulação da fosforilação de ERK1/2, modulando assim a resposta dessa via aos estímulos para proliferação celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o possível envolvimento da proteína Ubiquitina Ligase FBXO25 na regulação da via de sinalização da MAPK/ERK, por meio de caracterização da resposta celular de células humanas HAP1 nocaute para *FBXO25* (*FBXO25^{KO}*) e sua possível contribuição no fenótipo de proliferação celular.

2.2 Objetivo específico

- Caracterizar a linhagem *FBXO25^{KO}*.
- Avaliar os efeitos de *FBXO25* sobre a sinalização da via das MAPK/ERK .
- Avaliar os efeitos sobre a regulação sobre a via de proliferação celular.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 Linhagem e Cultivo Celular

As células HAP1 (*near-haploid cell line*) é uma linhagem celular humana haplóide (possui uma única cópia de quase todos os cromossomos, exceto do cromossomo 15 que está fundido ao cromossomo 19) que apresenta característica fibrobrástica, esta linhagem celular é derivada da linhagem KBM-7, células de leucemia mielóide crônica (LMC). As células foram cultivadas em meio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, Invitrogen Gibco®) suplementado com 20% de soro bovino inativado (FBS, Invitrogen Gibco®), 50ug/ml de gentamicina (Invitrogen Gibco®). As células foram incubadas e mantidas a 37°C em incubadora com 5% de CO₂ humidificada.

As linhagens de células HAP1 FBXO25^{KO}, foram geradas utilizando a técnica Crispr-Cas9, onde foi introduzido a nível genômico uma deleção de 23 pares de bases (pb), localizada no exon 6 das três variantes de *FBXO25*, a produção das células nocaute foi realizada pela empresa Horizon Genomics, Austria.

3.2 Avaliação da perda de expressão de *FBXO25* mediada por CRISPR-Cas9 em células HAP1.

A fim de avaliar e caracterizar as células HAP1 parental e a HAP1 FBXO25^{KO}, as células foram então cultivadas em placas de 10 cm para obtenção do DNA genômico que foi extraído a partir da utilização do kit- Sigma's GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit. Para amplificação da sequência que continha a deleção dos 23 pb utilizamos sequência de primers descrita na tabela 1.

Tabela 1. Tabela de sequência de primers utilizada para verificação do NOCAUTE de *FBXO25*

PRIMERS	SEQUÊNCIA
CRISPRGEN- SENSE	CCTTGTATGAAGGTCTCTTCAGGTT
CRISPRGEN-ANTISENSE	CCATCTCCTTTGCAACCAAATTTCAA

A reação de PCR foi preparada utilizando uma concentração final de 0,5µM de cada primer (Sense e Antisense), 10 ul de 2X Phusion Flash PCR Master Mix, 100ng de DNA genômico. A ciclagem para a PCR foi de 1 ciclo de 98° C por 10 segundos, seguido por 30 ciclos de 98° por 1 segundo, um gradiente de temperatura variando de 56 a 62° C por 15 segundos, e 72° C por 1 minutos, e por fim 1 ciclo de 72° C por 1 minuto.

O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1% através de eletroforese. Esse produto foi então purificado utilizando o QIAquick® Gel Extraction kit (QIAGEN). O material purificado foi utilizado para análise de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger utilizando o “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (ThermoFisher Scientific). A reação foi feita no equipamento ABI Prism 3130 Genetic Analyzer do Núcleo de Serviços em Biotecnologia da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. Os eletroferogramas e as sequências foram obtidas com auxílio do programa Chromas 2.5.0 e foram comparadas com a sequência referência depositada no banco de dados Gen Bank (sequência referência NC_000008.11) e alinhadas utilizando a plataforma Clustal Omega - Multiple Sequence Alignment.

3.3 Caracterização da taxa de duplicação estimulada com Trifosfato de Adenosina (ATP) e Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA)

A fim de medir a duplicação celular, $2,5 \times 10^5$ células parentais e FBXO25^{KO} foram plaqueadas em triplicatas em placas de seis poços. As células foram então tratadas ou não com 100 nM de PMA ou com 5mM de ATP, por 24h, sendo o meio de cultivo trocado após esse período. As células foram então contadas a cada 3 dias durante 9 dias, utilizando o contador de células automatizado TC20™ Automated Cell Counter - Biorad. Depois da contagem $2,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas novamente para contagem subsequentes. Por meio desse ensaio obtido um curva de crescimento que permitiu determinar o tempo de duplicação (*population doubling time*). Os cálculos foram realizados por meio das formulas descritas abaixo. A viabilidade celular foi acompanhada por meio da coloração com azul de trypan.

$$DP = 2,5 * \text{Log}nF/nI \quad (1)$$

DP= *Doubling time population*

nF= nº de células final

nI= nº de células inicial

Os dados do ensaio de tempo de duplicação foram obtidos por meio de três ensaios realizados de forma independente, a fim de validar os dados obtidos.

3.4 Avaliação da citotoxicidade celular em células parentais e FBXO25^{KO}

As células HAP1 parental e FBXO25^{KO} foram tratadas ou não com PMA e ATP nas mesmas concentrações do experimento anterior, a fim de avaliarmos a citotoxicidade dos tratamentos sobre as células parentais e FBXO25^{KO}, ambas linhagens foram comparadas com células não tratadas. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços em triplicata ($2,5 \times 10^5$ células por poço). As análises de toxicidade foram feitas após 24 horas, utilizando o ensaio de LDH (Lactato Desidrogenase) que permite a detecção de danos ao nível da membrana celular. O teste baseia-se na redução do NAD⁺ a NADH pela LDH (enzima citosólica

que é liberada para o meio extracelular quando a integridade da membrana é afetada). Os teste foram realizados nos sobrenadantes das linhagens celulares de acordo com as intruções mencionadas no kit CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega), e as leitura realizadas em 530nm no equipamento Enspire, Perkin-Elmer. Três experimentos foram realizados de formas independetes a fim de validar os resultados obtidos.

3.5 Caracterização do perfil de proliferação celular, ciclo celular e apoptose por meio de citometria de fluxo

As leituras dos ensaios de citometria, foram adquiridos no citômetro de fluxo FACS CANTO II (becton- dickison San Jose, CA), no laboratório de citometria de fluxo do Departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). As análises foram feitas por meio do programa FACS DIVA (BD) e Modfit 2.0.

3.5.1 Mensuração da síntese de DNA pela incorporação de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

A incorporação de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) fornece uma medida da proliferação celular, uma vez que o BrdU é um derivado da base uridina e possui uma estrutura análoga à da Timidina o que confere a capacidade de poder ser incorporado no DNA durante a fase de síntese (fase S) como um substituto da Timidina. A fim de se obter dados de proliferação celular , as células parentais e FBXO25^{ko} foram plaqueadas em placas de 6 poços em triplicata ($2,5 \times 10^5$ células por poço), sendo expostas a 12 h de privação de soro fetal bovino, após esse período as células foram expostas ao tratamento com 100nM de PMA ou com 5mM ATP por 24h. Após esse tempo ambas linhagens foram incubadas com 10 mM de BrdU (Sigma-Aldrich) por 2 h. Após esse tempo as células foram coletadas com tripsina e permeabilizadas com etanol a 95% em PBS 1x durante 1 h a 4°C. Os grânulos celulares foram obtidos por centrifugação a 900g durante 2 min, ressuspensos em HCl 2N / Triton X-100 a 0,5% e incubados durante 30 min à

temperatura ambiente (TA). Os pellets celulares foram então ressuspensos em tetraborato de sódio 0,1M durante 2 min e lavadas três vezes com PBS/BSA 1% à TA. Finalmente as células foram ressuspensas em 0,5% de Tween 20 1% de BSA/PBS e foi adicionado anti-BrdU-alexa 488 por 1h à TA. As células então foram ressuspensas em 100 µL de PBS 1x contendo 30 µg / mL de RNase A e 50 µg / mL de PI por 1h, as amostras foram analisadas na por FACS (BD). Ensaio realizado em monocata com três repetições.

3.5.2 Ensaio de Ciclo Celular – Iodeto de Propídio

A análise do ciclo celular foi realizada com $2,5 \times 10^5$ células em placas de 6 poços, as células foram exposta a 12h de privação de soro fetal bovino, sendo então posteriormente, tratadas ou não com PMA e ATP nas concentrações já apresentadas, o experimento foi realizado sem sincronização do ciclo celular. Após 24h de tratamento o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x e foram então soltas, por tripsinização, e foram centrifugadas a 300g por 5 min, estas foram então submetidas a fixação com paraformaldeído 1% por 15 min em gelo. Logo em seguida as amostras foram novamente centrifugadas por 5 min a 300g, o sobrenadante foi então descartado e o pellet foi ressuspensionado com PBS1x e resubmetido a uma nova centrifugação. Após a lavagem das células essas foram então fixadas com etanol 95% por 30 minutos. Após este período, foram centrifugadas novamente a 300g por 5 min e lavadas em PBS 1x e ressuspensas com 50µg/ml de iodeto de propídio (PI) e 30ug/ml de RNase A, a suspensão foi incubado por 1 hora em TA. Os dados foram avaliados no programa ModFit 2.0, sendo realizado três experimentos independentes.

3.5.3 Ensaio de Apoptose celular Apo-BrdU

Para verificação da taxa de apoptose celular $2,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas em triplicatas em placas de seis poço. As células HAP1 parentais e FBXO25^{KO} foram então submetidas ao tratamento com com 100 nM de PMA ou ao tratamento com 5mM de ATP por 24h. pós esse período, o meio foi removido as células foram lavadas com PBS 1x e foram então soltas, por tripsinização, após isso

as células foram centrifugadas a 300g por 5 min, e estas foram então submetidas a fixação através da utilização de paraformaldeído 1% por 15 min em gelo. Logo em seguida as amostras foram novamente centrifugadas por 5 min a 300g o sobrenadante foi então descartado e o pellet foi ressuspendido com PBS1x e resubmetido a uma nova centrifugação. Após a lavagem das células essas foram então fixadas com etanol 95% por 30 minutos. Após esse processo As células foram submetidas ao ensaio de apoptose utilizando o o APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, (Invitrogen Life Technologies). O ensaio foi realizado de acordo com recomendação do fabricante, sendo três experimentos realizados de formas independentes.

3.6 Western Blot

3.6.1 Tratamento das células HAP1 parentais e HAP1 FBXO25^{KO} com PMA e ATP

As células parentais e FBXO25^{KO} foram cultivadas em placas de 10cm com meio IMDM incompleto, sem Soro Fetal Bovino, por 16 horas, após esse período de privação de soro, as 12 placas foram tratadas com 100 nM de PMA por 0 e 30 minutos, o nível de pERK1/2 foi analisado por western blotting. As células foram submetidas também ao tratamento com 5mM de ATP por 0 e 30 minutos , para avaliação do dos níveis de ciclinas D1, ciclina D1 fosforilada e ciclina B.

