

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

Ana Carla Medeiros

Caracterização parcial do complexo SCF1 contendo a proteína
FBXO25 fosforilada

Ribeirão Preto/SP

2015

ANA CARLA MEDEIROS

Caracterização parcial do complexo SCF1 contendo a proteína FBXO25 fosforilada

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

Co-orientador: Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira

Ribeirão Preto

2015

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Medeiros, Ana Carla

Caracterização parcial do complexo SCF1 contendo a proteína FBXO25 fosforilada.

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

Ribeirão Preto – Agosto 2015. 73p.

Orientador: Dr. Marcelo Damário Gomes

Co-Orientador: Dr. Felipe Roberti Teixeira

1- SUP, 2- Complexos SCF1, 3- FBXO25, 4- Protoarrays

FICHA DE APROVAÇÃO

Ana Carla Medeiros

Caracterização parcial do complexo SCF1 contendo a proteína FBXO25 fosforilada

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. Dr. Fábio Luís Forti

Ass: _____

Instituto de Química da USP - IQ-USP

Profa. Dra. Lisandra Marques Gava Borges

Ass: _____

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me iluminando e abençoando;

A minha família, em especial aos meus pais pelo amor incondicional, apoio e incentivo de sempre buscar alcançar meus sonhos e objetivos;

Ao Bruno, pela paciência, incentivo, amor e por todos os momentos juntos;

Ao Marcelo, pela confiança em me receber em seu laboratório, pelos seus ensinamentos e por contribuir para minha formação profissional;

Ao Felipe, pela paciência, amizade, pelos puxões de orelha que tanto contribuíram para este trabalho, e por todos os seus ensinamentos acadêmicos e pra vida;

A Sarah, pela amizade em todos esses anos de convivência, incentivo e por sempre estar presente;

Ao quinteto (Karol, Deisy, Pri e Sarah) e as agregadas (Alinne e Luana), pela amizade, companheirismo, conversas no corredor, conselhos e risadas;

A Pri, minha companheira de bancada e balada! Obrigada pela paciência, amizade, conselhos pra vida, e por estar sempre presente;

Ao Prof. Cláudio, por nos permitir fazer uso do seu laboratório, assim como seus alunos por estarem sempre disponíveis a ajudar;

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica pela gentileza de sempre, em especial a Cacilda pelo carinho de mãe e exemplo de bom coração;

A CNPq pelo auxílio;

A FAPESP, Capes pelo auxílio ao projeto;

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIACÕES.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1- Sistema Ubiquitina-Proteassoma (SUP) e E3 ligases do tipo SCF1.....	11
1.2- FBXO25	16
1.3- PROTO-, FOSFO-ARRAYS	18
2. OBJETIVO GERAL.....	21
2.1- Objetivos específicos:	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1- Produção das construções de FBXO25 (WT e ΔF) em fusão ao peptídeo FLAG	22
3.2- Cultivo de células.....	23
3.3- Transfecção do complexo SCF1.....	24
3.4- Tratamento das células com PMA	24
3.5- Lise celular.....	25
3.6- Imunoprecipitação com anti-FLAG	25
3.7- <i>Western blotting</i>	27
3.8- Anticorpos utilizados	28
3.8.1- Anticorpos primários	28
3.8.2- Anticorpos secundários	28
3.9- Coloração com Coomassie	29
3.10- Coloração com Nitrato de Prata	29
3.11- Mutação Pontual	30
3.12- Ubiquitinação <i>in vitro</i>	31
3.13- Ubiquitinação nos Protoarrays	32
3.14- Aquisições de dados e análises.....	33
4- RESULTADOS	35
4.1- Obtenção dos complexos SCF1 ^{FBXO25} , SCF1 ^{pFBXO25} e SCF1 ^{FBXO25ΔF}	35
4.1.1- Imunoprecipitação.....	35
4.1.2- Modificações encontradas.....	38
4.1.3- Caracterização parcial da FBXO25 T137G.....	41
4.1.4- Determinação da atividade dos complexos SCF1	43

4.2- Ubiquitanação nos Protoarrays	45
4.2.1- Identificação dos substratos	45
4.2.2- Substratos selecionados	48
5- DISCUSSÃO	50
6- CONCLUSÕES	55
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8- ANEXOS.....	59

RESUMO

Caracterização parcial do complexo SCF1 contendo a proteína FBXO25 fosforilada.

Medeiros, A. C., 2015.

Dissertação de mestrado 73p. Programa de Pós-graduação em Bioquímica da FMRP/USP.

A FBXO25 é parte de uma E3 ligase do tipo RING, (*Really Interesting New Gene*), oligomérica do tipo SCF, responsável pelo reconhecimento específico do substrato a ser degradado via Sistema Ubiquitina-Proteassoma (SUP). O SUP é o principal mecanismo proteolítico intracelular, responsável pela degradação de 80-90% das proteínas citosólicas e nucleares. A FBXO25 é capaz de formar um complexo SCF1 ativo (formado pela interação das proteínas Skp1, Cul1, Roc1 e uma proteína do tipo F-box), capaz de ubiquitinar seus substratos. Essa proteína se acumula no núcleo celular formando uma nova estrutura subnuclear denominada FANDs (*FBXO25 Associated Nuclear Domains*) que estão envolvidos na ubiquitinação nuclear. Nesse trabalho, purificamos complexos SCF1 (WT ou sem o domínio de interação com Skp1 (ΔF)), tratados ou não com PMA, pela técnica de imunoprecipitação. Identificamos por espectrometria de massas um sítio de fosforilação essencial para FBXO25, quando células transfectadas são tratadas com o mitógeno PMA. Buscamos também por substratos diferencialmente ubiquitinados por esses complexos, por meio de ensaios em ProtoArrays[®], identificando substratos envolvidos na via de sinalização ERK1/2.

Palavras chave: SUP, Complexos SCF1, FBXO25, Protoarrays

ABSTRACT

Partial characterization of SCF1 complex containing the protein phosphorylated FBXO25.

Medeiros, A. C., 2015.

Dissertação de mestrado 73p. Programa de Pós-graduação em Bioquímica da FMRP/USP.

The FBXO25 is an E3 ligase RING type (*Really Interesting New Gene*), SCF oligomeric type, responsible for the specific recognition of the substrate to be degraded via the ubiquitin-proteasome system (SUP). SUP is the main intracellular proteolytic mechanism responsible for 80-90% degradation of cytosolic and nuclear proteins. The FBXO25 is capable of forming a complex SCF1 (formed by the interaction of proteins Skp1, Cul1, Roc1 protein and a type F-box), resulting in an active SCF complex which is able to ubiquitinate their substrates. This protein accumulates in the nucleus forming a subnuclear structure called FANDs (FBXO25 Associated Nuclear Domains) that are involved in nuclear ubiquitination. In this work, we purify complex SCF1 (WT or Δ F-box, which is not able to interact with Skp1), treated or not with PMA, by immunoprecipitation technique. We identified by mass spectrometry, an essential phosphorylation site for FBXO25, when it is phosphorylated under the action of the mitogenic reagent PMA. We also search for differentially ubiquitinated substrates for these complexes, by testing in ProtoArrays® identifying substrates involved in the signaling pathway ERK1 / 2.

Key words: UPS, SCF1 Complex, FBXO25, Protoarrays

LISTA DE ABREVIÇÕES

FANDS – FBXO25- *associated nuclear domains*

FBXL – *F-box LRR*

FBXO – *F-box other*

FBXW – *F-box WD40*

HA – *Haemagglutinin peptide*

HECT – *Homologus to E6-AP COOH terminus*

HEK – *Human embryonic kidney cells*

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PMA – *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

PML – *Promyelocytic leukemia protein*

RING – *Really interesting new gene*

SCF1 – SKP1, Cul1, *F-box protein*

SUP – Sistema ubiquitina-proteassoma

Ub – Ubiquitina

WT – Wild type

Δ F – delta F (mutante FBXO25).

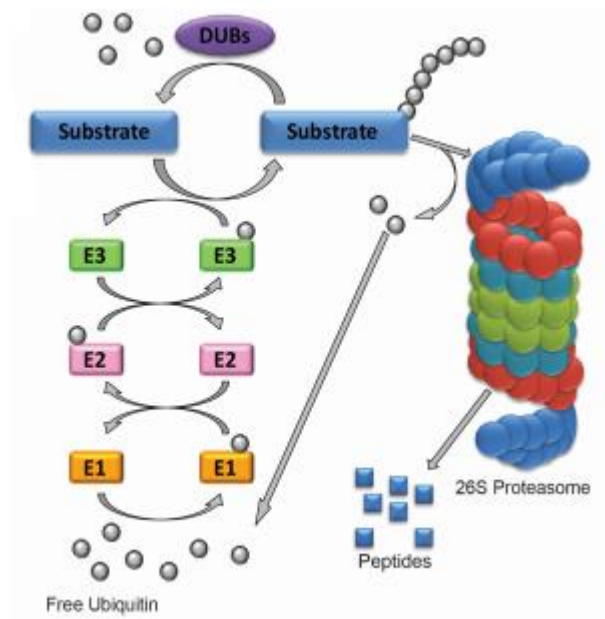
1. INTRODUÇÃO

1.1- Sistema Ubiquitina-Proteassoma (SUP) e E3 ligases do tipo SCF1

As proteínas são mediadoras efetivas de processos biológicos e o controle de sua disponibilidade consiste em um importante mecanismo de regulação da manutenção da homeostasia e resposta celular adaptativa. Dessa forma, após o desempenho de suas funções, elas são destinadas a sistemas de degradação intracelular. Existem dois mecanismos de proteólise intracelular, o lisossomal e o Sistema Ubiquitina Proteassoma (SUP). O sistema de degradação lisossomal não é específico e todas as proteínas são degradadas a uma mesma taxa ¹. O SUP é o principal mecanismo proteolítico intracelular, responsável pela degradação de 80-90% das proteínas citosólicas e nucleares ². Ele catalisa a degradação de proteínas de vida curta, importantes em uma série de processos celulares, desde a progressão do ciclo celular até a transdução de sinal e transcrição gênica. Além dessas, também catalisa a degradação de proteínas de vida longa, as quais compreendem a maioria das proteínas celulares. O SUP também catalisa a rápida eliminação de proteínas desnaturadas e mal-enoveladas que são continuamente produzidas devido a mutações, erros biossintéticos, falhas no enovelamento e danos pós-traducionais ¹.

O SUP foi bioquimicamente caracterizado no início dos anos 80, como um sistema de duas etapas dependentes de ATP: a primeira decorrente da conjugação covalente da ubiquitina (Ub) marcando proteínas para degradação, e a segunda representada pela hidrólise das proteínas ubiquitinadas pelo complexo proteolítico do proteassoma 26S ³.

Esse sistema é caracterizado por uma série de reações sequenciais formadas por um conjunto de enzimas que catalisam a ligação das Ub nas proteínas-alvo, marcando-as para degradação no proteassoma (Figura 1). A ubiquitinação de uma proteína alvo envolve uma cascata de atividades enzimáticas, que resultam na formação de uma ligação isopeptídica entre o resíduo G76 de ubiquitina e o grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina na proteína alvo ⁴. A ubiquitinação requer a ação coordenada de três enzimas: a enzima ativadora de Ub (E1), a enzima conjugadora de Ub (E2) e a enzima Ub ligase (E3) ⁵. Este processo inicia-se com a ativação da Ub pela E1, que forma uma ligação tioéster com o resíduo G76 de Ub. Este processo não possui nenhum papel discriminatório ou regulatório e geralmente organismos eucarióticos só contêm algumas isoformas de E1. No passo seguinte, a Ub é transferida para E2 através de uma ligação tioéster. Em seguida, a E2-ubiquitina é recrutada para E3 ligases que estão ligadas ao substrato e a ubiquitina é transferida a um resíduo de lisina na proteína alvo, geralmente por formação de um complexo intermediário com a E2 e o substrato ⁶.



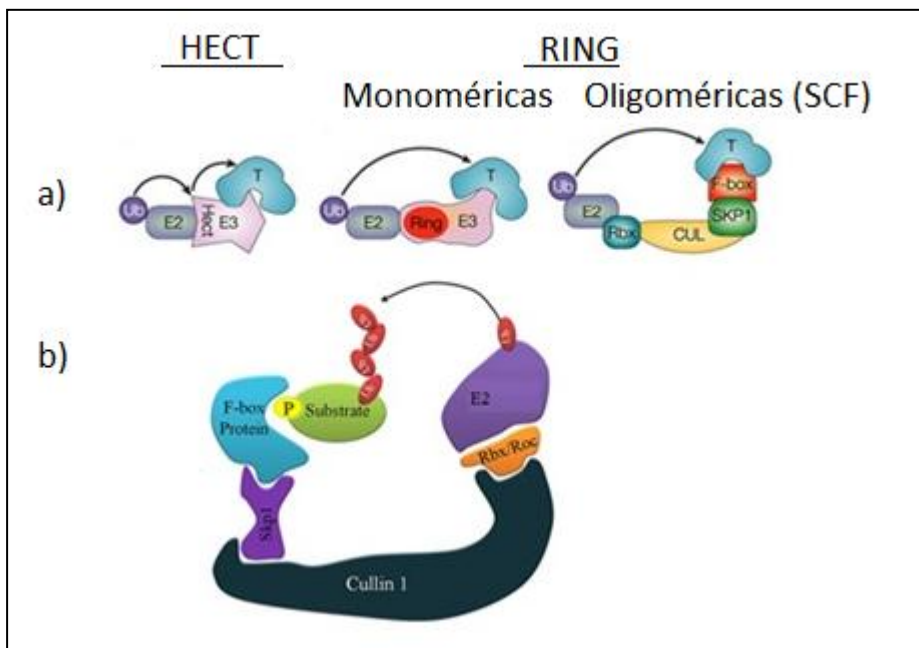
Modificado: Massali *et. al*, 2015.

Figura 1: Representação esquemática de degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma: A E1 recruta a ubiquitina livre, transferindo-a para E2, que por sua vez, a transfere para E3, que reconhece e marca o substrato para degradação no proteassoma. A Ub não é degradada podendo ser reaproveitada em outro processo. As enzimas deubiquitinadoras (DUBs), realizam a remoção da ubiquitina do substrato, tornando a ubiquitinação um processo totalmente reversível.

As proteínas do tipo E3 Ub-ligases são classificadas em 2 grupos com base no domínio de interação com as enzimas E2 ⁷(Figura 2a): -As HECT (*Homologus to E6-AP COOH-terminus*) utilizam o domínio HECT para interagir com as E2 e possuem uma única subunidade. Durante o evento de ubiquitinação, as HECTs formam uma ligação tioéster com a Ub antes da transferência para o resíduo de lisina da proteína alvo ⁸. E as E3-ligases do tipo RINGs (*Really Interesting New Gene*) que utilizam o domínio RING para interagir com as E2. Elas podem ser monoméricas ou oligoméricas, sendo essa última a mais amplamente estudada conhecida

como SCF (**S**kp - *S phase-kinase-associated protein-1*, **C**ullin - por selecionar “to cull” substratos para degradação e uma proteína tipo **F-box**- que contém um domínio conservado tipo F-box de interação com Skp)⁹. Atuam como uma estrutura de suporte para facilitar a transferência da Ub a partir de E2 até a proteína alvo¹⁰. A proteína Culina (1-4) 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 (RBX1 ou Roc 1-2) (Figura 2b).

