

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**

**PATRÍCIA MARIA SIQUEIRA DOS PASSOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES E SUBSTRATOS DO COMPLEXO E3**  
**UBIQUITINA-LIGASE SCF(FBXL17)**

**SÃO CARLOS**

**2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**

**PATRÍCIA MARIA SIQUEIRA DOS PASSOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES E SUBSTRATOS DO COMPLEXO E3**  
**UBIQUITINA-LIGASE SCF(FBXL17)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração:

**Bioquímica e Biologia Molecular**

Orientador:

**Felipe Roberti Teixeira**

**SÃO CARLOS**

**2022**



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Patrícia Maria Siqueira dos Passos, realizada em 10/02/2022.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira (UFSCar)

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Profa. Dra. Lisandra Marques Gava Borges (UFSCar)

Prof. Dr. Gustavo Costa Bressan (UFV)

Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes (USP)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

## DEDICATÓRIA

---

Dedico este trabalho à todas as mães na ciência, em especial as da pós-graduação, muitas das quais não possuem o apoio familiar e as oportunidades necessárias para conseguirem desenvolver o seu projeto. Dedico também à minha amada filha, Alice Passos Melo, por ser a minha fortaleza e motivação para tentar ser sempre a minha melhor versão, e ao seu pai por ter me ajudado a chegar até aqui.

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço à Deus por me conceder saúde, força e preencher minha vida com pessoas especiais. Aos espíritos de luz, que nos momentos mais desafiadores, me reergueram e me mostraram que sou mais forte do que imagino. À minha bonitinha, Vó Marieta, e ao meu irmão de alma José Márcio (*in memoriam*), que me envolvem com um amor que transcende qualquer barreira mortal.

Ao meu pai, Virgílio, por ser exemplo de superação, amor e caráter. Espero um dia poder ser para Alice pelo menos a metade do que o senhor significa para mim. À minha mãe, Cleusa, por ser sinônimo de amor e preocupação maternal. Sou imensamente grata a vocês por não pouparem esforços para me ajudarem a conseguir alcançar os meus objetivos, eu os amo. Aos meus irmãos, e sobrinhos pelo apoio e companheirismo que ultrapassam a distância física. Agradeço especialmente ao meu companheiro de vida, Leonildo, por segurar a minha mão e me incentivar a todo momento, pelo seu amor e por ser a minha fortaleza quando mais precisei. Sem o seu suporte o trajeto seria muito mais difícil de ser percorrido. À luz da minha vida, minha filha Alice, por conseguir me transformar com apenas um olhar, um abraço, e um “eu te amo muito, Mamami”. Se antes eu não sabia como seria a minha vida depois que você nascesse, hoje eu não consigo entender como eu vivi tanto tempo sem você nela.

Aos meus amigos por serem ponto de apoio durante toda a minha vida. Aos meus amigos de vida Carolina, Mônica, Paola, Eduardo, Laura, Felipe e Gislaine. Aos amigos que cultivei em São Carlos, em especial à Natália, Joice, Caio, Schay, Camila, Thaianne, Flávia e Talita. E às minhas amigas-irmãs que se tornaram tias da Alice, Nayore e Luana, obrigada pelas inúmeras vezes que vocês me ampararam de todas as formas possíveis, e por estarem ao meu lado. A família Malango e Alex Rutta por acolherem a mim e à minha família como parte da sua em Cambridge.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, por sua enorme dedicação a esse trabalho, pela orientação sempre presente e pelo acolhimento dentro do nosso grupo de pesquisa. À Profa. Dra. Sandra Maruyama pelo companheirismo, ensinamentos e suporte, especialmente após o nascimento da Alice, sou muito grata a você. A todos os professores do programa de genética evolutiva e biologia molecular, em especial ao Prof. Dr. Marcos Chiaratti, Profa. Dra. Heloísa Sobreiro, Profa. Dra. Lisandra Borges, Prof. Dr. Ricardo Borra e ao Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi, que acompanharam de perto o meu caminho.

Agradeço aos colaboradores externos desse projeto. Em especial à Prof. Dra. Heike Laman, por ter me recebido em seu laboratório na *University of Cambridge* durante seis meses, pelos ensinamentos e orientação dentro deste projeto, e por ter partilhado comigo a sua sabedoria sem limites. Você é dos meus maiores exemplos de mulheres na ciência. Agradeço a todos os membros do Laman's Lab, em especial à Dra. Sara AL Rawi, Dra. Rebecca Harris e à Dra. Bethany Mason pelo suporte durante este período.

Agradeço a todos os membros e ex-membros do grupo LBqC, pela parceria e por construírem um ambiente muito agradável de se estar. A todos os professores e demais funcionários do DGE, em especial a equipe de limpeza que foram cruciais para continuarmos trabalhando no departamento durante todo este período.

A CAPES, por meu amparo financeiro durante o desenvolvimento deste projeto. Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que este estudo fosse realizado, meus mais sinceros agradecimentos.



*“I wanted to change the world. But I have found that the only thing one can be sure of changing is oneself.”*

*Aldous Huxley*

## Resumo

Fbx117 é uma das 69 proteínas do tipo F-box (Fbx) presente em humanos. Através do seu domínio F-box de interação com SKP1, ela forma o complexo E3 ubiquitina-ligase SCF(Fbx117) juntamente com Cullina 1 e Rbx1. Este complexo tem como função ubiquitinar seus substratos culminando em sua degradação via proteassoma ou modulação de função. Além do domínio F-box, as Fbxls possuem o domínio LRR (*Leucine Rich Repeat*) de interação com substratos, garantindo especificidade ao complexo SCF(Fbx117). Durante o desenvolvimento do projeto METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*) foram encontrados truncamentos no gene *FBXL17* que ocasionavam em mutações no domínio LRR da Fbx117. Essas mutações foram encontradas em 135 das 1992 amostras de pacientes. Adicionalmente, em um ensaio de *CGH array* (*Comparative Genomic Hybridization*) realizado, dentre as 746 linhagens de células tumorais analisadas, foi visto que o gene *FBXL17* apresentou quebra em 3 linhagens de câncer de mama (BT-474, HCC38 e HCC1395) e em 1 linhagem de câncer esofágico/gástrico (OE-19). Essas quebras gênicas levaram a geração de proteínas Fbx117 truncadas em seu domínio LRR. Poucos substratos de Fbx117 foram caracterizados, não explicando o seu papel no desenvolvimento tumoral. Desta forma, este trabalho teve como principal objetivo a identificação e validação de potenciais ligantes e substratos de Fbx117. Para tal, foi realizado um ensaio de imunoprecipitação para purificação do complexo SCF(Fbx117), o mutante SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e a proteína Fbx117- $\Delta$ F-box de células HEK293T. Os purificados foram submetidos ao ensaio de ubiquitinação *in vitro* em larga escala usando microarranjos de proteínas e foram detectados 194 possíveis substratos positivos para SCF(Fbx117) excluídos aqueles presentes em Fbx117- $\Delta$ F-box e 92 alvos positivos somente para SCF(Fbx117) subtraindo os positivos em SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box. Após o enriquecimento funcional usando os bancos de dados REACTOME e DAVID, observamos que a maioria desses alvos possuem atuação na regulação do metabolismo de RNA, principalmente na via de regulação do *splicing*. Inicialmente foi feito um ensaio para verificar se Fbx117 atuava no processo de *splicing* utilizando o minigene repórter de *splicing E1A* em células HEK293T e MCF7. Os resultados, no entanto, não comprovaram o papel de Fbx117 neste processo. Posteriormente foi feita a validação da interação e ubiquitinação dos alvos diferencialmente ubiquitinados nos *Protoarrays* pelo complexo SCF(Fbx117). Os dados obtidos indicaram que DDB1, SNRPB2 e SRSF9 interagem com Fbx117. Dentre essas proteínas que interagem, os dados de ubiquitinação em célula indicaram que DDB1 é ubiquitinada pelo complexo SCF(Fbx117). Assim, este trabalho descreveu três novos ligantes de Fbx117 e um novo substrato. A caracterização funcional e relação destes ligantes de Fbx117 com o desenvolvimento tumoral será avaliada em trabalhos posteriores.

**Palavras-chave:** Ubiquitinação, SCF(Fbx117), câncer.

## Abstract

Fbx117 is one of the 69 F-box (Fbx) proteins in humans capable of interaction with SKP1, Cullin 1 and Rbx1 to form the E3 ubiquitin ligase complex SCF(Fbx117). The SCF(Fbx117) complex is the major class of human E3 ubiquitin-ligases and acts ubiquitylating its substrates leading them either to proteasome degradation or function modulation. The Fbx117 proteins have a F-box domain that interacts with SKP1 and a LRR domain (Leucine Rich Repeat domain) for substrate interaction. This LRR domain gives specificity to the SCF(Fbx117) complex. In the METABRIC project (Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium) mutations in *FBXL17* were found leading to depletion in the LRR domain of Fbx117 protein. Those mutations were identified in 135 out of 1992 patient's samples. Moreover, it was performed a CGH-array (Comparative Genomic Hybridization) of 746 cancer cell lines. As a result, they identified breaks in the *FBXL17* gene in 3 cell lines of breast cancer (BT-474, HCC38 and HCC1395) and in 1 cell line of esophageal/gastric cardia adenocarcinoma (OE-19). Those breaks led to the generation of Fbx117 protein with LRR domain truncation, among those mutants there is a protein entitled Fbx117- $\Delta$ 3LRR. Since there are no study relating Fbx117 to tumorigenicity, we aimed to identify potential substrates for Fbx117. It was performed an immunoprecipitation assay to purify SCF(Fbx117), SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) and Fbx117- $\Delta$ F-box from HEK293T cells. The eluates were submitted to a large-scale *in vitro* ubiquitination assay (Protoarray). We were able to identify 194 possible substrates positive for SCF(Fbx117) excluding the ones that were detected in the Fbx117- $\Delta$ F-box slide, and 92 targets that were positive only for SCF(Fbx117) subtracting the ones that were positive for SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) and Fbx117- $\Delta$ F-box. With those data, a functional enrichment analysis was performed using REACTOME and DAVID databases. The data showed most targets were related to RNA metabolism regulation and several of them were associated to splicing processing. Therefore, a functional assay was performed to evaluate whether Fbx117 plays role in pre-mRNA splicing. It was used a splicing reporter minigene called E1A in two different cell lines (HEK293 and MCF7). Afterwards, several targets were selected to go through substrate validation analysis. After performing interaction and ubiquitylation assay in cell, it was observed that DDB1, SNRPB2, and SRS9 interact with Fbx117. Moreover, among those binders our data indicate that DDB1 is ubiquitylated by SCF(Fbx117) in cells. Hence, this study identified three new binders to Fbx117 and one novel substrate. The functional characterization and the relationship of those binders to tumor development are going to be evaluated in subsequent study.

Key words: Ubiquitylation, SCF(Fbx117), cancer.

## Lista de abreviaturas e siglas

- aa - Aminoácido
- AB – *Assay buffer*
- APC – *Adenomatous polyposis coli gene*
- APP – *Alzheimer's amyloid precursor protein*
- ATP – *Adenosine triphosphate*, trifosfato de adenosina
- B12 – *Block 12*
- BACH1 – *Transcription Regulator Protein BACH1*
- BCL6 – *B-Cell Lymphoma 6*
- BSA – Albumina de soro bovino
- BTB - *Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac domain*
- c – Corte
- C11(12) – *Column 11 and 12*
- CDK – *Cyclin-dependant kinase*
- CGH – *Comparative genome hybridization*
- CRL4 – Cul4A-RING
- CRLs – Cullin-RING E3 ubiquitina-ligases
- CTD1 – *Chromatin licensing and DNA replication factor 1*
- CXCR4 – *C-X-C chemokine receptor type 4*
- DCAFs – *CUL4-associated factors*
- DCX – DDB1-Cul4-X-box
- DDB – *DNA-binding protein complex*
- DDB1 – *DNA damage-binding protein 1*
- DDB2 – *DNA damage-binding protein 2*
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DNA – *Desoxibonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico
- DPTOR – *DEP domain containing mTOR interacting protein*
- DUBs – Deubiquitinases
- E1 – Enzima ativadora de ubiquitina
- E2 – Enzima conjugadora de ubiquitina
- E3 – E3 ubiquitina-ligase
- EGFP – *Enhanced green fluorescent protein*

- ELK1 – *ETS domain containing protein ELK-1*
- EV – Vetor vazio
- FBPs – Proteínas do tipo F-box
- Fbx – F-box
- Fbxl1 – *F-box and leucine-rich repeat protein 1*
- Fbxl17 – *F-box/LRR-repeat protein 17*; apresenta 701 resíduos de aminoácidos em sua sequência
- Fbxl17- $\Delta$ 3LRR – Mutante de Fbxl17 que apresenta deleção no domínio rico em leucina importante para interação com o substrato; deleção na região N-terminal do resíduo de aminoácido 587 ao 701
- Fbxl17- $\Delta$ F-box – Mutante de Fbxl17 que não possui o domínio F-box para ligação com Skp1; região entre os resíduos de aminoácidos 324-358 ( $\Delta$ 324-358)
- Fbxw5 – *F-box/WD repeat-containing protein 5*
- FBXW7 – *F-box/WD repeat-containing protein 7*
- Fbxw8 – *F-box/WD repeat-containing protein 8*
- FISH – *Fluorescence in Situ Hybridization*
- FLAG – Peptídeo FLAG, sequência de aminoácidos DYKDDDDK
- FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- G1 – *Gap 1 phase/Growth 1 phase*
- Gal4 – *Regulatory protein GAL4*
- GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GFP – *Green fluorescent protein*
- Gli – *Glioma-associated oncogene homolog*
- Gsk3 $\beta$  – *Glycogen synthase kinase 3 $\beta$*
- HA – Peptídeo hemaglutinina da influenza, sequência de aminoácidos YPYDVPDYA
- HBx – Proteína X do vírus da hepatite B
- HECT – *Homologous to E6AP C-Terminus*
- HEK293T – *Human embryonic kidney 293T cells*
- Hh – *Hedgehog*
- HMCES – *Abasic site processing protein HMCES*
- HMOX1 – *Heme oxygenase 1*
- I – Intensidade

- IPs – Imunoprecipitações
- IκB – *Inhibitor of nuclear factor kappa B*
- JUN – *Transcription fator AP-1*
- K – Letra que representa o aminoácido lisina
- KEAP1 – *Kelch Like ECH Associated Protein 1*
- KLHL25 – *Kelch-like protein 25*
- KLHL3 – *Kelch Like Family Member 3*
- LRR – *Leucine rich repeat*
- LSM4 – *U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm4*
- MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*
- MCF-7 – *Michigan Cancer Foundation-7*
- METABRIC - *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*
- MG132 – *Carbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucine*
- MMP1 – *Matrix Metalloproteinase 1*
- MPTs – Modificações pós-traducionais
- mRNA – *Messenger ribonucleic acid*, ácido ribonucleico mensageiro
- mTOR – *Mammalian target of rapamycin*
- Myc – Peptídeo Myc derivado da proteína c-Myc, sequência de aminoácidos EQKLI-SEEDL
- NC – Não paramétrica
- NFR2 – *NADH-dependent flavin reductase subunit 2*
- Notch – *Neurogenic locus notch homolog protein*
- p127 – *DNA-damage binding protein 1 subunit p127*
- p21 – GTPase HRas
- p27 – *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*
- p48 – *Pancreas transcription factor 1 subunit alpha*
- p57 – *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*
- PBS – *Phosphate buffered saline*
- PDB – *Protein data bank*
- PEI – Polietilenoimina
- PRP – *Proline Rich Repeat*
- R12 – Row 12

- RAD51AP1 – *RAD51-associated protein 1*
- RBR – *RING-in between-RING*
- Rbx1 – *RING-box protein 1*
- RGS2 – *Regulator of G protein signaling 2*
- RING – *Really interesting new gene*
- RNA – *Ribonucleic acid, ácido ribonucleico*
- ROC1 – *Homeobox-leucine zipper protein ROC1*
- SCF – Complexo E3 ubiquitina-ligase composto por Skp1, Cullina1, proteína F-box e Rbx1
- SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
- SIP1 – *GEMIN2/Gem-associated protein 2*
- Skp1 – *S-phase kinase-associate protein 1*
- Skp2 – *S-phase kinase-associated protein 2*
- SNRPB2 – *U2 small nuclear ribonucleoprotein B*
- SRSF9 – *Serine/arginine-rich splicing fator 9*
- ssDNA – DNA de fita simples
- Sufu – *Suppressor of fused*
- SUP – Sistema ubiquitina-proteassoma
- SV5 – *Paramyxovirus simian virus 5*
- T.A. – Temperatura ambiente
- Tomm20 – *Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20*
- U2OS – *Human bone osteosarcoma epithelial cells*
- UV – Ultravioleta
- WD – Triptofano-ácido aspártico
- WD40 – *WD-repeat*, domínio contendo repetições dos resíduos de aminoácidos triptofano-ácido aspártico
- WT1 – *Wild type 1*
- Y2H – *Yeast two-hybrid*
- ZBTB10 – *Zinc Finge and BTB domain-containing protein 10*
- ZNF238 – *Zinc Finger and BTB domain-containing protein 18*
- $\beta$ -TrCP –  *$\beta$ -transducin repeat-containing protein*
- $\beta$ -TrCP1 –  *$\beta$ -transducin repeat-containing protein 1*

- $\beta$ -TrCP2 –  *$\beta$ -transducin repeat-containing protein 2*



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação do sistema ubiquitina-proteassoma.....	23
<b>Figura 2.</b> Estrutura tridimensional das cadeias de ubiquitina.....	24
<b>Figura 3.</b> Modelo esquemático do complexo SCF. ....	25
<b>Figura 4.</b> Membros da família FBXL.....	27
<b>Figura 5.</b> Modelo esquemático da ubiquitinação de Sufu por SCF(Fbx117) regulando a sinalização de Hh e crescimento de meduloblastoma. ....	29
<b>Figura 6.</b> Mutações no gene <i>FBXL17</i> .....	31
<b>Figura 7.</b> Truncamento no domínio LRR do gene <i>FBXL17</i> em linhagens de células tumorais de mama (HCC1395 e HCC38) e esofágico/gástrico (OE-19).....	32
<b>Figura 8.</b> Imunoprecipitação dos complexos SCF(Fbx117) e SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) em células HEK293T. ....	34
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da metodologia empregada no experimento de ubiquitinação <i>in vitro</i> em larga escala usando os Protoarrays como fonte de substrato. ....	44
<b>Figura 10.</b> Padrão de splicing alternativo sofrido pelo gene E1A para geração dos mRNA 13S, 12S, 11S, 10S e 9S. ....	46
<b>Figura 11.</b> Purificação dos complexos SCF(Fbx117) e SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR).....	54
<b>Figura 12.</b> Quantificação dos complexos purificados por SDS-PAGE corado com prata. Frações eluídas da imunoprecipitação dos complexos foram resolvidas em SDS-PAGE e coradas com reagente de prata.....	55
<b>Figura 13.</b> Avaliação de atividade dos complexos SCF(Fbx117), SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e de Fbx117- $\Delta$ F-box através de ensaios de ubiquitinação <i>in vitro</i> . ....	56
<b>Figura 14.</b> Predição estrutural da proteína Fbx117 usando o serviço de predição de estrutura tridimensional (3D) do software I-TASSER. ....	57
<b>Figura 15.</b> Predição estrutural de proteína Fbx117- $\Delta$ 3LRR usando o serviço de predição de estrutura tridimensional (3D) do software I-TASSER. ....	58
<b>Figura 16.</b> Imagem dos spots presentes em cada lâmina que foi submetida ao processo de ubiquitinação <i>in vitro</i> em larga escala. ....	60
<b>Figura 17.</b> Classificação dos alvos positivos para SCF(Fbx117) e subtraídos dos positivos para Fbx117- $\Delta$ F-box. ....	63
<b>Figura 18.</b> Classificação dos alvos positivos para SCF(Fbx117) subtraídos dos positivos para SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box.....	65

<b>Figura 19.</b> Verificação da integridade do RNA em células HEK293T após 24 h de transfecção.....	68
<b>Figura 20.</b> Efeito de Fbx117 no splicing do gene E1A em células HEK293T após 24 h de transfecção.....	69
<b>Figura 21.</b> Verificação da integridade do RNA em células MCF7 após 24 h de transfecção.....	70
<b>Figura 22.</b> Efeito de Fbx117 no splicing do gene E1A em células MCF7 após 24 h de transfecção.....	71
<b>Figura 23.</b> Verificação da integridade do RNA em células HEK293T após 48 h de transfecção.....	72
<b>Figura 24.</b> Efeito de Fbx117 no splicing do gene E1A em células HEK293T após 48 h de transfecção.....	73
<b>Figura 25.</b> Ensaio de interação entre SIP1 e Fbx117 .....	75
<b>Figura 26.</b> Ensaio de interação entre SNRPB2 e Fbx117.....	76
<b>Figura 27.</b> Ensaio de ubiquitinação de SNRPB2 e Fbx117 em células HEK293T.....	77
<b>Figura 28.</b> Ensaio de interação entre HMCES e Fbx117. ....	78
<b>Figura 29.</b> Ensaio de ubiquitinação de HMCES por Fbx117 em células HEK293T. ....	79
<b>Figura 30.</b> Ensaio de interação entre LSM4 e Fbx117.....	80
<b>Figura 31.</b> Ensaio de interação entre SRSF9 e Fbx117.....	81
<b>Figura 32.</b> Ensaio de ubiquitinação de SRSF9 por Fbx117 em células HEK293T.....	82
<b>Figura 33.</b> Ensaio de interação entre RAD51AP1 e Fbx117.....	83
<b>Figura 34.</b> Ensaio de interação entre DDB1 e Fbx117 em U2OS.....	86
<b>Figura 35.</b> Ensaio de interação entre DDB1 e Fbx117 em HEK293T. ....	88
<b>Figura 36.</b> Ensaio de ubiquitinação de DDB1 por Fbx117 em células HEK293T.....	90

## **Lista de tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Rearranjos genômicos e mutações em <i>FBXL17</i> . .....	33
<b>Tabela 2.</b> Composição do <i>mix</i> de ubiquitinação. ....	43
<b>Tabela 3.</b> Reação de ubiquitinação <i>in vitro</i> usando os complexos purificados. ....	43
<b>Tabela 4.</b> Ciclagem usada na PCR do ensaio de <i>splicing</i> alternativo do minigene <i>E1A</i> . ....	48
<b>Tabela 5.</b> Tabela dos alvos pré-selecionados para validação. ....	66
<b>Tabela 6.</b> Tabela dos alvos selecionados para validação. ....	67
<b>Tabela 7.</b> Tabela de alvos detectados positivos para SCF(Fbx117) subtraindo-se os positivos para Fbx117- $\Delta$ F-box. ....	104
<b>Tabela 8.</b> Tabela de alvos detectados positivos para SCF(Fbx117) subtraindo-se os positivos para SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box. ....	108

## **Equação**

<b>Equação 1.</b> Equação para o cálculo do complexo purificado. ....	42
---	----

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	21
1.1	Sistema ubiquitina-proteassoma (SUP).....	21
1.2	O complexo E3 ubiquitina-ligase do tipo SCF.....	24
1.3	A proteína Fbx117.....	27
1.4	Identificação de substratos de proteínas F-box .....	34
<b>2</b>	<b>Objetivos</b> .....	38
2.1	Objetivo geral.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
<b>3</b>	<b>Material e métodos</b> .....	40
3.1	Cultura de células .....	40
3.2	Purificação dos complexos SCF(Fbx117), SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e a construção mutante Fbx117- $\Delta$ F-box.....	41
3.3	Ubiquitinação <i>in vitro</i> dos complexos purificados de células HEK293T .....	42
3.4	Ensaio de ubiquitinação <i>in vitro</i> usando microarranjos de proteína ( <i>Protoarrays</i> ) como fonte de substrato .....	43
3.5	Aquisição dos dados dos <i>Protoarrays</i> e análises <i>in silico</i> .....	45
3.6	Ensaio de <i>splicing in cellulo</i> .....	46
3.7	Ensaio de co-imunoprecipitação.....	48
3.8	Ensaio de ubiquitinação em células.....	50
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	53
4.1	Purificação dos complexos SCF(Fbx117), SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box de células HEK293T e verificação de suas atividades por meio de ubiquitinação <i>in vitro</i> .....	53
4.2	Ensaio de <i>splicing</i> usando o gene repórter E1A.....	67
4.2.1	Avaliação da interação entre SIP1 e Fbx117 .....	74
4.2.2	Avaliação da interação entre SNRPB2 e Fbx117 .....	75
4.2.3	Avaliação da interação entre HMCES e Fbx117 .....	77
4.2.4	Avaliação da interação entre LSM4 e Fbx117 .....	79
4.2.5	Avaliação da interação entre SRSF9 e Fbx117.....	80
4.2.6	Avaliação da interação entre RAD51AP1 e Fbx117 .....	82
4.2.7	A proteína DDB1.....	83
4.2.8	Avaliação da interação entre DDB1 e Fbx117 .....	85
<b>5</b>	<b>Conclusão</b> .....	92
<b>6</b>	<b>Perspectivas futuras</b> .....	94
<b>7</b>	<b>Referências</b> .....	96

# INTRODUÇÃO

---

## 1 Introdução

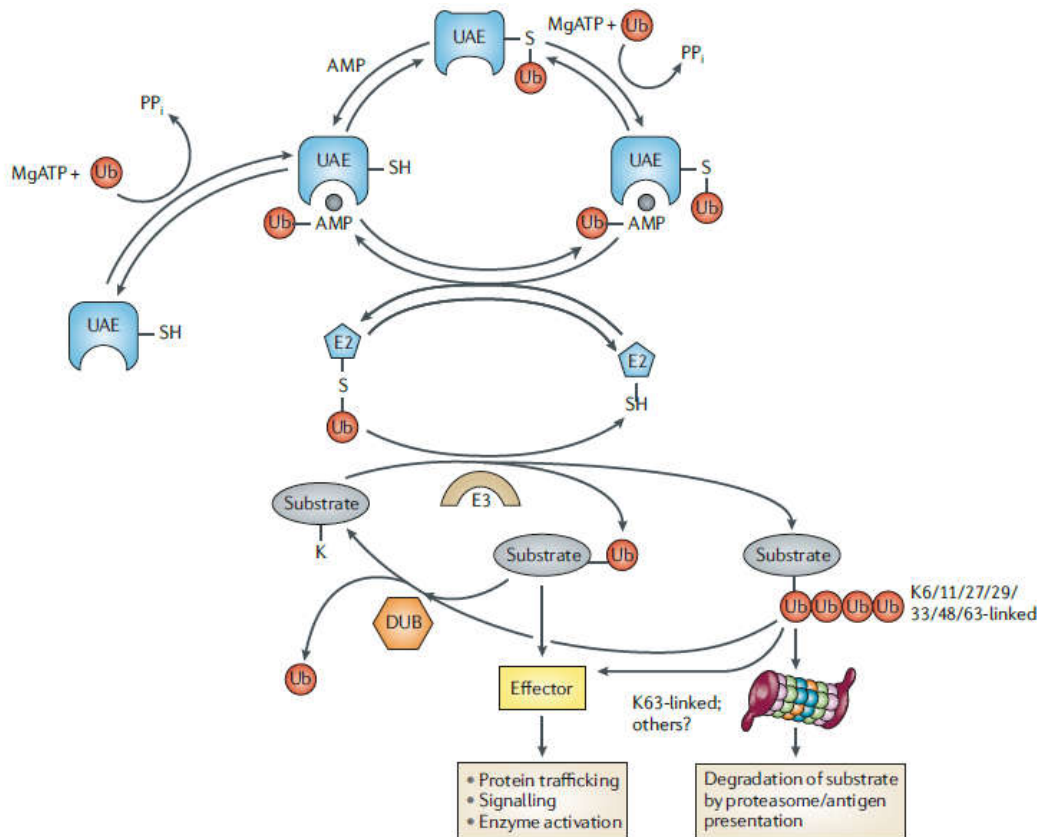
### 1.1 Sistema ubiquitina-proteassoma (SUP)

As modificações pós-traducionais (MPTs) são um tipo de mecanismo de regulação de proteínas celulares crucial para uma grande variedade de funções biológicas. As MPTs são capazes de controlar quase todos os processos fisiológicos, incluindo sua duração e intensidade, garantindo assim uma resposta celular rápida e dinâmica frente a um estímulo intracelular ou extracelular (Han et al., 2018). Diferentes tipos de MPTs são capazes de alterar a carga, hidrofobicidade, conformação e estabilidade das proteínas, o que afeta diretamente as suas funções. As modificações que ocorrem em proteínas incluem fosforilação, glicosilação, nitrosilação, metilação, acetilação, lipidação e ubiquitinação, dentre outras. A ubiquitinação é um processo importante para o controle da homeostase de proteínas, controlando a função e estabilidade das mesmas, uma vez que o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) é o principal responsável pela proteólise intracelular em organismos eucariotos (Çetin et al., 2021).

A ubiquitinação é uma via conservada em eucariotos e essencial para a regulação do ciclo celular. O mecanismo se baseia na ligação covalente isopeptídica da ubiquitina, proteína contendo 76 resíduos de aminoácidos, ao grupo  $\epsilon$ -amino de lisinas presentes nas proteínas alvo (Randles & Walters, 2018). Embora seja mais raro, também há relatos de moléculas de ubiquitina se ligando ao grupo hidroxil de resíduos de serina e ao grupo tiol em resíduos de cisteína (Cadwell & Coscoy, 2006; McClellan et al., 2019; Ravid & Hochstrasser, 2007). Uma ou várias ubiquitinas podem ser conjugadas ao substrato em processos denominados monoubiquitinação ou multimonoubiquitinação, respectivamente. Além disso, as ubiquitinas podem se conjugar uma à outra, formando uma cadeia de ubiquitinas durante o processo de poliubiquitinação.

A ubiquitinação é um processo reversível e finamente regulado, que requer normalmente três etapas catalíticas. Inicialmente a ubiquitina é ativada em uma reação de hidrólise de ATP catalisada pela enzima ativadora de ubiquitina (E1). Essa reação irá propiciar a geração de uma ligação tioéster entre o resíduo de cisteína presente no sítio ativo da enzima E1 com a região C-terminal da ubiquitina. Em seguida, a ubiquitina é transferida para o resíduo de cisteína situado no sítio ativo da enzima carreadora de ubiquitina (E2) que finalmente se liga a enzima E3 ubiquitina-ligase e transfere a ubiquitina diretamente para o substrato ligado a E3, ou para a enzima E3 que posteriormente transfere a ubiquitina ao substrato (**Figura 1**). A forma como essa transferência irá ocorrer depende diretamente do tipo de complexo que a interação E2-E3 irá formar. Como exemplo, em reações onde há a

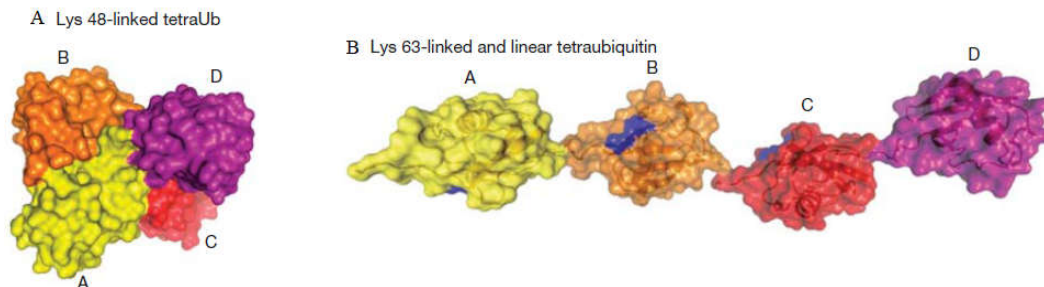
participação de E3 ubiquitina-ligases contendo o domínio RING (*Really Interesting New Gene*), o complexo exercerá a função de *scaffold*, orientando a transferência da ubiquitina ligada a enzima E2 diretamente para o substrato que será apresentado pelo complexo E3 (**Figura 1**). Por outro lado, os complexos E3 pertencentes à família contendo o domínio HECT (*Homologous to E6AP C-Terminus*) são capazes de formar uma ligação tioéster com a ubiquitina para então permitir a transferência da mesma para o seu alvo (Randles & Walters, 2018). Também já foi observado que algumas E3 ligases pertencentes à família RBR (*RING-in between-RING*) são capazes de agir como híbridos RING/HECT por meio da formação da ligação tioéster com a ubiquitina em um resíduo conservado de cisteína no domínio RING precedendo a transferência da ubiquitina ao substrato (Wenzel et al., 2011). Uma vez ubiquitinado, o substrato poderá seguir três caminhos distintos: 1) ser encaminhado para degradação via proteassoma; 2) ter sua função modulada mediante ao tipo de cadeia de ubiquitina adicionada; 3) por ser um processo reversível, o substrato também pode ter a molécula de ubiquitina removida por ação de enzimas deubiquitinases (DUBs) (**Figura 1**). Para uma visão mais detalhada do sistema ubiquitina-proteassoma e as funções de E3 ligases em doenças humanas, referenciamos o capítulo que publicamos (dos Passos et al., 2022) no livro *Proteolytic signaling in health and disease*, recentemente publicado pela editora Elsevier (Capítulo 2 – *Ubiquitin ligases: Proteolytic signaling, protein turnover, and disease*; em **ANEXO**).



**Figura 1.** Representação do sistema ubiquitina-proteassoma. A ubiquitina é ativada pelo complexo E1 (UEA), posteriormente, a ubiquitina é carregada pelo complexo E2 até o complexo E3, que por sua vez estará ligada ao alvo a ser ubiquitinado. No complexo E3 ocorre a transferência da ubiquitina para o substrato que será direcionado para degradação via proteassoma ou ter a sua função modulada, dependendo do tipo de cadeia de ubiquitina adicionada ao mesmo. O substrato também pode ser alvo das deubiquitinases (DUBs), que irão remover o sinal promovido pela(s) molécula(s) de ubiquitina. Imagem adaptada de (Bedford et al., 2011).

A ubiquitina possui sete resíduos de lisinas internas em sua estrutura (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63) que podem ser usadas para ligação com outras moléculas de ubiquitina no processo de poliubiquitinação (Komander, 2009). As cadeias de poliubiquitina atuam como sinal multifuncional por formarem diferentes estruturas tridimensionais que serão reconhecidas por proteínas efetoras distintas (French et al., 2021). As cadeias do tipo K48 que adquirem uma conformação estrutural pseudo-tetragonal, onde há contato de superfície entre cada molécula de ubiquitina, sinalizam para degradação do substrato via proteassoma. Por outro lado, as cadeias do tipo K63 possuem uma estrutura linear e atuam modulando a função do substrato sem direcioná-lo para degradação via proteassoma (Komander, 2009; Komander et al., 2009) (**Figura 2**).

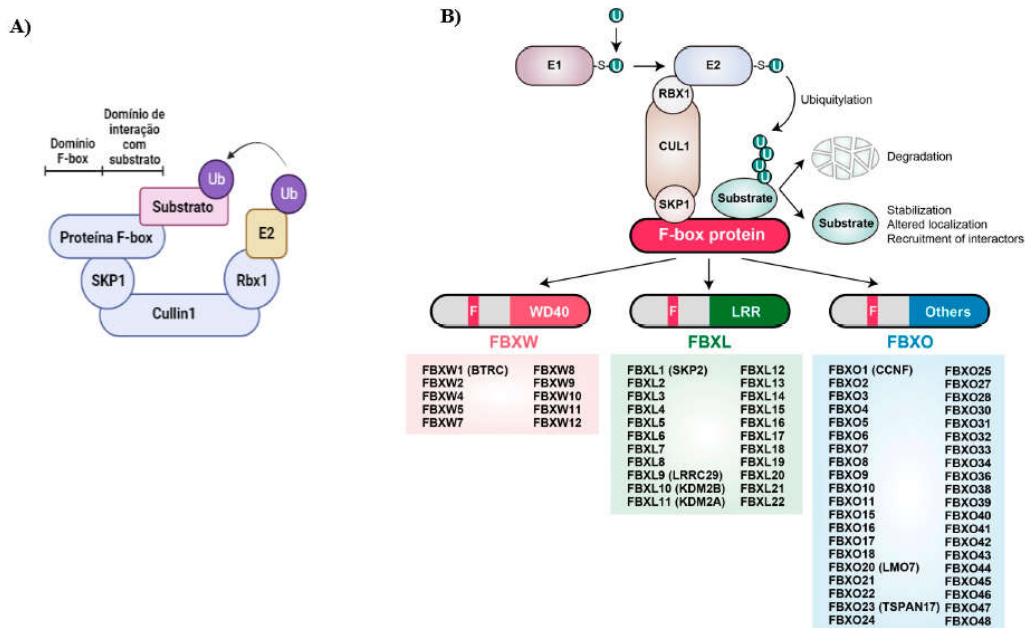




**Figura 2.** Estrutura tridimensional das cadeias de ubiquitina do tipo K48 (A) e do tipo K63 (B). Imagem adaptada de (Komander et al., 2009).

## 1.2 O complexo E3 ubiquitina-ligase do tipo SCF

A maior e mais bem estudada classe de E3 ubiquitina-ligases em eucariotos são as do tipo RING *finger*, sendo a família composta pelo complexo SCF a mais bem caracterizada (Jackson & Eldridge, 2002). O complexo SCF é constituído por SKP1, Cullina 1, Rbx1 e uma proteína do tipo F-box (FBP). As FBPs além de possuírem o domínio F-box para interação com SKP1, também possuem o domínio de interação com o substrato, conferindo assim especificidade ao complexo SCF (**Figura 3A**). A classificação de proteínas F-box se baseia em seu domínio de interação com o substrato (**Figura 3B**). Portanto, as proteínas que possuem o domínio WD, rico em resíduos de triptofano e ácido aspártico, são denominadas FBXW, grupo que compreende 10 proteínas; já as FBXL possuem o domínio LRR (*Leucin Rich Repeat*) abrangendo 22 proteínas distintas, e finalmente, as FBXO agrupam as proteínas que possuem Outros domínios, incluindo *Leucine Zipper*, *Ring Finger*, PRP (*Proline Rich Repeat*), dentre outros, contabilizando um total de 37 proteínas (Cenciarelli et al., 1999; Winston et al., 1999).



**Figura 3. A)** Modelo esquemático do complexo SCF. O complexo é constituído por SKP1, Cullin1, Rbx1 e pela proteína do tipo F-box, tendo os seus domínios característicos destacados na imagem. **B)** O complexo SCF atuando em conjunto com os complexos E1 e E2 propiciam a ubiquitinação de proteínas alvo. As proteínas do tipo F-box irão interagir com a SKP1 no domínio N-terminal para promover a montagem do complexo, possuindo também o domínio de interação com o substrato na região C-terminal. Cada proteína F-box se agrupa em uma das três classes, FBXW, FBXL e FBXO, com base no seu domínio de interação com o substrato. Figura adaptada de (Yumimoto et al., 2020).

Os complexos do tipo SCF são importantes para processos celulares dinâmicos degradando proteínas chave de regulação, geralmente após serem fosforiladas em epítotos específicos denominados *degrons* (Deshaies, 1999). O complexo SCF modula a transição de fases do ciclo celular por meio da ubiquitinação e posterior degradação via proteassoma de seus reguladores, incluindo inibidores de cinase dependente de ciclinas, fatores de transcrição de DNA e ciclinas da fase G1 (Kipreos & Pagano, 2000).

As FBPs podem atuar como oncogene promovendo a degradação de supressores tumorais, ou como supressor tumoral levando a degradação de oncoproteínas. A proteína FBXL1, também conhecida como SKP2, é um exemplo de uma FBP oncogênica por promover a entrada da fase S do ciclo celular através da ubiquitinação e posterior degradação de p27, proteína inibidora de CDK (*Cyclin-dependant kinase*) (Skaar et al., 2013). Foi verificado que a superexpressão de SKP2 está associada ao prognóstico desfavorável em diversos tipos de câncer, porque em grande parte dos tumores, p27 encontra-se inativada pois é encaminhado para degradação via proteassoma por SKP2 (Frescas & Pagano, 2008). Embora SKP2 atue de

forma majoritária na regulação de p27, essa proteína também é capaz de marcar outros substratos anti-proliferativos como p21 e p57, contribuindo ainda mais para a sua função como oncoproteína (Skaar et al., 2013).

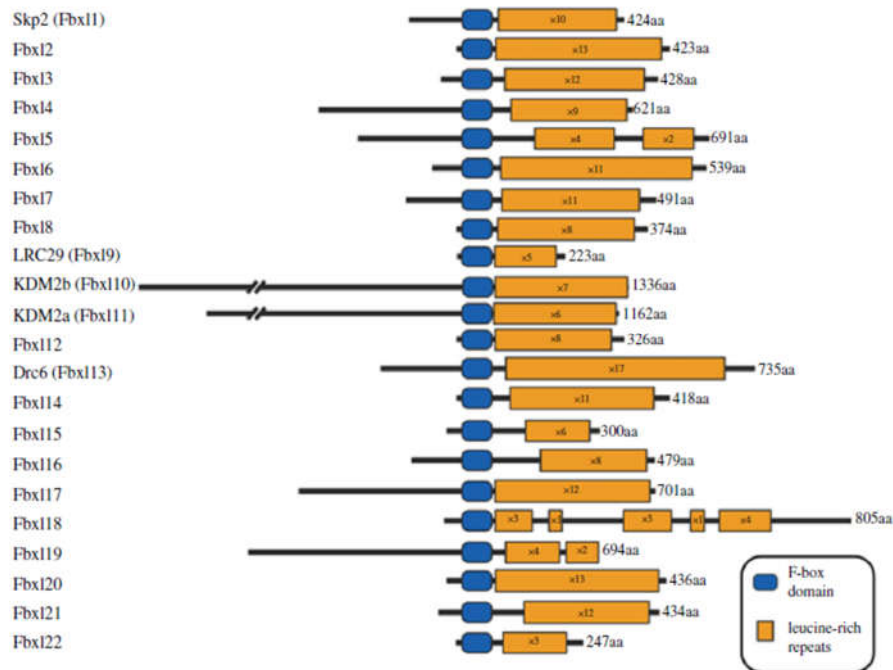
A Fbxw7, por sua vez, foi identificada como supressor tumoral pois a perda de função dessa proteína decorrente de mutações em *FBXW7* foi observada em uma variedade de câncer (Welcker & Clurman, 2008). Mutações em *FBXW7* foram detectadas com maior frequência em leucemia linfoblástica aguda de células T, mas também foi observada em tumores sólidos, como em câncer de intestino, câncer de mama e câncer ósseo (Skaar et al., 2013). Os substratos caracterizados de Fbxw7, incluindo MYC, JUN, *cyclin E* e Notch, propiciam a proliferação e tumorigênese quando atuam em conjunto com outros tipos de mutações (Skaar et al., 2013; Welcker & Clurman, 2008). Foi verificado também que a deleção de *FBXW7* ocasiona em perda prematura de células tronco hematopoiéticas pela promoção da entrada do ciclo celular e apoptose mediada por p53 (Crusio et al., 2010). Adicionalmente, a perda de função de Fbxw7 contribui para a resistência a certos tipos de drogas quimioterápicas (Skaar et al., 2013).

Proteínas do tipo F-box podem regular diferentes tipos de substratos, incluindo aqueles com funções biológicas opostas. Assim, uma mesma FBP pode atuar tanto como oncoproteína como supressor tumoral, dependendo do substrato regulado, compartimento e tipo celular.  $\beta$ TrCP (Fbxw1) é um exemplo dessa dualidade funcional por ser capaz de mediar a degradação de substratos que promovem a proliferação celular na fase G1, e por sua atuação na regulação positiva e negativa que controlam o tempo e a progressão do processo mitótico (Skaar et al., 2013). Tanto  $\beta$ TrCP1 como  $\beta$ TrCP2 encontram-se superexpressas em certos tipos de câncer, corroborando assim para o seu papel como proteínas oncogênicas pela degradação de proteínas que atuam como supressores tumorais como DEPTOR (*DEP domain containing mTOR interacting protein*) e I $\kappa$ B (*Inhibitor of nuclear factor kappa B*) (Bi et al., 2021; Cui et al., 2020; Fuchs et al., 2004). DEPTOR é uma proteína que desempenha função na inibição de mTOR, e quando ubiquitinada, DEPTOR é degradada via proteassoma o que propicia a ativação de AKT, levando à proliferação celular acelerada (Gao et al., 2012; Zhao et al., 2011). A ubiquitinação e consequente degradação de I $\kappa$ B, regulador negativo da via NF- $\kappa$ B, por sua vez, leva a ativação dessa via que encontra-se associada ao processo de tumorigênese (Karin & Greten, 2005). Por outro lado,  $\beta$ TrCP também exerce função de supressor tumoral por mediar a degradação de  $\beta$ -catenina, proteína crucial para a sinalização da via Wnt. A ativação constitutiva dessa via supostamente é um evento inicial em câncer

colorretal, uma vez que a ativação na maioria das vezes ocorre como resultado de mutações em *APC* (*Adenomatous polyposis coli gene*), e conseqüentemente, na inibição da fosforilação dependente de GSK-3 $\beta$  da  $\beta$ -catenina (Yumimoto et al., 2020).

