

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

CAIO ALMEIDA BATISTA DE OLIVEIRA

MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT PELA E3
UBIQUITINA LIGASE SCF(Fbxo7)

SÃO CARLOS
2019

CAIO ALMEIDA BATISTA DE OLIVEIRA

**MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT PELA E3
UBIQUITINA LIGASE SCF(Fbxo7)**

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 Mestre em Ciências.

Área de concentração:

Bioquímica e biologia molecular

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira

São Carlos

2019



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

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Caio Almeida Batista de Oliveira, realizada em 22/02/2019:

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira
UFSCar

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo
UFSCar

Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes
USP

AGRADECIMENTOS

Primeiro, e principalmente, gostaria de agradecer aos meus pais, pessoas que eu tenho um orgulho imenso de ter como referência, que sempre me apoiaram e incentivaram a tomar as decisões que me trouxeram até aqui, sendo um suporte que não consigo pôr em palavras. É uma alegria enorme pra mim ter tido vocês como base pra poder chegar até aqui, pra poder desenvolver esse trabalho que, mais uma vez, também é de vocês.

À Rê, que além de ser uma pessoa espetacular, vem sendo uma companheira maravilhosa durante esse tempo todo, desde a graduação, me ajudando a manter minha cabeça no lugar, me dando um suporte imenso a seguir com meus objetivos, dando forças em qualquer que seja a situação e sendo a pessoa que consegue me fazer acreditar que as coisas vão dar certo.

Ao AdS, por todas as festas juninas, Halloweens, chácaras e por sempre estarem por perto, seja pra um almoço, janta ou qualquer outra ocasião – importante ou apenas uma noite de terça sem nada pra fazer –, fazendo de São Carlos uma cidade muito mais amistosa e divertida.

Ao Felipe, pela incrível orientação, pela paciência e auxílio durante o mestrado, que possibilitou esse trabalho existir, e por ter me aberto a oportunidade numa área que acabei descobrindo como intensamente prazerosa de se trabalhar.

A todo o grupo do LBqC, que fez do ambiente de trabalho um lugar extremamente tranquilo e confortável pra se estar.

A praticamente todos os professores do DGE, que abriram a porta de seus laboratórios para usarmos quando precisamos, principalmente quando o LBqC estava em construção.

A CAPES, por meio do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento em forma de bolsa (Processo 2016/21310-6) durante a execução do projeto.

Meu mais sincero muito obrigado.

“It’s the question that drives us, Neo. It’s the question that brought you here.”

Trinity

Matrix (1999)

RESUMO

Complexos SCF são compostos por Skp1, Cullin1, Rbx1 e uma proteína do tipo F-box (FBP), que são responsáveis por dar especificidade aos complexos por interagirem com os substratos, facilitando a ligação da molécula de ubiquitina ao alvo. Fbxo7 é a FBP que forma o quinto complexo SCF mais abundante em células, porém possui poucos alvos descritos que não explicam suas funções biológicas. Mutações no gene *PARK15*, que codifica para Fbxo7, estão associadas a Doença de Parkinson e desregulação nos níveis de Fbxo7 ao câncer. Recentemente, demonstramos que Fbxo7 ativa a via Wnt e tem como substrato GSK3 β e potencialmente β -TrCP, duas proteínas reguladoras desta via, que controlam genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular, estando diretamente associada ao desenvolvimento tumoral. Assim, o objetivo deste trabalho foi entender como SCF(Fbxo7) está modulando a via de sinalização Wnt. Inserimos duplas (K292R e K297R) ou triplas mutações pontuais (K292R, K297R e K303R) em GSK3 β afim de anular a ubiquitinação desta proteína por Fbxo7. De forma similar a GSK3 β , os mutantes interagiram com Fbxo7 por não haver alterações estruturais significativas como demonstrado por análises *in silico*. No entanto, surpreendentemente, as mutações pontuais aumentaram o nível de ubiquitinação dos mutantes em relação a GSK3 β . Os perfis de interação e ubiquitinação também foram avaliados em GSK3 β nos resíduos alvos de fosforilação (S9 e Y216). Embora Fbxo7 continue interagindo com as versões S9A e Y216F, a versão GSK3 β -S9A apresenta uma redução brusca no seu sinal de ubiquitinação enquanto GSK3 β -Y216F um aumento em relação a GSK3 β . Foram realizados ensaios de interação e ubiquitinação de Fbxo7 e β -TrCP, mostrando que a interação se dá via N-terminal de Fbxo7, sugerindo que β -TrCP seja um alvo de Fbxo7. Ensaios de estabilidade demonstraram Fbxo7 altera os níveis apenas de GSK3 β -Y216F, comparado a GSK3 β , GSK3 β -S9A e β -TrCP. Também foi observado que apesar de ubiquitinar proteínas envolvidas na via, Fbxo7 não altera os níveis totais de β -catenina, molécula efetora da via Wnt. Por fim, os resultados mostraram que Fbxo7 impede o recrutamento de GSK3 β para a fração membrana da célula em comparação com Fbxo7- Δ F. Com isso, este trabalho sugere um novo mecanismo de regulação da via Wnt em que Fbxo7 ubiquitina GSK3 β sem direcioná-la para a fração membrana da célula, sendo este mecanismo dependente do estado de fosforilação de GSK3 β no resíduo de serina 9.

Palavras-chave: ubiquitinação, Fbxo7, via Wnt, GSK3 β , β -TrCP

ABSTRACT

SCF complexes are composed by Skp1, Cullin1, Rbx1 and an F-box protein (FBP), which are responsible to give specificity to the complexes, as they interact with substrates, allowing ligation of an ubiquitin molecule to the target. Fbxo7 forms the fifth most abundant SCF complex in cells, however there are few described targets of its complex, which does not explain its biological functions. Mutations in *PARK15* gene, which codes for Fbxo7, are related to Parkinson's Disease and deregulation on Fbxo7 levels to cancer. Recently, we demonstrated Fbxo7 activates Wnt pathway and has as targets GSK3 β and potentially β -TrCP, two regulator proteins of this pathway, which controls genes involved in cellular proliferation and differentiation, being directly associated to tumour development. Therefore, the aim of this work was to understand how SCF(Fbxo7) is modulating Wnt signalling pathway. Point mutations were inserted in two (K292R and K297R) or three (K292R, K297R and K303R) residues in GSK3 β , in order to prevent its ubiquitination by Fbxo7. Similarly to GSK3 β , mutants interact with Fbxo7 as there are no structural alterations as demonstrated by *in silico* analysis. However, surprisingly, point mutations elevated mutants ubiquitination signal in comparison to GSK3 β . Interaction and ubiquitination profiles were also assessed for GSK3 β in its phosphorylation sites (S9 and Y216). Although Fbxo7 keeps interacting with versions S9A and Y216F, GSK3 β -S9A presents an abrupt reduction in its ubiquitination signal while GSK3 β -Y216F was more ubiquitinated compared to GSK3 β . It was performed interaction and ubiquitination assays for Fbxo7 and β -TrCP, showing their interaction is mediated via Fbxo7 N-terminal and suggesting β -TrCP is a target of Fbxo7. Stability assays demonstrated Fbxo7 alters levels only of GSK3 β -Y216F, in comparison to GSK3 β , GSK3 β -S9A and β -TrCP. It was also observed that even though it ubiquitinates proteins involved in Wnt pathway, Fbxo7 does not alter the levels of effector molecule of this pathway, β -catenin. Finally, results showed Fbxo7 avoids GSK3 β recruitment to cellular membrane fraction compared to Fbxo7- Δ F. Overall, this work suggests a new mechanism of Wnt activation through GSK3 β ubiquitination dependent of Serine 9 residue, which prevents its migration to the cell membrane.

Key-words: ubiquitination, Fbxo7, Wnt pathway, GSK3 β , β -TrCP

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -TrCP: *β -transducin repeat-containing protein*

APC: *Adenomatous polyposis coli protein*

ATP: *adenosine triphosphate*, trifosfato de adenosina

BSA: albumina de soro bovina

Cdk: *cyclin-dependent kinase*

CHX: cicloheximida

CK1: *casein kinase 1*

DAM: anticorpo secundário burro-anti-camundongo

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: *desoxiribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

DP: doença de Parkinson

DUB: enzima deubiquitinase

FBS: soro fetal bovino

FBP: *F-box protein*

Fbxo7- Δ F(-box): mutante de Fbxo7 que não contém o domínio F-box de ligação com Skp1; não possui a região entre os resíduos 335-367 (Δ 335-367)

FLAG: peptídeo FLAG, sequência DYKDDDDK

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GAR: anticorpo secundário cabra-anti-coelho

Grp75: *75 kDa glucose-regulated protein*

SK3: glicogênio sintase quinase 3

HA: peptídeo hemaglutinina da Influenza, sequência YPYDVPDYA

HECT: *Homologous to E6-associated protein C-terminus*, família de E3 ligases

HEK293T: células embrionárias de rim humano 293T

IP: imunoprecipitação

LEF: *Lymphocyte-enhancer binding factor*

LRP: *Low-density lipoprotein receptor-related protein*

LRR: *leucine rich repeat*, domínio rico em leucina

MPT: modificações pós-traducionais

MVB: *multivesicular bodies*, corpos multivesiculares

OTU: *ovarian tumor DUB*, DUB de tumor ovariano

PARP: poli-ADP-ribose polimerase

PBS: tampão fosfato salino

PCP: *planar cell polarity*, um dos tipos da via Wnt

PCR: *polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase

PDB: *protein database*

PEI: polietilenoimina

PINK1: *PTEN-induced putative kinase protein 1*

Rab7: *Ras-related protein 7*

Rbx1: *RING-box protein 1*

RING: *Really Interesting New Gene*, família de E3 ligases

SCF: complexo E3 ligase composto por Skp1, Cullin1, *F-box protein* e Rbx1

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

Skp1: *S-phase kinase-associated protein 1*

Skp2: *S-phase kinase-associated protein 2*

T_m: temperatura de *melting*

TCF: *T-cell factor*

TOMM20: *translocase of outer mitochondrial membrane 20*

U2OS: células epiteliais de osteossarcoma humano

UAE: *ubiquitina activating enzyme*, enzima ativadora de ubiquitina, enzima E1

USP: *Ub-specific protease*, protease específica de ubiquitina

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1. A proteína Fbxo7	15
1.2. A via de sinalização Wnt e a proteína GSK3 β	16
2. Objetivos	21
2.1. Objetivos específicos	21
3. Metodologia	23
3.1. Obtenção das mutações pontuais em GSK3 β	23
3.2. Análise <i>in silico</i> das mutações K292/297/303R em GSK3 β	26
3.3. Ensaio de ubiquitinação <i>in vivo</i> de GSK3 β por SCF(Fbxo7)	26
3.4. Ensaio de interação entre Fbxo7 e GSK3 β <i>in vivo</i>	28
3.5. Ensaio de co-localização de Fbxo7 e GSK3 β ou GSK3 β -K292/297/303R	29
3.6. Ensaio de interação e ubiquitinação <i>in vivo</i> de β -TrCP	30
3.7. Ensaio de estabilidade <i>in vivo</i> de GSK3 β e β -TrCP	31
3.8. Avaliação dos níveis celulares totais de β -catenina	33
3.9. Avaliação do tráfego intracelular de GSK3 β	34
4. Resultados	37
4.1. Inserção das mutações pontuais em GSK3 β nos resíduos K292, K297 e K303	37
4.2. As mutações em K292, K297 e K303 não alteram a estrutura de GSK3 β	39
4.3. As mutações em GSK3 β alteram o seu perfil de interação e ubiquitinação por Fbxo7	41
4.4. Mutações em GSK3 β nos sítios de fosforilação e regulação serina 9 e tirosina 216 afetam sua ubiquitinação por Fbxo7	43
4.5. β -TrCP interage com Fbxo7 sendo potencialmente um substrato do complexo SCF(Fbxo7)	45
4.6. Fbxo7 altera a estabilidade de GSK3 β -Y216F, mas não de GSK3 β , GSK3 β -S9A e β -TrCP	47
4.7. Os níveis totais de β -catenina não são alterados por Fbxo7	49
4.8. Fbxo7 reduz a migração intracelular de GSK3 β para frações membranares	50
5. Discussão	53
6. Conclusão e contribuições do trabalho	59
7. Bibliografia	61

1. Introdução

Proteínas são macromoléculas biológicas capazes de sofrerem alterações em sua estrutura pela adição de um grupo funcional a algum resíduo de sua sequência. Essas alterações, chamadas de modificações pós-traducionais (MPT), se ligam de forma covalente e alteram a função do alvo modificado, de acordo com o grupo ligado a proteína. Acetilação e metilação, por exemplo, alteram a carga líquida de uma proteína; glicosilação pode funcionar como sinal de endereçamento de um polipeptídeo; além da fosforilação, no contexto de sinalização celular, a ubiquitinação surge como uma MPT de bastante importância por regular funcionalmente uma proteína ou leva-la a degradação pelo proteossoma (KOMANDER, 2009; NELSON; COX, 2014).

Ubiquitina é um polipeptídeo de 76 resíduos – e aproximadamente 8,5 kDa – que possui sete resíduos de lisina em sua sequência (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), os quais são extremamente importantes para a função do polipeptídeo (KOMANDER, 2009; HERHAUS; DIKIC, 2015). Ubiquitinação é um processo que consiste na adição de uma molécula de ubiquitina a uma proteína-alvo por meio de uma ligação isopeptídica. Essa ligação ocorre entre o C-terminal de uma molécula de ubiquitina e o grupo ϵ -amino da cadeia lateral de um resíduo de lisina (ou grupo α -amino-terminal da metionina de posição 1 (M1) na estrutura primária da proteína) (HERHAUS; DIKIC, 2015; LIU et al., 2015; ZHENG; SHABEK, 2017). A adição de ubiquitinas ao alvo pode ocorrer por meio da inserção de apenas uma molécula em apenas um sítio da proteína (monoubiquitinação), adição de moléculas únicas a vários sítios do alvo (multi-monoubiquitinação) ou através da formação de cadeias de ubiquitina em um sítio da proteína modificada (KOMANDER, 2009).

As diferentes cadeias de poliubiquitina formadas pelas ligações entre ubiquitinas nos seus sete diferentes resíduos de lisina geram diferentes resultados na modificação do alvo. Cadeias do tipo K48 – caracterizada pelas ligações isopeptídicas ocorrendo entre o C-terminal de uma ubiquitina à lisina 48 da ubiquitina anterior – geralmente enviam o alvo para degradação pelo proteossoma, enquanto cadeias do tipo K63 funcionam como um sinal de modulação proteica, não encaminhando a proteína para degradação. A relação entre tipo de cadeia e sua função está completamente ligada a estrutura da cadeia formada, sendo que cada uma delas apresenta uma estrutura única, servindo de reconhecimento pela célula para a função a ser desempenhada pela poliubiquitinação (PICKART, 2001; KOMANDER, 2009).

O processo de ubiquitinação consiste de três passos sequenciais que são executados por três enzimas diferentes: as enzimas E1, E2 e E3, como mostrado na **Figura 1**. A enzima E1, conhecida como enzima ativadora de ubiquitina, é responsável por se ligar covalentemente a molécula de ubiquitina, ativando-a às custas da quebra de uma molécula de ATP; sequencialmente, a molécula ativada de ubiquitina é transferida para a enzima E2, a carreadora de ubiquitina, que então interage com a enzima E3 ligase – responsável por interagir simultaneamente com a proteína-alvo –, que facilita a transferência da molécula de ubiquitina ao alvo a ser modificado, culminando com a ubiquitinação da proteína-alvo (LIU et al., 2015; ZHENG; SHABEK, 2017).

A modificação de substratos via ubiquitinação, no entanto, é um processo reversível, em que a molécula de ubiquitina pode ser retirada por via enzimática. Há aproximadamente 100 DUBs (deubiquitinases) codificadas no genoma humano, sendo responsáveis por retirar o sinal de ubiquitinação adicionado a uma proteína-alvo. As DUBs são divididas em seis famílias, que podem ser específicas em remover um tipo específico de ubiquitinação (como a família OTU – OTUB1 retira cadeias K48, OTUD1 retira cadeias K63) ou remover as cadeias de modo inespecífico (como a família USP – que inclui a enzima USP21, responsável por retirar todos os tipos de cadeia de ubiquitina). Assim como a ubiquitinação, a função das DUBs é extremamente importante, estando associada a regulação de diversos processos celulares, como controle do ciclo celular e reparo de dano ao DNA (MEVISSSEN et al., 2013; DARLING et al., 2017). Sua presença na cascata de ubiquitinação está demonstrada na **Figura 1**.