As E3-ligases marcam com especificidade as proteínas para degradação, uma vez que são responsáveis por recrutar e posicionar a proteína alvo de modo que ocorra a transferência ótima da ubiquitina ao substrato¹¹. Mono ou poli-Ub podem ser realizadas pelas E3-ligases, sendo as demais moléculas de Ub conjugadas umas às outras através de ligações isopeptídicas entre o C-terminal da segunda e o ϵ -amino de um resíduo de lisina da primeira Ub. O modo pelo qual as moléculas de Ub estão ligadas ao seu substrato tem o potencial de alterar sua função. Uma proteína pode ter uma ou mais lisinas mono ou poliubiquitinadas ou uma combinação das duas formas¹². Cadeias de Ub podem ser formadas nas diferentes lisinas desta molécula; poliubiquitinações em Lisina 48 levam a degradação¹³ via proteassoma¹⁴ e demais cadeias de Ub em outras lisinas -Lys 6¹⁵, Lys29/33^{16,17}, Lys63^{18,19}- podem regular a degradação da proteína ou sua atividade em diversos processos celulares de uma maneira independente da degradação como sua localização celular, atividade, ou ainda o reparo do DNA, interação com outras proteínas, assim como o tráfego de vesículas e ativação de quinases²⁰.



Modificado de Sullivan, James A., 2003.

Figura 2 (a) Classes das E3 ligases: são subdivididas em duas grandes classes, as do tipo HECT e RING finger que podem ser mono (RING E3) ou oligoméricas (SCF). **(b) Representação esquemática dos componentes do complexo SCF ativo.** O SCF1 (Skp1, Cul1 e FBP) é composto por subunidades invariáveis de Skp1, Cul1 e RBX1/Roc1 e uma componente variável da família FBX.

As proteínas F-box (FBPs) conferem especificidade ao complexo SCF, uma vez que são responsáveis pelo reconhecimento do substrato para ubiquitinação ²¹. Além do domínio F-box (40-50 aminoácidos que se ligam a Skp) ⁷, elas possuem domínios de interação com o substratos sendo por isso divididas em três categorias, as FBXL, FBXW e FBXO. As FBXL são proteínas que possuem o domínio de interação com o substrato rico em leucina, as FBXW, possuem um domínio WD40, e as FBXO, possuem outros domínios de interação com o substrato ²². Diversas proteínas F-box já foram estudadas e tiveram suas funções e substratos identificados, tais como a FBXW7 ²³, FBXL5 ²⁴ e, FBXO32²⁵, porém a maioria permanece com suas funções e substratos desconhecidos ²⁶.

1.2- FBXO25

A proteína FBXO25 é uma E3-ligase do tipo SCF1 capaz de formar um complexo SCF1^{FBXO25} estável e ativo em experimentos de ubiquitinação *in vitro*^{27,28}. Ela foi descrita pela primeira vez *in silico* em 1999^{10, 29}, e é alvo de estudos em nosso grupo. A FBXO25 possui 65% de identidade com Atrogin-1/FBXO32, hoje utilizada como marcador de atrofia muscular^{30,31}, entretanto, sua expressão não está alterada após a indução da atrofia, e seu gene é fracamente expresso no músculo estriado³². Presente em maior quantidade no cérebro, rins e intestino, a FBXO25 esta presente em diversos outros tecidos, como foi confirmado por estudos de distribuição subcelular, estando presente predominantemente no núcleo de forma extranucleolar^{27, 28}.

A forma endógena de FBXO25 encontra-se no núcleo sob a forma de “dots”, e parecem estar associados à estrutura da cromatina estando presentes apenas na fase G1/telófase do ciclo celular³³. Por meio de experimentos de imunofluorescência com dupla marcação, verificou-se que os corpos de FBXO25 apresentam diferentes localizações e morfologias quando comparados a outros domínios nucleares já bem caracterizados, tais como os speckles, corpos de cajal e gems. Dessa forma, uma nova denominação foi dada a este novo corpo nuclear composto de proteínas do tipo FBXO25, os “FANDs” (FBXO25 *Associated Nuclear Domains*)³³. Trata-se do primeiro e único corpo nuclear composto de proteínas do tipo F-box caracterizado até o momento.

Os compartimentos subnucleares e seus componentes variam de acordo com o estado transcricional da célula, assim, de acordo com determinadas circunstâncias fisiológicas ou doenças, pode ocorrer o remodelamento dos corpos nucleares, a

redistribuição das proteínas nucleoplasmáticas, ou ainda o bloqueio transcricional^{34,35}. Drogas como actinomicina D (ActD) possuem essa capacidade de bloquear a transcrição, e assim é possível reproduzir esse efeito. Os FANDs se redistribuem para o nucleoplasma após o tratamento com ActD, indicando que estes corpos são estruturas dinâmicas influenciadas pela atividade transcricional da célula³³.

A presença de proteínas poli-Ub, além de FBXO25, nos FANDs indicam que estes corpos representam sítios de ubiquitinação no núcleo celular³³. Os FANDs se sobrepõem diversas vezes aos corpos de PML (*Promyelocytic Leukemia Protein*) que são complexos multiprotéicos distribuídos por todo núcleo, responsáveis pela realização de diversos papéis em processos celulares, como regulação transcricional, controle do crescimento celular e apoptose. Os clastossomos, no entanto, são um subgrupo dos corpos de PML e contêm componentes do SUP, sendo caracterizados como importantes centros de degradação proteolítica no núcleo^{36, 37,38}. De maneira interessante, foi demonstrado que os FANDs colocalizam com agregados de poliglutamina. Além disso, verificou-se que há menos agregação das proteínas glutaminadas quando o complexo SCF1^{FBXO25} é superexpresso em células transfectadas com construções de poliglutamina³², indicando um possível papel de FBXO25 na regulação da formação desses agregados.

Em busca de informações funcionais da FBXO25 analisou-se pelo o sistema do duplo-híbrido em leveduras os ligantes endógenos da FBXO25. A proteína FBXO25 foi utilizada como “isca” para a triagem de possíveis ligantes codificados por uma biblioteca de cDNAs de cérebro fetal humano e resultou quase que unicamente na identificação da β -actina (97% dos clones). Em paralelo, por técnicas bioquímicas de copurificação (*TAP-Tandem Affinity Purification*) seguida de espectrometria de massas identificou-se 133 “proteínas parceiras”

de FBXO25, incluindo a β -actina³⁹. Sabe-se que a β -actina não é unicamente um componente do citoesqueleto, mas também uma proteína com funções regulatórias no núcleo (por exemplo, no remodelamento da cromatina e como fator de transcrição ativando a RNA polimerase II, ⁴⁰). Através de um ensaio *in vitro* (*cell free system*) de transcrição em combinação com a interferência de anticorpos anti-FBXO25 mostrou-se que a FBXO25 não só responde ao estado transcrricional celular, mas como esta envolvida diretamente (ou via β -actina nuclear) na transcrição ³⁹.

1.3- PROTO-, FOSFO-ARRAYS

Os arrays de proteínas ou Protoarrays são uma importante ferramenta por permitirem o estudo de forma simultânea de milhares de proteínas ao mesmo tempo, apresentada em 2001 pelo Dr Heng Zhu ⁴¹. Cerca de 90% do proteoma de levedura foi imobilizado em duplicata de forma direcional (via GST- *tag* utilizado na purificação das 5800 ORFs) em uma lâmina de vidro ativada. Isso permitiu a realização de ensaios de interação entre proteínas, proteínas com lipídeos, carboidratos, ácidos nucléicos ou até mesmo com microorganismos em larga escala ^{41,42}. Essa tecnologia foi utilizada pela primeira vez para identificação de substratos de uma E3 Ub-ligase de levedura tipo HECT (Rsp5) através de ensaios de ubiquitinação *in vitro* sobre as proteínas do *chip* ⁴³.

Estudos mostraram a utilização de chips de proteína humana (*Human ProtoArray*®-Invitrogen) para identificação de substratos de E3-ligases de mamíferos. Os *Protoarrays* contêm 21.120 proteínas humanas imobilizadas, sendo 8.295 proteínas únicas e 2.122 controles, sendo todas em duplicata. Um estudo comparou substratos de duas E3-ligases

humanas do tipo HECT (NEDD4 e NEDD4L), utilizando o mesmo princípio de ubiquitinação *in vitro* sobre o chip, identificando diferenças significantes na especificidade dessas duas enzimas⁴⁴. Outra comparação utilizando os Protoarrays foi realizada com extratos celulares sincronizados em determinadas fases do ciclo celular, indicando substratos diferencialmente ubiquitinados em cada uma delas⁴⁵. A identificação de substratos de outra E3-ligase humana tipo HECT (SMURF1) permitiu a identificação de 7 substratos que foram validados *in vitro*⁴⁶.

Nosso laboratório fez a primeira descrição do uso dessa estratégia para uma enzima E3 ligase oligomérica tipo SCF. Demonstramos que FBXO25 interage, ubiquitina e medeia a degradação proteassomal do fator de transcrição ELK-1 envolvido na indução gênica inicial imediata, tal como *c-fos*. Observou-se também que os efeitos celulares dessa atividade de FBXO25 promoveram a redução da ativação dos genes alvos de ELK-1 *c-fos* e *Egr-1* em células HEK293T estimuladas pelo mitógeno PMA⁴⁷.

O laboratório passou a investigar a associação de FBXO25 com outros componentes dessa via de sinalização dependente de ELK-1. Utilizando FosfoArrays (Phospho-Kinase Antibody Array- comercializado pela R&D Systems, EUA) avaliou-se o perfil de fosforilação de 43 substratos de quinases mediante hiperexpressão de FBXO25. A ERK1/2 fosforilada (pERK1/2) foi reduzida drasticamente após indução de FBXO25, sugerindo o envolvimento de FBXO25 na regulação da via das MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*) via fosforilação de ERK1/2⁴⁷. Aparentemente a FBXO25 regula negativamente a atividade de ERK1/2 independente de MEK1/2 provavelmente através da degradação ubiquitina-dependente de um inibidor/regulador da fosfatase de ERK1/2 (Figura 3)⁴⁷. No presente estudo, estabelecemos estratégias bioquímicas para identificar esse e outros substratos da

ubiquitina ligase FBXO25 que possam estar envolvidos na regulação da fosforilação de ERK
1/2.

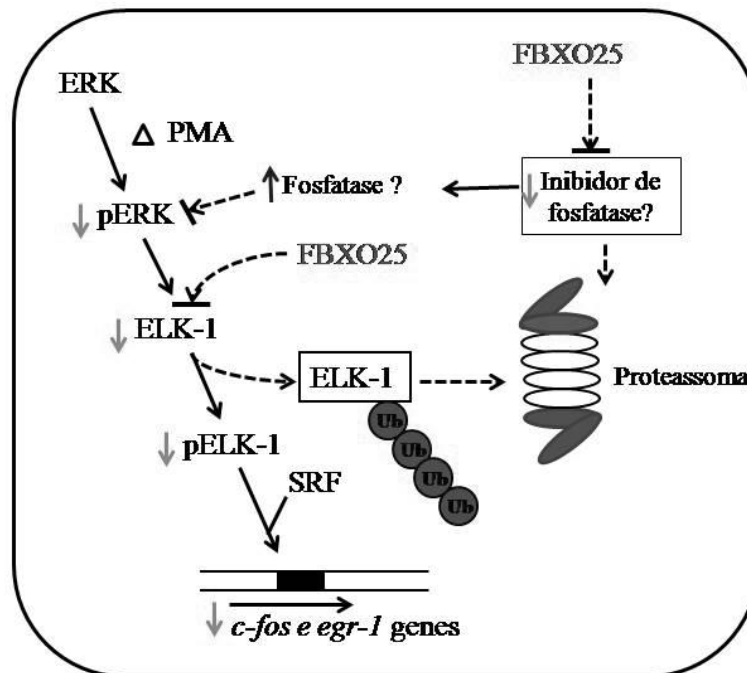


Figura 3. Mecanismo proposto para a redução da atividade transcricional de ELK-1 por FBXO25. Em resposta a estímulos mitogênicos, ERK é ativada pela MEK. ERK ativa, fosforila o fator de transcrição ELK-1. p-ELK-1 acumula-se no núcleo e promove a transcrição de genes regulados por ELK-1, tais como *c-fos* e *Egr-1*. FBXO25 regula negativamente a atividade ERK indiretamente ou por um inibidor ainda não identificado de uma fosfatase de ERK.

2. OBJETIVO GERAL

Estabelecer uma estratégia para identificar substratos que sejam ubiquitinados e degradados via SUP por meio do complexo SCF1 contendo a proteína FBXO25 possivelmente fosforilada.

2.1- Objetivos específicos:

- Analisar por espectrometria de massas o perfil de fosforilação de FBXO25 induzida por PMA;
- Obter os complexos SCF1^{FBXO25}, SCF1^{pFBXO25} e SCF1^{FBXO25ΔF} ativos de células HEK293T para os ensaios de ubiquitinação;
- Identificação de substratos diferencialmente ubiquitinados pelos complexos SCF^{FBXO25} e SCF^{pFBXO25} através da ubiquitinação *in vitro* utilizando os *Protoarrays* como fonte de substratos.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Produção das construções de FBXO25 (WT e ΔF) em fusão ao peptídeo FLAG

Com o objetivo de avaliar a ação do PMA sob a fosforilação das proteínas na presença e na ausência de FBXO25, foi produzida a forma selvagem (WT-*wild type*) e a mutante ΔF (deleção do domínio F-box), ambas em fusão ao peptídeo 3xFLAG.

A reação de PCR foi realizada utilizando *primers* com sítios de restrição para *EcoRI* ou *BamHI* em suas respectivas extremidades 3'e 5' (Tabela 1). Para a primeira PCR foi utilizado como molde a versão truncada de FBXO25 clonada no vetor pDEST 27, para FBXO25WT, e FBXO25 ΔF . A reação de PCR foi preparada utilizando uma concentração final de 0,3 μ M de cada primer (Sense e Antisense), 1mM MgSO₄, 300 μ M dNTP, 1 unidade de Platinum® Pfx DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), 1 μ L da versão truncada de FBXO25 WT e ΔF , e H₂O miliQ qsp para volume final de 50 μ L. A ciclagem para a PCR foi de 94° C por 3 minutos, seguido por 33 ciclos de 94° C por 15 segundos, um gradiente de temperatura variando de 54 a 62° C por 15 segundos, e 68° C por 2 minutos, e por fim 1 ciclo de 68° C por 10 minutos.

Tabela 1- Sequência dos *primers* utilizados.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
pcDNA3.3XFlagBamHIsense	ACTATCGGATCCATGCCGTTTCTGGGTC
pcDNA3.3XFlagEcoRI antisense	AGTCATGAATTCTCAGAACTTGAAGAGGTCAATGA

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) de acordo com as recomendações do fabricante e, em seguida, digerido com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI (Fermentas). O vetor pcDNA3.3xFLAG (gentilmente cedidas pela prof^a. Dra Heike Laman, Universidade de Cambridge) foi digerido com as mesmas enzimas. O produto de PCR e o vetor foram purificados utilizando o mesmo kit de purificação e em seguida, ligados utilizando T4 DNA ligase (Fermentas).