### 1.3 A proteína Fbx17

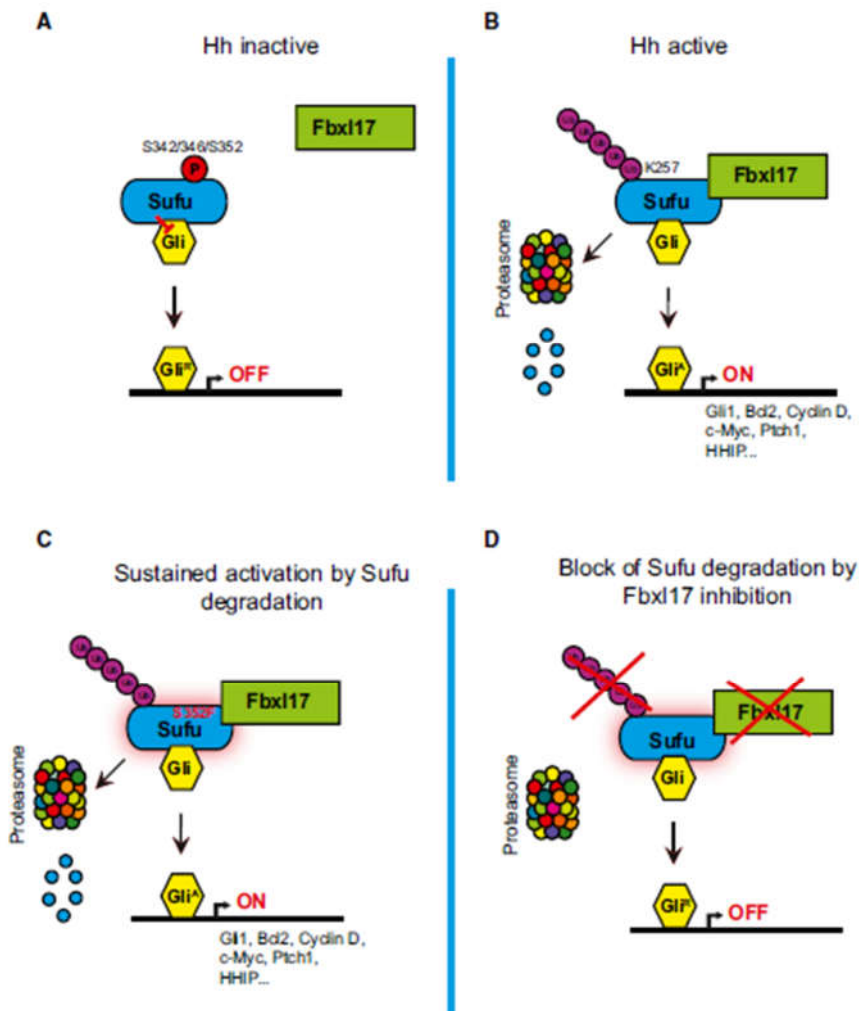
A família de proteínas do tipo FBXL é a maior família dentre as FBPs que possuem um domínio comum de interação com o substrato, apresentando um número variado de LRR na região C-terminal de sua estrutura (**Figura 4**). O domínio LRR contém cerca de 20 a 29 resíduos de aminoácidos contendo aproximadamente 11 ou 12 resíduos com sequência consenso [LxxLxLxxNxL ou LxxLxLxxNxxL, sendo “x” a representação de qualquer aminoácido, “L” representando um resíduo de leucina, isoleucina, valina ou fenilalanina (aminoácidos com cadeia lateral hidrofóbica) e “N” sendo um resíduo de asparagina, cisteína, treonina ou serina (aminoácidos apresentando cadeia lateral polar não carregada)] (Mason & Laman, 2020).



**Figura 4.** Membros da família FBXL. Desenho esquemático de proteínas do tipo FBXL apresentando domínio F-box (azul) e domínio LRR (amarelo). Imagem adaptada de (Mason & Laman, 2020).

Embora a proteína Fbx117 seja pobremente estudada, trabalhos anteriores relacionaram-na ao processo de regulação de estresse oxidativo via NFR2, tendo a proteína BACH1 (*Transcription Regulator Protein BACH1*) como substrato caracterizado (Tan et al., 2013). BACH1 atua como repressor transcricional de genes de resposta ao estresse oxidativo, como *HMOX1* (*Heme oxygenase 1*), exercendo papel central no controle da via Nrf2. Recentemente, foi demonstrado que BACH1 está associada à metástase óssea no câncer de mama por meio da regulação dos genes *CXCR4* (*C-X-C chemokine receptor type 4*) e *MMP1* (*Matrix Metalloproteinase 1*) (Davudian et al., 2016).

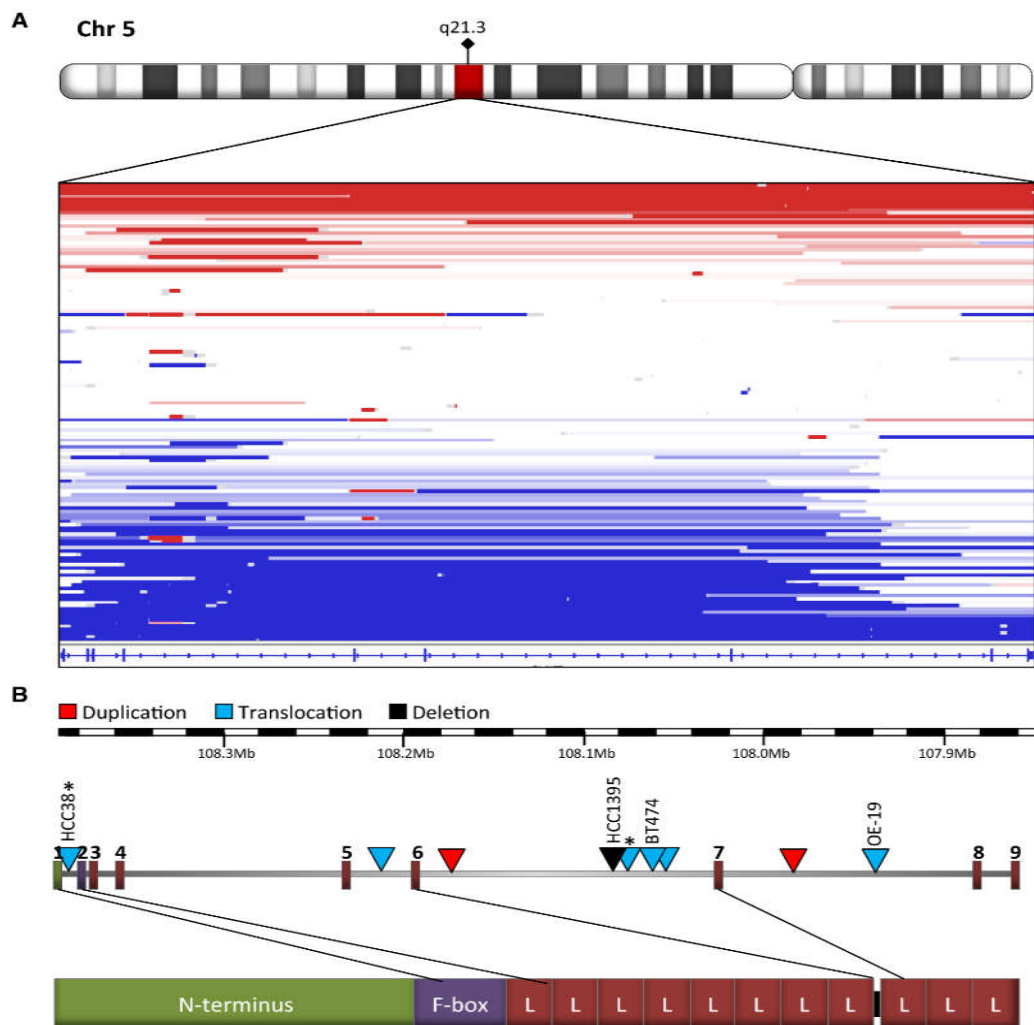
Fbx117 também é capaz de interagir, porém sem promover a ubiquitinação, com as proteínas ZNF238 (*Zinc Finger and BTB domain-containing protein 18*), KLHL25 (*Kelch-like protein 25*) e ZBTB10 (*Zinc Finger and BTB domain-containing protein 10*) (Tan et al., 2013). Em 2016, foi demonstrado que mutações em *FBXL17* estão associadas ao desenvolvimento tumoral. A Fbx117 atua na regulação da via Hh (*Hedgehog*), essencial no controle de proliferação e padronização celular durante a embriogênese, promovendo a ubiquitinação de Sufu (*Suppressor of fused*), que por sua vez, desempenha papel chave na sinalização da via Hh (*Hedgehog*) (**Figura 5**). Sufu atua como supressor tumoral através da inibição dos fatores de transcrição de Gli (*Glioma-associated oncogene homolog*). A ubiquitinação de Sufu mediada por SCF(Fbx117) para degradação via proteossoma, possibilita a liberação de Gli1 normalizando os sinais de transdução de Hh (**Figura 5**). Havendo redução dos níveis de Fbx117 acarreta no comprometimento dos sinais de Hh, que está diretamente associado à proliferação de células tumorais e crescimento de meduloblastoma (Raducu et al., 2016).



**Figura 5.** Modelo esquemático da ubiquitinação de Sufu por SCF(Fbx117) regulando a sinalização de Hh e crescimento de meduloblastoma. Imagem adaptada de (Raducu et al., 2016).

O complexo SCF(Fbx117) é capaz de interagir seletivamente e ubiquitinar dímeros BTB pertencentes a proteínas e peptídeos aberrantes, promovendo assim um controle de qualidade. Existem aproximadamente 200 proteínas funcionais contendo o domínio BTB; como exemplo, os reguladores transcricionais BCL6 (*B-Cell Lymphoma 6*) e BACH1 ou subunidades de outros complexos E3 ubiquitina-ligase KLHL3 (*Kelch Like Family Member 3*) e KEAP1 (*Kelch Like ECH Associated Protein 1*) (Mena et al., 2018). Esses últimos são reguladores de transcrição e subunidades pertencentes à E3 ubiquitina-ligases, e quando apresentam atividade aberrante propicia o desenvolvimento de inúmeras doenças, incluindo hipertensão, câncer e doenças neurodegenerativas (Ci et al., 2008; Geyer et al., 2003; Mena et al., 2018; Pintard et al., 2003).

Nosso grupo de pesquisa juntamente com o grupo da Dra. Heike Laman (*Department of Pathology/University of Cambridge/UK*) demonstrou que a região genômica que codifica para o domínio LRR em *FBXL17* apresenta mutações frequentes em câncer epitelial (Mason et al., 2019). Dentre as 1992 amostras analisadas pelo projeto METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*), 135 apresentaram pelo menos uma quebra em *FBXL17*, o que consiste em cerca de 7% das amostras totais. A quebra foi avaliada por meio da técnica de CGH-array (*Comparative Genomic Hybridization*), um procedimento capaz de identificar alterações cromossômicas desbalanceadas (**Figura 6**). A maior parte das quebras genômicas, havendo ganho ou perda no número de cópias, ocorreram na região 3' do gene da *FBXL17*. O domínio LRR da Fbx17 é codificado pela região do éxon 3' em diante, conseqüentemente, os rearranjos observados possivelmente afetam a interação com alguns de seus substratos (Mason et al., 2019).

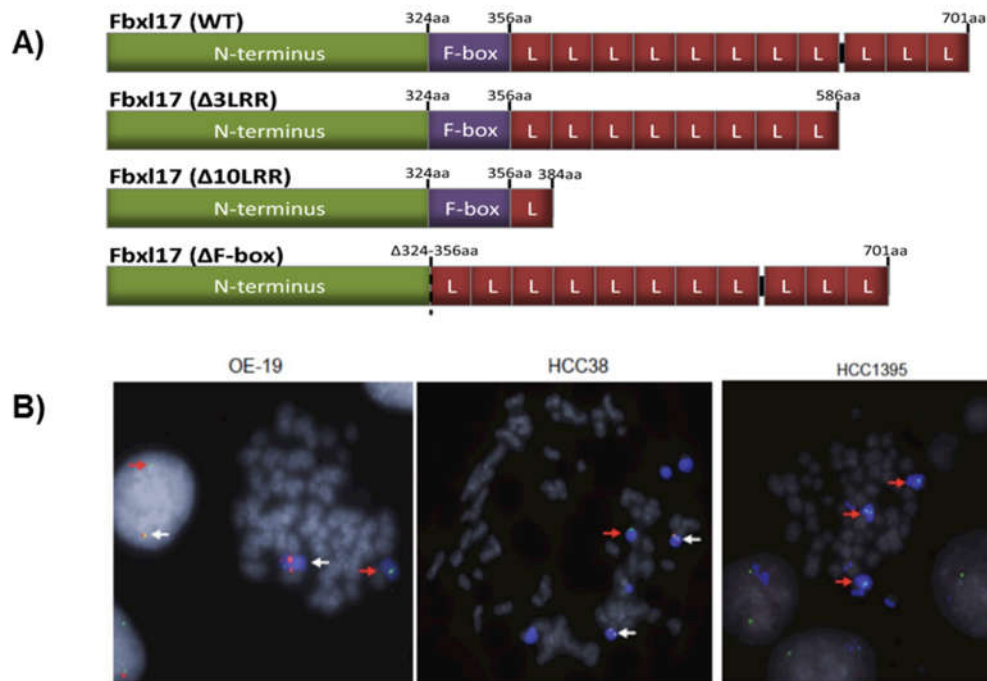


**Figura 6.** Mutações no gene *FBXL17*. **A)** Quebras em 135 das 1992 amostras de tumores de mama detectadas pela técnica de *CGH-array* tendo cada linha horizontal representando um tumor. As quebras são representadas por esquema de cores; azul: perda no número de cópias; branco: sem alteração; vermelho: ganho no número de cópias. **B)** Exon da *Fbxl17* obtido pelo Ensembl *transcript* ENST00000542267.5 (Refseq NM\_001163315.2, NP\_001156787.2). Triângulos indicam *breakpoints* no gene da *Fbxl17* em linhagens celulares (com o nome da linhagem destacado) ou em tumores primários de câncer de mama (não destacado). Asteriscos indicam fusão conhecida. Imagem adaptada de (Mason et al., 2019).

Outro dado interessante observado pela técnica de *CGH-array* foram as quebras em *FBXL17* em quatro linhagens de células de origem tumoral, sendo três referentes a linhagens celulares de carcinoma em mama (BT-474, HCC38 e HCC1395) e uma de adenocarcinoma esofágico/gástrico (OE-19). Essas quebras foram verificadas pela técnica de FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*) (**Figura 7**). Na linhagem celular BT-474, uma das três cópias de *FBXL17* apresentou quebra na região 3' do gene, já em HCC38 e em OE-19 foram



observadas a presença de uma cópia extra na região 5'. Adicionalmente, foi visto por meio de CGH-array e por sequenciamento que em HCC1395 há uma deleção homozigótica interna em *FBXL17* propiciando o truncamento de Fbx117 próximo à sua região N-terminal, codificando assim uma proteína mutante faltando aproximadamente três LRRs em sua sequência, denominada como Fbx117- $\Delta$ 3LRR (Mason et al., 2019).



**Figura 7.** Truncamento no domínio LRR do gene *FBXL17* em linhagens de células tumorais de mama (HCC1395 e HCC38) e esofágico/gástrico (OE-19). **A)** Localização de truncamentos na proteína Fbx117 em células tumorais. **B)** Validação pelo método de *FISH* (*Fluorescence in situ hybridization*) dos truncamentos encontrados no gene *FBXL17* utilizando sonda verde na região 5' do gene, ou vermelha na região 3' do gene. Em azul temos a representação de 5 e a seta vermelha o cromossomo 5 com truncamentos em *FBXL17*. Em branco temos a representação de *FBXL17* íntegro. Imagem adaptada de (Mason et al., 2019).

Sendo assim, a sugestão da importância do papel da Fbx117 no desenvolvimento tumoral surgiu quando foram identificadas modificações no gene *FBXL17* em uma grande diversidade de células tumorais descritas (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Rearranjos genômicos e mutações em FBXL17 (Baca et al., 2013; Bignell et al., 2010; Curtis et al., 2012; Robinson et al., 2011; Stephens et al., 2009).

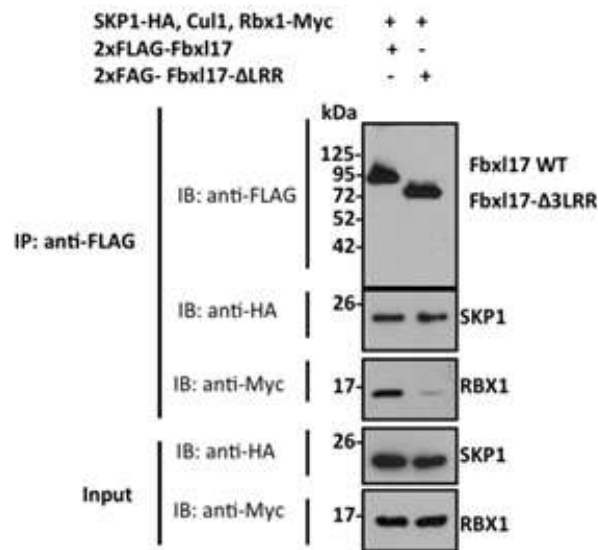
Mutation	Genes	Cancer	Study	Comment	Reference
<b>Survey</b>					
breaks*	<i>FBXL17</i>	breast	array-CGH, 1992 T	breaks in 7% cases	Curtis et al. (2012)
<b>Individual cases</b>					
inversion	<i>FBXL17</i>	breast	35 T	intron 2 to intron 3 (0.6 kb)	Yang et al. (2013)
deletion	<i>FBXL17</i>	breast, HCC1395 cell line	WGS, 9 C + 15 T	intron 6 to intron 8 (173 kb)	Stephens et al. (2009)
fusion	<i>FBXL17-PJA2</i>	breast, HCC38 cell line	WTS, 49 C + 40 T	exon 1 of <i>FBXL17</i> fused to exon 2 of <i>PJA2</i>	Robinson et al. (2011)
break	<i>FBXL17</i>	breast, BT474 cell line	Array-CGH	break in intron 6, extra copy 3' end	Bignell et al. (2010)
fusion	<i>PAIP2-FBXL17</i>	oesophageal adenocarcinoma	WGS, 16 T (49 x)	exon 2 of <i>PAIP2</i> fused to exon 8 of <i>FBXL17</i>	Dulak et al. (2013)
fusion	<i>FBXL17-HPSE2</i>	oesophageal adenocarcinoma	WGS, 16 T (49 x)	exon 7 of <i>FBXL17</i> fused to exon 4 of <i>HPSE2</i>	Dulak et al. (2013)
deletion	<i>FBXL17</i>	oesophageal adenocarcinoma	WGS, 16 T (49 x)	within intron 7 (1.3 kb)	Dulak et al. (2013)
break	<i>FBXL17</i>	oesophageal carcinoma, OE19	Array-CGH	break about intron 7, extra copy 5' end	Bignell et al. (2010)
unpredictable	<i>FBXL17</i>	prostate	WGS, 57 T (61 x)	5 junctions in intron 6	Baca et al. (2013)
unpredictable	<i>FBXL17</i>	prostate	WGS, 57 T (61 x)	3 junctions in introns 1, 6 and 4	Baca et al. (2013)

**Legenda:** (C) número de linhagens celulares; (T) amostras de tumor; WTS (*whole transcriptome sequencing*); WGS (*whole genome sequencing*); entre parênteses o número de vezes reportado; *unpredictable*- múltiplos rearranjos.

Uma vez que o domínio LRR das proteínas Fbxl são os responsáveis por garantir especificidade ao complexo SCF(Fbx17), mutações nessa região impactarão diretamente na interação da Fbxl com seus substratos, gerando um desequilíbrio na ubiquitinação e posterior degradação ou modulação de funções desses alvos. A Fbx17 foi relacionada ao desenvolvimento tumoral em um estudo que demonstra a proteína Sufu como substrato canônico do complexo SCF(Fbx17) (Raducu et al., 2016). E foi observada a presença de mutações em Fbx17 nas amostras de pacientes com câncer de mama e esôfágico gástrico. Assim, esperamos que a presença de truncamentos no domínio LRR de Fbx17 cause impacto na interação e ubiquitinação de seus substratos, ocasionando um acúmulo e/ ou comprometendo suas funções, favorecendo a etiologia de diversas doenças.

No trabalho que desenvolvemos em colaboração com o grupo da Dra. Heike Laman, foi possível constatar que mutações no domínio LRR de Fbx17 reduzem a estabilidade dos complexos SCF(Fbx17) mutantes. Observamos uma baixa recuperação da proteína Rbx1 na

amostra purificada onde houve co-transfecção com a construção mutante, o que por conseguinte levou a formação de um complexo instável (**Figura 8**).



**Figura 8.** Imunoprecipitação dos complexos SCF(Fbx17) e SCF(Fbx17- $\Delta$ 3LRR). Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados e seus lisados foram imunoprecipitados com resina agarose anti-FLAG. Os eluídos com o peptídeo FLAG foram resolvidos em SDS-PAGE e revelados com os anticorpos destacados. Imagem adaptada de (Mason et al., 2019).

#### 1.4 Identificação de substratos de proteínas F-box

Como mencionado anteriormente, a ubiquitinação é um processo fundamental para a manutenção da homeostase celular. Uma vez ubiquitinado, o substrato pode ser direcionado para degradação via proteassoma, como também, pode ter sua função modulada, impactando interações proteína-proteína e localização celular. Portanto, a ocorrência de falhas no processo de ubiquitinação possui potencial para desencadear o surgimento de patologias causadas a nível proteico, incluindo fibrose cística, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, câncer, dentre outras (Loch et al., 2011). Como mutações em E3 ubiquitina-ligases possuem potencial para ocasionar o desenvolvimento e progressão de várias doenças, a identificação de substratos de E3 ubiquitina-ligases específicas se tornou uma ferramenta fundamental na busca de novas terapias.

O processo de identificação de substratos de E3 ubiquitina-ligases, no entanto, é um processo árduo e desafiador. A presença de interações transitentes entre E3 ligases com seus

substratos, dificulta o uso de técnicas convencionais como ensaios baseados em imunoprecipitações (IPs), fundamentado na interação proteína-proteína após lise celular, sendo incapazes de detectar alguns tipos de substratos (Rayner et al., 2019). Por se tratar de um processo reversível, a atividade de deubiquitinasas (DUBs) agregam uma dificuldade adicional ao processo de identificação de substratos, bem como o fato de que um substrato pode ser ubiquitinado por mais de um tipo de E3 ligase, redundância que faz com que seja necessário à validação de pares substrato/E3 ligases específicos (Clague et al., 2013; Morishima et al., 2008). Portanto, estima-se que apenas cerca de 15% das proteínas ubiquitinadas foram caracterizadas como substratos de E3 ligases específicas (Rayner et al., 2019).

Diversos métodos baseados na interação proteína-proteína surgiram para auxiliar na identificação de substratos de E3 ubiquitina-ligases. Dentre eles, o sistema de duplo híbrido (*Yeast two-hybrid* – *Y2H*) pode ser empregado para identificação de interação proteína-proteína *in vivo* usando leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Esse método se baseia na reconstituição de um fator transcricional, o Gal4 como exemplo, que apresentará seus domínios de ligação ao DNA e de ativação de transcrição fisicamente separados. Estes domínios são clonados separadamente em fusão com proteínas de interesse, havendo a formação de dois híbridos e a interação entre essas proteínas propicia a restituição do fator de transcrição, permitindo assim a transcrição do gene repórter de escolha (Iconomou & Saunders, 2016).

Os métodos abalizados em análises proteômicas foram um grande avanço para a identificação de ligantes e substratos de E3 ligases, dentre esses, a purificação por afinidade acoplado à espectrometria de massas é largamente empregada para identificação de ligantes do complexo (Rayner et al., 2019). Outra técnica utilizada para a identificação de substratos é o ensaio de ubiquitinação *in vitro* acoplado a uma biblioteca de *phage display*, método bastante útil no estudo de interação proteína-proteína, proteína-peptídeo e proteína-DNA. Essa técnica faz uso de bacteriófagos lisogênicos e filamentosos que apresentam em sua superfície polipeptídeos (Bazan et al., 2012; Guo et al., 2013).

Por fim, os microarranjos de proteínas em ensaios para identificação de substrato do complexo SCF já se mostrou eficiente em estudos anteriores. O processo se baseia em um protocolo de ubiquitinação *in vitro* em larga escala usando como fonte de substratos os microarranjos de proteínas que possuem aproximadamente 9.500 proteínas humanas nativas

imobilizadas em duplicata em cada *slide*. Essa metodologia foi empregada para a identificação de novos substratos do complexo SCF(Fbxo7), onde um total de 338 alvos foram identificados como possíveis substratos do complexo. Dentre esses alvos, Gsk3 $\beta$  (*Glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ), proteína capaz de fosforilar  $\alpha$ -sinucleína, e Tomm20 (*Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20*), uma translocase mitocondrial, foram validadas como substrato do complexo SCF(Fbxo7) (Teixeira et al., 2016). Essa descoberta demonstrou que SCF(Fbxo7) é capaz de ubiquitinar duas proteínas que estão associadas ao processo patológico da doença de Parkinson. A mesma técnica foi utilizada para a identificação de substratos do complexo SCF(Fbxo25), onde ELK1 (*ETS domain containing protein ELK-1*), foi identificada e validada como substrato canônico do complexo, mostrando assim que Fbxo25 age como regulador negativo da via de sinalização MAPK através da ubiquitinação e posterior degradação de ELK1 (Teixeira et al., 2017).

Técnicas de ubiquitinação *in vitro* em larga escala usando microarranjos de proteínas fornece uma lista de possíveis substratos que requerem validações. Isso possibilita com que haja a investigações do envolvimento das E3 ligases modulando vias de sinalização através da ubiquitinação de seus substratos específicos, abrindo assim novas perspectivas para o envolvimento de E3 ligases na etiologia de doenças humanas.

## OBJETIVOS

---

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Identificar substratos e ligantes de Fbx117 utilizando microarranjos de proteínas;

### 2.2 Objetivos específicos

- Expressar e purificar os complexos SCF(Fbx117) e SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e da proteína mutante Fbx117- $\Delta$ F-box em células HEK293T;
- Realizar ensaios de ubiquitinação *in vitro* para verificação da atividade dos complexos purificados;
- Realizar ensaios de ubiquitinação *in vitro* utilizando microarranjos de proteína como fonte de substratos;
- Identificar substratos diferencialmente ubiquitinados pelo complexo SCF(Fbx117) através de análises *in silico*;
- Realizar o enriquecimento funcional dos alvos obtidos com base em sua via biológica de atuação e localização celular;
- Validar a interação entre os alvos selecionados e a proteína Fbx117.

## MATERIAL E MÉTODOS

---



### 3 Material e métodos

#### Lista de plasmídeos

- peGFP-N1 – Gentilmente doado pela Profa. Dra. Heike Laman;
- pcDNA3.1-Myc-Rbx1 – Gentilmente doado pelo Prof. Dr. Marcelo D. Gomes;
- pcDNA3-Cullin1 – Gentilmente doado pelo Prof. Dr. Marcelo D. Gomes;
- pcDNA3-DDB1-FLAG – Gentilmente doado pela Profa. Dra. Svetlana Khoronenkova;
- pcDNA3-FLAG-Fbx117 – Gentilmente doado pela Profa. Dra. Heike Laman;
- pcDNA3-FLAG-Fbx117- $\Delta$ 3LRR – Gentilmente doado pela Profa. Dra. Heike Laman;
- pcDNA3-FLAG-Fbx117- $\Delta$ F-box – Gentilmente doado pela Profa. Dra. Heike Laman;
- pcDNA3-HA – Gentilmente doado pela Profa. Dra. Heike Laman;
- pcDNA3-HA-SKP1 – Gentilmente doado pelo Prof. Dr. Marcelo D. Gomes;
- pcDNA3-SUFU-HA – Gentilmente doado pelo Prof. Dr. Vincenzo D'Angiolella;
- pcDNA3-Ubiquitina-HA – Gentilmente doado pela Profa. Dra. Heike Laman;
- pDNR-LIB-RAD51AP1 – Adquirido comercialmente (*Horizon*, #MHS6278-202840143);
- pCMV6-Entry-LSM4-Myc – Adquirido comercialmente (*Origene*, #RC201769);
- pCMV-SPORT6 -SIP1 – Adquirido comercialmente (*Horizon*, #MHS1010-202737370);
- pCMV-SPORT6 -SNRPB2 – Adquirido comercialmente (*Horizon*, #MHS6278-202758864);
- pCMV-Ubiquitina-Myc – Gentilmente doado pelo Prof. Dr. Marcelo D. Gomes;
- pEGFP-C1-SRSF9 – Gentilmente doado pelo Prof. Dr. Gustavo Bressan;
- pCMV-SPORT6 -HMCES – Adquirido comercialmente (*Horizone*, #MHS6278-202759729);
- pMT-E1A – Gentilmente doado pelo Prof. Dr. Gustavo Bressan;

#### 3.1 Cultura de células

Para os ensaios descritos abaixo foram utilizadas três linhagens celulares distintas, incluindo HEK293T (*Human embryonic kidney 293T cells*), U2OS (*Human bone osteosarcoma*

*epithelial cells*) e MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*), sendo esta última uma linhagem tumoral de câncer de mama. As células foram cultivadas em meio DMEM *high glucose* (*Corning*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Gibco*), penicilina (60 µg/mL), streptomina (100 µg/mL) e L-glutamina (0,292 mg/mL) (*Thermo Fisher Scientific*) e incubadas a 37 °C sob atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Para passagens celulares, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X (*Phosphate buffered saline, HyClone*) e soltas da placa de Petri (100x20 mm, *Corning*) com auxílio de tripsina (*TrypLe Express, Thermo Fisher Scientific*).

### **3.2 Purificação dos complexos SCF(Fbx117), SCF(Fbx117-Δ3LRR) e a construção mutante Fbx117-ΔF-box**

A purificação dos complexos foi feita em células HEK293T e quando o cultivo celular atingiu uma confluência de aproximadamente 80%, as células foram transfectadas usando uma quantidade total de 15 µg de DNA plasmidial, sendo 6 µg de FLAG-Fbx117 ou FLAG-Fbx117-Δ3LRR ou FLAG-Fbx117-ΔF-box + 3 µg de Cullin1 + 3 µg de HA-SKP1 + 3 µg de Myc-Rbx1. O DNA foi diluído em 100 µL de meio DMEM incompleto e posteriormente, foram adicionados à solução 45 µL do reagente de transfecção PEI (Polietilenoimina, 1 mg/mL, pH 7,2), obedecendo a uma proporção de 1 µg de DNA : 3 µL de PEI para o protocolo de transfecção em células HEK293T. Após a adição de todos os componentes, a solução foi agitada brandamente por 10 s, e mantida em repouso por 15 min a temperatura ambiente (T.A.). Em seguida, foram adicionados o volume total da solução às placas e após 5 h de transfecção, o meio de cultivo foi trocado, para que houvesse a remoção do PEI. A cultura foi então mantida na incubadora por 48 h a 37 °C em atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram coletadas e lisadas por 30 min no gelo em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7,2; KCl 225 mM; NP40 1%) com adição do coquetel de inibidores de proteases (*SIGMA FAST, Sigma Aldrich*) juntamente com os inibidores de fosfatases NaF 5 mM (*Sigma Aldrich*) e Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 10 mM (*Sigma Aldrich*). Após a lise, os extratos foram centrifugados a 16.900 *x g* por 20 min a 4 °C para a obtenção dos sobrenadantes clarificados. Os extratos proteicos totais (*inputs*) de cada amostra foram quantificados pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e preparadas para serem submetidas a imunoprecipitação (IP) para purificação dos complexos.

Para a purificação, foi usada a resina ANTI-FLAG® M2 *Affinity Gel* (#A2220, *Sigma*), visto que as construções, selvagem e mutantes, da Fbx117 possuem o tag FLAG. Para a IP

foram utilizados 33 mg de proteína total que foram submetidas a 4 h de incubação com a resina sob agitação rotacional branda a 4 °C. Em seguida, a resina foi lavada quatro vezes usando o mesmo tampão de lise celular, e duas vezes com o tampão de eluição FLAG (HEPES 10 mM pH 7,9; MgCl<sub>2</sub> 15 mM; KCl 225 mM; NP40 0,1%). A eluição dos complexos foi feita utilizando o peptídeo FLAG a 300 µg/mL (#F4799, *Sigma*) por 1 h 30 min a 4 °C, sob agitação branda. Finalmente, uma fração do eluído e do *input* foram resolvidos em SDS-PAGE 12 % e analisados por *western blot* utilizando os anticorpos necessários.

O volume restante do eluído foi armazenado à -20 °C em glicerol 15% para os ensaios posteriores de ubiquitinação *in vitro*. Paralelamente, uma fração dos eluídos foram utilizadas para quantificação proteica através da análise densitométrica usando o cálculo da intensidade de sinal obtido pela banda presente no gel corado com *Pierce Silver Stain Kit* (#24612, *Thermo Scientific*), e utilizando amostras de BSA purificada como padrão (0,03125 µg a 0,5 µg). Para a densitometria foi utilizado o *software* ImageJ, o qual fornece o cálculo da área do gráfico obtido pela intensidade de sinal de cada banda presente no gel (Schneider et al., 2012). O valor da densitometria foi representando como “y” do gráfico da curva padrão e a quantidade de BSA como “x”. Dessa forma obtivemos uma equação no formato destacado abaixo para quantificar o complexo purificado. Sabendo que a massa molecular do complexo SCF(Fbx17) é de aproximadamente 184,734 x 10<sup>3</sup> Da, a do complexo SCF(Fbx17-Δ3LRR) é de cerca de 173,539 x 10<sup>3</sup> Da e a massa molecular da construção mutante Fbx117-ΔF-box é de aproximadamente 75,695 x 10<sup>3</sup> Da, foi possível ser feito o cálculo da concentração molar dos purificados seguindo a equação abaixo:

$$\text{Concentração (M)} = \frac{\text{Massa (g)}}{\text{Massa molecular (Da)} \times \text{Volume (L)}}$$

**Equação 1.** Equação para o cálculo do complexo purificado

### 3.3 Ubiquitinação *in vitro* dos complexos purificados de células HEK293T

Os complexos SCF(Fbx17) e SCF(Fbx17-Δ3LRR), e a construção mutante Fbx117-ΔF-box foram utilizados nas reações de ubiquitinação *in vitro*. Para isso, foi feito um *mix* de ubiquitina conforme **Tabela 2**, contendo os reagentes essenciais para todas as etapas da reação de ubiquitinação. O ATP, essencial para ativação da ubiquitina, não foi adicionado ao *mix* devido aos controles negativos realizados conforme **Tabela 3**.

**Tabela 2.** Composição do *mix* de ubiquitinação.

Reagentes	Concentração necessária
Tampão de ubiquitinação 10X	1X
E1	100 nM
E2 (UbcH5a)	500 nM
Ubiquitina	20 nM
Água ultrapura	Completar volume final de 3,57 $\mu$ L/reação

**Tabela 3.** Reação de ubiquitinação *in vitro* usando os complexos purificados.

Reação de ubiquitinação <i>in vitro</i>					
Componentes	1	2	3	4	5
Ub <i>mix</i> ( $\mu$ L)	3,57				
ATP (mM)	2	-	2	2	2
SCF(Fbx117) (nM)	-	10	10	-	-
SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) (nM)	-	-	-	10	-
Fbx117- $\Delta$ F-box (nM)	-	-	-	-	10
Água ultrapura	<b>Completar volume final para 10 <math>\mu</math>L por reação</b>				

A reação procedeu por 1 h e 30 min a 30 °C, e em seguida, as amostras foram resolvidas em SDS-PAGE 10% e analisadas por *western blot*. A atividade do complexo foi determinada pela densitometria do arraste, referente a poliubiquitinação, após ser feita a incubação da membrana com o anticorpo anti-ubiquitina (Teixeira et al., 2016).

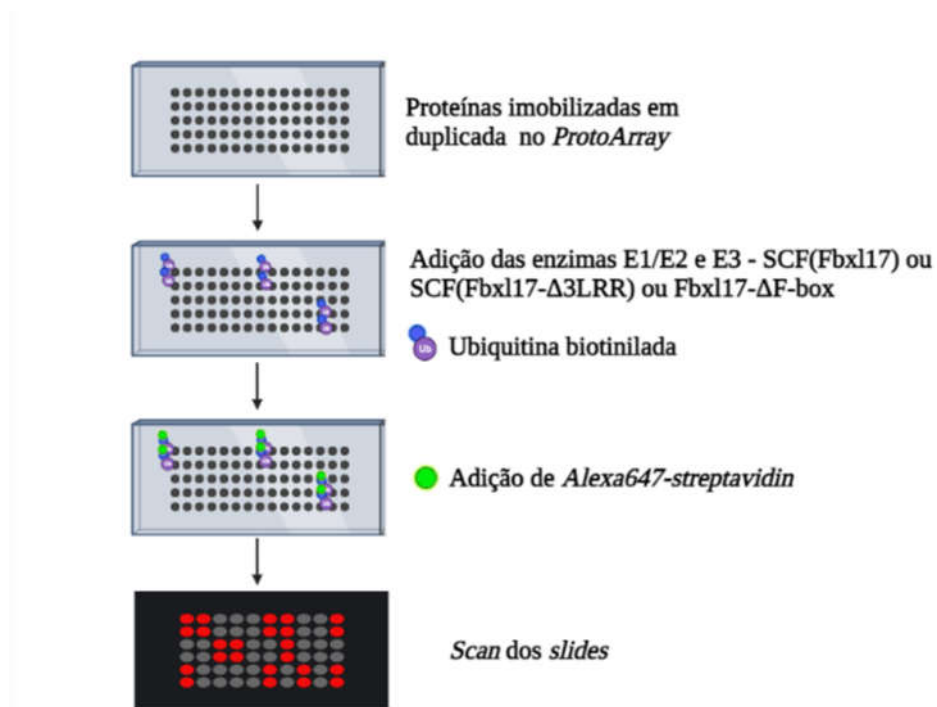
### 3.4 Ensaio de ubiquitinação *in vitro* usando microarranjos de proteína (*Protoarrays*) como fonte de substrato

Os *slides* de *ProtoArray*® *HumanProtein* foram adquiridos comercialmente sendo compostos por mais de 9.000 proteínas *full-length* humanas únicas e nativas, purificadas e imobilizadas em duplicata, sob condição não-desnaturante em membrana de nitrocelulose que reveste as lâminas de vidro. O experimento foi realizado de acordo com as especificações do fabricante (*Protoarray*® v5.1, *Invitrogen*, CA, USA).

Cada *slide* foi incubado em *Protoarray*® *Synthetic Block* por 1 hora a 4 °C sob agitação branda. Durante esse período de incubação, foram preparadas as reações que possuíam volume

final de 120  $\mu\text{L}$  contendo 25 nM de cada um dos purificados [SCF(Fbx117), ou SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) ou Fbx117- $\Delta$ F-box], combinados com o *mix* de ubiquitina [E1 (100 nM), UbcH5a (500 nM), Mg-ATP (2 mM), e ubiquitina-biotina (0,1 mg/mL) em tampão de ubiquitinação 1X (*Boston Biochem*)].

Após 1 h de incubação, as lâminas foram lavadas com o *Assay buffer* (AB - Tris 50 mM, pH 7,5; NaCl 50 mM;  $\text{MgSO}_4$  5 mM; Tween 20 0,1%; BSA 1% e DTT 1 mM, filtrado em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ ) e foram adicionados 110  $\mu\text{L}$  da reação em cada *slide*. As lâminas foram então cobertas com uma lamínula com bordas, e foi feita a incubação dos *arrays* por 1 h e 30 min a 30  $^\circ\text{C}$  em atmosfera húmida. Em seguida, as lâminas foram lavadas com 0,5% de SDS filtrado em 0,22  $\mu\text{m}$  e AB para serem então incubadas com 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de *streptavidin-AlexaFluor 647* por 90 min sob agitação branda a 4  $^\circ\text{C}$ . Os *arrays* foram lavados novamente com AB, e uma vez com água destilada a temperatura ambiente, e foram secados por meio de centrifugação a 1.000 x g por 2 min (**Figura 9**). Finalizando esse processo, os *arrays* foram escaneados com auxílio do aparelho *GenePix Personal 4000BA* (*Axon-Molecular Devices*) no Laboratório do prof. Dr. Gustavo H. Goldman na FCFRP-USP usando os parâmetros recomendados pelo fabricante.



**Figura 9.** Representação esquemática da metodologia empregada no experimento de ubiquitinação *in vitro* em larga escala usando os *Protoarrays* como fonte de substrato.

### 3.5 Aquisição dos dados dos *Protoarrays* e análises *in silico*

Para obtenção dos dados de leitura do *Protoarray*®, foi utilizado o *software GenePix Pro 4.1 (Molecular Devices)*. O *design* experimental foi feito usando duas replicatas biológicas de 25 nM dos complexos SCF(Fbx117), SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) ou o mutante Fbx117- $\Delta$ F-box, incapaz de formar complexo. Além das duas replicatas biológicas, cada *slide* possuía duas replicatas técnicas de cada proteína imobilizada. As lâminas usadas continham um total de 3.558 *spots* de controles negativos e 576 *spots* de controles positivos, todos em duplicata. O valor da intensidade de cada *spot* presente no *slide* analisado foi considerado como a média da intensidade de sinal de todos os *pixels* em uma região delimitada do *spot* subtraído pela intensidade da mediana dos *pixels* que rodeiam a região delimitada do *spot* analisado (*background* local). A subtração da intensidade do *background* foi submetida a uma normalização para fazer com que esse valor fosse diretamente comparado entre lâminas diferentes de *Protoarray*® (replicatas e condições). Supondo que todos os controles positivos presentes nos *slides* apresentam a mesma intensidade de sinal teórica entre as replicatas, os valores de correção do *background* foram obtidos e um único valor de centralização por lâmina (usado como normalizador) foi definido como a média de todos os *spots* referentes a todos os controles positivos presentes nos *slides*. Uma normalização adicional foi feita em lâminas diferentes, onde o valor geral do controle positivo foi obtido pela média de todos os fatores de centralização presentes em uma lâmina. Posteriormente, todos os *spots* analisados presentes no *array* tiveram a subtração da intensidade do *background* corrigida por esse fator geral usando os controles positivos. Possibilitando assim a comparação das intensidades normalizadas entre os *spots*.

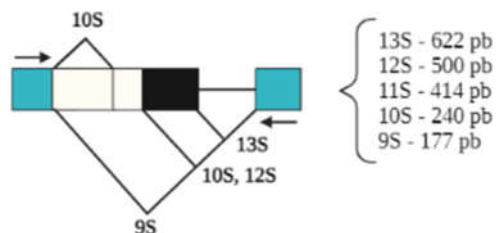
Finalmente, para determinar se o *spot* possuía intensidade de sinal estatisticamente significativa, foram usados todos os *spots* referentes aos controles negativos para estimar a distribuição da densidade nula não paramétrica (NC) para cada *slide* por meio de um estimador de densidade de núcleo Gaussiano. O valor da intensidade que engloba a grande maioria da massa de probabilidade nula foi escolhido como ponto de corte ( $c$ ) para cada lâmina:  $P(NC > c) = 0,001$ . Cada *spot* selecionado como possível substrato deveria apresentar uma intensidade do complexo selvagem ( $I_{wt}$ ) superior ao seu ponto de corte ( $c_{wt}$ ) e ao mesmo tempo apresentar a intensidade de sinal do mutante Fbx117- $\Delta$ F-box possuindo intensidade de sinal ( $I_{AF}$ ) inferior ao seu ponto de corte ( $c_{AF}$ ), na primeira análise. Na segunda análise, os substratos que foram considerados potenciais substratos exclusivos do complexo selvagem, SCF(Fbx117), e negativo para o complexo mutante SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e negativo também para Fbx117- $\Delta$ F-

box, deveriam apresentar intensidade de sinal do complexo selvagem ( $I_{wt}$ ) maior que o seu ponto de corte ( $c_{wt}$ ) ao passo que as intensidades de sinais dos mutantes ( $I_{AF}$  e  $I_{A3}$ ) deveriam ser inferior ao ponto de corte ( $c_{AF}$  e  $c_{A3}$ ). Somente proteínas que atendiam a esses critérios foram consideradas como possíveis alvos nas análises 1 e 2. Toda a análise dos *arrays* para identificação dos alvos foi realizada em colaboração com a Prof. Dra. Tie Koide da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)-USP.

A lista de proteínas obtidas com ambas as análises foi submetida a um enriquecimento funcional utilizando o *DAVID Bioinformatics Resources v6.8*, usando o proteoma humano presente no próprio banco de dados como *background*. Também foi utilizado o REACTOME para enriquecimento funcional agrupando os alvos em relação à sua via de atuação.

### 3.6 Ensaio de *splicing in cellulo*

Para o ensaio de *splicing* usamos o minigene repórter de *splicing E1A*. O minigene é expresso durante a replicação viral do adenovírus e dependendo da fase de infecção viral, são expressas proteínas distintas geradas por meio do *splicing* alternativo de *E1A*. São transcritas três isoformas principais (13S, 12S e 9S) produto do *splicing* alternativo do mRNA de *E1A*, e duas isoformas (11S e 10S) que são geradas em menor proporção, produto do *splicing* duplo do minigene (Cáceres et al., 1994).



**Figura 10.** Padrão de *splicing* alternativo sofrido pelo gene *E1A* para geração dos mRNA 13S, 12S, 11S, 10S e 9S. Imagem adaptada de (Bressan et al., 2009).

O ensaio foi realizado em células HEK293T e MCF7 cultivadas em placas de 6 *wells* (34,8 mm, *Corning*). Quando a cultura atingiu uma confluência de aproximadamente 80%, as células foram então transfectadas usando o agente de transfecção PEI, seguindo a mesma metodologia de transfecção descrita anteriormente. Para cada *well*, a quantidade total de DNA

plasmidial transfetado foi de 3 µg, possuindo a composição e quantidade de cada plasmídeo dependendo do grupo analisado, sendo realizadas três replicatas por grupo.