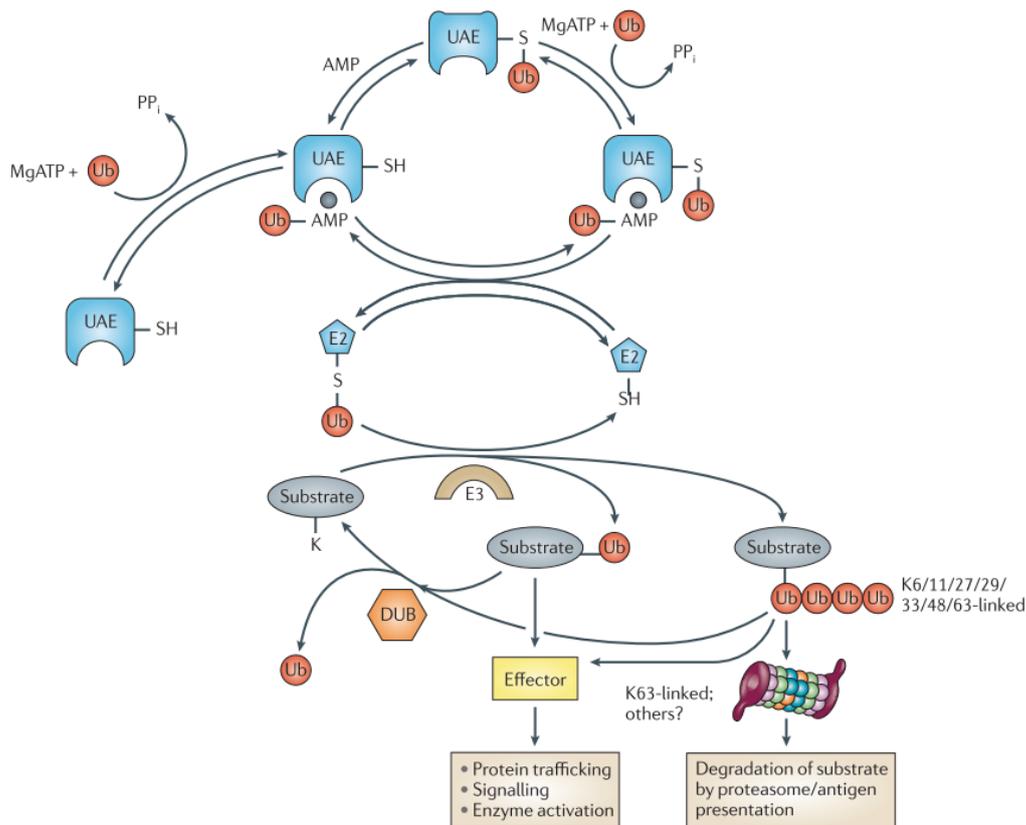


Figura 1: Modelo esquemático do processo de ubiquitinação. A molécula de ubiquitina é ativada pela E1 (UAE), em seguida carregada pela E2 até a enzima E3 ligada ao alvo a ser ubiquitinado. Neste complexo E3 há transferência de molécula de ubiquitina para o substrato, que pode ser direcionado ao proteassoma ou ter sua função modificada – a depender do tipo de cadeia de ubiquitina adicionado ao alvo. A proteína ubiquitinada pode ainda ser alvo das DUBs, que removem o sinal promovido pela(s) molécula(s) de ubiquitina (BEDFORD et al., 2011).

As E3 ligases, em particular, são altamente relevantes na cascata de ubiquitinação por serem as responsáveis por dar especificidade ao processo, já que cada E3 possui um ou um grupo restrito de alvos. O genoma humano é responsável por codificar duas enzimas E1, trinta e sete E2 e mais de seiscentas E3 ligases, reiterando sua importância e como sua função é finamente regulada (KOMANDER, 2009; LIU et al., 2015; ZHENG; SHABEK, 2017).

Existem diferentes tipos de E3 ligases que podem ser separadas em classes de acordo com a estrutura do seu domínio catalítico e o modo de catálise (HERHAUS; DIKIC, 2015). A literatura divide as E3 em duas (SATIJA; BHARDWAJ; DAS, 2013; WEATHINGTON; MALLAMPALLI, 2014; HERHAUS; DIKIC, 2015; MORROW et al., 2015; ZHENG; SHABEK, 2017; LIU et al., 2018) ou três (ARDLEY; ROBINSON, 2005; LIU et al., 2015) classes, dependendo do critério: HECT, RING e U-box (vista em alguns momentos como subclasse de E3 ligases do tipo RING (MORROW et al., 2015)). As E3 do tipo RING (*Really*

Interesting New Gene) são as mais abundantes, podendo ser inclusive subdivididas em monoméricas ou em complexos multi-subunidades, sendo que a maior família de E3 ligases do tipo RING são os complexos do tipo SCF (LIU et al., 2015; MORROW et al., 2015; ZHENG; SHABEK, 2017).

Os complexos SCF (**Figura 2**) são caracterizados (e nomeados) pelas proteínas que os compõem: são formados pela associação entre Skp1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), Cullin1, Rbx1 (*RING box protein 1*) e FBP (F-box protein), uma proteína da família F-box, que possui um domínio do mesmo nome. Rbx1, a proteína que possui o domínio RING de interação com a enzima E2 que carrega a molécula ativada de ubiquitina para ser transferida para a proteína-alvo; Cullin1 serve como base do complexo, interagindo com Rbx1 no C-terminal e com Skp1 no N-terminal; Skp1, por sua vez, funciona como uma ponte entre os elementos já descritos do complexo e a FBP. Por fim, a proteína da família F-box é responsável por dar especificidade ao complexo SCF, já que cada FBP interage com um grupo específico de alvos. Assim, FBP faz com que todo o complexo SCF interaja e, conseqüentemente, promova a adição da(s) molécula(s) de ubiquitina na proteína-alvo (LEE et al., 2011; SATIJA; BHARDWAJ; DAS, 2013; MORROW et al., 2015).

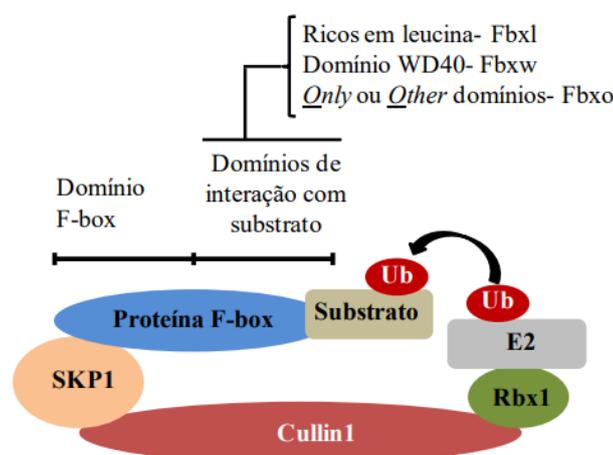


Figura 2: Modelo de complexo SCF montado pelas proteínas Skp1, Cullin1, Rbx1 e a proteína da família F-box, com destaque para os domínios característicos de cada uma das sub-famílias (Fbx1, Fbxw ou Fbxo).

Existem sessenta e nove FBP's descritas no genoma humano, porém a maioria ainda não foi caracterizada. Elas são divididas em três subfamílias de acordo com os domínios de interação com seus substratos: as Fbxw's, que contém o domínio WD-40 rico em triptofano (W) e ácido aspártico (D); as Fbx1's, que contém um domínio rico em leucina (*leucine rich repeat* – LRR); e as Fbxo's, que não contém nenhum domínio característico e por isso denominadas *F-box only proteins* (CENCIARELLI et al., 1999; WINSTON et al., 1999a).

As proteínas do tipo Fbxo representam a maior subfamília das FBPs, com trinta e sete membros, possuindo poucos substratos caracterizados – enquanto as outras subfamílias possuem membros muito bem caracterizados, como a β -TrCP (Fbxw1) e Skp2 (Fbx11). Dentre todas as FBP's, Fbxo7 forma o quinto complexo SCF mais abundante em células de mamífero, porém ainda não possui um número descrito de substratos que explique toda sua relevância biológica (CENCIARELLI et al., 1999; WINSTON et al., 1999a; NELSON; RANDLE; LAMAN, 2013; WANG et al., 2014).

1.1. A proteína Fbxo7

Fbxo7 tem sido relacionada ao desenvolvimento de algumas doenças, sejam degenerativas como Doença de Parkinson (DP) ou no caso de desenvolvimento de tumores.

Na DP, o *knockout* de *FBXO7* em modelos animais, tanto de forma sistêmica quanto condicional em neurônios, gerou sintomas severos de déficit motor, relacionados inclusive com uma menor quantidade total de dopamina – apesar de não ter sido observada variação na morte celular no cérebro dos animais, mostrando grande importância no contexto de prevenção à doença (VINGILL et al., 2016). O *knockdown* de Fbxo7 também foi visto em associação ao comprometimento da função de mitocôndrias, por gerar desbalanceamento dos níveis de NAD⁺/NADH e ativar mecanismos de reparo a DNA por meio de PARP (poli-ADP-ribose polimerase), causando comprometimento da homeostase mitocondrial – um dos *hallmarks* da DP.

Algumas formas mutantes de Fbxo7 observadas em pacientes com desenvolvimento precoce de DP (T22M, R378G e R498X) foram mostradas se acumular no interior de mitocôndrias na forma de agregados gerando uma organela disfuncional, levando a uma queda de viabilidade celular (ZHOU et al., 2015). Em paralelo, Fbxo7 é responsável por mediar, juntamente a PINK1 e Parkin, a mitofagia de mitocôndrias despolarizadas, processo que é deficiente em amostras de pacientes com a mutação T22M no gene *FBXO7* (BURCHELL et al., 2013). Outras mutações na estrutura primária de Fbxo7 – como I87T e D328R – também já foram identificadas em casos de desenvolvimento precoce de doenças ou alteração de parâmetros fisiológicos, porém ainda não possuem descrição funcional (RANDLE; LAMAN, 2017).

Da mesma forma, Fbxo7 também já foi observada estar envolvida em situações de proliferação celular e desenvolvimento de tumores. Em modelo celular de fibroblasto

murino, Fbxo7 interagiu com ciclina D e especificamente com Cdk6, sendo essencial para a formação do complexo Cdk/ciclina entre Cdk6/ciclina D. Esses complexos são bem caracterizados e responsáveis por estimular a progressão do ciclo celular com consequente multiplicação celular. Ainda, a superexpressão de Fbxo7 induziu formação de tumores em modelo animal devido a sua atividade transformante por meio da indução da formação desse tipo de complexo Cdk/ciclina (LAMAN et al., 2005).

De maneira interessante, Fbxo7 também se mostrou como regulatória da proliferação celular. Em modelo de células hematopoiéticas progenitores da linhagem B de leucócitos, não foi observada uma atividade transformante de Fbxo7 com decorrente multiplicação celular. Ao contrário, o *knockdown* de Fbxo7 fez com que as células se proliferassem de maneira mais acelerada e tivessem uma fase G1 do ciclo menor, mostrando que Fbxo7, nesse modelo, possui um efeito anti-proliferativo, em contraste ao efeito em fibroblasto murino (MEZIANE et al., 2011). Desta forma, Fbxo7 tem uma função extremamente dependente do modelo celular utilizado, estando sua atuação condicionada ao tecido no qual a proteína é analisada.

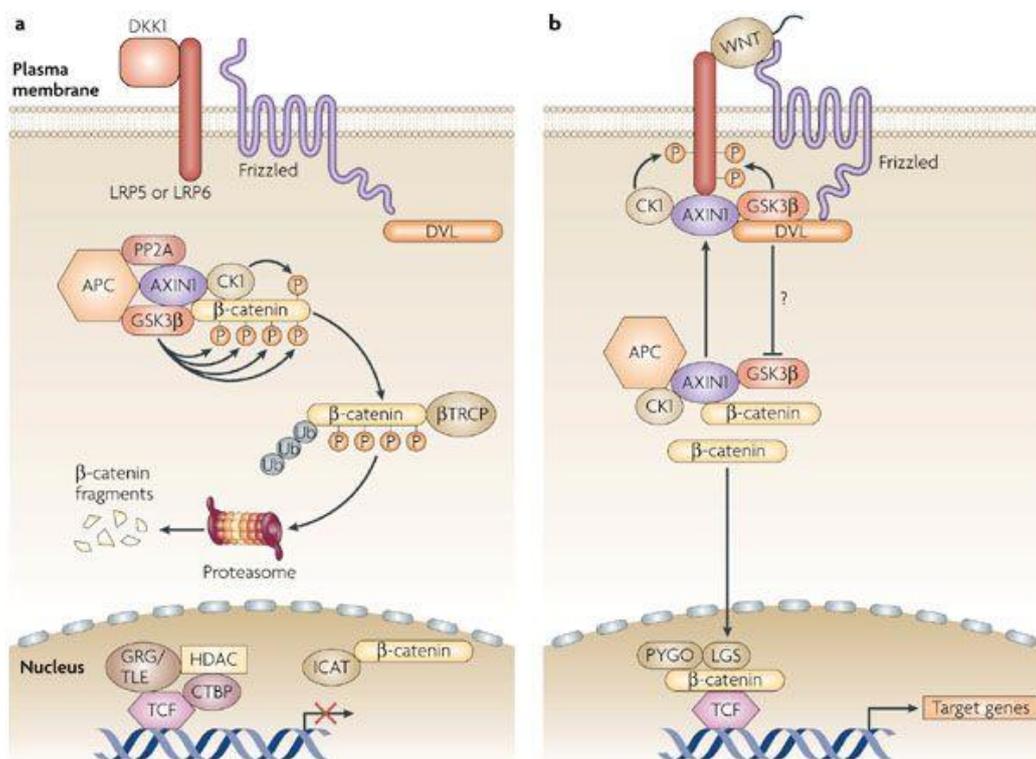
Por esse efeito dependente de tecido, a caracterização de substratos de Fbxo7 se mostra ainda mais interessante. Recentemente, nosso grupo de pesquisa em colaboração com a Dra. Heike Laman (*University of Cambridge/UK*) demonstrou que a proteína Fbxo7 interage via N-terminal com a proteína GSK3 β . Esta interação promove a ubiquitinação de GSK3 β por SCF(Fbxo7) *in vitro* e *in vivo*; no entanto, esta modificação pós-traducional não levou o substrato a degradação pelo proteossoma, já que foram identificadas cadeias de ubiquitina K63 inseridas em GSK3 β . Esta modificação levou a um aumento na atividade transcricional de β -catenina, principal efetor da via de sinalização Wnt, sugerindo que Fbxo7 é um ativador desta via (TEIXEIRA et al., 2016).

1.2. A via de sinalização Wnt e a proteína GSK3 β

A via de sinalização Wnt pode ser dividida em três tipos: canônica, *planar cell polarity* [PCP] e a Wnt-Ca²⁺, sendo uma cascata de sinalização controlada pela atividade de 19 proteínas da família WNT, codificadas pelo mesmo número de genes *WNT* em humanos. Está diretamente relacionada ao controle da expressão de genes relacionados a proliferação e diferenciação celular, sendo que a alteração da atividade normal da cascata de sinalização

pode causar defeitos no desenvolvimento embrionário (STAAL; LUIS; TIEMESSEN, 2008; ANASTAS; MOON, 2012).

A via Wnt canônica, também chamada de Wnt/ β -catenina, tem como principal efetor a proteína β -catenina. Quando a via está inativa, um complexo multiproteico chamado de complexo de destruição – composto por Axin1, APC, CK1 e GSK3 β – é responsável por interagir e fosforilar β -catenina, o que faz com que seja reconhecida e ubiquitinada por β -TrCP, levando a sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Assim, o *T-cell factor* (TCF) se liga a um repressor no núcleo impedindo a transcrição dos genes controlados pela via. Quando uma proteína WNT interage com o receptor *Frizzled* e o co-receptor LRP5/6, o complexo de destruição é recrutado para a interação com os receptores transmembrana e, com isso, β -catenina, o efetor da via, não mais é fosforilado e degradado. Seus níveis citoplasmáticos aumentam e esse acúmulo faz com que migre para o núcleo, onde interage com TCF e age como fator de transcrição de genes que contem regiões de interação com TCF/LEF (*T-cell factor/lymphocyte-enhancer-binding factor*), estimulando a expressão desses genes (STAAL; LUIS; TIEMESSEN, 2008; ANASTAS; MOON, 2012). A via pode ser observada na **Figura 3**.



Nature Reviews | Immunology

Figura 3: Modelo esquemático da via Wnt. a) via inativa e a proteína β -catenina recrutada para o complexo de destruição, sendo fosforilada por CK1 e GSK3 β e em seguida direcionada a E3 ligase β -TrCP, sendo destinada a degradação pelo proteossoma. b) via ativada pela interação de uma WNT com LRP5/6 e *Frizzled* na membrana plasmática e recrutamento do complexo de destruição para membrana plasmática com liberação de β -catenina para o núcleo ativando a expressão de genes alvo (STAAL; LUIS; TIEMESSEN, 2008).

A importância da via Wnt em doenças já foi observada em vários tipos de patologias diferentes, variando de doenças do sistema neurológico – como esquizofrenia e transtorno bipolar – a doenças degenerativas, como Doença de Alzheimer, passando por doenças crônicas, como doenças autoimunes e, aquela que talvez a sinalização Wnt seja mais amplamente discutida e associada, câncer (KAHN, 2014).

A presença de mutações nos fatores envolvidos na via Wnt, incluindo mutações nos fatores *APC* e *AXIN1*, do complexo de destruição, em *CTNNB1* – gene codificante da β -catenina –, já foram observadas em vários tipos de câncer. Inclusive, alta presença nuclear de β -catenina já foi correlacionada a um prognóstico ruim em casos de tumor de mama e cólon. Além disso, a sinalização autócrina por meio das WNT's tem uma alta relevância no crescimento e desenvolvimento de vários tumores. WNT3A, WNT1 e WNT7A, por exemplo, são capazes de gerar efeito transformante em células epiteliais mamárias, sendo

que WNT3A também tem a capacidade de estabilizar β -catenina e estimular a expressão dos genes controlados pela via em outros tipos de tumor (ANASTAS; MOON, 2012).

Talvez o caso mais bem estudado de correlação entre a via Wnt e desenvolvimento de tumores seja no câncer gastrointestinal – mutações em *APC* já estão relacionadas com esse tipo de tumor. Um aumento de atividade transcricional associado a um aumento de atividade de β -catenina também foi observado como fator de desenvolvimento de tumores, pelo aumento da instabilidade cromossomal. A inibição farmacológica da via também já foi observada reduzir níveis proliferativos em modelo animal, mostrando a importância da atividade da via no desenvolvimento e manutenção das doenças (ANASTAS; MOON, 2012; ZHAN; RINDTORFF; BOUTROS, 2017).

A proteína GSK3 (Glicogênio Sintase Quinase 3) foi inicialmente identificada como a quinase responsável pela fosforilação da enzima glicogênio sintase (GS), regulando a produção de glicogênio (ROBERTSON; HAYES; SUTHERLAND, 2018).

GSK3 β é uma das duas isoformas encontradas em mamíferos do gene *GSK3*, denominadas α e β possuindo mais de 90% de identidade, porém com características funcionais diferentes. Enquanto o *knockout* de *GSK3 α* gera camundongos viáveis – com defeitos no metabolismo de glicose –, a ausência de GSK3 β em camundongos gera letalidade pós-natal, causada por vários defeitos de desenvolvimento (ROBERTSON; HAYES; SUTHERLAND, 2018).