As transformações de bactérias contendo essas construções foram realizadas por *heat shock*, e as preparações plasmidiais em pequena escala (mini-preps) foram realizadas com o kit da QIAGEN *Plasmid Purification*(QIAGEN). As construções foram selecionadas a partir da análise de enzimas de restrição e os fragmentos analisados em gel de agarose 1%.

3.2- Cultivo de células

Foi utilizada, para o presente estudo, Células Ecophoenix, HEK 293 modificadas. Essas células foram transformadas com adenovírus E1a carregando antígeno sensível à temperatura co-selecionadas com neomicina. A transformação foi provocada pela inserção de aproximadamente 4,5 quilobases de genoma viral no cromossomo 19 humano. Gag-pol foi introduzido com higromicina como marcador de seleção, e as proteínas de envelope foram introduzidas com a resistência da difteria como o marcador co-selecionável. As células foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Dra Heike Laman da Universidade de Cambridge. São células epiteliais derivadas de rim que foram cultivadas em meio DMEN (Sigma-Aldrich), com

10% de soro bovino fetal (SFB), 10µg/mL de estreptomicina e 10U/mL de penicilina G sódica em estufa com atmosfera úmida a 5% de CO₂ e 37°C de temperatura.

3.3- Transfecção do complexo SCF1

O método de transfecção utilizado foi com o PEI (polietilenimina, Polyscience) 1µg/µL em Tris-HCL pH 7.2. Esse composto apresenta a capacidade de condensar o DNA por interação eletrostática entre seus grupos carregados positivamente com as cargas negativas dos grupos fosfato das cadeias de DNA. Células repicadas em placas de cultura de 15 cm de diâmetro, foram deixadas confluir cerca de 80%. O DNA plasmidial foi diluído em meio DMEN sem soro e sem antibiótico, e em seguida foi adicionado o PEI na proporção de 1 parte de DNA para 3 partes de PEI. A quantidade total de DNA plasmidial transfectado foi de 22µg distribuído da seguinte maneira: 10µg de FBXO25 (WT ou ΔF) em fusão ao peptídeo FLAG, 4µg Myc-Roc1, 4µg HA-SKP1 e 4µg de Cul1. Essa solução foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente para formação dos complexos. Em seguida, a suspensão foi adicionada gota a gota ao meio DMEN/SFB na placa. Após 5 horas de incubação na estufa a 37°C, o meio foi trocado e a placa foi incubada por 48 horas na estufa.

3.4- Tratamento das células com PMA

As placas foram colocadas em *starvation*, ou seja, foi retirado do meio de cultura, o soro fetal bovino, após completar 24 horas de transfecção. Das 12 placas de 15 cm

transfectadas com o complexo SCF1^{FBXO25}, 6 foram tratadas com 100 nM de *12-myristate-13-acetate* (PMA) (Invitrogen) por trinta minutos, após esse período as células foram lisadas, e os complexos SCF (FBXO25) purificados por imunoprecipitação.

3.5- Lise celular

O meio das placas foi aspirado e em seguida, foi adicionado 2mL de PBS/EDTA 15mM para soltar as células. Foi adicionado mais 2mL de PBS/EDTA para ressuspender e homogeneizar as células. Essa solução foi centrifugada a 2000 rpm por 2 minutos. O pellet foi ressuspenso em 1mL de tampão de lise 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 Bradford⁴⁸. Os valores foram então normalizados a fim de se ter a mesma quantidade de proteínas em todas as amostras. Dos 1000 µL, 950 foram separados para imunoprecipitação, e 50 µL para o *Input*.

3.6- Imunoprecipitação com anti-FLAG

As *beads* (ou resina) utilizadas para este ensaio estavam conjugadas ao peptídeo FLAG (DYKDDDDK), eliminando o passo de incubação da resina ao anticorpo ou peptídeo de interesse. Foram utilizados 15µL de *bead* por placa. A resina foi então equilibrada com o

tampão de lise, isto significa centrifugar a resina a 1400xg por 10 segundos, adicionar o tampão de lise, homogeneizar por inversão do tubo e retirar o sobrenadante – tudo com cuidado para não aspirar também o precipitado. Esse passo foi repetido 2x. Após as lavagens, a resina foi então dividida igualmente entre os tubos para posterior adição das amostras. As amostras ($SCF1^{FBXO25}$, $SCF1^{pFBXO25}$ e $SCF^{FBXO25\Delta F}$) foram então adicionadas aos tubos e incubadas a 4° C, sob agitação por 5 horas. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 1400xg, por 10 segundos, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se tampão de lise, homogeneizou-se e centrifugou-se novamente a 1400xg por 10 segundos. Esse passo foi repetido três vezes. Em seguida, adicionou-se o tampão de eluição FLAG (HEPES 10 mM pH 7,9; $MgCl_2$ 1,5 mM; NP40 0,05% e KCl 225 mM), homogeneizou-se e as amostras foram centrifugadas novamente a 1400xg, 10 segundos. O passo foi repetido. O peptídeo FLAG foi então diluído no tampão de eluição, de forma que a concentração final fosse de 300 μ g/mL. As amostras ficaram eluindo sob agitação a 4 °C, por 1 hora. Após esse período, as amostras foram centrifugadas, e o precipitado foi separado do sobrenadante. Foi adicionado tampão de amostra 2x ao *Input*, ao sobrenadante e a resina, e todas as amostras foram fervidas a 100 °C, por 5 minutos para posterior análise da atividade do complexo por meio de *western blotting*.

Aos complexos purificados foram adicionados glicerol, e as amostras divididas em alíquotas de 25 μ L. Os complexos foram quantificados por meio de do programa IMAGE J, quantificando-se a banda de FBXO25 e Cul1 coradas por coomassie blue e determinando suas quantidades baseadas numa curva padrão de BSA corrida no mesmo gel.

3.7- Western blotting

As amostras (FBXO25, pFBXO25 e FBXO25ΔF) foram preparadas para aplicação em gel gradiente NuPage 4-12% (Invitrogen), na presença de DTT. As amostras foram aplicadas em duplicata. Após separação eletroforética, o gel foi dividido ao meio: metade do gel foi utilizada para o procedimento padrão de western blotting, e a outra metade foi corado com Coomassie Blue R250.

Na metade do gel a ser submetida ao *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, num 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 *Super Block Blocking Buffer in PBS* (ThermoScientific) durante 1 hora. A seguir, o anticorpo primário policlonal (coelho) anti-FBXO25 (1:500) foi diluído em tampão de bloqueio, e incubado com a membrana 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), por 3 vezes de 10 minutos e então incubada com o anticorpo secundário 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).

3.8- Anticorpos utilizados

3.8.1- Anticorpos primários

- Anticorpo policlonal anti-FBXO25 purificado por afinidade feito em coelho contra o fragmento NT2 (referente aos aminoácidos 2 a 63) da proteína FBXO25 ⁴⁹;
- Anticorpo monoclonal anti-HA, clone HA-7 (camundongo isotipo IgG), purificado por imunoglobulina;
- Anticorpo anti-Cul1 (Upstate technology) produzido contra Cul1 humana recombinante;
- Anticorpo monoclonal p-ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology) produzido contra IgG1 de camundongo;
- Anticorpo policlonal ERK 2 (Santa Cruz Biotechnology) produzido em coelho, IgG.

3.8.2- Anticorpos secundários

- IgG de carneiro anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Cell Signaling technology);

- Anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo purificado por afinidade, produzido em cabra conjugados a peroxidase (Kirkegaard & Perry Laboratories);

3.9- Coloração com Coomassie

Foi preparada a solução de Coomassie obedecendo-se a seguinte proporção: 0,25% Coomassie Blue R-250, 50% metanol, 10% de ácido acético em água miliQ, a solução foi filtrada 0,22 μm . O gel foi deixado agitando lentamente por 2-4 horas. Após esse período, o comassie foi então retirado para adição de solução descorante (50% metanol e 10% de ácido acético em água). O gel ficou descorando overnight. No dia seguinte, as bandas correspondentes a FBXO25, pFBXO25 e FBXO25 Δ F foram cortadas e enviadas para análise de espectrometria de massas pela empresa Veritas Biotecnologia Ltda.

3.10- Coloração com Nitrato de Prata

O gel, previamente corado com Coomassie, foi colocado em solução descorante (25% propanol e 10% CH_3COOH em água) *overnight*. Em seguida, o gel foi transferido para uma solução 7,5% CH_3COOH por uma hora, e depois para uma solução de periodato 0,2%, por também uma hora a 4°C. Após esse período, o gel foi lavado com água cinco vezes, de 15 minutos cada. O passo subsequente foi a incubação com solução de DTT (Ditiotreitol) 0,0005% em água por uma hora. Em seguida, o gel foi incubado em solução 0,1% de nitrato de prata, por mais uma hora. Lavou-se então rapidamente o gel com água e em seguida duas

vezes com o revelador (formaldeído 37% mais 3% de carbonato de sódio). Revelou-se até a intensidade desejada e a reação foi parada pela adição de ácido cítrico 2,3M, e deixada sob agitação por 10 minutos. Por fim, o gel foi lavado três vezes de 10 minutos cada, sendo adicionada solução de carbonato 0,3% ao final do processo.

3.11- Mutação Pontual

Foi realizado o procedimento de mutação pontual no vetor pcDNA3.3Xflag clonado com FBXO25 WT, no resíduo de Thr-137, para a inserção de um resíduo de Gly. Para tanto, utilizou-se o kit *Phusion Flash High Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Scientific). Utilizou-se por reação, 1 µL de cada primer (F ou R), 20 ng do vetor pcDNA3.3xFLAG, 10 µL do mix PCR (2x), e completou-se com água para o volume final de reação de 20 µL. Os *primers* (Tabela 2) foram produzidos com um sítio de restrição para a enzima *PvuII* (Thermo Scientific).

A ciclagem utilizada foi de 98 °C por 10 segundos, 30 ciclos de 98 °C por 10 segundos, um gradiente de temperatura de anelamento de 50-62 °C por 5 segundos, e 72 °C por 3 minutos. E por fim, um ciclo de 72 °C por 10 minutos.

Ao final da reação, foi adicionado 0,1 µL da enzima DPN1 (Thermo Scientific). Essa enzima é responsável pela degradação do DNA metilado (o da bactéria), deixando apenas o amplicon. Em seguida, as reações foram colocadas em estufa a 37 °C, overnight, por um período máximo de 18 horas.

Tabela 2- *Primers* utilizados para mutação pontual

<i>Primers</i>	Sequências
2TA137PvuII-R	ACTCCA CT CAGTGAAGCCAGCTGGGACTTCGC
2TA137PvuII-F	AG TCC CAG CTG GCT TCA CTG AGT GGA

As amostras de PCR foram analisadas em gel de agarose 1%, com as amostras de PCR, a fim de se avaliar a presença de uma banda no gel de tamanho aproximado de 5000bp, correspondente ao tamanho do vetor. Se aparecesse a banda, bactérias competentes seriam transformadas com 1, 3e 5 µL de reação. As colônias que cresceram foram submetidas ao procedimento de extração do DNA plasmidial em pequena escala (Mini-Preps QIAGEN).

O DNA plasmidial foi submetido à reação de digestão por 30 min e 1 hora com *PvuII* (Thermo Scientific), a fim de se avaliar a eficiência de digestão da enzima. Utilizou-se 1 µg de DNA da preparação anterior, 2 µL de Buffer G (10x), 0,5 µL de *PvuII* e H₂O miliQqsp 20 µL. Foi colocado para digerir também, o vetor pcDNA3.3xFLAG FBXO25 WT.

3.12- Ubiquitinação *in vitro*

As reações de ubiquitinação *in vitro* foram realizadas da seguinte maneira: os complexos purificados SCF1^{FBXO25} ou SCF1^{pFBXO25} utilizados como fontes de E3 ligases, mix ubiquitina (100 ng de E1 + 500 ng de E2 (UbcH5c), 1 µg de ubiquitina nativa 0,5 µg de N-terminal de biotina-ubiquitina e tampão de ubiquitinação) foram incubadas durante 90 min

a 30 °C. As proteínas foram carregadas em SDS-PAGE, e analisadas por Western com estreptavidina-peroxidase.

3.13- Ubiquitinação nos Protoarrays

Os procedimentos com os ProtoArrays Human Protein Microarrays v4.1 seguiram as instruções do fabricante (Invitrogen) (Figura 3). As lâminas do Protoarray foram tratadas com tampão de bloqueio (50 mM de HEPES, 200 mM de bloqueio De NaCl, 0,08% de Triton X-100, 25% glicerol, 20 mM de glutathiona reduzida, 1 mM de ditioneitol (DTT), e 1% de albumina de soro bovino (BSA) (Invitrogen) durante 60 min a 4 °C em agitação 50 rpm. Durante esse tempo as reações foram preparadas: 25nM SCF1^{FBXO25} purificado ou SCF1^{pFBXO25} em combinação com ubiquitina mix: 100 ng de E1 e 500 ng de E2 (UbcH5c) + 10µM de ubiquitina N-terminal monobiotinilada em tampão de ubiquitinação (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 2mM, DTT 1 mM e glicerol a 10%). As enzimas E1, E2, e Ubiquitinas foram adquiridos a partir da Boston Biochem (Boston, MA). 110 µL da reação foi adicionada à lâmina que foi coberta com uma lamínula seguido por incubação durante 90 min a 30 °C em câmara úmida (Corning Inc.). As lâminas foram lavadas em tampão de ensaio (50 mM Tris, pH 7,5, NaCl 50 mM, 5mM MgSO₄, 0,1% de Tween 20, 1% BSA) (Invitrogen) para remoção da lamínula. Em seguida, o *array* foi lavado 3x em solução de SDS 0,5%, sendo 10 min cada lavagem em temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi repetido utilizando-se o tampão de ensaio como solução de lavagem, também a temperatura ambiente, mais duas outras lavagens com o tampão de ensaio a 4°C. Por fim, as matrizes foram então incubadas com 1,0 µg /µL de estreptavidina-AlexaFluor 647

(Invitrogen) durante 45 min a 4 °C, com agitação de 50 rpm. Em seguida, elas foram lavadas cinco vezes com tampão de ensaio e uma vez com água destilada. As lâminas foram secas por centrifugação a 1000g por 2 minutos, protegidas da luz, as lâminas foram escaneadas em GeneScan5000B (Lab. Prof. Dr. Gustavo H. Goldman/Ciências Farmacêuticas/FCFRP-USP) utilizando o software *GenePix*.