- Grupo 1: 0,5 µg de vetor vazio (pcDNA3) + 1,0 µg de EGFP + 1,5 µg de E1A;
- Grupo 2: 1,5 µg de vetor vazio (pcDNA3) + 1,5 µg de E1A;
- Grupo 3: 0,5 µg de Fbx117 + 1,0 µg de EGFP + 1,5 µg de E1A;
- Grupo 4: 1,5 µg de Fbx117 + 1,5 µg de E1A.

Após 24 h de transfecção, o RNA total das células foi extraído usando *SV total RNA isolation system Kit* (#Z3105, *Promega*) e o protocolo foi feito segundo recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas com o auxílio do *Qubit3™ Fluorometer* (*Invitrogen*) usando o *kit* de quantificação de amostras de RNA *Labeling & Detection Qubit™ RNA HS assay kit* (#Q32852, *Invitrogen*). Para o cDNA foram utilizados 300 ng de RNA, e o processo para obtenção de cDNA foi realizado usando o *High capacity cDNA reverse transcription kit* (#00567912, *Applied biosystems*), seguindo as recomendações do fabricante.

Finalmente, a PCR foi feita para visualização do padrão de bandas obtida pelo *splicing* alternativo do minigene *E1A*. Foram usados o conjunto de primers 5'-ATTATCTGCCACGGAAGGTGT-3' *forward* e 5'-GGATAGCAGGCGCCATTTTA-3' *reverse* para amplificação do minigene. Também foi realizada a PCR para amplificação do GAPDH, usado como normalizador, com o conjunto de *primers* 5'-TGCTGATGCCCCCATGTTTCG-3' *forward* e 5'-TGCAGGAGGCATTGCTGATGA-3' *reverse*. As ciclagens utilizadas estão descritas a seguir (**Tabela 4**). A quantificação de cada isoforma foi feita usando o *software ImageJ*. As intensidades de sinal de todas as isoformas presentes na amostra foram somadas, essa soma foi definida como 100% e utilizada na normalização da intensidade de sinal de cada banda calculada.



**Tabela 4.** Ciclagem usada na PCR do ensaio de *splicing* alternativo do minigene E1A.

E1A			GAPDH		
°C	Tempo	Ciclagem	°C	Tempo	Ciclagem
95	2 min	1	95	2 min	1
95	30 seg	40	95	30 seg	40
50	30 seg				
72	1 min				
72	1 min	1	72	1 min	1
4	∞		4	∞	

Um volume de 5 µL de RNA de cada amostra foi utilizado para corrida em gel de agarose 1,5% para avaliação da integridade do RNA extraído. Para isso, o RNA foi aquecido a 65 °C por 5 min com intuito de desfazer qualquer estrutura tridimensional. O restante do RNA extraído foi mantido a -80 °C para análises posteriores.

### 3.7 Ensaios de co-imunoprecipitação

Para avaliar se os alvos selecionados eram substratos do complexo, foram realizados ensaios de interação em células HEK293T, pois para haver ubiquitinação mediada pelo complexo SCF(Fbx117), o substrato precisa primeiramente interagir com a proteína Fbx117. As células foram mantidas em placas de Petri 10 x 20 mm (*Corning*) e quando atingiram uma confluência de 80%, as células foram transfectadas de acordo com o protocolo descrito no item 3.2. Para isso, foram utilizados 10 µg de DNA plasmidial total, sendo 5 µg do plasmídeo codificante para Fbx117 ou seus mutantes em fusão com FLAG ou pcDNA 3, como controle negativo, juntamente com igual quantidade dos alvos selecionados, sendo eles: SIP1-HA (*GEMIN2/Gem-associated protein 2*), SNRPB2-HA (*U2 small nuclear ribonucleoprotein B*), SRSF9-EGFP1 (*Serine/arginine-rich splicing factor 9*), LSM4-Myc (*U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4*), HMCES-HA (*Abasic site processing protein HMCES*), RAD51AP1-HA (*RAD51-associated protein 1*) e DDB1-FLAG (*DNA damage-binding protein 1*). Os alvos testados no ensaio de interação foram co-transfectados com o vetor vazio (pcDNA3) ou com

FLAG-Fbx117, em alguns casos foram também utilizadas as construções mutantes FLAG-Fbx117- $\Delta$ 3LRR e FLAG-Fbx117- $\Delta$ F-box para avaliar a interação dos alvos com os mutantes.

As células foram coletadas e centrifugadas a  $5.000 \times g$  por 5 min e lisadas em tampão de lise gelado (20 mM HEPES pH 7,5; 5 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Triton-X100; com adição do coquetel de inibidores de proteases e fosfatase). Após a ressuspensão do *pellet* de células no tampão de lise, o conteúdo foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em água a temperatura ambiente por três vezes seguidas. O lisado foi mantido por 30 min no gelo, tendo o período de incubação cronometrado a partir do início do processo de congelamento e descongelamento. Em seguida, foi feita a adição de NaCl para uma concentração final de 150 mM em cada amostra e o lisado foi centrifugado a  $16.900 \times g$  por 20 min, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante que continha o extrato proteico foi recuperado e armazenado em microtubos limpos de 1,5 mL (Mena et al., 2018). O extrato proteico total (*input*) de cada amostra foi quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e preparados para serem submetidos à imunoprecipitação.

Para o ensaio de IP, foram utilizadas quantidades iguais de proteína de cada amostra sendo utilizada a resina *ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel* (#A2220, *Sigma*) ou *EZview™ Red Anti-HA Affinity Gel* (#E6779, *Sigma*). Antes de iniciar o processo de imunoprecipitação, a resina foi lavada três vezes com o mesmo tampão utilizado na lise celular, sendo alíquotada de modo que cada amostra recebesse aproximadamente 15  $\mu$ L de resina. Após a adição do extrato proteico à resina, foi feita a incubação da IP sob agitação rotacional branda durante um período de 3 h, a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 30 s,  $16.900 \times g$  a 4 °C, e o sobrenadante foi retirado e descartado. A resina foi então lavada quatro vezes com tampão de lise e duas vezes com tampão de eluição (HEPES 10 mM, pH 7,9; KCl 225 mM MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e NP40 0,1%). Finalmente, foi feito a eluição com 300  $\mu$ g/mL de peptídeo FLAG (#F4799, *Sigma*), para a IP utilizando a resina anti-FLAG ou, 300  $\mu$ g/mL de peptídeo HA (#I2149, *Sigma*), para a IP onde a resina agarose anti-HA foi usada, em tampão de eluição. As amostras foram mantidas por 1 h a 4 °C sob agitação branda. Ao final do protocolo, as amostras foram centrifugadas por 30 s,  $16.900 \times g$ , 4 °C, e os sobrenadantes (eluídos) foram coletados. Os *inputs* e os eluídos de todas as amostras foram resolvidos em SDS-PAGE 10% e analisados por *western blot* utilizando os anticorpos específicos.

### 3.8 Ensaios de ubiquitinação em células

Células HEK293T foram transfectadas, conforme **item 3.2**, com 9 µg de DNA plasmidial total por placa, sendo 3 µg de cada um dos plasmídeos necessários. Foram feitos ensaios de ubiquitinação mediada por SCF(Fbx117) dos alvos SNRPB2 e DDB1, onde foi realizada a co-transfecção do vetor vazio (pcDNA3) ou FLAG-Fbx117, juntamente com o plasmídeo da proteína alvo e ubiquitina-myc. No caso da SNRPB2, pelo fato dela possuir o tag HA, também usamos as construções mutantes da FLAG-Fbx117-Δ3LRR e FLAG-Fbx117-ΔF-box para o ensaio de ubiquitinação.

A cultura foi incubada por 36 h após transfecção e 6 h antes da lise as células foram tratadas com 10 µM do inibidor de proteassoma MG132 (*Carbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucine*) (*Boston Biochem*) diluído em meio DMEM completo, seguindo o protocolo usado por (Teixeira et al., 2016). Esse tratamento visa o acúmulo das proteínas ubiquitinadas facilitando sua detecção por imuniprecipitação. O protocolo de lise e IP foram os mesmos utilizados nos ensaios de interação descritos no **item 3.7**. A resolução do *input* e do eluído foi feita em SDS-PAGE 10% ou 8% e analisados por *western blot*. Para visualização das proteínas ubiquitinadas, foi utilizando anticorpo anti-myc para detecção das cadeias de ubiquitina inseridas nos substratos.

#### Lista de anticorpos

- Anti-Cullin 1 (1:1.000) – *Cell signalling* (#4995);
- Anti-Fbx117 (1:1.000) – *Thermo Fisher Scientific* (#PA5-57647);
- Anti-GAPDH (1:10.000) – *ABClonal* (#AC002);
- Anti-GFP (1:1.000) – *ABClonal* (#AE012);
- Anti-HA (6E2) (1:1.000) – *Cell signaling* (#2367);
- Anti-HA (C29F4) (1:1.000) – *Cell signaling* (#3724);
- Anti-Myc (1:1.000) – *Cell signaling* (#2272);
- Anti-ubiquitina (P4D1) (1:1000)- *Cell signaling* (#3936)
- IgG-Mouse (1:7.500) – *KPL Peroxidase-labeled antibody to Mouse IgG (H+L) (Human serum absorbed), Sera care* (#074-1806);

- *IgG-Rabbit (1:7.500) – KPL Peroxidase-labeled antibody to Rabbit IgG (H+L) (Human serum absorbed), Sera care (#074-1516).*

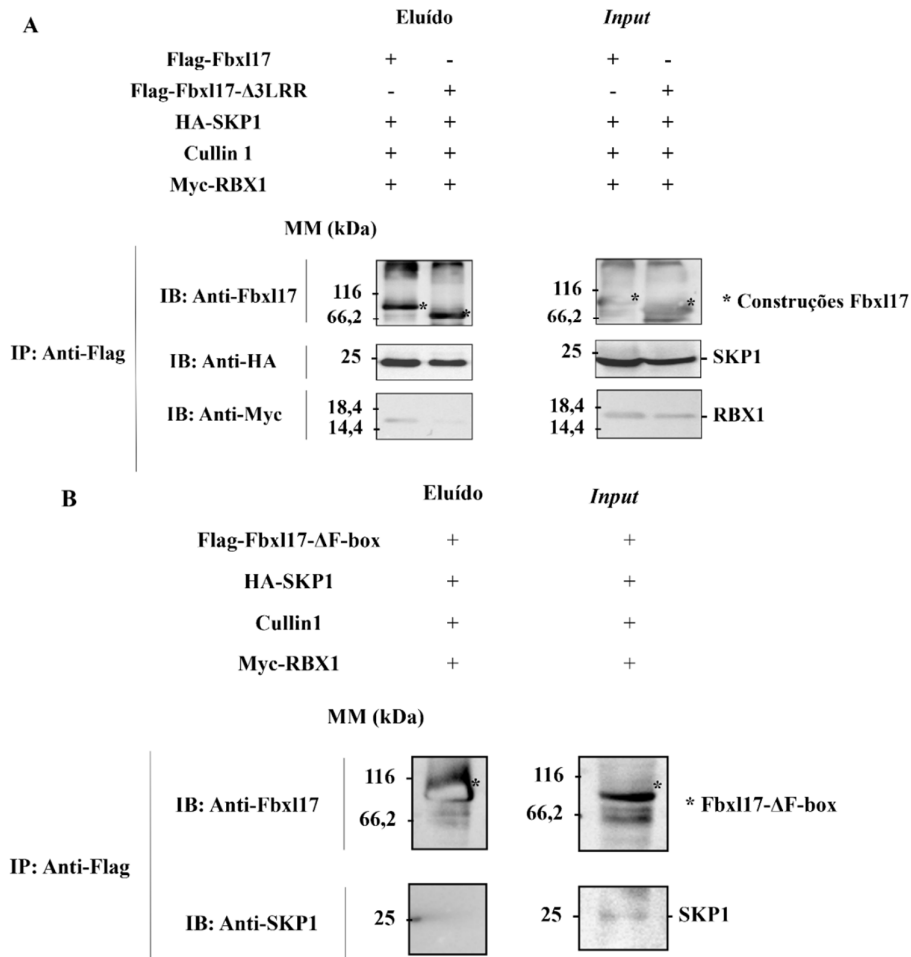
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

## 4 Resultados e discussão

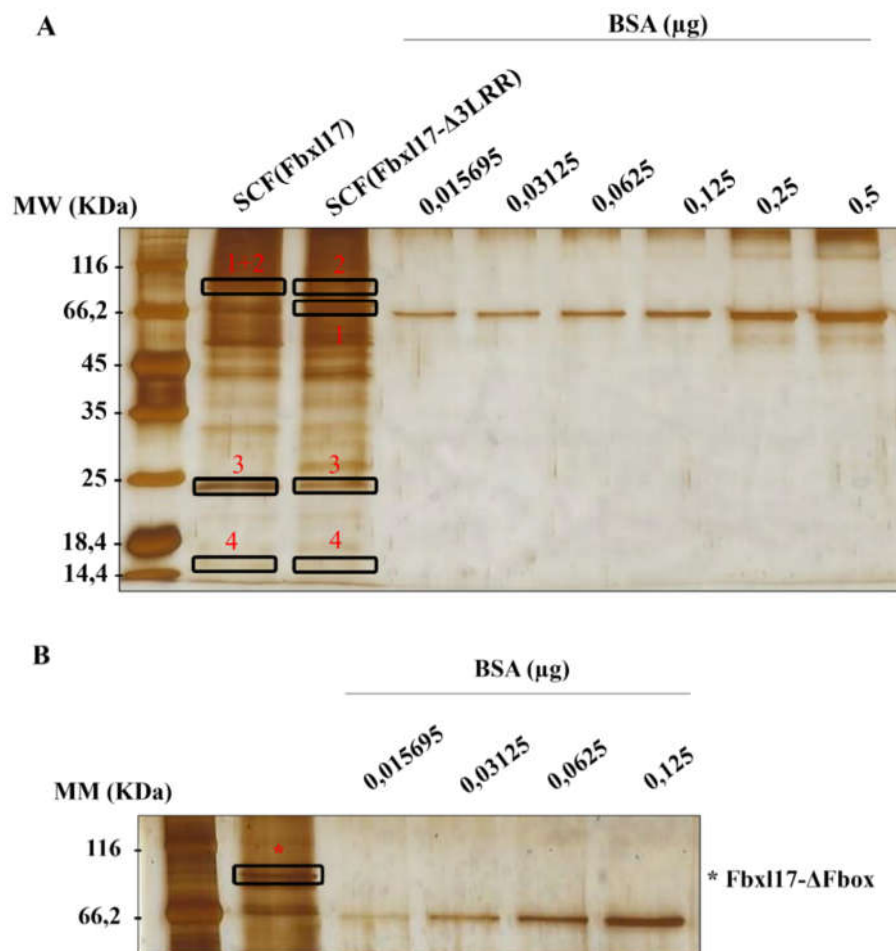
### 4.1 Purificação dos complexos SCF(Fbx117), SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box de células HEK293T e verificação de suas atividades por meio de ubiquitinação *in vitro*

Os complexos SCF(Fbx117) e SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR), e a construção mutante Fbx117- $\Delta$ F-box foram purificados de células HEK293T e as frações eluídas com peptídeo FLAG foram submetidas a SDS-PAGE e analisadas por *western blot* (**Figura 11**). Foi possível observar bandas equivalentes as construções de Fbx117 e Fbx117- $\Delta$ 3LRR, e foi possível detectar bandas referentes a SKP1 em ambos co-imunoprecipitados dos complexos. Entretanto, o sinal correspondente à Rbx1 foi observado somente no eluído referente ao complexo selvagem. Este resultado está de acordo com os resultados apresentados por (Mason et al., 2019), onde vimos que mutações no domínio LRR interferem na montagem do complexo SCF(Fbx117). Como a proteína Rbx1 é essencial para a associação e atividade do complexo SCF, é esperado que o complexo SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) apresente atividade catalítica inferior ao complexo selvagem. Na amostra referente ao eluído de Fbx117- $\Delta$ F-box foi possível observar a eluição apenas da proteína mutante, não sendo detectado sinal referente a SKP1 e Rbx1, uma vez que a deleção do domínio F-box impossibilita a interação com SKP1, impossibilitando a formação do complexo SCF.



**Figura 11.** Purificação dos complexos SCF(Fbx117) e SCF(Fbx117-Δ3LRR) (**A**) e da construção mutante Fbx117-ΔF-box (**B**). Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos destacados acima. Após 48 h de transfecção, as células foram lisadas e os complexos purificados através de IP utilizando a resina agarose anti-FLAG. Os eluídos e os extratos totais (*inputs*) de cada amostra foram resolvidos em SDS-PAGE e submetidos a *western blot* com os anticorpos destacados acima. n=1.

Para quantificação dos complexos purificados, uma fração dos eluídos foi submetida a SDS-PAGE. Para aumentar a sensibilidade de detecção de bandas, o gel foi corado com prata e fotodocumentado para análise densitométrica utilizando o *software ImageJ* (**Figura 12**). Com auxílio da equação descrita na metodologia foi possível fazer o cálculo da concentração de cada complexo purificado. Sendo assim, obtivemos uma concentração de 356 nM do complexo SCF(Fbx117), 150 nM do complexo SCF(Fbx117-Δ3LRR) e 50 nM da proteína Fbx117- ΔF-box.



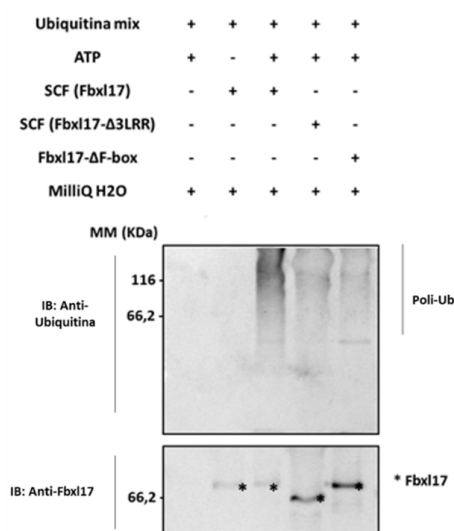
**Figura 12.** Quantificação dos complexos purificados por SDS-PAGE corado com prata. Frações eluídas da imunoprecipitação dos complexos foram resolvidas em SDS-PAGE e coradas com reagente de prata. **A)** Linhas 2 e 3: eluídos dos complexos SCF(Fbx117) e SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR), respectivamente. Linhas 4- 9: BSA purificada variando de 0,015 a 0,5  $\mu$ g. Os retângulos indicam as bandas selecionadas para quantificação, sendo 1 referente a Fbx117 na linha 2 e Fbx117- $\Delta$ 3LRR na linha 3, 2 referente Cullin 1, 3 referente a SKP1, 4 referentes a Rbx1. **B)** Eluído de Fbx117- $\Delta$ F-box, o retângulo indica a banda utilizada para quantificação. Padrão de BSA variando de 0,015-0,125 $\mu$ g. n=1.

Em seguida, para avaliação da atividade enzimática, os eluídos dos complexos SCF(Fbx117) e SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR), e do mutante Fbx117- $\Delta$ F-box foram submetidos a ensaios de ubiquitinação *in vitro* utilizando uma concentração de 10 nM de cada complexo (**Figura 13**). As quantidades usadas no ensaio foram determinados de acordo com o reportado por (Teixeira et al., 2016).

Nas amostras referentes aos controles negativos, as quais não foram adicionadas a *mix* de ubiquitina ou ATP, não houve detecção de sinal de arraste referente à poliubiquitinação

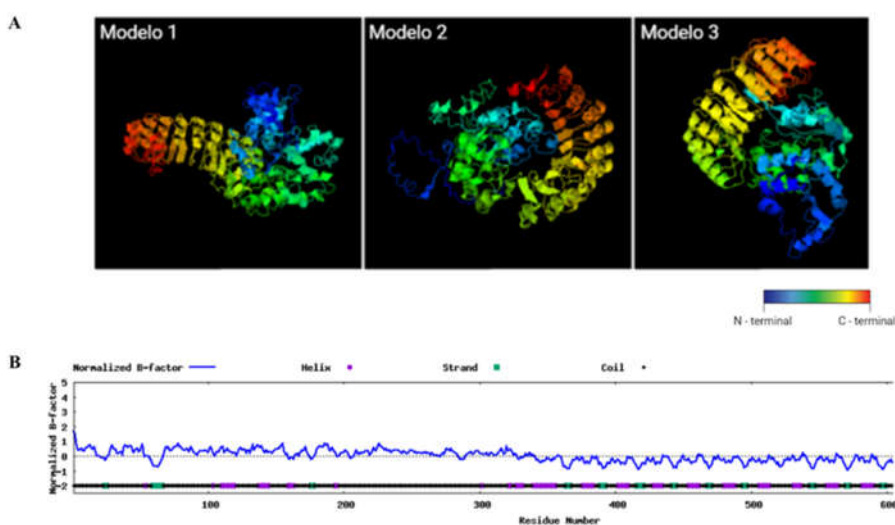


após a revelação da membrana com o anticorpo anti-ubiquitina, mesmo na presença do complexo SCF(Fbx117). O arraste é formado pela ligação de diferentes números de moléculas de ubiquitina ao substrato, aumentando a sua massa molecular gradualmente à medida que há o aumento no número de ubiquitinas ligado ao alvo. Sendo assim, é possível ser feita a detecção deste sinal de arraste característico de poliubiquitinação quando a membrana é revelada com o anticorpo para detectar ubiquitina ou para detecção do alvo ubiquitinado. Este dado indica que as marcações obtidas são especificamente determinadas pelos complexos utilizados (**Figura 13, linhas 1 e 2**). Ao analisar as reações completas, verificamos que o complexo selvagem SCF(Fbx117) foi capaz de se autoubiquitinar, evidenciado pelo arraste de poliubiquitinação alta massa molecular obtido na amostra (**Figura 13, linha 3**). Em acordo com os resultados de purificação obtidos na **Figura 12**, observamos que o complexo SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box apresentaram sinal de poliubiquitinação reduzido ou ausente, sugerindo que o complexo e a proteína mutante possuem capacidade catalítica reduzida ou inexistente. Portanto, podemos concluir que além do domínio LRR ser crucial para a estabilidade do complexo, ele também é importante para a sua atividade enzimática, conforme demonstrado por (Mason et al., 2019).



**Figura 13.** Avaliação de atividade dos complexos SCF(Fbx117), SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e de Fbx117-  $\Delta$ F-box através de ensaios de ubiquitinação *in vitro*. Uma concentração de 10 nM de cada complexo purificado foi utilizada nas reações que contaram com a adição de Ubiquitinação mix (E2, E2 e tampão de ubiquitinação), ATP (essencial para ativação da E1) e os complexos. Os controles negativos foram linhas 1 e 2 e as reações completas nas linhas 3-5. Anticorpos anti-ubiquitina e anti-Fbx117 foram utilizados na revelação do *western blot*. Asteriscos indicam as construções da Fbx117. n=1.

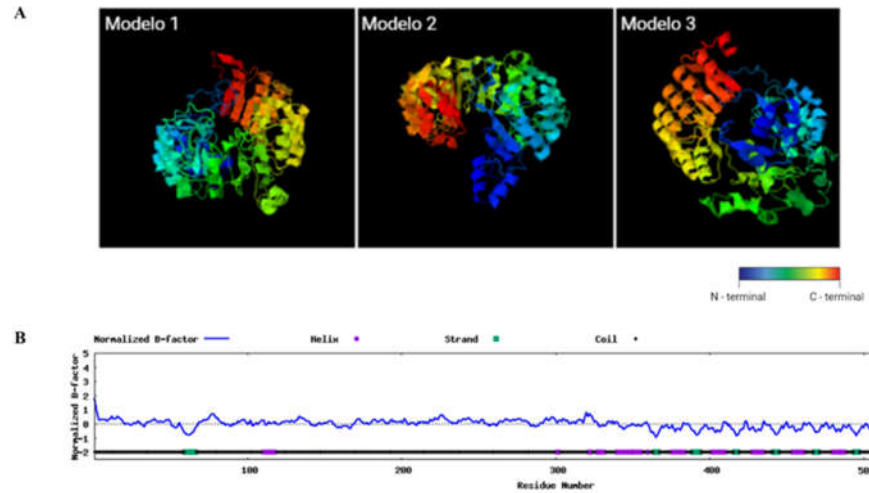
Visando avaliar as diferenças estruturais entre a proteína Fbx117 (1-701 aa) selvagem e o mutante Fbx117- $\Delta$ 3LRR (1-586 aa) onde há deleção no domínio LRR (**Figura 14**), foi feita a predição estrutural de ambas as proteínas *in silico* através do *software* I-TASSER (Zhang, 2008). Este programa faz uso das estruturas tridimensionais representativas depositadas no banco de dados do PDB apresentando um corte de identidade de sequência pareada de 70% em relação à sequência de aminoácidos fornecida para a realização da predição estrutural.



**Figura 14.** A) Predição estrutural da proteína Fbx117 usando o serviço de predição de estrutura tridimensional (3D) do *software* I-TASSER. Os modelos de estrutura 3D foram gerados através de modelagem comparativa. Região N-terminal está destacada em azul e C-terminal em vermelho. B) Predição do fator-B normalizador indicando regiões de loops,  $\alpha$ -hélice e fitas- $\beta$ .

A estrutura do domínio LRR presente na região C-terminal é composto por várias repetições em tandem que propicia a formação de uma estrutura apresentando curvatura solenoide que é favorável para a ocorrência de interações proteína-proteína (Bella et al., 2008). É suposto que o principal fator que favorece o surgimento da conformação solenoide nos domínios LRR em Fbxls é a presença de resíduos conservados de leucina e outros resíduos de aminoácidos alifáticos em sua estrutura. Isto propicia a formação de uma estrutura compacta que é capaz de otimizar as interações de van der Waals presente entre as cadeias laterais dos

resíduos de aminoácido, conferindo estabilidade ao domínio LRR como um todo (Bella et al., 2008; Mason & Laman, 2020).



**Figura 15. A)** Predição estrutural de proteína Fbx117- $\Delta$ 3LRR usando o serviço de predição de estrutura tridimensional (3D) do *software* I-TASSER. Os modelos de estrutura 3D foram gerados através de modelagem comparativa. Região N-terminal está destacada em azul e C-terminal em vermelho. **B)** Predição do fator-B normalizador indicando regiões de loops,  $\alpha$ -hélice e fitas- $\beta$ .

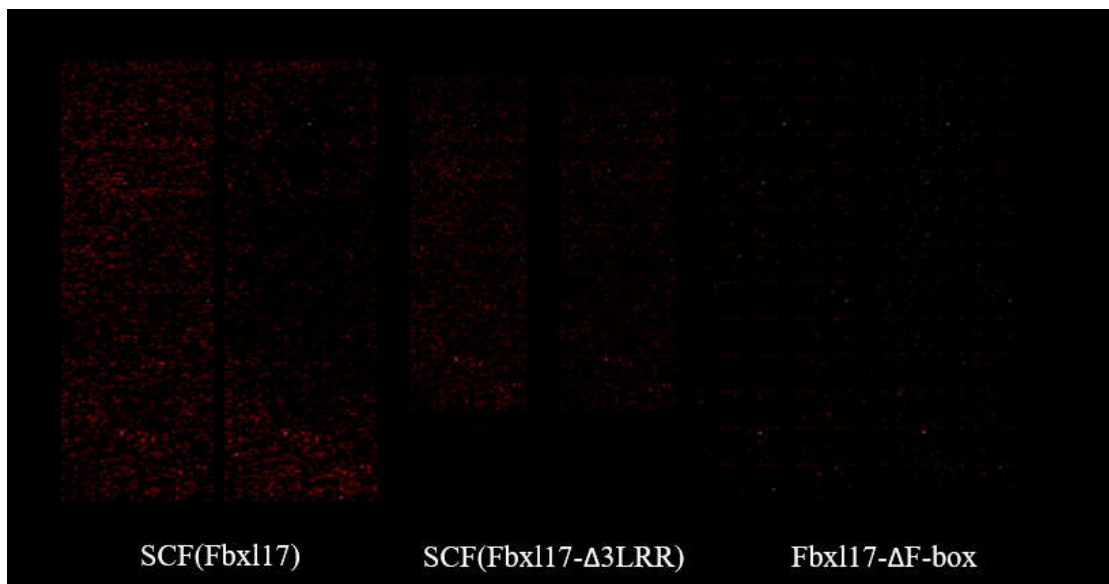
Geralmente o número de repetições LRR está associado ao grau de curvatura adotado neste domínio, e como pode ser observado na predição de ambas as estruturas (**Figura 14 e 15**), o domínio LRR é composto por uma série de fitas- $\beta$  em paralelo, tendo o seu lado convexo composto por  $\alpha$ -hélices. Comparando os modelos estruturais gerados pelo I-TASSER (**Modelo 1, 2 e 3**) para a proteína Fbx117, podemos verificar que a estrutura do domínio LRR permanece quase que inalterada entre eles. Entretanto a posição da região N-terminal apresenta variações entre os modelos obtidos. Comparando a estrutura de Fbx117 selvagem (**Figura 14**) com o mutante Fbx117- $\Delta$ 3LRR (**Figura 15**), observamos que embora haja perda no número de repetições LRR no domínio de interação com o substrato, o mesmo ainda apresenta estrutura solenoide na proteína mutante.

O fator-B normalizador é calculado pelo software como uma estimativa da extensão do movimento atômico em experimentos de cristalografia de raio-X. Este fator é estimado por meio do ResQ que faz uso de um conjunto de atribuições baseada em modelos existentes e

predição baseada em *machine-learning* que utiliza perfis de sequência e predição de estruturas (Yang & Zhang, 2016). Analisando o fator-B gerado para a proteína Fbx117 selvagem (**Figura 14B**), percebemos que a região N-terminal apresenta diversos picos na região positiva, apresentando um pico proeminente na região do fator-B com valor negativo entre o resíduo de aminoácido número 1 e 100. Já para o fator-B normalizador da predição da proteína mutante Fbx117- $\Delta$ 3LRR (**Figura 15B**) é possível perceber que a curva se encontra mais próxima de zero na região N-terminal, mas também apresentando alguns picos na região positiva e o pico na região com valores negativos no gráfico entre os resíduos de aminoácidos 1 e 100, como foi visto na proteína selvagem. Adicionalmente, é possível observar que a proteína selvagem apresenta um maior número de fitas- $\beta$  (em verde) e  $\alpha$ -hélices (em lilás) na região N-terminal quando comparada com a proteína mutante.

#### **4.2. Ensaio de ubiquitinação *in vitro* dos complexos SCF(Fbx117), SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box em *Protoarrays***

Com a obtenção dos complexos SCF(Fbx117) e SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e do mutante Fbx117- $\Delta$ F-box purificados e quantificados, foi realizado o ensaio de ubiquitinação *in vitro* utilizando os microarranjos de proteína como fonte de substratos. Cada purificado foi usado em duas lâminas diferentes conforme **Figura 16**.



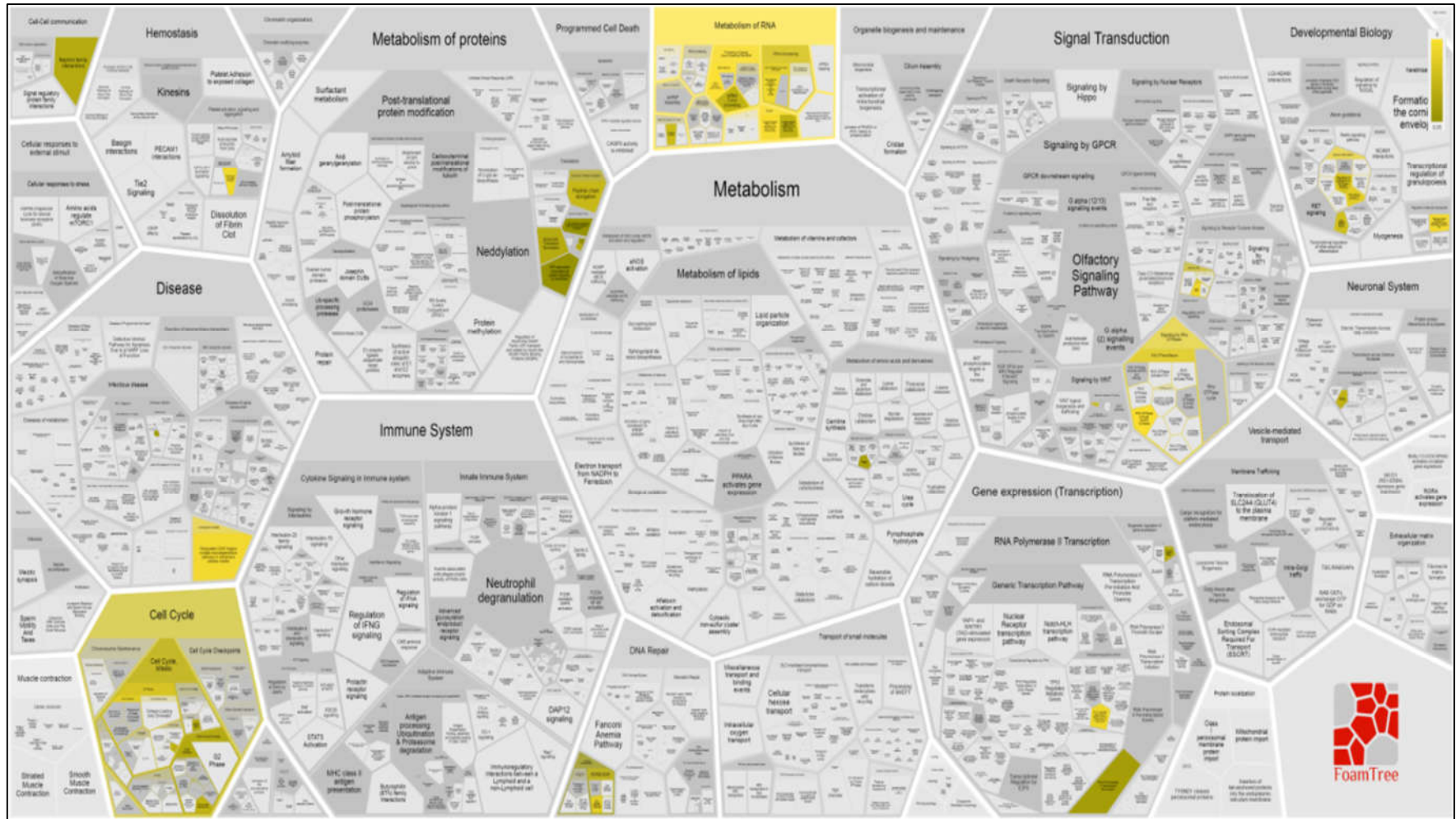
**Figura 16.** Imagem dos spots presentes em cada lâmina que foi submetida ao processo de ubiquitinação *in vitro* em larga escala. Os complexos usados para cada *slide* estão representados abaixo da figura. Imagem obtida com o auxílio do aparelho *GenePix Personal 4100A* (Axon-Molecular Devices).

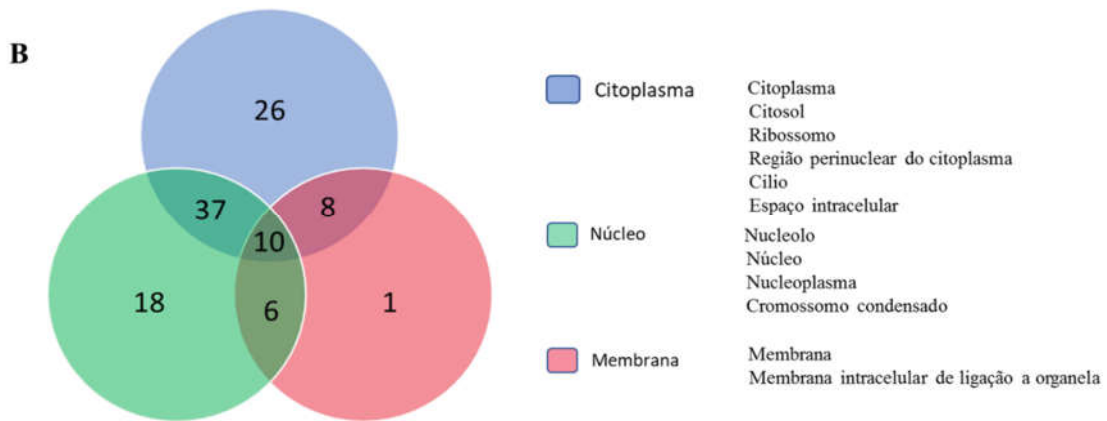
Foram feitas duas análises estatísticas distintas com os dados do *Protoarray*. A primeira análise foi feita considerando os alvos positivos somente para o complexo SCF(Fbx117), subtraindo os positivos de Fbx117-ΔF-box, e sendo desconsiderado os dados obtidos com os *slides* em que o complexo mutante SCF(Fbx117-Δ3LRR) foi usado. Nesta primeira análise foram detectados 194 alvos (**Apêndice: Tabela 1**). Esses potenciais substratos foram submetidos ao enriquecimento funcional agrupando-os com base em sua via de atuação através do banco de dados do REACTOME, e em sua localização celular usando o *DAVID Bioinformatics Resources 6.8* (Griss et al., 2020; Huang et al., 2009). Após análises feita com o auxílio do REACTOME, foi possível verificar que as duas principais vias onde esses substratos se agruparam de forma majoritária foram as vias de metabolismo de RNA e a de regulação do ciclo celular (**Figura 17A**). Já o agrupamento dos alvos em relação à sua localização celular por meio do *DAVID database*, observamos que a intercessão núcleo-citoplasma foi a região onde houve maior concentração de alvos desta primeira lista (**Figura 17B**).

A segunda análise foi feita considerando os alvos que foram positivos para o complexo SCF(Fbx117), subtraindo os alvos positivos para o complexo SCF(Fbx117-Δ3LRR) e para o mutante Fbx117-ΔF-box. Nesta análise foram identificados 92 alvos distintos (**Apêndice: Tabela 2**), sendo também submetidos à análise de enriquecimento funcional por meio dos

bancos de dados do REACTOME e DAVID. A análise feita através do REACTOME para o agrupamento dos alvos com base na via funcional demonstrou que a maioria dos alvos pertencentes à segunda análise se agrupavam de forma preferencial na via do metabolismo do RNA, dado que coincidiu com a análise realizada na primeira lista (**Figuras 17A e 18A**). Já o agrupamento dos alvos em relação a sua localização intracelular através do DAVID *database* também apresentou a grande maioria dos alvos se agrupando na interseção núcleo-citoplasma (**Figura 18B**).

A

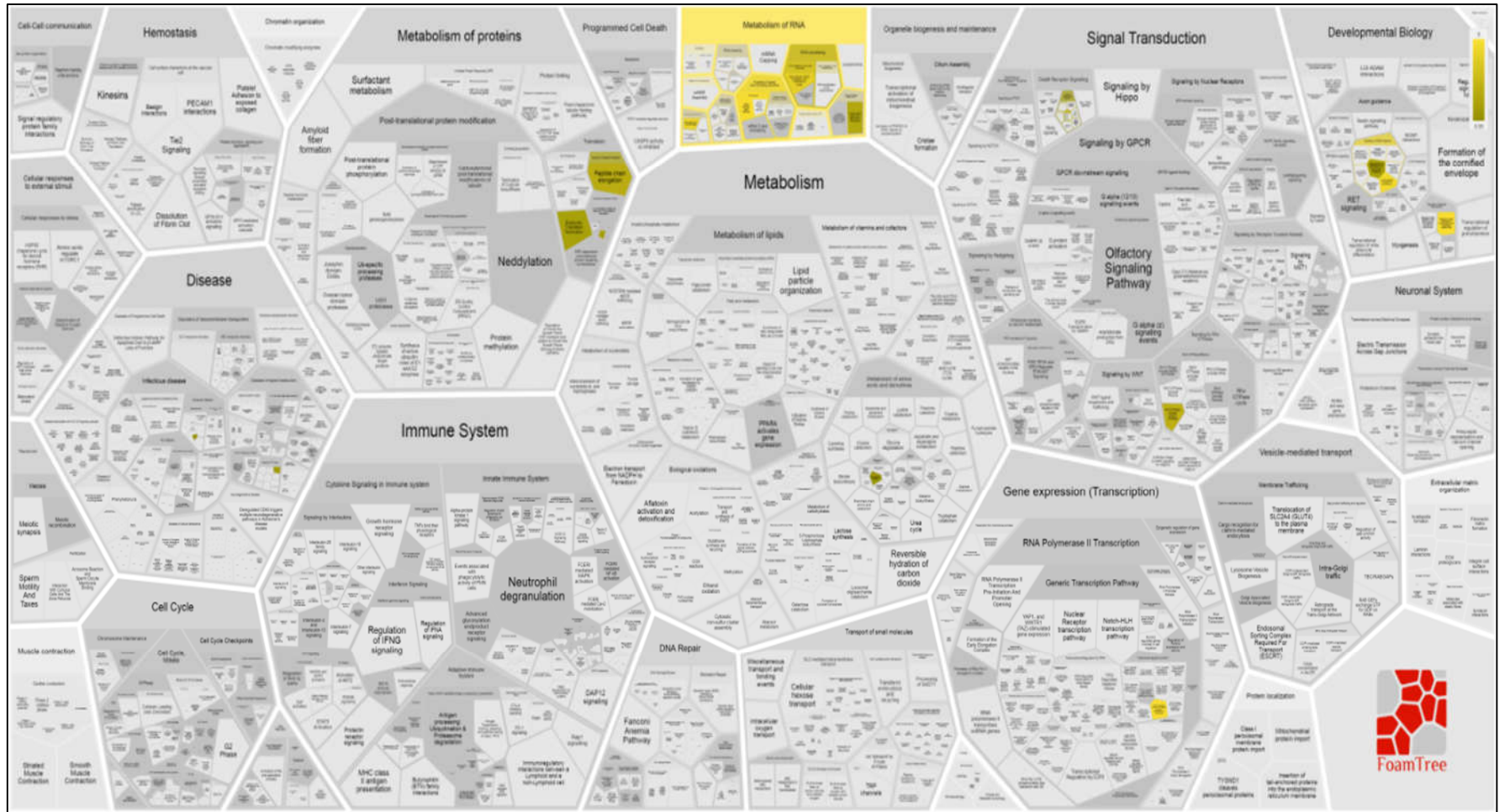


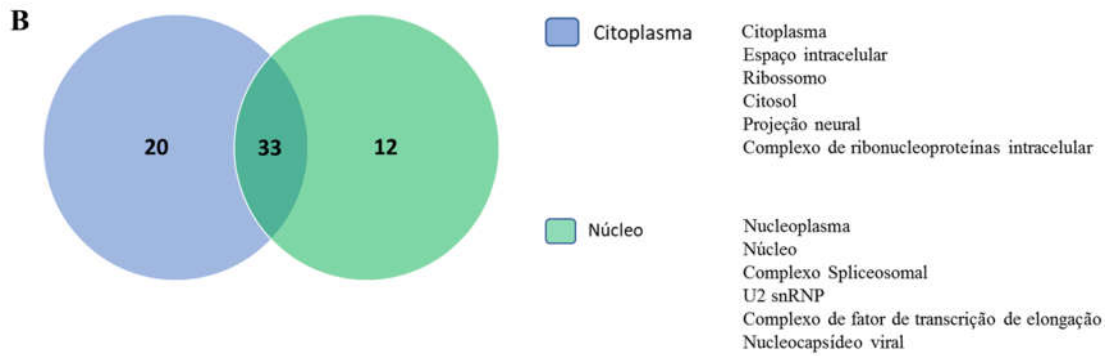


**Figura 17.** Classificação dos alvos positivos para SCF(Fbx117) e subtraídos dos positivos para Fbx117- $\Delta$ F-box. **A)** *Foamtree* obtida com o enriquecimento funcional dos alvos positivos para SCF(Fbx117) e negativos para Fbx117- $\Delta$ F-box, utilizando o REACTOME *database*. Esquema de cores indicando concentração de alvos atuando em determinada via. Quanto mais amarelo maior a presença de alvos regulando a via; em cinza são vias que não há nenhum alvo proveniente da lista atuando nelas. **B)** Diagrama de Venn com a representação do número de alvos localizados nos compartimentos celulares destacados da análise para SCF(Fbx117) e negativo e para Fbx117- $\Delta$ F-box. Enriquecimento funcional realizado no DAVID *database* (Huang et al., 2009).



A





**Figura 18.** Classificação dos alvos positivos para SCF(Fbx117) subtraídos dos positivos para SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box. **A)** *Foamtree* obtida com o enriquecimento funcional dos alvos positivos para SCF(Fbx117) e negativos para SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box, utilizando o REACTOME *database*. Esquema de cores indicando concentração de alvos atuando em determinada via. Quanto mais amarelo maior a presença de alvos regulando a via; em cinza são vias que não há nenhum alvo proveniente da lista atuando nelas. **B)** Diagrama de Venn com a representação do número de alvos localizados nos compartimentos celulares destacados da análise positivos para SCF(Fbx117) e negativos para SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box. Enriquecimento funcional realizado no DAVID *database* (Huang et al., 2009).