Já foram descritos mais de 100 substratos fosforilados por GSK3 em dezenas de processos celulares diferentes, mostrando sua versatilidade em termos de regulação da homeostase celular. Aliado a isso, GSK3 β é a quinase com mais substratos teóricos previstos, passando de 500 (BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015). A ação de GSK3 β geralmente se dá pelo reconhecimento de uma sequência S/T-XXX(p)-S/T, em que é capaz de fosforilar um resíduo de serina ou treonina 4 posições acima (ou a N-terminal) de um resíduo já fosforilado. Geralmente, há a necessidade de *priming* de seu substrato, ou seja, a fosforilação prévia por parte de uma outra quinase. Porém, já foram identificados alvos que não continham essa primeira fosforilação, em que GSK3 β foi capaz de atuar sem a modificação prévia (BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015; ROBERTSON; HAYES; SUTHERLAND, 2018).

GSK3 β possui no resíduo de serina 9 (S9) um ponto importante na modulação de sua atividade. Sutherland e colaboradores (SUTHERLAND; LEIGHTON; COHEN, 1993) descreveram a fosforilação de S9 como responsável por inibir a função da enzima, enquanto

a defosforilação do sítio resgatava a atividade da proteína. Da mesma forma, GSK3 β também pode ser inibida quando da interação com a proteína transmembrana LRP5/6, observada inicialmente sob estímulo de ativação da via Wnt (CSELENYI et al., 2008). A inibição de GSK3 β foi descrita por um terceiro mecanismo, sendo sequestrada para vesículas intracelulares denominadas corpos multivesiculares (*multivesicular bodies*, MVBs), em que sua atividade não é afetada, porém a sua compartimentalização faz com que não esteja disponível para fosforilar seus alvos, também no contexto da via Wnt (TAELMAN et al., 2010).

Os mecanismos descritos de modulação da atividade de GSK3 β que indicam sua migração para a membrana plasmática (CSELENYI et al., 2008) ou seu sequestro em MVB's (TAELMAN et al., 2010) não descrevem o estímulo responsável por gerar este efeito. Nosso grupo identificou GSK3 β como substrato da E3 ligase SCF(Fbxo7) e sua ubiquitinação levou a ativação da via Wnt (TEIXEIRA et al., 2016). Além deste substrato, identificamos a proteína β -TrCP (*Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase*) como um potencial alvo de ubiquitinação por Fbxo7. Desta forma, este trabalho buscou entender a maneira pela qual SCF(Fbxo7) está modulando a via Wnt através da ubiquitinação de proteínas envolvidas nesta via de sinalização intracelular. Nossa hipótese inicial era que a ubiquitinação de GSK3 β por SCF(Fbxo7) seria o estímulo para a sua migração e aprisionamento deste substrato em corpos multivesiculares culminando com a sua inibição e ativação da via Wnt.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo descrever o mecanismo pelo qual Fbxo7 regula a via de sinalização Wnt através da ubiquitinação de fatores envolvidos nesta via.

2.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- A partir da versão selvagem de GSK3 β , produzir mutações pontuais nos sítios K292, K297 e K303, alterando os resíduos de lisina (K) por resíduos de argininas (R) a fim de gerar o duplo e triplo mutantes GSK3 β -K292/297R e GSK3 β -K292/297/303R;
- Avaliar se as mutações pontuais geram alteração nos perfis de interação e ubiquitinação *in vivo* de GSK3 β com Fbxo7;
- Avaliar interação e ubiquitinação por Fbxo7 dos mutantes GSK3 β -S9A e GSK3 β -Y216F;
- Avaliar a estabilidade de GSK3 β e de seus mutantes *in vivo*;
- Avaliar perfil de interação e ubiquitinação *in vivo* de β -TrCP por Fbxo7;
- Avaliar a estabilidade de β -TrCP *in vivo*;
- Avaliar os níveis totais de β -catenina quando em superexpressão de Fbxo7;
- Avaliar o tráfego intracelular de GSK3 β quando em co-expressão com Fbxo7.

3. Metodologia

3.1. Obtenção das mutações pontuais em GSK3 β

Com a intenção de observar se os resíduos de lisinas K292, K297 e K303 estavam sendo ubiquitinados por SCF(Fbxo7) desenhamos *primers* para produzir mutações pontuais no gene de GSK3 β , trocando estes resíduos por arginina, a fim de obter a enzima com a dupla (K292R, K297R) e a tripla mutações (K292R, K297R e K303R). O esquema de desenho dos *primers* para produzir as mutações está descrito na **Figura 4**.

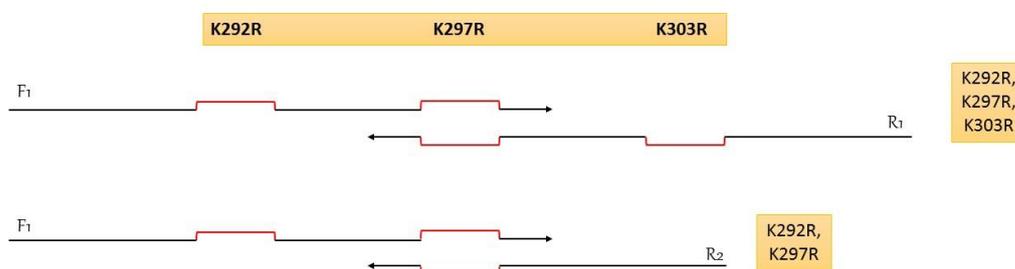


Figura 4: Esquema para desenho dos *primers* a fim de gerar as mutações pontuais nos resíduos de lisina (K) na sequência de GSK3 β . Os destaques são as regiões dos *primers* com mutações. Os *primers forward* estão nomeados em F e os *reverse* em R.

O desenho dos *primers* foi feito baseado em uma estratégia previamente descrita (LIU; NAISMITH, 2008) baseado em duas regiões: uma de sobreposição entre os dois *primers* de cada reação (*overlapping*) e uma que não se sobrepõe, em cada um deles (*nonoverlapping*), com uma diferença de 10 °C na temperatura de *melting* (T_m) entre as duas, sendo que a região não-sobreposta possui um T_m mais alto; assim, se evita dimerização inespecífica entre o par de *primers*. Por fim, como esquematizado na **Figura 4**, as mutações estão presentes tanto nas regiões de *overlapping* e *nonoverlapping* dos *primers*. A sequência dos *primers* está descrita na **Tabela 1**.

Tabela 1: Nome e sequência dos *primers* desenhados para mutações em GSK3 β , com destaque em vermelho para as regiões das mutações.

NOME	SEQUÊNCIA 5'-3'
F1 – K292/297R	5' CAGAATTTAGATTCCCTCAAATTAGAGCAC 3'
R1 – K297/303R	5' GACTCTAGTCCAAGGATGTGCTCTAATTTG 3'
R2 – K297R	5' CCTTAGTCCAAGGATGTGCTCTAATTTG 3'

As PCRs utilizaram como DNA molde a construção pcDNA3-GSK3 β -HA. Para garantir que as mutações fossem inseridas corretamente e evitar outras mutações, utilizamos a *Phusion Flash PCR Master Mix* (#F548S, Thermo Scientific), uma polimerase de alta fidelidade. O protocolo para o preparo da PCR está descrito na **Tabela 2** e as condições da PCR na **Tabela 3**.

Tabela 2: Protocolo da PCR.

Master Mix 2x	12,5 μ L
DNA molde	10 ng
<i>Primer F</i>	67,5 ng
<i>Primer R</i>	67,5 ng
Água	qsp 25,0 μ L

Tabela 3: Ciclagem da PCR.

$^{\circ}$ C	Tempo (s)	Ciclos
95	120	1
95	20	
55	10	25x
72	15/kb DNA	
72	300	1
4	∞	1

Após confirmada amplificação de um fragmento no tamanho esperado por meio de gel de agarose – correspondente a soma do tamanho do inserto e do vetor, já que neste protocolo o plasmídeo é amplificado por completo –, o volume total do produto da PCR foi tratado com *DpnI* (#ER1701, Thermo Scientific), para digestão de DNA metilado na amostra

(no caso, o DNA utilizado como molde da reação), por 1h a 37 °C, com posterior inativação da enzima a 80 °C por 15 minutos.

O DNA amplificado foi então transformado em 50 µL de bactérias *E. coli* DH5α quimiocompetentes (produzidas no laboratório) por meio de choque térmico. Após adição do DNA à solução bacteriana, foi feita incubação desta por 30 minutos no gelo, com choque a 42 °C por 1 minuto e gelo novamente por 2 min, com posterior adição de 800 µL de meio LB (L3022, 20 g/L, Sigma) e agitação rotacional a 250 rpm a 37 °C por 1h. Finalmente, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante vertido, restando cerca de 10% do volume para ressuspensão das células e espalhamento destas em placas de Petri contendo meio LB-ágar e ampicilina como marcador de seleção (100 µg/mL), as quais foram deixadas *overnight* a 37 °C.

A partir das placas que continham colônias crescidas, foram selecionadas algumas isoladas e feito o inóculo em meio líquido LB contendo ampicilina, crescidas *overnight* a 37 °C/250 rpm, com posterior extração do DNA plasmidial com o QIAprep Spin Miniprep Kit (27106, Qiagen). O DNA isolado foi quantificado e 800 ng de cada um foram digeridos com as enzimas flanqueadoras do inserto: *EcoRI* (#ER0271, Thermo Scientific) e *XbaI* (#ER0681, Thermo Scientific) segundo as indicações do fabricante.

As amostras foram aplicadas em gel de agarose e aquelas que mostraram duas bandas após a digestão, uma na altura esperada do vetor pcDNA3 e outra na altura do inserto relativo ao gene da GSK3β, foram enviadas para sequenciamento no Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) utilizando os *primers* T7f e SP6r.

Após o retorno dos dados, aquelas que tiveram a inserção das mutações confirmadas foram digeridas mais uma vez com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* e a banda relativa ao gene da GSK3β foi excisada do gel e purificada com o QIAquick Gel Extraction Kit (28706, Qiagen). Em paralelo, também foi feito o mesmo procedimento com o vetor pcDNA3 vazio. Com os dois fragmentos purificados, realizamos reação de ligação entre eles com a enzima T4 DNA Ligase (#EL0014, Thermo Scientific), segundo indicações do fabricante, e transformação em DH5α.

As colônias crescidas tiveram o DNA plasmidial purificado e, assim que confirmada via digestão a presença das bandas relativas ao gene da GSK3β e do pcDNA3, as amostras foram utilizadas nos experimentos posteriores.

3.2. Análise *in silico* das mutações K292/297/303R em GSK3 β

Em paralelo aos ensaios *in vivo*, fizemos a análise *in silico* das mutações nos três sítios de lisina de GSK3 β , em comparação com a forma selvagem da proteína, pelo *software* I-TASSER, o qual é alimentado pela estrutura primária de proteínas e faz a modelagem da estrutura terciária por homologia com as estruturas primárias de um banco de dados (ZHANG, 2008). Assim, pudemos observar se as mutações pontuais que geramos causaram modificações estruturais em GSK3 β que pudesse auxiliar a entender os resultados dos experimentos de interação e ubiquitinação *in vivo*.

3.3. Ensaio de ubiquitinação *in vivo* de GSK3 β por SCF(Fbxo7)

Visando avaliar se as formas K292/297R e K292/297/303R de GSK3 β apresentam diferença no perfil de ubiquitinação *in vivo* em comparação a forma selvagem, fizemos a co-expressão de Fbxo7 e das duas formas mutadas de GSK3 β utilizando como controle a forma selvagem da proteína, que já foi descrita como alvo de ubiquitinação de SCF(Fbxo7) (TEIXEIRA et al., 2016).

Da mesma forma, avaliamos também os perfis de ubiquitinação por SCF(Fbxo7) de outros dois mutantes de GSK3 β : no resíduo de serina na posição 9 (GSK3 β -S9A) e no resíduo de tirosina na posição 216 (GSK3 β -Y216F).

O desenho racional dos experimentos está presente na **Tabela 4** e na **Tabela 5**.

Tabela 4: Desenho experimental de transfecção de 3 placas de 100mm para avaliação da ubiquitinação das formas mutantes de GSK3 β nos resíduos de lisina 292, 297 e 303.

Plasmídeos	1	2	3
Fbxo7-2xFLAG	+	+	+
GSK3 β -HA	+	-	-
GSK3 β -K292R/297R-HA	-	+	-
GSK3 β -K292R/K297R/K303R-HA	-	-	+
Ubiquitina-MYC	+	+	+

Tabela 5: Desenho experimental de transfecção de 9 placas de 100mm para para avaliação da ubiquitinação das formas mutantes S9A e Y216F de GSK3 β .

Plasmídeos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pcDNA3 (vetor vazio)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Fbxo7-2xFLAG	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Fbxo7-ΔF-2xFLAG	-	-	+	-	-	+	-	-	+
GSK3β-HA	+	+	+	-	-	-	-	-	-
GSK3β-S9A-HA	-	-	-	+	+	+	-	-	-
GSK3β-Y216F-HA	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Ub-myc	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Células HEK293T foram cultivadas em placas de Petri (100x20 mm, #430167, Corning) contendo meio DMEM (SH30022, HyClone™, GE HealthCare) – suplementado com soro fetal bovino (10% v/v, 12657029, Gibco™, Thermo Scientific), piruvato de sódio (SH30239.01, HyClone™, GE Healthcare) e penicilina/streptomicina/glutamina (10378016, Gibco™, Life Technologies) – em incubadora a 37 °C com atmosfera úmida de 5% CO₂. Para a transfecção, foram utilizados 3 μ g de DNA de cada construção. O DNA foi diluído em meio incompleto, ao qual foi adicionado PEI (polietilenoimina, 1 mg/mL pH 7,2, numa relação 3 μ L PEI:1 μ g DNA). A solução foi agitada por 10 segundos, mantida por 15 minutos a temperatura ambiente e posteriormente o volume total de cada reação foi adicionado a placa. Após 5h o meio foi trocado por completo e as placas foram mantidas por 48h a 37 °C/5% CO₂.

As células foram então tratadas por 6h com inibidor de proteassoma MG-132 (10 μ M, diluído em meio completo, conforme TEIXEIRA et al., 2016) para evitar que alvos ubiquitinados fossem degradados pelo proteassoma. Após as 6h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 500 x g/5 minutos e ressuspensas em 250 μ L de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 225 mM KCl, 1% NP-40 – contendo inibidores de fosfatases NaF e Na₃VO₄ e coquetel de inibidores de proteases SIGMAFAST – S8820, Sigma), sendo mantidas por 30 minutos em gelo, com posterior centrifugação a 16900 x g/20 minutos/4 °C e recolhimento do sobrenadante, onde se encontravam as proteínas totais extraídas (input).

As amostras foram quantificadas por reagente de Bradford (B1916, Sigma Aldrich) e as mesmas quantidades de proteínas foram imunoprecipitadas – ao mínimo 1 mg de proteína total – com resina EZview™ Red Anti-HA Affinity Gel (E6779, Sigma). Para a imunoprecipitação (IP), a resina foi lavada com tampão de lise previamente e alíquotada

para que cerca de 15 μ L da resina fosse utilizada por placa de 100x20 mm. A mesma quantidade de proteína total foi adicionada em cada amostra a ser imunoprecipitada e a IP foi mantida por 3h sob agitação rotacional a 4 °C.

Após o período, a resina de cada amostra foi centrifugada, o sobrenadante foi retirado e elas foram lavadas por 4 vezes com tampão de lise, posteriormente mais 2 vezes com o tampão de eluição (10 mM HEPES pH 7,9, 225 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ e 0,1% Tergitol). Ao fim, a eluição foi feita se adicionando 300 μ g/mL do peptídeo HA (I2149, Sigma) ao tampão de eluição e mantendo a amostra por 1h a 4 °C. As resinas foram então centrifugadas e o sobrenadante coletado, contendo a amostra purificada (eluído).

O input e o eluído de todas as amostras foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Os anticorpos utilizados nas análises foram anti-myc (#2272, Cell Signaling, diluição 1:1000), anti-HA (#3724, Cell Signaling, diluição 1:1000), anti-Fbxo7 (ARP43128_P050, Aviva Systems Biology, diluição 1:2000; e SAB1407251, Sigma, diluição 1:1000), anti-GAPDH (G8795, Sigma, diluição 1:10000) e anti-actina (A3853, Sigma, diluição 1:5000).

3.4. Ensaio de interação entre Fbxo7 e GSK3 β *in vivo*

A fim de garantir que os resultados obtidos no ensaio de ubiquitinação realmente são efeitos da interação de Fbxo7 com as diferentes variantes de GSK3 β , realizamos um ensaio de interação *in vivo* entre elas, purificando Fbxo7 do extrato proteico total da célula e identificando a presença de GSK3 β no extrato purificado. Para isto, desenhamos os experimentos como mostrados nas **Tabelas 6 e 7**.

Tabela 6: Esquema de transfecção de 3 placas de 100mm para para avaliação de interação *in vivo* entre Fbxo7 e o mutante de GSK3 β no resíduo de lisina.

Plasmídeos	1	2	3
pcDNA3	+	-	-
Fbxo7-2xFLAG	-	+	+
GSK3 β -HA	-	+	-
GSK3 β -K292/297/303R-HA	+	-	+

Tabela 7: Desenho experimental de transfecção de 8 placas de 100mm para avaliação da interação *in vivo* entre Fbxo7 e os mutantes de fosforilação de GSK3 β .

Plasmídeos	1	2	3	4	5	6	7	8
pcDNA3	+	-	+	-	+	-	+	-
Fbxo7-2xFLAG	-	+	-	+	-	+	-	+
GSK3 β -HA	+	+	-	-	-	-	-	-
GSK3 β -K292/297/303R-HA	-	-	+	+	-	-	-	-
GSK3 β -S9A-HA	-	-	-	-	+	+	-	-
GSK3 β -Y216F-HA	-	-	-	-	-	-	+	+

O cultivo celular, transfecções e obtenção dos extratos proteicos totais foram realizados como no item 3.3. Para purificação da proteína Fbxo7-2xFLAG, realizamos a imunoprecipitação (IP) com a resina ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (#A2220, Sigma) da seguinte forma: a resina foi lavada com tampão de lise previamente e alíquotada para que cerca de 15 μ L da resina fosse utilizada por placa de 100x20 mm. A mesma quantidade de proteína total – ao mínimo 1 mg de proteína total – foi adicionada em cada amostra a ser imunoprecipitada e a IP foi mantida por 3h sob agitação rotacional a 4 °C.