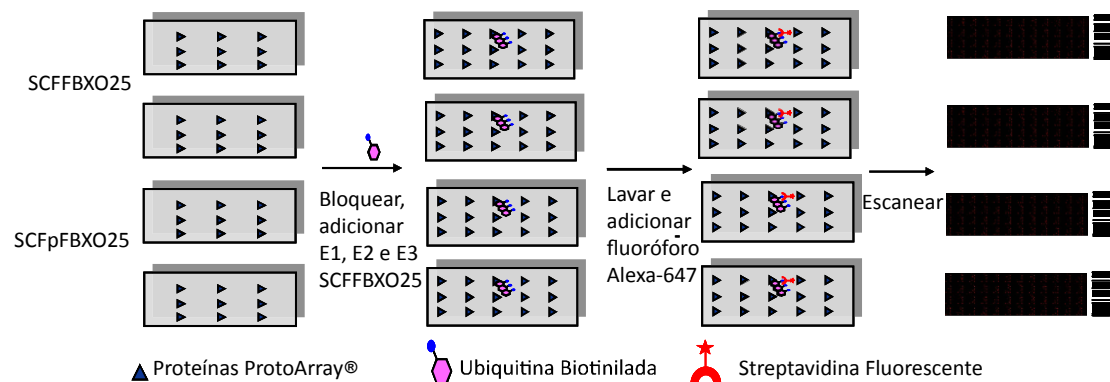


Figura 4: Mecanismo esquemático da reação de ubiquitinação *in vitro* sobre protoarray. O *chip* foi bloqueado inicialmente e em seguida a reação de ubiquitinação foi adicionada sobre ele. A Ub-biotinilada foi revelada por streptavidina-Alexa647, revelando as proteínas que foram ubiquitinadas. Lavou-se o *chip* e sua fluorescência foi lida em *Scanner* de *microarray*.

3.14- Aquisições de dados e análises

Os Protoarrays foram digitalizados, e a aquisição dos dados e subtração do *background* local foram adquiridos com software *GenePix* 4.1 (Molecular Devices) e os dados analisados em *ProspectorAnalyser* 5.1 (Invitrogen). As proteínas foram consideradas somente se todas as replicatas internas fossem consistentemente detectadas pelo

Coeficiente de Variância (CV) de 50%. Os spots foram considerados *hits* se possuísem o Z-factor $> 0,45$. Isso significa que o sinal apresentado leva em consideração a variação associada às características do controle e da amostra para medir a qualidade do ensaio.

4- RESULTADOS

4.1- Obtenção dos complexos SCF1^{FBXO25}, SCF1^{pFBXO25} e SCF1^{FBXO25ΔF}

4.1.1- Imunoprecipitação

A obtenção dos complexos SCF1^{FBXO25}, SCF1^{pFBXO25} e SCF1^{FBXO25ΔF}, deu-se por meio da transfecção transiente de células HEK293 com os plasmídeos componentes do complexo SCF1 (HA-Skp1, Cul1 e myc-Roc1, FBXO25 e FBXO25ΔF).

O processo de purificação dos complexos ocorreu de forma eficiente, por meio da técnica de imunoprecipitação (Figura 5). Utilizou-se uma resina de Agarose-anti-FLAG, e os complexos foram eluídos com o peptídeo 3xFLAG, o que nos permitiu obter os complexos SCF1 de forma ativa^{32,39}. A proteína Cul1 endógena foi co-purificada apenas com a forma selvagem (WT) uma vez que a forma mutante de FBXO25 possui depleção no domínio F-box (aminoácidos 228-266) de interação com SKP1, impossibilitando a formação do complexo SCF1 (FBXO25)⁴⁷.

As frações eluídas da resina Agarose-anti-FLAG pelo peptídeo 3xFLAG foram resolvidas em gel NuPAGE 4-12% (Figura 6). Após a coloração do gel tanto com nitrato de prata quanto com Azul de coomassie, foi possível visualizar as bandas correspondentes a proteína FBXO25, em sua forma selvagem (WT) (bandas 1 e 2), assim como Cul1, componente do complexo. As bandas 1 e 2 foram recortadas e enviadas para análise de espectrometria de massas (MS) para busca de sítios de fosforilação na proteína FBXO25, realizadas pelo laboratório Veritas Life Sciences Biotecnologia Ltda.

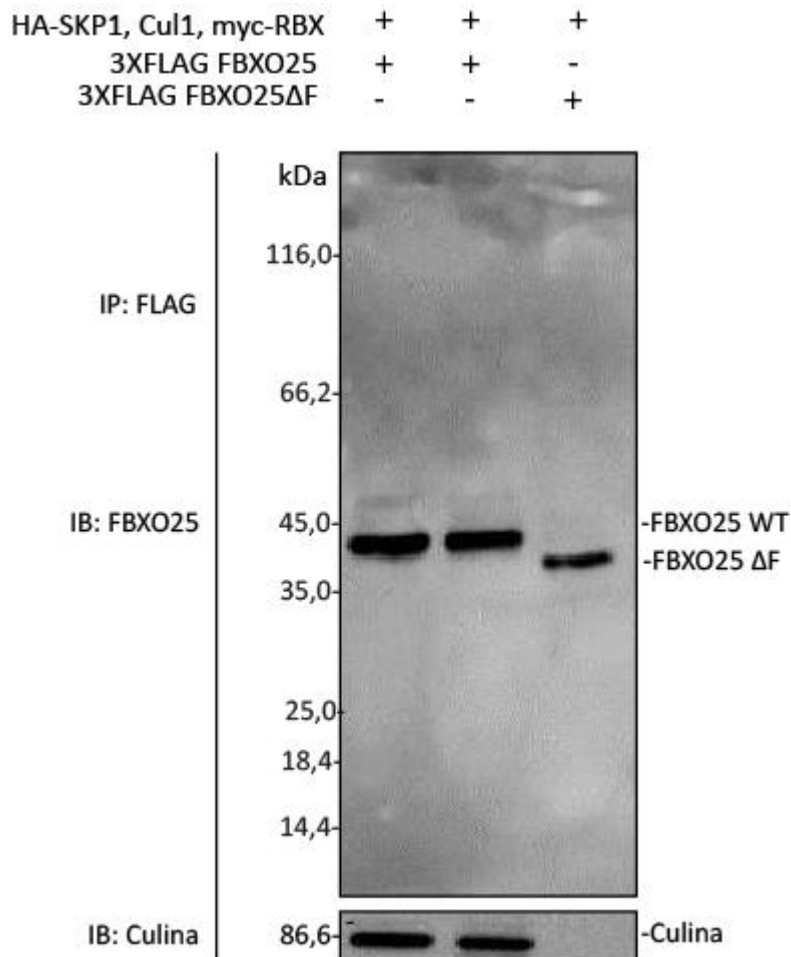


Figura 5: Interação entre FBXO25 e proteínas do complexo SCF1 purificadas por imunoprecipitação. Aproximadamente 10% do eluato total da imunoprecipitação de células HEK293T transfectadas com FBXO25 mutante (ΔF) ou selvagem (WT) foram submetidas a SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana de nitrocelulose e revelados com diferentes anticorpos. Note-se que Cul1, não co-purificou com FBXO25 F-box mutante.

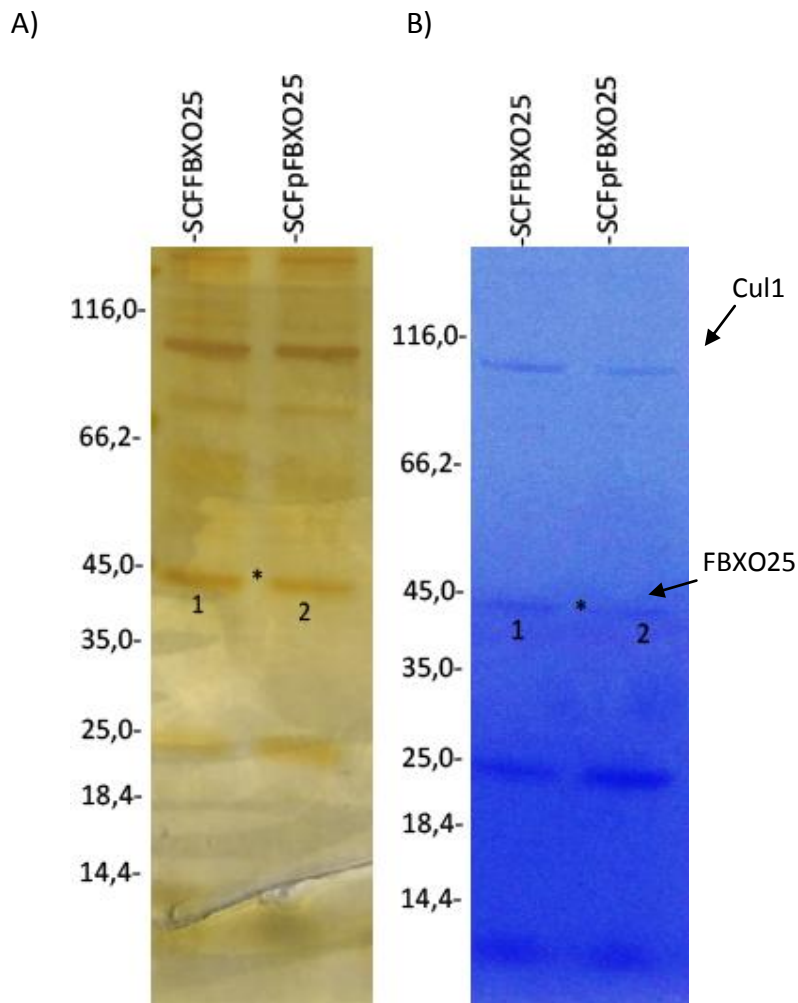


Figura 6: Proteínas associadas a FBXO25 purificadas por imunoprecipitação. Proteínas associadas a FBXO25 que foram separadas em NuPAGE 4-12% e visualizadas por nitrato de prata (A) e azul de comassie (B). A seta indica a presença de Cul1, purificada de células HEK293. Os asteriscos indicam as bandas do gel que foram recortadas para análise por espectrometria de massas (banda 1 e banda 2).

4.1.2- Modificações encontradas

As bandas 1 e 2 recortadas do gel corado com coomassie foram enviadas para análise de MS para identificar as proteínas presentes em cada banda do gel de SDS-poliacrilamida e, identificar possíveis sítios de fosforilação no complexo SCF1^{FBXO25}, comparando com o complexo SCF1^{FBXO25}, que foi tratado com PMA por trinta minutos antes da lise celular.

A proteína FBXO25 foi a principal proteína identificada nas bandas 1 e 2, com alto grau de confiança (em torno de 90%), (Anexo 1). Isso reforça nossos resultados comprovando que o processo de purificação dos complexos SCF1, por meio da imunoprecipitação e a eluição com o peptídeo 3xFLAG, foi eficiente.

Identificou-se na Banda 1 três potenciais sítios de fosforilação e na Banda 2 (provenientes de células tratadas com PMA) foram identificados dois potenciais sítios. No entanto, na Banda 1 o primeiro peptídeo modificado indica fosforilação apenas na Serina 138 (S138), enquanto na Banda 2 esse peptídeo aparece fosforilado também no resíduo de Treonina 137 (T137) (Figura 7).

A fim de se avaliar a importância desse sítio específico de fosforilação da FBXO25, que só é encontrado após o tratamento com PMA, decidimos mutar esse resíduo de T137 por um resíduo de Glicina, para posteriormente analisar se esse sítio específico é crucial para manter a função de FBXO25.

O processo de mutação consistiu, primeiramente, em uma reação de PCR utilizando-se o kit *Phusion Flash High Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Scientific), utilizando-se um gradiente de temperatura de 52-60 °C. Ao final da reação foi adicionado a enzima DPN1 para destruição do DNA metilado, e por fim bactérias competentes foram transformadas, e as

colônias crescidas submetidas a preparações plasmidiais em pequena escala. Em seguida, o DNA foi digerido com a enzima *PvuII* (Figura 8).

Apenas o mutante 2 (55°C), apresentou padrão diferenciado de digestão. Após o sequenciamento a mutação T137G foi confirmada (Anexo 2).

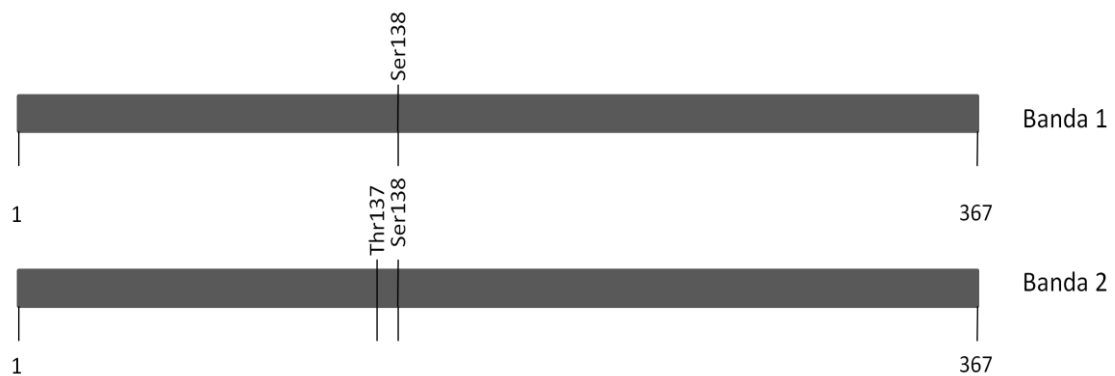


Figura 7: Representação esquemática dos sítios de fosforilação da FBXO25. A banda 1 representa o sítio de fosforilação da FBXO25, enquanto a banda 2 representa os sítios de fosforilação da FBXO25, quando tratada com PMA (pFBXO25), identificados por MS.

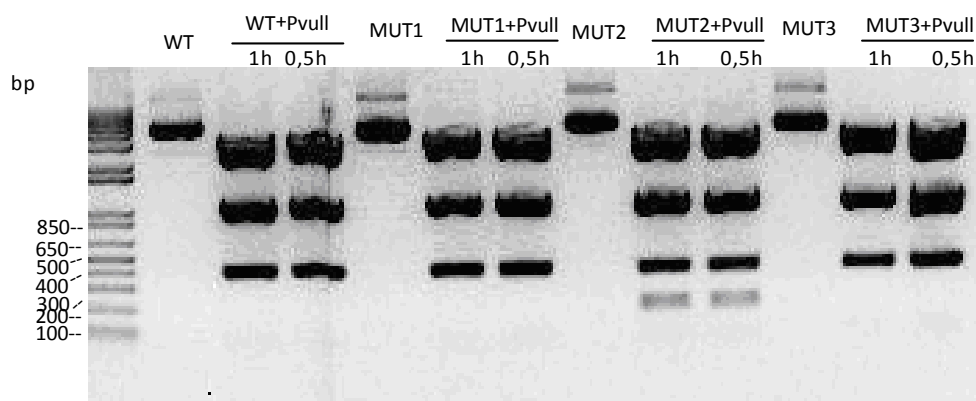


Figura 8: Clones submetidos a reação de digestão pela enzima *PvuII*. Clones derivados da reação de PCR, decorrente do gradiente de temperatura de anelamento dos *primers* (52-60° C). Linha 1- padrão de peso molecular; 2- Plasmídeo p295-3xFLAG-WT não digerido; 3- Plasmídeo p295-3xFLAG-WT digerido com *PvuII* por 1h; 4- Plasmídeo p295-3xFLAG-WT digerido com *PvuII* por 30 min; 5- p295-3xFLAG-WT Mut 1(52° C) não digerido; 6- p295-3xFLAG-WT Mut 1(52° C) digerido *PvuII* 1h; 7- p295-3xFLAG-WT Mut 1(52° C) digerido *PvuII* 30 min; 8- p295-3xFLAG-WT Mut 2 (55° C) não digerido; 9- p295-3xFLAG-WT Mut 2(55° C) digerido *PvuII* 1h; 10- p295-3xFLAG-WT Mut 2 (55° C) digerido *PvuII* 30 min; 11- p295-3xFLAG-WT Mut 3 (58° C) não digerido; 12- p295-3xFLAG-WT Mut 3 (58° C) digerido *PvuII* 1h; 13- p295-3xFLAG-WT Mut 3 (58° C) digerido *PvuII* 30 min.

