

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA



**Caracterização Parcial das Ligases de Ubiquitina
TRAC-1/RNF125 (T-Cell RING Protein in
Activation), RNF114, RNF138 e RNF166**

Paula Pezzuto

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.
Orientador: Franklin David Rumjanek
Co-Orientadora: Ana Lúcia Moraes Giannini

Rio de Janeiro – 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PEZZUTO, Paula

Caracterização Parcial das Ligases de Ubiquitina TRAC-1/RNF125 (T-Cell Ring Protein in Activation), RNF114, RNF138 e RNF166.

Paula Pezzuto – 2010.

118 f.

Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro, 2010.

Orientador: Franklin David Rumjanek

Co-Orientadora: Ana Lúcia Moraes Giannini

1.Caracterização. 2.Ligases de Ubiquitina. 3.TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166. 4.Localização Celular. 5.Ativação de Células T. – Dissertações.

I. Rumjanek, Franklin David (Orient.). II. Giannini, Ana Lúcia Moraes (Co-Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica. IV. Título.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Câncer localizado no Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, sob orientação do professor Franklin David Rumjanek e no Laboratório de Genômica Funcional e Transdução de Sinal, no Departamento de Genética – UFRJ, sob orientação da professora Ana Lúcia Moraes Giannini. Parte do trabalho foi desenvolvida no laboratório da colaboradora Dra. Marie-Jose Bijlmakers localizado no Departamento de Imunologia do Guy's Hospital em Londres. O projeto foi financiado pelas agências CNPq e FAPERJ.

Caracterização Parcial das Ligases de Ubiquitina TRAC-1/RNF125 (T-Cell Ring Protein in Activation), RNF114, RNF138 e RNF166.

Paula Pezzuto

Orientador: Franklin David Rumjanek
Co-Orientadora: Ana Lúcia Moraes Giannini

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Aprovada em Agosto de 2010 por:

Orientador: Dr. Franklin David Rumjanek
Prof. Titular do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – IBqM/UFRJ

Co-Orientadora: Dr^a. Ana Lúcia Moraes Giannini
Prof. Adjunto do Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Dr. Marcelo Rosado Fantappié
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – IBqM/UFRJ

Dr^a. Carla Ribeiro Polycarpo
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – IBqM/UFRJ

Dr^a. Luciana Barreto Chiarini
Prof. Adjunto do Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – IBqM/UFRJ

Revisor/Suplente Interno: Dr. Cláudio Akio Masuda
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – IBqM/UFRJ

Suplente externo: Dr. Renato Santana de Aguiar
Prof. Adjunto do Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

*Aos meus pais, Amauri e Maria
por todo amor, incentivo e apoio incondicional.*

*A Ana Lúcia Giannini, por toda amizade,
confiança e suporte no desenvolvimento deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, por todas as oportunidades e por estar comigo em todos os momentos.

Aos meus pais, Maria e Amauri, por todo amor. Obrigada pelo incentivo a minha formação e crescimento profissional, pela compreensão e orientação nos momentos difíceis.

À minha irmã e ao meu sobrinho por toda alegria, amor e carinho.

Ao meu avô Amaury por todo carinho, pelos docinhos gostosos que ele sempre me dá e por sua alegria durante as conquistas que aparecem na minha vida.

Aos meus tios e amigos pelo carinho e apoio que me dedicaram nesse momento da minha vida.

À professora e co-orientadora, Ana Lúcia Moraes Giannini, pela grande amizade e dedicação durante o desenvolvimento da minha dissertação. Obrigada pelo meu projeto, pela oportunidade de trabalhar com você aqui e em seu antigo laboratório em Londres, pelas conversas, por todo incentivo, confiança e por estar sempre presente.

Ao professor e orientador, Franklin David Rumjanek, por ter me recebido em seu laboratório. Obrigada pela confiança e por toda ajuda para o desenvolvimento da minha dissertação.

À colaboradora, Dra. Marie-Jose Bijlmaker, pela generosidade em me receber em seu laboratório! Obrigada por toda a ajuda no desenvolvimento dos experimentos e discussões. Obrigada a Marie e ao Thomas por me receberem em sua casa e pelos momentos de descontração!

Aos queridos Vânia, Moacir e Rodrigo; pela ótima recepção e estadia em Londres. Obrigada pelo carinho e confiança! Foram momentos inesquecíveis!!!!

Ao querido aluno de IC Alan Messala, pela amizade e companheirismo. Obrigada por todas as discussões a respeito do trabalho, pela ajuda na realização de muitos destes experimentos, pelas canções, os abraços apertados e pelo seu sorriso que sempre me alegra!!!

À minha querida aluna de IC Ana Carolina Vieira, pela ajuda nos experimentos e principalmente pela compreensão desses últimos e tumultuados meses de dissertação. Obrigada pelo carinho, companhia e serenidade!

À minha querida amiga Mariana Pires! Obrigada por todos os momentos, bons ou ruins, que passamos juntas sempre apoiando uma a outra. Pode contar sempre comigo! Obrigada também pelos linfócitos!!!

Ao professor Cláudio Akio Masuda, por ser o revisor. Obrigada pelos conselhos e pelas discussões. A sua participação foi de grande importância para o direcionamento e desenvolvimento desta dissertação.

À Nívea Dias Amoedo, pela amizade e carinho! Obrigada por estar sempre ao meu lado e disposta a me ajudar, desde quando eu era sua IC. Em especial, obrigada por todos os cafés da tarde que foram importantíssimos para aliviar o stress!

À Mariana Figueiredo, por todo carinho, amizade e pelas sábias palavras! Obrigada pela companhia divertida no laboratório e na sala de cultura. Show!

Ao Vitor Coutinho Carneiro, por toda amizade desde os tempos de UNIRIO! Obrigada por toda ajuda, principalmente na parte inicial de clonagem! Obrigada pelo ombro amigo nos momentos de dificuldade!