Avaliando os dados dos alvos identificados na lista dos positivos para SCF(Fbx117) subtraídos dos positivos para Fbx117- $\Delta$ F-box, encontramos 24 pertencentes somente à via de regulação do metabolismo de RNA, 6 que regulam o ciclo celular, e 2 que atuam em ambas as vias (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Tabela dos alvos pré-selecionados para validação. Asteriscos indicando os possíveis substratos que apareceram em ambas as análises, positivo para SCF(Fbx117) subtraindo os positivos Fbx117- $\Delta$ F-box, bem como para positivo SCF(Fbx117) e subtraídos para SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box. Os alvos sublinhados são as proteínas que já foram observadas como alvos de ubiquitinação de outras ligases, apresentadas em estudos de ubiquitinoma celular. Em vermelho estão destacados os alvos selecionados para serem submetidos aos ensaios de validação (Danielsen et al., 2011; Wagner et al., 2011).

<b>Metabolismo de RNA</b>	
*DDX21	*SRSF5
*DNAJC8	*WDR4
*EDC3	* <b>SRSF9</b>
* <b>WBSR22</b>	* <b>SNRPB2</b>
* <b>LSM8</b>	* <b>SNRPA1</b>
<u>RPS19</u>	<u>RPL31</u>
<u>PRPF38A</u>	<u>RPL23A</u>
UPF3A	SRSF6
<b>SIP1</b>	HSPC148
PES1	SRPK2
<b>Ciclo celular</b>	
*PRKCB1	*ITGB3BP
ODF2	OFD1
NCAPG	FAM128B
<b>Metabolismo de RNA e ciclo celular</b>	
*PSMA8	PRKCA

Considerando que as vias mais comuns de atuação dos possíveis substratos do complexo SCF(Fbx117) foram as vias de regulação do metabolismo de RNA para ambas as análises, em especial a via de regulação do *splicing*, e em segundo lugar, a via de regulação do ciclo celular, foi criada uma lista de seleção de alvos para serem submetidos à ensaios de validação de substrato (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Tabela dos alvos selecionados para validação

Alvos selecionados	Via de atuação
SIP1/GEMIN 2	<i>Splicing</i>
SNRPB2	<i>Splicing</i>
HMCES	Reparo do DNA
LSM4	<i>Splicing</i>
RAD51AP1	Reparo do DNA
SRSF9	<i>Splicing</i>
DDB1	Reparo do DNA

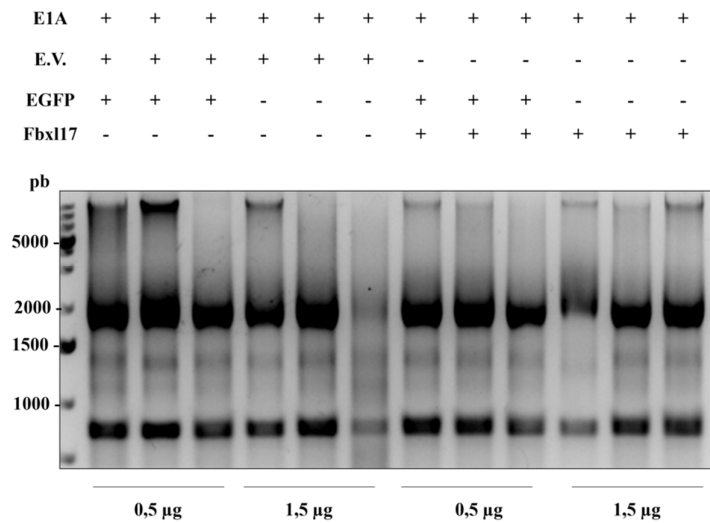
#### 4.2 Ensaio de *splicing* usando o gene repórter E1A

Pelo fato da maioria dos alvos se agruparem na via de regulação do *splicing* do pré-mRNA, investigamos os efeitos de Fbx117 nesta via através do ensaio de *splicing* transiente com auxílio do minigene *E1A* de adenovírus atuando como gene repórter de *splicing* (Cáceres et al., 1994). O pré-mRNA do E1A pode gerar 5 isoformas distintas (13S, 12S, 11S, 10S e 9S) dependendo da seleção do sítio de *splicing* alternativo. As isoformas geradas podem ser monitoradas através de RT-PCR e análise da intensidade de bandas geradas em gel de agarose, a intensidade da banda de cada isoforma produzida reflete o efeito positivo ou negativo da proteína regulatória testada (Bressan et al., 2009).

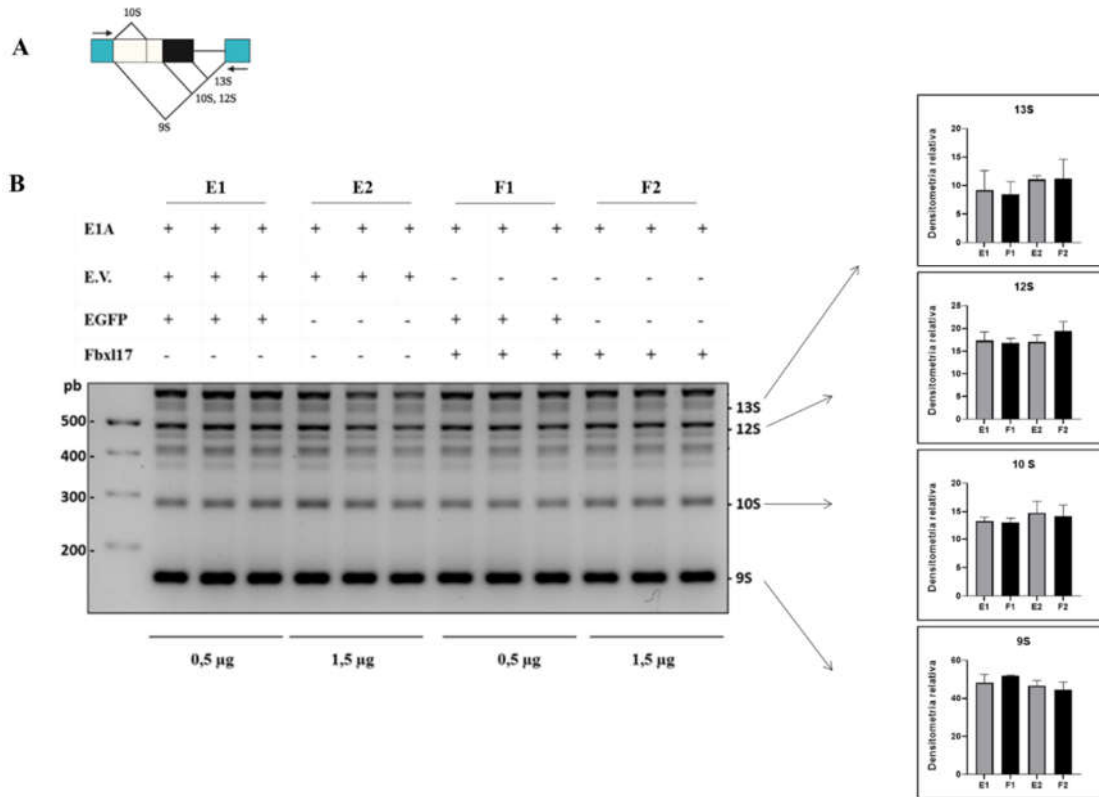
Portanto, foi feita a transfecção das células com o vetor expressando a proteína FLAG-Fbx117 ou o vetor vazio (pcDNA3), usando quantidades crescentes de DNA plasmidial, juntamente com quantidades iguais do plasmídeo E1A (Cáceres et al., 1994). O processo foi conduzido em duas linhagens celulares distintas, HEK293T e MCF7, visto que o padrão de *splicing* difere de um tipo celular para o outro. A extração do RNA foi feita após 24 h e 48 h de transfecção em HEK293T e após 24 h de transfecção em MCF7.

Após a extração de RNA no primeiro tempo do experimento em células HEK293T, verificamos a integridade da amostra por meio da detecção de bandas no gel de agarose 1,5 % e pudemos perceber que a maior parte das amostras apresentaram integridade do RNA compatível para ensaios posteriores, com exceção da amostra presente na coluna 6 (**Figura**

**19).** Os produtos da RT-PCR usando os *primers* de amplificação do *splicing* alternativo de E1A foram resolvidos em gel de agarose 3% (**Figura 20B**). De forma geral, em células HEK293T a isoforma do mRNA 9S é preferencialmente formada em relação às demais isoformas. Também foi possível verificar que não houve variações visíveis na formação de uma isoforma específica quando o minigene foi co-transfectado com Fbx117 em duas quantidades distintas em comparação com a co-transfecção com o vetor vazio. Esse dado indica que a superexpressão de Fbx117 não interfere no padrão de *splicing* do pré-mRNA de E1A nesta linhagem celular (**Figura 20B**). É importante ressaltar que a amostra que apresentou o RNA com integridade mais comprometida em relação às demais (**Figura 19 coluna 6**), exibiu bandas referentes às isoformas de mRNA com intensidade de sinal reduzida em relação às outras amostras. Entretanto esta diferença de intensidade não interferiu nas análises estatísticas realizadas.

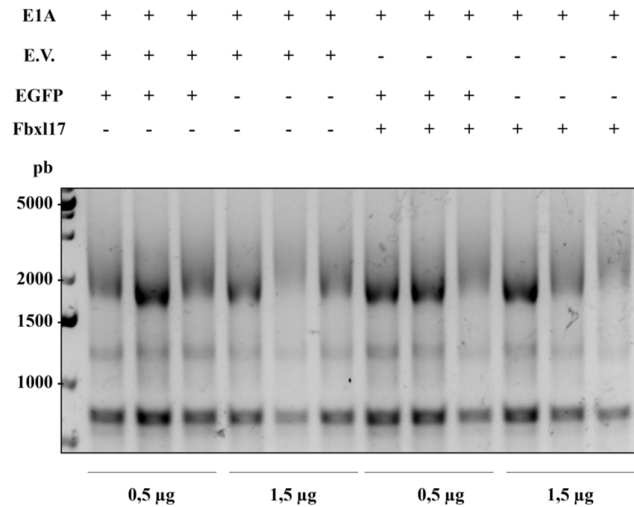


**Figura 19.** Verificação da integridade do RNA. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos destacados acima, e após 24 h de transfecção as células foram lisadas e seu RNA extraído. As amostras de RNA foram resolvidas em gel de agarose 1,5% para verificação da sua integridade. Triplicata representada.



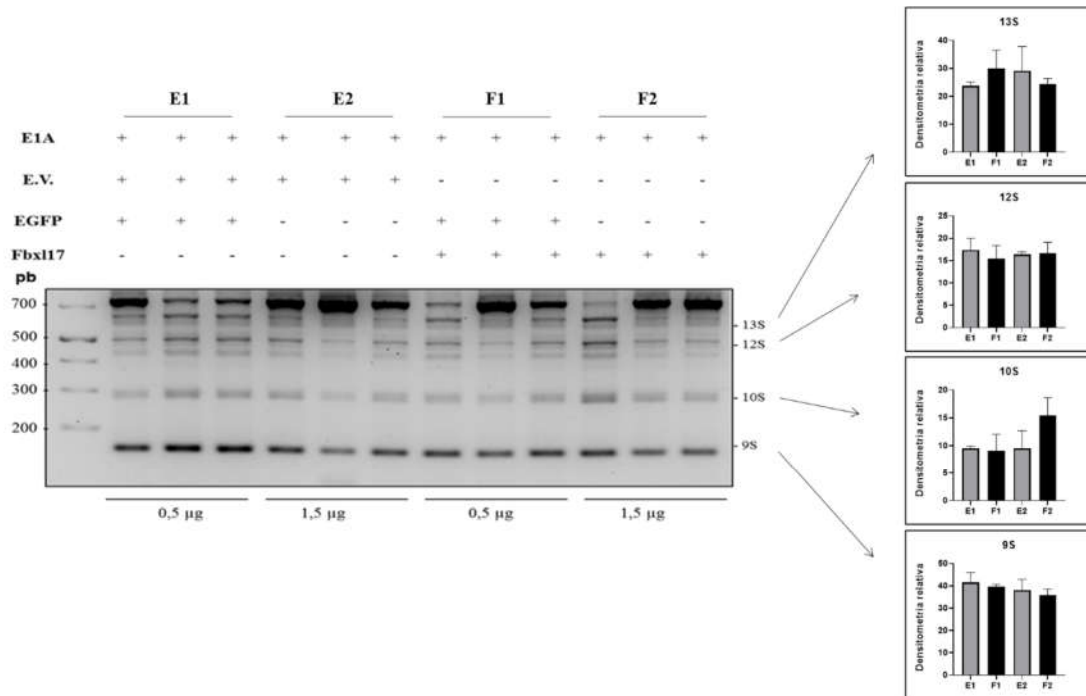
**Figura 20.** Efeito de Fbx17 no *splicing* do gene *E1A* em células HEK293T após 24 h de transfecção. **A)** Diagrama dos eventos de *splicing* que ocorre do pré-Mrna do minigene E1A para geração das isoformas 13S, 12S, 10S e 9S. **B)** As células foram transfectadas transientemente com os plasmídeos destacados. Após 24 h de transfecção o RNA total de cada amostra foi extraído e utilizado para produção do cDNA. Este foi utilizado para reações de PCR com os primers para o minigene *E1A*. As quantidades transfectadas do vetor vazio (EV), nos dois primeiros grupos, e da Fbx17 nos dois últimos grupos estão especificadas embaixo da imagem do gel. A atividade do *splicing* foi quantificada como descrito no **item 3.6**. Gráficos e teste estatístico realizado no programa *GraphPrism 7.4*. Análise estatística empregada: *One-way ANOVA*, dados não pareados e paramétricos. P-valor <0,05. Triplicata representada.

Em seguida, o experimento descrito acima foi feito utilizando a linhagem tumoral de mama MCF7, e o RNA também foi extraído após 24 h de transfecção. Após a extração do RNA e avaliação de sua integridade, notamos que quando comparada com as amostras de RNA obtidas de células HEK293T, a integridade do RNA extraído das células MCF7 foi inferior. Adicionalmente, as amostras presentes na coluna 5, 9, 11 e 12 exibiram maior comprometimento em sua integridade devido à baixa resolução de bandas no gel de agarose.



**Figura 21.** Verificação da integridade do RNA. Células MCF7 foram transfectadas com os plasmídeos destacados acima, e após 24 h de transfecção as células foram lisadas e seu RNA extraído. As amostras de RNA foram resolvidas em gel de agarose 1,5% para verificação da sua integridade. Triplicata representada.

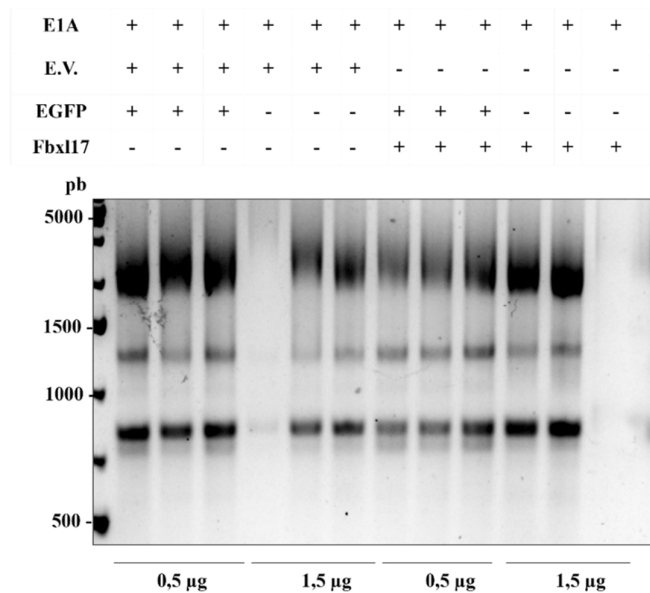
Após a obtenção das amostras provenientes da RT-PCR, e levando em consideração os dados obtidos com a análise estatística da intensidade de sinal referente às bandas de cada isoforma, observamos novamente que não houve diferença significativa na produção das isoformas onde houve co-transfecção de Fbx117 em comparação com a co-transfecção com o pcDNA3 (**Figura 22**). Nesta linhagem celular também ficou evidente que a isoforma do mRNA 9S é formada preferencialmente em comparação às demais (**Figura 22**). Devido à baixa integridade das amostras extraídas desta linhagem celular, é importante ressaltar que a análise estatística pode ter sido influenciada pela diferença no padrão de bandas entre as replicatas. Este resultado nos levou a conduzir o último experimento testando o tempo de transfecção de 48 h somente em células HEK293T.



**Figura 22.** Efeito de Fbx117 no *splicing* do gene *E1A* em células MCF7 após 24 h de transfecção. Células transfectadas transientemente com os plasmídeos destacados. Após 24 h de transfecção o RNA total de cada amostra foi extraído e utilizado para produção do cDNA. Este foi utilizado para reações de PCR com os *primers* para o minigene *E1A*. As quantidades transfectadas do vetor vazio (**EV**), nos dois primeiros grupos, e da Fbx117 nos dois últimos grupos estão especificadas embaixo da imagem do gel. A atividade do *splicing* foi quantificada como descrito no **item 3.6**. Gráficos e teste estatístico realizado no programa *GraphPrism 7,4*. Análise estatística empregada: *One-way ANOVA*, dados não pareados e paramétricos. P-valor <0,05. Triplicata representada.

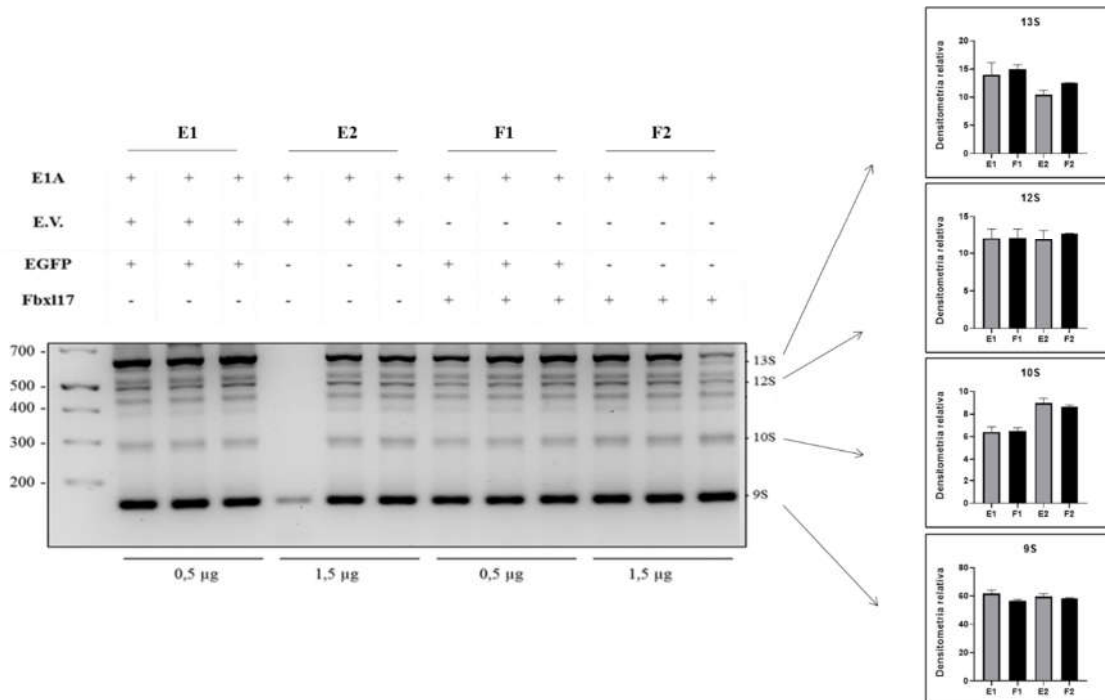
Nos experimentos anteriores, a extração do RNA foi feita após 24 h de transfecção, e como pôde ser observado, não foi possível detectar diferença estatística significativa nas análises realizadas. Desta forma, selecionamos as células HEK293T, que foi a linhagem que nos forneceu melhor integridade nas amostras de RNA, e fizemos a transfecção das mesmas com os plasmídeos destacados na imagem (**Figura 23**). Após 48 h de transfecção o RNA foi extraído, e avaliamos o seu grau de integridade para então prosseguir para a análise das RT-PCRs. Como pode ser observado na **Figura 23**, as amostras presentes na coluna 4 e 12 apresentaram alto grau de degradação.





**Figura 23.** Verificação da integridade do RNA. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos destacados acima, e após 48 h de transfecção as células foram lisadas e seu RNA extraído. As amostras de RNA foram resolvidas em gel de agarose 1,5% para verificação da sua integridade. Triplicata representada.

Após ser feita a RT-PCR para amplificação das isoformas, novamente, não observamos variação estatística significativa na produção de nenhuma delas quando comparamos a co-transfecção com o vetor expressando Fbx117 em relação às amostras onde o vetor vazio foi usado (**Figura 24**). Também é possível observar que a presença da isoforma do mRNA 9S neste ensaio foi predominante frente a geração das demais. Adicionalmente, as amostras presentes nas colunas 4 e 12, que apresentaram a amostra de RNA mais comprometida, foram as que apresentaram um padrão de banda menos reprodutivo quando comparado com as outras replicatas (**Figura 24**). Na amostra da coluna 4 não é possível detectar nenhum sinal referente às isoformas do *splicing* de *E1A* além da isoforma de mRNA 9S, esta discrepância também pode ter afetado as análises estatísticas neste experimento.



**Figura 24.** Efeito de Fbx117 no *splicing* do gene *E1A* em células HEK293T após 48 h de transfecção. Células transfectadas transientemente com os plasmídeos destacados. Após 48 h de transfecção o RNA total de cada amostra foi extraído e utilizado para produção do cDNA. Este foi utilizado para reações de PCR com os primers para o minigene *E1A*. As quantidades transfectadas do vetor vazio (**E.V.**), nos dois primeiros grupos, e da Fbx117 nos dois últimos grupos estão especificadas embaixo da imagem do gel. A atividade do *splicing* foi quantificada como descrito no **item 3.6**. Gráficos e teste estatístico realizado no programa *GraphPrism 7.4*. Análise estatística empregada: *One-way ANOVA*, dados não pareados e paramétricos. P-valor <0,05. Triplicata representada.

Os resultados obtidos com os experimentos de *splicing* alternativo do minigene *E1A* sugerem que a proteína Fbx117 não está envolvida na regulação do *splicing* celular para este gene repórter de *splicing*, embora a maior parte dos potenciais substratos identificados pelos *Protoarrays* estejam relacionados ao processamento desta via. Foi possível verificar também que a melhor condição experimental para os ensaios que executamos foi usando células HEK293T com a extração das amostras de RNA ocorrendo após 24 h de transfecção.

#### 4.4. Validação de interação e ubiquitinação de alvos identificados nos *protoarrays*

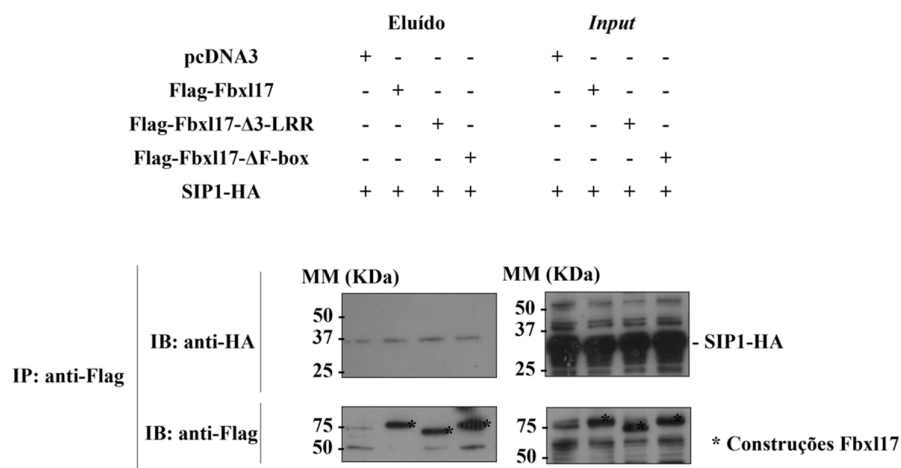
Os resultados fornecidos pelo ensaio de *Protoarray* foram compostos por uma lista contendo 194 alvos que foram positivos para SCF(Fbx117) subtraindo os positivos para Fbx117-ΔF-box, e outra lista mais seletiva onde foram considerados os alvos positivos

somente para SCF(Fbx117) subtraindo SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box, onde foram detectados 92 alvos. Com base nos critérios de localização nuclear, modificação pós-traducional por ubiquitinação, disponibilidade comercial de plasmídeos codificando os genes, estudos na literatura e anticorpos disponíveis, definimos os seguintes genes para serem usados nos ensaios de validação de interação e ubiquitinação: SIP1 (*Gem-associated protein 2/GEMIN2*); SNRPB2 (*U2 small nuclear ribonucleoprotein B*); HMCES (*Abasic site processing protein HMCES*); LSM4 (*U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm4*); SRSF9 (*Serine/arginine-rich splicing fator 9*); RAD51AP1 (*RAD51 associated protein 1*); DDB1 (*DNA-damage binding protein 1*).

#### 4.2.1 Avaliação da interação entre SIP1 e Fbx117

A proteína SIP1 (*Gem-associated protein 2/GEMIN2*), também conhecida como GEMIN2, foi o primeiro alvo selecionado para os ensaios de validação. Esta proteína apresenta massa molecular de aproximadamente 31,585 kDa e encontra-se localizada em estruturas subnucleares enriquecidas em snRNPs *spliceossomais* e no citoplasma. Uma de suas principais funções é auxiliar na associação das snRNPs para a formação do *spliceossomo* (W.-J. Zhang & Wu, 1998).

Realizamos assim os ensaios de interação através de co-IP, onde co-transfectamos FLAG-Fbx117 ou o vetor vazio e SIP-1-HA em células HEK293T. Após a resolução das frações eluídas e dos *inputs*, percebemos que SIP-1 interagiu de forma inespecífica com as *beads* de agarose-anti-FLAG (**Figura 25**). Ao compararmos os eluídos na presença e ausência de Fbx117, não observamos diferença nas quantidades de SIP-1, indicando que esta proteína possivelmente não interage com Fbx117. A interação da SIP-1 com a resina sugere que as condições de IP podem ter apresentado baixa força iônica ou concentração/presença de detergentes. Novos ensaios para minimizar estas interações inespecíficas devem ser realizados para avaliar a interação com Fbx117.



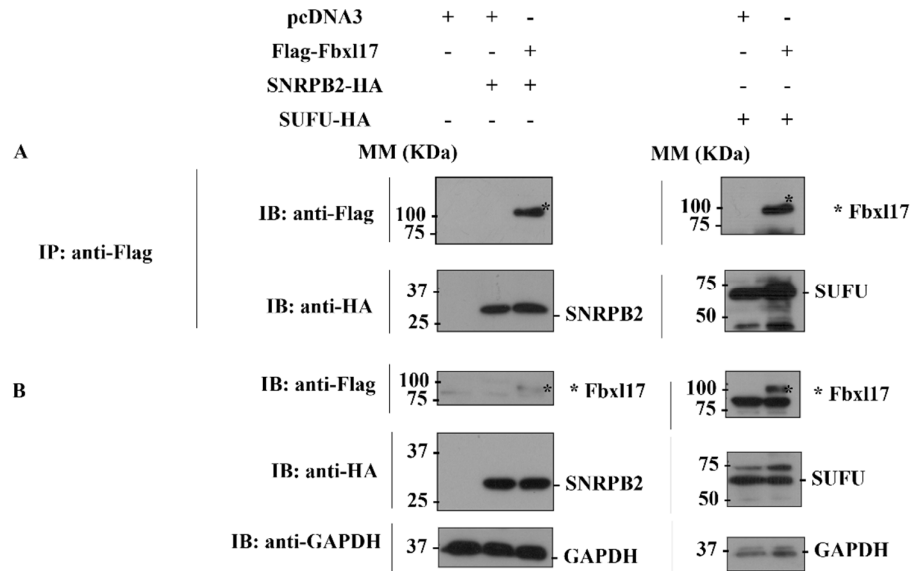
**Figura 25.** Ensaio de interação entre SIP1 e Fbx117 - Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos em destaque. Os eluídos provenientes das imunoprecipitações usando resina agarose anti-Flag à esquerda e extrato total (*input*) à direita. A resolução foi feita por *western blot* usando os anticorpos indicados. Experimento realizado em duplicata com apenas um representado acima.

#### 4.2.2 Avaliação da interação entre SNRPB2 e Fbx117

A proteína SNRPB2 (*U2 small nuclear ribonucleoprotein B*) apresenta massa molecular aproximada a 25,486 kDa, também foi selecionada para os testes de validação. Esta proteína que encontra-se localizada no núcleo celular, também desempenha função na regulação do *splicing* do pré-mRNA (Jurica et al., 2002).

Para o ensaio de interação entre SNRPB2-HA e FLAG-Fbx117, as transfecções foram realizadas em células HEK293T. Foi feita também a co-transfecção de SUFU-HA com o vetor vazio e com o vetor expressando Fbx117, como controle positivo de interação, uma vez que a proteína SUFU foi caracterizada como substrato do complexo SCF(Fbx117) (Raducu et al., 2016). Os resultados demonstraram que SNRPB2 eluiu juntamente com o pcDNA3, mas o sinal referente à essa proteína foi detectado de forma mais intensa no eluído correspondente à co-transfecção com Fbx117 (**Figura 26**). Embora tenha sido detectado interação inespecífica de SNRPB2 com a resina utilizada na IP, quando comparamos a interação inespecífica da SUFU, substrato caracterizado do complexo SCF(Fbx117), observamos que o padrão de ambas as interações era compatível. Pelo fato de a SNRPB2 apresentar um sinal de interação com Fbx117 mais intenso do que a interação inespecífica com a resina, decidimos prosseguir com os ensaios de validação e avaliar se a SNRPB2 era ubiquitinada pelo complexo SCF(Fbx117) em célula. De forma similar ao ocorrido para SIP1, novos ensaios em condições

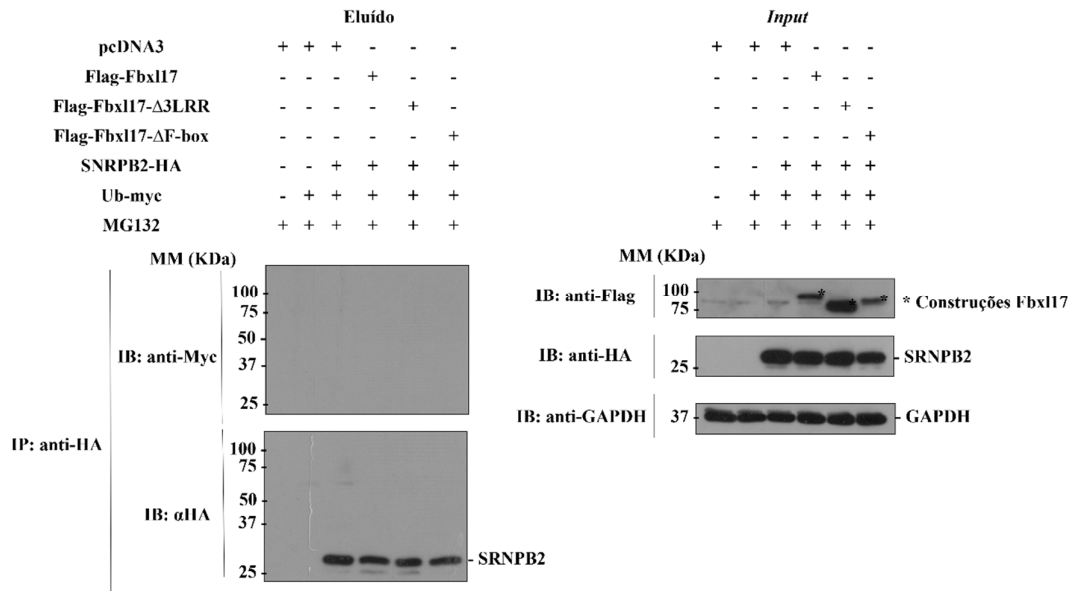
mais estridentes devem ser realizados com o objetivo de minimizar interações inespecíficas com as resinas utilizadas nos experimentos de IP.



**Figura 26.** Ensaio de interação entre SNRPB2 e Fbx117 - Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos em destaque. **A)** Eluídos provenientes das imunoprecipitações usando resina agarose anti-FLAG. **B)** Extrato total. A resolução foi feita por *western blot* usando os anticorpos indicados.

Para o ensaio de ubiquitinação utilizamos células HEK293T co-transfectadas com SNRPB2-HA e as construções de Fbx117 ou com o vetor vazio pcDNA3 e ubiquitina-myc (**Figura 27**). Utilizamos neste ensaio o inibidor de proteassoma MG132 antes de ser feita a lise celular, para permitir o acúmulo de todas as proteínas ubiquitinadas, incluindo as proteínas que seriam destinadas a degradadas via proteassoma (Kisselev & Goldberg, 2001). As frações eluídas foram avaliadas por *western blot* e observamos que a revelação da incubação da membrana com o anticorpo anti-myc, que detecta ubiquitina através do Myc tag, não detectou sinal de arraste referente à poliubiquitinação de SNRPB2 (**Figura 27, linha 4**). Posteriormente, incubamos essa mesma membrana das amostras do eluído com o anticorpo anti-HA para verificar se a IP tinha sido eficiente ao puxar SNRPB2, que apresenta o HA tag em sua estrutura. Como esperado, verificamos sinal referente à SNRPB2 em todas as amostras do eluído onde houve transfecção dessa proteína indicando que a IP foi bem-sucedida (**Figura 27**). De modo a garantir que as construções de Fbx117 também foram devidamente expressas, foi feita a incubação da membrana do extrato total com o anticorpo anti-FLAG para detecção

das construções de Fbx117 que possuíam o *tag* FLAG. Após as revelações, constatamos que todas as construções estavam sendo devidamente expressas na linhagem de célula utilizada. Desta forma, concluímos que SNRPB2 apesar de sugestivamente interagir com Fbx117, ela não é substrato do complexo SCF(Fbx117).



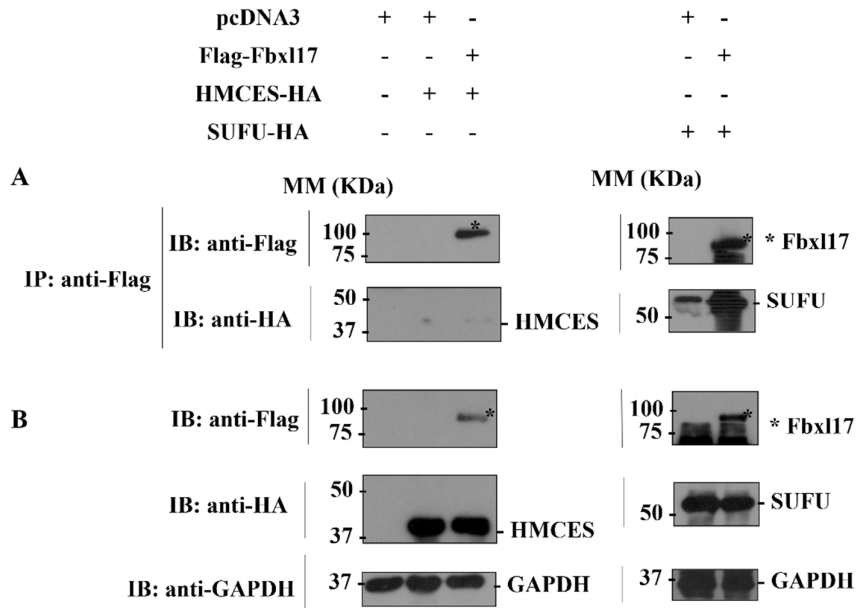
**Figura 27.** Ensaio de ubiquitinação de SNRPB2 e Fbx117 em células HEK293T. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos em destaque. Os eluídos provenientes das imunoprecipitações usando resina agarose anti-Flag à esquerda e extrato total (*input*) pode ser observado à direita. A resolução foi feita por *western blot* usando os anticorpos indicados.

#### 4.2.3 Avaliação da interação entre HMCES e Fbx117

Posteriormente HMCES foi escolhida para prosseguir com os ensaios de validação. Essa é uma proteína nuclear que apresenta cerca 40,575 kDa de massa molecular e atua na preservação da integridade genômica agindo como sensor de sítios abásicos em fita simples de DNA (ssDNA) (Mohni et al., 2019).

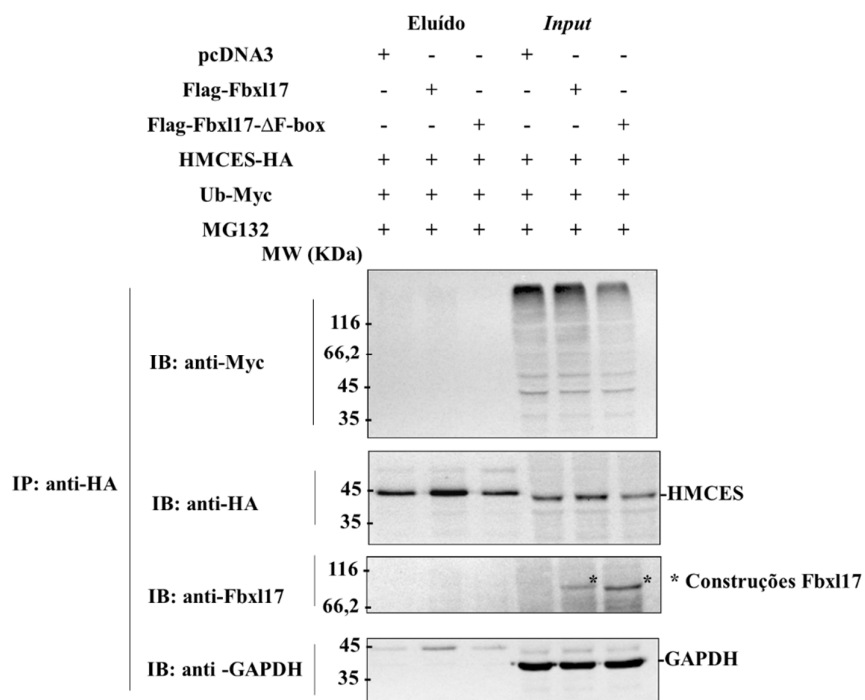
O ensaio de interação também foi realizado em células HEK293T co-transfectadas com vetor vazio ou Fbx117-FLAG em conjunto com HMCES-HA ou com o controle positivo SUFU-HA. Observamos que nas amostras dos eluídos, há a presença de HMCES na fração contendo Fbx117, sugerindo uma interação entre estas proteínas (**Figura 28**). No entanto, a intensidade de sinal referente à HMCES é muito fraca, conseqüentemente este experimento foi reproduzido e obtivemos o mesmo padrão na intensidade de sinal correspondente à

HMCES co-transfectada com Fbx117 (dados não fornecidos). Observando o resultado da interação do controle positivo SUFU, foi possível constatar que o ensaio de imunoprecipitação foi eficiente. Apesar de HMCES apresentar uma interação aparentemente fraca com Fbx117, prosseguimos para o ensaio de ubiquitinação em células HEK293T (**Figura 29**).



**Figura 28.** Ensaio de interação entre HMCES e Fbx117. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados. **A)** Os eluídos provenientes das imunoprecipitações usando resina agarose anti-FLAG ou frações totais (**B**) foram resolvidas em SDS-PAGE e *western blot*. Ensaio realizado em duplicata.

Ao analisarmos os eluídos de HMCES na presença de Fbx117, não observamos sinal de poliubiquitinação desta proteína (**Figura 29, linha 2**). Confirmamos que o processo de IP foi eficiente, visto que houve detecção de sinal referente à HMCES nas amostras do eluído, também podemos notar ao analisarmos as amostras dos *inputs* que as construções de Fbx117 foram devidamente expressas. Sendo assim, os resultados sugerem que HMCES, embora seja capaz de interagir de forma fraca com Fbx117, não é substrato do complexo SCF(Fbx117). Ensaio posteriores serão realizados para avaliar as consequências funcionais da interação entre estas duas proteínas.



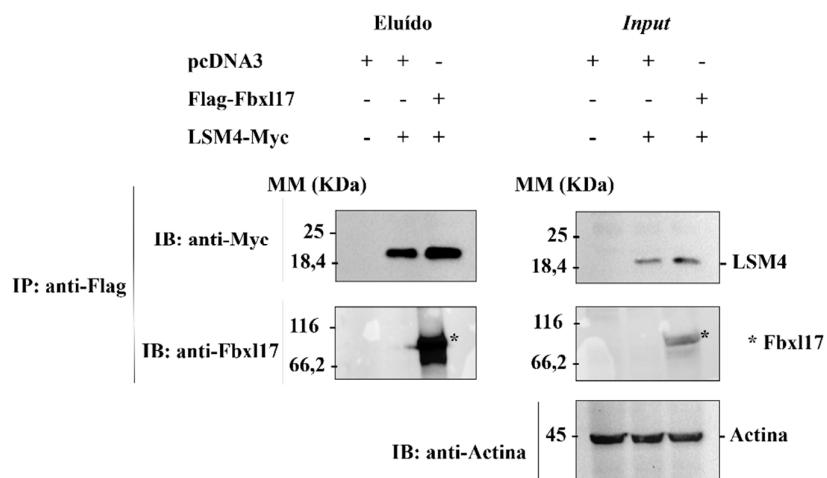
**Figura 29.** Ensaio de ubiquitinação de HMCES por Fbx17 em células HEK293T. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados. Frações eluídas provenientes das imunoprecipitações usando resina agarose anti-Flag à esquerda e extrato total (*input*) foram reveladas com os anticorpos indicados.

#### 4.2.4 Avaliação da interação entre LSM4 e Fbx17

LSM4 atua no *splicing* do pré-mRNA como componente do complexo U4/U6-U5 tri-snRNP, crucial para a montagem do *spliceossomo* (Achsel et al., 1999). Essa proteína apresenta massa molecular de 15,350 kDa e encontra-se localizada no núcleo celular (Bertram et al., 2017).

O ensaio foi realizado em células HEK293T superexpressando LSM4-myc, juntamente com FLAG-Fbx17 selvagem ou o vetor vazio pcDNA3. Os resultados demonstraram que LSM4 foi eluída na presença do vetor vazio ou Fbx17, apresentando sinal mais intenso quando co-transfectada com Fbx17 (**Figura 30**). Este resultado é semelhante ao obtido para o SNRPB2, entretanto, observamos neste caso que o *input* contendo Fbx17 e LSM4 apresentava maior expressão deste alvo, o que pode explicar o sinal mais intenso na fração do eluído referente a este *input*. Ensaio posteriores devem ser realizados com condições de IP diferentes com o objetivo de minimizar as interações inespecíficas com as resinas utilizadas.





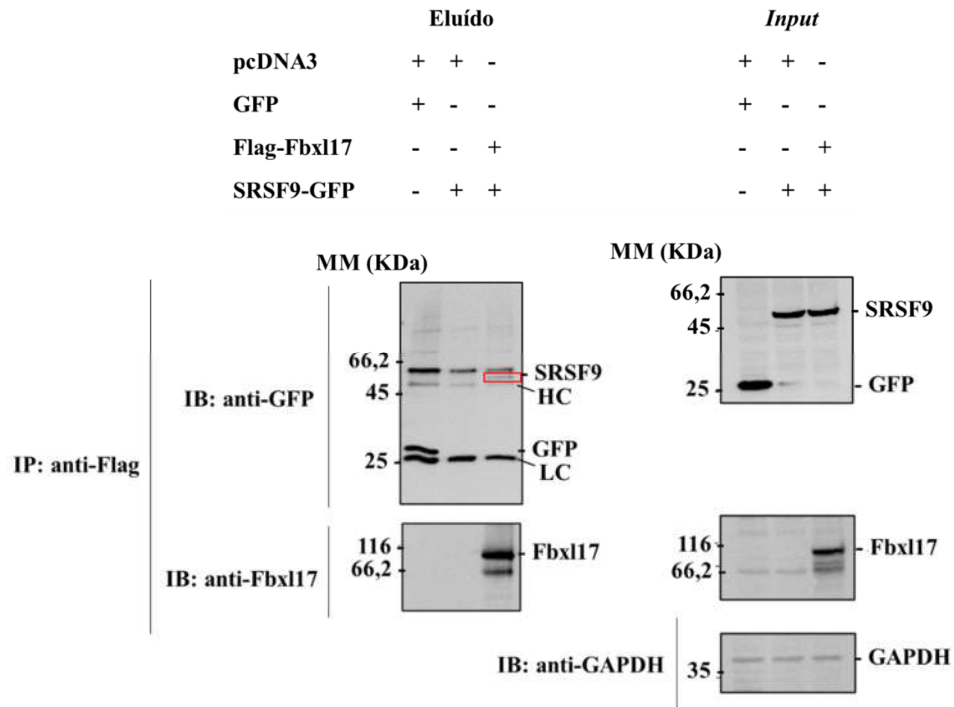
**Figura 30.** Ensaio de interação entre LSM4 e Fbx117. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados. Os eluídos provenientes das imunoprecipitações usando resina agarose anti-FLAG à esquerda e extrato total a direita (*input*) pode ser observado à direita foram revelados com os anticorpos indicados acima.

Como pudemos observar nos resultados de interação com SIP1/GEMIN2 (**Figura 25**) e SNRPB2 (**Figura 26**), este alvo selecionado apresentou um padrão de interação não-específica com a resina muito similar ao que vimos anteriormente. Portanto concluímos que provavelmente a interação com Fbx117 não ocorreu de forma específica, e decidimos assim não prosseguir com ensaios de validação adicionais com LSM4.