4.1.3- Caracterização parcial da FBXO25 T137G

Resultados do nosso laboratório mostram que a superexpressão de FBXO25, leva a diminuição da fosforilação de ERK1/2 (pERK1/2) ⁴⁷. Assim, para avaliar a importância desse sítio de fosforilação, transfectamos células HEK293T, com os vetores pcDNA3.1, FBXO25 e o FBXO25 T137G. Após 47 horas de transfecção, as células foram tratadas com 100 nM de PMA por 0, 15 e 30 minutos, e o nível de pERK1/2 foi analisado por *western blotting*.

Foram utilizados anticorpos específicos contra a proteína ERK1/2 fosforilada (pERK1/2) e contra a ERK2, assim como contra GAPDH (Figura 9). Os resultados mostram que células HEK293 transfectadas com FBXO25 T137G apresentaram maior quantidade da proteína pERK1/2, comparada com os extratos controle (pcDNA3.1) e selvagem (FBXO25 WT). Com esses resultados demonstramos que esse sítio específico de fosforilação da FBXO25 pode ser crucial para regulação da fosforilação da ERK1/2, sugerindo sua participação na via de sinalização das MAPKs ⁴⁷.

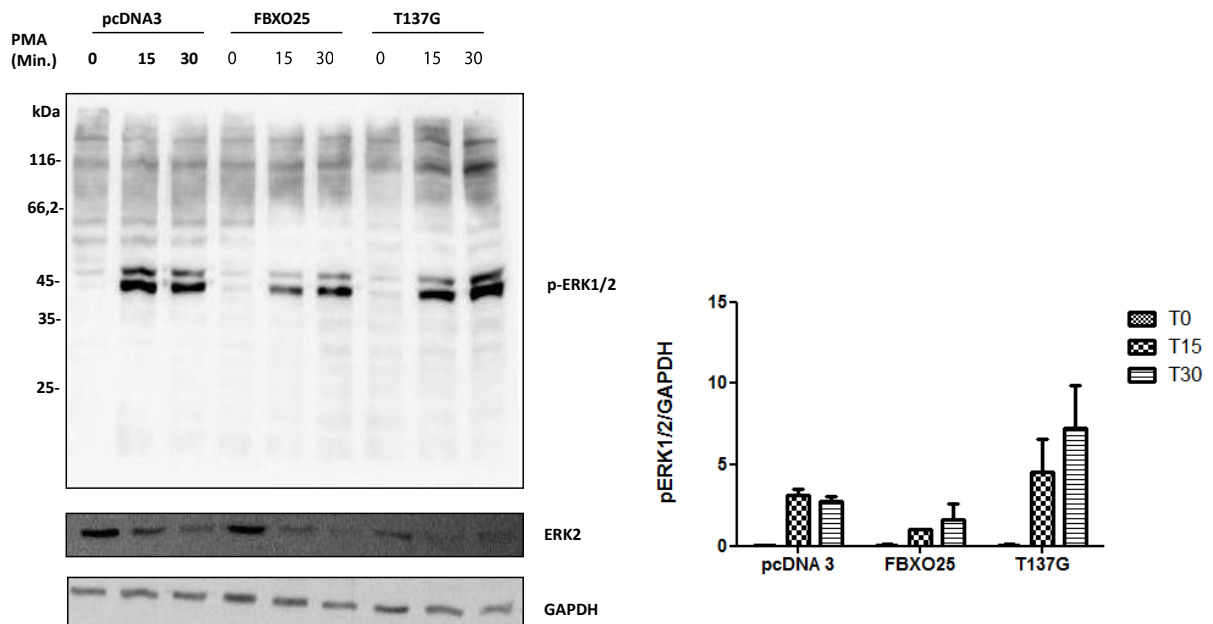


Figura 9: Lisados de células HEK 293 transfectadas transientemente com os vetores pcDNA 3, FBXO25 WT e FBXO25 mutante T137G. As células foram submetidas a privação de SFB, por 24hs após a transfecção. Após 22hs, as mesmas receberam tratamento com PMA por 0, 15 e 30 minutos. Em seguida, as células foram imediatamente submetidas a lise, e os extratos submetidos a SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana de nitrocelulose e revelada com anticorpo monoclonal pERK1/2.

4.1.4- Determinação da atividade dos complexos SCF1

Avaliamos a integridade/atividade do complexo SCF1 endógeno co-purificado com FBXO25, através de ensaios de ubiquitinação *in vitro* (Figura 10). Os complexos SCF1^{FBXO25} e SCF1^{pFBXO25}, co-purificados com FBXO25 selvagem (WT) mostraram-se ativos após a imunoprecipitação demonstrando um aumento dos arrastes de ubiquitinação quando utilizamos quantidades crescentes de complexos SCF. A amostra contendo o complexo SCF1^{FBXO25ΔF} não foi utilizada para os ensaios de ubiquitinação porque nos interessava apenas comparar a atividade dos complexos selvagens contendo FBXO25 e pFBXO25. No entanto, o complexo mutante nos será útil na etapa de validação dos alvos que forem encontrados, uma vez que ele funciona como dominante negativo em ensaios celulares e controle negativo em ubiquitinação *in vitro*⁴⁷.

A identificação dos componentes do complexo SCF1, FBXO25 e Cul1 e a obtenção desse complexo ativo após a imunoprecipitação, validam essa estratégia para purificação de complexos protéicos sob condições nativas a partir de células HEK293.

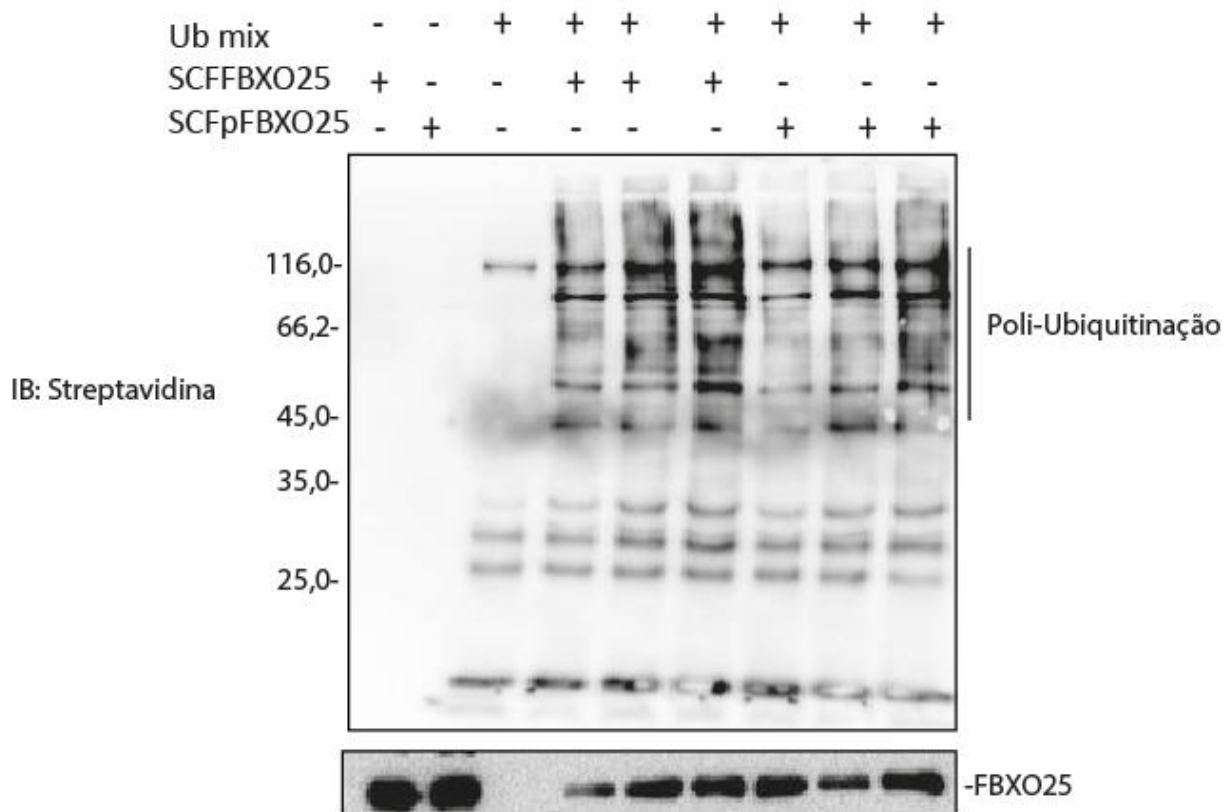


Figura 10: Atividade do complexo SCF co-purificado por imunoprecipitação. Células HEK293 foram transfectadas com FBXO25 selvagem WT. As linhas de 1 a 3 representam os controles negativos do experimento. Linha 1: SCF1 (FBXO25); linha 2: SCF1 (FBXO25+PMA); linha 3: ub mix. As linhas de 4 a 6 representam a ubiquitinação do complexo SCF1 (FBXO25) com concentrações crescentes do complexo, juntamente com ub mix: linha 4: 5nM de complexo, linha 5: 10 nM de complexo e linha 6 com 20 nM de complexo. Já as linhas de 7 a 9 correspondem a ubiquitinação do complexo SCF1 (FBO25+PMA), também em concentrações crescentes de complexo, junto com ub mix. Linha 7: 5 nM de complexo; linha 8 com 10 nM de complexo e linha 9 com 20 nM de complexo.

4.2- Ubiquitanação nos Protoarrays

4.2.1- Identificação dos substratos

Para identificar candidatos a substrato de FBXO25, utilizamos Protoarrays humanos como alvo e os complexos SCF1^{FBXO25} e SCF1^{pFBXO25} purificados como fontes de E3 ligases. Os Protoarrays são uma tecnologia refinada como descrito anteriormente⁴¹, contém mais de 8.000 proteínas únicas (*fulllength*) em duplicata, o que corresponde a boa parte o proteoma humano.

Realizamos a busca por substratos utilizando quatro lâminas de Protoarrays da seguinte forma: Dois contendo o complexo SCF1^{FBXO25} tipo selvagem (WT) e dois contendo o complexo SCF1^{pFBXO25} (Figura 11). No primeiro ensaio para o complexo SCF1^{FBXO25}, identificamos 416 substratos, enquanto que no segundo ensaio, 510 foram identificados. Porém, desse total de 926 substratos identificados, apenas 258 repetiram nos dois experimentos, sendo, portanto os substratos considerados. Para o complexo SCF1^{pFBXO25}, no entanto, identificamos 267 substratos no primeiro ensaio, 434 no segundo, mas apenas 193, de um total de 701, foram reprodutíveis considerando esses dois experimentos. Por fim, utilizando os critérios estatísticos descritos em “Materiais e métodos” identificamos 122 substratos de FBXO25 (Anexo 1), que consistem da soma dos substratos que foram reprodutíveis utilizando o SCF1^{FBXO25} e SCF1^{pFBXO25}, que apareceram em ambos os experimentos. Essas proteínas identificadas foram agrupadas de acordo com as suas funções biológicas, sendo grande parte delas (22%) proteínas autofosforiladas e 8% proteínas envolvidas na via das MAPKS (Figura 12).

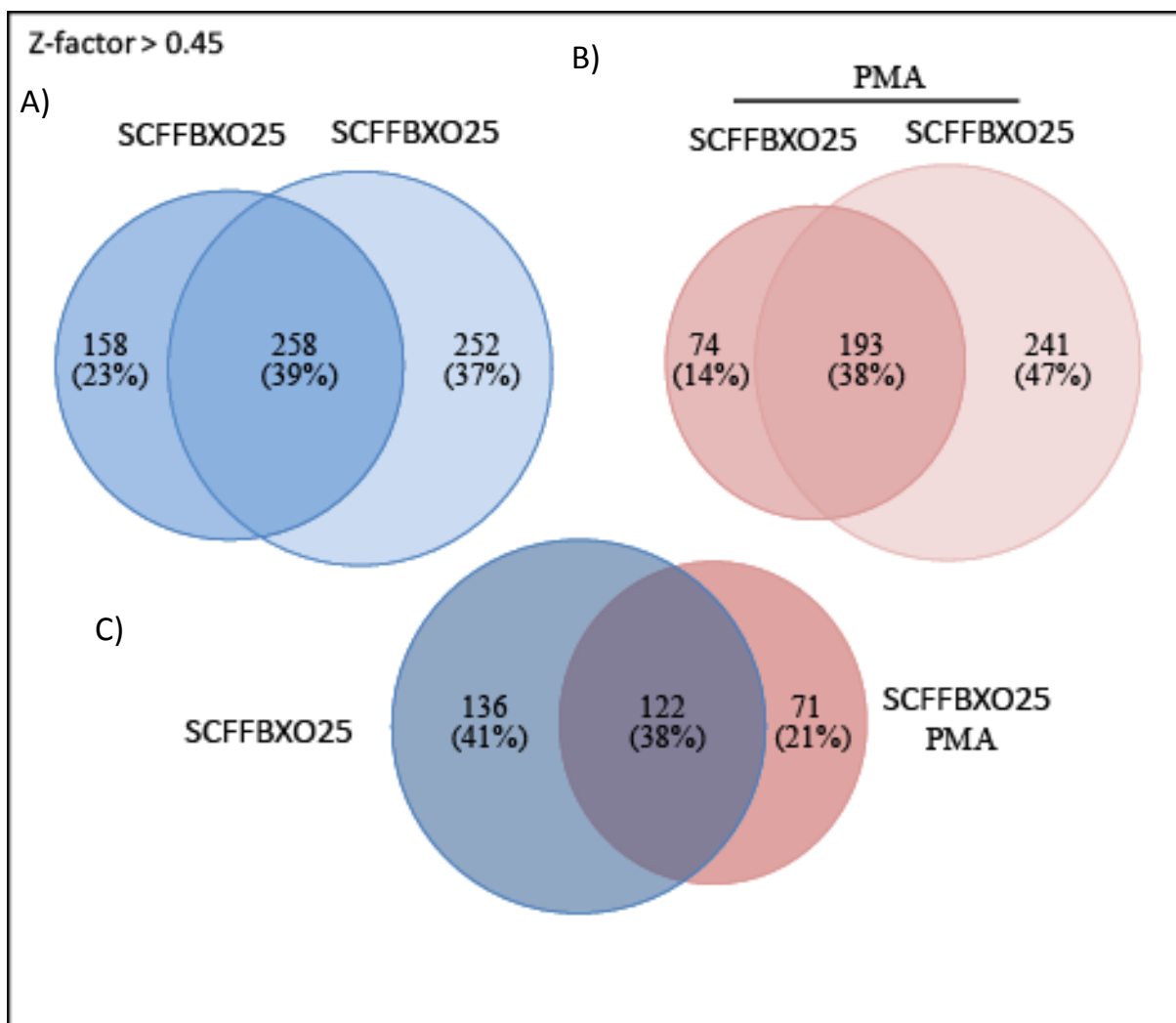


Figura 11: Diagrama de Venn representando a quantidade de proteínas ubiquitinadas em cada ensaio pelo complexo $SCF1^{FBXO25}$ e $SCF1^{pFBXO25}$. A) Diagrama de Venn ilustrando as proteínas ubiquitinadas pelo Complexo $SCF1^{FBXO25}$ nos dois ensaios; B) Diagrama de Venn ilustrando as proteínas ubiquitinadas pelo Complexo $SCF1^{pFBXO25}$ nos dois ensaios; C) Diagrama representando a interseção das proteínas que foram ubiquitinadas por ambos os complexos, alvo do nosso estudo.