À Isabel Caetano Abreu, pela amizade e pela proteção espiritual (anjo da guarda)! Obrigada por toda a ajuda, principalmente nos ensaios de fosforilação!

À Amanda Vicentino, pela amizade e por toda a sua doçura! Obrigada pelos conselhos, carinho e também por toda a ajuda que eu precisei!

Ao Fabio Schneider, por todo carinho!!!! Obrigada pelo ombro amigo, pelos conselhos, pela sua serenidade, paciência e pelos vários momentos de alegria e diversão!

Ao Humberto Dez Vítto, pela amizade e pela ajuda no super “fast” seqüenciamento das minhas dezenas de amostras! Obrigada pelos almoços e pela divertida convivência no laboratório.

À querida Vanessa Sandim, pelo seu carinho e sábias palavras. Uma grande companhia nas tardes de cafezinho! Obrigada por toda ajuda!!!!

Aos queridos Juan, Diego, Roberto, Bruna e Camila, pelos momentos de descontração no laboratório! Obrigada ao atual e ex-técnico, Diego e Roberto, por toda ajuda na preparação de soluções e materiais de laboratório. Obrigada ao Juanito pela sua alegria que contagia!!! Obrigada a Camila e a Bruna pelos momentos divertidos no laboratório em especial as “ quartas sem lei “!!!!

À amiga e ex-técnica Marta Freire, pela colaboração no início do mestrado.

À querida Juliana Vital, por toda ajuda no início do meu mestrado! Obrigada pelos momentos divertidos!!!!!!

À Fabiana PAR1, pelos momentos divertidos e por toda ajuda no centro de citometria!

Aos queridos Gilson Junior, Andréa Goes e Cláudia Gallo, por todo carinho! Obrigada a Andréa pelos momentos divertidos em Paris! Gilson, obrigada por toda ajuda no início da minha dissertação e pelos momentos de alegria no

laboratório! Maravilha!!!! Obrigada a Dr^a. Cláudia Gallo pelos conselhos que fizeram toda a diferença!!!

À Dr^a. Claudete Klumb que sempre esteve disposta a me ajudar!

As pessoas queridas que fizeram parte desses 2 anos de dissertação: Roberta, Luiza, Thais, Leo Azul, Tati, Andreinha, Angélica, Andrea, Reinaldo, Willy, Samir, Theresa, Raphael, Flávio, Carlinha, Lívia, David, Michele, Nuccia, Roberta, Wagner, Antônio, Clara, Aline e Camila.

Aos amigos da UNIRIO por todo apoio e amizade! Fernanda, Jaqueline, Bárbara, Tatiana e Rafael vocês são demais!!!

Aos Laboratórios do Instituto de Bioquímica Médica, em especial, ao laboratório do professor Marcelo Fantappié, Pedro Lagerblad, Débora Foguel e Jerson Lima. Obrigado a todos os alunos!

Ao aluno Zé Henrique, pela ionomicina!!!

Aos alunos Guilherme e Théo, pela disponibilidade em ceder um cantinho no shaker para as minhas amostras!!!!

Ao professor Marcelo Rosado Fantappié, pela ótima receptividade em seu laboratório. Obrigada pelos cafés e lanchinhos!!!!

Aos alunos de IC Anderson, Juliana e Flash; pelo carinho e pelos momentos de descontração!!!! Estou esperando o churrasco em Xerém!!!

Ao Laboratório de Genética Molecular de Eucariotos, em especial, ao professor Carlos Augusto Soares. Ao aluno de doutorado Marcus Senra, obrigada por todo carinho e ajuda!

Ao Laboratório de Genômica Funcional e Transdução de Sinal, em especial, ao professor Gilberto Sachetto. Obrigada pela carinhosa recepção de todos (Regis, Diego, Ricardo, Amanda, Luiza, Fátima e Luis).

Ao Laboratório de Virologia Molecular Animal (LAVIMOAN), em especial, ao professor Renato Santana e as alunas de doutorado Ana Luiza e Celina. Obrigado pela recepção e carinho com que sempre fui tratada neste laboratório. Ao professor Renato Santana, pela nova e promissora colaboração. À aluna Ana Luiza, pela ajuda em todos os experimentos com HIV. Obrigada pela sua paciência! À aluna Celina, por sempre estar disposta a me ajudar! Aos demais alunos e funcionários!

Aos funcionários da secretaria de pós-Graduação: Tereza, Patrícia e Leandro.

Aos membros e suplentes da banca examinadora, pela disponibilidade de participar desse importante momento na minha vida profissional.

Às agências de fomento CNPq e FAPERJ.