Após o período, a resina de cada amostra foi centrifugada, o sobrenadante retirado e lavadas 4 vezes com tampão de lise e mais 2 vezes com o tampão de eluição. Ao fim, a eluição foi feita com 300 μ g/mL do peptídeo FLAG (F3290, Sigma) diluído em tampão de eluição e mantendo a amostra por 1h a 4 °C. As resinas foram então centrifugadas e o sobrenadante coletado, contendo a amostra purificada (eluído).

O input e o eluído de todas as amostras foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Os anticorpos utilizados nas análises foram anti-HA (#3724, Cell Signaling, diluição 1:1000), anti-Fbxo7 (ARP43128_050, Aviva Systems Biology, diluição 1:2000; e SAB1407251, Sigma, diluição 1:1000), anti-actina (A3853, Sigma, diluição 1:5000) e anti- β -actina (MAB1501, Merck Millipore, diluição 1:10000).

3.5. Ensaio de co-localização de Fbxo7 e GSK3 β ou GSK3 β -K292/297/303R

Para visualizar a interação entre as duas proteínas diretamente na célula, realizamos co-expressão das versões selvagem e mutante de GSK3 β com Fbxo7 para análise de co-localização.

Células HEK293T foram semeadas em placas de 4 poços por cima de lamínulas de vidro, num total de 5×10^4 células por poço, e transfectadas com 800 ng totais de DNA, divididos igualmente, de Fbxo7-2xFLAG e GSK3 β -HA (ou GSK3 β -K292R/K297R/K303R-HA) utilizando-se Lipofectamine™ 2000 (11668-027, Thermo Scientific), segundo recomendações do fabricante.

Após 48h, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de fixação (0,5% Triton X-100, 4% paraformaldeído em PBS) por 10 minutos a temperatura ambiente; em seguida foram lavadas 3x 5 minutos com PBS e foram bloqueadas com BSA 2% por 1h. Posteriormente foram incubadas com anticorpos primários anti-GSK3 β (#9832, Cell Signaling) e anti-Fbxo7 (ARP43128_050, Aviva Systems Biology), ambos em diluição 1:100 em BSA 2%/PBS, por 1h a temperatura ambiente.

Feito um novo ciclo de lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpos secundários Alexa Fluor (Thermo Scientific), diluídos na concentração 1:600 em BSA 2%/PBS: *donkey-anti-mouse* (DAM) 488, contra anti-GSK3 β , e *goat-anti-rabbit* (GAR) 594, contra anti-Fbxo7. Novamente foi feito um ciclo de lavagens com PBS e as lâminas foram montadas com ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (P36962, Thermo Scientific). As análises foram realizadas utilizando o microscópio confocal Leica SP5 do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP).

3.6. Ensaio de interação e ubiquitinação *in vivo* de β -TrCP

O trabalho que caracterizou GSK3 β como substrato de SCF(Fbxo7) (TEIXEIRA et al., 2016) também obteve dados mostrando que β -TrCP é um potencial substrato do mesmo complexo. O trabalho de TEIXEIRA et al. (2016) também fez um mapeamento na interação de Fbxo7 com GSK3 β , mostrando que se dá por meio da sua região N-terminal. Assim, no ensaio de interação que realizamos, utilizamos 4 diferentes construções de Fbxo7 para tentar identificar se e qual região seria a responsável pela interação com β -TrCP (**Tabela 8**). Para avaliar se este Fbxo7 era capaz de ubiquitinar β -TrCP *in vivo*, desenhamos o experimento conforme a **Tabela 9**.

Tabela 8: Desenho experimental de transfecção de 5 placas de 100mm para avaliar interação entre Fbxo7 e β -TrCP.

Plasmídeos	1	2	3	4	5
pcDNA3	+	-	-	-	-
Fbxo7-2xFLAG	-	+	-	-	-
Fbxo7-(129-522)-2xFLAG	-	-	+	-	-
Fbxo7-(1-398)-2xFLAG	-	-	-	+	-
Fbxo7-(89-398)-2xFLAG	-	-	-	-	+
β -TrCP-HA	+	+	+	+	+

Tabela 9: Desenho experimental de transfecção de 3 placas de 100mm para ensaio de ubiquitinação *in vivo* de β -TrCP por Fbxo7.

Plasmídeos	1	2	3
pcDNA3	+	-	-
Fbxo7-2x-FLAG	-	+	-
Fbxo7- Δ F-2xFLAG	-	-	+
β -TrCP-HA	+	+	+
Ub-myc	+	+	+

Os experimentos foram realizados em células HEK293T, cultivadas da mesma forma como descrito em 3.3. Para as transfecções, foram utilizados 10 μ g totais de DNA divididos de forma equivalente entre as construções no ensaio de interação; para a ubiquitinação, 3 μ g de DNA de cada construção foi utilizado em cada grupo experimental.

As condições de transfecção, lise celular e imunoprecipitação utilizadas foram as mesmas descritas em 3.3 – para ubiquitinação – e 3.4 – para interação. Os extratos totais e purificados obtidos foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Os anticorpos utilizados nas análises foram anti-HA (#3724, Cell Signaling, diluição 1:1000), anti-Fbxo7 (SAB1407251, Sigma, diluição 1:1000), anti-myc (#2272, Cell Signaling, diluição 1:1000) e anti-actina (A3853, Sigma, diluição 1:5000).

3.7. Ensaio de estabilidade *in vivo* de GSK3 β e β -TrCP

Tendo em vista os resultados obtidos de interação e ubiquitinação *in vivo* de Fbxo7 com GSK3 β e β -TrCP, realizamos um ensaio para observar se GSK3 β e β -TrCP têm padrão

diferenciado de estabilidade proteica quando em co-expressão de Fbxo7 ou Fbxo7- Δ F-box. O desenho experimental é apresentado em **Tabela 10, 11, 12 e 13.**

Tabela 10: Esquema de transfecção de 6 poços para ensaio de estabilidade de GSK3 β .

CHX (h)	0		2		4	
Plasmídeos	1	2	3	4	5	6
Fbxo7-2xFLAG	+	-	+	-	+	-
Fbxo7-ΔF-2xFLAG	-	+	-	+	-	+
GSK3β-HA	+	+	+	+	+	+

Tabela 11: Esquema de transfecção de 6 poços para ensaio de estabilidade de GSK3 β -S9A.

CHX (h)	0		2		4	
Plasmídeos	1	2	3	4	5	6
Fbxo7-2xFLAG	+	-	+	-	+	-
Fbxo7-ΔF-2xFLAG	-	+	-	+	-	+
GSK3β-S9A-HA	+	+	+	+	+	+

Tabela 12: Esquema de transfecção de 6 poços para ensaio de estabilidade de GSK3 β -Y216F.

CHX (h)	0		2		4	
Plasmídeos	1	2	3	4	5	6
Fbxo7-2xFLAG	+	-	+	-	+	-
Fbxo7-ΔF-2xFLAG	-	+	-	+	-	+
GSK3β-Y216F-HA	+	+	+	+	+	+

Tabela 13: Esquema de transfecção de 6 poços para ensaio de estabilidade de β -TrCP.

CHX (h)	0		2		4	
Plasmídeos	1	2	3	4	5	6
Fbxo7-2xFLAG	+	-	+	-	+	-
Fbxo7-ΔF-2xFLAG	-	+	-	+	-	+
β-TrCP-HA	+	+	+	+	+	+

Os experimentos foram realizados em células U2OS, cultivadas nas mesmas condições apresentadas em **3.3**, apenas com a diferença que foram semeadas em placas de 6 poços (#3506, Corning). Cada poço da placa foi transfectado com 1 µg de DNA de cada construção, se adicionando o DNA a meio incompleto, ao qual posteriormente foi adicionado PEI (para essa linhagem celular, proporção 2,5 µL PEI:1 µg DNA). A solução foi agitada por 10 segundos e mantida 15 minutos a temperatura ambiente, sendo então adicionada aos poços onde eram cultivadas as células. O meio foi completamente trocado após 4h e as placas foram mantidas por 48h a 37 °C/5% CO₂.

As células foram submetidas a meio com privação de soro fetal bovino (0 % FBS) por 12h, se iniciando 8h antes do primeiro tratamento com cicloheximida (CHX, 40 µg/mL, C1988, Sigma), que foi realizado de acordo com os tempos indicados nas tabelas acima. Passado o tratamento, as células foram tripsinizadas e lisadas com cerca de 50 µL de tampão de lise (acrescido dos inibidores de fosfatase NaF e Na₃VO₄ e coquetel de inibidores de protease SIGMAFAST – S8820, Sigma) por 30 minutos em gelo; a solução foi então centrifugada a 16900 x g/20 minutos/4 °C e o sobrenadante foi recolhido como o extrato proteico.

Todos os extratos foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Os anticorpos utilizados foram anti-HA (#3724, Cell Signaling, diluição 1:1000), anti-Fbxo7 (SAB1407251, Sigma, diluição 1:1000), anti-actina (A3853, Sigma, diluição 1:5000) e anti-Akt (#4691, Cell Signaling, diluição 1:1000).

3.8. Avaliação dos níveis celulares totais de β-catenina

Investigamos se a superexpressão de Fbxo7 é capaz de alterar os níveis totais de β-catenina e, para isso, realizamos os experimentos esquematizados na **Tabela 14**. O cultivo celular de células HEK293T, transfecções e obtenção dos extratos proteicos totais foram realizados conforme item **3.7**. Os extratos foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Os anticorpos utilizados nas análises foram anti-β-catenina (#9562, Cell Signaling, diluição 1:1000), anti-Fbxo7 (SAB1407251, Sigma, diluição 1:1000) e anti-actina (A3853, Sigma, diluição 1:5000).

Tabela 14: Esquema de transfecção de 3 placas de 100mm para avaliação dos níveis totais de β -catenina.

Plasmídeos	1	2	3
pcDNA3	+	-	-
Fbxo7-2xFLAG	-	+	-
Fbxo7-ΔF-2xFLAG	-	-	+

3.9. Avaliação do tráfego intracelular de GSK3 β

Visando avaliar se a interação de GSK3 β com Fbxo7 é um dos estímulos responsáveis pela sua inibição com consequente mudança de localização subcelular, utilizamos células U2OS transfectadas conforme condições apresentadas na **Tabela 15** realizadas em triplicata.

Tabela 15: Esquema de transfecção de 2 placas de 100mm para avaliação do tráfego intracelular de GSK3 β .

Plasmídeos	1	2
Fbxo7-2xFLAG	+	-
Fbxo7-ΔF-2xFLAG	-	+
GSK3β-HA	+	+

As células foram cultivadas nas mesmas condições descritas no item **3.3**. Para a transfecção, 10 μ g de DNA total foi utilizado por placa, sendo utilizadas quantidades equivalentes de cada construção. O DNA foi diluído em meio incompleto, ao qual foi adicionado PEI (2,5 μ L PEI:1 μ g DNA). A solução foi agitada por 10 segundos, mantida por 15 minutos a temperatura ambiente e posteriormente o volume total de cada reação foi adicionado a placa. Após 4h, o meio foi trocado por completo e as placas foram mantidas por 48h a 37 °C/5% CO₂.

O enriquecimento das frações celulares foi realizado segundo protocolos previamente descritos (HOLDEN; HORTON, 2009; BAGHIROVA et al., 2015). As células foram tripsinizadas e centrifugadas a 500 x g/5min, sendo posteriormente lavadas e lisadas com 400 μ L do tampão 1 (150 mM NaCl, 50 mM, HEPES pH 7,4 e 50 μ g/mL digitonina – D141, Sigma) por 10 minutos em agitação rotacional, com posterior centrifugação a 2000 x

g/10 minutos/4 °C com recolhimento do sobrenadante (fração citosólica – C). O *pellet* foi solubilizado em vórtex com 400 µL do tampão 2 (150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,4 e 1% NP-40) e mantido por 30 minutos no gelo com posterior centrifugação a 7000 x g/10 minutos/4 °C, com recolhimento do sobrenadante (fração de membrana – M). A todos os tampões foi adicionado coquetel de inibição de proteases SIGMAFAST – S8820, Sigma – e inibidores de fosfatases (NaF 10 mM, Na₃VO₄ 10 mM). Todas as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford, resolvidas por SDS-PAGE e analisadas por *Western Blot*. Os anticorpos utilizados nas análises foram anti-GSK3β (#9832, Cell Signaling, diluição 1:1000), anti-Rab7 (#9367, Cell Signaling, diluição 1:1000), anti-Fbxo7 (SAB1407251, Sigma, diluição 1:1000), anti-Akt (#4691, Cell Signaling, diluição 1:1000) e anti-Grp75 (#3593, Cell Signaling, diluição 1:1000).

A fim de confirmar que um dos nossos marcadores utilizados de fração membrana se encontra *in vivo* apenas em organelas membranares intracelulares, cultivamos células U2OS e fizemos marcação de imunofluorescência da mesma forma como em 3.5. As células foram marcadas com anticorpo anti-Grp75 (#3593, Cell Signaling, diluição 1:50) e com anticorpo secundário GAR 594 (anti-*rabbit*). Após preparação das lâminas, as células foram observadas em microscópio BX50F (Olympus) com câmera DP72 (Olympus), com filtros de fluorescência DAPI (372-456 nm) e Cy3/Rhodamine (560-580 nm).

4. Resultados

4.1. Inserção das mutações pontuais em GSK3 β nos resíduos K292, K297 e K303

Com o intuito de identificar os sítios de ubiquitinação deste substrato, inserimos mutações pontuais nestes resíduos de lisina por arginina, conservando a característica básica do aminoácido.

A partir do molde GSK3 β -HA, realizamos em paralelo as PCRs com os pares de *primer* F1/R1 e F1/R2 para produzir, respectivamente, GSK3 β -K292/297/303R-HA e GSK3 β -K292/297R-HA. O produto das PCRs transformado em bactéria gerou colônias que foram utilizadas para isolamento de DNA plasmideal. Uma fração deste foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* e foi possível observar a presença de duas bandas nas alturas esperadas para o pcDNA3 e para o gene da GSK3 β (**Figura 4**). Os produtos derivados das colônias marcadas com asterisco foram sequenciados, evidenciando apenas a forma com duas mutações pontuais a partir da amplificação com os *primers* F1/R2 (alinhamento entre GSK3 β -HA e GSK3 β -K292/297R-HA representado na **Figura 5**), enquanto o sequenciamento do DNA gerado com a amplificação dos *primers* F1/R1 não gerou nenhum dado resultante.

No intuito de obter a forma triplo mutante (GSK3 β -K292/297/303R-HA), refizemos a PCR com o par F1/R1 utilizando GSK3 β -K292/297R-HA como DNA molde, já que dessa forma seria necessária a inserção de apenas mais uma mutação pontual para conseguirmos o triplo mutante. Após amplificação e transformação, a digestão do DNA plasmideal obtido mostrou a presença das duas bandas nas alturas esperadas para o gene da GSK3 β -K292/297/303R-HA e o pcDNA3 (**Figura 6**). O sequenciamento das colônias destacadas demonstrou que obtivemos o triplo mutante GSK3 β -K292/297/303R-HA (**Figura 7**).

As duas formas mutadas de GSK3 β foram posteriormente subclonadas a um pcDNA3 vazio, para evitar que quaisquer mutações inseridas ao acaso na sequência do vetor amplificado na primeira reação de PCR pela enzima *Phusion* pudessem interferir nos ensaios subsequentes de transfecção celular.

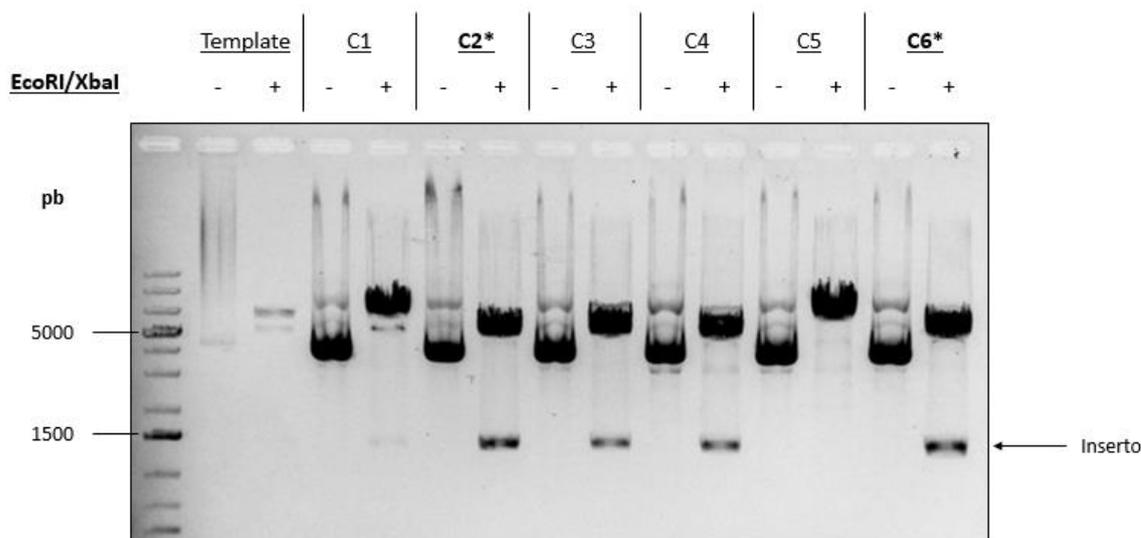


Figura 4: Digestão (*EcoRI/XbaI*) do plasmídeo amplificado com o par de *primers* F1/R2, a fim de produzir GSK3 β -K292R/K297R-HA. *Template* indica o vetor utilizado como DNA molde para a PCR, GSK3 β -HA. As colônias com nome em negrito e marcadas com asterisco foram enviadas para sequenciamento.