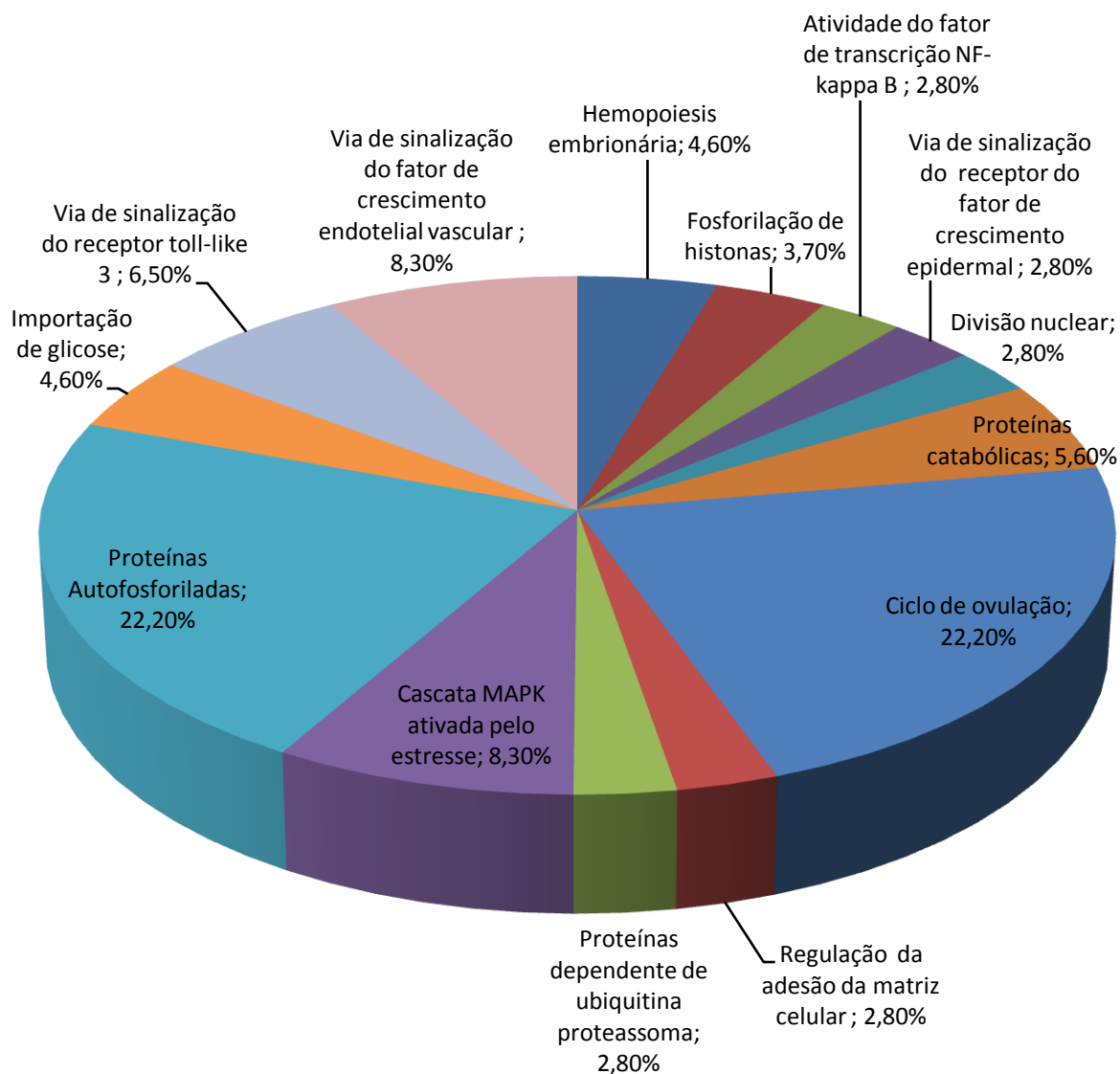


Figura 12: Classificação das proteínas identificadas de acordo com suas funções nas células. As 122 proteínas foram agrupadas 14 diferentes classes: proteínas da cascata MAPK, proteínas que são autofosforiladas, proteínas que são degradadas via ubiquitina proteassoma, envolvidas com o fator de transcrição NF-kappaB, e outras.

Do total de proteínas identificadas, 96 (78,6%), apresentaram maior sinal de ubiquitinação quando a FBXO25 encontrava-se fosforilada ($SCF1^{pFBXO25}$), indicando que a mudança estrutural causada pela adição de grupamentos fosfato a FBXO25 pode ter causado um aumento na sua capacidade de ubiquitinar seus substratos.

4.2.2- Substratos selecionados

Dados recentes do nosso laboratório mostram que a superexpressão de FBXO25 causava uma diminuição drástica da fosforilação de ERK1/2, sugerindo a participação da proteína FBXO25 na via de sinalização das MAPKs ⁴⁷.

Identificamos substratos que foram ubiquitinados apenas pelo complexo $SCF1^{pFBXO25}$ (Anexo 3) nos experimentos com os Protoarrays, mas como o nosso objetivo era comparar o complexo fosforilado com o complexo em seu estado nativo, buscamos por proteínas que fossem ubiquitinadas por ambos os complexos, mas que apresentassem maior nível de ubiquitinação nos complexos contendo pFBXO25.

Obedecendo a esses requisitos, as proteínas escolhidas foram a MAPK3K, a MAP3K9 e a PRKCI (Figura 13).

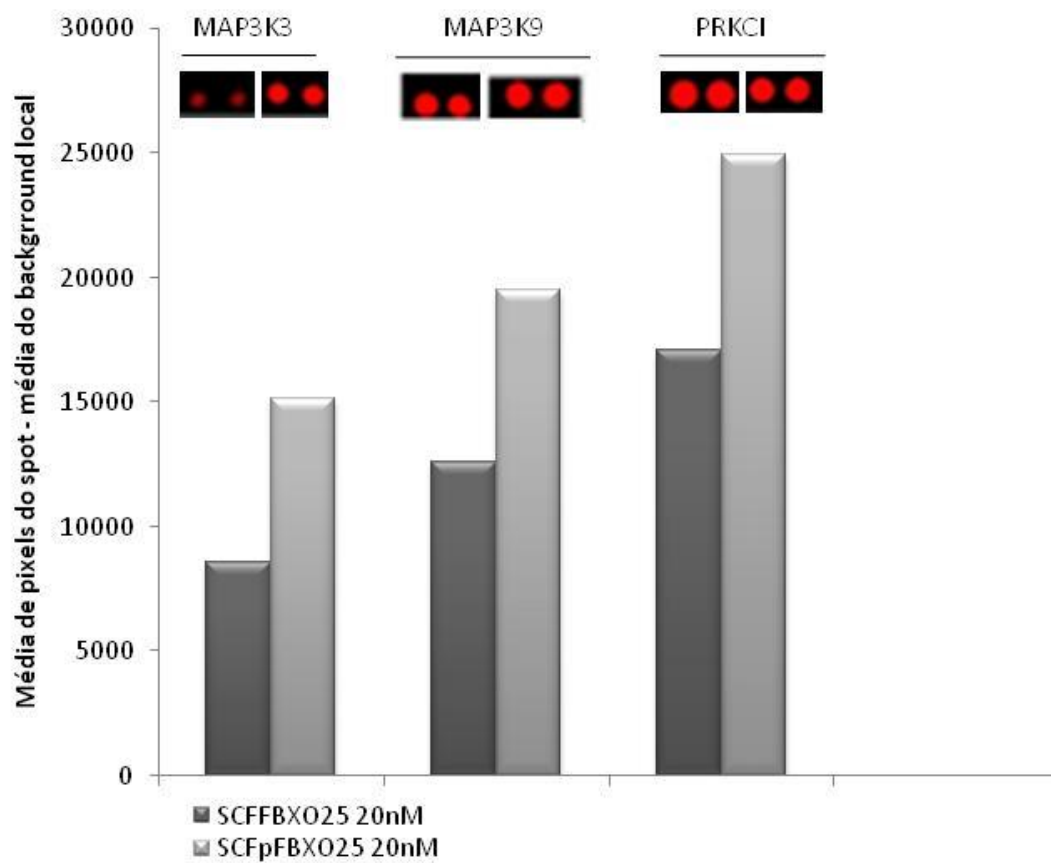


Figura 13: Substratos selecionados para o estudo. Foram utilizadas lâminas de Protoarrays e os complexos purificados SCF^{FBXO25} e SCF^{pFBXO25} como fontes de E3 ligase. Os *spots* foram analisados e os alvos escolhidos.

5- DISCUSSÃO

A fosforilação e ubiquitinação de proteínas são duas das modificações pós-traducionais mais comuns em proteomas eucarióticos e são essenciais para todos os processos celulares⁵⁰. A fosforilação é o mecanismo primário para a regulação da sinalização celular, enquanto a ubiquitinação regula a degradação protéica. Estas duas modificações pós-traducionais estão interligadas, uma vez que a fosforilação pode promover ou inibir a ubiquitinação, que por sua vez regula degradação proteossomal, processamento ou tráfico intracelular de proteínas de membrana⁵¹.

As proteínas quinases catalisam a fosforilação reversível de uma grande quantidade de proteínas celulares, por modificação de sua atividade e regulação de uma grande variedade de processos celulares⁵². A proteína ERK1/2 é um membro importante da família MAPK e aumenta a tradução de proteínas através da fosforilação. ERK1/2 fosforilada (pERK1/2) é ativada por ERK1/2, e participa da regulação de vários caminhos fisiológicos e patológicos, tais como diferenciação celular, proliferação e apoptose⁵³.

Nesse trabalho, descrevemos a purificação de complexos SCF1 (SCF1^{FBXO25}, SCF1^{pFBXO25} e SCF1^{FBXO25ΔF}) de células HEK293 por meio da técnica de imunoprecipitação e assim conseguimos obter esses complexos ativos^{27,54}. Demonstramos a eficiência dessa técnica de purificação através da confirmação dos componentes dos complexos SCF1 nas frações eluídas. É importante destacar a presença majoritária de FBXO25 nessas frações, comprovando o enriquecimento da amostra e dando suporte a veracidade das interações observadas. Em relação à atividade dos complexos SCF1^{FBXO25} e SCF1^{pFBXO25}, vimos que eles não apresentaram diferença de atividade nos ensaios de ubiquitinação *in vitro*, mostrando

que o tratamento com PMA não interferiu na capacidade de auto-ubiquitinação do complexo.

O PMA (12-miristato 13-acetato) age como promotor de tumor e modula diversas respostas celulares, tais como a transcrição gênica, crescimento e diferenciação celular, a morte celular programada, a resposta imunológica, e a dessensibilização do receptor através da proteína quinase C (PKC) e vias de sinalização. O PMA possui estrutura que mimetiza o diacilglicerol (DAG), ativador de PKC endógena, e que por isso tem sido usado como um agente de modelo para estudar os mecanismos utilizados pelos fatores de crescimento, hormônios, citocinas, além de regular o crescimento e diferenciação celular ⁵⁵. Após o tratamento de células HEK293 com PMA, identificamos na FBXO25, por espectrometria de massas, um novo sítio de fosforilação na T137 que até então não havia sido demonstrado. Outro sítio de fosforilação já identificado na FBXO25 é na S178, quando a FBXO25 é tratada com o indutor de apoptose etoposídeo ⁵⁶.

Decidimos mutar esse resíduo de T137 para um resíduo de glicina e avaliar a importância desse sítio para função da FBXO25. Nosso laboratório mostrou que a FBXO25 diminui os níveis de fosforilação da proteína ERK1/2 por um mecanismo ainda não conhecido ⁴⁷, portanto saber se essa mutação tem algum efeito sobre essa função já identificada, era crucial para continuação dos nossos estudos. Transfectamos células HEK293T com FBXO25, FBXO25 T137G ou pcDNA3 como controle negativo do experimento. Interessantemente, o mutante T137G apresentou maior quantidade da proteína ERK1/2 fosforilada comparada tanto com o controle pcDNA3, quanto com a FBXO25 selvagem. Curiosamente, a expressão da proteína ERK2 diminui drasticamente, com o tratamento com PMA, porém esse é um efeito independente da FBXO25, uma vez que essa diminuição

também ocorre em relação ao controle, e que mesmo com essa diminuição dos valores da ERK 2, tem-se ainda um aumento dos níveis de fosforilação de ERK1/2. Esses dados reforçam a importância desse sítio específico de fosforilação da FBXO25, porém ainda não nos ajuda a explicar como a FBXO25 age na redução dos níveis de pERK1/2, se é impedindo sua fosforilação, ou ativando sua defosforilação.

A FBXO25, embora com algumas funções definidas, ainda não apresenta muitos substratos identificados. A ubiquitinação de proteínas *in chips* é uma estratégia inovadora, uma vez que permite a identificação de um grande número de proteínas alvo em um único ensaio. Além disso, permite a identificação direta de substratos sem a prévia necessidade de identificar ligantes por ensaios de interação proteína-proteína^{41,42}. Nosso laboratório foi pioneiro na utilização dessa tecnologia no Brasil identificando 75 substratos de SCF(FBXO25) com alto grau de confiabilidade. Identificamos e validamos a proteína ELK-1 como substrato de FBXO25⁴⁷. ELK-1 é um fator de transcrição que desempenha um papel importante na indução da expressão gênica em resposta a um sinal extracelular⁵⁴. Demonstramos que FBXO25 medeia a ubiquitinação e degradação de ELK-1 através do sistema ubiquitina proteassoma em células HEK293T. Como validação desse processo, demonstramos que a superexpressão de FBXO25 suprimiu a expressão de dois genes alvos de ELK-1, *c-fos* e *Egr-1*⁴⁷.

Nos nossos ensaios utilizando os complexos SCF^{FBXO25} e SCF^{FBXO25+PMA} identificamos 122 substratos ubiquitinados em ambos os complexos. Eles foram agrupados em categorias de acordo com suas funções celulares destacando as envolvidas na via de sinalização das MAPKs, proteínas relacionadas ao SUP, proteínas autofosforiladas, entre outras.