RESUMO

A ubiquitinação foi inicialmente descrita como um mecanismo de marcação de proteínas destinadas à degradação. Hoje já se sabe que a ubiquitinação também é responsável pela regulação da função, localização e interações de proteínas. A ubiquitinação também está envolvida na regulação de diversas funções do sistema imune. Neste contexto, a ubiquitina ligase TRAC-1/RNF125 foi identificada em uma varredura de genes envolvidos na regulação de células T. Esta proteína contém um domínio C3HC4-RING, três domínios do tipo “dedo de zinco” e um domínio UIM. Uma busca por seqüências de aminoácidos semelhantes à TRAC-1/RNF125 identificou três proteínas humanas homólogas: RNF114, RNF138 e RNF166. Pouco se sabe a respeito dessas proteínas, porém a similaridade entre TRAC-1/RNF125 e essas ligases de ubiquitina, pode indicar funções semelhantes. O presente estudo busca caracterizar melhor as ligases de ubiquitina TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166; e entender alguns aspectos da biologia dessas proteínas. TRAC-1/RNF125 é capaz de se auto-ubiquitinar e essa característica contribui para uma meia-vida inferior a 30 minutos no interior das células. Experimentos *in vivo* mostram que mutações nos 8 resíduos de lisinas presentes em TRAC-1/RNF125 resultam em um aumento da estabilidade desta proteína. As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 apresentam uma estabilidade maior do que TRAC-1/RNF125 e também são capazes de interagir com ubiquitinas. Ao contrário de TRAC-1/RNF125, essas proteínas não estão associadas à membranas. RNF114 é exclusivamente citoplasmática, RNF166 se apresenta distribuída por toda a célula e RNF138 é predominantemente nuclear. Utilizamos a ativação de células Jurkat como ensaio funcional para RNF114, RNF138 e RNF166; comparadas à TRAC-1/RNF125 e seus diferentes mutantes. Os resultados confirmam uma redução da ativação de células T por TRAC-1/RNF125 e sugerem que apenas RNF138 também é capaz de reduzir a ativação dessas células, mensurado pela expressão de CD69. Além disso, as ligases de ubiquitina TRAC-1/RNF125, RNF114 e RNF166 não são fosforiladas por PKC ou CKII, *in vitro*. Assim, nossos estudos sugerem que apesar da sua homologia, essas ligases de ubiquitina não possuem funções redundantes.

ABSTRACT

Ubiquitination has long been known to target proteins for degradation. More recently, ubiquitination was also shown to modulate the function, localization and interaction of target proteins. Moreover, it has become clear that ubiquitination is crucially involved in the regulation of T-cell functions. The protein TRAC-1/RNF125 was identified in a functional screen for T-cell regulators. This protein contains a C3HC4 RING domain, three zinc-finger-like domains and a UIM domain. Protein BLAST searches with RING domain of TRAC-1/RNF125 revealed that homologous sequences are present in other human proteins: RNF114, RNF138 and RNF166. The similarities between TRAC-1/RNF125 and its family members raise the possibility that these proteins may be involved in similar activities. Little is known about TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 and RNF166 proteins and how their functions are regulated in the cells. The present study seeks to better characterize these ubiquitin ligases in order to clarify some aspects of their biology. TRAC-1/RNF125 ubiquitinates itself and these events result in its short life (~30 minutes) inside the cells. Using experiments *in vivo*, we showed that mutations in all of the 8 lysine residues present TRAC-1/RNF125 resulted in an increased stability of this protein, when compared to wild-type protein. RNF114, RNF138 and RNF166 present a higher stability than TRAC-1/RNF125 and also able to interact with ubiquitins. Unlike TRAC-1/RNF125, these proteins are not associated with membranes. RNF114 is exclusively cytoplasmatic, RNF166 is homogenously distributed in the cell cytoplasmatic and nucleus; and RNF138 is mainly nuclear. The functional study of TRAC-1/RNF125 wild-type and mutants, RNF114, RNF138 and RNF166 in Jurkat cells activation assays confirms that the intact RING domain of TRAC-1/RNF125 is necessary to inhibit T-cell activation. Moreover, among the others members of this family of ubiquitin ligases, only RNF38 inhibited activation of Jurkat cells as measured by expression of the activation marker CD69. Moreover, the ubiquitin ligases TRAC-1/RNF125, RNF114 and RNF166 are not phosphorylated by PKC or CKII in "*in vitro*" assays. Taken together, our results so far indicate that despite their homology, these ubiquitin ligases do not have redundant functions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processos celulares dependentes de conjugação da ubiquitina -----	01
Figura 2 – Esquema da ligação isopeptídica entre a ubiquitina e o substrato -----	02
Figura 3 – Estrutura primária da Ubiquitina -----	02
Figura 4 – Cascata Enzimática de Ubiquitinação -----	04
Figura 5 – Estrutura hierárquica das enzimas envolvidas na Cascata de Ubiquitinação -----	05
Figura 6 – Regulação de NF- κ B via TLR e Ubiquitinação -----	10
Figura 7 – Cascata de Sinalização mediada por RIG-I -----	11
Figura 8 – Eventos de sinalização celular após a ativação do receptor de células T -----	14
Figura 9 – Esquema da estrutura da proteína TRAC-1/RNF125 com seus principais domínios -----	18
Figura 10 – Análise de expressão gênica de TRAC-1/RNF125 em diferentes tipos celulares -----	20
Figura 11 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas humanas TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166 -----	22
Figura 12 - Análise de expressão gênica de RNF114 em diferentes tipos celulares -----	24
Figura 13 - Análise de expressão gênica de RNF138 em diferentes tipos celulares -----	26
Figura 14 – Análise de expressão gênica de RNF166 murino em diferentes tipos celulares -----	28
Figura 15 – Alinhamento das proteínas TRAC-1/RNF125 de diferentes espécies -----	49
Figura 16 – Alinhamento da proteína humana TRAC-1/RNF125 e seus respectivos mutantes -----	51
Figura 17 – A proteína TRAC-1/RNF125 possui uma meia-vida inferior a 30 minutos -----	53
Figura 18 – A proteína ALLK-TRAC-1 possui uma meia-vida em torno de 60 minutos -----	53