GSK3b_K292RK297R_HA	SAGCVLAELLLGQPIFPGDSGVDQLVEI IKVLGTPTRQIREMNPNYTEFRFPQIRAHPW	239
GSK3b_HA	SAGCVLAELLLGQPIFPGDSGVDQLVEI IKVLGTPTRQIREMNPNYTEFKFPQIRAHPW	300

GSK3b_K292RK297R_HA	TKVFRPRTPEAIALCSRLLEYTPARLTPLEACAHSAFFDEL RDPNVKLPNGRDTPALFN	299
GSK3b_HA	TKVFRPRTPEAIALCSRLLEYTPARLTPLEACAHSAFFDEL RDPNVKLPNGRDTPALFN	360

GSK3b_K292RK297R_HA	FTTQELSSNPPLATILIPPHARIQAAASTPTNATAASDANTGDRGQTNNAASASASNSTS	359
GSK3b_HA	FTTQELSSNPPLATILIPPHARIQAAASTPTNATAASDANTGDRGQTNNAASASASNSTS	420

GSK3b_K292RK297R_HA	YPYDVPDYASLGGPN*YSPDGPLESSIAF*	387
GSK3b_HA	YPYDVPDYASLGGPN-----	435

Figura 5: Alinhamento entre as sequências de resíduos de aminoácidos de GSK3 β -HA e da tradução do sequenciamento obtido pela amplificação com F1/R2 da amostra C2, em que foi produzida a versão GSK3 β -K292/297R-HA. Os quadros vermelhos indicam a mutação, onde o resíduo de lisina (K) foi substituído pelo de arginina (R).

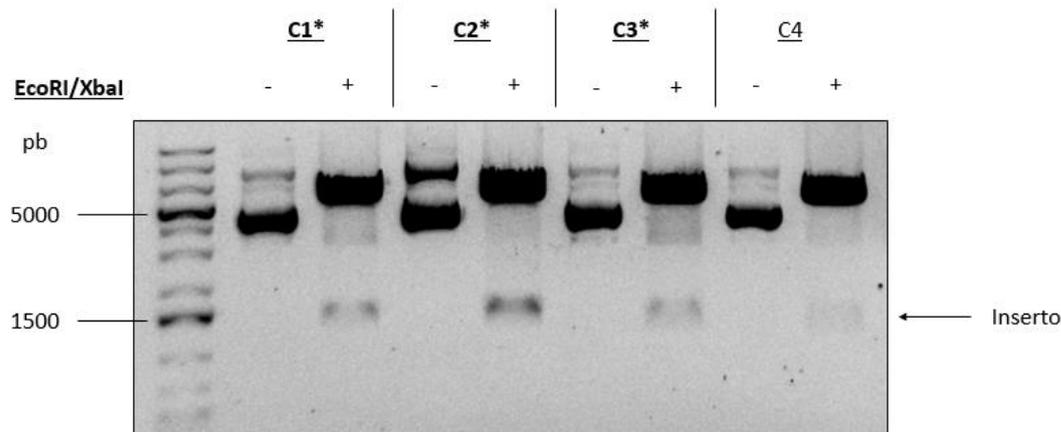


Figura 6: Digestão (*EcoRI/XbaI*) do plasmídeo amplificado com o par de *primers* F1/R1, a fim de produzir GSK3 β -K292R/K297R/K303R-HA. O vetor utilizado como DNA molde para a PCR foi GSK3 β -K292R/K297R-HA. As colônias com nome em negrito e marcadas com asterisco foram enviadas para sequenciamento.

GSK3b_HA	WSAGCVLAELLLGQIFPGDSGVDLVEIISKVLGTPTREQIREMNPNYTEKFPQIKAHP	300
GSK3b_K292RK297RK303R_HA	-----MNPNYTEFRFPQIRAHF	17
	*****:****:****	
GSK3b_HA	WTKVFRPRTPEAIALCSRLLEYTPARLTPLEACAHSFFDELRDPIWVKLPNGRDTPALF	360
GSK3b_K292RK297RK303R_HA	WTRVFRPRTPEAIALCSRLLEYTPARLTPLEACAHSFFDELRDPIWVKLPNGRDTPALF	77
	*..*****	
GSK3b_HA	NFTTQELSSNPPLATILIPPHARIQAAASTPTNATAASDANTGDRGQTNNAAASASASNST	420
GSK3b_K292RK297RK303R_HA	NFTTQELSSNPPLATILIPPHARIQAAASTPTNATAASDANTGDRGQTNNAAASASASNST	137

GSK3b_HA	SYPYDVPDYASLGGPN* 436	
GSK3b_K292RK297RK303R_HA	SYPYDVPDYASLGGPN* 153	

Figura 7: Alinhamento entre as sequências de resíduos de aminoácidos de GSK3 β -HA e da tradução do sequenciamento obtido pela amplificação com F1/R1 da amostra C3 a partir de molde GSK3 β -K292/297R-HA, em que foi produzida a versão GSK3 β -K292/297/303R-HA. Os quadros vermelhos indicam as mutações, onde os resíduos de lisina (K) foram substituídos por arginina (R).

4.2. As mutações em K292, K297 e K303 não alteram a estrutura de GSK3 β

Mutações sítio-específicas em resíduos de lisina para identificação dos sítios de modificação pós-traducional são realizados pela substituição por uma arginina por terem características químicas similares, mantendo as funções locais na estrutura da proteína modificada. Uma notável diferença é que argininas não são sítios de ubiquitinação por não possuírem o grupo amino livre em seu radical.

Com objetivo de avaliar se as mutações K292R, K297R e K303R inseridas em GSK3 β alteravam sua estrutura tridimensional e consequentemente sua interação com

Fbxo7, realizamos análises de predição estrutural *in silico* utilizando o *software* I-TASSER (ZHANG, 2008). Este programa utiliza a estrutura tridimensional de GSK3 β depositada no PDB com código 4J1R (**Figura 8**) como modelo para gerar a estrutura do triplo mutante. Os resultados mostraram que a alteração na estrutura primária não levou a mudanças significativas na estrutura geral de GSK3 β (**Figura 9**).

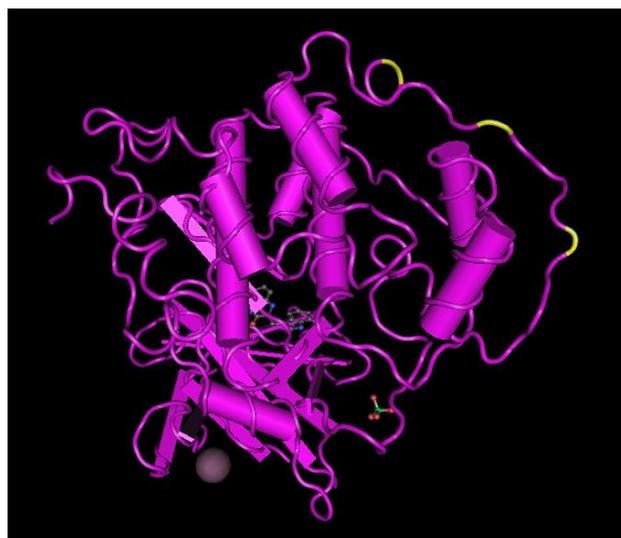


Figura 8: Estrutura de GSK3 β disponível no PDB, com número de acesso 4J1R. Os resíduos destacados em amarelo são os resíduos 292, 297 e 303.

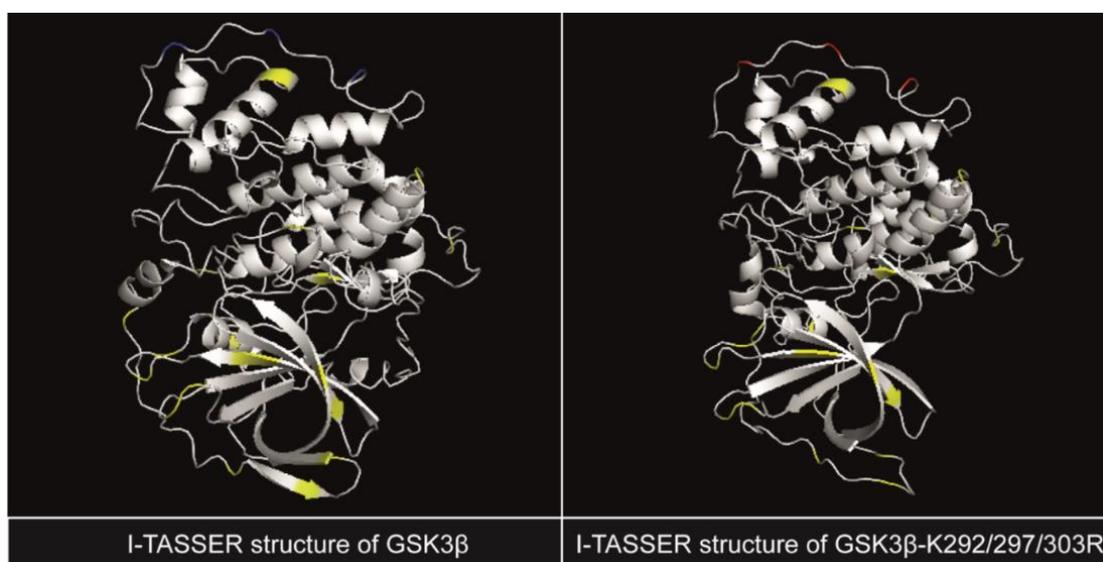


Figura 9: Resultados retornados pelo software I-TASSER com a predição estrutural das versões nativa e mutada de GSK3 β . Em destaque para os resíduos de lisinas em azul na estrutura nativa de GSK3 β e em vermelho na estrutura da versão mutada, as argininas que foram inseridas.

4.3. As mutações em GSK3 β alteram o seu perfil de interação e ubiquitinação por Fbxo7

Para avaliar se as mutações na sequência de GSK3 β alteravam o padrão de interação com Fbxo7, realizamos ensaios de co-imunoprecipitação *in vivo* entre Fbxo7 e as diferentes formas de GSK3 β . Os resultados mostraram que a GSK3 β -K292R/K297R/K303R teve um leve aumento no extrato purificado com Fbxo7 em comparação a versão selvagem de GSK3 β , sugerindo um aumento no nível de interação entre as duas proteínas (**Figura 10**).

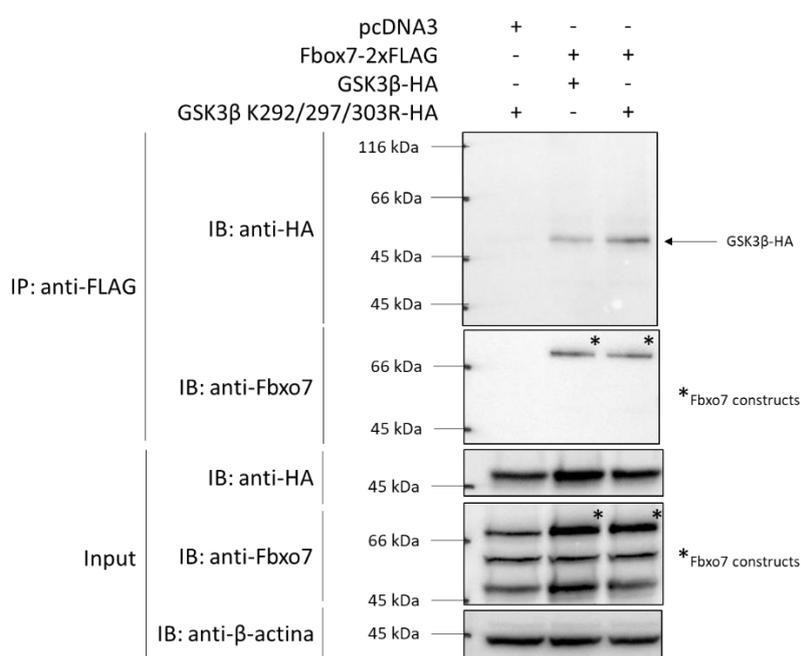


Figura 10: Ensaio de interação *in vivo* entre Fbxo7 e GSK3 β ou GSK3 β -K292/297/303R. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos acima e a IP foi realizada com resina agarose anti-FLAG. Extrato total (*Input*) e eluídos foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos utilizados estão indicados, assim como o padrão de massa molecular.

Para validar a interação observada por *western blot*, realizamos análise de colocalização entre Fbxo7 e GSK3 β -K292/297/303R ou a forma selvagem por microscopia confocal. Os dados mostraram que tanto a GSK3 β quanto GSK3 β -K292R/K297R/K303R se encontram predominantemente no citoplasma celular colocalizando com Fbxo7 (**Figura 11**).

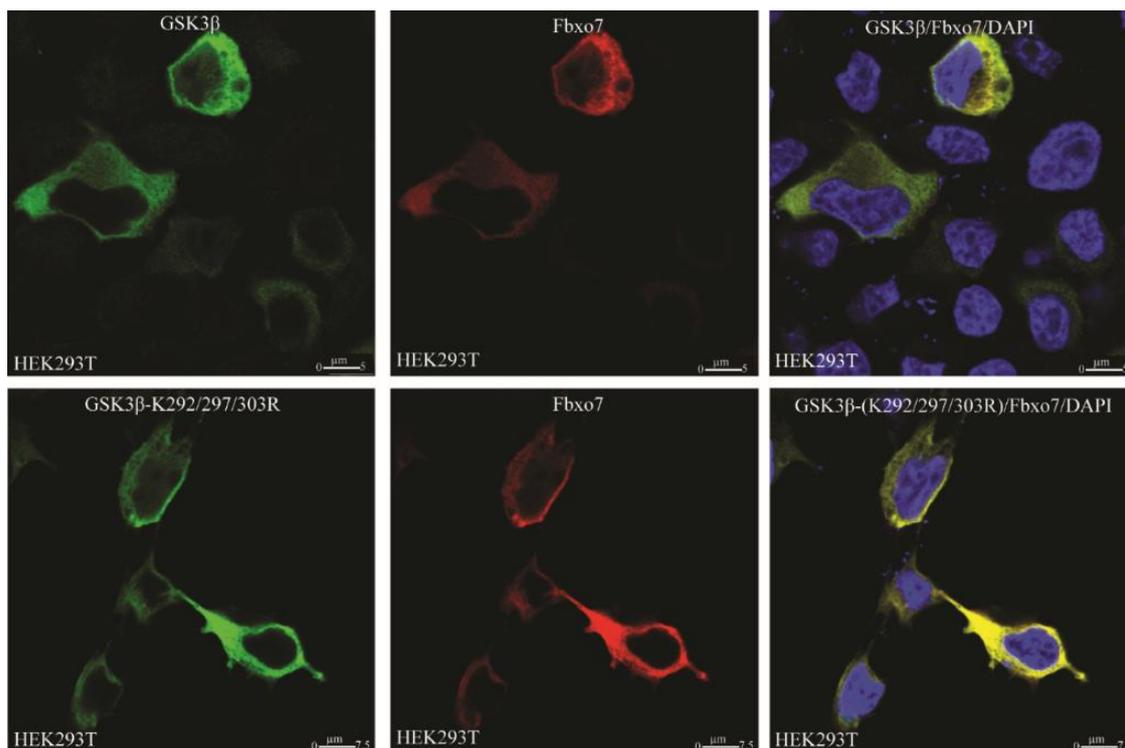


Figura 11: Colocalização entre Fbxo7 e GSK3 β selvagem ou GSK3 β triplo mutante. Células HEK293T foram transfectadas com Fbxo7-2xFLAG e GSK3 β -HA ou GSK3 β -K292R/K297R/K303R. Após 36h foram fixadas, permeabilizadas e bloqueadas para incubação com os anticorpos anti-Fbxo7 e anti-GSK3 β . Os anticorpos secundários utilizados foram DAM 488 e GAR 594 e as lamínulas submetidas a microscopia confocal. As marcações de cada quadro estão identificadas na figura. Objetiva de 100x.

Sabendo que as mutações não alteraram a localização intracelular de GSK3 β e que a forma GSK3 β -K292R/K297R/K303R interagiu com Fbxo7 aparentemente com maior afinidade, realizamos ensaios de ubiquitinação *in vivo*. Nossa hipótese era que as formas (K \rightarrow R), especialmente a forma K292/297/303R, teria um menor sinal de ubiquitinação em comparação a forma selvagem por termos excluindo sítios de ubiquitinação descritos deste substrato. Nossos resultados de ubiquitinação *in vivo* demonstraram que, surpreendentemente os mutantes GSK3 β -K292R-K297R e GSK3 β -K292R/K297R/K303R apresentaram um aumento no sinal de ubiquitinação em relação à forma selvagem, sendo o triplo mutante o mais ubiquitinado entre eles (**Figura 12**).

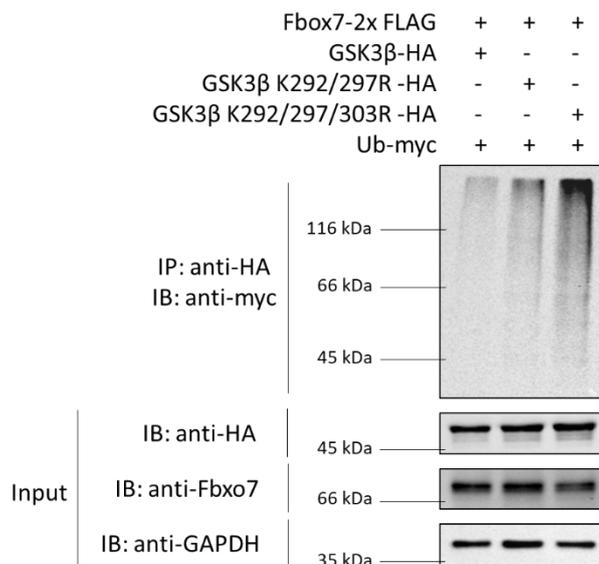


Figura 12: Ensaio de ubiquitinação *in vivo* das formas mutantes (K \rightarrow R) de GSK3 β por SCF(Fbxo7). Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados e os lisados foram imunoprecipitados com resina anti-HA. Os *inputs* e os eluídos foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos utilizados estão indicados, assim como o padrão de massa molecular.

4.4. Mutações em GSK3 β nos sítios de fosforilação e regulação serina 9 e tirosina 216 afetam sua ubiquitinação por Fbxo7

O resíduo de Serina 9 (S9) é um sítio de regulação de GSK3 β , diminuindo a atividade da enzima quando fosforilado ao passo que Y216 é um sítio em que a fosforilação é necessária para ativar a função catalítica de GSK3 β (BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015; ROBERTSON; HAYES; SUTHERLAND, 2018). Assim, nosso interesse foi observar se a interação e ubiquitinação de GSK3 β era afetada pela sua fosforilação, utilizando a enzima constantemente ativa (S9A) e uma constantemente inativa (Y216F) em nossos ensaios.