Selecionamos para posteriores estudos as três proteínas que foram *hits* nos 4 arrays, envolvidas na via de sinalização MAPK ERK1/2, sendo elas: MAP3K3, MAP3K9 e PRKCI.

A MAP3K3 (*Mitogen-Activated Protein kinase kinase kinase 3*) é uma proteína ativada por mitógeno quinase quinase quinase (MAP3K) pertencente a família de Ser/Thr quinases. A MAP3K3 pode ativar eficazmente a via de sinalização MEK/ERK⁵⁷, e foi ubiquitinada mais fortemente pelo complexo SCF^{pFBXO25}, sugerindo uma possível explicação para diminuição da fosforilação da proteína pERK1/2 na presença de FBXO25.

A MAP3K9 também é uma proteína ativada por mitógeno (MAP3K), e também possui um domínio Ser/Thr quinase e é diretamente relacionada com a ativação da cascata de sinalização MAPK/ERK. Assim como a MAP3K3, a MAP3K9 pode estar relacionado a diminuição da fosforilação de pERK1/2, quando FBXO25 é superexpressa uma vez que MAP3K9 é um ativador *upstream* das vias de ERK1/2 e JNK^{58,59}.

Como uma subclasse estrutural e funcionalmente distinta da família das PKCs, a PRKCI, é classificada como uma PKC atípica, exibindo atividade enzimática basal elevada e não é regulada por diacilglicerol, fosfatidilserina, ésteres de forbol ou íons cálcio. Esta proteína está envolvida em múltiplas vias de sinalização em diferentes aspectos fenotípicos incluindo o crescimento, invasão e quimioresistência que determinam a sobrevivência de células tumorais⁶⁰. A atividade dessa PKC no entanto, é regulada *in vivo* e *in vitro*, por quinases dependentes de fosfoinositida (PDK1)⁶¹ e é indispensável para a sinalização Ras oncogênica. A proteína Ras é um ativador *upstream* da via de sinalização de ERK1/2, e também é um importante ponto de regulação dessa via, por isso a escolha dessa PKC, uma vez que também é degradada quando FBXO25 é superexpressa. Outro ponto importante é que a amplificação e a superexpressão de PRKCI já foi descrito em carcinomas de ovário,

câncer de pulmão, e esôfago⁶²⁻⁶⁵, demonstrando sua participação na via de ERK1/2 envolvida na proliferação celular.

Curiosamente as proteínas selecionadas apresentaram maior sinal de ubiquitinação quando utilizamos complexos SCF^{pFBXO25} provenientes de células tratadas com PMA, indicando que essa fosforilação em FBXO25 pode ser importante para o reconhecimento dos seus substratos. Além do papel de regular a proteína F-box, a fosforilação também regula a função dos substratos, uma vez que muitos deles são reconhecidos pelos SCFs após sua fosforilação⁶⁶⁻⁶⁸.

Em resumo, nesse trabalho conseguimos purificar complexos SCF1 (FBXO25) ativos, por imunoprecipitação, além de identificarmos um novo sítio de fosforilação (T137) na proteína FBXO25 quando o complexo SCF1 é tratado com PMA. A relevância funcional desse mutante T137G foi demonstrada com um efeito oposto ao da forma selvagem de FBXO25, aumentando os níveis de ERK1/2 fosforilada. Utilizando os *Protoarrays*, identificamos 122 potenciais substratos de FBXO25 e selecionamos apenas os envolvidos na via MAPK/ERK1/2 que apresentaram níveis de ubiquitinação maiores no complexo SCF1^{pFBXO25}. Mais estudos precisam ser feitos para validação desses alvos como substratos da FBXO25, assim como ensaios de localização celular, ensaios utilizando anticorpos específicos contra essas proteínas e avaliar o perfil de degradação das mesmas. Novos estudos bioquímicos precisam ser feitos para validação dessa fosforilação *in vitro* e *in vivo* da FBXO25.

6- CONCLUSÕES

- A purificação dos complexos SCF1(SCF1^{FBXO25}, SCF1^{pFBXO25} e SCF1^{FBXO25ΔF}), ocorreu de maneira eficiente, uma vez que as proteínas Cul1 e FBXO25 foram copurificadas, caracterizando a formação do complexo SCF1 ativo;
- Nossos resultados preliminares nos mostram que sítio de fosforilação da FBXO25 (T137) pode ser importante para função da FBXO25 na diminuição da pERK1/2;
- Os Protoarrays funcionaram como estratégia de identificação de substratos de FBXO25, uma vez que identificamos 122 substratos;
- O complexo SCF1^{pFBXO25} comparado ao complexo SCF1^{FBXO25}, apresentou proteínas com maior perfil de ubiquitinação, sugerindo uma mudança no padrão de reconhecimento dos substratos ubiquitinados por esses complexos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Glickman, M. H., and Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Nat. Rev.* 82, p. 373–428 (2002).
- 2- Ciechanover, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell* v.6, n.1, Jan, p. 79-87 (2005).
- 3- Bingol, B., and Sheng, M. Deconstruction for reconstruction: the role of proteolysis in neural plasticity and disease. *Neuron*, v.69, p. 22–32 (2011).
- 4- Fernandez-Saiz V, Targosz BS, Lemeer S, Eichner R, Langer C, Bullinger L, Reiter C, Slotta-Huspenina J, Schroeder S, Knorn AM, Kurutz J, Peschel C, Pagano M, *et al.* SCFFbxo9 and CK2 direct the cellular response to growth factor withdrawal via Tel2/Tti1 degradation and promote survival in multiple myeloma. *Nat Cell Biol.* ; v.15, n.1, p.72-81, (2013).
- 5- Vierstra, R. D. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.* v. 8, p. 135–142 (2003).
- 6- Sullivan, James A., Shirasu, Ken & Deng, Xing Wang. The diverse roles of ubiquitin and 26S proteasome in the life of plants *Nature Reviews Genetics* v.4, p. 948-958 (2003)
- 7- Skowyra, D., Craig, K. L., Tyres, M., Elledge, S. J., & Harper, J. W. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* v.91, p. 209-219 (1997).
- 8- Pickart, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Ann. Rev. Biochem.* v. 70, p. 503–533 (2001).
- 9- L. Jia; Y. San. SCF E3 Ubiquitin ligases as anticancer targets. *Curr Cancer Drug Targets.* Mar ; v.11, n.3; p. 347–356 (2011).
- 10- Cenciarelli, C., et al. Identification of a family of human F-box proteins. *Curr Biol.* V.9, p. 1177-1179 (1999).
- 11- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ. 1996 SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* v. 86, p. 263–274 (1996).

- 12- Weissman, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* v. 2, p. 169-178 (2001).
- 13- Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., and Varshavsky, A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* v. 243, p. 1576-1583 (1989).
- 14- Hershko, A., and Ciechanover, A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* v. 61, p. 761-807 (1992).
- 15- Nishikawa, H., Ooka, S., Sato, K., Arima, K., Okamoto, J., Klevit, R. E., Fukuda, M., and Ohta, T. Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* v. 279, p. 3916-3924 (2004)
- 16- Chastagner, P., Israel, A., and Brou, C. Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep* v. 7, p. 1147-1153 (2006).
- 17- Arnason, T., and Ellison, M. J. Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol* v. 14, p. 7876-7883 (1994).
- 18- Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L., and Finley, D. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* v. 15, p. 1265-1273 (1995).
- 19- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* v. 103, p. 351-36 (2000)
- 20- Sato, Y.; Yoshikawa, A.; Yamagata, A.; Mimura, H.; Yamashita, M.; Ookata, K.; Nureki, O.; Iwai, K.; Komada, M. and Fukai, S. Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature*; v.455, p. 358-363 (2008).
- 21- Hochstrasser, M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*; v. 458, p. 422-429 (2009).
- 22- Jin, J., *et al.* Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* v.18, p. 2573-2580 (2004).

- 23- Yumimoto K, Akiyoshi S, Ueo H, Sagara Y, Onoyama I, Ueo H, Ohno S, Mori M, Mimori K, Nakayama KI, F-box protein FBXW7 inhibits cancer metastasis in a non-cell-autonomous manner *J Clin Invest.* Jan v.2; p. 78782 (2014).
- 24- Viñas-Castells R, Frías Á, Robles-Lanuza E, Zhang K, Longmore GD, García de Herreros A, Díaz VM Nuclear ubiquitination by FBXL5 modulates Snail1 DNA binding and stability. *Nucleic Acids Res.*;v.42; n.2; p.1079-94. (2014).
- 25- Baldelli S, Aquilano K, Ciriolo MR. PGC-1 α buffers ROS-mediated removal of mitochondria during myogenesis; *Cell Death Dis.* v.6; n.5; p.1515 (2014).
- 26- Cardozo, T. & Pagano, M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* v. 5, p. 739-751 (2004)
- 27- Maragno, A.L., Baqui, M. M. & Gomes, M. D. FBXO25, an F-box homologue of atrogin-1, is not induced in atrophying muscle. *Biochim Biophys Acta* v.1760, p. 966-972, (2006).
- 28- Hagens, O., Minina, E., Schweiger, S., Ropers, H. H. & Kalscheuer, V. Characterization of FBX25, encoding a novel brain-expressed F-box protein. *Biochim Biophys Acta* v.1760, p. 110-118, (2006).
- 29- Winston, J. T., Koepp, D. M., Zhu, C., Elledge, S. J. & Harper, J. W. A family of mammalian F-box proteins. *Curr Biol*, v.9, p. 1180-1182, (1999).
- 30- Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A. & Goldberg, A.L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* v.98, p. 14440-14445 (2001).
- 31- Bodine, S.C., *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* v. 294, p. 1704-1708 (2001).
- 32- 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, p. 966-972 (2006).
- 33- Manfiolli, A.O., *et al.* FBXO25-associated nuclear domains: a novel subnuclear structure. *Mol Biol Cell* v.19, p. 1848-1861 (2008).
- 34- Gonda, K., *et al.* Reversible disassembly of somatic nucleoli by the germ cell proteins FRGY2a and FRGY2b. *Nat Cell Biol* v. 5, p. 205-210 (2003).
- 35- Andersen, J.S., *et al.* Nucleolar proteome dynamics. *Nature* v. 433, p. 77-83 (2005)

- 36- Zhong, S., Salomoni, P. & Pandolfi, P.P. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* v. 2, p. E85-90 (2000).
- 37- Lafarga, M., *et al.* Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol Biol Cell* v.13, p. 2771-2782 (2002).
- 38- Gonda, K., *et al.* Reversible disassembly of somatic nucleoli by the germ cell proteins FRGY2a and FRGY2b. *Nat Cell Biol* v. 5, p. 205-210 (2003).
- 39- Teixeira, F.R., *et al.* Identification of FBXO25-interacting proteins using an integrated proteomics approach. *Proteomics* v. 10, p. 2746-2757 (2010).
- 40- Hofmann, W.A., *et al.* Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* v. 6, p. 1094-1101 (2004).
- 41- Zhu, H., *et al.* Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* v. 293, p. 2101-2105 (2001).
- 42- Phizicky, E., Bastiaens, P.I., Zhu, H., Snyder, M. & Fields, S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* v.422, p.208-215 (2003).
- 43- Lu, J.Y., *et al.* Functional dissection of a HECT ubiquitin E3 ligase. *Mol Cell Proteomics* v. 7, p. 35-45 (2008).
- 44- Persaud, A., *et al.* Comparison of substrate specificity of the ubiquitin ligases Nedd4 and Nedd4-2 using proteome arrays. *Mol Syst Biol* v. 5, p. 333 (2009).
- 45- Merbl, Y. & Kirschner, M.W. Large-scale detection of ubiquitination substrates using cell extracts and protein microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* v. 106, p. 2543-2548 (2009).
- 46- Andrews, P.S., *et al.* Identification of substrates of SMURF1 ubiquitin ligase activity utilizing protein microarrays. *Assay Drug Dev Technol* v. 8, p. 471-487 (2010).
- 47- Teixeira, Felipe R.; Manfiolli, Adriana O.; Soares, Cláudia S.; Baqui, Munira M. A.; Koide, Tie; Gomes, Marcelo D. The F-box Protein FBXO25 Promotes the Proteasome dependent Degradation of ELK-1 Protein. *Journal of Biological Chemistry* V. 288, p.28152–28162 (2013).
- 48- . Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.*v. 72, p. 248 (1976).
- 49- Bodine, S.C., *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, v. 297, p. 1704-1708, (2001).

- 50- Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N.J. 568 and Villen, J. Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation 569 cross-talk in protein degradation. *Nat Methods*, v.10,p. 676-682 (2013).
- 51- Hunter, T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. 481 *Mol Cell*, v. 28,p. 730-738 (2007).
- 52- Seger, R., Krebs, E. G. The MAPK signaling cascade. *Faseb Journal*, v.9, p. 726-735 (1995).
- 53- Eiji Tahara, Humam Kadara, Ludovic Lacroix, Dafna Lotan & Reuben Lotan Activation of Protein Kinase C by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate suppresses the growth of lung cancer cells through KLF6 induction, *Cancer Biology & Therapy*, v. 8:9, p. 801-807 (2009).
- 54- Gille, H., Sharrocks, A. D., and Shaw, P. E. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at *c-fos* promoter. *Nature* v. 358, p. 414–417 (1992).
- 55- Chang MS, Chen BC, Yu MT, Sheu JR, Chen TF, Lin CH. Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-kappaB, but not p38 MAPK, pathways. *CellSignal*. V. 3 p. 299-310 (2005).
- 56- Baumann, U., et al. Disruption of the PRKCD–FBXO25–HAX-1 axis attenuates the apoptotic response and drives lymphomagenesis *Nature Medicine*; v. 20, p. 1401-1409 (2014)
- 57- Teixeira, F.R., et al. Identification of FBXO25-interacting proteins using an integrated proteomics approach. *Proteomics* v.10, p. 2746-2757 (2010).
- 58- Chen L, Shi Y, Jiang CY, et al Expression and prognostic role of pan-Ras, Raf-1, pMEK1 and pERK1/2 in patients with hepatocellular carcinoma. *EJSO*, v.37, p. 513-20 (2011).
- 59- Qi Chen, Hong-sheng Lu, Mei-fu Gan, Lan-xi Chen, Kai He, Guang-min Fan, Xue-quan Cao. Expression and Prognostic Role of MEKK3 and pERK in Patients with Renal Clear Cell Carcinoma . *Asian Pac J Cancer Prev*, v.16 (6),p. 2495-2499 (2015).
- 60- Kant S, et al. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho familyGTPase signaling pathway. *Genes Dev* v.25(19), p. 2069–2078.(2011).