Figura 19 – A proteína V217P/S221Q-TRAC-1 continua estável após 120 minutos de tratamento com cicloheximida -----	54
Figura 20 - Localização celular da proteína TRAC-1/RNF125 e de seus respectivos mutantes -----	56
Figura 21 – A proteína ALLK-TRAC-1 é capaz de interagir com ubiquitinas -----	58
Figura 22 - A proteína ALLK-TRAC-1 é capaz de reduzir a ativação de células T -----	60
Figura 23 - A proteína TRAC-1/RNF125 apresenta sítios putativos de fosforilação por PKC -----	61
Figura 24 - A proteína TRAC-1/RNF125 não é fosforilada por PKC -----	62
Figura 25 - Alinhamento das proteínas RNF114 de diferentes espécies -----	64
Figura 26 - Alinhamento das proteínas RNF138 de diferentes espécies -----	65
Figura 27 - Alinhamento das proteínas RNF166 de diferentes espécies -----	66
Figura 28 - Alinhamento das proteínas humanas RNF125, RNF114, RNF138, RNF166 e do mutante A229P,S233Q-RNF166-----	67
Figura 29 - A proteína RNF114 continua estável após 2 horas de tratamento com cicloheximida -----	68
Figura 30 - A proteína RNF114 endógena continua estável após 6 horas de tratamento com cicloheximida -----	69
Figura 31 - A proteína RNF138 é estável por até 120 minutos -----	70
Figura 32 - A proteína RNF166 continua estável após 2 horas de tratamento com cicloheximida -----	71
Figura 33 - A proteína RNF166 continua estável após 6 horas de tratamento com cicloheximida -----	72
Figura 34 - Localização celular das proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 -----	73
Figura 35 - As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 não são associadas à membranas celulares -----	74

Figura 36 - As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 são capazes de interagir com ubiquitinas -----	76
Figura 37 - A proteína RNF138 é capaz de reduzir a ativação de células T -----	78
Figura 38 - As proteínas RNF114 e RNF166 apresentam sítios putativos de fosforilação por PKC e CKII -----	79
Figura 39 - As proteínas RNF114 e RNF166 não são fosforiladas por PKC -----	80
Figura 40 - As proteínas RNF114 e RNF166 não são fosforiladas por CKII -----	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Complexo promotor da anáfase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina tri-fosfato
BCR	Receptor de células B
CAA	Célula apresentadora de antígeno
cDNA	DNA complementar
C- terminal	Carboxi-terminal
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CARD	Caspase recruitment domain
Cbl	casitas B-lineage lymphoma
CD	Doença de Crohn
CD3	Grupamento de diferenciação 3
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CD8	Grupamento de diferenciação 8
CKII	Caseína cinase II
cm	centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CHX	cicloheximida
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
E1	Enzima ativadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima ligase de ubiquitina
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FSC	forward scatter (tamanho)
g	gramas

GFP	Proteína de fluorescência verde
GST	Glutathione S-transferase
GRAIL	Gene related to anergy in lymphocytes
HA	Hemaglutinina A
Hanks	Hanks' Balanced Salt Solution
HCV	Vírus da Hepatite C
HECT	Homologous with E6-associated protein C-terminus
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HSP90	proteína de choque térmico 90
IFN-I	Interferon do tipo I
IFN- β	Interferon- β
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-21	Interleucina 21
IPS-1	Interferon- β promoter stimulator 1
ISG15	Interferon- Stimulated gene 15
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRAK4	interleukin-1 receptor-associated kinase 4
kDa	Quilodáton (s)
L	Litro
Lck	leukocyte-specific protein tyrosine kinase
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
mA	miliamperagem
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
MDA5	Melanoma differentiation-associated gene 5
Mdm2	murine double minute 2
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

min	minuto
NARF	NLK-associated RING finger protein
NEM	N-etilmaleimida
NF- κ B	Fator nuclear-Kappa B
NFAT1	Fator nuclear de células T ativadas
NLK	Nemo-like kinase
N-terminal	Amino-terminal
Nedd8	Neural precursor Cell-expressed Developmentally Downregulated-8
NK	Natural Killer
nm	nanômetro
NaF	Fluoreto de sódio
NH ₂	amino
NP-40	nonyl phenoxy polyethoxy ethanol - 40
p53	Proteína tumoral 53
PAMP	Padrões moleculares associados à patógenos
pb	pares de base
PLC γ 1	Fosfolipase C
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	paraformaldeído
PKC	Proteína cinase C
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PRR	Região rica em prolina
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
RING	Really Interesting New Gene
RNA	Ácido ribonucleico
RNF125	Ring finger protein 125
RNF128	Ring finger protein 128
RNF138	Ring finger protein 138
RNF166	Ring finger protein 166

RLR	Receptor do tipo RIG-I
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SUMO	Small Ubiquitin-Related Modifier
SSC	Side scatter (granulosidade)
TBS	Tampão Tris Salina
TCF	T-cell Factor
TCR	Receptor de células T
TKB	Tyrosine kinase-binding
TLR	Receptores do tipo Toll
TRAC-1	T-cell RING protein in activation
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor
TRIM25	Tripartite motif protein 25
TRIM α	Tripartite motif protein 5 α
Ub	Ubiquitina
UIM	Motivo de interação com ubiquitinas
V	Volts
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70
ZNF313	Zinc finger protein 313
Δ	truncado
α	alfa
β	beta
ζ	Zeta
μ L	microlitro
μ g	micrograma
x g	Gravidade
%	porcentagem
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
μ Ci	microCurie
μ F	microfaraday

A	Ala	alanina
C	Cys (Cis)	cisteína
D	Asp	aspartato
E	Glu	glutamato
F	Phe (Fen)	fenilalanina
G	Gly (Gli)	glicina
H	His	histidina
I	Ile	isoleucina
K	Lys (Lis)	lisina
L	Leu	leucina
M	Met	metionina
N	Asn	asparagina
P	Pro	prolina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
S	Ser	serina
T	Thr (The)	treonina
V	Val	valina
W	Trp	triptofano
Y	Tyr (Tir)	tirosina