As mutações nos sítios de fosforilação não geraram alteração na interação entre Fbxo7 e GSK3 β , como mostrado na **Figura 13**. Comparado às formas selvagem e GSK3 β -K292R/K297R/K303R, tanto GSK3 β -S9A quanto GSK3 β -Y216F foram recuperadas juntamente com Fbxo7. A aparente diminuição de quantidade destes mutantes de fosforilação se deve a sua menor expressão como pode ser visto nos seus *inputs*. Desta forma, podemos sugerir que a interação entre Fbxo7 e GSK3 β não é dependente de seu estado de fosforilação.

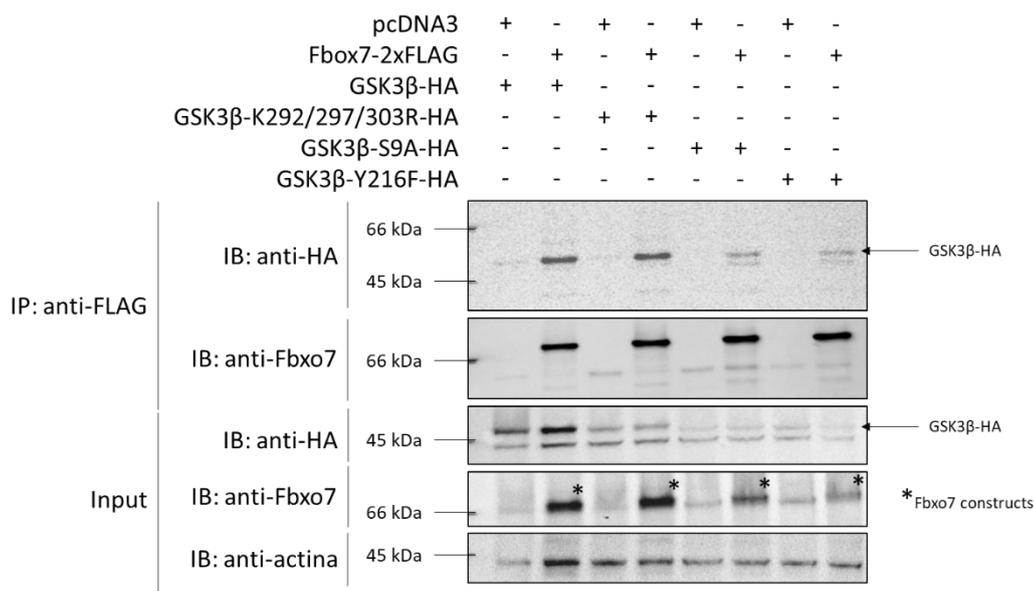


Figura 13: Ensaio de interação *in vivo* entre Fbxo7 e as formas mutantes para os sítios de fosforilação, GSK3 β -S9A e GSK3 β -Y216F. Células HEK293T foram transfectadas e a IP foi feita com resina anti-FLAG. Input e eluído foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos utilizados estão indicados, assim como o padrão de massa molecular.

O ensaio de ubiquitinação das versões mutantes para os sítios de fosforilação S9 e Y216 revelou alterações no perfil de modificação de GSK3 β . A forma S9A, que é constitutivamente ativa por não sofrer uma fosforilação inibitória, mostra um sinal reduzido de ubiquitinação por Fbxo7, ao passo que a forma Y216F – constitutivamente inativa por não sofrer ativação por meio da fosforilação – mostrou aumento no perfil de ubiquitinação comparado a GSK3 β (**Figura 14**). É importante destacar que nos *inputs*, o nível de expressão das formas mutantes são claramente menores que a GSK3 β selvagem, e ainda assim, o perfil de ubiquitinação apresenta-se muito similar, o que argui a favor de um aumento de ubiquitinação do mutante Y216F. Estes resultados indicam que apesar da interação não sofrer alteração em função destas mutações, a ubiquitinação de GSK3 β é modulada por seus resíduos S9 e Y216.

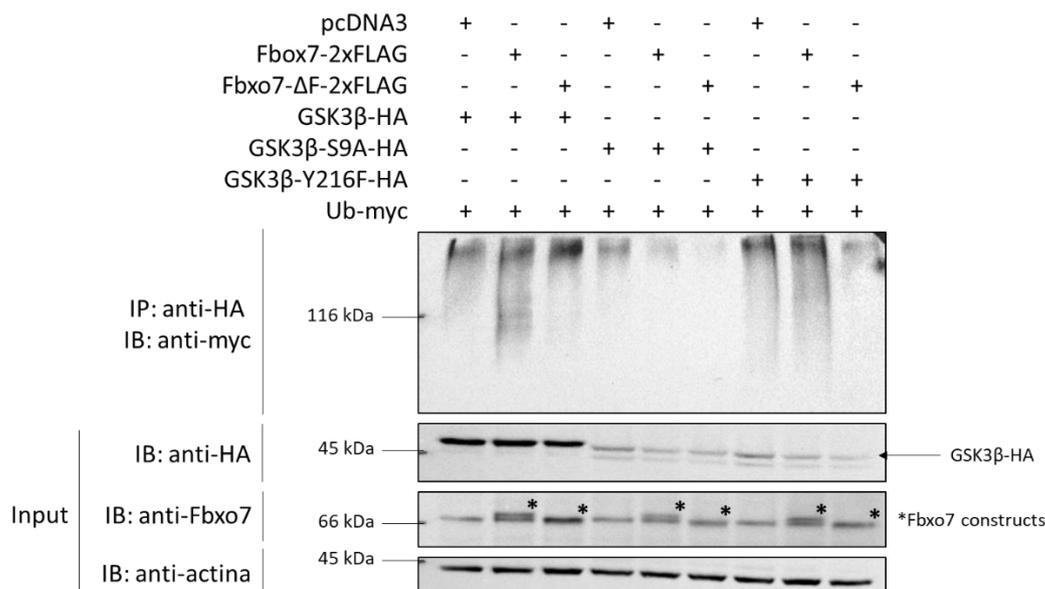


Figura 14: Ensaio de ubiquitinação *in vivo* das formas S9A e Y216F de GSK3β por SCF(Fbxo7). Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados e os lisados foram imunoprecipitados com resina agarose anti-HA. Os *inputs* e os eluídos foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos utilizados estão indicados, assim como o padrão de massa molecular.

4.5. β-TrCP interage com Fbxo7 sendo potencialmente um substrato do complexo SCF(Fbxo7)

β-TrCP, também chamada de Fbxw1, foi a primeira Fbxw a ser identificada e se mostrou como um potencial alvo de ubiquitinação por SCF(Fbxo7) (CENCIARELLI et al., 1999; WINSTON et al., 1999a; TEIXEIRA et al., 2016). Assim, tivemos como intenção observar se elas interagem entre si e se β-TrCP era alvo de SCF(Fbxo7) *in vivo*. Nossos resultados mostraram que ambas proteínas interagem por meio do N-terminal de Fbxo7 (**Figura 15**). Como pode ser observado, quando há a co-expressão de β-TrCP com uma forma truncada de Fbxo7 que não tem seu C-terminal, a interação se mantém. Ao contrário, quando são retirados os primeiros 88 resíduos de Fbxo7, se percebe uma diminuição na intensidade da interação, redução que fica mais acentuada quando feita a co-expressão com a forma (129-522) de Fbxo7.

Os resultados de ubiquitinação *in vivo* não são conclusivos por não conseguirmos repetir os dados a tempo, mas sugerem que β-TrCP é alvo de SCF(Fbxo7), já que há uma menor intensidade do sinal de ubiquitinação quando em co-expressão com a forma Fbxo7-ΔF-box, que não é capaz de ubiquitinar seus alvos por não interagir com Skp1 e assim não

montar o complexo SCF (**Figura 16**). Como pode ser observado na revelação com o anti-mouse-peroxidase, as cadeias pesadas dos anticorpos utilizados na imunoprecipitação estão em quantidades equivalentes o que nos permite comparar seguramente as proteínas imunoprecipitadas.

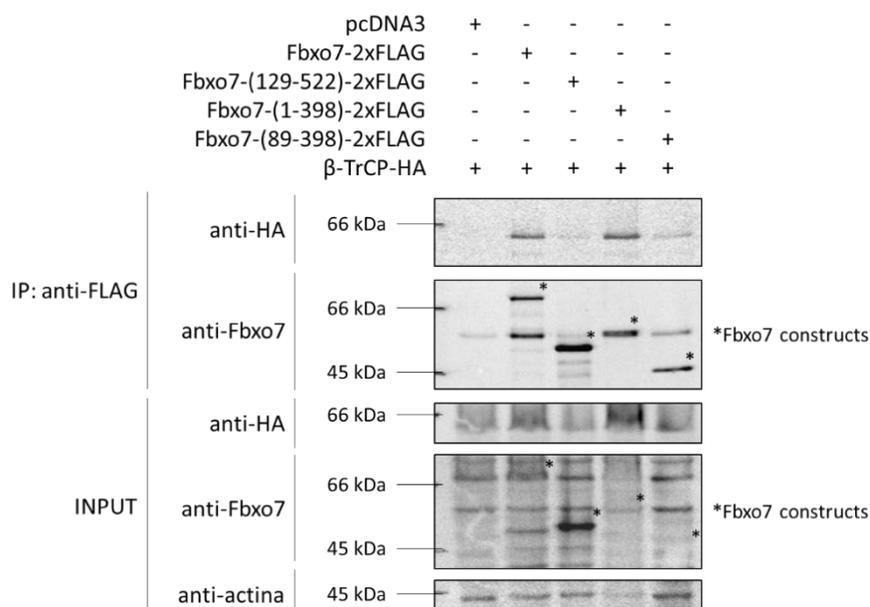


Figura 15: Ensaio de interação *in vivo* entre β -TrCP e diferentes construções de Fbxo7. Células HEK293T foram transfectadas com as construções indicadas na imagem e foi realizada IP com resina agarose anti-FLAG. Os extratos totais e eluídos foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos e padrão molecular utilizados estão indicados na imagem.

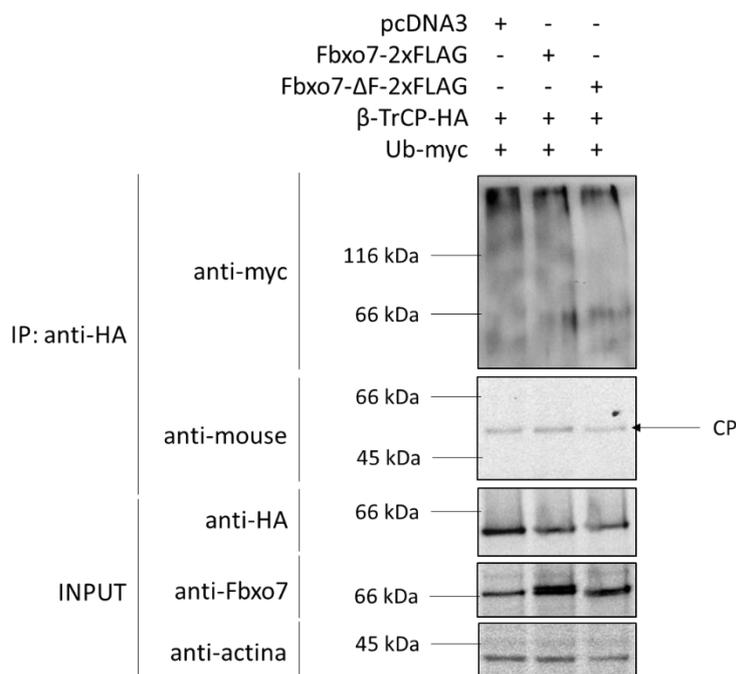


Figura 16: Ensaio de ubiquitinação *in vivo* de β -TrCP por SCF(Fbxo7). Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados e os lisados foram imunoprecipitados com resina agarose anti-HA. Os *inputs* e os eluídos foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos e padrão de massa molecular estão indicados, assim como a cadeia pesada dos anticorpos utilizados para a imunoprecipitação. CP: cadeia pesada do anticorpo da resina anti-HA.

4.6. Fbxo7 altera a estabilidade de GSK3 β -Y216F, mas não de GSK3 β , GSK3 β -S9A e β -TrCP

Como observamos um aumento na ubiquitinação do mutante Y216F em comparação ao S9A e a proteína selvagem, decidimos avaliar a estabilidade destes mutantes em relação a GSK3 β . Os resultados obtidos mostraram que GSK3 β -Y216F é estabilizada na presença de Fbxo7- Δ F-box comparada a Fbxo7 no período de 2 h após bloqueio da tradução por cicloheximida. No entanto, após 4h de tratamento, os níveis de GSK3 β -Y216F são similares na presença de Fbxo7 ou Fbxo7- Δ F-box (**Figura 17**).

Como esperado, a proteína Fbxo7 não alterou a estabilidade da forma selvagem de GSK3 β uma vez que já foi demonstrado uma inserção de cadeias K63 nesta proteína (TEIXEIRA et al., 2016) por Fbxo7 que não destina o substrato para degradação pelo proteassoma (**Figura 18**). Similarmente, não notamos qualquer alteração na estabilidade de GSK3 β -S9A nos tempos analisados (**Figura 19**). E por último, avaliamos a estabilidade de

β -TrCP e verificamos que Fbxo7 não alterou seus níveis nos tempos analisados sugerindo que sua potencial poliubiquitinação seria via K63 a não K48 (**Figura 20**).

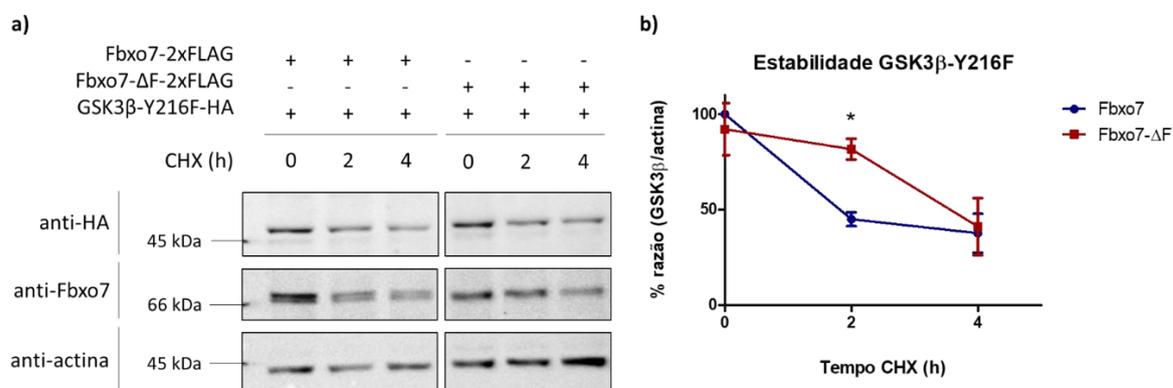


Figura 17: Ensaio de estabilidade de GSK3 β -Y216F em co-expressão de Fbxo7 ou Fbxo7- Δ F-box. Células U2OS foram mantidas em privação de soro fetal bovino (FBS 0%) e tratadas com CHX conforme indicado. a) Os extratos obtidos foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos utilizados e padrão estão indicados. b) Análise densitométrica da razão (GSK3 β /actina). Os dados foram normalizados para porcentagem. Asterisco indica variação estatística significativa.

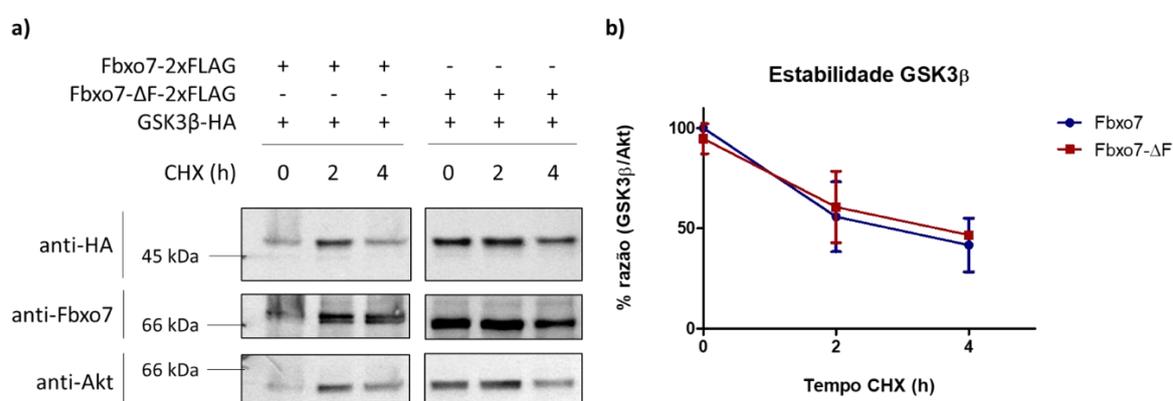


Figura 18: Ensaio de estabilidade de GSK3 β em co-expressão de Fbxo7 ou Fbxo7- Δ F-box. Células U2OS foram mantidas em privação de soro fetal bovino (FBS 0%) e tratadas com CHX conforme indicado. a) Os extratos obtidos foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos utilizados e padrão estão indicados. b) Análise densitométrica da razão (GSK3 β /Akt). Os dados foram normalizados para porcentagem.

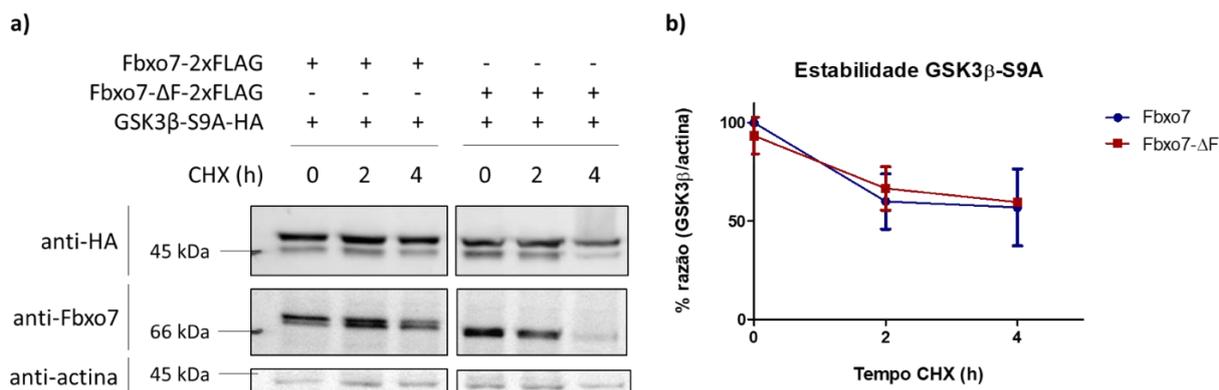


Figura 19: Ensaio de estabilidade de GSK3β-S9A em co-expressão de Fbxo7 ou Fbxo7-ΔF-box. Células U2OS foram mantidas em privação de soro fetal bovino (FBS 0%) e tratadas com CHX conforme indicado. a) Os extratos obtidos foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos utilizados e padrão estão indicados. b) Análise densitométrica da razão (GSK3β/actina). Os dados foram normalizados para porcentagem.