#### 4.2.5 Avaliação da interação entre SRSF9 e Fbx117

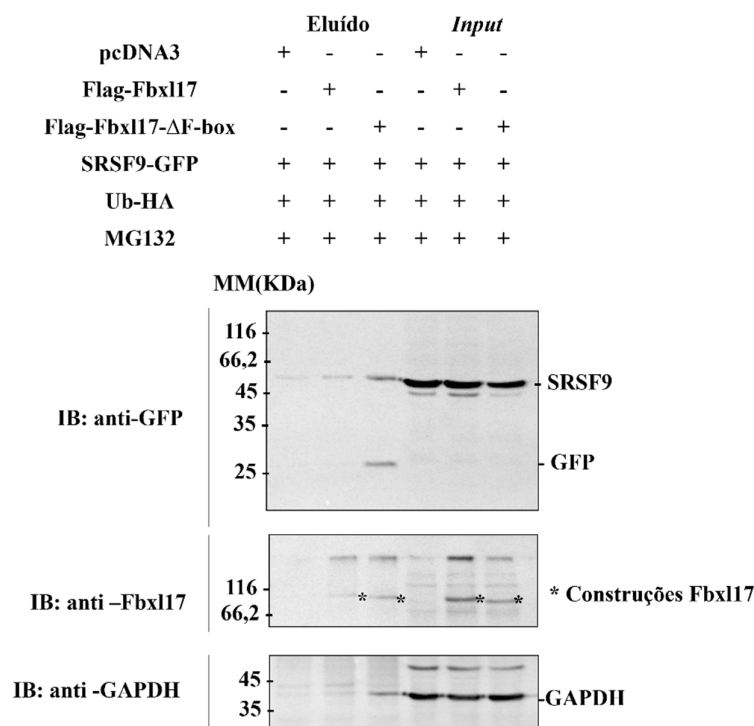
O próximo alvo selecionado foi o fator de *splicing* SRSF9 (*Serine/arginine-rich splicing fator 9*) que desempenha papel no *splicing* constitutivo, sendo capaz de modular a seleção de sítios alternativos de *splicing* (Ha et al., 2021). Essa proteína possui cerca de 25,542 kDa e é encontrada no núcleo celular.

Utilizamos uma construção desta proteína em fusão com GFP na região C-terminal, totalizando uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa deste alvo. Os resultados do ensaio de co-imunoprecipitação demonstraram que SRSF9 foi eluída juntamente com Fbx117 e não na presença do vetor vazio, indicando que este alvo possivelmente interage com Fbx117 na célula (**Figura 31**). Devido a isso, o ensaio de ubiquitinação em célula foi realizado usando este substrato em potencial na presença de Fbx117 ou do vetor vazio pcDNA 3.



**Figura 31.** Ensaio de interação entre SRSF9 e Fbx17. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos em destaque na figura acima. Os eluídos proveniente das imunoprecipitações usando resina agarose anti-Flag à esquerda e extrato total (*input*) pode ser observado à direita. As membranas de *western blot* foram revelados usando os anticorpos indicados. As marcações das cadeias leve (**LC**) e pesada (**HC**) do anticorpo presente na resina estão destacados na imagem. Contornado em vermelho está a marcação referente à SRSF9.

Como SRSF9 está em fusão com GFP, para este ensaio de ubiquitinação em célula, foi usada a resina anti-HA e ubiquitina contendo o *tag* HA. Neste cenário, houve imunoprecipitação de todas as proteínas poliubiquitinadas e a revelação foi feita com o anticorpo anti-GFP para detectarmos a presença de SRSF9 poliubiquitinada. Avaliando as amostras do eluído não foi possível identificar sinal de arraste característico de poliubiquitinação em SRSF9 quando co-transfectada com Fbx17 quando a membrana foi incubada com o anticorpo anti-GFP. Este dado indica que não houve poliubiquitinação desta proteína na presença de Fbx17 (**Figura 32**). Com a análise do extrato total foi possível concluir que as construções de Fbx17 bem como SRSF9 encontravam-se expressas nas células usadas para o ensaio. Desta maneira, podemos concluir que apesar de SRSF9 interagir com Fbx17, essa proteína não é substrato do complexo SCF(Fbx17).



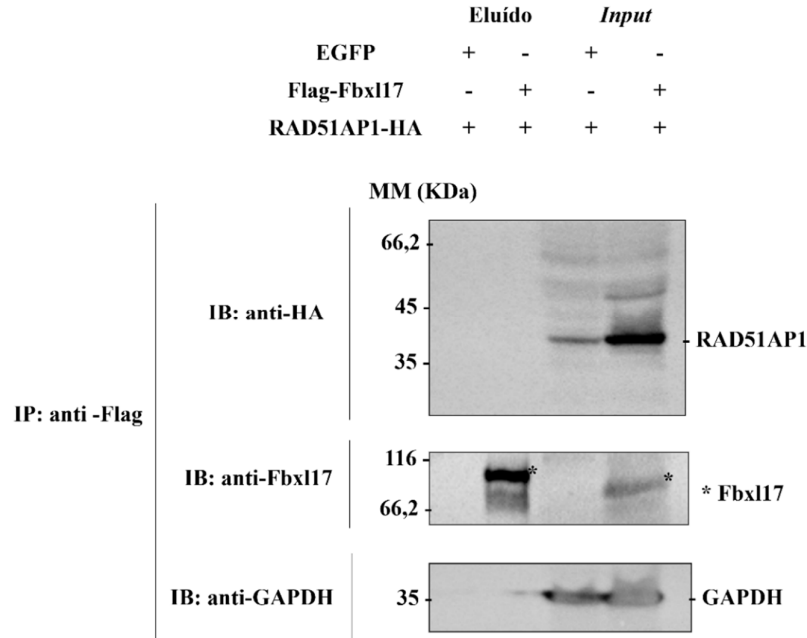
**Figura 32.** Ensaio de ubiquitinação de SRSF9 por Fbx117 em células HEK293T. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados acima. Eluídos provenientes das imunoprecipitações usando resina agarose anti-HA à esquerda e extrato total (*input*) foram submetidos a *western blot* com os anticorpos indicados.

#### 4.2.6 Avaliação da interação entre RAD51AP1 e Fbx117

Tendo em vista que a grande maioria dos alvos associados ao processo de *splicing* não apresentaram os resultados de interação e ubiquitinação esperados, decidimos selecionar outro alvo fora desta via. A proteína RAD51AP1 (*RAD51 associated protein 1*) recentemente foi identificada com expressão elevada em linfomas e carcinomas agressivos por meio de um *screening* gênico (Modesti et al., 2007). RAD51AP1 é uma proteína de ligação ao DNA, e encontra-se envolvida no processo de reparo do DNA por meio da promoção da recombinação homóloga mediada por RAD51. Está proteína se encontra-se localizada no núcleo celular e apresenta massa molecular de aproximadamente 38,457 kDa (Parplys et al., 2015).

Avaliando o resultado obtido pelo ensaio de interação com a Fbx117, foi possível observar que RAD51AP1-HA não é capaz de interagir com Fbx117, embora essa proteína tenha sido expressa de forma eficiente na linhagem celular escolhida (**Figura 33**). Observamos também que os plasmídeos foram expressos conforme visto nas análises dos

*inputs* onde foi feita a incubação com os anticorpos anti-HA, para visualização de RAD51AP1, e anti-Fbx117.



**Figura 33.** Ensaio de interação entre RAD51AP1 e Fbx117. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados acima. Os eluídos provenientes das imunoprecipitações usando resina agarose anti-Flag à esquerda ou extrato total (*input*) à direita foram submetidos a *western blot* com os anticorpos indicados.

#### 4.2.7 A proteína DDB1

A presença de defeitos no sistema de reparo do DNA culmina em instabilidade genômica que pode ocasionar na etiologia de algumas doenças. Quando ocorre danos no DNA ocasionados por radiação ultravioleta (UV), o sistema de reparo do DNA é ativado, tendo início através do reconhecimento de sítios de lesão. Esse reconhecimento é possibilitado através do complexo DDB (*DNA-binding protein complex*) que é constituído por duas proteínas, DDB1 e DDB2, conhecidas também como p127 e p48 respectivamente (Cang et al., 2007). O complexo DDB é capaz de reconhecer foto-produtos de pirimidina-pirimidona induzida por radiação UV, bem como dímeros de pirimidina de ciclobutano, que são os tipos de lesões mais frequentes no DNA quando ocorre exposição prolongada à radiação UV (Iovine et al., 2011).

Em condições normais, DDB1 encontra-se majoritariamente no citosol, no entanto, quando há exposição à radiação UV, DDB1 é translocada para o núcleo se ligando à DDB2 para formação do dímero DDB (Iovine et al., 2011). Além de sua função no reconhecimento de sítios de lesões no DNA, DDB1 também é componente do complexo E3 ubiquitina-ligase denominado Cul4A-RING (CRL4). Este complexo é constituído por DDB1, DDB2, CUL4A e ROC1, e DDB1 atua desempenhando papel como proteína adaptadora para associação de Cul4A (*Cullin 4A*) e DCAFs (*CUL4-associated factors*) (Sugasawa, 2009). Cullin-RING E3 ubiquitina-ligasas (CRLs) são os tipos de E3 ligases mais abundantes em eucariotos mediando a ubiquitinação de uma gama de substratos envolvidos na regulação do ciclo celular, transdução de sinal, integridade genômica e desenvolvimento embrionário, dentre outras (Sang et al., 2015). CTD1 (*Chromatin licensing and DNA replication fator 1*), componente fundamental para a formação do complexo de pré-replicação, é um substrato do complexo CRL4 na presença de radiação ionizante (Fouad et al., 2019). Adicionalmente, foi observado que os níveis de CRL4 em câncer de ovário são elevados, e que o *knockdown* desse complexo levou à inibição da proliferação celular e migração, bem como o aumento no processo de apoptose em células de câncer de ovário resistente à cisplatina (Hu et al., 2019).

DDB1 é uma proteína conservada composta por 1.140 resíduos de aminoácidos, apresentando massa molecular de aproximadamente 127 kDa, e o gene humano que codifica para essa proteína é situado no cromossomo 11q12-q13 (Tang & Chu, 2002). Essa proteína é capaz de interagir com diversas proteínas virais, incluindo a proteína V de SV5 (*Paramyxovirus simian virus 5*), e as proteínas V do vírus da caxumba, da parainfluenza humana do tipo 2 e o vírus do sarampo (Lin et al., 1998; Lin & Lamb, 2000; Tang & Chu, 2002). Adicionalmente, DDB1 é capaz de interagir com a proteína X do vírus da hepatite B (HBx), importante para o processo de multiplicação viral *in vivo*, bem como na transativação de diversos promotores virais e celulares.

A DDB1 é capaz de se associar ao domínio citoplasmático de APP (*Alzheimer's amyloid precursor protein*), e em condições de disfunção metabólica APP pode levar ao aumento dos níveis da proteína  $\beta$ -amiloide contribuindo para o surgimento da doença de Alzheimer (Watanabe et al., 1999). Estudos anteriores reportaram que pacientes portadores da doença de Alzheimer apresentavam baixa atividade na via de reparo do DNA, o que pode contribuir para a degeneração neuronal (Tang & Chu, 2002).

Danos no DNA também têm sido relatado como uma das causas para o surgimento de diversos tipos de câncer. Quando o sistema de reparo não funciona de forma efetiva propicia o surgimento de mutações ou aberrações cromossômicas em oncogenes e em supressores tumorais, auxiliando no crescimento e desenvolvimento tumoral (Torgovnick & Schumacher, 2015). É interessante ressaltar que mediante tratamentos de quimioterapia e radioterapia o sistema de reparo de DNA também desempenha papel chave na eficácia da terapia adotada. A baixa atividade do sistema de reparo de DNA em células tumorais as tornam mais sensíveis ao tratamento, ao passo que células não tumorais podem ser afetadas por mutações decorrentes no DNA que não estão sendo devidamente reparado (Kiwerska & Szyfter, 2019).

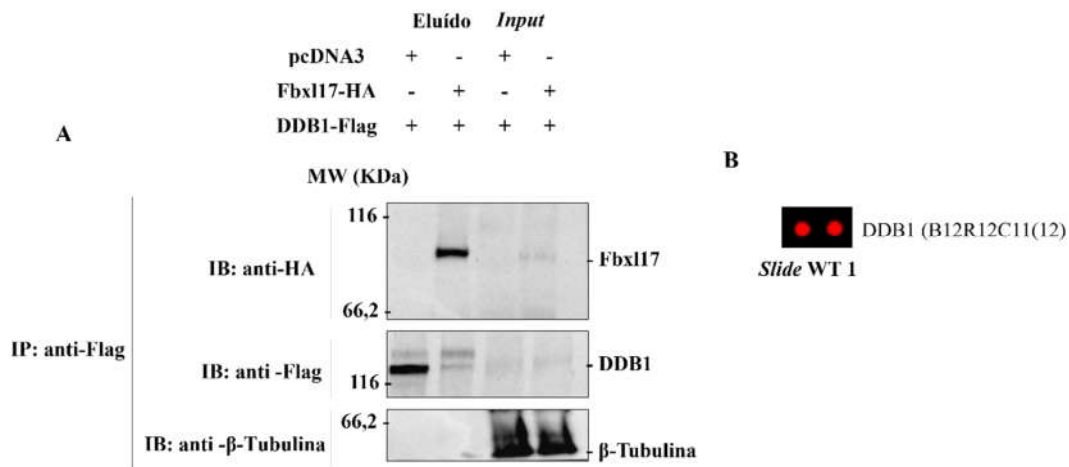
Há relatos de que algumas proteínas do tipo F-box são capazes de interagir com DDB1. Foi avaliado por meio de *screening* de siRNA um complexo E3 ubiquitina-ligase atípico composto por CUL4B/DDB1 em associação com a Fbxo44 mediando a degradação de RGS2 (*Regulator of G protein signaling 2*), fator essencial para redução da amplitude e o período de duração da sinalização através de receptores acoplados a proteína G (Sjögren et al., 2015). Também foi verificado que o domínio F-box presente em Fbxo44, que é crucial para interação com SKP1 e formação do complexo SCF, é essencial também para associação com CUL4B-DDB1, pois a deleção desse domínio impossibilita a interação com CUL4B/DDB1. Em outro estudo, foi observado que pelo menos duas F-boxs contendo o domínio WD40, Fbxw5 e Fbxw8, são capazes de interagir com CUL4A/DDB1. Embora tenha sido constatado que o domínio F-box em Fbxw5 não seja crucial para interação com o complexo, uma vez que a sua deleção não afetou na associação dessa proteína com CUL4A/DDB1 (He et al., 2006). Também foi evidenciado que SKP2 (ou Fbx11) é capaz de interagir com DDB1 (Chen et al., 2019). Embora haja relatos descritos de interação entre DDB1 e proteínas do tipo F-box, as consequências funcionais desse tipo de interação ainda permanecem pobremente estudadas.

#### **4.2.8 Avaliação da interação entre DDB1 e Fbx117**

Resultados preliminares obtidos pelo grupo da Dra. Laman em um ensaio de espectrometria de massas, indicaram interação entre DDB1 e Fbx117. O contato com a Dra. Heike Laman foi possível através do Programa Print/CAPES/PPGGEV onde tive a possibilidade de trabalhar em seu laboratório pelo período de 6 meses na University of Cambridge/UK. Como mencionado acima, proteína DDB1 atua na manutenção da integridade genômica por meio da via NER de reparo de DNA, localizada em sua maior proporção no

núcleo da célula sendo componente do heterodímero DDB1/DDB2 que se associam ao DNA após danos causados por luz-ultravioleta (Lovejoy et al., 2006). DDB1 também se encontra associada ao processo de ubiquitinação em proteínas sendo parte do complexo DCX (DDB1-Cul4-X-box) (Hu et al., 2004).

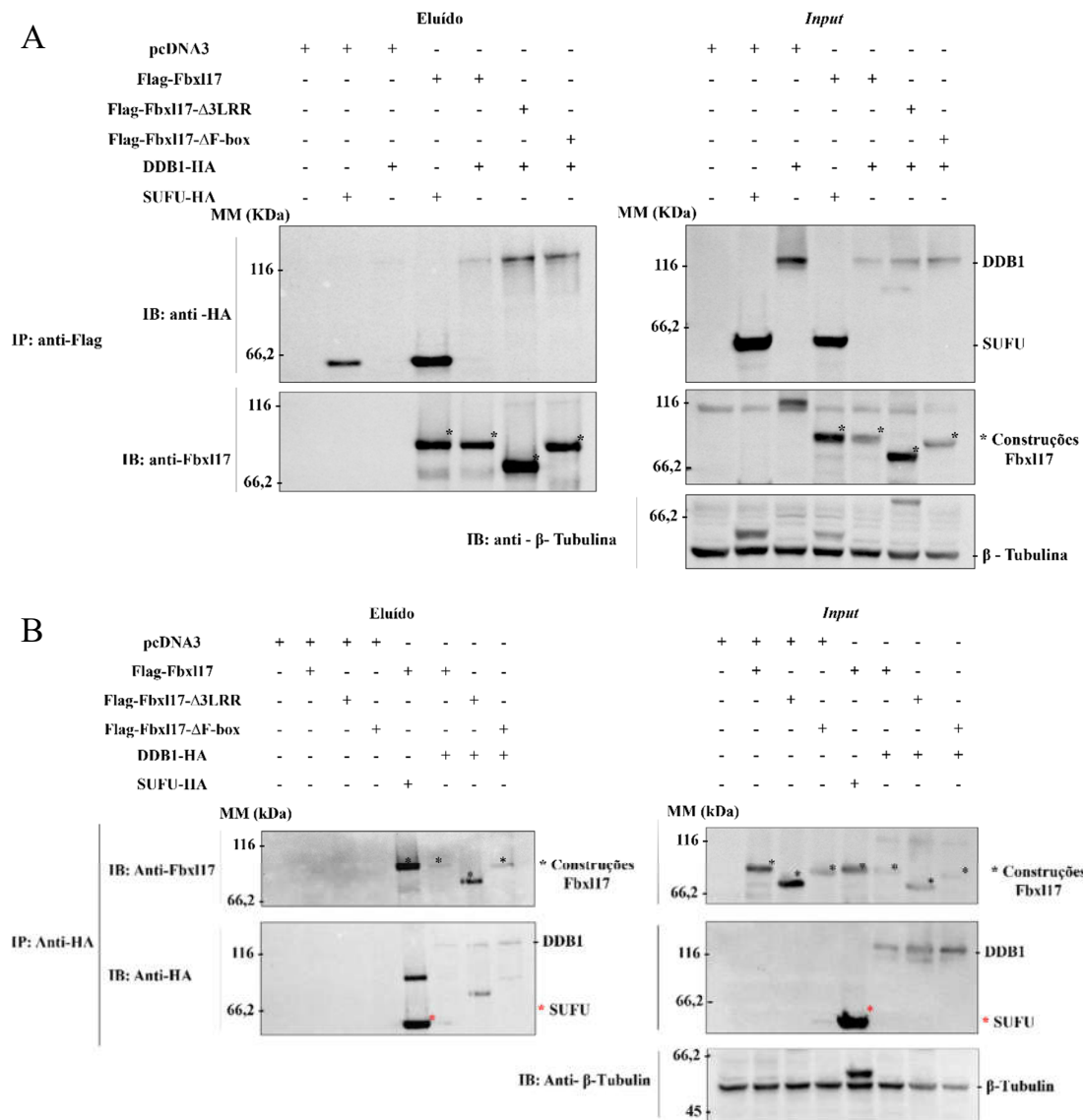
DDB1 não apareceu em nossas tabelas finais de potenciais substratos do *Protoarray* porque seus *spots* apareceram ubiquitinados em somente uma das replicatas dos *slides* onde foi usado o complexo selvagem (**Figura 16**) e (**Figura 34B**). Para validar a interação entre estas duas proteínas, realizamos ensaios de co-imunoprecipitação em células U2OS co-transfectadas com DDB1-FLAG e Fbx117-HA. Os resultados demonstraram que DDB1 foi co-eluída com Fbx117, mas não com o vetor controle pcDNA3 (**Figura 34A**). Os *inputs* demonstraram a expressão de Fbx117 e DDB1, sugerindo que Fbx117 interage com DDB1 nesta linhagem celular (**Figura 34A**). Outro dado interessante observado nos *inputs* foi que a co-transfecção de DDB1 com o vetor vazio apresentou sinal referente à DDB1 mais intenso em comparação ao sinal dessa proteína co-transfectada com Fbx117. Sugerindo que Fbx117 possivelmente estaria regulando os níveis intracelulares de DDB1.



**Figura 34.** Ensaio de interação entre DDB1 e Fbx117 em U2OS. **A)** Células U2OS foram transfectadas com os plasmídeos em destaque. Eluídos provenientes da co-imunoprecipitação usando resina agarose anti-FLAG à esquerda e extrato total (*input*) pode ser observado à direita. A resolução foi feita por *western blot* usando os anticorpos indicados. **B)** Imagem dos spots em duplicata referente à DDB1 – Os spots estavam presentes no *slide* denominado WT1 (*Wild Type 1*) onde a ubiquitinação foi feita usando o complexo selvagem SCF(Fbx117). A coordenada dos spots no slide é no bloco 12 (B12 - *Block 12*), linha 12 (R12 – *Row 12*) e nas colunas 11 e 12 (C11(12) – *Column 11 and 12*).

Em sequência, performamos outro ensaio de interação com o plasmídeo expressando a proteína DDB1 em células HEK293T co-transfectadas também com Fbx117- $\Delta$ 3LRR ou Fbx117- $\Delta$ F-box para verificação da capacidade de interação de DDB1 com estas construções mutantes (**Figura 35**). As três últimas colunas do eluído e do *input* foram as amostras onde foi feita co-transfecção de DDB1 com as construções de Fbx117 selvagem e as versões mutantes Fbx117- $\Delta$ 3LRR e Fbx117- $\Delta$ F-box, respectivamente. Detectamos a presença de DDB1 co-eluído com Fbx117 selvagem e com suas versões mutantes (**Figura 35A**). SUFU foi utilizada como controle positivo de interação, apresentando sinal intenso onde houve co-transfecção com Fbx117, SUFU também interagiu de forma inespecífica com a resina, embora, em proporção menor. Curiosamente, os níveis de DDB1 na presença de Fbx117 selvagem foi menor em comparação com a co-transfecção dessa proteína com Fbx117- $\Delta$ 3LRR ou Fbx117- $\Delta$ F-box, indicando que Fbx117 pode ser responsável pela regulação dos níveis deste substrato (**Figura 35A**). Este mesmo procedimento de transfecção foi reproduzido em uma segunda análise, onde foi feita a IP reversa, usando a resina anti-HA para interação com DDB1. Novamente pudemos identificar a presença de Fbx117, e as versões mutantes Fbx117- $\Delta$ 3LRR e Fbx117- $\Delta$ F-box, co-eluído com DDB1 (**Figura 35B**). Este dado está de acordo com o resultado obtido anteriormente no ensaio de interação de DDB1-Flag e Fbx117-HA, onde foi feita a IP usando a resina anti-FLAG para interação com DDB1 (**Figura 34A**).





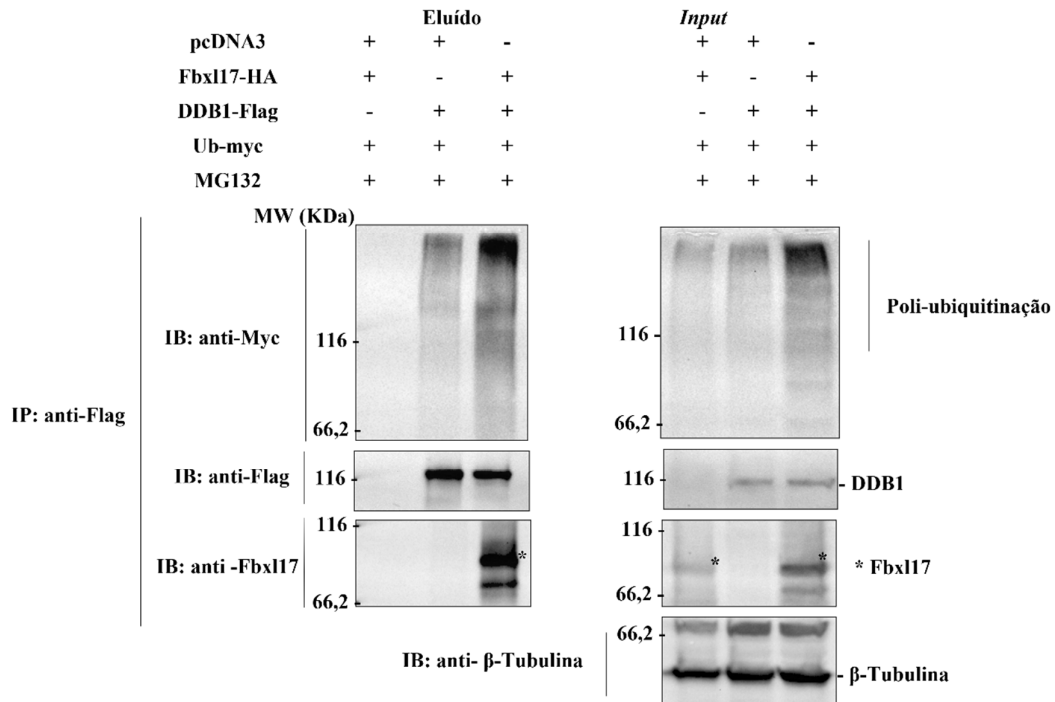
**Figura 35.** Ensaio de interação entre DDB1 e Fbx117 em HEK293T. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos em destaque. Eluído proveniente da imunoprecipitação usando resina anti-Flag à esquerda e extrato total (*input*) pode ser observado à direita. A resolução foi feita por *western blot* usando os anticorpos indicados.

Adicionalmente, observamos que DDB1 é capaz de interagir com todas as construções de Fbx117 utilizadas no experimento (**Figuras 35**). Já foi reportado que esse domínio é crucial para interação de DDB1 com Fbxo44 (Sjögren et al., 2015). Porém, com base em nossos resultados obtidos concluímos que o domínio F-box não é essencial para interação de Fbx117 com DDB1, uma vez que a deleção presente em Fbx117-ΔF-box não impactou sua interação com DDB1 (**Figura 35A – coluna 7, Figura 35B – coluna 8**). Também somos capazes de afirmar que a deleção presente no domínio LRR em Fbx117-Δ3LRR não impossibilitou a

interação dessa construção com DDB1. É possível observar também que a intensidade de sinal referente à DDB1 nas amostras co-transfectadas com Fbx117- $\Delta$ 3LRR e Fbx117- $\Delta$ F-box foi mais forte quando comparado com o sinal obtido na amostra co-transfectada com Fbx117 (**Figura 35**). Esse dado nos levou a hipótese de que as construções mutantes estariam promovendo a proteção de DDB1 contra degradação via proteassoma por meio da interação com essa proteína. No entanto estudos adicionais de estabilidade e ubiquitinação são necessários para confirmar essa teoria.

Sendo demonstrada a interação de DDB1 com Fbx117 em dois tipos celulares distintos, realizamos ensaios de ubiquitinação de DDB1 mediado por SCF(Fbx117) em células HEK293T (**Figura 35**). Observando as frações eluídas, notamos que onde foi feita a co-transfecção de DDB1 com Fbx117 o sinal de arraste referente à poliubiquitinação de DDB1 foi mais intenso do que quando comparamos ao sinal emitido na amostra usando o vetor vazio com DDB1 (**Figura 36, coluna 2 e 3**). Foi preparado um controle de poliubiquitinação para garantir que o sinal observado era referente à DDB1, onde foi feita a co-transfecção de Fbx117 com o vetor vazio, uma vez que o complexo SCF(Fbx117) tem a capacidade de se auto-ubiquitar. É possível notar que não houve sinal de arraste referente à poliubiquitinação neste controle, indicando que o sinal observado em DDB1 com Fbx117 se tratava de ubiquitinação específica em DDB1 (**Figura 36, coluna 1**). Esses resultados sugerem fortemente que DDB1 além de interagir com Fbx117, é um substrato do complexo SFC(Fbx117) em células HEK293T.

Para determinar que DDB1 é um substrato canônico de SCF(Fbx117), ensaios de estabilidade utilizando cicloheximida serão realizados com o intuito de avaliar o tempo de meia vida do alvo na presença ou ausência de Fbx117. Tendo validado esta hipótese, trataremos as células co-transfectadas com DDB1 e Fbx117 com o inibidor de proteassoma MG132, para avaliar se este inibe a degradação de DDB1, indicando que seria um substrato canônico da via ubiquitina-proteassoma.



**Figura 36.** Ensaio de ubiquitinação de DDB1 por Fbx17. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados. Os eluídos provenientes da imunoprecipitação usando resina agarose anti-FLAG à esquerda e extrato total (*input*) podem ser observados à direita. A resolução foi feita por *western blot* usando os anticorpos indicados.

## CONCLUSÃO

---

## 5 Conclusão

Concluimos que o complexo mutante SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) é menos estável que o complexo selvagem SCF(Fbx117), além de possuir uma atividade catalítica reduzida. Isso sugere que o domínio LRR presente em Fbx117 é crucial para formação e estabilidade do complexo SCF(Fbx117).

Após a análise de enriquecimento funcional dos potenciais alvos de SCF(Fbx117) foi possível observar que os alvos obtidos em ambas as análises se agruparam de forma majoritária na via de processamento do RNA, especialmente na modulação do *splicing* do pré-mRNA, e apresentaram sua localização celular na intercessão núcleo-citoplasma em sua maior proporção.

Nossos resultados indicaram que Fbx117 não atua na via de modulação do *splicing* do minigene *E1A*, sendo necessário a utilização de outro gene repórter de *splicing* para verificar se Fbx117 de fato não atua no processamento do *splicing* do pre-mRNA. Embora as listas geradas com o ensaio do *protoarray* sugerem que uma grande variedade dos possíveis substratos do complexo SCF(Fbx117) atuem regulando o *splicing* do pré-mRNA.

Os dados obtidos com os ensaios de interação e ubiquitinação indicaram que as proteínas SNRPB2 e SRSF9 foram capazes de interagir com Fbx117, porém não foram ubiquitinadas pelo complexo SCF(Fbx117). Adicionalmente, foi verificado que a proteína DDB1 também foi capaz de interagir com Fbx117 e foi ubiquitinada em células HEK293T pelo complexo SCF(Fbx117). Desta forma, este trabalho apresentou três novos ligantes de Fbx117 e um novo substrato do complexo.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

---

## 6 Perspectivas futuras

As listas de possíveis substratos presente nesse estudo podem ser utilizadas como ferramenta na busca de novos ligantes e substratos para o complexo SCF(Fbx117) em estudos futuros. O processo de validação de substrato para E3 ubiquitina-ligases específicas é um processo laborioso, tendo em mãos uma lista que promove o direcionamento de quais alvos poderia ser utilizada nos ensaios de validação facilitaria o processo.

Como a grande maioria dos alvos identificados neste trabalho se agruparam na via de modulação do *splicing* do pré-mRNA, seria interessante testar o papel de Fbx117 utilizando outro gene repórter de *splicing*. Embora Fbx117 não apresentou papel na regulação do *splicing* do pré-mRNA do minigene *E1A*, poderíamos obter um resultado diferente utilizando um gene repórter de *splicing* distinto.

Ensaio adicionais para determinar as consequências funcionais da interação de Fbx117 com SNRPB2 e SRSF9 são necessários. E ensaios de estabilidade usando cicloheximida serão realizados em estudos futuros para verificar como Fbx117 e suas construções mutantes afetam o tempo de meia vida de DDB1. Adicionalmente, para verificar se a ubiquitinação de DDB1 em célula é afetada pela mutação presente no domínio LRR em Fbx117- $\Delta$ 3LRR, ensaios de ubiquitinação em célula serão realizados futuramente.

## REFERÊNCIAS

---



## 7 Referências

- Achsel, T., Brahms, H., Kastner, B., Bachi, A., Wilm, M., & Lührmann, R. (1999). A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO Journal*, *18*(20), 5789–5802. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.20.5789>
- Baca, S. C., Prandi, D., Lawrence, M. S., Mosquera, J. M., Romanel, A., Drier, Y., Park, K., Kitabayashi, N., MacDonald, T. Y., Ghandi, M., Van Allen, E., Kryukov, G. V., Sboner, A., Theurillat, J. P., Soong, T. D., Nickerson, E., Auclair, D., Tewari, A., Beltran, H., ... Garraway, L. A. (2013). Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell*, *153*(3), 666–677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.021>
- Bazan, J., Calkosiński, I., & Gamian, A. (2012). Phage display - A powerful technique for immunotherapy: 2. Vaccine delivery. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *8*(12), 1829–1835. <https://doi.org/10.4161/hv.21704>
- Bedford, L., Lowe, J., Dick, L. R., Mayer, R. J., & Brownell, J. E. (2011). Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitinating-proteasome system as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, *10*(1), 29–46. <https://doi.org/10.1038/nrd3321>
- Bella, J., Hindle, K. L., McEwan, P. A., & Lovell, S. C. (2008). The leucine-rich repeat structure. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(15), 2307–2333. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8019-0>
- Bertram, K., Agafonov, D. E., Dybkov, O., Haselbach, D., Leelaram, M. N., Will, C. L., Urlaub, H., Kastner, B., Lührmann, R., & Stark, H. (2017). Cryo-EM Structure of a Pre-catalytic Human Spliceosome Primed for Activation. *Cell*, *170*(4), 701–713.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.011>
- Bi, Y., Cui, D., Xiong, X., & Zhao, Y. (2021). The characteristics and roles of  $\beta$ -TrCP1/2 in carcinogenesis. *FEBS Journal*, *288*(11), 3351–3374. <https://doi.org/10.1111/febs.15585>
- Bignell, G. R., Greenman, C. D., Davies, H., Butler, A. P., Edkins, S., Andrews, J. M., Buck, G., Chen, L., Beare, D., Latimer, C., Widaa, S., Hinton, J., Fahey, C., Fu, B., Swamy, S., Dalgliesh, G. L., Teh, B. T., Deloukas, P., Yang, F., ... Stratton, M. R. (2010). Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature*, *463*(7283), 893–898. <https://doi.org/10.1038/nature08768>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bressan, G. C., Quaresma, A. J. C., Moraes, E. C., Manfiolli, A. O., Passos, D. O., Gomes, M. D., & Kobarg, J. (2009). Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events. *FEBS Journal*, *276*(14), 3770–3783. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07092.x>
- Cáceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M., & Krainer, A. R. (1994). Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science*, *265*(5179), 1706–1709. <https://doi.org/10.1126/science.8085156>
- Cadwell, K., & Coscoy, L. (2006). Erratum: Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase (Science (July 1, 2005) (127)). *Science*, *311*(5758), 177.

<https://doi.org/10.1126/science.311.5758.177>

- Cang, Y., Zhang, J., Nicholas, S. A., Kim, A. L., Zhou, P., & Goff, S. P. (2007). DDB1 is essential for genomic stability in developing epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(8), 2733–2737. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611311104>
- Cenciarelli, C., Chiaur, D. S., Guardavaccaro, D., Parks, W., Vidal, M., Pagano, M., & F-box, S. E. (1999). Identification of a family of human F-box proteins F-box proteins. *Current Biology*, *October*, 1177–1179.
- Çetin, G., Klafack, S., Studencka-turski, M., & Krüger, E. (2021). The Ubiquitin – Proteasome System in Immune Cells. *Biomolecules*.
- Chen, D., Liu, X., Xia, T., Tekcham, D. S., Wang, W., Chen, H., Li, T., Lu, C., Ning, Z., Liu, X., Liu, J., Qi, H., He, H., & Piao, H. long. (2019). A Multidimensional Characterization of E3 Ubiquitin Ligase and Substrate Interaction Network. *IScience*, *16*, 177–191. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.033>
- Ci, W., Polo, J. M., & Melnick, A. (2008). B-cell lymphoma 6 and the molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Current Opinion in Hematology*, *15*(4), 381–390. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328302c7df>
- Clague, M. J., Barsukov, I., Coulson, J. M., Liu, H., Rigden, D. J., & Urbé, S. (2013). Deubiquitylases from genes to organism. *Physiological Reviews*, *93*(3), 1289–1315. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2013>
- Crusio, K. M., King, B., Reavie, L. B., & Aifantis, I. (2010). The ubiquitous nature of cancer: The role of the SCFFbw7 complex in development and transformation. *Oncogene*, *29*(35), 4865–4873. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.222>
- Cui, D., Dai, X., Shu, J., Ma, Y., Wei, D., Xiong, X., & Zhao, Y. (2020). The cross talk of two family members of  $\beta$ -TrCP in the regulation of cell autophagy and growth. *Cell Death and Differentiation*, *27*(3), 1119–1133. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0402-x>
- Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S. F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., Speed, D., Lynch, A. G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Gräf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., McKinney, S., Aparicio, S., Brenton, J. D., Ellis, I., ... Caldas, C. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, *486*(7403), 346–352. <https://doi.org/10.1038/nature10983>
- Danielsen, J. M. R., Sylvestersen, K. B., Bekker-Jensen, S., Szklarczyk, D., Poulsen, J. W., Horn, H., Jensen, L. J., Mailand, N., & Nielsen, M. L. (2011). Mass spectrometric analysis of lysine ubiquitylation reveals promiscuity at site level. *Molecular and Cellular Proteomics*, *10*(3), 1–12. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.003590>
- Davudian, S., Mansoori, B., Shajari, N., Mohammadi, A., & Baradaran, B. (2016). BACH1, the master regulator gene: A novel candidate target for cancer therapy. *Gene*, *588*(1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.04.040>
- Deshaies, R. J. (1999). SCF and Cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. [https://doi.org/1081-0706/99/1115-0435\\$08.00](https://doi.org/1081-0706/99/1115-0435$08.00)

- dos Passos, P. M. S., de Correia, C. R. S. T. B., de Oliveira, C. A. B., Spagnol, V., Martins, I. F. M., & Teixeira, F. R. (2022). Ubiquitin ligases: Proteolytic signaling, protein turnover, and disease. In *Proteolytic Signaling in Health and Disease* (pp. 11–40). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85696-6.00010-x>
- Fouad, S., Wells, O. S., Hill, M. A., & D'Angiolella, V. (2019). Cullin Ring Ubiquitin Ligases (CRLs) in Cancer: Responses to Ionizing Radiation (IR) Treatment. *Frontiers in Physiology*, *10*(October). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01144>
- French, M. E., Koehler, C. F., & Hunter, T. (2021). Emerging functions of branched ubiquitin chains. *Cell Discovery*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00237-y>
- Frescas, D., & Pagano, M. (2008). Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and  $\beta$ -TrCP: Tipping the scales of cancer. *Nature Reviews Cancer*, *8*(6), 438–449. <https://doi.org/10.1038/nrc2396>
- Fuchs, S. Y., Spiegelman, V. S., & Kumar, K. G. S. (2004). The many faces of  $\beta$ -TrCP E3 ubiquitin ligases: Reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene*, *23*(11 REV. ISS. 1), 2028–2036. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207389>
- Gao, D., Inuzuka, H., Tan, M. M., Fukushima, H., Locasale, J. W., Liu, P., Wan, L., Zhai, B., Chin, Y. R., Lyssiotis, C. A., Gygi, S. P., Toker, A., Cantley, L. C., John, M., Harper, J. W., & Wei, W. (2012). *NIH Public Access*. *44*(2), 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.030.mTOR>
- Geyer, R., Wee, S., Anderson, S., Yates, J., & Wolf, D. A. (2003). BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell*, *12*(3), 783–790. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00341-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00341-1)
- Griss, J., Viteri, G., Sidiropoulos, K., Nguyen, V., Fabregat, A., & Hermjakob, H. (2020). ReactomeGSA - Efficient Multi-Omics Comparative Pathway Analysis. *Molecular and Cellular Proteomics*, *19*(12), 2115–2124. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR120.002155>
- Guo, Z., Wang, X., Li, H., & Gao, Y. (2013). Screening E3 Substrates Using a Live Phage Display Library. *PLoS ONE*, *8*(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076622>
- Ha, J., Jang, H., Choi, N., Oh, J., Min, C., Pradella, D., Jung, D. W., Williams, D. R., Park, D., Ghigna, C., Zheng, X., & Shen, H. (2021). Srsf9 regulates cassette exon splicing of caspase-2 by interacting with its downstream exon. *Cells*, *10*(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/cells10030679>
- He, Y. J., McCall, C. M., Hu, J., Zeng, Y., & Xiong, Y. (2006). DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes and Development*, *20*(21), 2949–2954. <https://doi.org/10.1101/gad.1483206>
- Hu, J., McCall, C. M., Ohta, T., & Xiong, Y. (2004). Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to DNA damage. *Nature Cell Biology*, *6*(10), 1003–1009. <https://doi.org/10.1038/ncb1172>
- Hu, X., Meng, Y., Xu, L., Qiu, L., Wei, M., Su, D., Qi, X., Wang, Z., Yang, S., Liu, C., & Han, J. (2019). Cul4 E3 ubiquitin ligase regulates ovarian cancer drug resistance by targeting the antiapoptotic protein BIRC3. *Cell Death and Disease*, *10*(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1200-y>

- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, *37*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>
- Iconomou, M., & Saunders, D. N. (2016). Systematic approaches to identify E3 ligase Substrates. *Biochemical Journal*, *473*(22), 4083–4101. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160719>
- Iovine, B., Iannella, M. L., & Bevilacqua, M. A. (2011). Damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1): A protein with a wide range of functions. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *43*(12), 1664–1667. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.09.001>
- Jackson, P. K., & Eldridge, A. G. (2002). The SCF Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*, *9*(5), 923–925. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00538-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00538-5)
- Jurica, M. S., Licklider, L. J., Gygi, S. P., Grigorieff, N., & Moore, M. J. (2002). Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *Rna*, *8*(4), 426–439. <https://doi.org/10.1017/S1355838202021088>
- Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF- $\kappa$ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, *5*(10), 749–759. <https://doi.org/10.1038/nri1703>
- Kisselev, A. F., & Goldberg, A. L. (2001). Proteasome inhibitors: From research tools to drug candidates. *Chemistry and Biology*, *8*(8), 739–758. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00056-4)
- Kiwerska, K., & Szyfter, K. (2019). DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy—a double-edged sword. *Journal of Applied Genetics*, *60*(3–4), 329–334. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00516-9>
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, *37*(5), 937–953. <https://doi.org/10.1042/BST0370937>
- Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J. D. F., Odenwaelder, P., Wilkinson, K. D., & Barford, D. (2009). Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Reports*, *10*(5), 466–473. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.55>
- Lin, G. Y., & Lamb, R. A. (2000). The Paramyxovirus Simian Virus 5 V Protein Slows Progression of the Cell Cycle. *Journal of Virology*, *74*(19), 9152–9166. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.19.9152-9166.2000>
- Lin, G. Y., Paterson, R. G., Richardson, C. D., & Lamb, R. A. (1998). *The V protein of the Paramyxovirus SV5 interacts with damage-specific DNA binding protein* (pp. 189–200). <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9317>
- Loch, C. M., Eddins, M. J., & Strickler, J. E. (2011). Protein Microarrays for the Identification of Praja1 E3 Ubiquitin Ligase Substrates. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *60*(1–2), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9180-x>
- Lovejoy, C. A., Lock, K., Yenamandra, A., & Cortez, D. (2006). DDB1 Maintains Genome Integrity through Regulation of Cdt1. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(21), 7977–

7990. <https://doi.org/10.1128/mcb.00819-06>

- Mason, B., Flach, S., Teixeira, F. R., Manzano Garcia, R., Rueda, O. M., Abraham, J. E., Caldas, C., Edwards, P. A. W., & Laman, H. (2019). Fbx117 is rearranged in breast cancer and loss of its activity leads to increased global O-GlcNAcylation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(13), 2605–2620. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03306-y>
- Mason, B., & Laman, H. (2020). The FBXL family of F-box proteins: Variations on a theme: The FBXL family of F-box proteins. *Open Biology*, 10(11). <https://doi.org/10.1098/rsob.200319>
- McClellan, A. J., Laugesen, S. H., & Ellgaard, L. (2019). *Cellular functions and molecular mechanisms of non-lysine ubiquitination*.
- Mena, E. L., Kjolby, R. A. S., Saxton, R. A., Werner, A., Lew, B. G., Boyle, J. M., Harland, R., & Rape, M. (2018). Dimerization quality control ensures neuronal development and survival. *Science*, 362(6411). <https://doi.org/10.1126/science.aap8236>
- Modesti, M., Budzowska, M., Baldeyron, C., Demmers, J. A. A., Ghirlando, R., & Kanaar, R. (2007). RAD51AP1 Is a Structure-Specific DNA Binding Protein that Stimulates Joint Molecule Formation during RAD51-Mediated Homologous Recombination. *Molecular Cell*, 28(3), 468–481. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.025>
- Mohni, K. N., R. Wessel, S., Zhao, R., C. Wojciechowski, A., W. Luzwick, J., Layden, H., F. Eichman, B., S. Thompson, P., P. M. Mehta, K., & Cortez, D. (2019). HMCES Maintains Genome Integrity by Shielding Abasic Sites in Single-Strand DNA. *Cell*, 7(2), 1–16.
- Morishima, Y., Wang, A. M., Yu, Z., Pratt, W. B., Osawa, Y., & Lieberman, A. P. (2008). CHIP deletion reveals functional redundancy of E3 ligases in promoting degradation of both signaling proteins and expanded glutamine proteins. *Human Molecular Genetics*, 17(24), 3942–3952. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn296>
- Parplys, A. C., Zhao, W., Sharma, N., Groesser, T., Liang, F., Maranon, D. G., Leung, S. G., Grundt, K., Dray, E., Idate, R., Østvold, A. C., Schild, D., Sung, P., & Wiese, C. (2015). NUCKS1 is a novel RAD51AP1 paralog important for homologous recombination and genome stability. *Nucleic Acids Research*, 43(20), 9817–9834. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv859>
- Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J.-L. F., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P. E., Tyers, M., Bowerman, B., & Peter, M. (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, 425(6955), 307–311. <https://doi.org/10.1038/nature01874>
- Raducu, M., Fung, E., Serres, S., Infante, P., Barberis, A., Fischer, R., Bristow, C., Thézénas, M., Finta, C., Christianson, J. C., Buffa, F. M., Kessler, B. M., Sibson, N. R., Di Marcotullio, L., Toftgård, R., & D'Angiolella, V. (2016). SCF (Fbx117) ubiquitylation of Sufu regulates Hedgehog signaling and medulloblastoma development. *The EMBO Journal*, 35(13), 1400–1416. <https://doi.org/10.15252/embj.201593374>
- Randles, L., & Walters, K. J. (2018). Ubiquitin and its binding domains. *Physiology &*

*Behavior*, 176(5), 139–148.