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS -----	vi
RESUMO -----	ix
ABSTRACT -----	x
LISTA DE FIGURAS -----	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS -----	xiv
SUMÁRIO -----	xix
1- INTRODUÇÃO -----	01
1.1- Ubiquitinação -----	01
1.1.1- Ubiquitina -----	02
1.1.2- Cascata Enzimática -----	03
1.1.3- Estrutura Hierárquica das E1, E2 e E3 -----	05
1.1.4- Proteassoma -----	06
1.1.5- Integração das Modificações Pós-Traducionais Ubiquitinação e Fosforilação -----	06
1.2- Enzimas Ligases de Ubiquitina (E3) -----	08
1.2.1- Ligases de Ubiquitina (E3) e Regulação do Sistema Imune -----	09
1.2.1.1- E3 na Imunidade Inata -----	09
1.2.1.2- E3 na Imunidade Adaptativa -----	13
1.3- TRAC-1/RNF125 (T-cell Ring protein in activation) -----	17
1.3.1- Identificação da Proteína -----	17
1.3.2- Caracterização Funcional dos Domínios de TRAC-1/RNF125 -----	18
1.3.3- Funções de TRAC-1/RNF-125 -----	20
1.4- Novas Proteínas da Sub-família de TRAC-1/RNF125 -----	22
1.4.1- RNF114 / ZNF313 -----	23
1.4.2- RNF138 -----	25
1.4.3- RNF166 -----	27
2- OBJETIVOS -----	29
2.1 - Objetivo Geral -----	29
2.2 - Objetivos Específicos -----	29
3- MATERIAL E MÉTODOS -----	30
3.1- Plasmídeos -----	30

3.2- Alinhamento de seqüências de aminoácidos -----	31
3.2.1- TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138, RNF166 e mutantes -----	31
3.2.2- TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138, RNF166 em diferentes espécies -----	31
3.3- Cultura de Células -----	32
3.4- Transfecção de Células -----	33
3.5- Tratamento com Cicloheximida -----	34
3.6- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e <i>Western blot</i> - -----	35
3.7- Quantificação: Densitometria das Bandas -----	37
3.8- Imunoprecipitação de Proteínas -----	38
3.9- Imunofluorescência -----	39
3.10- Gradiente de Sacarose -----	40
3.11- Produção de Proteínas de Fusão e Ensaio de Fosforilação <i>in vitro</i> -	41
3.12- Ensaio de Ativação de Células T -----	43
3.13- Análise por Citometria de Fluxo (FACS) -----	45
4 – RESULTADOS -----	47
4.1- Parte I -----	47
4.1.1- Alinhamento das Seqüências de Aminoácidos da Proteína TRAC- 1/RNF125 de diferentes espécies -----	47
4.1.2- Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos da proteína humana TRAC-1/RNF125 e respectivos mutantes -----	50
4.1.3- Análise da Estabilidade da Proteína Humana TRAC-1/RNF125 e de seus diferentes Mutantes -----	52
4.1.4- Localização Intracelular da Proteína TRAC-1/RNF125 e de seus diferentes Mutantes -----	55
4.1.5- Ensaio de Interação do Mutante ALLK-TRAC-1 com Ubiquitinas ---	57
4.1.6- Avaliação Funcional da Expressão da Proteína Mutante ALLK- TRAC-1 em Células Jurkat -----	59
4.1.7- Ensaio de Fosforilação <i>in vitro</i> com a Proteína TRAC-1/RNF125 ---	61
4.2- Parte II -----	63
4.2.1- Alinhamentos das Seqüências de Aminoácidos das Proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 de diferentes Espécies -----	63

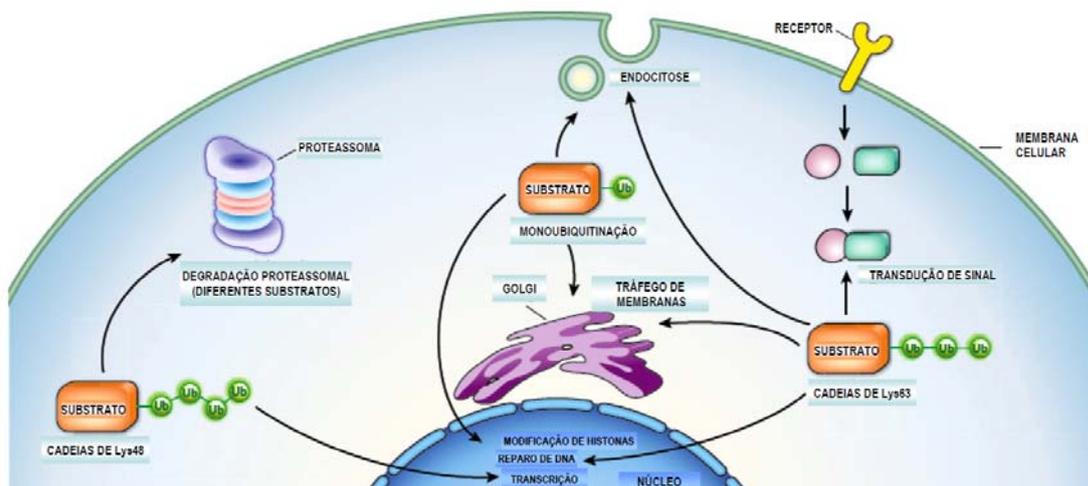
4.2.2- Alinhamento entre as Seqüências de Aminoácidos das Proteínas Humanas RNF114, RNF138, RNF166 e o Mutante A229P,S233Q-RNF166 -----	67
4.2.3- Análise da Estabilidade das Proteínas Humanas RNF114, RNF138 e RNF166 -----	68
4.2.4- Localização Intracelular das Proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 -----	73
4.2.5- Ensaio de Interação das Proteínas RNF114, RNF138, RNF166 e do Mutante A229P,S233Q-RNF166 com Ubiquitinas -----	75
4.2.6- Avaliação Funcional da Expressão das proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 em células Jurkat -----	77
4.2.7- Ensaio de Fosforilação in vitro com as Proteínas RNF114 e RNF166 -----	79
5- DISCUSSÃO -----	82
6- CONCLUSÕES -----	88
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	90

1- INTRODUÇÃO

1.1- Ubiquitinação

Com a descoberta nos anos 70 do sistema ubiquitina-proteassoma emergiu o conceito de que certas proteínas intracelulares eram marcadas com ubiquitinas para degradação via um complexo multi-enzimático, denominado de proteassoma 26S (CIECHANOVER *et al*, 1980 e HERSHKO *et al*, 1980). Mais tarde, novos trabalhos mostraram que variações na forma com que as ubiquitinas marcavam cada substrato, influenciavam nos diferentes destinos das proteínas-alvo, sendo muitos deles não-proteolíticos (SPENCE *et al*, 1995).