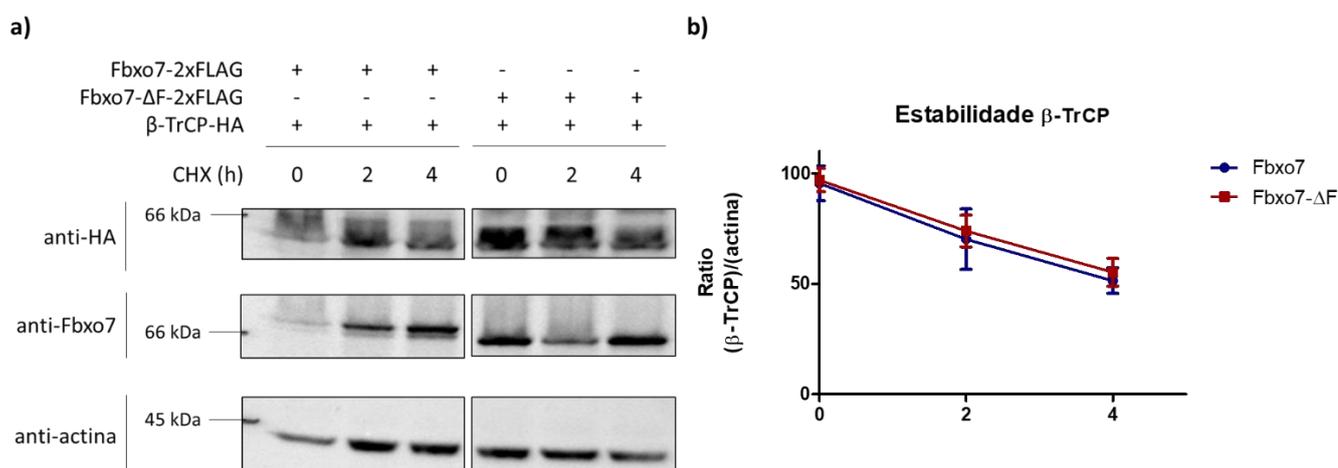


Figura 20: Ensaio de estabilidade de β-TrCP em co-expressão de Fbxo7 ou Fbxo7-ΔF-box. Células U2OS foram mantidas em privação de soro fetal bovino (FBS 0%) e tratadas com CHX conforme indicado. a) Os extratos obtidos foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos utilizados e padrão estão indicados. b) Análise densitométrica da razão (β-TrCP/actina). Os dados foram normalizados para porcentagem.

4.7. Os níveis totais de β-catenina não são alterados por Fbxo7

β-catenina é a molécula efetora da via de sinalização Wnt responsável por ativar os genes controlados pela via (STAAL; LUIS; TIEMESSEN, 2008). Trabalhos recentes mostraram que a superexpressão de Fbxo7 é capaz de modular a via Wnt aumentando o nível de expressão dos genes através de gene responsivo expresso em fusão com *firefly* luciferase (TEIXEIRA et al., 2016). Assim, avaliamos se Fbxo7 altera os níveis totais de β-catenina na

presença da *Fbxo7* ou sua forma mutante *Fbxo7-ΔF-box*. Apesar da modulação previamente demonstrada, nossos resultados mostraram que não há uma alteração nos níveis totais da proteína β -catenina na presença da *Fbxo7* selvagem em relação a *Fbxo7-ΔF-box* (**Figura 21A e B**).

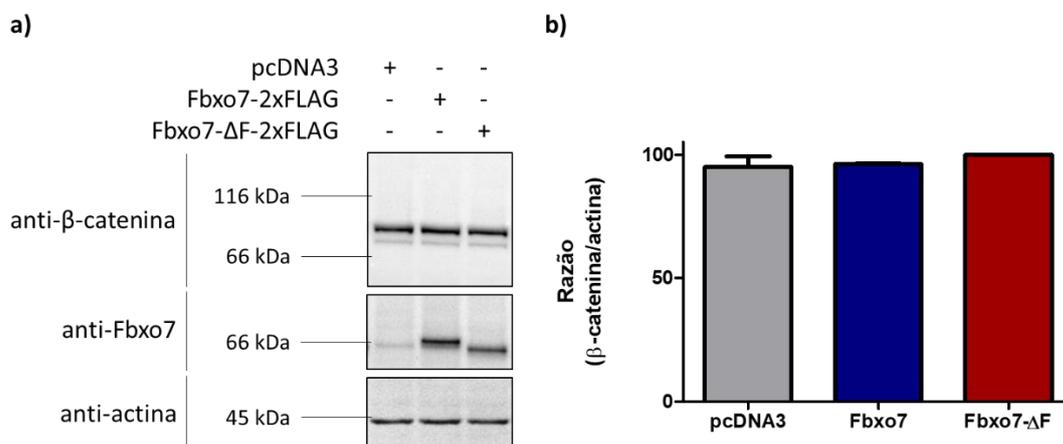


Figura 21: Análise dos níveis celulares totais de β -catenina quando em co-expressão com pcDNA3, *Fbxo7* ou *Fbxo7-ΔF-box*. **a)** Os extratos proteicos totais foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Anticorpos e padrão molecular utilizados estão indicados. **b)** Gráficos obtidos da análise densitométrica da razão (β -catenina/actina), normalizados para porcentagem, n=3.

4.8. *Fbxo7* reduz a migração intracelular de GSK3 β para frações membranares

A fim de observar se *Fbxo7* gera um estímulo de migração intracelular de GSK3 β , realizamos ensaios de enriquecimento de frações citoplasmáticas e membranas celulares internas. Os resultados mostraram que o enriquecimento celular foi devidamente realizado com predominância dos marcadores de membranas internas (Rab7 e Grp75) e citoplasma (Akt) (**Figura 23A**). Ainda, confirmamos por meio de imunofluorescência que um dos nossos marcadores membranares – Grp75 – se encontra em grande maioria, *in vivo*, em mitocôndrias, condizendo com a marcação esperada nas análises de *Western Blot* (**Figura 22**).

A análise do conteúdo de GSK3 β mostrou que há uma maior quantidade de GSK3 β na fração membranares das células quando em co-expressão com *Fbxo7-ΔF-box* em comparação a *Fbxo7* (**Figuras 23A e B**). Estes resultados sugerem que a interação de GSK3 β com *Fbxo7* e possivelmente sua ubiquitinação impedem a migração deste substrato para as

membranas celulares, uma vez que o mutante Fbxo7- Δ F-box é incapaz de ubiquitinar e preservou GSK3 β nestas frações.

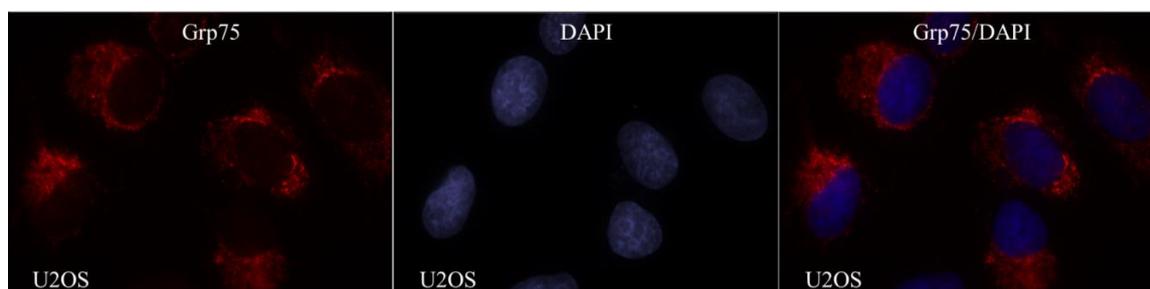


Figura 22: Imunolocalização da proteína do marcador de membrana interna Grp75. Células U2OS foram marcadas com anti-Grp75 (e anticorpo secundário GAR 594) e submetidas a microscopia de fluorescência em objetiva de 100x. As marcações de cada quadro estão identificadas na figura.

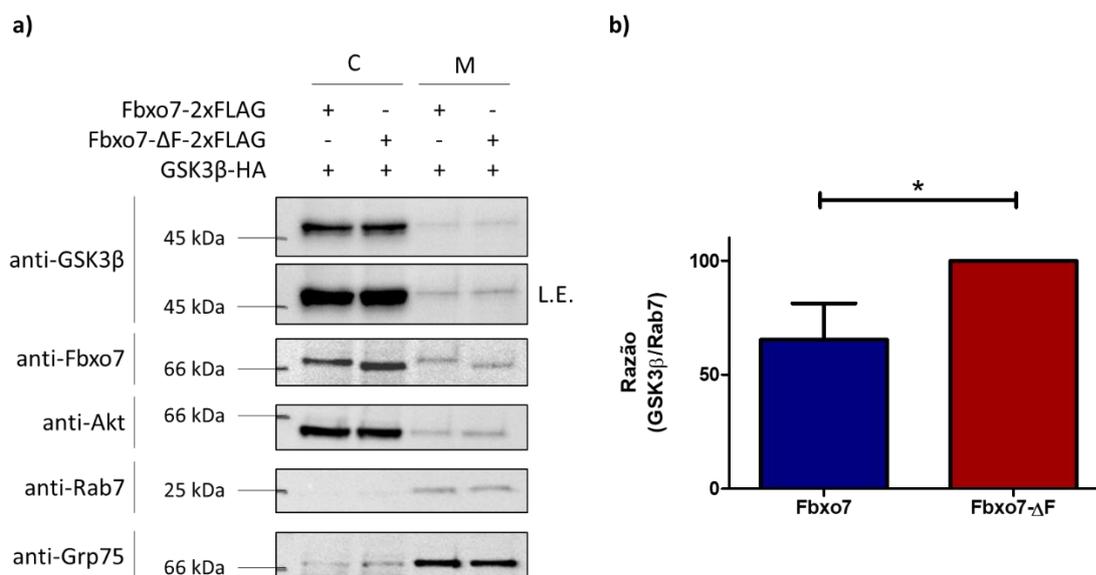


Figura 23: Ensaio de enriquecimento de frações celulares para análise da migração intracelular de GSK3 β . Células U2OS foram transfectadas de acordo com o indicado. a) Os extratos proteicos referentes a cada fração, de cada amostra, foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados por *Western Blot*. Padrão de massa molecular e anticorpos utilizados estão indicados. A amostra marcada como L.E. se refere a Longa Exposição quando feita a revelação. C: fração citosólica enriquecida; M: fração membranares enriquecida. b) Análise densitométrica referente a razão (GSK3 β /Rab7) das frações membranares das amostras em co-expressão de Fbxo7 ou Fbxo7- Δ F-box. Asterisco indica variação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

5. Discussão

Dois trabalhos prévios de identificação de sítios ubiquitinados no proteoma humano descreveram três sítios de ubiquitinação em GSK3 β : os resíduos de lisina K292, K297 e K303, sendo os dois primeiros sítios mais prováveis de ubiquitinação e o terceiro com a menor probabilidade (DANIELSEN et al., 2011; WAGNER et al., 2011). Recentemente, nosso grupo identificou que SCF(Fbxo7) é responsável por ubiquitinar GSK3 β via cadeias K63 e potencialmente monoubiquitinação (TEIXEIRA et al., 2016). Neste trabalho, utilizamos uma estratégia de inserção de mutação pontual sem a utilização de *kit* (LIU; NAISMITH, 2008) e demonstramos que é eficiente para esta finalidade, permitindo a obtenção dos clones mutados esperados. Embora os *primers* tenham longas regiões de sobreposição, as diferenças de T_m entre as regiões sobrepostas e não sobrepostas minimizaram a formação dos dímeros de *primers* que pudessem impedir a amplificação dos mutantes.

Com esta estratégia, inserimos mutações pontuais nos três resíduos de lisina mencionados (K292, K297 e K303), trocando por argininas com o intuito de identificar os sítios de ubiquitinação de GSK3 β por SCF(Fbxo7). Estes resíduos se encontram numa região de superfície da proteína, potencialmente numa região de interação com Fbxo7. Apesar das mutações inseridas, os mutantes GSK3 β -K292/297R e GSK3 β -K292/297/303R continuaram interagindo com Fbxo7 confirmando que a interação entre estas proteínas não se dá por interações iônicas nesta região. De fato, conforme observado em análises *in silico*, as mutações não alteraram significativamente a estrutura de GSK3 β de forma a bloquear a sua interação com Fbxo7. Surpreendentemente, os mutantes GSK3 β -K292/297R e GSK3 β -K292/297/303R apresentaram um perfil de ubiquitinação maior que a proteína GSK3 β selvagem. Recentemente, foi demonstrado que GSK3 β é ubiquitinada na posição K183, por SCF(Fbxo17), resultando na sua degradação proteassomal (SUBER et al., 2017). Desta forma, demonstramos que a ubiquitinação de GSK3 β por SCF(Fbxo7) não se dá nos resíduos K292, K297 e K303 e sugerimos que as mutações nestes resíduos podem ter aumentando a afinidade de interação de GSK3 β com Fbxo7 ou outra E3 ubiquitina ligase envolvida na sua ubiquitinação. Embora não publicado, pesquisadores da área relatam que mutações pontuais em um resíduo de lisina podem induzir a ubiquitinação de outro resíduo, quando não há impedimento estrutural. Por isso, as descrições dos sítios de ubiquitinação de um determinado alvo na literatura nem sempre são encontrados.

GSK3 β também possui outros dois sítios importantes para a modulação de sua função, os resíduos S9 e Y216. O primeiro é alvo de fosforilação inibitória, diminuindo a capacidade da enzima fosforilar seus substratos (BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015). No contexto da via Wnt, já foi observado em casos de tumor colorretal um aumento na fosforilação desse resíduo de GSK3 β , o que levou a uma maior estabilidade de β -catenina e gerou sua translocação para o núcleo (RASOLA et al., 2007). De forma contrária, Y216 é um sítio que é fosforilado durante a síntese de GSK3 β e essa modificação é necessária para a máxima atividade da enzima (ROBERTSON; HAYES; SUTHERLAND, 2018). Assim, a versão GSK3 β -S9A não sofre a fosforilação inibitória, sendo uma enzima constitutivamente ativa, ao contrário de GSK3 β -Y216F, constitutivamente inativa. Apesar de ambas interagirem com Fbxo7, observamos que GSK3 β -S9A sofre uma redução muito brusca no seu sinal de ubiquitinação, enquanto GSK3 β -Y216F demonstra um maior nível de ubiquitinação por Fbxo7 do que a forma selvagem. Há uma associação frequente entre fosforilação e ubiquitinação, em que alguns alvos de complexos SCF precisam ser fosforilados previamente para serem reconhecidos e ubiquitinados pelas E3 ligases em regiões denominadas *degrons* (SKOWYRA et al., 1997; WINSTON et al., 1999a, 1999b; TEIXEIRA; REED, 2013). Dado que a fosforilação em S9 e a ubiquitinação de GSK3 β por SCF(Fbxo7) tem caráter inibitório para a sua função (SUTHERLAND; LEIGHTON; COHEN, 1993; TEIXEIRA et al., 2016), sugerimos que SCF(Fbxo7) depende de uma fosforilação prévia de GSK3 β na posição S9 para reconhecê-la como alvo de ubiquitinação, sendo a interação independente da fosforilação deste resíduo. Esses resultados são corroborados pelos ensaios de estabilidade de GSK3 β -S9A em que não verificamos qualquer alteração nos seus níveis em função da presença de Fbxo7.

Por outro lado, como a versão GSK3 β -Y216F é constitutivamente inativa e seu resíduo S9 está disponível para fosforilação, continua sendo reconhecida por SCF(Fbxo7) e ubiquitinada. Além disso, estando GSK3 β -Y216F inativa e disfuncional, pode ser um alvo para eliminação pela célula, o que pode estar sendo realizado pela sua ubiquitinação por SCF(Fbxo7), uma vez que nos ensaios de estabilidade observamos uma redução deste alvo apenas na presença de Fbxo7 selvagem.

Os resultados de estabilidade de GSK3 β selvagem obtidos condizem com os descritos previamente pelo nosso grupo. A ubiquitinação de GSK3 β por SCF(Fbxo7) adiciona cadeias do tipo K63, responsáveis por modificar a função do alvo sem enviá-lo a degradação proteassomal (KOMANDER, 2009; TEIXEIRA et al., 2016). Por isso, não

observamos diferença significativa na estabilidade de GSK3 β em co-expressão com Fbxo7 ou Fbxo7- Δ F-box.

Já os dados obtidos para estabilidade de β -TrCP evidenciam que não há diferença em comparação a co-expressão com Fbxo7 ou Fbxo7- Δ F-box. Caso seja confirmado que β -TrCP é um substrato do complexo SCF(Fbxo7), como há a sugestão dos nossos resultados, mais uma vez a ubiquitinação por Fbxo7 se daria por via não-degradativa, mas regulatória, assim como para GSK3 β e TOMM20, outros alvos descritos desse complexo. Ademais, sua interação se dá também com o N-terminal de Fbxo7, da mesma forma como é para GSK3 β (TEIXEIRA et al., 2016). β -TrCP foi a primeira proteína F-box com domínio WD40 descrita, sendo também chamada de Fbxw1, possuindo mais de 30 substratos conhecidos. Por reconhecer sequências do tipo DSGXXS – com maior intensidade se os resíduos serina estiverem fosforilados –, que se parecem muito com sítios de reconhecimento para fosforilação por GSK3 β , ambas trabalham em conjunto não só modulando a via Wnt por meio de β -catenina, mas também são responsáveis por fosforilar e ubiquitar, por exemplo, Snail1 e Snail2, envolvidas na transição epitelial-mesenquimal de tumores (DÍAZ; DE HERREROS, 2016; ROBERTSON; HAYES; SUTHERLAND, 2018). Assim, se confirmada β -TrCP como alvo, teríamos SCF(Fbxo7) agindo da mesma forma nas duas proteínas, que tem uma ligação intrínseca de regulação do metabolismo celular, incluindo suas funções na via Wnt.