- Ravid, T., & Hochstrasser, M. (2007). Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nature Cell Biology*, 9(4), 422–427. <https://doi.org/10.1038/ncb1558>
- Rayner, S. L., Morsch, M., Molloy, M. P., Shi, B., Chung, R., & Lee, A. (2019). Using proteomics to identify ubiquitin ligase–substrate pairs: how novel methods may unveil therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2499–2510. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03082-9>
- Robinson, D. R., Kalyana-Sundaram, S., Wu, Y. M., Shankar, S., Cao, X., Ateeq, B., Asangani, I. A., Iyer, M., Maher, C. A., Grasso, C. S., Lonigro, R. J., Quist, M., Siddiqui, J., Mehra, R., Jing, X., Giordano, T. J., Sabel, M. S., Klee, C. G., Palanisamy, N., ... Chinnaiyan, A. M. (2011). Functionally recurrent rearrangements of the MAST kinase and Notch gene families in breast cancer. *Nature Medicine*, 17(12), 1646–1651. <https://doi.org/10.1038/nm.2580>
- Sang, Y., Yan, F., & Ren, X. (2015). The role and mechanism of CRL4 E3 ubiquitin ligase in cancer and its potential therapy implications. *Oncotarget*, 6(40), 42590–42602. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6052>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sjögren, B., Swaney, S., & Neubig, R. R. (2015). FBXO44-mediated degradation of RGS2 protein uniquely depends on a cullin 4B/DDB1 complex. *PLoS ONE*, 10(5), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123581>
- Skaar, J. R., Pagan, J. K., & Pagano, M. (2013). Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(6), 369–381. <https://doi.org/10.1038/nrm3582>
- Stephens, P. J., McBride, D. J., Lin, M. L., Varela, I., Pleasance, E. D., Simpson, J. T., Stebbings, L. A., Leroy, C., Edkins, S., Mudie, L. J., Greenman, C. D., Jia, M., Latimer, C., Teague, J. W., Lau, K. W., Burton, J., Quail, M. A., Swerdlow, H., Churcher, C., ... Stratton, M. R. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*, 462(7276), 1005–1010. <https://doi.org/10.1038/nature08645>
- Sugasawa, K. (2009). *UV-DDB: A molecular machine linking DNA repair with ubiquitination* (pp. 969–972). <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.05.001>
- Tan, M. K. M., Lim, H. J., Bennett, E. J., Shi, Y., & Harper, J. W. (2013). Parallel SCF Adaptor Capture Proteomics Reveals a Role for SCFFBXL17 in NRF2 Activation via BACH1 Repressor Turnover. *Molecular Cell*, 52(1), 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.018>
- Tang, J., & Chu, G. (2002). Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein Jean. *DNA Repair*, 1(8), 601–616. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(02\)00052-6](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(02)00052-6)
- Teixeira, F. R., Manfiolli, A. O., Vieira, N. A., Medeiros, A. C., Coelho, P. O., Guimarães, D. S., Schechtman, D., & Gomes, M. D. (2017). FBXO25 regulates MAPK signaling

- pathway through inhibition of ERK1/2 phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1(621), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.04.003>.This
- Teixeira, Felipe Roberti, Randle, S. J., Patel, S. P., Mevissen, T. E. T., Zenkeviciute, G., Koide, T., Komander, D., & Laman, H. (2016). Gsk3 $\beta$  and Tomm20 are substrates of the SCFFbxo7/PARK15 ubiquitin ligase associated with Parkinson's disease. *Biochemical Journal*, 473(20), 3563–3580. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160387>
- Torgovnick, A., & Schumacher, B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics*, 6(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00157>
- Wagner, S. A., Beli, P., Weinert, B. T., Nielsen, M. L., Cox, J., Mann, M., & Choudhary, C. (2011). A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(10), M111.013284. <https://doi.org/10.1074/mcp.m111.013284>
- Watanabe, T., Sukegawa, J., Sukegawa, I., Tomita, S., Iijima, K. I., Oguchi, S., Suzuki, T., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1999). A 127-kDa protein (UV-DDB) binds to the cytoplasmic domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Journal of Neurochemistry*, 72(2), 549–556. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720549.x>
- Welcker, M., & Clurman, B. E. (2008). FBW7 ubiquitin ligase: A tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nature Reviews Cancer*, 8(2), 83–93. <https://doi.org/10.1038/nrc2290>
- Wenzel, D. M., Lissounov, A., Brzovic, P. S., & Klevit, R. E. (2011). UbcH7 reactivity profile reveals Parkin and HHARI to be RING/ HECT hybrids. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature09966>.UbcH7
- Winston, J. T., Koepp, D. M., Zhu, C., Elledge, S. J., Harper, J. W., Plaza, O. B., Harper, C. J. W., & Ly, L. A. (1999). A family of mammalian F-box proteins. *Current Biology*.
- Yang, J., & Zhang, Y. (2016). Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Current Protoc Bioinformatics*, 52(5). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0508s52>.
- Yumimoto, K., Yamauchi, Y., & Nakayama, K. I. (2020). F-box proteins and cancer. *Cancers*, 12(5), 1–28. <https://doi.org/10.3390/cancers12051249>
- Zhang, W.-J., & Wu, J. Y. (1998). Sip1, a Novel RS Domain-Containing Protein Essential for Pre-mRNA Splicing. *Molecular and Cellular Biology*, 18(2), 676–684. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.2.676>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Zhao, Y., Xiong, X., & Sun, Y. (2011). DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF $\beta$ TrCP E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy Yongchao. *Molecular Cell*, 44(2), 304–316. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.029>

## APÊNDICE

---



## Apêndice

**Tabela 7.** Tabela de alvos detectados positivos para SCF(Fbx117) subtraindo-se os positivos para Fbx117- $\Delta$ F-box. Obedecendo a  $p < 0,001$ .

Gene.Symbol	WT 25nM 1_pval	WT 25nM 2_pval	Delta3 1_pval	Delta3 2_pval	DeltaFbox 1_pval	DeltaFbox 2_pval
ABCF3	0,00305	0,00265	0,0154	0,0275	0,0455	0,0743
ABL1	0,00168	0	0,0122	0,0177	0,0307	0,0743
ABR	0,00168	0,00568	0,0162	0,0308	0,0396	0,0743
ADH4	0,00885	0,00909	0,0332	0,0476	0,0633	0,0891
AFAP1L2	0,00046	0,00568	0,00247	0,0144	0,0324	0,0466
AFF4	0,00305	0,00136	0,0162	0,0476	0,0563	0,0866
AGGF1	0,00474	0,00286	0,0232	0,0463	0,0731	0,0866
ANLN	0,00106	0,00438	0,0064	0,0233	0,0128	0,0257
ANP32B	0,00168	0,00265	0,0145	0,0353	0,0455	0,0695
ARHGAP12	0,000263	0,00409	0,0122	0,0275	0,0158	0,0198
BATF	0,00334	0,00286	0,0255	0,0476	0,0834	0,128
BCCIP	0,00764	0,005	0,0305	0,0451	0,0968	0,141
BCL11A	0,00305	0,00438	0,0171	0,0476	0,0941	0,0792
C10orf84	0,00764	0,00604	0,0318	0,0451	0,0455	0,0866
C11orf58	0,004	0,00308	0,0221	0,0365	0,0807	0,109
C11orf74	0,00655	0,0086	0,0733	0,0254	0,0518	0,122
C16orf80	0,00951	0,00308	0,0332	0,0595	0,0435	0,104
C1orf116	0,00606	0,00767	0,0279	0,0152	0,018	0,0466
C2orf13	0,000626	0,00162	0,00735	0,0169	0,0455	0,0647
C3orf26	0,00474	0,00468	0,0102	0,0254	0,0435	0,0647
C3orf37	0,0015	0,000357	0,00378	0,0275	0,0782	0,104
C6orf60	0,00823	0,00724	0,02	0,0377	0,0111	0,06
C8orf33	0,00207	0,00041	0,00956	0,0365	0,0158	0,0554
C8orf53	0,00606	0,00643	0,0487	0,068	0,125	0,188
C9orf150	0,00207	0,00909	0,00596	0,0152	0,0415	0,0671
C9orf82	0,00187	0,00533	0,00515	0,0102	0,0307	0,0363
CACNB1	0,00168	0,00331	0,00409	0,0137	0,0518	0,0172
CACYBP	0,00708	0,00767	0,0171	0,0451	0,0807	0,109
CAST	0	0,00812	0,00186	0,00737	0,0968	0,117
CBX5	0,000116	0,000923	0,0064	0,0186	0,0396	0,0647
CCDC106	0,00885	0,00604	0,0292	0,0582	0,0518	0,102
CCDC25	0,00187	0,00438	0,00378	0,0152	0,0415	0,0509
CCDC72	0,0012	0,00382	0,019	0,0755	0,0633	0,0509
CCDC95	0,000626	0,000151	0,00787	0,0223	0,0192	0,0554
CCNB3	0,00885	0,00959	0,00787	0,0786	0,0914	0,0241
CDC25A	0,00054	0,00308	0,00735	0,00843	0,0169	0,0184
CENTB2	0,00606	0,00124	0,021	0,0528	0,0782	0,102
CGI-38	0,004	0,00286	0,0243	0,0353	0,0941	0,138
CHD2	0	0,00192	0,0115	0,00843	0,0205	0,0326
CIP29	0,00823	0,00149	0,0154	0,0264	0,0111	0,0403

CLUAP1	0,0000765	0,00331	0,00247	0,00194	0,0148	0,0344
CNNM1	0,00278	0,00643	0,0318	0,009	0,0169	0,0695
COPS7B	0,00951	0,00767	0,0221	0,0451	0,0377	0,0532
CSPP1	0,00559	0,00959	0,0108	0,0195	0,0415	0,0743
DCLK1	0,00305	0,000529	0,0115	0,0377	0,0158	0,0403
DCUN1D3	0,00168	0,00192	0,00956	0,0186	0,026	0,0695
DDX21	0,00252	0,00724	0,0108	0,0319	0,0307	0,0532
DKK4	0,00515	0,00682	0,0292	0,0476	0,128	0,194
DNAJC8	0,00278	0,00382	0,0375	0,0489	0,0941	0,141
DOK1	0,004	0,00568	0,0145	0,0637	0,0158	0,0363
DPF2	0,00655	0,00724	0,039	0,068	0,145	0,161
DPPA4	0,00951	0,00568	0,0375	0,0609	0,0731	0,122
DRAP1	0,000826	0,00959	0,0064	0,0308	0,0246	0,0647
DYRK3	0,00823	0,00409	0,0346	0,0637	0,0609	0,0916
EAF1	0,00366	0,00767	0,0232	0,0451	0,102	0,136
EDC3	0,00823	0,00192	0,0437	0,0401	0,0887	0,141
EDN3	0,00515	0,00724	0,0171	0,0342	0,0275	0,0487
EIF2A	0,00106	0,00124	0,0595	0,0186	0,0111	0,0308
ERICH1	0	0,00209	0,00687	0,00372	0,0158	0,0198
FAM126B	0,00823	0,000669	0,021	0,0264	0,0231	0,0466
FAM128B	0,00168	0,00209	0,0137	0,0308	0,0231	0,06
FAM130A2	0,00305	0,000747	0,00687	0,0177	0,0205	0,0466
FAM44A	0,00366	0,000832	0,0115	0,0286	0,018	0,0647
FAM64A	0,00764	0,00124	0,0145	0,0169	0,0111	0,029
FAM92A1	0,00168	0,00604	0,02	0,0129	0,0307	0,0554
FGF16	0,00305	0,00767	0,0487	0,0342	0,0586	0,107
FGFR1OP	0,0000765	0,00909	0,0145	0,00596	0,0968	0,115
FHL3	0,00764	0,00959	0,054	0,0568	0,113	0,185
FLJ21908	0	0,00767	0,00515	0,00404	0,0435	0,01
FLJ35767	0,004	0,00812	0,0292	0,0195	0,0192	0,0403
FMNL2	0,00708	0,00533	0,0332	0,0476	0,0609	0,115
FRA10AC1	0	0,00533	0,0027	0,00404	0,0111	0,0326
GAK	0,00885	0,000832	0,0232	0,0401	0,0148	0,0257
GNL1	0,00606	0,000832	0,019	0,0264	0,0246	0,0624
GRHL3	0,00515	0,005	0,0279	0,0377	0,0887	0,109
HIF0	0,00168	0,000264	0,00787	0,0264	0,0169	0,0444
HMGB1	0,000263	0,00136	0,0137	0,0169	0,0657	0,107
HNRPC	0,00764	0,0086	0,0487	0,0365	0,0995	0,17
HSPC148	0,00054	0,00682	0,00515	0,00688	0,0205	0,0403
HTF9C	0,00366	0,00468	0,0558	0,0401	0,0586	0,122
ING1	0,0015	0,00136	0,0115	0,0296	0,054	0,0671
IRF2	0,0012	0,000669	0,0108	0,0204	0,0681	0,104
ITAC	0,00278	0,00209	0,0162	0,0214	0,0359	0,0792
ITGB3BP	0,00885	0,00245	0,0162	0,0389	0,0657	0,0941
KIAA0859	0,00366	0,00162	0,018	0,0389	0,0324	0,0577

KIAA1143	0,00207	0,00265	0,0122	0,0233	0,0681	0,115
KIAA1189	0,00366	0,000467	0,018	0,016	0,0324	0,0577
KIAA1618	0,00334	0,00331	0,00841	0,0214	0,0275	0,0403
KIF2C	0,00016	0,00604	0,019	0,00737	0,0246	0,0172
KIFC3	0,00951	0,00192	0,0243	0,0438	0,054	0,104
KPNA2	0,00474	0,00162	0,0171	0,0438	0,0455	0,0624
LARP7	0,00229	0,00682	0,0267	0,0319	0,0359	0,0743
LIG3	0,000388	0,0086	0,00442	0,00959	0,0246	0,0308
LOC399763	0,00207	0,00604	0,00409	0,0102	0,0231	0,029
LOC653972	0,00305	0,00227	0,0108	0,0401	0,0415	0,0671
LOC93349	0,00606	0,00909	0,0243	0,0426	0,0633	0,0423
LRRC48	0,00885	0,00767	0,0883	0,0438	0,0341	0,0487
LRRC6	0,0000406	0,0086	0,00225	0,009	0,0128	0,0127
LSM4	0,00764	0,00286	0,018	0,0451	0,0563	0,0719
MAB21L2	0,00823	0,00308	0,0243	0,0609	0,0324	0,0647
MAP3K2	0,00885	0,00382	0,0318	0,0528	0,0633	0,102
MAPK8IP2	0,000826	0,00331	0,013	0,0152	0,0138	0,0383
MCM10	0,00135	0,00767	0,0154	0,0709	0,0169	0,0423
MEOX1	0,00334	0,000596	0,0162	0,0451	0,0307	0,0866
MLLT6	0,000939	0,00227	0,019	0,0342	0,026	0,0308
MND1	0,00515	0,000596	0,0122	0,0195	0,0455	0,0916
MORN3	0,00252	0,00286	0,00687	0,0204	0,0102	0,0273
MPP1	0,00334	0,000832	0,00956	0,0342	0,0324	0,0532
MSL3L1	0,00106	0,00909	0,00735	0,077	0,0192	0,0326
N/A	0,00016	0,00959	0,00247	0,00737	0,0148	0,0148
NA	0,00229	0,00245	0,018	0,033	0,0415	0,0866
NAP1L1	0,00229	0,00192	0,0115	0,0233	0,0563	0,0768
NAP1L2	0,00207	0,00177	0,0162	0,0177	0,0455	0,0941
NCAPG	0,00334	0,0000644	0,00841	0,0137	0,0231	0,0509
NCF2	0,00606	0,00682	0,019	0,0568	0,054	0,775
NCK1	0,00515	0,00812	0,0243	0,0377	0,0563	0,0841
NEUROD1	0,00229	0,00468	0,0122	0,0243	0,0192	0,029
NIP30	0,00054	0,005	0,0243	0,0223	0,0359	0,0743
NOLC1	0,0000765	0,00162	0,00442	0,0152	0,47	0,0403
NVL	0,00187	0,00909	0,0405	0,0319	0,054	0,112
ODF2	0,00207	0,00767	0,0032	0,0129	0,0128	0,0241
OFD1	0,00951	0,00209	0,0332	0,0502	0,0706	0,107
OR1A2	0,00885	0,00245	0,0243	0,0476	0,0377	0,0647
OTUD6B	0,0012	0,00959	0,039	0,0275	0,0807	0,0743
PAIP2	0,00168	0,000357	0,00515	0,0195	0,0341	0,0991
PAK6	0,00559	0,000467	0,0221	0,0401	0,0246	0,0671
PARG	0,00334	0,00568	0,018	0,0296	0,0609	0,0671
PES1	0,000722	0,00812	0,00554	0,009	0,0138	0,0198
PGBD4	0,00515	0,00192	0,0122	0,0319	0,0324	0,0577
PHF23	0,0000406	0,00767	0,0032	0,00194	0,0102	0,0109

PI4KB	0,00252	0,000529	0,0108	0,0296	0,0341	0,0532
PLEKHC1	0,00046	0,00382	0,0122	0,0115	0,0415	0,0363
PLEKHF2	0,00168	0,00245	0,0108	0,0233	0,0435	0,0624
PPFIBP2	0,00168	0,00209	0,021	0,0275	0,0609	0,0991
PPP1R10	0,00135	0,0000905	0,00787	0,0254	0,0138	0,0532
PRKCA	0,0012	0,00331	0,0032	0,0108	0,0148	0,0172
PRKCB1	0,000626	0,00468	0,02	0,0152	0,0341	0,0554
PRKCZ	0,00708	0,0086	0,00478	0,0204	0,0291	0,0344
PRPF38A	0,00305	0,00112	0,00554	0,0243	0,018	0,029
PSCD4	0,00606	0,00724	0,102	0,0451	0,0706	0,0817
PSMA8	0,00474	0,00162	0,0154	0,0401	0,0128	0,0257
RAD51AP1	0,00135	0,00682	0,00442	0,0177	0,0205	0,0326
RAPGEF4	0,00366	0,00409	0,0171	0,0414	0,0968	0,15
RBM23	0,000939	0,00112	0,0064	0,0214	0,018	0,0383
RDBP	0,0000083	0,00767	0,0032	0,00641	0,0111	0,0127
RFX5	0	0,00568	0,00378	0,0144	0,0192	0,0344
RGS14	0,00229	0,0000644	0,00735	0,0264	0,0291	0,128
RIMS3	0,00655	0,00724	0,0279	0,0438	0,0169	0,0326
RIOK1	0	0,00177	0,000667	0,00141	0,0102	0,016
RPH3AL	0,00305	0,00533	0,0346	0,0342	0,018	0,0257
RPL23A	0,00278	0,000119	0,00956	0,0353	0,018	0,0647
RPL31	0,00334	0,00468	0,0346	0,0582	0,113	0,15
RPS19	0,00054	0,00112	0,0232	0,0204	0,0415	0,0817
RPS20	0,00366	0,00767	0,0115	0,0308	0,0307	0,0444
RPS6KB1	0,00305	0,00409	0,0115	0,0186	0,0128	0,0403
RSL1D1	0,00951	0,00767	0,0305	0,0528	0,0518	0,112
RSRC2	0,000722	0,00112	0,0122	0,0308	0,0341	0,0792
RUFY4	0,00764	0,00643	0,039	0,0438	0,0834	0,128
SAFB2	0,00187	0,000596	0,00897	0,0177	0,0377	0,0532
SAMSN1	0	0,000357	0,00554	0,00474	0,0169	0,0383
SFRS5	0,00168	0,00533	0,00956	0,0223	0,0158	0,0383
SFRS6	0,00606	0,00265	0,00409	0,0195	0,0138	0,775
SFRS9	0,00559	0,00409	0,0232	0,0365	0,0307	0,0866
SIP1	0,00708	0,00227	0,0267	0,0214	0,0307	0,0344
SLC4A1AP	0	0,00286	0,00137	0,00737	0,0111	0,0118
SMARCA5	0,000116	0,000747	0,00841	0,0186	0,0396	0,0532
SMNDC1	0,00252	0,00724	0,0437	0,0414	0,0518	0,0768
SNRPA1	0,00366	0,000669	0,0108	0,0243	0,018	0,0487
SNRPB2	0,00559	0,00331	0,0267	0,0414	0,0359	0,0817
SPATS2	0,004	0,00767	0,0243	0,0296	0,0633	0,0841
SRPK2	0,000939	0,0086	0,00841	0,0195	0,0476	0,0719
STK33	0,000323	0,00767	0,021	0,0115	0,0341	0,0866
SUHW2	0,000323	0,00767	0,0232	0,0129	0,0275	0,0344
SURF2	0,000826	0,00177	0,0162	0,0264	0,0377	0,0647
TADA3L	0,0012	0,00568	0,00186	0,00688	0,0497	0,0118

TARS	0,00823	0,00959	0,0558	0,0651	0,128	0,182
TBPL1	0,00515	0,00533	0,00687	0,0286	0,026	0,0466
TIAM2	0,00334	0,00959	0,0292	0,0342	0,0586	0,0966
TNRC5	0,00252	0,0086	0,00787	0,0308	0,0435	0,0487
TRAT1	0,00135	0,00136	0,0122	0,0254	0,0377	0,0695
TSGA10	0,00515	0,00643	0,0292	0,0377	0,0497	0,107
TTL7	0,00515	0,000529	0,018	0,0365	0,0324	0,0866
UPF3A	0,000722	0,000747	0,0108	0,221	0,0169	0,0768
USP45	0,00187	0,00209	0,019	0,0319	0,0563	0,104
WASL	0,000209	0,000669	0,00554	0,016	0,0586	0,0695
WBSR22	0,00708	0,00356	0,0405	0,0609	0,0497	0,0841
WDR4	0,00764	0,005	0,0232	0,0414	0,0396	0,0466
YY1	0,00606	0,000669	0,00956	0,0186	0,0158	0,0403
ZBTB14	0,00474	0,00331	0,0243	0,0254	0,0324	0,0577
ZFAND1	0,00951	0,00959	0,013	0,0286	0,0377	0,0444
ZHX2	0,000826	0	0,00294	0,741	0,0341	0,06
ZKSCAN4	0,00366	0,000529	0,021	0,0414	0,0476	0,0624
ZNF428	0,00229	0,00568	0,0243	0,0296	0,0455	0,0941
ZNF706	0,00655	0,00724	0,018	0,0463	0,0586	0,0768

**Tabela 8.** Tabela de alvos detectados positivos para SCF(Fbx117) subtraindo-se os positivos para SCF(Fbx117- $\Delta$ 3LRR) e Fbx117- $\Delta$ F-box. Obedecendo a  $p < 0,001$ .

Gene.Symbol	WT_25nM_1_pval	WT_25nM_2_pval	Delta3_1_pval	Delta3_2_pval	DeltaFbox_1_pval	DeltaFbox_2_pval
ABR	0,00168	0,00568	0,0162	0,0308	0,0396	0,0743
AFF4	0,00305	0,00136	0,0162	0,0476	0,0563	0,0866
AGGF1	0,00474	0,00286	0,0232	0,0463	0,0731	0,0866
ANP32B	0,00168	0,00265	0,0145	0,0353	0,0455	0,0695
BATF	0,00334	0,00286	0,0255	0,0476	0,0834	0,128
BCCIP	0,00764	0,005	0,0305	0,0451	0,0968	0,141
BCL11A	0,00305	0,00438	0,0171	0,0476	0,0941	0,0792
C10orf84	0,00764	0,00604	0,0318	0,0451	0,0455	0,0866
C11orf58	0,004	0,00308	0,0221	0,0365	0,0807	0,109
C11orf74	0,00655	0,0086	0,0733	0,0254	0,0518	0,122
C1orf116	0,00606	0,00767	0,0279	0,0152	0,018	0,0466
C3orf26	0,00474	0,00468	0,0102	0,0254	0,0435	0,0647
C8orf53	0,00606	0,00643	0,0487	0,068	0,125	0,188
CCDC106	0,00885	0,00604	0,0292	0,0582	0,0518	0,102
CENTB2	0,00606	0,00124	0,021	0,0528	0,0782	0,102
CGI-38	0,004	0,00286	0,0243	0,0353	0,0941	0,138
COPS7B	0,00951	0,00767	0,0221	0,0451	0,0377	0,0532
DCLK1	0,00305	0,000529	0,0115	0,0377	0,0158	0,0403
DDX21	0,00252	0,00724	0,0108	0,0319	0,0307	0,0532
DKK4	0,00515	0,00682	0,0292	0,0476	0,128	0,194
DNAJC8	0,00278	0,00382	0,0375	0,0489	0,0941	0,141
DOK1	0,004	0,00568	0,0145	0,0637	0,0158	0,0363

EAF1	0,00366	0,00767	0,0232	0,0451	0,102	0,136
EDC3	0,00823	0,00192	0,0437	0,0401	0,0887	0,141
EDN3	0,00515	0,00724	0,0171	0,0342	0,0275	0,0487
FAM126B	0,00823	0,000669	0,021	0,0264	0,0231	0,0466
FAM128B	0,00168	0,00209	0,0137	0,0308	0,0231	0,06
FAM44A	0,00366	0,000832	0,0115	0,0286	0,018	0,0647
FAM92A1	0,00168	0,00604	0,02	0,0129	0,0307	0,0554
FGF16	0,00305	0,00767	0,0487	0,0342	0,0586	0,107
GAK	0,00885	0,000832	0,0232	0,0401	0,0148	0,0257
GNL1	0,00606	0,000832	0,019	0,0264	0,0246	0,0624
GRHL3	0,00515	0,005	0,0279	0,0377	0,0887	0,109
HMGB1	0,000263	0,00136	0,0137	0,0169	0,0657	0,107
HTF9C	0,00366	0,00468	0,0558	0,0401	0,0586	0,122
ING1	0,0015	0,00136	0,0115	0,0296	0,054	0,0671
IRF2	0,0012	0,000669	0,0108	0,0204	0,0681	0,104
ITGB3BP	0,00885	0,00245	0,0162	0,0389	0,0657	0,0941
KIAA0859	0,00366	0,00162	0,018	0,0389	0,0324	0,0577
KIAA1143	0,00207	0,00265	0,0122	0,0233	0,0681	0,115
KIAA1189	0,00366	0,000467	0,018	0,016	0,0324	0,0577
KPNA2	0,00474	0,00162	0,0171	0,0438	0,0455	0,0624
LARP7	0,00229	0,00682	0,0267	0,0319	0,0359	0,0743
LOC653972	0,00305	0,00227	0,0108	0,0401	0,0415	0,0671
LSM4	0,00764	0,00286	0,018	0,0451	0,0563	0,0719
MAPK8IP2	0,000826	0,00331	0,013	0,0152	0,0138	0,0383
MEOX1	0,00334	0,000596	0,0162	0,0451	0,0307	0,0866
MND1	0,00515	0,000596	0,0122	0,0195	0,0455	0,0916
NAP1L1	0,00229	0,00192	0,0115	0,0233	0,0563	0,0768
NAP1L2	0,00207	0,00177	0,0162	0,0177	0,0455	0,0941
NCF2	0,00606	0,00682	0,019	0,0568	0,054	0,775
NCK1	0,00515	0,00812	0,0243	0,0377	0,0563	0,0841
NEUROD1	0,00229	0,00468	0,0122	0,0243	0,0192	0,029
NIP30	0,00054	0,005	0,0243	0,0223	0,0359	0,0743
OFD1	0,00951	0,00209	0,0332	0,0502	0,0706	0,107
OR1A2	0,00885	0,00245	0,0243	0,0476	0,0377	0,0647
PAK6	0,00559	0,000467	0,0221	0,0401	0,0246	0,0671
PGBD4	0,00515	0,00192	0,0122	0,0319	0,0324	0,0577
PLEKHC1	0,00046	0,00382	0,0122	0,0115	0,0415	0,0363
PLEKHF2	0,00168	0,00245	0,0108	0,0233	0,0435	0,0624
PPFIBP2	0,00168	0,00209	0,021	0,0275	0,0609	0,0991
PRKCB1	0,000626	0,00468	0,02	0,0152	0,0341	0,0554
PSCD4	0,00606	0,00724	0,102	0,0451	0,0706	0,0817
PSMA8	0,00474	0,00162	0,0154	0,0401	0,0128	0,0257
RIMS3	0,00655	0,00724	0,0279	0,0438	0,0169	0,0326
RPH3AL	0,00305	0,00533	0,0346	0,0342	0,018	0,0257
RPL31	0,00334	0,00468	0,0346	0,0582	0,113	0,15

RPS19	0,00054	0,00112	0,0232	0,0204	0,0415	0,0817
RPS20	0,00366	0,00767	0,0115	0,0308	0,0307	0,0444
RPS6KB1	0,00305	0,00409	0,0115	0,0186	0,0128	0,0403
RSRC2	0,000722	0,00112	0,0122	0,0308	0,0341	0,0792
RUFY4	0,00764	0,00643	0,039	0,0438	0,0834	0,128
SFRS5	0,000626	0,005	0,0102	0,0233	0,0158	0,0363
SFRS9	0,00559	0,00409	0,0232	0,0365	0,0307	0,0866
SNRPA1	0,00366	0,000669	0,0108	0,0243	0,018	0,0487
SNRPB2	0,00559	0,00331	0,0267	0,0414	0,0359	0,0817
SPATS2	0,004	0,00767	0,0243	0,0296	0,0633	0,0841
STK33	0,000323	0,00767	0,021	0,0115	0,0341	0,0866
SUHW2	0,000323	0,00767	0,0232	0,0129	0,0275	0,0344
SURF2	0,000826	0,00177	0,0162	0,0264	0,0377	0,0647
TIAM2	0,00334	0,00959	0,0292	0,0342	0,0586	0,0966
TRAT1	0,00135	0,00136	0,0122	0,0254	0,0377	0,0695
TSGA10	0,00515	0,00643	0,0292	0,0377	0,0497	0,107
TTL7	0,00515	0,000529	0,018	0,0365	0,0324	0,0866
USP45	0,00187	0,00209	0,019	0,0319	0,0563	0,104
WBSCR22	0,00708	0,00356	0,0405	0,0609	0,0497	0,0841
WDR4	0,00764	0,005	0,0232	0,0414	0,0396	0,0466
ZBTB14	0,00474	0,00331	0,0243	0,0254	0,0324	0,0577
ZFAND1	0,00951	0,00959	0,013	0,0286	0,0377	0,0444
ZKSCAN4	0,00366	0,000529	0,021	0,0414	0,0476	0,0624
ZNF428	0,00229	0,00568	0,0243	0,0296	0,0455	0,0941
ZNF706	0,00655	0,00724	0,018	0,0463	0,0586	0,0768

## ANEXO





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

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

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

## ***Ubiquitin-proteasome system (UPS) and E3 ligases***

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is the major responsible for intracellular proteolysis having a central role in regulating many cellular processes such as cell cycle progression, apoptosis, immune response, differentiation, signal transduction, and protein quality control [1]. This system was described by Aaron Ciechanover, Avram Hershko, and Irwin Rose, who received the Nobel Prize in Chemistry in 2004.

The ubiquitin is a small protein composed of 76 amino acids with approximately 8.5 kDa, which is found ubiquitously in most eukaryotic cells [2]. It is attached to a protein substrate through an isopeptide bond formed between the carboxyl group (COO<sup>-</sup>) of the ubiquitin's glycine 76 and the amino group of the protein target. This posttranslational modification called ubiquitination involves a three-step enzyme cascade: initially, ubiquitin-activating enzyme (E1) catalyzes ubiquitin activation in an ATP-dependent reaction; secondly, activated ubiquitin is transferred to ubiquitin-conjugating enzyme (E2) via a thioester linkage between E2 cysteine in active site and C-terminal of ubiquitin; finally, ubiquitin ligases (E3) that specifically binds to the substrate recruits the E2 ~ Ub and catalyzes the transferring of ubiquitin to the substrate [1] (Fig. 1).

The human genome encodes two E1 enzymes, 37 E2 enzymes, and more than 600 E3 ligases, which are classified in two major families based on their specific domains: HECT (homologous to E6-associated protein C-terminus) domain or a RING (really interesting new gene) finger domain. HECT and RING E3 ligases have different mechanisms to ubiquitinate their substrates. HECTs catalyze substrate ubiquitination in a two-step reaction:

---

<sup>a</sup>These authors contributed equally for this work.

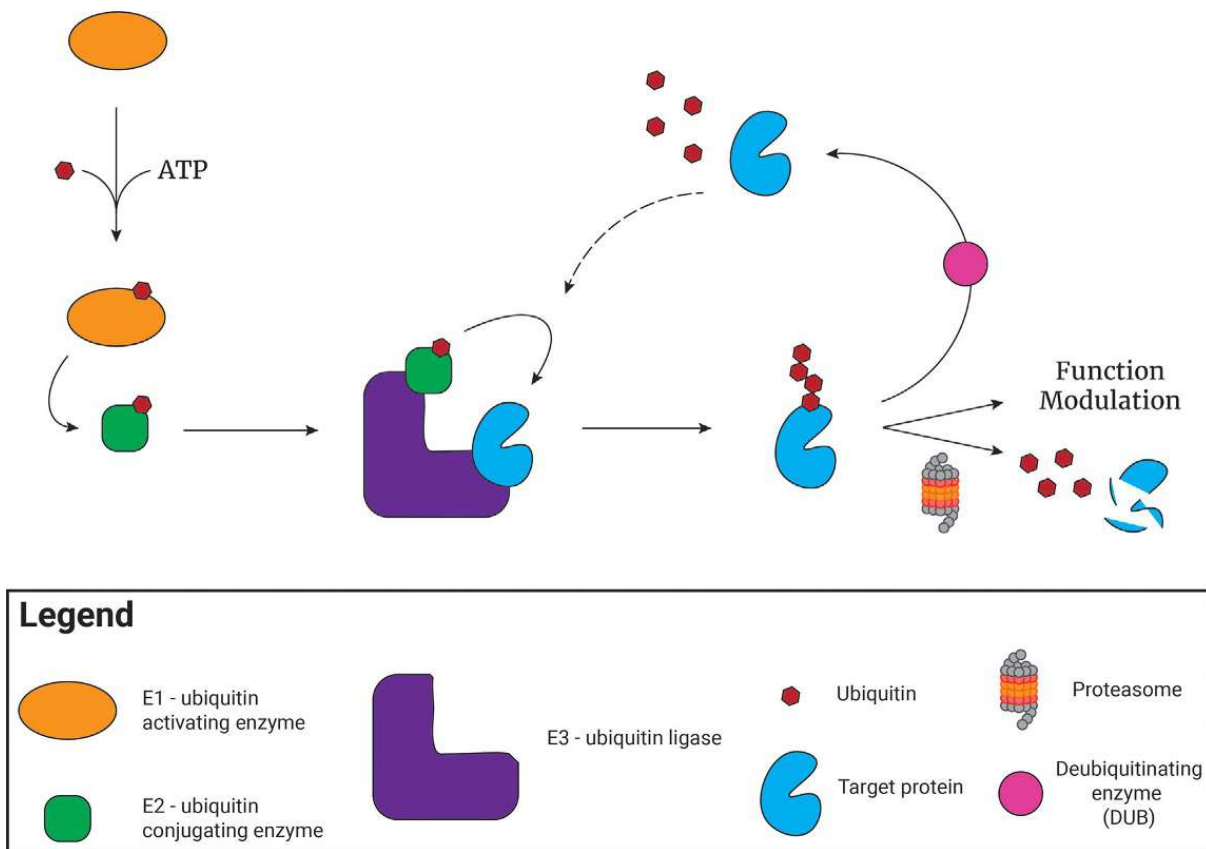
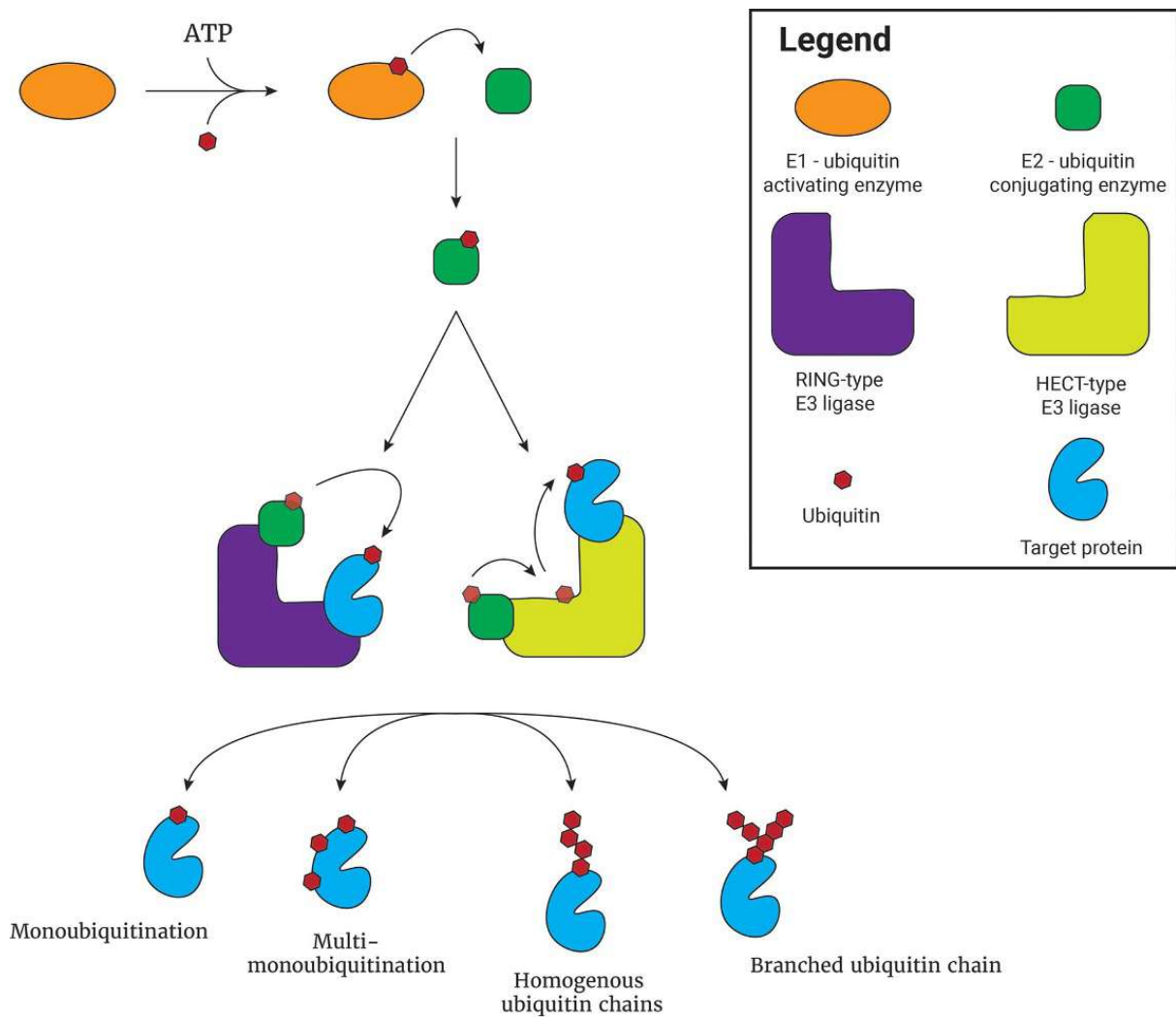


Fig. 1

The ubiquitin-proteasome system. Ubiquitin is activated by E1 in an ATP-dependent reaction and transferred to an E2. Finally, the E3 ubiquitin ligase transfers the ubiquitin from E2 to a substrate. Ubiquitination either can direct the polyubiquitinated substrate to the proteasome for degradation or can alter the function of the target protein. Furthermore, ubiquitinated substrate can be deubiquitinated by deubiquitinating enzymes.

in the first step, HECT conserved cysteine residue accepts activated ubiquitin from an E2 by a transthioylation reaction; in the second step, the ubiquitin is transferred from the E3 intermediate to a lysine on the target substrate, whereas RING E3s transfer ubiquitin directly from E2 to substrate [3] (Fig. 2).

Most of the human E3 ligases are RING type with the Cullin RING ligases (CRLs) superfamily being the most abundant. They are composed of Cullin protein (Cul-1, -2, -3, -4a, -4b, -5, -7, or -9), a small RING protein (Rbx1/Roc1/Hrt1), and either an adaptor protein(s) that binds to an interchangeable substrate recognition protein [4]. The most studied class of CRLs is the SCF (SKP, Cullin, F-box), which is composed of SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1), Cullin 1, Rbx1 (RING box protein 1), and a member of F-box protein family (Fig. 3A). Rbx1 contains a RING domain that interacts with Cullin 1 and recruits E2 ~ Ub to be transferred to the substrate. Cullin 1 is a scaffold of the complex, interacting with Rbx1 at C-terminus and SKP1 at N-terminus. SKP1 works as an adapter linking the

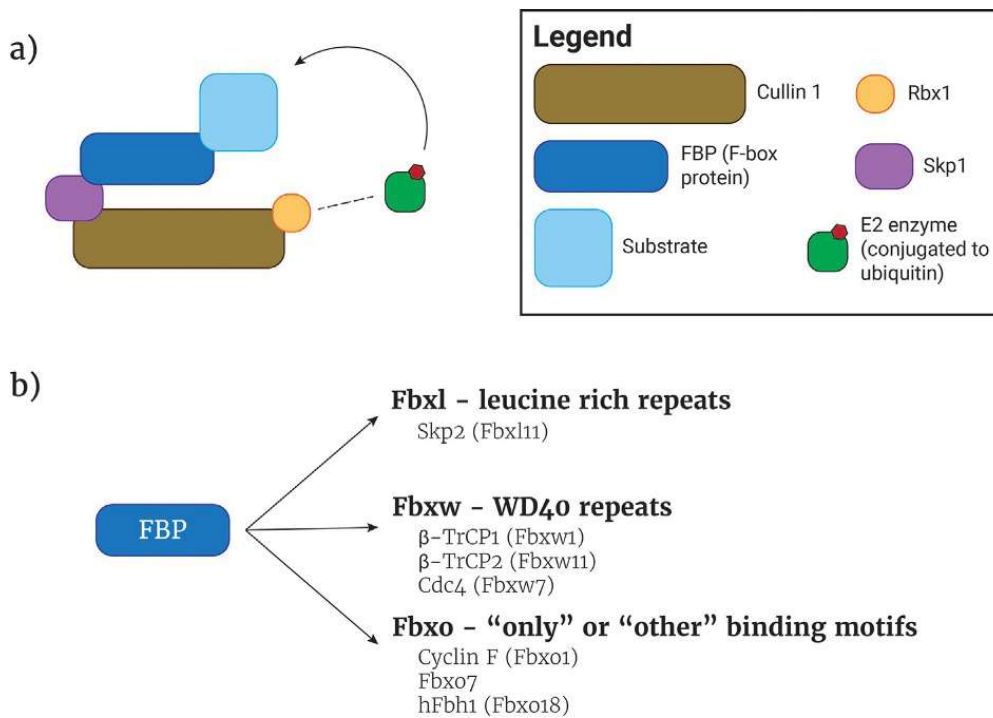


**Fig. 2**

Different mechanisms of ubiquitination by two classes of E3 ubiquitin ligases: HECT and RING E3 ligases. HECT E3 ligases catalyze substrate ubiquitination in a two-step reaction: first, ubiquitin is transferred from E2 to HECT E3, and then, ubiquitin is transferred to substrate, whereas RING E3s transfer ubiquitin directly from E2 ~ Ub to substrate.

F-box protein to Cullin 1, connecting it with the rest of the complex. Finally, F-box proteins are characterized by a 42–48 amino acid F-box motif that binds SKP1 and also a carboxy-terminal domain that interacts with substrates, which allow the specificity of ubiquitination [5].

There are 69 F-box proteins in humans that are classified into three families based on its substrate-interacting domain: FBXW, with WD40 repeated domain; FBXL, with Leucine-Rich Repeats (LRR); and FBXO, with either another or no other motif [6] (Fig. 3B). The SCF complexes regulate cell cycle, immune response, signaling pathways, and development stages through the ubiquitination of their targets, such as cyclins and  $\beta$ -catenin.

**Fig. 3**

(A) The SCF (SKP1, Cullin 1, F-box) E3 ubiquitin ligases. SCF complexes are composed of SKP1, Cullin 1, Rbx1 and an F-box protein. Rbx1 interacts with Cullin 1 and recruits E2 ~ Ub to be transferred to the substrate. Cullin 1 is a scaffold of the complex, interacting with Rbx1 and SKP1. The F-box proteins utilize the F-box domain to interact with SKP1. (B) The three classes of F-box proteins and the most studied proteins of each class.