3.6.2 Extração Proteica e Western Blot

As amostras das células parentais e FBXO25^{KO} foram lisadas utilizando 1 ml de tampão Tris-HCl (KCl 225 mM, NP40 1%, e Tris-HCl 25mM pH 7,5), mais uma mistura de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich) e fosfatases (NaF 10 mM, Na₃VO₄ 1mM; Sigma-Aldrich), a solução foi então deixada no gelo para lise, por 30 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 16800g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante com as proteínas foi colhido, e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford. Os lisados de (HAP1 parental e FBXO25^{KO}), foram então submetidas a análise por western blotting, as proteínas foram

transferidas (TransBlot SemiDryer, BIORAD) para membrana de nitrocelulose (Transblot 0,45 μm BIORAD) utilizando-se uma corrente de 0,5 mA/40 min, em meio contendo glicina 39 mM, Tris 48 mM, 10% SDS e mistura água/metanol 1:5 (vol/vol). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau Red e bloqueada com 2% de BSA em TTBS (Thermo Scientific) durante 1 hora. As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários: Anticorpo monoclonal p-ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology, catálogo#SC-7883) produzido contra IgG1 de camundongo; anticorpo policlonal ciclina B (Doação Profa. Dra. Munira Baqui) produzido contra IgG de coelho, anticorpo policlonal ciclina D1 (Cellsignalling, catálogo#2926) produzido contra IgG de coelho, anticorpo policlonal ciclina D1 fosforilada (Thr286) (Cellsignalling#4656), produzido contra IgG de coelho, a 4°C sob leve agitação, *overnight*. A membrana foi lavada com tampão TTBS (1M Tris-HCl, pH 7,2; 5M NaCl e 0,1% Tween 20), e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugados a peroxidase ou anti-IgG de coelho, conjugados a peroxidase diluídos em tampão de bloqueio, por 1 hora, a temperatura ambiente. Após extensivas lavagens com TTBS a membrana foi revelada utilizando o método de quimioluminescência com ECL (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente a membrana foi incubada com Anticorpo policlonal ERK-1 e 2 (Santa Cruz Biotechnology catálogo#SC-154) produzido em coelho, IgG, anticorpo monoclonal anti-GAPDH (Sigma Aldrich#HPA008012) produzido em camundongo, anticorpo anti-Beta Tubulina (Sigma Aldrich, catálogo#T8328), produzido em coelho, em seguida procedeu o protocolo de lavagens já descrito, a membrana então foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (invitrogen) ou camundongo conjugados a peroxidase (KPL- catálogo #04-18-06) e posteriormente a membrana foi revelada como já descrito. As intensidades das bandas foram então quantificadas utilizando o programa gel analyzer 2010.

3.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados como Média \pm DP de três experimentos independentes. Com exceção o ensaio de Proliferação Celular por incorporação de BrdU que foi realizado em monocata com três repetições. A significância estatística

foi estimada por teste t de Student não pareado para comparação entre dois grupos. Para comparação entre três ou mais grupos foi usado análise de Variância com um fator (OneWay ANova) ou Análise de Variância com dois fatores (Two way ANOVA), seguido pelo pós teste de Bonferroni ou Tukey. Foram consideradas diferenças significativas quando obteve-se $p < 0,05$. Todas análises estatísticas foram conduzidas usando o software GraphPad Prism 6[®].

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da perda de expressão de FBXO25 mediada por CRISPR-Cas9 em células HAP1

A fim de caracterizar o envolvimento de FBXO25 na regulação da sinalização MAPK via ERK1/2 foi utilizado uma linhagem de células humanas nocaute para FBXO25. As células HAP1 sofreram deleção de 23 pares de base no exon 6, por meio da técnica de Crispr-Cas9, a região foi escolhida pelo fato de anteceder o domínio F-BOX e por englobar todas as três variantes de FBXO25 humana modificadas (figura 5 A). As células parentais e FBXO25^{KO}, foram então submetidas a análise por PCR a partir de DNA genômico e analisados por sequenciamento de Sanger (figura 5 B, C). Por meio dessas análises, podemos confirmar a deleção 23 pares de base do gene de FBXO25 nas células FBXO25^{KO}.

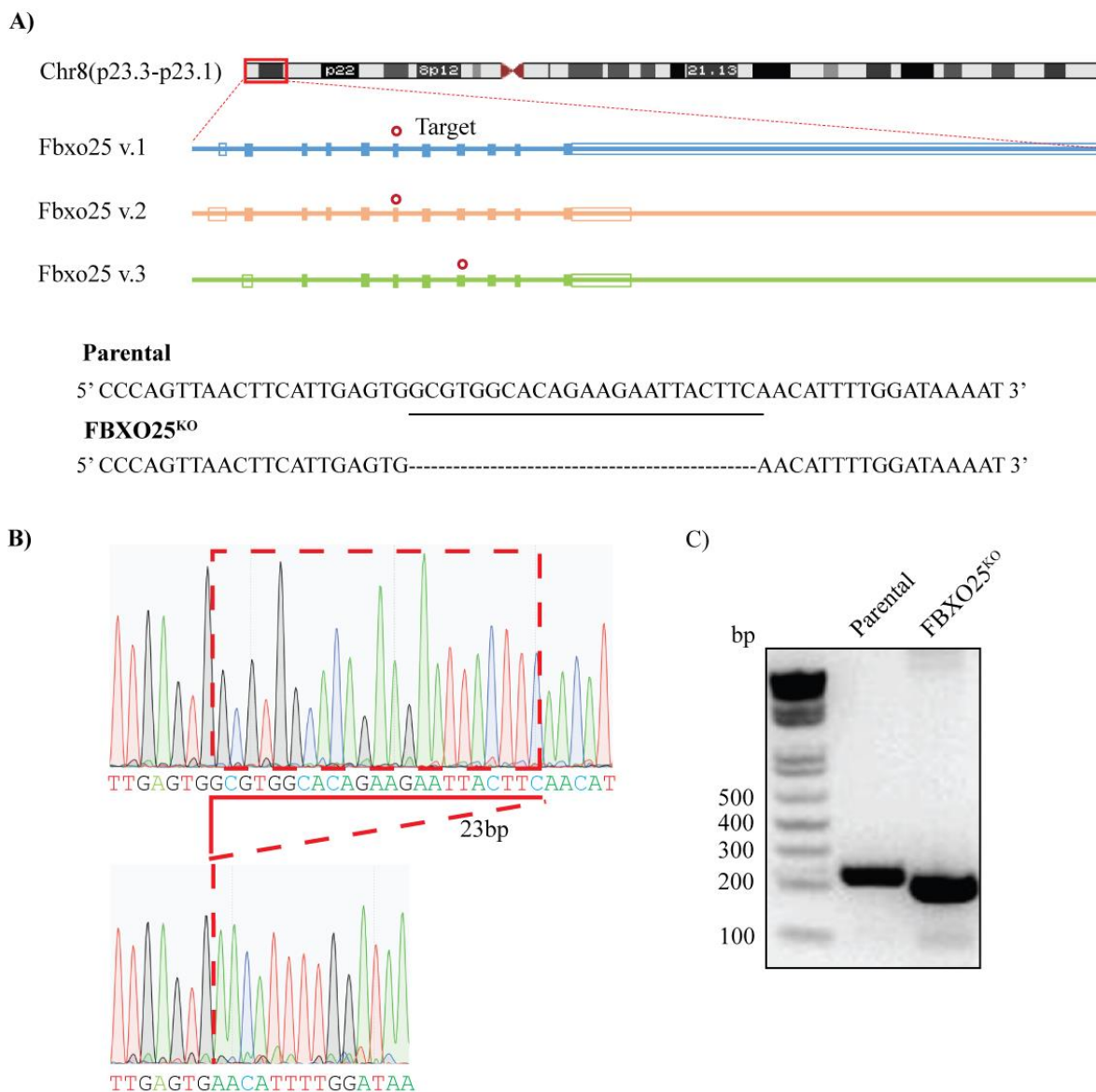
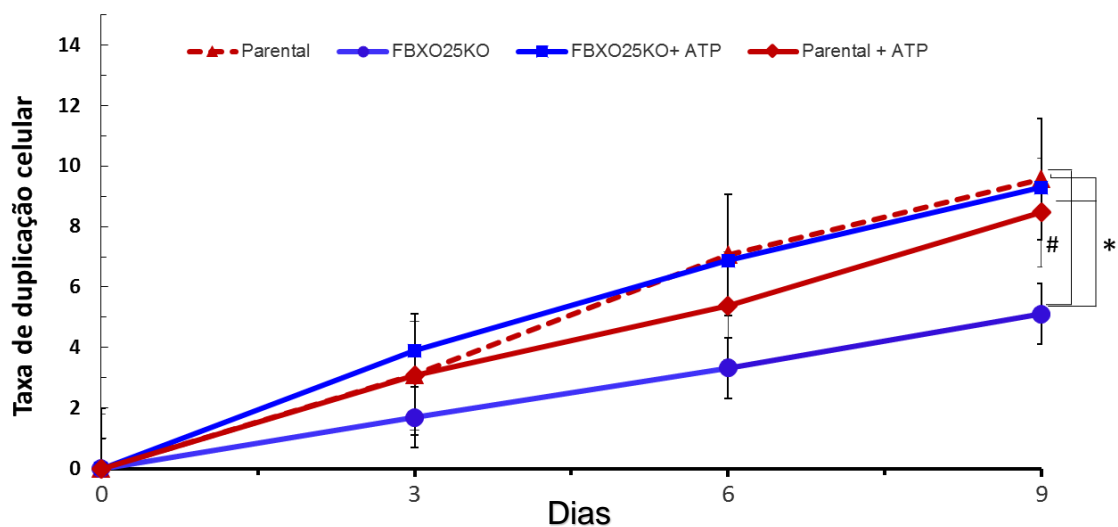


Figura 5. Caracterização da linhagem de células humanas HAP1 nocaute de *FBXO25*. (A) Representação esquemática do locus de *FBXO25* humana, demonstrando edição do genoma no exon 6, nas três variantes de *FBXO25* (pontos vermelhos). Representação da sequência de pb usada para edição do genoma por CRISPR-Cas 9, sublinhados (preto). (B) sequência alvo. O exon 6 foi amplificado a partir de DNA genômico e analisados por sequenciamento de Sanger. (C) PCR com análise do DNA genômico demonstrando a presença de uma deleção de 23 pb células *FBXO25^{KO}*.