A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional rápida e reversível, cujas conseqüências podem ser: endocitose de receptores de membrana, alteração de localização celular; degradação da proteína alvo pelo proteassoma, mediação de interações entre proteínas, reparo de DNA e regulação da transcrição (WILKINSON, 2005 e HOCHSTRASSER, 2009 – Figura 1).

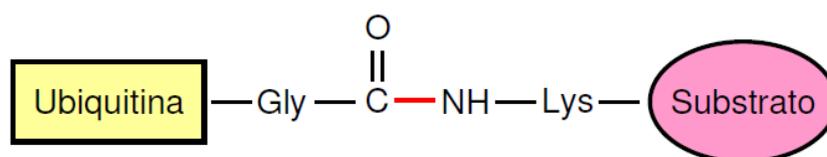


HOCHSTRASSER, 2009 – NATURE

Figura 1: Processos celulares dependentes de conjugação da ubiquitina. Endocitose de receptores, degradação via proteassoma, transdução de sinal, reparo de DNA, entre outros.

1.1.1- Ubiquitina

Ao contrário de outras modificações pós-traducionais, como fosforilação e acetilação, que envolvem a adição de grupamentos químicos a determinados aminoácidos, a ubiquitinação envolve a ligação covalente de uma pequena proteína de 76 aminoácidos (ubiquitina-9kDa) a resíduos de lisina presentes no substrato (NERIAH, 2002 e PICKART, 2004 – Figura 2).



Adaptado – Principles of Biochemistry, 2006

Figura 2: Esquema da ligação isopeptídica entre a ubiquitina e o substrato. A ligação se dá entre o grupamento C-terminal do resíduo de glicina da ubiquitina e o grupamento épsilon amino da cadeia lateral do resíduo de lisina do substrato.

A ubiquitina é extremamente conservada entre os eucariotos e se encontra livre no citoplasma ou associada a diferentes tipos de proteínas. Sua forma madura consiste em uma assinatura de duas glicinas na porção C-terminal expostas após um processamento proteolítico (HOCHSTRASSER, 1996 e PICKART *et al*, 2004). Recentemente foi mostrado que alguns procariotos possuem uma proteína similar a ubiquitina, denominada de Pup (~6,9 kDa), capaz de se ligar a resíduos de lisina de proteínas; destinando-as a degradação proteolítica (PEARCE *et al*, 2008).

Ao longo de sua estrutura primária, a ubiquitina apresenta sete resíduos de lisinas (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63) que são utilizados durante a formação das cadeias de poliubiquitinas (Figura 3).

MQIFV**K**TLTG**K**TITLEVEPSDTIENV**KAKI**QDK**E**GIPP
 DQ**Q**RLIFAG**K**QLEDGRTLSDYNIQ**K**ESTLHLVLR**L**RGG

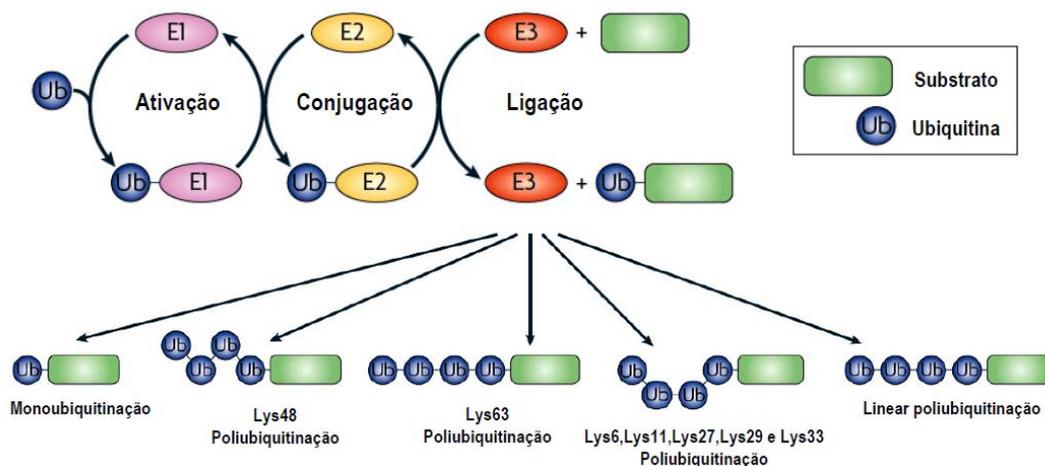
Figura 3: Estrutura primária da Ubiquitina. A ubiquitina apresenta 76 aminoácidos ao longo de sua cadeia. Em negrito estão destacados os sete resíduos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63) da ubiquitina.

Além da ubiquitina, outras moléculas como Nedd8, SUMO, ISG15; fazem parte da grande família de marcadores que modulam a estabilidade, função e localização de outras proteínas. Nedd8 (9 kDa), SUMO (11,5 kDa) e ISG15 (15 kDa) apresentam tamanhos semelhantes ao da ubiquitina, porém enquanto Nedd8 e SUMO estão distribuídas entre todos os eucariotos; ISG15 é exclusivo de mamíferos. Todas essas proteínas são capazes de formar uma ligação isopeptídica com o grupamento épsilon amino da cadeia lateral do resíduo de lisina do substrato; porém somente ISG15 e SUMO são capazes de formar cadeias como a ubiquitina (HERRMANN *et al*, 2007).