Deregulation of SCF-dependent proteolysis can lead to neoplastic transformation, in which mutations of SCF subunit are found in several breast and ovarian cancer cell lines [7].

The target protein can be monoubiquitinated or multi-monoubiquitinated, where a ubiquitin is added in multiple lysine residues. Moreover, the first ubiquitin attached to substrate can prime the attachment of another ubiquitin into the first through their seven lysine residues (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, and Lys63), resulting in different types of ubiquitin chains. Each one of them has a unique tertiary structure resulting in different cascade events in the cells [8] (Fig. 4). Monoubiquitination is involved in cellular recycling, lysosome degradation of cell-surface receptors, DNA repair, histone regulation, and others. Ub chains linked via Lys48 or 63 are the most well characterized, while Lys48 polyubiquitinated destines the substrate for 26S proteasome degradation, the Lys63 polyubiquitination has a nondegradative function in different signaling pathways such as endocytosis, DNA repair, and NF- $\kappa$ B [9].

The ubiquitination is a reversible process, where ubiquitin can be removed from the substrate by deubiquitinating enzymes (DUBs). There are approximately 79 DUBs in the human

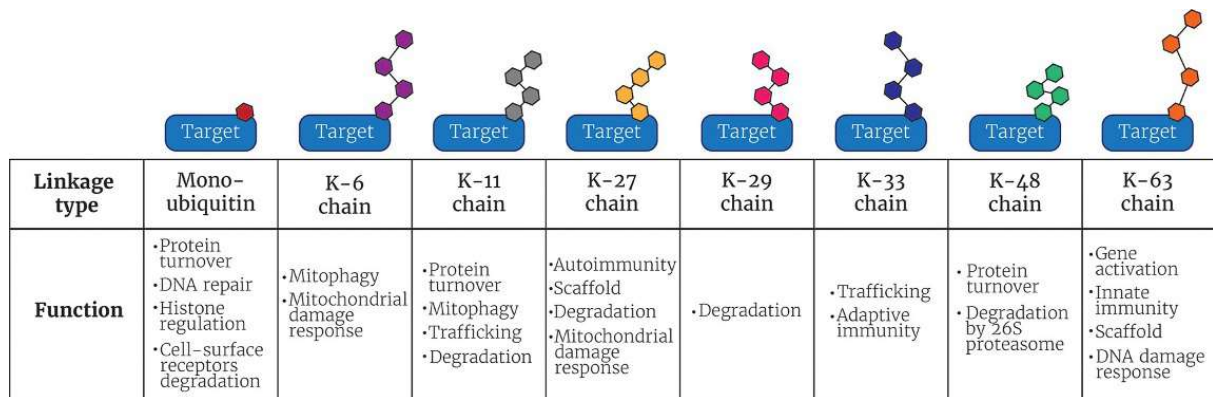


Fig. 4

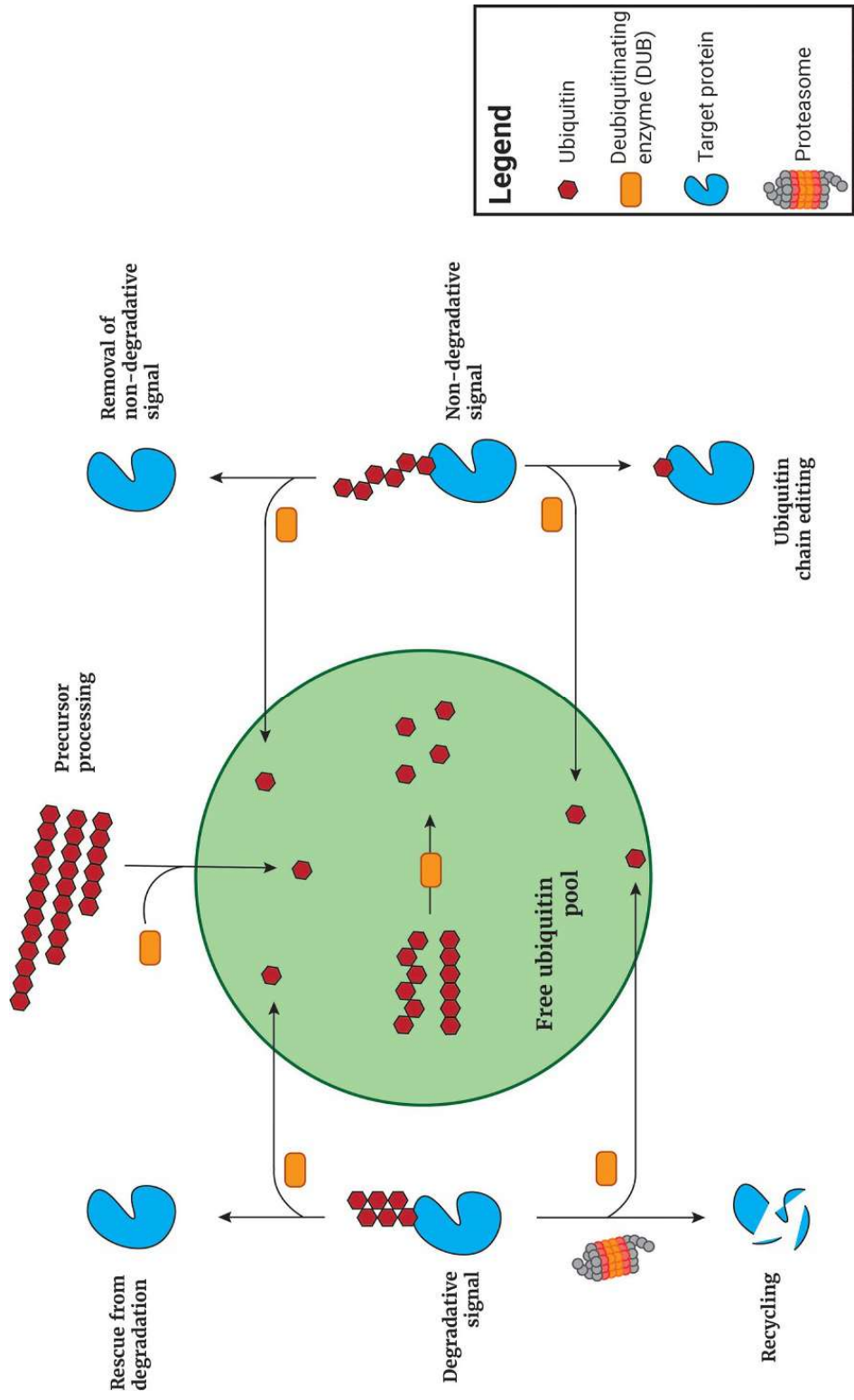
Representation of monoubiquitinated substrate and different polyubiquitin chain types via Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63, and their respective cellular functions.

genome responsible for removing ubiquitin molecules from the target protein. DUBs are also called as deubiquitylating or deubiquitinating enzymes and can be subdivided into five families: ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHs), ubiquitin-specific proteases (USPs), ovarian tumor proteases (OTUS), Josephins, and JAB1/MPN/MOV34 metalloenzymes. DUBs’ activities are specific for both substrates and particular ubiquitin chain types, and this specificity is not restricted to a particular DUB family [10].

In general, DUBs catalyze a proteolytic reaction between a Lys ε-amino group and a carboxy group corresponding to the C-terminal of ubiquitin in a single-step chain removal through ubiquitinated target sequences in substrates. These DUBs can both remove ubiquitin completely from substrates or leave them monoubiquitinated, in which most promiscuous DUBs remove ubiquitin completely, while linkage-specific DUBs might leave them monoubiquitinated. Once a substrate is monoubiquitinated, it can be extended again, including different types of ubiquitin chains; therefore, DUBs can also promote ubiquitin chain editing [10] (Fig. 5).

**Proteasome**

The proteasome is the major ATP-dependent protease in eukaryotic cells being the most downstream element of the UPS, responsible for the degradation of polyubiquitinated proteins. It plays a central role in many biological processes, such as cell cycle progression, signal transduction, and protein quality control. This 2.5 MDa protease is constituted by at least 32 different subunits that form a 20S proteolytic core (PC) and one or two 19S regulatory particles (RPs) that serve as a proteasome activator with a molecular mass of approximately 700 kDa (called PA700) (Fig. 6). The 19S RP binds to one or both ends of the latent 20S proteasome to form an enzymatically active proteasome. The proteasome works via a multistep mechanism where substrate recognition, deubiquitination, unfolding, and translocation occur into 19S RP, while peptide bond cleavage occurs in PC [11].

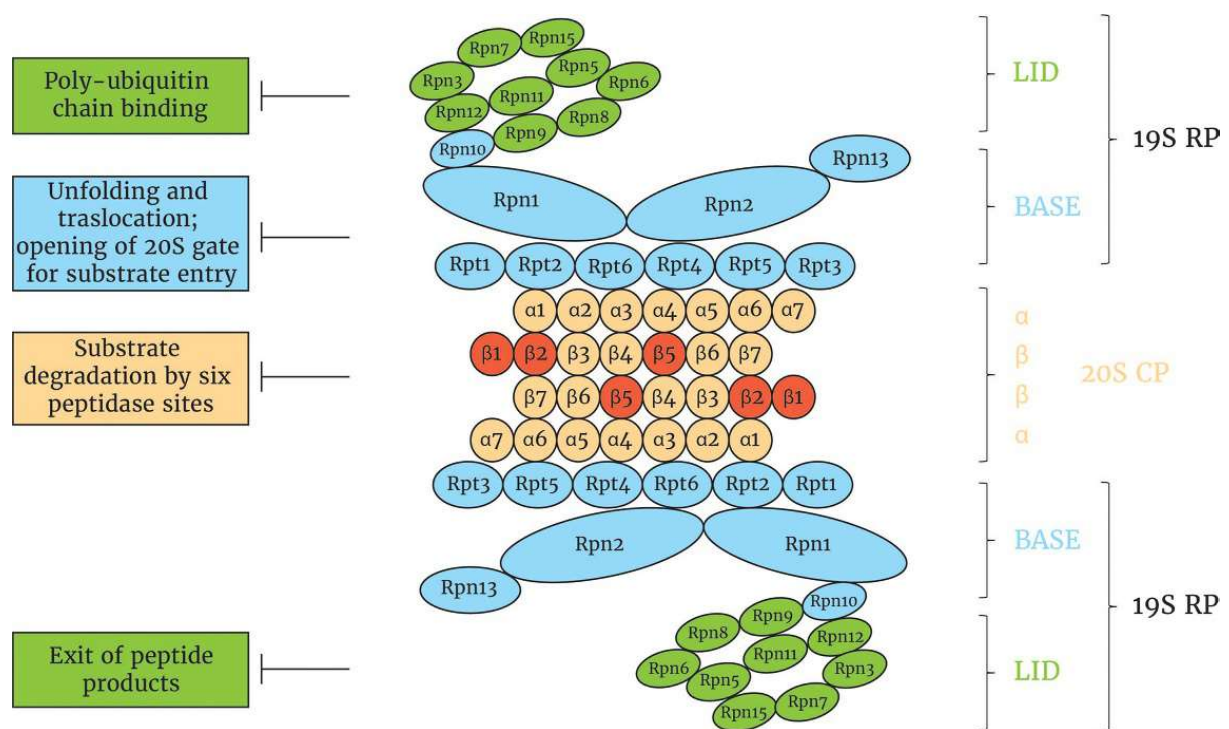


**Fig. 5**

Central roles of DUBs. Ubiquitin is transcribed and translated as a linear fusion protein consisting of multiple copies of ubiquitin and DUBs digest them in free ubiquitin. DUBs remove a nondegradative ubiquitin signal from the substrates regulating its function, and also it is responsible for removing the substrate ubiquitin degradative signal, which releases ubiquitin, recycling it to be used into the cells. Also, DUBs can promote ubiquitin chain edition exchanging types of ubiquitin linkage from substrate. Targeted protein can be rescued from degradation by DUBs by removing or changing its ubiquitin signal.



In Fig. 6, we can observe that the RP 19S particle consists of 20 subunits in mammals that are subdivided into the lid (Rpn 1–13, Rpn15) and base, which is composed of six ATPases subunits from the AAA + family (Rpt1–6). Polyubiquitinated proteins are recognized by Rpn10 and Rpn13 subunits and Rad23, Dsk2, and Ddi1 through their Ub-like (UBL) domains and Ub-associated (UBA) domains, respectively. The ubiquitin chains of polyubiquitinated substrates are first removed by the Rpn11 and unfolded by the hexameric ring (Rpt1–6) and subsequently translocated to the inner of CP 20S complex, which is composed by 28 subunits arranged in four hetero-heptameric rings ( $\alpha$ 1–7;  $\beta$ 1–7;  $\beta$ 1–7;  $\alpha$ 1–7) that are highly conserved in eukaryotes [11]. The two  $\alpha$  rings complexes form a narrow channel that only allow the traffic of denatured proteins through it. The two inner  $\beta$  rings are the catalytic chamber of 20S CP, which contains three enzymatically active sites by  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 5 classified in caspase-like, trypsin-like, and chymotrypsin-like, respectively. The final products of proteasome digestion are a heterogeneous mixture of peptides that in some cases can be biologically active and functional molecules (Fig. 6).



**Fig. 6**

Structure and function of 26S proteasome subunits. 19S regulatory particles (RP) act as a proteasome activator and are subdivided into the lid (Rpn 3, 5–9, 11, 12, and 15); base, which is composed of Rpn 1, 2, 10, and 13; and six ATPase subunits (Rpt1–6). The 20S proteolytic core (PC) is constituted by 28 subunits arranged into four hetero-heptameric rings ( $\alpha$ 1–7;  $\beta$ 1–7;  $\beta$ 1–7;  $\alpha$ 1–7). 20S CP contains three enzymatically active sites by  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 5 classified into caspase-like, trypsin-like, and chymotrypsin-like, respectively (highlighted in red (dark gray in the print version)). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



## Cell signaling regulation by ubiquitination

Ubiquitin is a key regulator in different cell signaling pathways such as mitophagy, NF- $\kappa$ B and interferon signaling pathway, cell cycle, and DNA repair. In this section, we will discuss the role of ubiquitination in each of these processes (Fig. 7).

### NF- $\kappa$ B signaling pathway

The NF- $\kappa$ B protein family was discovered as transcription factors that bind to an enhancer of kappa light genes in B cells—therefore, the name  $\kappa$ B, which is the name of the DNA region they bind. This family comprises five members, responsible for the expression of a series of genes related to immunity response, acting on cell survival and immunity. All of the five (p50, p52, p65/RelA, c-Rel, and RelB) possess a Rel homology domain (RHD), which enables the formation of heterodimers—the functional structure of NF- $\kappa$ B proteins. The RHD is also important in controlling the activity of these transcription factors, since NF- $\kappa$ B inhibitors (I $\kappa$ Bs) also bind to this region when the signaling pathway is inactive, preventing dimerization and nuclear translocation from cytoplasm [12, 13].

Ubiquitin stands out as one of the main regulators of NF- $\kappa$ B signaling pathway being responsible for its activation or inhibition. When the canonical pathway is stimulated via tumor necrosis factor (TNF), interleukins (ILs), or pathogens products such as

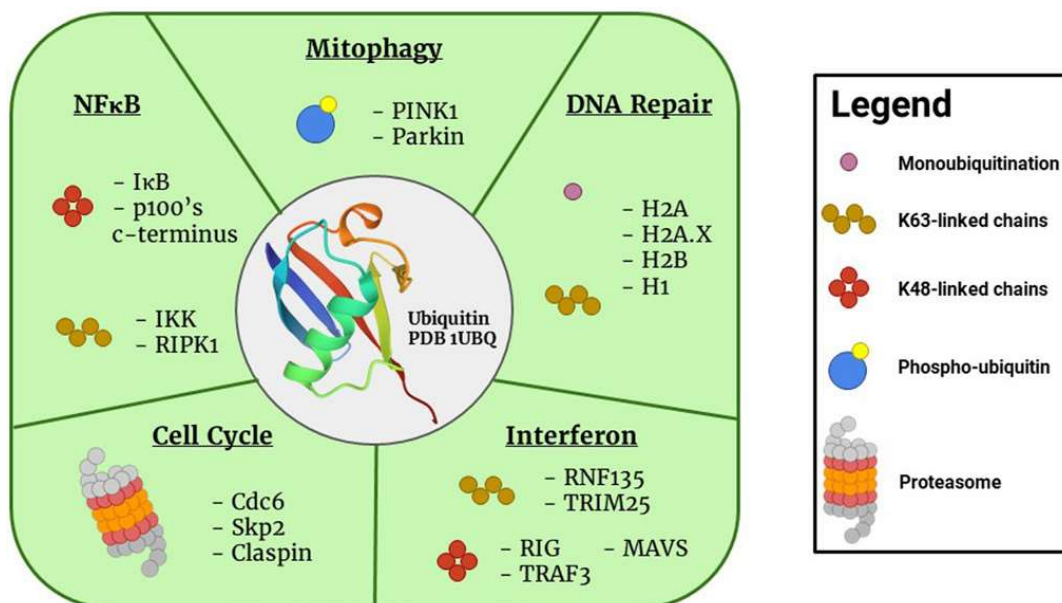


Fig. 7

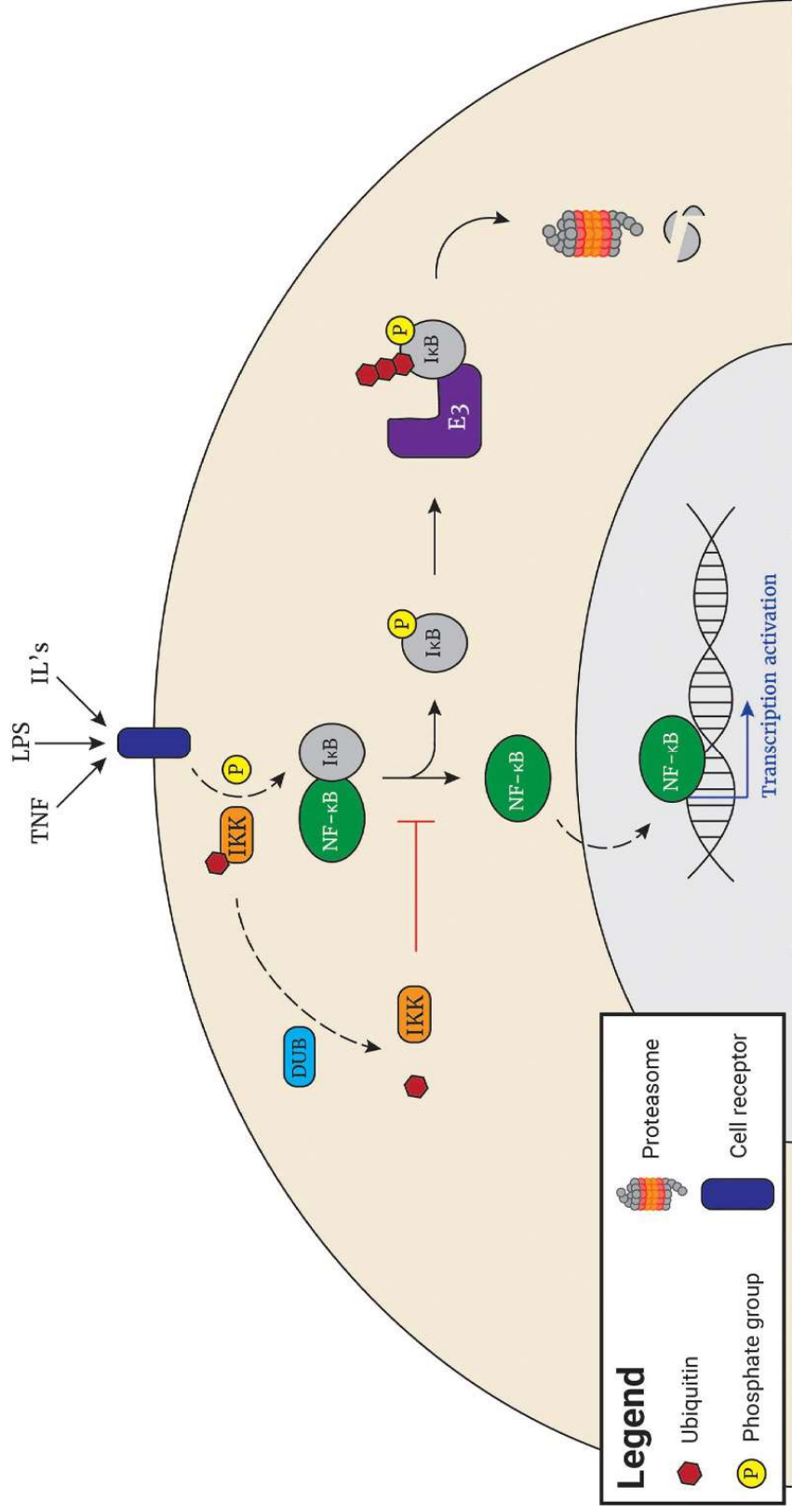
Cellular processes regulated by ubiquitination. Examples of targets in each process are indicated with the ubiquitin types conjugated by the E3 ubiquitin ligases.

lipopolysaccharide (LPS), the signal transduction leads to phosphorylation of I $\kappa$ Bs by the I $\kappa$ B kinase complex (IKK). The phosphorylated inhibitors are recognized and ubiquitinated by the E3 ligase SCF( $\beta$ -TRCP)—also known as SCF(Fbxw1)—which are then destined to by the proteasome (Fig. 8). Activation of the noncanonical pathway also relies on the ubiquitination of own NF- $\kappa$ B proteins. p100, for example, requires a proteasomal treatment that only degrades its C-terminus region, which acts as an intramolecular inhibitor—it is similar to I $\kappa$ Bs; once this region is removed by the 26S proteasome, the p52 protein is active [12].

Ubiquitination is central in the control of canonical and noncanonical pathways, as several components of these pathways suffer modifications through ubiquitin. The IKK, for example, is only fully active when polyubiquitinated by K63—and this process is mediated by the E2 complex Ubc13/Uev1A and the TRAF6 protein, which contains a RING domain in its N-terminus region that is able to facilitate the formation of those chains on IKK. Activation of the pathway through IL-1 $\beta$  (consequently through IL-1 receptor, IL-1R) is completely ablated when the wild-type ubiquitin pool is replaced by a K63R-mutated ubiquitin within the cell; more than that, the K63 ubiquitin chains were first discovered as an activator of the NF- $\kappa$ B pathway [12, 14].

The activation of the pathway can also be reached through a very particular mechanism of ubiquitination that, so far, has only been described to be performed by one E3 ligase: linear ubiquitin chains, catalyzed by linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). Differently from the ubiquitin chains formed by the addition of a ubiquitin onto another ubiquitin's lysine, isopeptide bonds of linear chains occur with the methionine 1 residue of ubiquitin. LUBAC is recruited after IL-1R or tumor necrosis factor receptor (TNFR) activation, and depending on the type of receptor stimulated, different response will occur. Activation of TNFR leads to recruitment and K63 polyubiquitination of RIPK1, which is the signal for LUBAC; in turn, LUBAC produces linear chains on RIPK1 and attracts NEMO, the regulatory subunit of the IKK complex, which is also a target for LUBAC's linear chains, responsible for activating IKK and causing a later degradation of I $\kappa$ Bs by proteasome recognition of K48 chains added by SCF( $\beta$ -TRCP). On the contrary, if the cascade starts via IL-1R, LUBAC will recognize ubiquitinated IRAK1, which was previously recruited by already modified Myd88 and IRAK4. In this situation, LUBAC is not only able to produce linear chains but also extends already existing K63 chains, forming hybrid chains. The simultaneous presence of TAB1-TAB2/3-TAK1 in this context completes the requirements for the activation of IKK complex, which ultimately will cause the expression of the genes controlled by this pathway [12, 15].

Deubiquitinating enzymes (DUBs) also play a major role in modulating NF- $\kappa$ B pathway activation avoiding a constant stimulation of NF- $\kappa$ B controlled genes, which could lead to chronic inflammation. Among them, A20 is one of the most important, as it is specific for K63 chains on RIPK1 and NEMO, attenuating inflammatory response. Interestingly, A20



**Fig. 8**

General signal transduction cascade of NF-κB signaling pathway. After the activation of a cell receptor (by TNF, LPS, or ILs), IKK—which is active only after nondegrading ubiquitination—phosphorylates IκB, releasing NF-κB transcription factor from inhibition. While IκB is recognized by an E3 ligase, ubiquitinated, and degraded by the proteasome, the transcription factor is able to migrate to the nucleus and activate the expression of controlled genes.

has also an E3 ubiquitin ligase activity introducing K48 ubiquitin chains on those proteins, leading to their degradation and counteracting NF- $\kappa$ B activation. The absence of A20 causes a prolonged stimulation of NF- $\kappa$ B signaling through prolonged phosphorylation of IKK and increased degradation of I $\kappa$ Bs. Other DUBs are also essential for NF- $\kappa$ B control, as, for example, OTULIN, which is able to directly counteract LUBAC action, hydrolyzing linear ubiquitin chains and diminishing pathway activation [12, 14, 15].

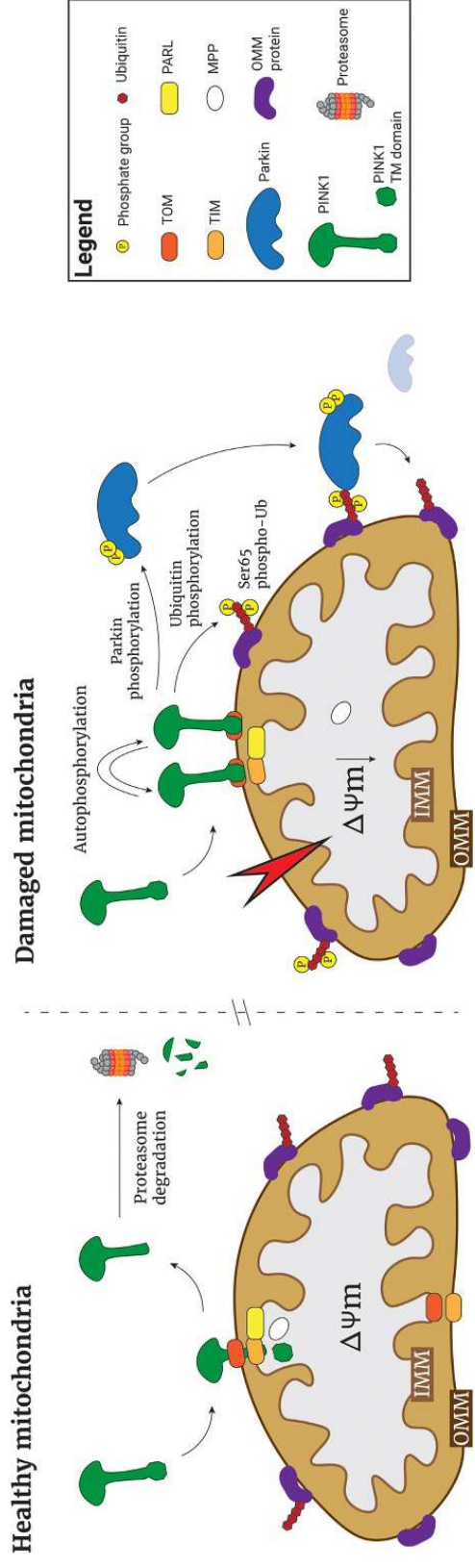
### **Mitophagy**

Mitochondria are highly dynamic and multifunctional organelles that participate in a broad array of functions within eukaryotic cells. Besides generate the bulk of ATP in most cell types through oxidative phosphorylation, mitochondria also metabolize and synthesize complex macromolecules as lipids, amino acids, and nucleotides; regulate calcium homeostasis and cellular redox balance; control apoptosis; and play a key role in the innate response to viral infections, helping to induce antiviral and anti-inflammatory pathways [16]. Mitochondria are particularly susceptible organelles because their role in energy production exposes them to damage due to high levels of reactive oxygen species (ROS), a product of energy generation that can cause mutations in mitochondrial DNA (mtDNA). For this reason, mitochondria have multiple systems of quality control to ensure the maintenance of a healthy and functional mitochondrial network to meet the demands of the cell [17].

Mitochondria experiencing global/widespread damage undergo a selective form of autophagy, called mitophagy [18]. This process requires the ubiquitination of damaged mitochondria, which is mediated in large part by the E3 ubiquitin ligase Parkin. Most prominent of the genes involved in mitochondrial maintenance is *PINK1* that encodes the neuroprotective protein PTEN-induced serine/threonine kinase 1 (PINK1) and *PRKN* that encodes the E3 ubiquitin ligase Parkin. Mutations in *PRKN* and *PINK1* genes are linked to autosomal recessive early-onset Parkinson's disease [18, 19].

PINK1 is a mitochondrial-targeted protein that contains an N-terminal mitochondrial targeting sequence (MTS) and a transmembrane domain (TM). In healthy mitochondria, PINK1 is constitutively imported via translocase of the outer membrane (TOM) and translocase of the inner membrane (TIM) to the inner membrane (IMM). Translocation of the MTS through the TIM complex is energetically driven by the electrical membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) across the IMM. PINK1 reaches the matrix, where it is sequentially cleaved by two proteases, mitochondrial processing peptidase (MPP) and presenilin-associated rhomboid-like (PARL). The truncated protein produced is retro translocated to the cytosol, where it is degraded via proteasomal pathway (Fig. 9, left panel). Under physiological conditions, PINK1 levels are quite low because it is rapidly degraded [18, 19].

Loss of mitochondrial membrane potential by damages inhibits PINK1 import through the TIM complex and its proteolytic cleavage inside the matrix, leading to insertion of its



**Fig. 9**

(Left panel) In healthy mitochondria, PINK1 is constitutively imported into mitochondria, processed, and degraded by the proteasome. (Right panel) Upon mitochondrial stress or damage, PINK1 import to IMM is compromised and it is stabilized on the OMM, where it phosphorylates both Parkin and ubiquitin from OMM proteins. Parkin has a high affinity for phosphoUb and translocates to the mitochondrial surface, where ubiquitinates more OMM proteins. The newly incorporated ubiquitin is still phosphorylated by PINK1, which recruits more Parkin from the cytosol to the damaged mitochondria, in a positive feedback loop.



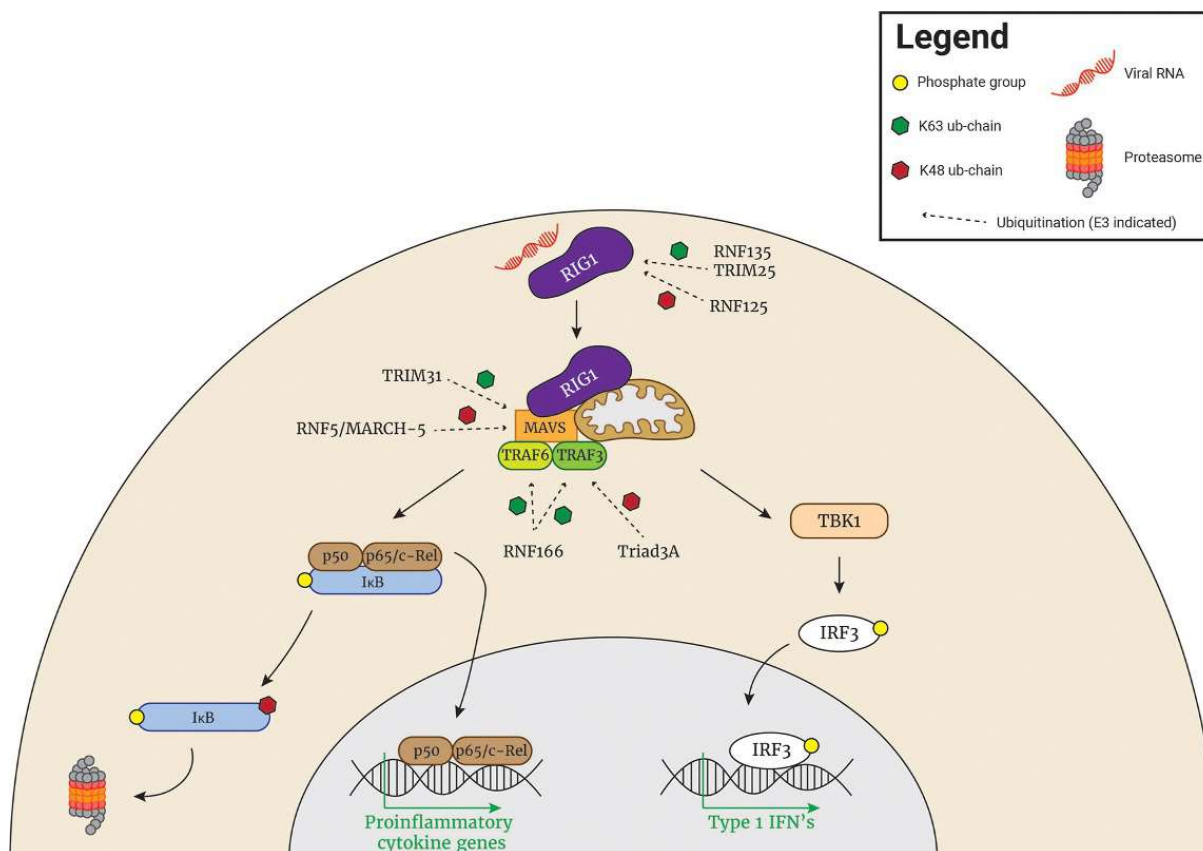
transmembrane domain (TM) into the outer mitochondrial membrane (OMM). At the OMM, PINK1 phosphorylates both Parkin and ubiquitin from OMM proteins at Ser65, producing the Ser65-phosphoUb. The E3 ubiquitin ligase Parkin has a high affinity for phosphorylated ubiquitin and it is translocated from the cytosol to the surface of damaged mitochondria under the increase of phosphoUb concentration (Fig. 9, right panel). The identification of phosphorylated ubiquitin has triggered enormous excitement and research into this and other chemical modifications functionally important of ubiquitin [18, 19].

Structural and biochemical studies revealed that the E3 Parkin is autoinhibited in several ways, but mainly due to the self-inhibition of its N-terminal Ubl domain that blocks the E2 binding site [20, 21]. A current model for PINK1-mediated activation of Parkin suggests that PINK1 phosphorylates ubiquitin attached to OMM proteins and the autoinhibited cytosolic Parkin is recruited by nanomolar affinity to sites of PINK1 activity. The Ser65-phosphoUb acts as an allosteric regulator, leading to significant conformational changes at Parkin that release the Ubl domain from the Parkin core, unblocking the E2 binding site, but also enable PINK1 to phosphorylate the Ubl domain. Parkin phosphorylation stabilizes it in its active form. Active Parkin ubiquitinates OMM proteins, and the newly incorporated ubiquitin is still phosphorylated by PINK1, which recruits more Parkin from the cytosol to the damaged mitochondria, in a positive feedback loop. Mitophagy receptors NDP52 and OPTN bind to ubiquitinated mitochondrial proteins and recruit the autophagy machinery to mitochondria. The phagophore engulfs mitochondria and fuses with the lysosome to degrade and recycle its contents [18–21].

### ***Interferon***

One of the main mechanisms of innate immunity against viruses is the induction of type I Interferon (IFNs) by infected cells. These are parts of a large family of cytokines, which are named this way for their ability to interfere in the viral infection, whose main function is to inhibit pathogen's replication [22]. When pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) are recognized by pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs), RIG-1-like receptors (RLRs), and cytosolic DNA receptors, several signaling pathways are activated stimulating the transcription of IFN gene through activation of the transcription factor (IRF) 3. Through ubiquitination, RING E3s are responsible for accurately regulating this process to amplify or decrease antiviral response [23, 24].

Viral nucleic acids are the most potent stimuli for inducing the synthesis of IFNs. RLRs, such as RIG-1 and MDA5, which contain caspase activation and recruitment domain (CARD), detect viral double-stranded RNA in the cytosol by RNA helicase domains and are associated with mitochondrial antiviral-signaling (MAVS) proteins and TRAF proteins, for activation of the TANK-binding kinase 1 (TBK1) that promotes phosphorylation and activation of IRF3, leading to the induction of interferon type I [25–28] (Fig. 10).



**Fig. 10**

Regulation of RING E3 ligases in RLR signaling. RIG-1 recognizes viral RNA, and it is K63-linked polyubiquitinated by RNF135 and TRIM25 inducing its interaction with MAVS adaptor protein. This recruits TRAF3 and TRAF6, being TRAF6 responsible for recruiting NEMO and, consequently, TBK1, which will activate IRF3. TRIM31 acts as a positive regulator of the pathway by promoting the aggregation of MAVS, while RNF166 by performing TRAF3 and TRAF6 ubiquitination. On the contrary, RNF125, RNF5/MARCH-5, and Triad3A are negative regulators by inducing RIG, MAVS, and TRAF3, respectively, to proteasome degradation.

However, for the interaction between RLRs and MAVS, it is necessary to its ubiquitination by TRIM25 and RNF135, both RING E3s. RNF135 transfers K63-linked polyubiquitin chains to the C-terminal domain of RIG-1, leading to the exposure of the CARD's domains, which will later be ubiquitinated by TRIM25, also via K63-linked polyubiquitin, thereby enabling CARD-CARD interactions between RIG-1 and MAVS [25, 29]. This activation induces the prion-like polymerization of MAVS, recruiting and activating TRAF3 and TRAF6. TRAF6, in turn, synthesizes polyubiquitin chains that will be recognized by NEMO, activating NF- $\kappa$ B, and the expression of proinflammatory cytokines. Moreover, NEMO is responsible for recruiting TBK1, inducing the expression of interferon type I, by activating the IRF3 [26, 29].

In addition to the functions mentioned earlier, other RING E3s perform important functions in this signaling pathway in order to stimulate or inhibit the production of interferon. For example, TRIM31 acts as a positive regulator of the antiviral response, by promoting the K63-linked ubiquitination of MAVS, generating greater aggregation of these adaptor proteins and, consequently stimulating the production of IFN [30]. For the same purpose, RNF166 increases the ubiquitination of TRAF3 and TRAF6 [31]. On the contrary, some RING E3s such as RNF125, RNF5/MARCH-5, and Triad3A act by negatively regulating this signaling pathway through the K48-linked ubiquitination of RIG, MAVS, and TRAF3, respectively, leading them to proteasomal degradation [32, 33].

### **Cell cycle**

The cell cycle consists of an extremely orchestrated sequence of events that control the cellular life progression in a timely-ordered manner. The main effectors of these events are cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs), which are counteracted by the CDK inhibitors (CKIs). The combined activity of those different effectors modulates transition between different cellular phases, from G1 to S or from G2 to mitosis, for example. However, cyclins, CDKs, and CKIs are also targets of several controlling mechanisms, in which ubiquitination is highlighted with an essential role in the development of the cell cycle [34, 35].

Among more than 600 different E3 ligases expressed in humans, the RING family stands out in the context of cell cycle control, drawing attention to two classes of CRLs (Cullin RING ligases): SCFs and APC/Cs (anaphase-promoting complex/cyclosome) ligases. Both are multiprotein complexes where SCF contains an F-box protein as a substrate-interacting protein, while APC/Cs bind the substrate via one of two subunits in somatic cells, Cdc20 or Cdh1 (Fig. 11). However, a remarking difference between these two classes of CRLs is the cell phase that they are active: SCFs act throughout the entire cycle, while APC/Cs are mainly active between mitosis and the next G1 [34, 35] (Fig. 12).

During the end of a mitotic process, the APC/C(Cdh1) is the main E3 ligase establishing a new G1-phase, being responsible for ubiquitination and proteasomal degradation of important factors for replication and mitosis, such as Cdc6, SKP2, Cdc25A, and cyclins A and B. Cdc6 is a protein that mediates the formation of prereplication complexes (pre-RCs), binding to the origin recognition complex (ORC); Skp2, or Fbx11, is kept at low levels in order to prevent the formation of SCF(Skp2), which targets CKIs and causes the cell cycle progression; Cdc25A removes phosphate groups attached to Cdk1/2, consequently activating them and the cell cycle; cyclins A and B are extremely important in the mitotic entry, the reason why they are targeted by APC/C(Cdh1). When the cycle progresses and G1-phase ends, the S-phase can start, APC/C(Cdh1) promotes ubiquitination of a specific APC/C E2, UbcH10, and autoubiquitination, decreasing its activity. In parallel, CDKs phosphorylate Cdh1, disrupting



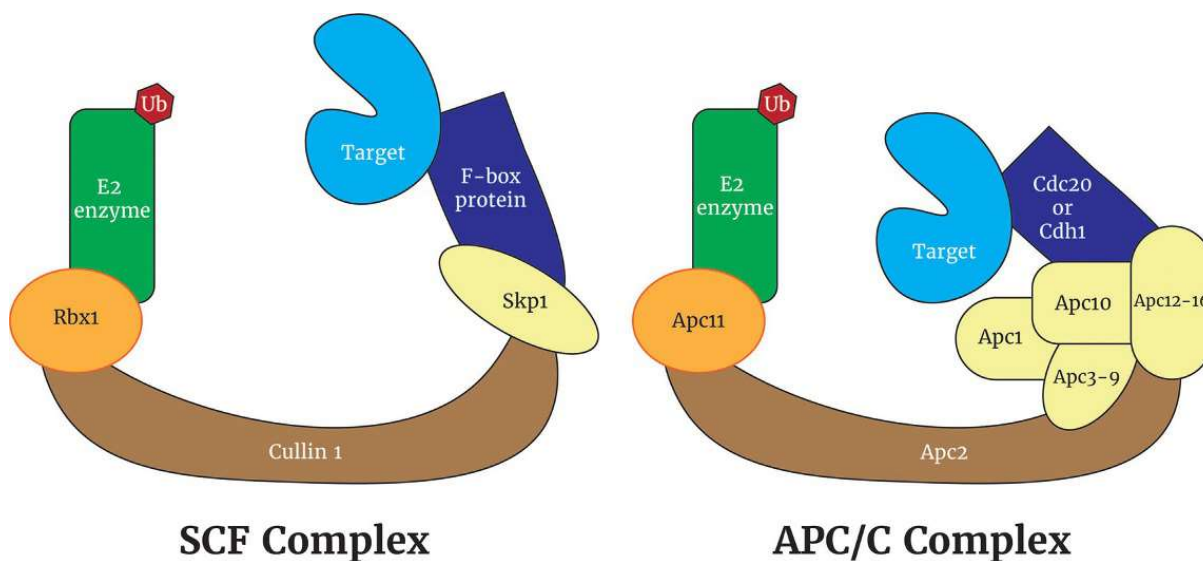


Fig. 11

Structure comparison of two classes of RING E3 ligases, SCF and APC/C. Scaffold proteins are indicated in *brown* (dark gray in the print version) (Cullin 1 and Apc2), RING-containing proteins in *orange* (gray in the print version) (Rbx1 and Apc11), adaptors in *light yellow* (light gray in the print version) (SKP1 and Apc1/3/9/10/12/16), and substrate-interacting proteins in *dark blue* (dark gray in the print version) (F-box and Cdc20/Cdh1). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

its interaction with the APC/C complex—an interaction that will only be restored at the end of the next mitosis [35, 36]. APC/C(Cdh1) is also responsible for attaching unusual ubiquitin linkage chains to its targets, more specifically K11 chains—which also cause targets to be degraded via proteasome. Synthesis of K11 chains by APC/C(Cdh1) is done with the assistance of two dedicated E2s, UBE2C and UBE2S, the first responsible for working on chain initiation and the latter for chain elongation [37] (Fig. 12).