4.2 Caracterização da taxa de duplicação estimulada com Trifosfato de Adenosina (ATP) e Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA)

Para analisar o efeito de FBXO25 sobre fenótipo de crescimento celular realizamos ensaios de duplicação celular (Population doubling cell). Inicialmente quando comparado o efeito as células FBXO25^{KO} e parentais, observou-se que a linhagem FBXO25^{KO}, apresentam crescimento quatro vezes menor que a linhagem, além de apresentar um maior número de células inviáveis (figura 6 A, B), Tabela 2. No entanto, quando estas células são tratadas com 5mM de ATP, notamos que o fenótipo de menor crescimento da célula FBXO25^{KO} é revertido, sendo que esta passa a proliferar mais (3X) que a parentais, além de apresentar uma diminuição no número de células inviáveis (figura 6 A) Tabela 2. O mesmo resultado foi observado quando as células foram tratadas com 100nM de PMA (figura 6B), Tabela 2.

A)



B)

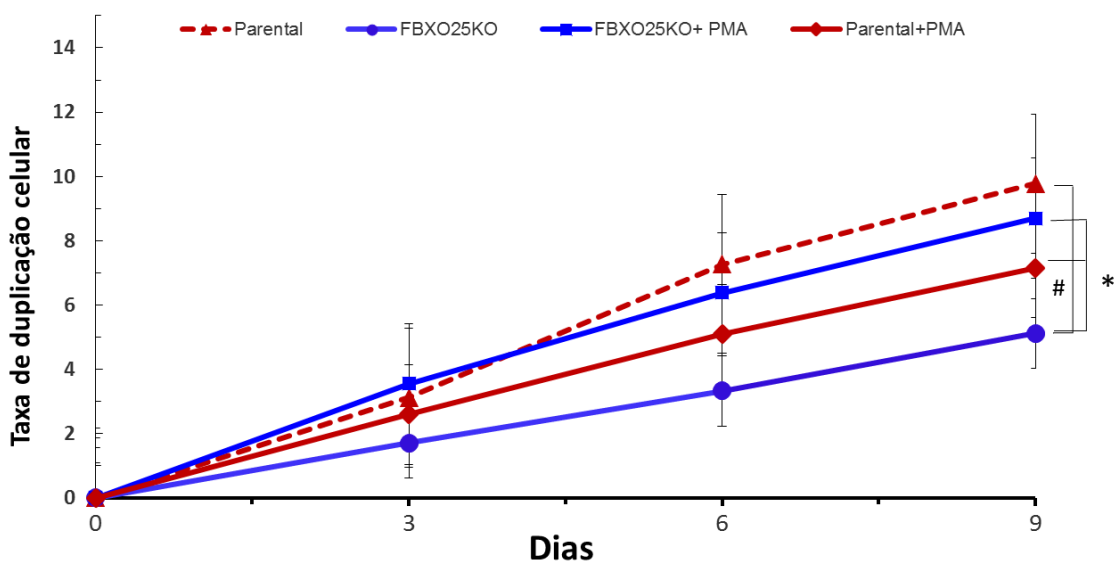


Figura 6. Comparação da taxa de duplicação celular das linhagens parentais e FBXO25^{KO} estimulada com Trifosfato de Adenosina (ATP) e Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA). 2,5 x 10⁵ células parentais e FBXO25^{KO} foram semeadas em placas de seis poços em triplicatas. Para determinar a taxa de duplicação celular estas células foram contadas a cada 3 dias, durante 9 dias utilizando contador de célula automatizado (TC20™ AutomatedCellCounter - Biorad). A) curva das células parentais e FBXO25^{KO} com ATP. B) curva das células parentais e FBXO25^{KO} com PMA. # indica diferença entre HAP1 parentais e células FBXO25^{KO} e * indica diferença entre o tratamento. P < 0,05 Teste t de student, seguidos do pós-teste de Tukey.

Tabela 2. Porcetagem de células viáveis e não viáveis com ou sem tratamento. * indica diferença entre as células FBXO25^{KO} e parental.

	% CÉLULA VIÁVEL		% CÉLULAS INVIÁVEIS	
	Parental	FBXO25KO	Parental	FBXO25KO
S A	90	76	10	24
ATP	82	93	18	7
PMA	80	91	20	9

4.3 Avaliação da síntese de DNA incorporação de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

Para verificar se FBXO25 exerce algum efeito sobre a proliferação, o ensaio de captação de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) foi realizado em células FBXO25^{KO} e parentais foram tratadas ou não com ATP e PMA por 24 horas. Assim pode-se medir a atividade proliferativa da célula. A partir das leituras realizadas por citometria de fluxo, foi possível observar que células parentais apresentaram maior incorporação de Brdu que as células FBXO25^{KO}, indicando que as células parentais apresentam maior taxa de proliferação. No entanto, quando foi realizada a comparação entre os tratamentos, observamos que as células FBXO25^{KO} apresentaram aumento da incorporação de BrdU, contudo o mesmo efeito não foi observado nas células parentais (Figura 8)

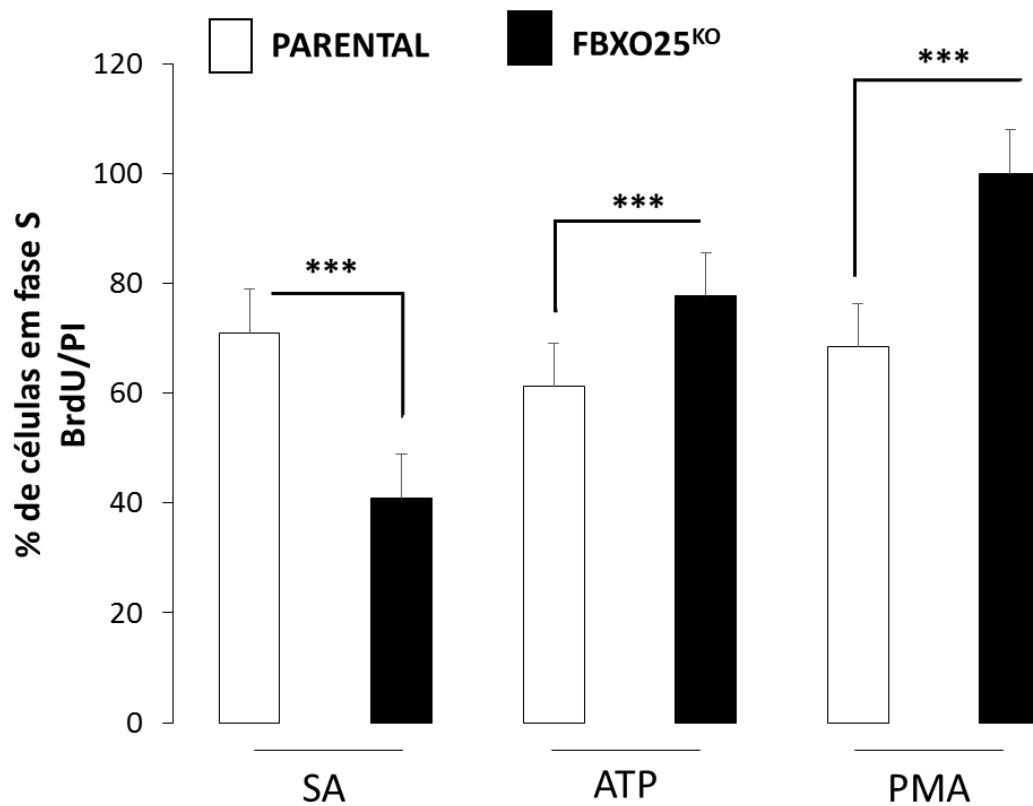


Figura 8. Ensaio de proliferação por incorporação de BrdU. Células parentais e FBXO25^{KO}, foram tratadas com 100nM de PMA ou com 5mM ATP sendo que SA são células sem ativação. As análises foram feitas após 24 horas, sendo os resultados expressos em média \pm SD estes foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguidos do pós-teste de Tukey. *** $p < 0,0001$ para comparação entre os grupos com tratamento. Dados obtidos de um único experimento com 3 repetições.

4.4 Análise do ciclo celular das células parentais e FBXO25^{KO}

Com o objetivo de verificar se FBXO25, de alguma maneira modula a resposta do ciclo celular, as células parentais e FBXO25^{KO} foram marcadas com iodeto de propídio, após serem ou não tratadas com 100nM de PMA e 5 mM de ATP por 24 horas. O ensaio foi realizado sem sincronização da população de células analisadas. Quando analisados de citometria de fluxo, não foi encontrado alterações significativas nas fases do ciclo celular das diferentes linhagens (figura 9 B). No entanto, pode-se notar que tanto a célula parental quanto a célula FBXO25^{KO} quando estimuladas com PMA ou ATP, apresentaram um ligeiro aumento da fase G1 acompanhado de uma redução sutil de células em S. No entanto a fase G2/M parece não sofrer alteração como pode- se observar na figura 9 C. Indicando que o tratamento de alguma maneira interfere no ciclo celular de forma a causar um possível atraso nas fases de G1/S.