1.1.2- Cascata Enzimática

O processo de ubiquitinação envolve múltiplas reações enzimáticas catalisadas por pelo menos três classes de enzimas: a enzima ativadora de ubiquitina E1, a enzima conjugadora de ubiquitina E2 e a enzima ligase de ubiquitina E3.

Primeiramente, a ubiquitina é ativada pela enzima E1 através de uma ligação tiol-éster entre o grupamento tiol (-SH) do resíduo de cisteína do sítio de ativação da E1 com grupamento C-terminal do resíduo de glicina da ubiquitina. Esta etapa requer gasto de energia havendo assim hidrólise de ATP. Devidamente ativada pelo complexo E1-Ub, a ubiquitina é transferida para a enzima E2 formando uma nova ligação tiol-éster, desta vez com a E2. Em seguida, acontece a interação entre o complexo E2-Ub e a enzima E3, que por sua vez, conduz o substrato ao encontro da ubiquitina. São as ligases de ubiquitina que conferem especificidade ao processo de ubiquitinação, pois são elas que reconhecem e interagem com o substrato, de forma específica. A partir daí, a ubiquitina é covalentemente ligada ao substrato, através de uma ligação isopeptídica entre o grupamento C-terminal do resíduo de glicina da ubiquitina e o grupamento épsilon amino da cadeia lateral do resíduo de lisina do substrato (CIECHANOVER *et al*, 2000 e SUN, 2003 – Figura 2 e Figura 4). Existem ainda as E4; enzimas que participam do alongamento das cadeias de poliubiquitinas, favorecendo a degradação proteossomal de determinadas proteínas (KOEGL *et al*, 1999).



DIKIC *et al*, 2009 – Mol. Cell Biology

Figura 4: Cascata Enzimática de Ubiquitinação. O processo requer a participação, de pelo menos, três classes de enzimas: E1 (ativadora de ubiquitina), E2 (conjugadora de ubiquitina) e E3 (ligase de ubiquitina). Os substratos podem ser ubiquitinados via Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 e Lys63, formando monoubiquitinações ou cadeias de poliubiquitinas.

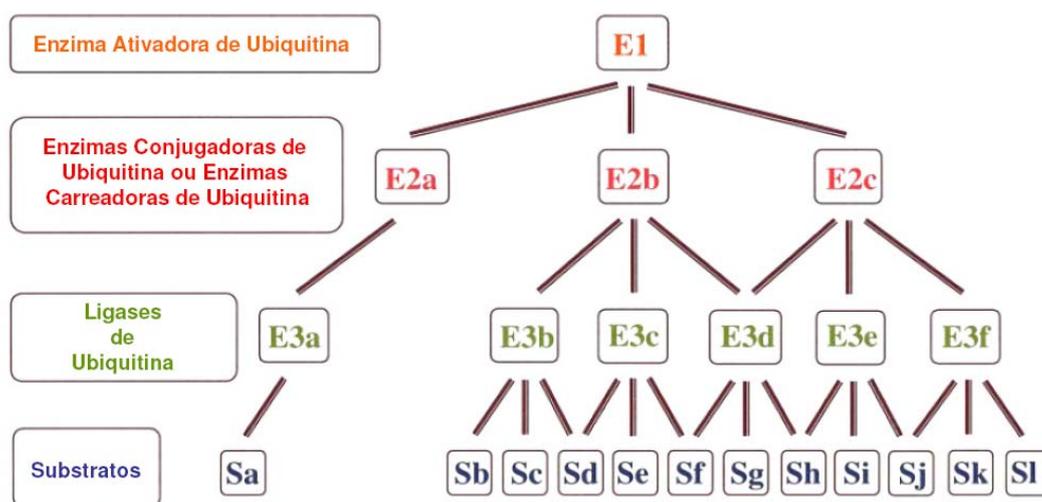
Os resíduos de lisina parecem ser os principais sítios de ligação de ubiquitinas em proteínas, embora já se saiba que essas modificações também ocorrem eventualmente em resíduos de cisteínas ou grupamentos α -NH₂ em regiões N-terminal (BREITSCHOPF *et al*, 1998 e CADWELL *et al*, 2005). Essas variações podem acontecer devido a uma inacessibilidade da ubiquitina aos resíduos de lisinas ou mesmo da porção N-terminal; fazendo com que ligações tiol-éster (Ub-cisteína) ocorram mais facilmente do que ligações isopeptídicas (Ub-lisina) (PETROSKI, 2008).

Os substratos podem ser mono ou poliubiquitinados. As cadeias de ubiquitinas podem ser formadas utilizando qualquer uma das lisinas presentes na ubiquitina. Porém, a maioria das cadeias é formada pelas lisinas 48, 63 ou 29 da ubiquitina e cada tipo de cadeia determina o destino do substrato ubiquitinado (FINLEY *et al*, 2004). Cadeias de ubiquitinas formadas via K48 e K29 sinalizam a proteína alvo para degradação via proteassoma; no entanto, a monoubiquitinação ou a poliubiquitinação via K63 não resultam na degradação, mas estão envolvidas na alteração da função do substrato ou na mediação de interações proteína-proteína. A monoubiquitinação de proteínas, em um ou mais resíduos de lisina, está envolvida na endocitose de receptores e

regulação de histonas; já a poliubiquitinação via K63 está relacionada a eventos intracelulares como ativação de cinases, sinalização inflamatória e reparo do DNA (VENTII *et al*, 2008 e SATO *et al*, 2008).