- 61- Fawdara S, et al. Targeted genetic dependency screen facilitates identification of actionable mutations in FGFR4, MAP3K9, and PAK5 in lung cancer. *PNAS*, v 110, p. 12426–12431, (2013).
- 62- Qiaoxin Li, et al. Two Novel PRKCI Polymorphisms and Prostate Cancer Risk in an Eastern Chinese Han Population. *Molecular Carcinogenesis*, (2014).
- 63- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*; v. 281, p. 2042–2045 (1998).
- 64- Fields AP, Regala RP. Protein kinase C iota: Human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacol Res*;v. 55, p. 487–497 (2007).
- 65- Regala RP, Davis RK, Kunz A, Khor A, Leitges M, Fields AP. Atypical protein kinase C is required for bronchioalveolar stem cell expansion and lung tumorigenesis. *Cancer Res*; v. 69, p. 7603–7611 (2009).
- 66- Zhang L, Huang J, Yang N, et al. Integrative genomic analysis of protein kinase C (PKC) family identifies PKC iota as a biomarker and potential oncogene in ovarian carcinoma. *Cancer Res*; v. 66, p. 4627–4635 (2006).
- 67- Petroski, M.D. & Deshaies, R.J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 6, p. 9–20 (2005).
- 68- Fernández-Sáiz, V. et al. SCF-Fbxo9 and CK2 direct the cellular response to growth factor withdrawal via Tel2/Tti1 degradation and promote survival in multiple myeloma. *Nat. Cell Biol.* V.15, p. 72–81 (2013).

ANEXO 1

Modificações encontradas

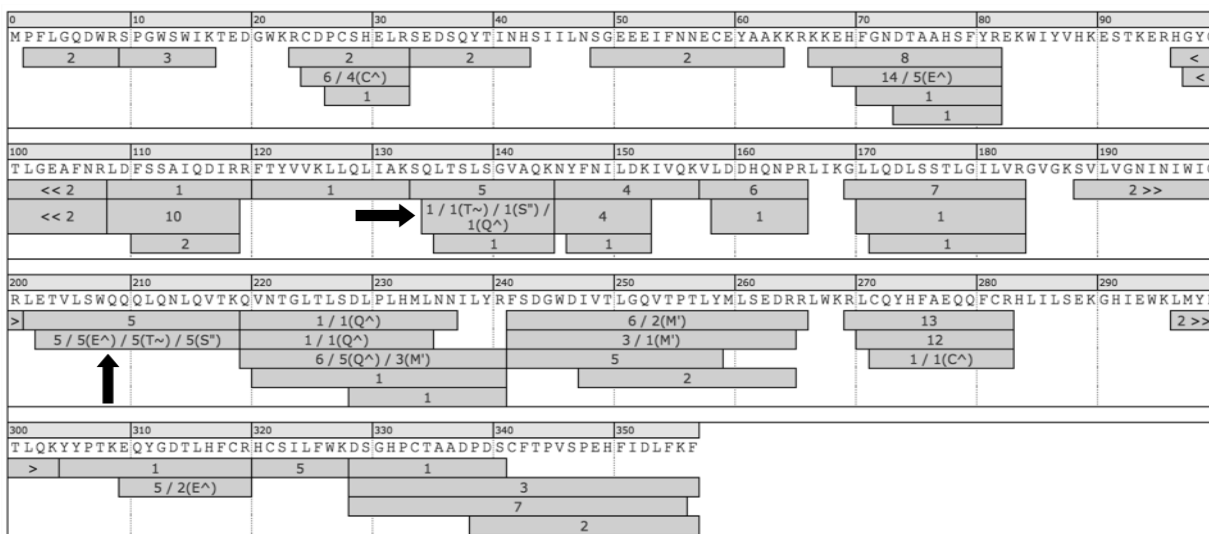
sp|Q9D2Y6|FBX25_MOUSE

Run SF112614_120314_S20_O1_2.pep.xml - @files/SF112614_120314_S20_O1_2 (Mouse_phospho)

Sequence Mass 41,826

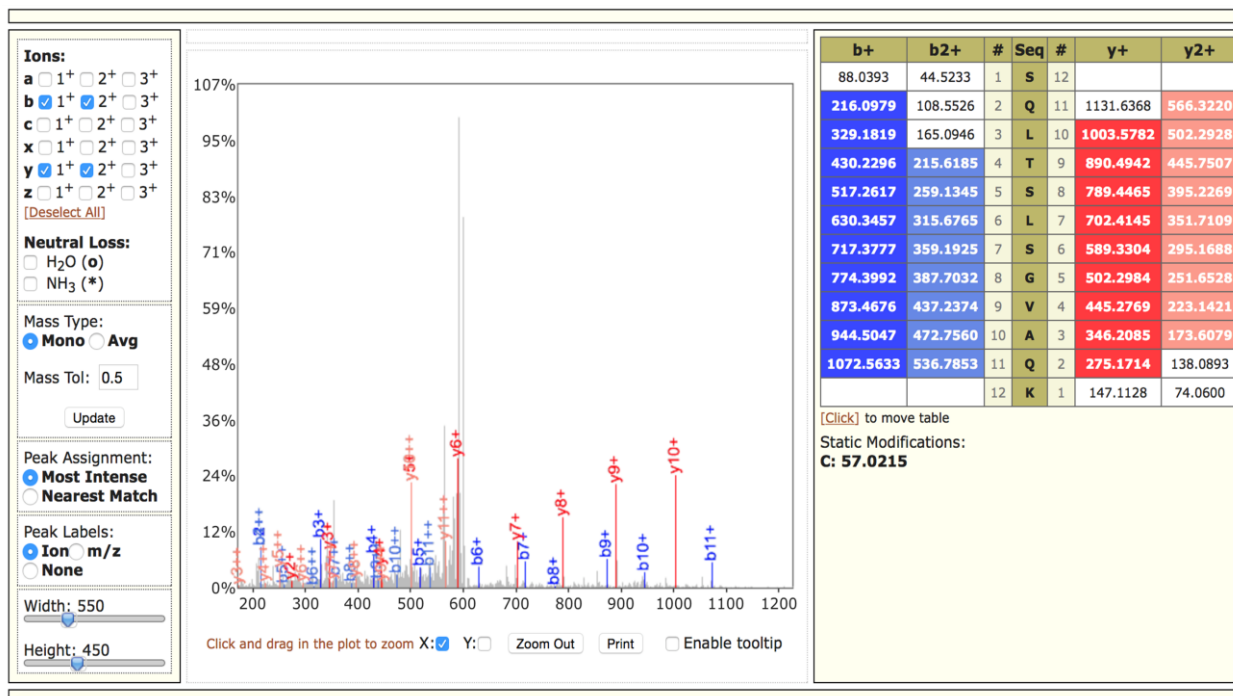
AA Coverage 86% (306 / 357)

Mass Coverage 85% (35,624 / 41,826)



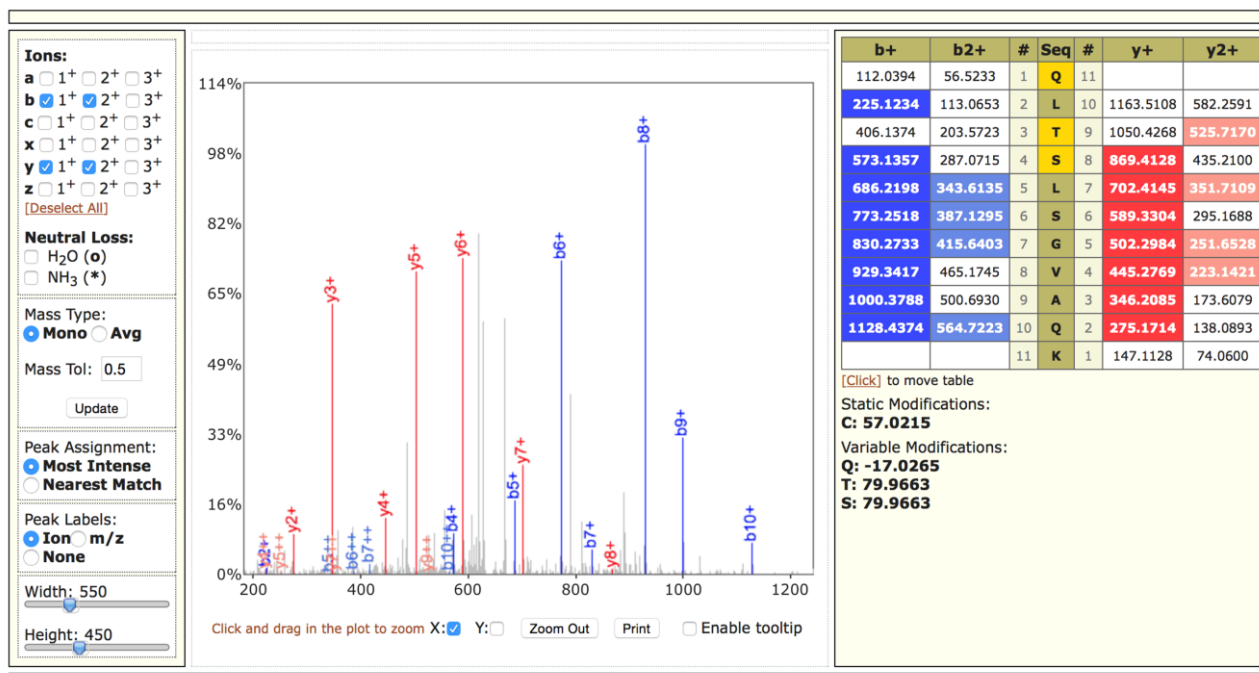
Peptídeos identificados Banda 1: Não fosforilado

K.SQLTSLSGVAQK.N



Peptídeos identificados: Banda 2 → Fosforilação em T137 e S138

S.Q¹LT[~]S["]LSGVAQK.N



ANEXO 2

Seqüenciamento mutante T137G

Primer T7

Query: FBXO25

Subject: FBXO25 T137G

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Mus musculus F-box protein 25 (Fbxo25), mRNA	1550	1550	100%	0.0	99%	NM_025785.2
<input type="checkbox"/>	Mus musculus F-box protein 25, mRNA (cDNA clone MGC:25973 IMAGE:4240953), complete	1550	1550	100%	0.0	99%	BC014749.1
<input type="checkbox"/>	Mus musculus adult male cecum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:913001510	1550	1550	100%	0.0	99%	AK018626.1
<input type="checkbox"/>	Mus musculus adult male small intestine cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:20	1544	1544	100%	0.0	99%	AK008027.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Mus musculus F-box protein 25 (Fbxo25), transcript variant X3, mRNA	1432	1432	92%	0.0	99%	XM_011242071.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Mus musculus F-box protein 25 (Fbxo25), transcript variant X1, mRNA	1426	1426	100%	0.0	96%	XM_006508854.2
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Mus musculus F-box protein 25 (Fbxo25), transcript variant X2, mRNA	1406	1406	100%	0.0	96%	XM_006508855.1
<input type="checkbox"/>	Mus musculus adult male medulla oblongata cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:	1400	1400	100%	0.0	96%	AK134722.1
<input type="checkbox"/>	Rattus norvegicus F-box protein 25 (Fbxo25), mRNA	1177	1177	99%	0.0	92%	NM_001014239.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Cricetulus griseus F-box protein 25 (Fbxo25), transcript variant X2, mRNA	1109	1109	99%	0.0	90%	XM_007615911.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Cricetulus griseus F-box protein 25 (Fbxo25), transcript variant X1, mRNA	1109	1109	99%	0.0	90%	XM_007615904.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Cricetulus griseus F-box protein 25 (Fbxo25), transcript variant X2, mRNA	1103	1103	99%	0.0	90%	XM_007632247.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Cricetulus griseus F-box protein 25 (Fbxo25), transcript variant X1, mRNA	1103	1103	99%	0.0	90%	XM_007632246.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Microtus ochrogaster F-box protein 25 (Fbxo25), transcript variant X3, mRNA	1099	1099	99%	0.0	90%	XM_005366245.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Cricetulus griseus F-box protein 25 (Fbxo25), transcript variant X3, mRNA	1090	1090	99%	0.0	90%	XM_007615915.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Cricetulus griseus F-box protein 25 (Fbxo25), transcript variant X3, mRNA	1085	1085	99%	0.0	90%	XM_007632248.1

Range 1: 1 to 269 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
552 bits(1422)	0.0	Compositional matrix adjust.	267/269(99%)	268/269(99%)	0/269(0%)
Query 1		MPFLGQDWRS PGWSWIKTEDG WKRCDCPSHELRS EDSQY TINHSII LNSGEEEIFNNECE			60
Sbjct 1		MPFLGQDWRS PGWSWIKTEDG WKRCDCPSHELRS EDSQY TINHSII LNSGEEEIFNNECE			60
Query 61		YAAKRRKKEHFGNDTAAHSFYREKWIYVHKESTKERHGYCTLGEAFNRLDFSSAIQDIRR			120
Sbjct 61		YAAKRRKKEHFGNDTAAHSFYREKWIYVHKESTKERHGYCTLGEAFNRLDFSSAIQDIRR			120
Query 121		FTYVVV KLLQLIAKSQITSLSGVAQKNYFMILDKIVQKVLDDHQNPRIKGLLQDLSSTLG			180
Sbjct 121		FTYVVV KLLQLIAKSQITSLSGVAQKNYFMILDKIVQKVLDDHQNPRIKGLLQDLSSTLG			180
Query 181		ILVRGVGKSVLVGNINIWICRLETVLSWQQQLQNLQVTKQVNTGLTLDLPLHMLNNILY			240
Sbjct 181		ILVRGVGKSVLVGNINIWICRLETVLSWQQQLQNLQVTKQVNTGLTLDLPLHMLNNILY			240
Query 241		RFSDGWDIVTLGQVTP TLYMLED RRLWK	269		
Sbjct 241		RFSDGWDIVTLGQVTP TLYMLED RRLW+	269		

Primer SP6 Reverso

Range 1: 80 to 357 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
568 bits(1464)	0.0	Compositional matrix adjust.	274/278(99%)	275/278(98%)	0/278(0%)
Query 8		FIVKKWIYVHKESTKERHGYCTLGEAFNRDLFSSAIQDIRRFTYVVKLLQLIAKSQLGSL			67
Sbjct 80		F +KWIYVHKESTKERHGYCTLGEAFNRDLFSSAIQDIRRFTYVVKLLQLIAKSQLSL			139
Query 68		SGVAQKNYFNILDKIVQKVLDHQNPRLIKGLLQDLSSTLGILVRGVGKSVLVGNINIWI			127
Sbjct 140		SGVAQKNYFNILDKIVQKVLDHQNPRLIKGLLQDLSSTLGILVRGVGKSVLVGNINIWI			199
Query 128		CRLETVLSWQQQLQNLQVTKQVNTGLTSLDPLHMLNMLYRFSGWDIVTLGQVTPTLY			187
Sbjct 200		CRLETVLSWQQQLQNLQVTKQVNTGLTSLDPLHMLNMLYRFSGWDIVTLGQVTPTLY			259
Query 188		MLSEDRRLWKRLCQYHFAEQFCRHLLSEKGHIEWKLMYFTLQKYYPTKEQYGDTLHFC			247
Sbjct 260		MLSEDRRLWKRLCQYHFAEQFCRHLLSEKGHIEWKLMYFTLQKYYPTKEQYGDTLHFC			319
Query 248		RHCSILFWKDSGHPCTAADPDSCFTPVSPEHFIDLKFK	285		
Sbjct 320		RHCSILFWKDSGHPCTAADPDSCFTPVSPEHFIDLKFK	357		