The SCF(SK2) acts in early interphase, being activated in late G1—after a decrease in Cdh1 activity—and targeting cell cycle inhibitors promoting cell cycle progression [34, 35]. One of its targets is p27, an inhibitor of cyclin E-Cdk2 complex. SCF(SK2) also targets other CKIs, causing a strengthening in cyclin-CDKs activity and stimulating cycle progression [36]. Thus, SK2 is seen as an oncogenic protein and APC/C(Cdh1) a tumor suppressor by promoting SK2 degradation [35]. After the entry and progression of S-phase, cyclins D1 and E are ubiquitinated by two SCF complexes, SCF(Fbxo4)- $\alpha$ /B-crystalline and SCF(Fbxw7), respectively. During this phase and later G2, the activity of SCFs is essential in DNA damage checkpoints: when such an event occurs, Cdc25A is phosphorylated and later ubiquitinated by SCF( $\beta$ -TRCP/Fbxw1), arresting cell cycle progression to allow the DNA repair. After checkpoint recovery, Claspin—a protein that promotes Cdc25A phosphorylation—is phosphorylated and this modification recruits it to interact with SCF( $\beta$ -TRCP), which is

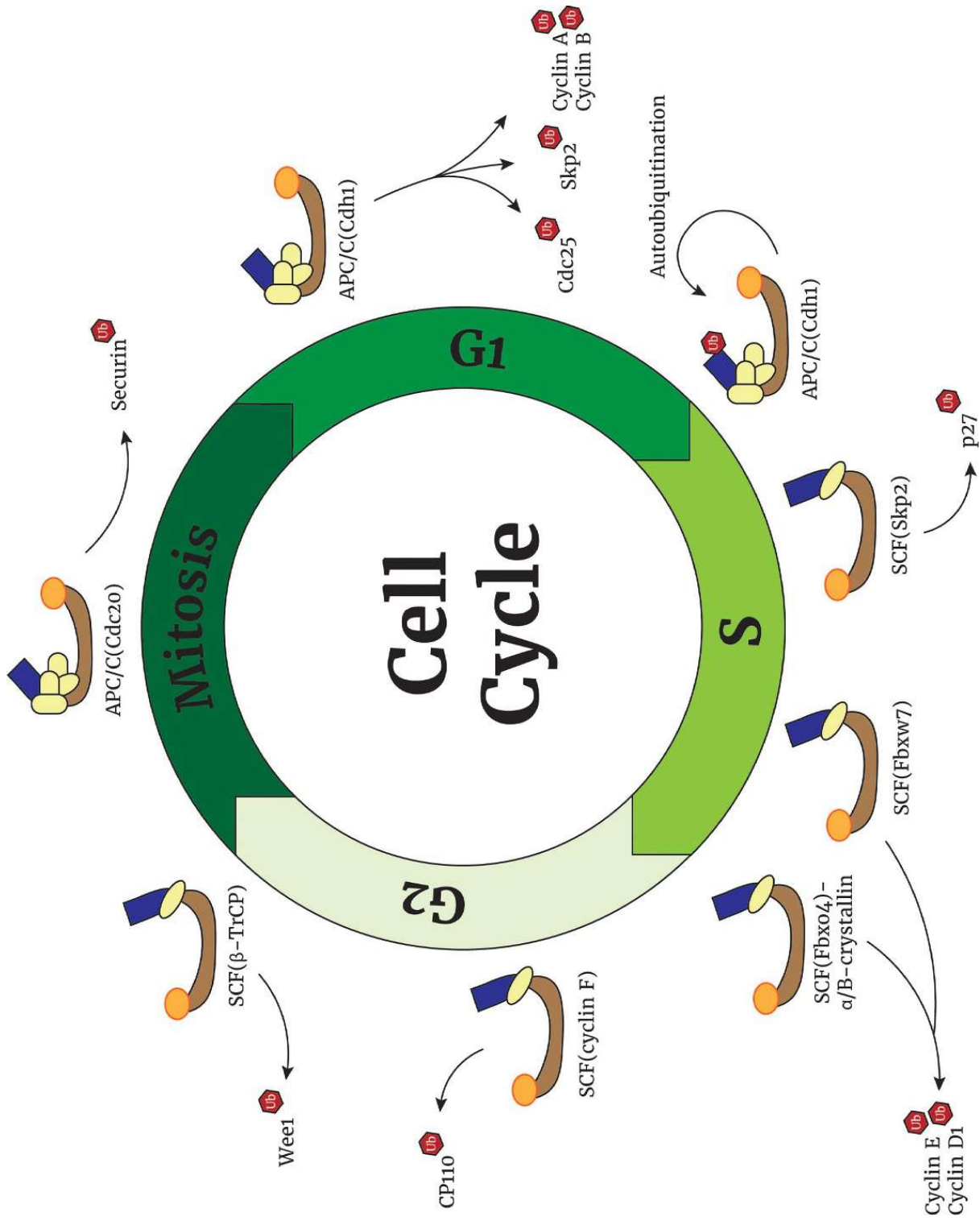


Fig. 12

Examples of SCF and APC/C complexes active throughout the cell cycle. Position of each E3 relates to the stage, in which they are most active during the cycle. Arrows indicate some of their targets.

polyubiquitinated and degraded by proteasome. eEF2K, an inhibitor of translation factor eEF2, is also targeted by this SCF, resuming protein synthesis and cycle progression [35] (Fig. 12).

After DNA replication, secure transitions to G<sub>2</sub>- and later to M-phases require the activity of different SCF complexes. SCF(cyclin-F) is active after DNA is duplicated, ubiquitinating RRM2, a critical enzyme in deoxyribonucleotide synthesis. In addition, SCF(cyclin-F) also targets CP110 for degradation, a protein responsible for centrosome replication, avoiding overduplication of this chromosome region [35, 37]. In late G<sub>2</sub>, SCF( $\beta$ -TRCP) promotes cycle progression and mitotic entry as it targets for the degradation of a Cdk1 inhibitor, Wee1. This activity is balanced by SCF(NIPA) during S and G<sub>2</sub>, which ubiquitinates nuclear cyclin B and prevents the formation of cyclin B-Cdk1 complex, avoiding an early entry in mitosis. However, during late G<sub>2</sub>, NIPA is phosphorylated and the SCF is disrupted, releasing cyclin B from degradation signal and subsequently accumulating it—promoting its interaction with Cdk1 and entry in mitosis [35] (Fig. 12).

During mitosis, one of the most critical steps is chromatid separation, in order to guarantee each daughter cell will receive the same DNA content. One of the mechanisms used to control correct separation is known as spindle assembly checkpoint (SAC), a protein set that delay mitotic progression until all chromosomes are properly attached to spindle fibers. MAD2 and BubR1, SAC components, bind to Cdc20 and inhibit APC/C action; once all duplicated chromosomes are ready to segregate—and the inhibitor Emi1 is degraded because of SCF( $\beta$ -TRCP) ubiquitination—inhibitory proteins dissociate from Cdc20 and the APC/C complex is released from inhibition, ubiquitinating checkpoint targets to ensure mitotic progression and exit [35–37]. In parallel, during transition from metaphase to anaphase, SCF( $\beta$ -TRCP) is also responsible for controlling cycle progression. It targets Bora for degradation, a protein that regulates spindle stability when in contact with kinetochores. Degradation of Bora leads the cell to progress into anaphase and then finishing the division, so the daughter cells can restart the cycle and SCFs as well as APC/Cs can again orchestrate the process [35].

### ***DNA repair***

The DNA contains all the necessary information for a functional cell; thus, the cell employs several mechanisms to protect its DNA and also to repair it under any damage. In eukaryotes, DNA is structured in association with many proteins that among several functions, compact it into the cell nucleus. However, when DNA is damaged, those same proteins are targeted for posttranslational modifications that help to indicate there is a need to activate mechanisms of DNA damage repair (DDR) in a certain region of the genome [38]. One of the most destructive types of DNA damage is a double-strand break (DSB), which causes break in both DNA strands. In order to repair DSBs, the main strategies used by the cells are homologous recombination (HR) and nonhomologous end joining (NHEJ). Both mechanisms, even though different, rely on ubiquitin and ubiquitination to function properly and to repair the DNA [39, 40].

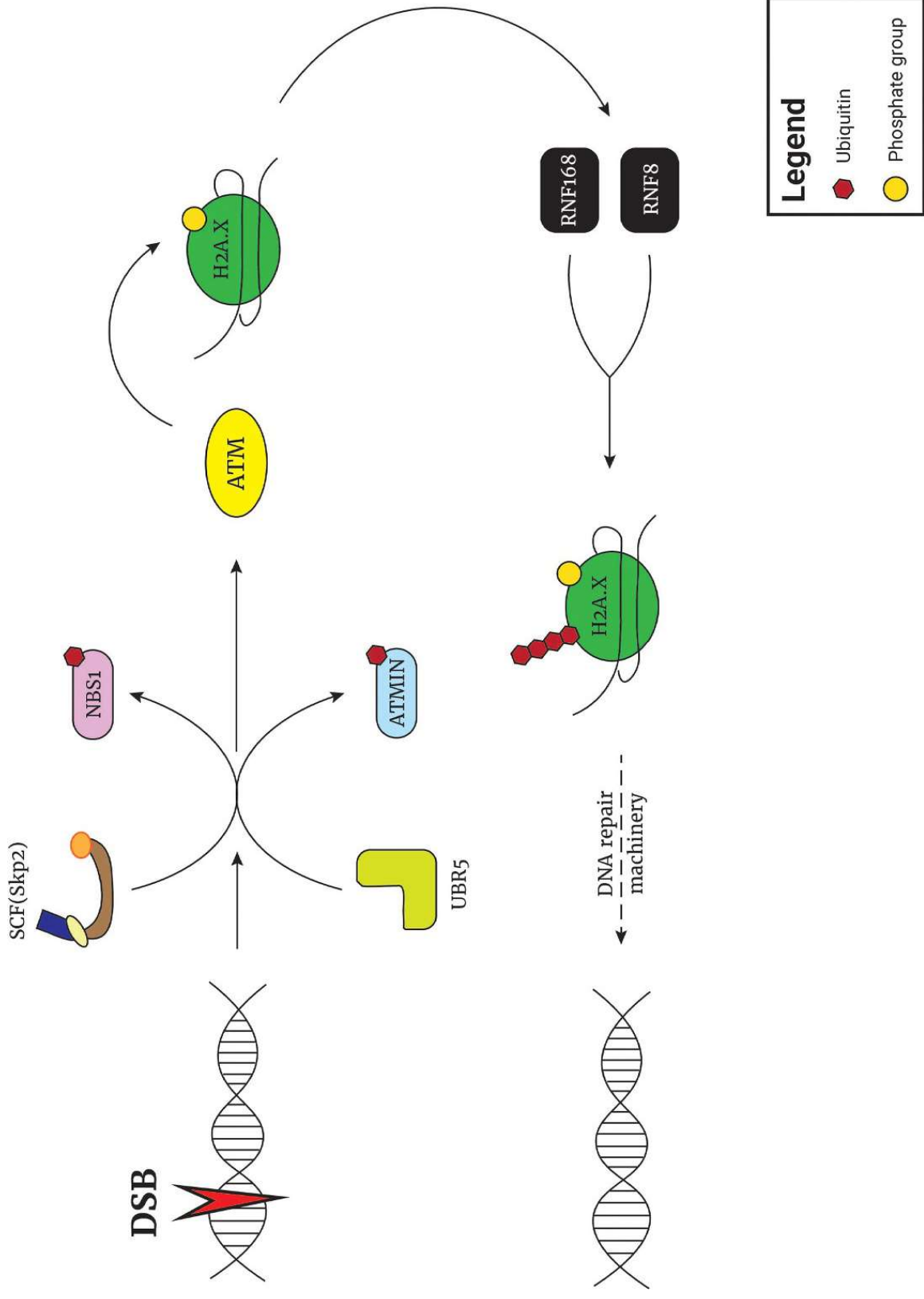
When facing a DSB, the cell activates the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinase, which is dependent on the action of two E3 ligases: SCF(SKP2) that adds K63-linked ubiquitin chains onto NBS1—responsible for later activating ATM; and UBR5, capable of modifying ATMIN, an interactor of ATM and competitor for NBS1 interaction (Fig. 13). ATM then is able to phosphorylate histone H2A.X generating the  $\gamma$ -H2A.X, which is able to recruit MDC1, a mediator that, after phosphorylated, brings to the region close to the DSB site the UBC13 complex, which contains an E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) and the E3 ligase RNF8. This E3 then modifies histone H1, generating a signal for another ligase, RNF168, to be recruited to the damage site, ubiquitinating the histones H2A and  $\gamma$ -H2A.X. RNF168 modification occurs through monoubiquitination, either on lysine 13 or on lysine 15—followed by the action of RNF8, which extends these modifications to K63-linked chains and accumulate RNF168 near to the break site, as both ubiquitin chain and monoubiquitination are able to amplify the signal [39–41].

Ubiquitinated histones are able to recruit factors in the context of DDR, among them BRCA1 e 53BP1, proteins that antagonize each other during the repair process. K63-linked ubiquitin chains recruit BRCA1-A, a multiprotein complex that includes the dimer BRCA1/BARD1—that possess E3 ligase activity—and RAP80, a protein that helps to decide the type of repair will be utilized. BRCA1/BARD1 is able to ubiquitinate H2A at lysines 127/129, which leads to RAD51 attraction and DNA-end resection, a critical step for establishment of HR. The ubiquitination of lysines 127/129 displaces 53BP1 from DSB, which diminishes the NHEJ activity. On the contrary, ubiquitination of H2A/H2A.X at lysine 15 selectively causes the activation of 53BP1 recruiting it to NHEJ. The choice on which mechanism will be used to repair the DNA is also connected to the cell cycle phase active during the repair, as HR is only possible during S/G2, when the other DNA double strand is available to function as a template; in the meanwhile, NHEJ occurs through every phase except for mitosis [39–41].

Finally, deubiquitinating enzymes (DUBs) are also part of these well-orchestrated events, executing crucial actions on the control of DDR. USP7 and USP34 remove ubiquitin from RNF168, stabilizing it and allowing ubiquitination of H2A and H2A.X. Other DUBs, such as DUB3, BAP1, and USP3, act directly on histones, removing ubiquitin from H2A/H2A.X/H2B. They are also parts of BRCA1-A complex, as the BRCC36 DUB is able to regulate which DDR pathway the cell will follow, since its absence may favor the establishment of HR instead of NHEJ [39, 41].

## ***Diseases***

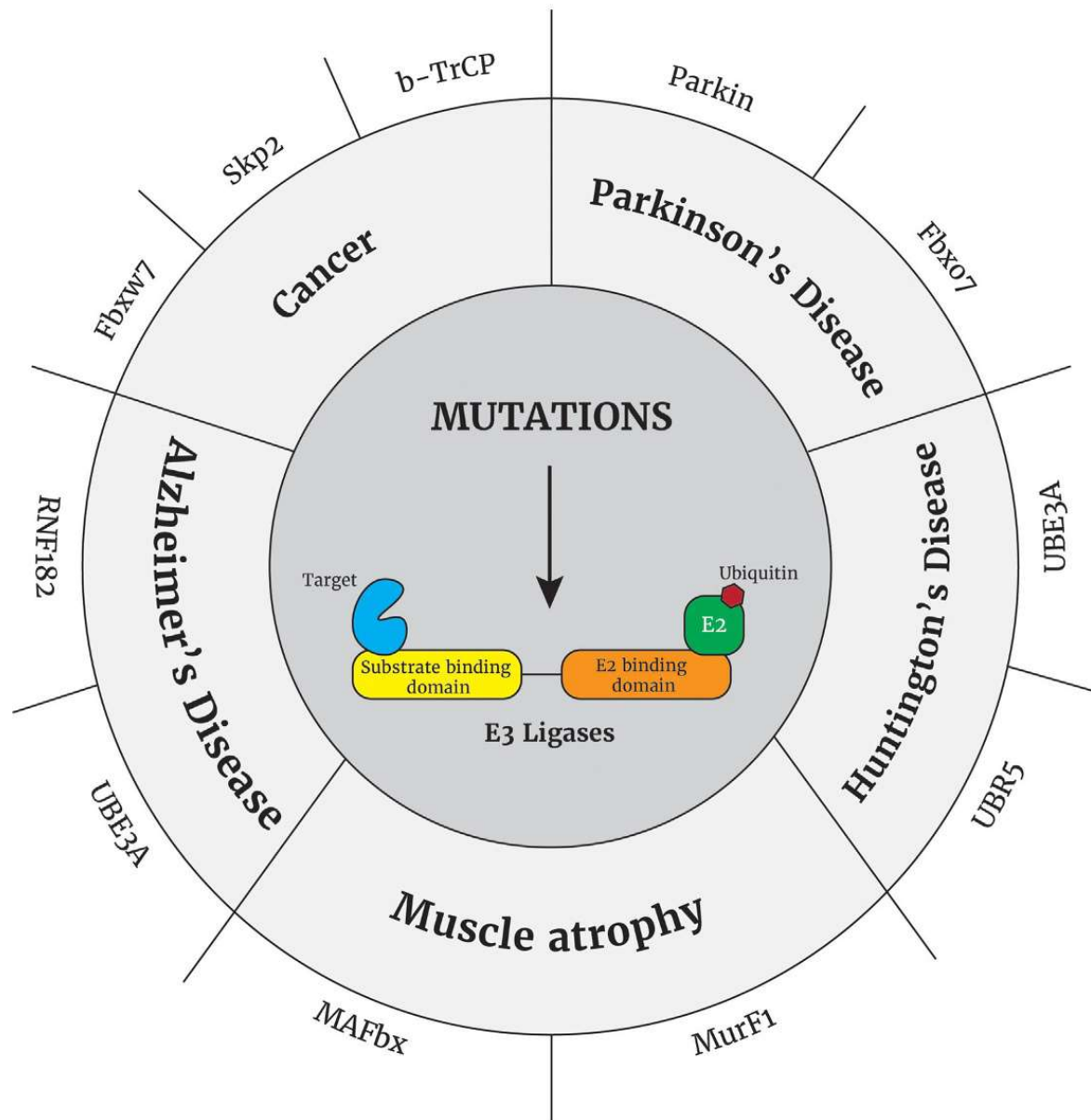
E3 ubiquitin ligases do not only confer specificity to the ubiquitin-proteasome system but also play an important role in mediating different cellular processes. Therefore, deregulation in this system underlies the etiology of several diseases (Fig. 14). Mutations in E3 ligase



**Fig. 13**

After facing a double-strand break (DSB), one of the mechanisms the cell employs is the activation of the ATM kinase, which depends on ubiquitination of NBS1 by SCF(SKP2) and ATMIN by UBR5. ATM is then able of phosphorylating H2A.X—which becomes phospho-H2A.X, or  $\gamma$ -H2A.X—resulting in recruitment and activation of RNF8 and RNF168 E3 ligases, which in turn ubiquitinate  $\gamma$ -H2A.X, leading to later recruitment of DNA repair machinery.





**Fig. 14**

Mutations found in E3 ubiquitin ligase leading to different types of diseases. The E3 ubiquitin ligase related to each kind of disease is found on the edge of the figure.

complex that do not interfere in vital pathways can generate various types of phenotypes. The pathological state caused by these mutations can be divided into two groups. The first one implicates in the stabilization of several proteins, which is caused by mutations resulting in either loss of function of E3 ligases or compromising its substrate recognition motif and the other group leads to a decrease in protein half-life due to E3 ligase gain of function promoting an acceleration of protein degradation rate [42].

### Muscular atrophy

The maintenance of muscle tissue underlies the balance between anabolic and catabolic processes. When protein degradation overcomes, its synthesis generates the loss of muscle mass. Muscular atrophy is a debilitating condition that impacts mobility, whole-body metabolism, disease resistance, and quality of life. There are three major protein degradation pathways present in eukaryotic cells: apoptosis, autophagy-lysosomes, and ubiquitin-proteasome system. Regarding muscular atrophy, it is known that the ubiquitin-proteasome system is crucial for protein degradation and two E3 ubiquitin ligases are essential in this process: muscle atrophy F-box (MAFbx)/atrogin-1 (Fbxo32) and the muscle ring-finger (MuRF-1/Trim63) [43]. These proteins are markers for skeletal muscle atrophy due to its high expression found in this tissue and in many atrophy-inducing conditions [44] (Fig. 15).

Atrogin-1 is an F-box protein found in cardiac and skeletal muscle and has its expression regulated by the family of transcription factors called forkhead, for example, FoxO. Loss of FoxO expression results in inhibition of Atrogin1 and MuRF1 expression. It was discovered that defects in atrogin-1 are also associated with susceptibility to dilated cardiomyopathy, which can result in heart failure and arrhythmia [45]. The other marker for muscle atrophy

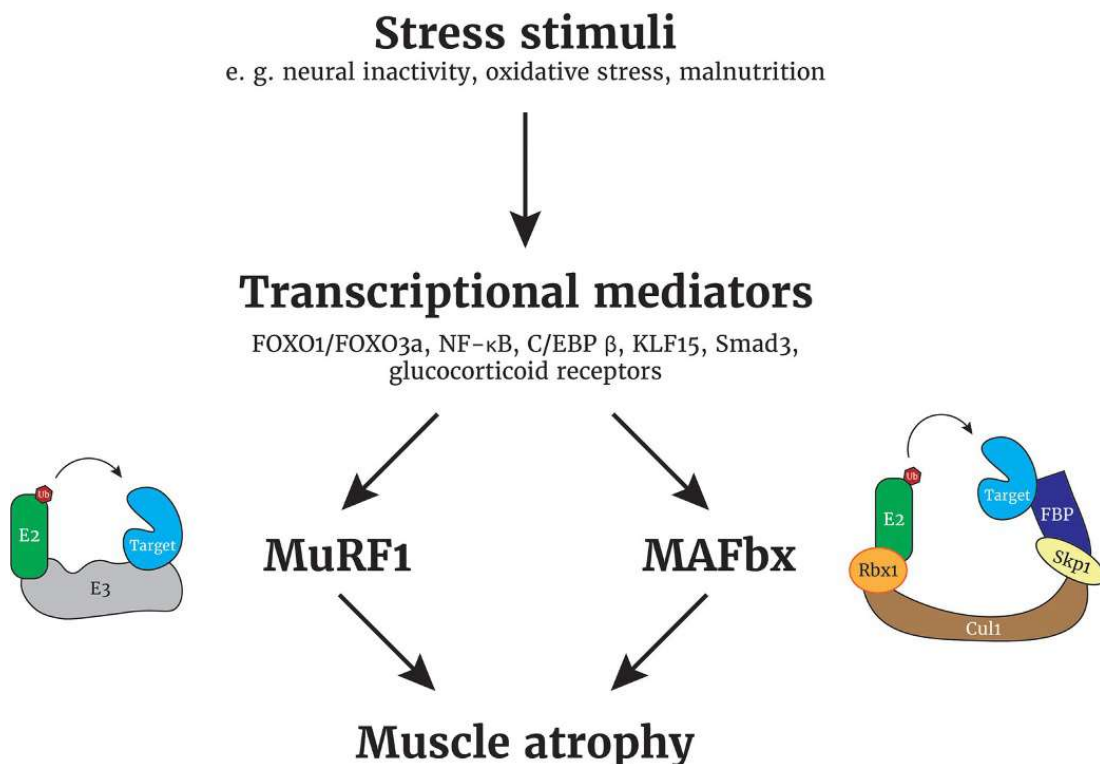


Fig. 15

Muscle RING finger 1 (MuRF1) and muscle atrophy F-box (MAFbx) expression in skeletal muscle under stress conditions regulating muscle atrophy.

MuRF1 localizes in the M-line and Z-disk in the sarcoma and is involved in the mechanical stress sensors via its interaction with titin [46]. Both proteins are induced in response to myostatin/TGF $\beta$  signaling [47].

### ***Neurodegenerative diseases***

The ubiquitin-proteasome system is important to maintain cell homeostasis; when this system fails, it contributes to generate the formation of protein aggregates, which is one of the most common hallmarks in neurodegenerative diseases. Dysfunction in ubiquitination pathway has been found in some neurodegenerative diseases that are responsible for causing a severe decline in cognitive ability capable of interfering with daily life and that include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease [48].

#### ***Huntington's disease***

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant progressive brain disorder, and the earliest neuropathologic modifications in HD patients are found in the striatum and in the cerebral cortex that frequently compromises the movement, cognitive, and psychiatric skills with a broad spectrum of signs and symptoms [49]. HD is caused by the expansion of CAG trinucleotide repeat in exon 1 of the huntingtin gene (*HTT*) coding for poly-glutamine (Poli-Q) in the N-terminus of the Huntington protein (HTT). Usually, in health individuals the *HTT* gene contains up to 18 CAG triplets, however, individuals with 35 CAG repeats is considered critical as a disease-causing allele, and above 40 repeats the disease is pervasive with the CAG repeats length increasing directly correlated to the rate of pathogenesis [50]. The HTT is ubiquitously expressed in eukaryotic cells and is important as an antiapoptotic protein and has importance in embryonic development, vesicle transport, and transcriptional regulation. The expanded poly-Q present in HTT is prone to aggregation that contributes to the development of neurodegeneration due to the accumulation of the mutant HTT fibrils and its intermediate oligomers formed during the aggregation/disaggregation process [51]. HTT accumulation can be toxic to the cell due the interference caused in cell-specific gene expression, posttranslational modifications, and protein-protein interaction.

Recently, it was identified by a genome-wide association analysis of several genetic modifiers for age of onset of HD, and among these data, it was found the E3 ubiquitin ligase UBR5 is a genetic modifier for HD. UBR5 is a component of the HECT class of ubiquitin ligases and it is known to be involved in important cellular pathways including DNA damage response, cell signaling, and apoptosis. The HECT domain shows a structural particularity in the C-lobe that does not have a surface for noncovalent ubiquitin binding; instead, the ubiquitin interacts with UBR5 by the UBA domain [52]. It was observed that UBR5 downregulation is associated with dysregulation of HTT levels resulting in the aggregation of poly-Q-expanded HTT in Huntington's disease immortalized pluripotent stem cell line [51].



Another E3 ligase related to HD is Ube3A, which is also part of the HECT family and it played a crucial role in experience-dependent cortical and neurocortical plasticity. Ube3A is capable of selectively redistributing the nuclear aggregates of mutant HTT. Also, its solubility is reduced in different regions of HD mice brain. Moreover, deficiency in Ube3A culminates in increased levels of HTT aggregates in mice brain [53]. A third E3 ligase component of the HECT family was also discovered regulating the levels of HTT in HD. The WWP1 (WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1) was first identified by its WW domain and belongs to the Nedd4-like family. Data showed high levels of expression of WWP1 in mice and in N2 cells expressing mutant HTT [54]. And finally, it was observed in filtration retardation assays that overexpressing SCF(Fbxo25) but not its mutant Fbxo25 without F-box domain of interaction with SKP1, decreases the aggregation of poly-Q-HTT, indicating that ubiquitin ligase activity of SCF(Fbxo25) prevents the aggregation of HTT [55].

#### *Parkinson's disease*

Parkinson's disease (PD) is known to be the second most ordinary neurodegenerative disease, which is characterized by the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta that results in the pathophysiologic changes in downstream basal ganglia circuit, albeit, it is not restricted to this region. The clinical syndrome caused by PD is called "parkinsonism" that includes resting tremor, imbalance, a slow shuffling gait, cogwheel rigidity, and bradykinesia [56]. The major part of PD cases is present in men with an average age of onset of 68 years.

Regarding the genetic factors found in PD patients, mutations in a variety of genes, including a mitochondrial protein kinase *PINK1* and two E3 ubiquitin ligases: Parkin (*PARK2*) and *FBXO7* (F-box only protein 7/*PARK15*), were found to be associated with familial PD [57]. Parkin is an E3 ubiquitin ligase part of the RING finger family and is localized in the cytosol unless mitochondrial depolarization occurs. Once it happens, Parkin is translocated to the mitochondrial outer membrane (MOM) where it ubiquitinates several proteins resulting in the induction of mitophagy. Therefore, Parkin plays an essential role in maintaining mitochondrial quality control and mutation in its gene is one of the major causes of autosomal recessive form of PD [58].

The other protein associated with a familial form of PD is Fbxo7, which is one of the 69 F-box proteins present in humans that is a component of the E3 ubiquitin ligase SCF (Fbxo7) [59]. Fbxo7 interacts with Parkin to regulate mitophagy and point that mutations in *FBXO7* were found in several families with sporadic PD and autosomal recessive early onset of PD [60]. The direct role of Fbxo7 in PD pathology is still unclear, but one hypothesis is that these mutations disable Fbxo7 enzymatic activity triggering toxic accumulation of some unknown protein causing the pathology [61].

### *Alzheimer's disease*

Alzheimer's disease (AD) is the most common brain disorder that causes dementia in older adults. A number of pathologic changes found in AD patients may occur several years before symptom onset, which leaves a reasonable time for implementation of prevention strategies for the earliest stages of AD. The causes of neurodegeneration are attributed to mitochondrial dysfunction, impairment of cerebral glucose metabolism, synaptic dysfunction, formation of neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau, and toxic amyloid oligomers [62].

Dysfunction in ubiquitin-proteasome pathway plays an important role in AD development. In patients with AD, ubiquitinated proteins are accumulated and this is capable of overwhelming the proteasome in neurons. A reduction of 50% was found in proteasome activity in neurons isolated from amyloid precursor protein (APP) transgenic mice, which is an animal model for AD, compared to neurons isolated from wild-type mice [63, 64].

The accumulation of  $\beta$ -amyloid is involved in the early AD pathogenesis, and it was discovered a ring finger E3 ubiquitin ligase called RNF182 that is overexpressed in postmortem brain tissue of AD patients. In normal conditions, RNF182 is a cytoplasmic protein expressed preferentially in the brain at low levels [65]. RNF182 targets ATP6V0C (C-subunit of the V0 sector of the vacuolar proton ATPase) for degradation by the ubiquitin-proteasome system. ATP6V0C is crucial in the formation of gap junction complexes and neurotransmitter release channels, for instance, it is known that acetylcholine, serotonin, and dopamine are released if ATP6V0C is expressed in cultured cells [66].

### *Cancer*

Cancer is a multifactorial disease where the activity of several E3 ubiquitin ligases is deregulated due to epigenetic and genetic pathways and/or by altered posttranslational modification. Since E3 ubiquitin ligase is involved in several cellular processes, the malfunctioning of this type of enzyme can lead to uncontrolled cell proliferation, DNA damage causing genomic instability contributing to malignant transformation, drug resistance therapy, and tumor progression by modulating the balance between cell growth and survival signals [67].

F-box proteins (FBP) assemble with SKP1, Cullin 1, and Rbx1 forming the SCF-type E3 ubiquitin ligase complex that is a part of the RING-type family. FBPs are known to be associated with a number of types of cancers. For instance, somatic mutations in *FBXW7* (F-box/WD repeat-containing protein 7) were found in a variety of human cancers. This protein acts as a tumor suppressor by promoting the degradation of oncoproteins such as cyclin E, MYC, JUN, mTOR, and NOTCH, which are responsible for regulating crucial

cellular processes [68]. Moreover, studies showed that mice with *Fbxw7* depletion developed a predisposition for cancer in a series of tissues [69].

Another FBP protein associated with cancer is SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2), which is best known for mediating the degradation of cell cycle regulators via ubiquitin-proteasome system, including p27 and p21. Additionally, it was found that SKP2 is involved in tumorigenesis because it is responsible to ubiquitinate and promote the degradation of tumor suppressor proteins such as p27, p21, p130, and FOXO1 (forkhead box protein O1) [68]. Also, mutated *Skp2* mice models developed breast tumors and the overexpression of SKP2 in a cohort of human cancer supports the idea of SKP2 acting as a proto-oncoprotein [68, 70].

Interestingly, an FBP was discovered acting as both an oncogenic and a tumor suppressor.  $\beta$ -TRCP1 ( $\beta$ -transducin repeat-containing protein 1) and  $\beta$ -TRCP2 ( $\beta$ -transducin repeat-containing protein 2) can execute both functions depending on the cellular context and in a tissue-specific way [68]. In mice, mutation in  $\beta$ -TRCP1 showed predisposition in developing mammary, ovarian, and uterine carcinomas and mutation in  $\beta$ -TRCP2 presented a decrease in inflammatory response in skin and hyperplasia, suggesting a possible role of  $\beta$ -TRCP2 in skin cancer [71, 72]. There are several substrates of  $\beta$ -TRCP1 and  $\beta$ -TRCP 2 described, some of those act promoting cell cycle, such as CDC25 and others function in cell cycle arrest and that include Wee1 e EMI1 [68]. Therefore, to conclude how  $\beta$ -TRCP is going to play a role, we need to consider the whole cellular context.

The fate of a substrate will depend on the topology of the ubiquitin chains added on it. Hence, a more detailed comprehension of the E3 ubiquitin ligase regulation in tumorigenesis can contribute to the identification of prognostic markers enabling the development of anticancer therapies. Inhibition of the proteasome, for example, has been emerging as an interesting method for cancer treatment. Malignant cells are more prompt to suffer from the cytotoxic effects of proteasome inhibition compared to normal cells [73]. One explanation for this effect is the increased metabolism found in tumor cells raising the levels of protein synthesis that would turn these cells more susceptible to the cytotoxic effects of proteasome inhibition.

Bortezomib was the first proteasome inhibitor to be used in clinical practice. It is a peptide boronate inhibitor that acts as a specific inhibitor of the chymotryptic activity of the proteasome that generates cytotoxic effects on tumor cells. Bortezomib is used as a first-line treatment usually combined with other drugs to treat patients with multiple myeloma and malignant lymphoma. It inhibits NF- $\kappa$ B, which is a transcription factor for anti-apoptotic proteins, including Bcl-2, c-IAP2, and surviving, additionally, bortezomib acts stabilizing cell cycle proteins such as p53, p21, and p27 [74]. Understanding the control of checkpoints may be crucial to identify new targets to increase the efficacy of proteasome inhibitor drug development in cancer treatment.

## Conclusion

E3 ubiquitin ligases are an abundant family of enzymes composed of more than 600 proteins responsible for the conjugation of ubiquitin to the target substrate regulating numerous cellular responses through proteolytic or nonproteolytic actions in different signaling pathways, such as NF- $\kappa$ B, mitophagy, interferon response, cell cycle, and DNA repair. Because of their pleiotropic actions in cellular regulation, the E3 ligases are therapeutic targets for the treatment of different diseases, such as muscular atrophy, cancer, and neurodegenerative diseases (Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and Huntington's disease). Only a small number of the human E3 ubiquitin ligases have been characterized, and expanding the research of this class of enzymes is necessary to understand their role in human health and diseases.

## References

- [1] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Ann Rev Biochem* 1998;425–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>.
- [2] Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:11–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.11>.
- [3] Metzger MB, Pruneda JN, Klevit RE, Weissman AM. RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochim Biophys Acta* 1843;2014:47–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.026>.
- [4] Fouad S, Wells OS, Hill MA, D'Angiolella V. Cullin ring ubiquitin ligases (CRLs) in cancer: responses to ionizing radiation (IR) treatment. *Front Physiol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01144>.
- [5] Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, et al. Structure of the Cul1–Rbx1–Skp1–BoxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 2002;416:703–9.
- [6] Kipreos ET, Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biol* 2000;1. [reviews3002.1–reviews3002.7](https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-1-reviews3002.1).
- [7] Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:369–81. <https://doi.org/10.1038/nrc1881>.
- [8] Lafont E, Hartwig T, Walczak H. Paving TRAIL's path with ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 2018;43:44–60. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.002>.
- [9] Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 2005;24:3353–9. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600808>.
- [10] Komander D, Clague MJ, Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:550–63. <https://doi.org/10.1038/nrm2731>.
- [11] Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.004101>.
- [12] Liu S, Chen ZJ. Expanding role of ubiquitination in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res* 2011;21:6–21. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.170>.
- [13] Xu H, You M, Shi H, Hou Y. Ubiquitin-mediated NF $\kappa$ B degradation pathway. *Cell Mol Immunol* 2015;12:653–5. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.99>.
- [14] Aksentijevich I, Zhou Q. NF- $\kappa$ B pathway in autoinflammatory diseases: dysregulation of protein modifications by ubiquitin defines a new category of autoinflammatory diseases. *Front Immunol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00399>.
- [15] Steiner A, Harapas CR, Masters SL, Davidson S. An update on autoinflammatory diseases: relopathies. *Curr Rheumatol Rep* 2018;20:39. <https://doi.org/10.1007/s11926-018-0749-x>.

- [16] Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 2018;20:745–54. <https://www.nature.com/articles/s41556-018-0124-1>. [Accessed 7 January 2021].
- [17] Pickles S, Vigie P, Youle RJ. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr Biol* 2018;28:R170–85. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004>.
- [18] Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>.
- [19] Gladkova C, Maslen SL, Skehel JM, Komander D. Mechanism of Parkin activation by PINK1. *Nature* 2018;559:410–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0224-x>.
- [20] Trempe J-F, Sauv e V, Grenier K, Seirafi M, Tang MY, M enade M, et al. Structure of Parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science* 2013;340:1451–5. <https://doi.org/10.1126/science.1237908>.
- [21] Chaugule VK, Burchell L, Barber KR, Sidhu A, Leslie SJ, Shaw GS, et al. Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J* 2011;30:2853–67. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.204>.
- [22] Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 9th ed; 2017. <https://www.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-47978-3>. [Accessed 21 December 2020].
- [23] Hu H, Sun S-C. Ubiquitin signaling in immune responses. *Cell Res* 2016;26:457–83. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.40>.
- [24] Zhang Y, Li L-F, Munir M, Qiu H-J. RING-domain E3 ligase-mediated host–virus interactions: orchestrating immune responses by the host and antagonizing immune defense by viruses. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01083>.
- [25] Gack MU, Shin YC, Joo C-H, Urano T, Liang C, Sun L, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007;446:916–20. <https://doi.org/10.1038/nature05732>.
- [26] Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, et al. Activation of the I B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000;103:351–61. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00126-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00126-4).
- [27] Yoo Y-S, Park Y-Y, Kim J-H, Cho H, Kim S-H, Lee H-S, et al. The mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 resolves MAVS aggregates during antiviral signalling. *Nat Commun* 2015;6:7910. <https://doi.org/10.1038/ncomms8910>.
- [28] Song G, Liu B, Li Z, Wu H, Wang P, Zhao K, et al. E3 ubiquitin ligase RNF128 promotes innate antiviral immunity through K63-linked ubiquitination of TBK1. *Nat Immunol* 2016;17:1342–51. <https://doi.org/10.1038/ni.3588>.
- [29] Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Seya T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem* 2009;284:807–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804259200>.
- [30] Liu B, Zhang M, Chu H, Zhang H, Wu H, Song G, et al. The ubiquitin E3 ligase TRIM31 promotes aggregation and activation of the signaling adaptor MAVS through Lys63-linked polyubiquitination. *Nat Immunol* 2017;18:214–24. <https://doi.org/10.1038/ni.3641>.
- [31] Chen H-W, Yang Y-K, Xu H, Yang W-W, Zhai Z-H, Chen D-Y. Ring finger protein 166 potentiates RNA virus-induced interferon-  production via enhancing the ubiquitination of TRAF3 and TRAF6. *Sci Rep* 2015;5:14770. <https://www.nature.com/articles/srep14770>. [Accessed 8 January 2021].
- [32] Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *PNAS* 2007;104:7500–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611551104>.
- [33] Zhong B, Zhang Y, Tan B, Liu T-T, Wang Y-Y, Shu H-B. The E3 ubiquitin ligase RNF5 targets virus-induced signaling adaptor for ubiquitination and degradation. *J Immunol* 2010;184:6249–55. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903748>.
- [34] Benanti JA. Coordination of cell growth and division by the ubiquitin–proteasome system. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23:492–8. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2012.04.005>.



- [35] Bassermann F, Eichner R, Pagano M. The ubiquitin proteasome system—implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2014;1843:150–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.028>.
- [36] Teixeira LK, Reed SI. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu Rev Biochem* 2013;82:387–414. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060410-105307>.
- [37] Mocciaro A, Rape M. Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control. *J Cell Sci* 2012;125(Pt 2):255–63. <https://jcs.biologists.org/content/125/2/255>. [Accessed 6 January 2021].
- [38] Stadler J, Richly H. Regulation of DNA repair mechanisms: how the chromatin environment regulates the DNA damage response. *Int J Mol Sci* 2017;18:1715. <https://doi.org/10.3390/ijms18081715>.
- [39] Nishi R. Balancing act: to be, or not to be ubiquitylated. *Mut Res Fund Mol Mech Mutagen* 2017;803–805:43–50. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.07.006>.
- [40] Hieu T, Van, Margarida A, Santos, Histone modifications and the DNA double-strand break response. *Cell Cycle* 2018;17(21–22):2399 <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1542899> (accessed December 18, 2020).
- [41] Uckelmann M, Sixma TK. Histone ubiquitination in the DNA damage response. *DNA Repair* 2017;56:92–101. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.011>.
- [42] Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta* 1695;2004:3–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.018>.
- [43] Ogawa T, Furochi H, Mameoka M, Hirasaka K, Onishi Y, Suzue N, et al. Ubiquitin ligase gene expression in healthy volunteers with 20-day bedrest. *Muscle Nerve* 2006;34:463–9. <https://doi.org/10.1002/mus.20611>.
- [44] Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14440–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.251541198>.
- [45] Al-Hassnan ZN, Shinwari ZM, Wakil SM, Tulbah S, Mohammed S, Rahbeeni Z, et al. A substitution mutation in cardiac ubiquitin ligase, FBXO32, is associated with an autosomal recessive form of dilated cardiomyopathy. *BMC Med Genet* 2016;17:3. <https://doi.org/10.1186/s12881-016-0267-5>.
- [46] Gumucio JP, Mendias CL. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. *Endocrine* 2013;43:12–21. <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9751-7>.
- [47] Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;307:E469–84. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>.
- [48] Atkin G, Paulson H. Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease. *Front Mol Neurosci* 2014;7:63. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00063>.
- [49] Roos RAC. Huntington’s disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:40. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-40>.
- [50] Zheng Q, Huang T, Zhang L, Zhou Y, Luo H, Xu H, et al. Dysregulation of ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* 2016;8:303. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00303>.
- [51] Koyuncu S, Saez I, Lee HJ, Gutierrez-Garcia R, Pokrzywa W, Fatima A, et al. The ubiquitin ligase UBR5 suppresses proteostasis collapse in pluripotent stem cells from Huntington’s disease patients. *Nat Commun* 2018;9:2886. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05320-3>.
- [52] Shearer RF, Ionomou M, Watts CKW, Saunders DN. Functional roles of the E3 ubiquitin ligase UBR5 in cancer. *Mol Cancer Res* 2015;13:1523–32. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0383>.
- [53] Maheshwari M, Samanta A, Godavarthi SK, Mukherjee R, Jana NR. Dysfunction of the ubiquitin ligase Ube3a may be associated with synaptic pathophysiology in a mouse model of Huntington disease. *J Biol Chem* 2012;287:29949–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371724>.
- [54] Lin L, Park JW, Ramachandran S, Zhang Y, Tseng Y-T, Shen S, et al. Transcriptome sequencing reveals aberrant alternative splicing in Huntington’s disease. *Hum Mol Genet* 2016;25:3454–66. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw187>.
- [55] Manfiolli AO, Maragno ALGC, Baqui MMA, Yokoo S, Teixeira FR, Oliveira EB, et al. FBXO25-associated nuclear domains: a novel subnuclear structure. *Mol Biol Cell* 2008;19:1848–61. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0815>.

- [56] Reich SG, Savitt JM. Parkinson's disease. *Med Clin North Am* 2019;103:337–50. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.014>.
- [57] Burchell VS, Nelson DE, Sanchez-Martinez A, Delgado-Camprubi M, Ivatt RM, Pogson JH, et al. The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat Neurosci* 2013;16:1257–65. <https://doi.org/10.1038/nn.3489>.
- [58] Seirafi M, Kozlov G, Gehring K. Parkin structure and function. *FEBS J* 2015;282:2076–88. <https://doi.org/10.1111/febs.13249>.
- [59] Teixeira FR, Randle SJ, Patel SP, Mevissen TET, Zenkeviciute G, Koide T, Komander D, Laman H. Gsk3 $\beta$  and Tomm20 are substrates of the SCFFbxo7/PARK15 ubiquitin ligase associated with Parkinson's disease. *Biochem J* 2016;473(20):3563–80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27503909/>. [Accessed 18 December 2020].
- [60] Stott SR, Randle SJ, Al Rawi S, Rowicka PA, Harris R, Mason B, et al. Loss of FBXO7 results in a Parkinson's-like dopaminergic degeneration via an RPL23-MDM2-TP53 pathway. *J Pathol* 2019;249:241–54. <https://doi.org/10.1002/path.5312>.
- [61] Randle SJ, Laman H. Structure and function of Fbxo7/PARK15 in Parkinson's disease. *Curr Protein Pept Sci* 2017;18:715–24. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160311121433>.
- [62] Oboudiyat C, Glazer H, Seifan A, Greer C, Isaacson RS. Alzheimer's disease. *Semin Neurol* 2013;33:313–29. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1359319>.
- [63] Almeida CG, Takahashi RH, Gouras GK. Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J Neurosci* 2006;26:4277–88. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5078-05.2006>.
- [64] Balducci C, Forloni G. APP transgenic mice: their use and limitations. *Neuromolecular Med* 2011;13:117–37. <https://doi.org/10.1007/s12017-010-8141-7>.
- [65] Liu QY, Lei JX, Sikorska M, Liu R. A novel brain-enriched E3 ubiquitin ligase RNF182 is up regulated in the brains of Alzheimer's patients and targets ATP6VOC for degradation. *Mol Neurodegener* 2008;3:4. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-3-4>.
- [66] Higashida H, Yokoyama S, Tsuji C, Muramatsu S-I. Neurotransmitter release: vacuolar ATPase V0 sector c-subunits in possible gene or cell therapies for Parkinson's, Alzheimer's, and psychiatric diseases. *J Physiol Sci* 2017;67:11–7. <https://doi.org/10.1007/s12576-016-0462-3>.
- [67] Senft D, Qi J, Ronai ZA. Ubiquitin ligases in oncogenic transformation and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2018;18:69–88. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.105>.
- [68] Wang Z, Liu P, Inuzuka H, Wei W. Roles of F-box proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2014;14:233–47. <https://doi.org/10.1038/nrc3700>.
- [69] Tetzlaff MT, Yu W, Li M, Zhang P, Finegold M, Mahon K, et al. Defective cardiovascular development and elevated cyclin E and Notch proteins in mice lacking the Fbw7 F-box protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3338–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307875101>.
- [70] Umanskaya K, Radke S, Chander H, Monardo R, Xu X, Pan Z-Q, et al. Skp2B stimulates mammary gland development by inhibiting REA, the repressor of the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 2007;27:7615–22. <https://doi.org/10.1128/MCB.01239-07>.
- [71] Kudo Y, Guardavaccaro D, Santamaria PG, Koyama-Nasu R, Latres E, Bronson R, et al. Role of F-box protein  $\beta$ Trcp1 in mammary gland development and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2004;24:8184–94. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.8184-8194.2004>.
- [72] Bhatia N, Demmer TA, Sharma AK, Elcheva I, Spiegelman VS. Role of  $\beta$ -TrCP ubiquitin ligase receptor in UVB mediated responses in skin. *Arch Biochem Biophys* 2011;508:178–84. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.023>.
- [73] Manasanch EE, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:417–33. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.206>.
- [74] Strauss SJ, Higginbottom K, Jülicher S, Maharaj L, Allen P, Schenkein D, et al. The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. *Cancer Res* 2007;67:2783–90. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3254>.