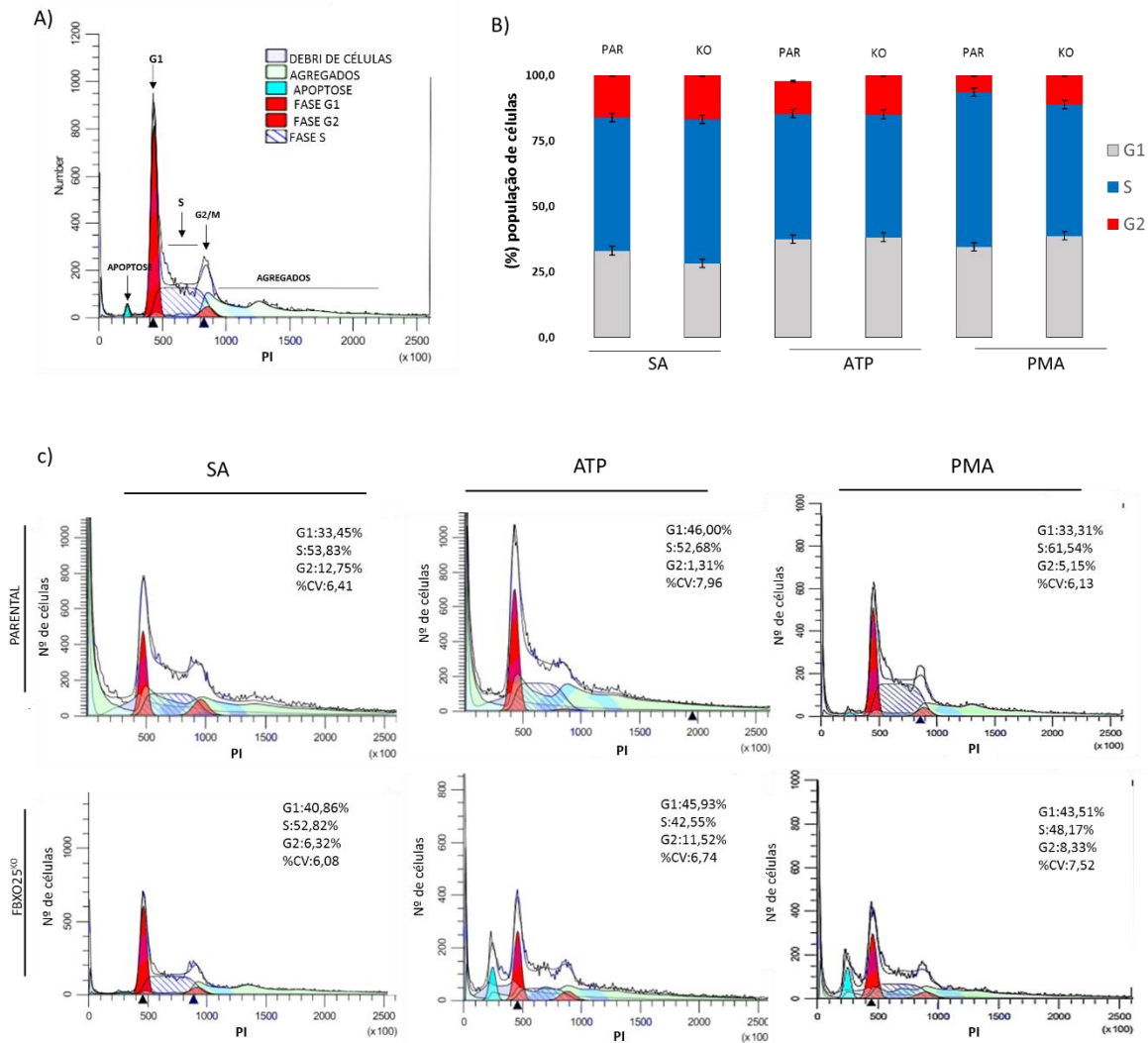


Figura 9. Distribuição em percentagem das fases do ciclo celular de células parentais e FBXO25^{KO} tratadas com ATP e PMA. A) Esquematização do gráfico de ciclo celular. B) gráfico de percentagem de cada fase do ciclo celular das células parentais e FBXO25^{KO}. C) gráficos demonstrativos de cada fase do ciclo celular, demonstração da alteração do perfil do ciclo de acordo com cada tratamento. Ensaio não apresentou diferenças estatísticas.

4.5 Avaliação dos níveis de de ciclina D1 e B1

Com o objetivo de analisar e compreender os resultados obtidos no ensaio de ciclo celular, os níveis de ciclina D1 fosforilada (pD1) e não fosforilada, assim como os níveis totais de ciclina B1, das células parentais e células FBXO25^{KO} tratadas com apenas 5 mM de ATP, foram analisadas por meio da técnica de western blotting. Contudo, não foi encontrada nenhuma diferença nos níveis de ciclina pD1, D1 e B1 (figura 10 A e B). Esses resultados nos levam a acreditar que o mitogéno ATP não induz alteração significativa em níveis de ciclinas de fase G1 (ciclina D) e nem interfere no nível de ciclinas presentes durante a mitose (ciclina B).

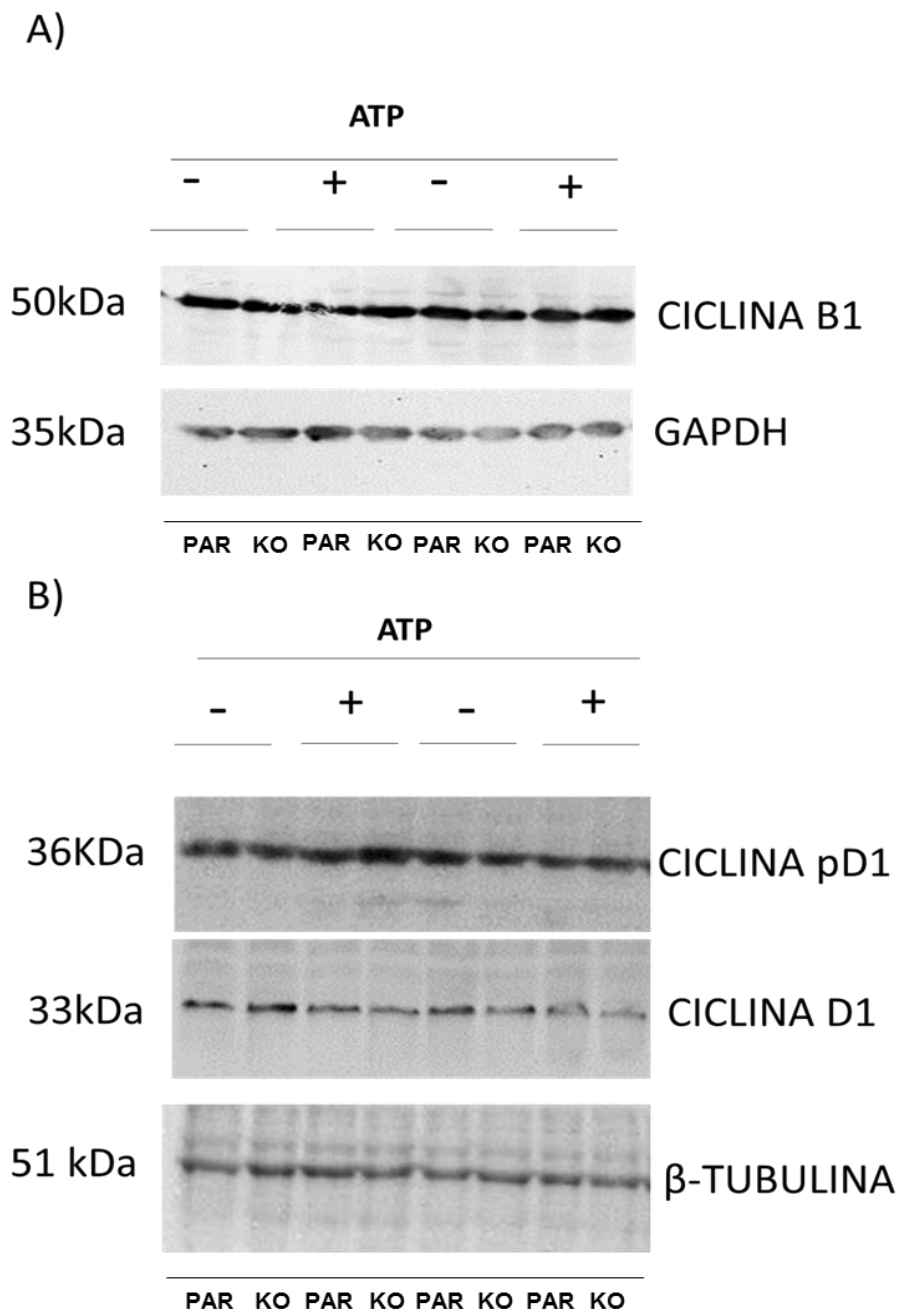


Figura 10. Avaliação dos níveis de ciclina D1 e B1 das células parentais e FBXO25^{KO}. As células foram submetidas a privação de SFB por 12hs, as mesmas receberam tratamento com 5mM de ATP por 30 minutos, após esse tempo as células foram imediatamente submetidas a lise, e os extratos submetidos a SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana de nitrocelulose e revelada com anticorpo policlonal ciclina B1. B) Membrana de nitrocelulose e revelada com anticorpo policlonal ciclina D1 e pD1.

4.6 Avaliação dos níveis de fosforilação de ERK1/2 em células FBXO25

Para demonstrar o envolvimento de FBXO25 sobre a fosforilação de ERK1/2, células parentais e células FBXO25^{KO}, foram estimuladas com PMA. Os extratos celulares foram avaliados, demonstrando que os nocautes de FBXO25 apresentam uma aumento na fosforilação de ERK1/2 (~45%) em comparação com a linha celular parental, esse resultado confirma o efeito inibitório de FBXO25 sobre a sinalização ERK1/2 (Figura 11 A e B).

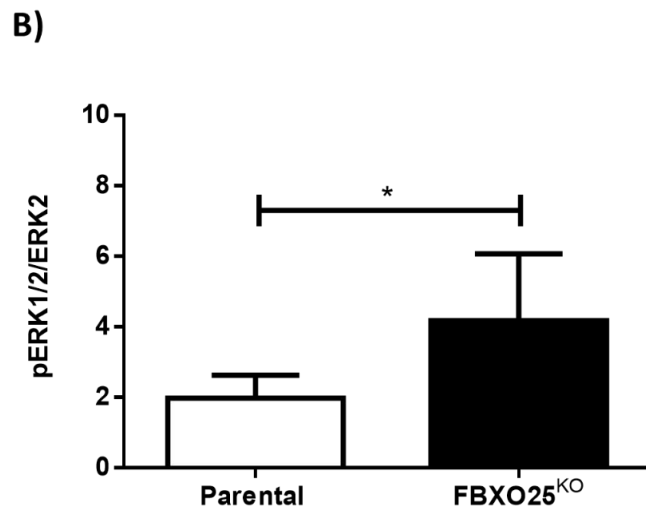
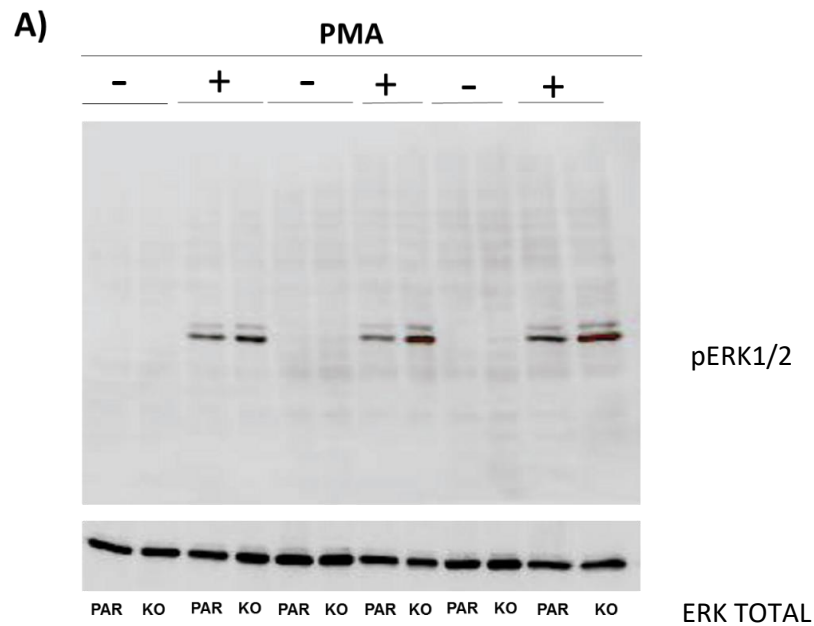


Figura 11. Análise por Western blotting dos níveis de ERK1/2 fosforilados em células parentais e FBXO25^{KO} tratadas ou não com 100ng/ml de PMA. As células foram submetidas a privação de SFB por 12hs, as mesmas receberam tratamento com PMA por 30 minutos, após esse tempo as células foram imediatamente submetidas a lise, e os extratos submetidos a SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana de nitrocelulose e revelada com anticorpo monoclonal pERK1/2. B) quantificação dos níveis de pERK e ERK-total. Os resultados expressos em média ± SD foram submetidos a análise de teste t de student, para comparação entre os grupos com tratamento e *p <0,05 para comparação dos grupos tratados e não tratados. Dados obtidos de três experimentos independentes.