Dentro do contexto da via de sinalização Wnt canônica, β -catenina é a molécula efetora, se acumulando no citoplasma celular e posteriormente migrando para o núcleo, onde é responsável por ativar os genes controlados pela via quando esta é estimulada (STAAL; LUIS; TIEMESSEN, 2008). Pelo fato de Fbxo7 ser responsável por aumentar a expressão dos genes controlados pela via (TEIXEIRA et al., 2016), decidimos investigar se Fbxo7 é capaz de gerar uma variação nos níveis intracelulares totais de β -catenina justificando a ativação da via Wnt. No entanto, os resultados mostram que não há um acúmulo de β -catenina na célula, sugerindo que o efeito de Fbxo7 na via não é através da preservação direta deste efector. O *crosstalk* entre vias de sinalização celular é comum e pode ser que Fbxo7 esteja regulando outras vias que culminem com a ativação de Wnt. Além disso, a proteína β -catenina não é unicamente envolvida em sinalização, sendo também responsável por atuar em junções aderentes – interações célula-célula – funcionando como uma molécula de adesão celular, juntamente a E-caderina e a α/γ -catenina (BREMBECK; ROSÁRIO; BIRCHMEIER, 2006; KIM; KIM; JHO, 2013). Mais do que isso, mesmo depois de

fosforilada – que é a sua marcação para degradação –, β -catenina é necessária para a formação de corpos multivesiculares no interior da célula que são responsáveis por sequestrar o complexo de destruição quando há a ativação da via (TAELMAN et al., 2010). Desta forma, mesmo marcada para o encaminhamento para o sistema ubiquitina-proteassomo, os níveis de β -catenina precisam se manter para que haja a ativação da via. Juntamente a isso, nossa observação foi feita com relação aos níveis totais da proteína, sem separar a fração citoplasmática da nuclear, onde poderíamos ver variações quando a via estivesse ativada.

Por fim, três mecanismos de regulação de GSK3 β com impacto na via de sinalização Wnt já foram descritos: um deles tem seu estímulo elucidado, a fosforilação do resíduo S9, com caráter inibitório, ou do resíduo Y216, de forma a estimular a atividade catalítica da enzima (SUTHERLAND; LEIGHTON; COHEN, 1993; ROBERTSON; HAYES; SUTHERLAND, 2018). Outros dois mecanismos foram elucidados, porém sem determinar o estímulo que leva ao efeito. Em um deles, foi mostrado que GSK3 β , quando a via é estimulada, pode ser recrutada para a membrana plasmática, interagindo com LRP5/6 juntamente com o complexo de destruição, o que diminui sua disponibilidade para fosforilar β -catenina (CSELENYI et al., 2008; STAAL; LUIS; TIEMESSEN, 2008). E o terceiro mecanismo envolve o sequestro de GSK3 β e seu complexo para vesículas intracelulares, chamadas corpos multivesiculares (MVB's), ocorrendo a compartimentalização da enzima, fazendo com que não esteja mais disponível para fosforilar β -catenina para ser ubiquitinada por β -TrCP (TAELMAN et al., 2010). A proposta apresentada neste trabalho foi elucidar se a ubiquitinação de GSK3 β por SCF(Fbxo7) é um estímulo que pode levar a sua migração intracelular.

Nossos resultados de enriquecimento das frações celulares mostraram que a co-expressão de Fbxo7- Δ F-box (mutante incapaz de ubiquitinar) e GSK3 β aumentou seus níveis na fração membranar em comparação a presença da forma selvagem Fbxo7. O protocolo utilizado de enriquecimento de frações (HOLDEN; HORTON, 2009; BAGHIROVA et al., 2015) separa uma fração de organelas membranares intracelulares, mostrando que GSK3 β , na presença de Fbxo7- Δ F, está sendo internalizada em vesículas intracelulares, de acordo com o descrito por (TAELMAN et al., 2010). De modo contrário, quando em presença de Fbxo7, GSK3 β se encontra em menor quantidade nesta fração celular. Esses resultados contrariam nossa hipótese inicial mas mostram com forte evidência que a ubiquitinação de GSK3 β impede sua migração para a fração membranar, enquanto a

interação com Fbxo7- ΔF – uma interação que protege o alvo da ubiquitinação – está mantendo GSK3 β nessa fração. Em suma, sugerimos que a interação e ubiquitinação de GSK3 β por Fbxo7 pode ser um novo mecanismo de inibição de GSK3 β dependente do seu resíduo S9, sem correlação com os mecanismos inibitórios já descritos (SUTHERLAND; LEIGHTON; COHEN, 1993; CSELENYI et al., 2008; TAELEMAN et al., 2010) (**Figura 24**).

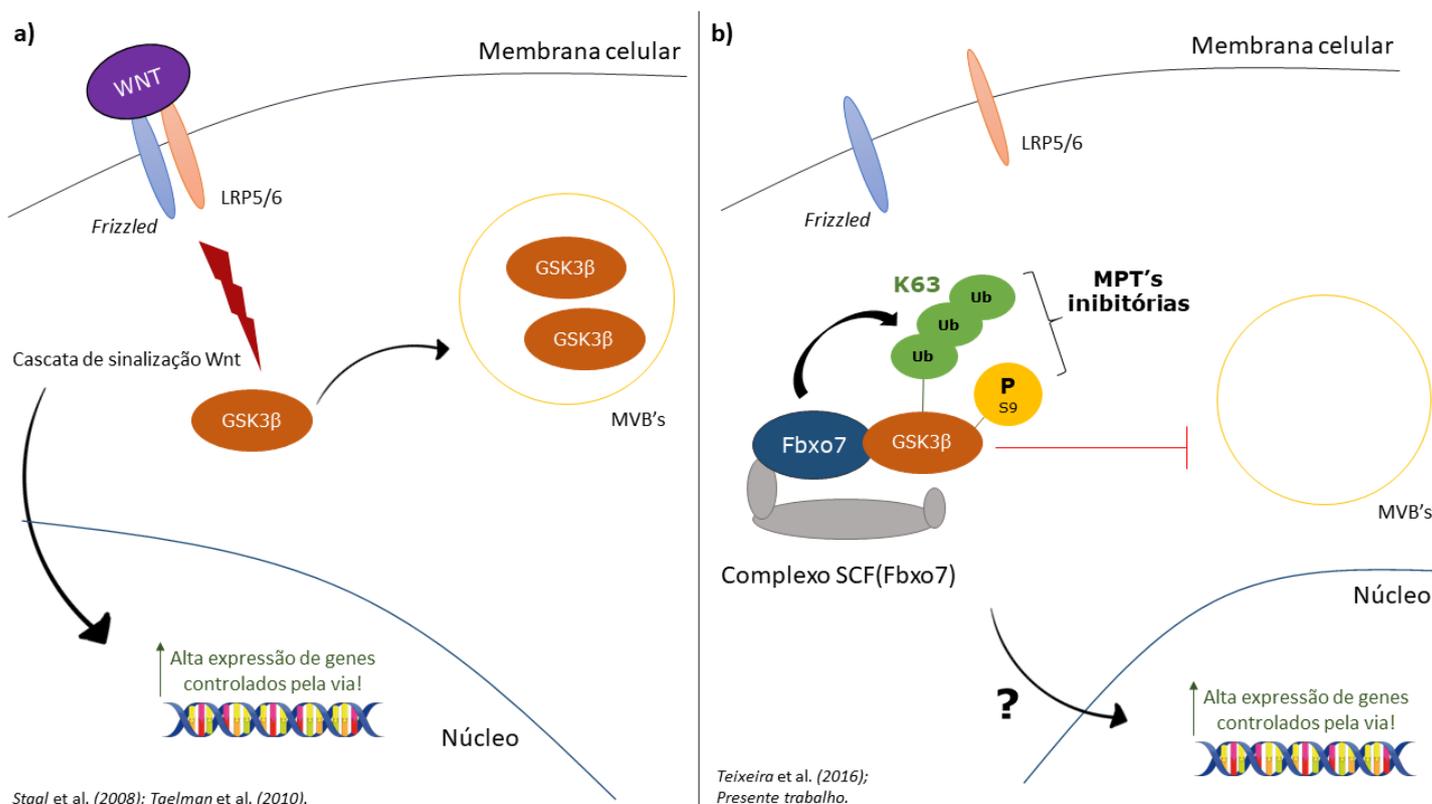


Figura 24: Modelo proposto de inibição de GSK3 β pelos dados apresentados neste trabalho. A) Como previamente descrito, a ativação da via de sinalização Wnt pelo estímulo gerado a partir da interação de proteínas WNT com receptores na membrana plasmática geram a translocação de GSK3 β para MVB's e a via se torna ativa, aumentando a expressão dos genes controlados (STAAL; LUIS; TIEMESSEN, 2008; TAELEMAN et al., 2010). B) Sem a dependência da interação de proteínas WNT com os receptores de membrana, SCF(Fbxo7) ubiquitina GSK3 β fosforilada no resíduo S9, inativando a enzima, e essa modificação impede que seja translocada para os MVB's. A ação de Fbxo7 também é responsável por ativar a via Wnt (TEIXEIRA et al., 2016), por maneiras ainda desconhecidas.

6. Conclusão e contribuições do trabalho

Nosso trabalho refutou a hipótese de que a ubiquitinação de GSK3 β por Fbxo7 seria o estímulo para sua migração para os corpos multivesiculares culminando com sua inativação. No entanto, contribuímos para o entendimento da função de GSK3 β e Fbxo7 nas células mostrando que os sítios de ubiquitinação de GSK3 β descritos na literatura não são exclusivos para Fbxo7; que os sítios de fosforilação têm uma alta relevância na regulação e ubiquitinação de GSK3 β por Fbxo7. E este trabalho sugeriu um novo mecanismo de regulação de GSK3 β em que sua interação e ubiquitinação por Fbxo7 impedem sua migração para membrana celular, inativando-a e culminando com a ativação da via Wnt. Mais experimentos serão necessários para confirmação desta nova hipótese gerada.

7. Bibliografía

- ANASTAS, J. N.; MOON, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 1, p. 11–26, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23258168%5Cnhttp://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3419>>.
- ARDLEY, H. C.; ROBINSON, P. A. E3 ubiquitin ligases. **Essays in Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 15, 2005. Disponível em: <<http://essays.biochemistry.org/bsessays/041/bse0410015.htm>>.
- BAGHIROVA, S. et al. Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells. **MethodsX**, v. 2, p. e440–e445, 2015.
- BEDFORD, L. et al. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 1, p. 29–46, 2011. Disponível em: <<http://www.emeraldinsight.com/doi/10.1108/20408741111155325>>.
- BEUREL, E.; GRIECO, S. F.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. **Pharmacol Ther.**, v. 0, p. 114–131, 2015.
- BREMBECK, F. H.; ROSÁRIO, M.; BIRCHMEIER, W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 16, n. 1, p. 51–59, 2006.
- BURCHELL, V. S. et al. The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 1257–65, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3827746&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>.
- CENCIARELLI, C. et al. Identification of a family of human F-box proteins. **Current Biology**, v. 9, n. 20, p. 1177–1179, 1999.
- CSELENYI, C. S. et al. LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 23, p. 8032–7, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2430354&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>.
- DANIELSEN, J. M. R. et al. Mass Spectrometric Analysis of Lysine Ubiquitylation Reveals Promiscuity at Site Level. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 3, 2011.
- DARLING, S. et al. Regulation of the cell cycle and centrosome biology by deubiquitylases. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 5, p. 1125–1136, 2017. Disponível em: <<http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST20170087>>.
- DÍAZ, V. M.; DE HERREROS, A. G. F-box proteins: Keeping the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in check. **Seminars in Cancer Biology**, v. 36, p. 71–79, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.10.003>>.
- HERHAUS, L.; DIKIC, I. Expanding the ubiquitin code through post-translational modification. **EMBO reports**, v. 16, n. 9, p. 1071–1083, 2015. Disponível em: <<http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.15252/embr.201540891>>.
- HOLDEN, P.; HORTON, W. A. Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines. **BMC research notes**, v. 2, p. 243, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2802353&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>.
- KAHN, M. Can we safely target the WNT pathway? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 13, n. 7, p. 513–32, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd4233>>.

- KIM, W.; KIM, M.; JHO, E. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. **Biochemical Journal**, v. 450, n. 1, p. 9–21, 2013. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20121284>>.
- KOMANDER, D. The emerging complexity of protein ubiquitination. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 5, p. 937–953, 2009. Disponível em: <<http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST0370937>>.
- LAMAN, H. et al. Transforming activity of Fbxo7 is mediated specifically through regulation of cyclin D/cdk6. **The EMBO journal**, v. 24, n. 17, p. 3104–3116, 2005.
- LEE, J. E. et al. The Steady-State Repertoire of Human SCF Ubiquitin Ligase Complexes Does Not Require Ongoing Nedd8 Conjugation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 5, p. M110.006460–M110.006460, 2011. Disponível em: <<http://www.mcponline.org/cgi/doi/10.1074/mcp.M110.006460>>.
- LIU, H.; NAISMITH, J. H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. **BMC biotechnology**, v. 8, p. 91, 2008.
- LIU, J. et al. Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1855, n. 1, p. 50–60, 2015.
- LIU, L. et al. Functional significance and therapeutic implication of ring-type E3 ligases in colorectal cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 2, p. 148–159, 2018.
- MEVISSSEN, T. E. T. et al. OTU Deubiquitinases Reveal Mechanisms of Linkage Specificity and Enable Ubiquitin Chain Restriction Analysis. **Cell**, v. 154, n. 1, p. 169–184, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.046>>.
- MEZIANE, E. K. et al. Knockdown of Fbxo7 reveals its regulatory role in proliferation and differentiation of haematopoietic precursor cells. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 13, p. 2175–2186, 2011. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.080465>>.
- MORROW, J. K. et al. Targeting ubiquitination for cancer therapies. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 17, p. 2333–2350, 2015.
- NELSON, D. E.; RANDLE, S. J.; LAMAN, H. Beyond ubiquitination: the atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins. **Open biology**, v. 3, n. 10, p. 130131, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3814724&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. ed. [s.l.] ARTMED, 2014.
- PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 503–33, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583613>>.
- RANDLE, S. J.; LAMAN, H. Structure and Function of Fbxo7/PARK15 in Parkinson's Disease. **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, n. 7, p. 715–724, 2017. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/node/140358/article>>.
- RASOLA, A. et al. A positive feedback loop between hepatocyte growth factor receptor and β -catenin sustains colorectal cancer cell invasive growth. **Oncogene**, v. 26, n. 7, p. 1078–1087, 2007.
- ROBERTSON, H.; HAYES, J. D.; SUTHERLAND, C. A partnership with the proteasome ; the destructive nature of GSK3. **Biochemical Pharmacology**, v. 147, p. 77–92, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.10.016>>.
- SATIJA, Y. K.; BHARDWAJ, A.; DAS, S. A portrayal of E3 ubiquitin ligases and deubiquitylases in cancer. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 12, p. 2759–2768, 2013.

- SKOWYRA, D. et al. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 209–219, 1997.
- STAAL, F. J. T.; LUIS, T. C.; TIEMESSEN, M. M. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 8, p. 581–93, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617885>>.
- SUBER, T. et al. SCF(FBXO17) E3 ligase modulates inflammation by regulating proteasomal degradation of glycogen synthase kinase-3 β in lung epithelia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 18, p. 7452–7461, 2017.
- SUTHERLAND, C.; LEIGHTON, I. A.; COHEN, P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. **Biochemical Journal**, v. 296, n. 1, p. 15–19, 1993. Disponível em: <<http://www.biochemj.org/content/296/1/15.abstract>>.
- TAELMAN, V. F. et al. Wnt signaling requires sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside multivesicular endosomes. **Cell**, v. 143, n. 7, p. 1136–1148, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.034>>.
- TEIXEIRA, F. R. et al. Gsk3 β and Tomm20 are substrates of the SCFFbxo7/PARK15 ubiquitin ligase associated with Parkinson's disease. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 20, p. 3563–3580, 2016. Disponível em: <<http://biochemj.org/cgi/doi/10.1042/BCJ20160387>>.
- TEIXEIRA, L. K.; REED, S. I. Ubiquitin Ligases and Cell Cycle Control. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 387–414, 2013. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060410-105307>>.
- VINGILL, S. et al. Loss of FBXO7 (PARK15) results in reduced proteasome activity and models a parkinsonism-like phenotype in mice. **The EMBO Journal**, v. 7, p. e201593585, 2016. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emj.201593585>>.
- WAGNER, S. a. et al. A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 10, p. M111.013284-M111.013284, 2011.
- WANG, Z. et al. Roles of F-box proteins in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 4, p. 233–247, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4306233/pdf/nihms656118.pdf>>.
- WEATHINGTON, N. M.; MALLAMPALLI, R. K. Emerging therapies targeting the ubiquitin proteasome system in cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 1, p. 6–12, 2014.
- WINSTON, J. T. et al. A family of mammalian F-box proteins. **Current Biology**, v. 9, n. 20, p. 1180–1182, 1999a.
- WINSTON, J. T. et al. The SCF(β -TRCP)–ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and β -catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro. **Genes & Development**, v. 283, p. 9369–9369, 1999b.
- ZHAN, T.; RINDTORFF, N.; BOUTROS, M. Wnt signaling in cancer. **Oncogene**, v. 36, n. 11, p. 1461–1473, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.304>>.
- ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. 2008. Disponível em: <<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER>>. Acesso em: 21 ago. 2018.
- ZHENG, N.; SHABEK, N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 129–157, 2017.
- ZHOU, Z. D. et al. F-box protein 7 mutations promote protein aggregation in mitochondria and inhibit mitophagy. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 22, p. 6314–6330, 2015.