4.7 Verificação dos níveis de Apoptose e citotoxicidade das células parentais e FBXO25^{KO}

Para medir a ocorrência de apoptose nas células parentais e FBXO25^{KO}, ambas as linhagens foram submetidas ao ensaio de apoptose utilizando o APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, (Invitrogen Life Technologies), sendo a mensuração de células apoptóticas detectada por citometria de fluxo. Quando analisados as médias de absorvância de BrdU, pode-se notar que as células KO apresentaram níveis maiores de apoptose quanto comparadas com as células parentais, demonstrando assim um possível papel antiapoptótico de FBXO25. Quando as células foram ativadas com 5mM de ATP, pode-se notar um aumento nos níveis de apoptose celular nas parentais, sendo esse acompanhado por uma redução dos níveis de apoptose nas células FBXO25^{KO}. No entanto, esse efeito não foi observado quando ambas as linhagens foram ativadas com 100nM de PMA, pois não foi observado alterações nos níveis de apoptose das células FBXO25^{KO}, ao mesmo tempo que as células parentais apresentaram aumento dos níveis de de apoptose, Figura 12.

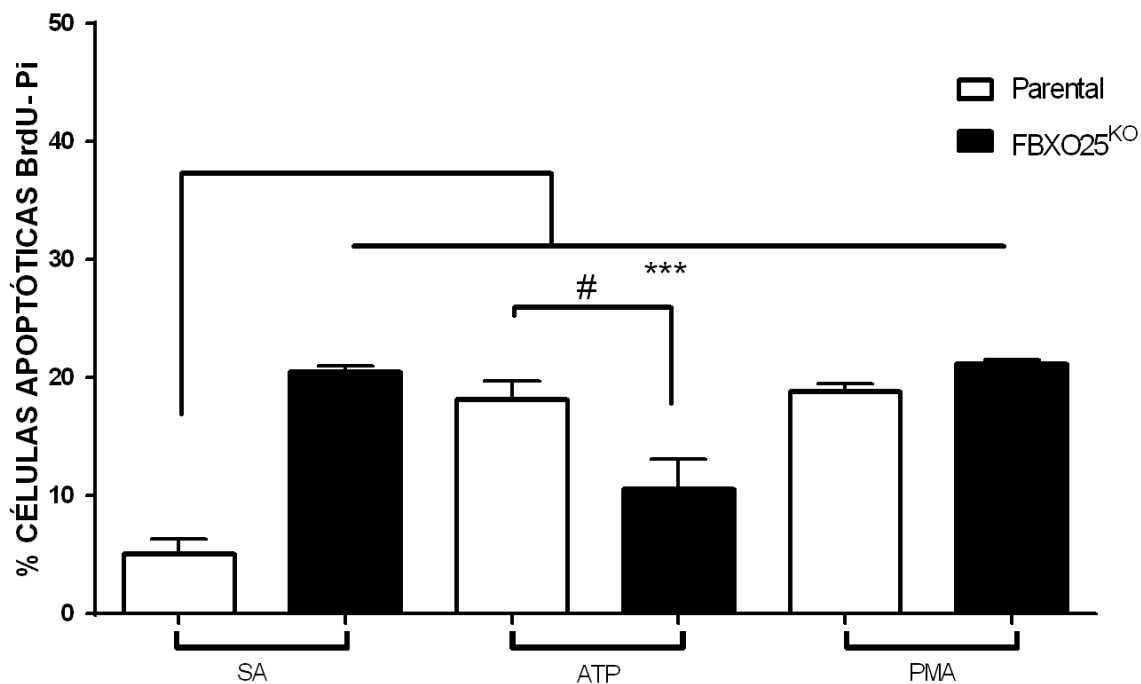


FIGURA12. Ensaio para verificação de apoptose celular: Para medir a ocorrência de apoptose nas células parentais e FBXO25^{KO}, foram semeadas $2,5 \times 10^5$ células em triplicatas em placas de seis poço e submetidas ao ensaio de apoptose utilizando o APO-BrdUTM TUNEL Assay Kit, sendo a mensuração de células apoptóticas detectada por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em média \pm SD, estes foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguidos do pós-teste de Tukey. *** $p < 0,0001$ para comparação entre os grupos com tratamento e # $p < 0,005$ para comparação dos grupos tratados e não tratados. Dados obtidos de três experimentos independentes.

4.8 Ensaio de toxicidade celular (teste do LDH - Lactato desidrogenase) em células parentais e FBXO25^{KO}

Para verificar se a ausência de FBXO25 possui efeito sobre a toxicidade celular as células parentais e FBXO25^{KO} foram tratadas com 100 nM de PMA, 5mM ATP por 24 horas, sendo o ensaio de LDH realizado após esse período. Os resultados mostram que há aumento de citotoxicidade apenas nas células tratadas com ATP e PMA, sendo que as células parentais apresentaram níveis maiores de citotoxicidade quando comparadas com as células FBXO25^{KO} em ambos os tratamentos. Esse resultado demonstra que a presença ou ausência de FBXO25 não induz alteração da citotoxicidade celular, porém que na presença de um mitogêno esta induz alteração dos parametros de citotoxicidade. (figura 13)

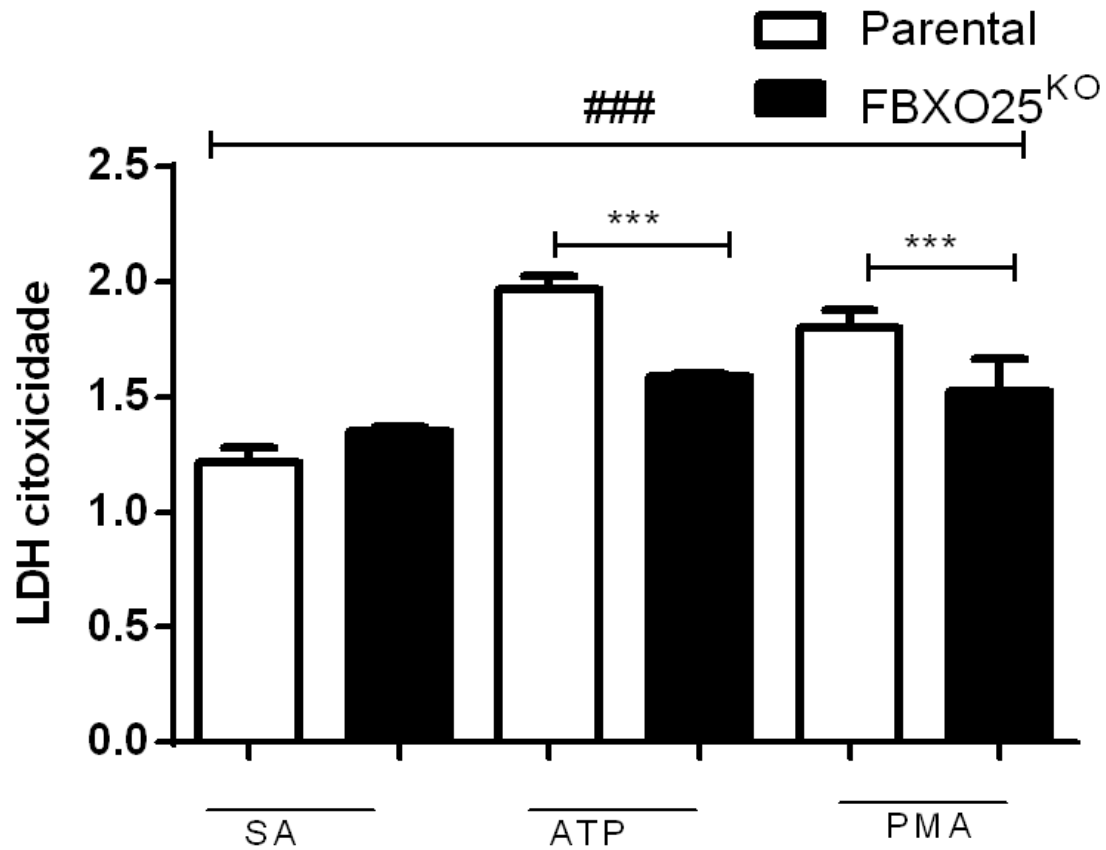


FIGURA 13. Ensaio de toxicidade celular (teste do LDH - Lactato desidrogenase) em células parentais e FBXO25^{KO} - As células foram cultivadas em placas de 6 poços, sendo estas tratadas ou não tratadas com ATP, PMA . As análises de toxicidade foram feitas após 24 horas, sendo os resultados expressos em média \pm SD estes foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguidos do pós-teste de Tukey. *** $p < 0,0001$ para comparação entre os grupos com tratamento e ## $p < 0,005$ para comparação dos grupos tratados e não tratados. Dados obtidos de três experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

A via MAPK regula numerosos processos biológicos incluindo crescimento celular, diferenciação e morte celular apoptótica (Jacobs *et al.*, 1999; Johnson e Lapadat, 2002; Murphy e Blenis, 2006; Katz *et al.*, 2007; Shaul e Seger, 2007). Essa via é caracterizada por três vias que compartilham diversos substratos e possuem diversos pontos em comum, sendo essas, a via quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a Jun kinase (JNK) e p38 MAPK. A via de ERK1/2 é dependente da ligação de moléculas de sinalização a receptores tirosino quinase ou ativação de proteína G (Zhong *et al.*, 2002; Roux e Blenis, 2004; Katz *et al.*, 2007; Roberts e Der, 2007; May e Hill, 2008; Nakayama *et al.*, 2008; Ramos, Joe W., 2008; Roskoski, 2012). A ligação de uma molécula ativadora a um receptor, dá início a ativação de toda a cascata por meio do processo de fosforilação e desfosforilação. Diversos estudos tem apresentado a via de ERK como a principal via sinalizadora para a proliferação e diferenciação celular.(Zhan *et al.*, 2003; Chambard *et al.*, 2007; Katz *et al.*, 2007; Shaul e Seger, 2007; Srinivasan *et al.*, 2009; Wortzel e Seger, 2011; Fremin *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016)

Nesse trabalho demonstramos como FBXO25 participa da regulação da via de MAPK, atuando sobre a ativação de ERK e o crescimento celular. Observamos que células FBXO25^{KO} tratadas com o mitógeno PMA, apresentaram um aumento dos níveis de ERK1/2 fosforilada quando comparadas com células parentais, esse aumento de ERK induziu um aumento dos parâmetros de proliferação acompanhado da diminuição das taxas de apoptose das células FBXO25^{KO}. Diversos trabalhos tem descrito a via de ERK como sendo um grande intermediador para a sinalização de crescimento celular (Matsubayashi *et al.*, 2004; Roux e Blenis, 2004; Lu e Xu, 2006; Murphy e Blenis, 2006; Wortzel e Seger, 2011).

Em condições de repouso, a proteína ERK é ancorado no citoplasma por sua associação com MEK e por uma rede de microtúbulos (Zehorai *et al.*, 2010). Mitógenos como o ATP e o PMA induzem ativação de ERK1 e ERK2 por meio de vias distintas, no entanto, ambos induzem uma resposta de translocação rápida e

massiva de ERK para o núcleo. O mecanismo molecular da translocação de ERK1/2, é resultado do desprendimento das moléculas ERK1/2 de suas âncoras (Chen *et al.*, 1992; Chuderland *et al.*, 2008; Zehorai *et al.*, 2010; Roskoski, 2012). A transferência de ERK1/2 para o núcleo tem sido descrita como um importante modulador do ciclo celular, já que induz a transição da fase G0 para fase G1, sendo assim descrito como um importante mediador da resposta de crescimento celular (Chambard *et al.*, 2007; Matson e Cook, 2017). Após a translocação para o núcleo, ERK1/2 fosforila diversos fatores do complexo ternário, como Elk-1, Sap-1, e Tif-IA (Kasza, 2013; Plotnikov *et al.*, 2015). A fosforilação de Elk-1 na porção C - terminal, induz o aumento da transcrição de diversas proteínas relacionadas ao crescimento, tais como c-Fos e c-Myc (Chen *et al.*, 1992; Katz *et al.*, 2006; Roskoski, 2012). Diversas proteínas reguladoras do ciclo celular são ativadas por ERK1/2 estão localizadas no núcleo, dessa forma o acesso de ERK a seus substratos é um ponto essencial a regulação do ciclo celular (Chen *et al.*, 1992; Chuderland *et al.*, 2008; Roskoski, 2012; Plotnikov *et al.*, 2015).

É conhecido que a ativação de ERK é essencial para ativação do ciclo celular, uma vez que a ativação de ERK1/2 não só induz a transição da fase G0 para fase G1, mas também modula os níveis de ciclina D de forma a realizar transição da fase G1 para fase S (Nebigil *et al.*, 2000; Alldridge e Bryant, 2003; Ang e Wade Harper, 2005; Chambard *et al.*, 2007; Meloche e Pouyssegur, 2007; Von Kriegsheim *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2016; Matson e Cook, 2017). Contudo, nossos dados demonstram não haver diferença nos níveis de ciclina D1 e de ciclina D1 fosforilada nas células FBXO25^{KO}, também não encontramos diferença nos níveis de ciclina B1, marcador clássico da fase de G2/M. Diversos trabalhos tem demonstrado que diferentes E3 ligases do tipo SCF, como FBXL2 (Chen *et al.*, 2012), FBXL7 (Coon *et al.*, 2012), FBXL11 (Kawakami *et al.*, 2015), FBXO31 (Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016), FBXL19 (Zhao, J. *et al.*, 2013), são capazes de modular os níveis de ciclinas ou proteínas nucleares participantes da ativação ou parada do ciclo celular, demonstrando assim a importância da ubiquitinação na regulação da proliferação celular (Aoyama *et al.*, 2004; Cardozo e Pagano, 2004; Nakayama e Nakayama, 2005; Kanie *et al.*, 2012). Contudo, quando

analisada a porcentagem de cada fase do ciclo celular nenhuma diferença na comparação da células FBXO25^{KO} e parental foi encontrada, porém o tratamento com ATP e PMA induziu um ligeiro aumento da fase G1 e G2 ao mesmo tempo que observamos uma sutil diminuição da fase S, demonstrando o que parece ser um efeito compensatório entre as fases, porém os resultados obtidos não deixam claro se a proteína FBXO25 estaria envolvida na modulação do ciclo celular como outras E3 ligases já conhecidas. Dessa forma FBXO25 parece não atua diretamente sobre as proteínas do ciclo celular, mas sim de maneira indireta por meio da resposta a fosforilação e ERK.

Resultados anteriores do laboratório, demonstraram que FBXO25 medeia a ubiquitinação e a degradação do fator de transcrição Elk-1 (Teixeira *et al.*, 2013). O fator de transcrição Elk-1 é um ponto comum entre as três vias de sinalização de (ERK, JNK e p38), sendo esse responsivo tanto a estimulação com mitógenos, estresse e citocinas (Hong *et al.*, 2009; Kasza, 2013). Em resposta a estímulos mitogénicos como PMA, ATP e EGF, a via de ERK é ativada por meio da ativação de MEK que por conseguinte ativa/fosforila ERK, que atua fosforilando o fator de transcrição Elk-1. Elk-1 fosforilada então acumula-se no núcleo e promove a transcrição de genes regulados por Elk-1, como *C-FOS*, *EGR-1* e *C-MYC*, que são fundamentais para a sinalização celular (Lu *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Lu e Xu, 2006; Shaul e Seger, 2007; Chang *et al.*, 2008; Chuderland *et al.*, 2008; Ramos, J. W., 2008; Zehorai *et al.*, 2010; Steelman *et al.*, 2011; Ohtsuka *et al.*, 2016).

Quando avaliamos os níveis de apoptose, nossos resultados demonstraram que a ausência de FBXO25 leva a aumento de morte celular por apoptose quando comparada com as células que expressam FBXO25, sendo esse efeito revertido após estimulação da via ERK com PMA e ATP, apesar do tratamento induzir aumento de apoptose nas células parentais e aumentar de forma geral as taxas de citotoxicidade, foi possível observar que o tratamento com ATP reverte o quadro de morte celular encontrado nas células FBXO25^{KO}, o que não foi observado quando submetemos a linhagem ao PMA. Acreditamos que esse efeito ocorra em resposta a receptores celulares presentes nessa linhagem e a via ativada, uma vez que a

ativação de ERK foi feita com o PMA que atua via PKC e o ATP que atua via receptor P2Y. Nossos resultados demonstram que FBXO25 ao modular a via de ERK leva a diminuição da apoptose celular nas células FBXO25^{KO}, acreditamos que esse efeito seja decorrência da ativação massiva de ERK, que deve se sobrepôr a outra via da antagônica da MAPK, ex: JNK ou p38, ou ainda que a ativação de ERK esteja modulando proteínas nucleares, como c- Myc. No entanto, não foi avaliado marcadores específicos de apoptose nesse trabalho, o que não permite explorar essa via com maior exatidão.

Por outro lado, já foi descrito que a ativação contínua e prolongada da via de ERK1/2, pode provocar parada ou retardo do ciclo celular, sendo essa regulada por aumento da expressão de p21 não mediada por p53 (Tang *et al.*, 2002; Bornstein *et al.*, 2003; Nam *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2011). Com já foi dito, a fosforilação de ERK1/2 pode modular a expressão de diversos fatores de transcrição como c-Myc. Esse fator de transcrição em especial medeia a resposta pró proliferação, contudo alguns trabalhos tem demonstrado que dependendo da intensidade e da duração do estímulo, c-Myc pode induzir uma resposta pró apoptótica (Evan *et al.*, 1994; Cassimere *et al.*, 2009).

Esse dados obtidos quando analisados em conjunto, demonstram que FBXO25 possui a capacidade de inibir a via de sinalização de ERK , de forma que essa sinalização de ERK modula uma resposta em prol da proliferação.

6 CONCLUSÃO

Demonstramos aqui que FBXO25 participa da regulação da via de sinalização de MAPK/ERK, exercendo uma ação inibitória sobre a fosforilação de ERK1/2, gerando uma resposta secundária em prol proliferação celular. A nossa hipótese a partir desses dados é que, FBXO25 modula a ativação de ERK por meio da ubiquitinação de um substrato específico ou que está atue ubiquitinando alguma fosfatase que atue sobre pERK 1/2.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLDRIDGE, L. C.; BRYANT, C. E. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. **Experimental Cell Research**, v. 290, n. 1, p. 93-107, 2003. ISSN 00144827.

AMM, I.; SOMMER, T.; WOLF, D. H. Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 1, p. 182-96, Jan 2014. ISSN 0006-3002 (Print)

ANG, X. L.; WADE HARPER, J. SCF-mediated protein degradation and cell cycle control. **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2860-70, Apr 18 2005. ISSN 0950-9232 (Print)

AOYAMA, Y. et al. MFB-1, an F-box-type ubiquitin ligase, regulates TGF-beta signalling. **Genes Cells**, v. 9, n. 11, p. 1093-101, Nov 2004. ISSN 1356-9597 (Print)

AUFDERHEIDE, A. et al. Structural disorder and its role in proteasomal degradation. **FEBS Lett**, v. 589, n. 19 Pt A, p. 2552-60, Sep 14 2015. ISSN 1873-3468 (Electronic)

BERNDSSEN, C. E.; WOLBERGER, C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. **Nat Struct Mol Biol**, v. 21, n. 4, p. 301-7, Apr 2014. ISSN 1545-9985 (Electronic)

BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-8, Nov 23 2001. ISSN 0036-8075 (Print)

BORNSTEIN, G. et al. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. **J Biol Chem**, v. 278, n. 28, p. 25752-7, Jul 11 2003. ISSN 0021-9258 (Print)

BUSCA, R.; POUYSSEGUR, J.; LENORMAND, P. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? **Front Cell Dev Biol**, v. 4, p. 53, 2016. ISSN 2296-634X (Linking).

CARDOZO, T.; PAGANO, M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 9, p. 739-51, Sep 2004. ISSN 1471-0072 (Print)

CASSIMERE, E. K.; PYNDIAH, S.; SAKAMURO, D. The c-MYC-interacting proapoptotic tumor suppressor BIN1 is a transcriptional target for E2F1 in response to DNA damage. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 12, p. 1641-53, Dec 2009. ISSN 1476-5403 (Electronic)

- CENCIARELLI, C. et al. Identification of a family of human F-box proteins. **Current Biology**, v. 9, n. 20, p. 1177-S3, 1999. ISSN 09609822.
- CHAMBARD, J. C. et al. ERK implication in cell cycle regulation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 8, p. 1299-310, Aug 2007. ISSN 0006-3002 (Print)
- CHANG, S. J. et al. Extracellular ATP activates the PLC/PKC/ERK signaling pathway through the P2Y2 purinergic receptor leading to the induction of early growth response 1 expression and the inhibition of viability in human endometrial stromal cells. **Cell Signal**, v. 20, n. 7, p. 1248-55, Jul 2008. ISSN 0898-6568 (Print)
- CHEN, B. B. et al. F-box protein FBXL2 exerts human lung tumor suppressor-like activity by ubiquitin-mediated degradation of cyclin D3 resulting in cell cycle arrest. **Oncogene**, v. 31, n. 20, p. 2566-79, May 17 2012. ISSN 1476-5594 (Electronic)
- CHEN, C. C.; LEE, W. R.; SAFE, S. Egr-1 is activated by 17beta-estradiol in MCF-7 cells by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of ELK-1. **J Cell Biochem**, v. 93, n. 5, p. 1063-74, Nov 15 2004. ISSN 0730-2312 (Print)
- CHEN, J. et al. MicroRNA-193b represses cell proliferation and regulates cyclin D1 in melanoma. **Am J Pathol**, v. 176, n. 5, p. 2520-9, May 2010. ISSN 1525-2191 (Electronic)
- CHEN, R. H.; SARNECKI, C.; BLENIS, J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 3, p. 915-927, 1992. ISSN 0270-7306
- CHEN, Y. et al. GAB2 promotes cell proliferation by activating the ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma. **Tumour Biol**, v. 37, n. 9, p. 11763-11773, Sep 2016. ISSN 1423-0380 (Electronic)
- CHUDERLAND, D.; KONSON, A.; SEGER, R. Identification and Characterization of a General Nuclear Translocation Signal in Signaling Proteins. **Molecular Cell**, v. 31, n. 6, p. 850-861, 9/26/ 2008. ISSN 1097-2765.
- COLLINS, I. et al. Chemical approaches to targeted protein degradation through modulation of the ubiquitin-proteasome pathway. **Biochem J**, v. 474, n. 7, p. 1127-1147, Mar 15 2017. ISSN 1470-8728 (Electronic)
- COOK, M. R. et al. Identification of a novel Raf-1 pathway activator that inhibits gastrointestinal carcinoid cell growth. **Molecular cancer therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 429, 01/26 2010. ISSN 1535-7163
- COON, T. A. et al. Novel E3 ligase component FBXL7 ubiquitinates and degrades Aurora A, causing mitotic arrest. **Cell Cycle**, v. 11, n. 4, p. 721-9, Feb 15 2012. ISSN 1551-4005 (Electronic)
- CORN, P. G. Role of the ubiquitin proteasome system in renal cell carcinoma. **BMC Biochemistry**, v. 8, n. 1, p. S4, 2007. ISSN 1471-2091.

DARWIN, K. H. Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup), proteasomes and pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 7, p. 485-91, Jul 2009. ISSN 1740-1534 (Electronic)

DE BIE, P.; CIECHANOVER, A. Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 9, p. 1393-402, Sep 2011. ISSN 1476-5403 (Electronic)

DESHAIES, R. J.; JOAZEIRO, C. A. RING domain E3 ubiquitin ligases. **Annu Rev Biochem**, v. 78, p. 399-434, 2009. ISSN 1545-4509 (Electronic)

DROZDOV, I. et al. Auto-regulatory Effects of Serotonin on Proliferation and Signaling Pathways In Lung and Small Intestine Neuroendocrine Tumor Cell Lines. **Cancer**, v. 115, n. 21, p. 4934-4945, 2009. ISSN 0008-543X

DU, H. et al. ARF triggers cell G1 arrest by a P53 independent ERK pathway. **Mol Cell Biochem**, v. 357, n. 1-2, p. 415-22, Nov 2011. ISSN 1573-4919 (Electronic)

DWORAKOWSKA, D. et al. Activation of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in pituitary adenomas and their effects on downstream effectors. **Endocr Relat Cancer**, v. 16, n. 4, p. 1329-38, Dec 2009. ISSN 1479-6821 (Electronic)

EVAN, G. et al. Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 345, n. 1313, p. 269-75, Aug 30 1994. ISSN 0962-8436 (Print)

FREMIN, C. et al. Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. **Cell Rep**, v. 12, n. 6, p. 913-21, Aug 11 2015. ISSN 2211-1247 (Electronic).

GALARIA, II et al. Differential regulation of ERK1/2 and p38(MAPK) by components of the Rho signaling pathway during sphingosine-1-phosphate-induced smooth muscle cell migration. **J Surg Res**, v. 122, n. 2, p. 173-9, Dec 2004. ISSN 0022-4804 (Print)

GOMES, M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 25, p. 14440-5, Dec 4 2001. ISSN 0027-8424 (Print)

HAGENS, O. et al. Characterization of FBX25, encoding a novel brain-expressed F-box protein. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 1, p. 110-8, Jan 2006. ISSN 0006-3002 (Print)

HONG, S. K. et al. Noncatalytic function of ERK1/2 can promote Raf/MEK/ERK-mediated growth arrest signaling. **J Biol Chem**, v. 284, n. 48, p. 33006-18, Nov 27 2009. ISSN 1083-351X (Electronic)

INOBE, T.; MATOUSCHEK, A. Paradigms of protein degradation by the proteasome. **Curr Opin Struct Biol**, v. 24, p. 156-64, Feb 2014. ISSN 1879-033X (Electronic)

JACOBS, D. et al. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. **Genes & Development**, v. 13, n. 2, p. 163-175, January 15, 1999 1999.

JIN, J. et al. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. **Genes Dev**, v. 18, n. 21, p. 2573-80, Nov 01 2004. ISSN 0890-9369 (Print)

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, 2002.

KAISER, P.; HUANG, L. Global approaches to understanding ubiquitination. **Genome Biol**, v. 6, n. 10, p. 233, 2005. ISSN 1474-760X (Electronic)

KANIE, T. et al. Genetic reevaluation of the role of F-box proteins in cyclin D1 degradation. **Mol Cell Biol**, v. 32, n. 3, p. 590-605, Feb 2012. ISSN 1098-5549 (Electronic)

KASZA, A. Signal-dependent Elk-1 target genes involved in transcript processing and cell migration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1829, n. 10, p. 1026-33, Oct 2013. ISSN 0006-3002 (Print)

KATZ, M.; AMIT, I.; YARDEN, Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 8, p. 1161-76, Aug 2007. ISSN 0006-3002 (Print)

KATZ, S.; BOLAND, R.; SANTILLAN, G. Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38, n. 12, p. 2082-91, 2006. ISSN 1357-2725 (Print)

KAWAKAMI, E. et al. The histone demethylase Fbxl11/Kdm2a plays an essential role in embryonic development by repressing cell-cycle regulators. **Mech Dev**, v. 135, p. 31-42, Feb 2015. ISSN 1872-6356 (Electronic)

KEHAT, I.; MOLKENTIN, J. D. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1188, p. 96-102, Feb 2010. ISSN 1749-6632 (Electronic)

KRAVTSOVA-IVANTSIV, Y.; SOMMER, T.; CIECHANOVER, A. The lysine48-based polyubiquitin chain proteasomal signal: not a single child anymore. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 52, n. 1, p. 192-8, Jan 02 2013. ISSN 1521-3773 (Electronic)

LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; MITCH, W. E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, n. 7, p. 1807-19, Jul 2006. ISSN 1046-6673 (Print)

LEGENDRE, F. et al. JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-

regulation of SOX9 expression. **J Biol Chem**, v. 278, n. 5, p. 2903-12, Jan 31 2003. ISSN 0021-9258 (Print)

LEHMAN, N. L. The ubiquitin proteasome system in neuropathology. **Acta Neuropathol**, v. 118, n. 3, p. 329-47, Sep 2009. ISSN 1432-0533 (Electronic)

LI, A.; BLOW, J. J. The origin of CDK regulation. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 8, p. E182-4, Aug 2001. ISSN 1465-7392 (Print)

LIU, D. et al. MicroRNA-210 interacts with FBXO31 to regulate cancer proliferation cell cycle and migration in human breast cancer. **Onco Targets Ther**, v. 9, p. 5245-55, 2016. ISSN 1178-6930 (Linking).

LIU, D. X.; GREENE, L. A. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. **Cell and Tissue Research**, v. 305, n. 2, p. 217-228, 2001. ISSN 0302-766X 1432-0878.

LIU, J. et al. F-box only protein 31 (FBXO31) negatively regulates p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling by mediating lysine 48-linked ubiquitination and degradation of mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6). **J Biol Chem**, v. 289, n. 31, p. 21508-18, Aug 01 2014. ISSN 1083-351X (Electronic)

LIU, T. B.; XUE, C. The Ubiquitin-Proteasome System and F-box Proteins in Pathogenic Fungi. **Mycobiology**, v. 39, n. 4, p. 243-8, Dec 2011. ISSN 2092-9323 (Electronic)

LIU, W. et al. Cell-specific activation profile of extracellular signal-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinases in asthmatic airways. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, n. 4, p. 893-902 e2, Apr 2008. ISSN 1097-6825 (Electronic)

LIU, Y. et al. F-box protein Fbx18 mediates polyubiquitylation and proteasomal degradation of the pro-apoptotic SCF subunit Fbx17. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1630, Feb 05 2015. ISSN 2041-4889 (Electronic).

LU, Z.; XU, S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. **IUBMB Life**, v. 58, n. 11, p. 621-31, Nov 2006. ISSN 1521-6543 (Print)

LU, Z. et al. The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. **Mol Cell**, v. 9, 2002.

MAGORI, S.; CITOVSKEY, V. Hijacking of the Host SCF Ubiquitin Ligase Machinery by Plant Pathogens. **Front Plant Sci**, v. 2, p. 87, 2011. ISSN 1664-462X (Electronic)

MANFIOLLI, A. O. et al. FBXO25-associated nuclear domains: a novel subnuclear structure. **Mol Biol Cell**, v. 19, n. 5, p. 1848-61, May 2008. ISSN 1939-4586 (Electronic)

- MARAGNO, A. L.; BAQUI, M. M.; GOMES, M. D. FBXO25, an F-box protein homologue of atrogin-1, is not induced in atrophying muscle. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 6, p. 966-72, Jun 2006. ISSN 0006-3002 (Print)
- MARUYAMA, T. et al. CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation required for proper hyperosmotic response. **EMBO J**, v. 29, 2010.
- MATSON, J. P.; COOK, J. G. Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. **FEBS J**, v. 284, n. 3, p. 362-375, Feb 2017. ISSN 1742-4658 (Electronic)
- MATSUBAYASHI, Y. et al. ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing. **Curr Biol**, v. 14, n. 8, p. 731-5, Apr 20 2004. ISSN 0960-9822 (Print)
- MATSUMOTO, A.; NAKAYAMA, K. I. Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 2, p. 2335-44, Feb 2013. ISSN 0006-3002 (Print)
- MAY, L. T.; HILL, S. J. ERK phosphorylation: spatial and temporal regulation by G protein-coupled receptors. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 10, p. 2013-7, 2008. ISSN 1357-2725 (Print)
- MELOCHE, S.; POUYSSEGUR, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3227-39, May 14 2007. ISSN 0950-9232 (Print)
- METZGER, M. B. et al. RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 1, p. 47-60, Jan 2014. ISSN 0006-3002 (Print)
- MURPHY, L. O.; BLENIS, J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. **Trends Biochem Sci**, v. 31, n. 5, p. 268-75, May 2006. ISSN 0968-0004 (Print)
- NAKAYAMA, K. et al. FGF induces oscillations of Hes1 expression and Ras/ERK activation. **Curr Biol**, v. 18, 2008.
- NAKAYAMA, K. I.; NAKAYAMA, K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. **Semin Cell Dev Biol**, v. 16, n. 3, p. 323-33, Jun 2005. ISSN 1084-9521 (Print)
- Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 5, p. 369-81, May 2006. ISSN 1474-175X (Print)
- NAM, C. et al. Etoposide induces apoptosis and cell cycle arrest of neuroepithelial cells in a p53-related manner. **Neurotoxicol Teratol**, v. 28, n. 6, p. 664-72, Nov-Dec 2006. ISSN 0892-0362 (Print)

- NATH, S. R.; LIEBERMAN, A. P. The Ubiquitination, Disaggregation and Proteasomal Degradation Machineries in Polyglutamine Disease. **Front Mol Neurosci**, v. 10, p. 78, 2017. ISSN 1662-5099 (Linking).
- NEBIGIL, C. G. et al. 5-Hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: Cross-talk with tyrosine kinase pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 6, p. 2591-2596, 02/25
- NELSON, D. E.; RANDLE, S. J.; LAMAN, H. Beyond ubiquitination: the atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins. **Open Biol**, v. 3, n. 10, p. 130131, Oct 09 2013. ISSN 2046-2441 (Electronic)
- OHTSUKA, S. et al. Cell cycle arrest caused by MEK/ERK signaling is a mechanism for suppressing growth of antigen-hyperstimulated effector T cells. **Int Immunol**, v. 28, n. 11, p. 547-557, Nov 2016. ISSN 1460-2377 (Electronic)
- OLIVEIRA, C. S. et al. The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, n. 3-4, p. 355-62, May-Jun 2008. ISSN 0736-5748 (Print)
- PLOTNIKOV, A. et al. The nuclear translocation of ERK1/2 as an anticancer target. **Nat Commun**, v. 6, p. 6685, Mar 30 2015. ISSN 2041-1723 (Electronic)
- PRAKASH, S. et al. Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes. **Nat Chem Biol**, v. 5, n. 1, p. 29-36, Jan 2009. ISSN 1552-4469 (Electronic)
- PRUNEDA, J. N. et al. Structure of an E3:E2-Ub complex reveals an allosteric mechanism shared among RING/U-box ligases. **Mol Cell**, v. 47, n. 6, p. 933-42, Sep 28 2012. ISSN 1097-4164 (Electronic)
- RAMOS, J. W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 12, p. 2707-19, 2008. ISSN 1357-2725 (Print)
- ROBERTS, P. J.; DER, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3291-310, May 14 2007. ISSN 0950-9232 (Print)
- RODRIGUEZ, J. et al. ERK1/2 MAP kinases promote cell cycle entry by rapid, kinase-independent disruption of retinoblastoma-lamin A complexes. **J Cell Biol**, v. 191, n. 5, p. 967-79, Nov 29 2010. ISSN 1540-8140 (Electronic)
- ROSE, B. A.; FORCE, T.; WANG, Y. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in the Heart: Angels Versus Demons in a Heart-Breaking Tale. **Physiological reviews**, v. 90, n. 4, p. 10.1152/physrev.00054.2009, 2010. ISSN 0031-9333

- ROSKOSKI, R., JR. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. **Pharmacol Res**, v. 66, n. 2, p. 105-43, Aug 2012. ISSN 1096-1186 (Electronic)
- ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 2, p. 320-344, 2004. ISSN 1092-2172
- SATYANARAYANA, A.; KALDIS, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. **Oncogene**, v. 28, n. 33, p. 2925-39, Aug 20 2009. ISSN 1476-5594 (Electronic)
- SCHEFFNER, M.; KUMAR, S. Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 1, p. 61-74, Jan 2014. ISSN 0006-3002 (Print)
- SCHMIDT, M.; FINLEY, D. Regulation of proteasome activity in health and disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 1, p. 13-25, Jan 2014. ISSN 0006-3002 (Print)
- SHAUL, Y. D.; SEGER, R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 8, p. 1213-26, Aug 2007. ISSN 0006-3002 (Print)
- SHIN, J. et al. Depletion of ERK2 but not ERK1 abrogates oncogenic Ras-induced senescence. **Cell Signal**, v. 25, n. 12, p. 2540-7, Dec 2013. ISSN 1873-3913 (Electronic)
- SKAAR, J. R.; PAGAN, J. K.; PAGANO, M. Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 6, p. 369-81, Jun 2013. ISSN 1471-0080 (Electronic)
- SCF ubiquitin ligase-targeted therapies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 12, p. 889-903, Dec 2014. ISSN 1474-1784 (Electronic)
- SOMMER, T.; WOLF, D. H. The ubiquitin-proteasome-system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 1, p. 1, Jan 2014. ISSN 0006-3002 (Print)
- SRINIVASAN, R. et al. Erk1 and Erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8283, Dec 14 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic)
- STEELMAN, L. S. et al. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. **Leukemia**, v. 25, n. 7, p. 1080-94, Jul 2011. ISSN 1476-5551 (Electronic)
- TANAKA, K. Molecular biology of the proteasome. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 247, n. 3, p. 537-41, Jun 29 1998. ISSN 0006-291X (Print)

TANG, D. et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. **J Biol Chem**, v. 277, n. 15, p. 12710-7, Apr 12 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

TEIXEIRA, F. R. et al. The F-box protein FBXO25 promotes the proteasome-dependent degradation of ELK-1 protein. **J Biol Chem**, v. 288, n. 39, p. 28152-62, Sep 27 2013. ISSN 1083-351X (Electronic)

TEIXEIRA, F. R. et al. Identification of FBXO25-interacting proteins using an integrated proteomics approach. **Proteomics**, v. 10, n. 15, p. 2746-2757, 2010. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <mailto://mdamario@fmrp.usp.br> >.

TZIVION, G. Special issue on mitogen-activated protein kinases: New insights into regulation, function and role in human disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 8, p. 1149, Aug 2007. ISSN 0006-3002 (Print)

UCHIKI, T. et al. The ubiquitin-interacting motif protein, S5a, is ubiquitinated by all types of ubiquitin ligases by a mechanism different from typical substrate recognition. **J Biol Chem**, v. 284, n. 19, p. 12622-32, May 08 2009. ISSN 0021-9258 (Print)

UDDIN, S. et al. Involvement of F-BOX proteins in progression and development of human malignancies. **Semin Cancer Biol**, v. 36, p. 18-32, Feb 2016. ISSN 1096-3650 (Electronic)

VON KRIEGSHEIM, A. et al. Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 12, p. 1458-64, Dec 2009. ISSN 1476-4679 (Electronic)

WEATHINGTON, N. M.; MALLAMPALLI, R. K. New insights on the function of SCF ubiquitin E3 ligases in the lung. **Cell Signal**, v. 25, n. 9, p. 1792-8, Sep 2013. ISSN 1873-3913 (Electronic)

WEI, J. et al. A new mechanism of RhoA ubiquitination and degradation: roles of SCF(FBXL19) E3 ligase and Erk2. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 12, p. 2757-64, Dec 2013. ISSN 0006-3002 (Print)

WILKINSON, K. D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. **Semin Cell Dev Biol**, v. 11, n. 3, p. 141-8, Jun 2000. ISSN 1084-9521 (Print)

WORTZEL, I.; SEGER, R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. **Genes Cancer**, v. 2, n. 3, p. 195-209, Mar 2011. ISSN 1947-6027 (Electronic)

YAMASAKI, L.; PAGANO, M. Cell cycle, proteolysis and cancer. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, n. 6, p. 623-8, Dec 2004. ISSN 0955-0674 (Print)

YUAN, X. S. et al. Downregulation of RUVBL1 inhibits proliferation of lung adenocarcinoma cells by G1/S phase cell cycle arrest via multiple mechanisms. **Tumour Biol**, Oct 10 2016. ISSN 1423-0380 (Electronic)

ZEHORAI, E. et al. The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. **Mol Cell Endocrinol**, v. 314, n. 2, p. 213-20, Jan 27 2010. ISSN 1872-8057 (Electronic)

ZHAN, Y. et al. Role of JNK, p38, and ERK in platelet-derived growth factor-induced vascular proliferation, migration, and gene expression. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 5, p. 795-801, May 01 2003. ISSN 1524-4636 (Electronic)

ZHAO, J. et al. SCF E3 ligase F-box protein complex SCF(FBXL19) regulates cell migration by mediating Rac1 ubiquitination and degradation. **FASEB J**, v. 27, n. 7, p. 2611-9, Jul 2013. ISSN 1530-6860 (Electronic)

ZHAO, J. et al. SCF E3 ligase F-box protein complex SCF(FBXL19) regulates cell migration by mediating Rac1 ubiquitination and degradation. **The FASEB Journal**, Bethesda, MD, USA, v. 27, n. 7, p. 2611-2619, 11/16/received 03/11/accepted 2013. ISSN 0892-6638

ZHONG, X. P. et al. Regulation of T cell receptor-induced activation of the Ras-ERK pathway by diacylglycerol kinase zeta. **J Biol Chem**, v. 277, n. 34, p. 31089-98, Aug 23 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

ZHOU, W.; WEI, W.; SUN, Y. Genetically engineered mouse models for functional studies of SKP1-CUL1-F-box-protein (SCF) E3 ubiquitin ligases. **Cell Res**, v. 23, n. 5, p. 599-619, May 2013. ISSN 1748-7838 (Electronic)