1.1.3- Estrutura Hierárquica das E1, E2 e E3

Até o momento, apenas duas E1 e aproximadamente cinquenta E2 foram identificadas, mas a análise do genoma humano sugere a presença de pelo menos 600 diferentes E3 (BHOJ *et al*, 2009). A estrutura hierárquica do maquinário de conjugação a ubiquitina é descrita da seguinte forma: uma única E1 é capaz de ativar ubiquitinas para diferentes eventos, e é também apta a transferir ubiquitinas ativadas para diversas enzimas E2. Cada E2 é capaz de interagir com uma única (E2a) ou algumas enzimas E3 (E2b). As enzimas E3 são específicas para determinados substratos (E3a) ou podem reconhecer mais de um tipo de substrato (E3b). Porém uma pequena parte dos substratos também pode ser reconhecida por mais de uma E3 (Sd), desde que os sítios de reconhecimento do substrato sejam diferentes para cada E3 (CIECHANOVER *et al*, 2000; CIECHANOVER, 1998 e Figura 5).



CIECHANOVER, 1998- EMBO Journal

Figura 5: Estrutura hierárquica das enzimas envolvidas na Cascata de Ubiquitinação. Uma única enzima E1 é capaz de ativar ubiquitinas para diversas enzimas E2. Cada enzima E2 é capaz de interagir com diferentes enzimas E3 ou de forma específica com uma única E3. Já as enzimas E3 são substrato-específico e poucos substratos são capazes de serem reconhecidos por mais de uma E3.

1.1.4- Proteassoma

O proteassoma 26S é uma estrutura multicatalítica capaz de degradar proteínas poliubiquitinadas a pequenos peptídeos (SOROKIN *et al*, 2009). Ele é composto de duas subunidades: o complexo catalítico central 20S e dois complexos regulatórios 19S localizados nas extremidades. Na subunidade 19S ocorre o reconhecimento dos substratos poliubiquitinados, a ação de deubiquitinasas liberando as ubiquitinas e o encaminhamento dos substratos ao cerne catalítico; enquanto que na subunidade 20S, os substratos são alvos de clivagem proteolítica pela ação de inúmeras proteases. Após a degradação dos substratos, as ubiquitinas são recicladas para novos eventos de ubiquitinação e os aminoácidos livres podem ser utilizados na síntese de novas proteínas (CIECHANOVER *et al*, 2000 e NERIAH, 2002).

1.1.5- Integração das Modificações Pós-Traducionais Ubiquitinação e Fosforilação

Além da ubiquitinação, uma variedade de proteínas pode ser regulada também pela fosforilação. Como mencionado anteriormente, a ubiquitinação se dá pela adição de uma ubiquitina a resíduos de lisinas (podendo acontecer também em cisteínas e em grupamento α -NH₂); já na fosforilação, a adição do grupamento fosfato ocorre preferencialmente em serinas, treoninas e tirosinas.

A fosforilação pode regular a ubiquitinação em diversas formas tais como: regulando positivamente ou negativamente a atividade de E3-ligases de ubiquitina; criando ou expondo fosfodegrons, sinais específicos que permitem o reconhecimento do substrato pelas E3s ou ainda proteínas cinases podem ser reguladas via ubiquitinação (HUNTER, 2007).

As ligases de ubiquitina da família Cbl, c-Cbl e Cbl-b; possuem além do domínio RING; um domínio TKB (tyrosine kinase-binding) que possibilita a sua interação com receptores de tirosina cinase ou proteínas cinases livres. A autofosforilação do receptor de tirosina cinase EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal) cria sítios de reconhecimento para a ligase c-Cbl, que é capaz de promover a ubiquitinação e degradação do receptor. Além disso, Cbl-

b e c-Cbl são capazes de ubiquitinar as cinases Lck e ZAP70, envolvidas na cascata de sinalização durante o engajamento do TCR (receptor de células T). A proteína cinase Lck se liga a c-Cbl e a fosforila via tirosina. A partir daí, c-Cbl sofre alterações conformacionais que permite a interação da enzima E2-Ub com o substrato Lck; resultando na ubiquitinação e degradação desta cinase (SANJAI *et al*, 2001 e THIEN *et al*, 2005). Outra ligase de ubiquitina que também pode ser regulada via fosforilação é a Mdm2. Durante eventos que geram danos ao DNA, Mdm2 é fosforilada via serina / treonina e sofre alterações conformacionais que a impede de interagir com a proteína p53 e promover a sua ubiquitinação (HUNTER, 2007).

1.2- Enzimas Ligases de Ubiquitina (E3)

As ligases de ubiquitina são o elemento central da ubiquitinação, já que são capazes de selecionar especificamente substratos e interagir com as proteínas E2. As E3s são formadas por diferentes famílias determinadas pela presença de domínios distintos: RING (“Really Interesting New Gene”), HECT (homologia a E6AP carboxi-terminal) e U-Box.

O domínio RING, definido pela seqüência consenso $CX_2CX_{(9-39)}CX_{(1-3)}HX_{(2-3)}CX_2CX_{(4-48)}CX_2C$, consiste em um pequeno motivo rico em aminoácidos cisteínas e histidinas, estabilizados por dois íons de zinco; conferindo uma conformação globular (JOAZEIRO *et al*, 2000 e FREEMONT, 2000). Este domínio assemelha-se ao domínio “zinc-finger”, encontrado em proteínas que interagem com DNA, diferindo na distância entre os aminoácidos que interagem com o zinco (BORDEN, 2000 e DESHAIES *et al*, 2009). As ligases de ubiquitina da família HECT possuem um domínio de aproximadamente 350 aminoácidos, originalmente identificado em E6-AP, que é uma ligase de ubiquitina recrutada pela oncoproteína do Vírus do Papiloma Humano E6 para a degradação da proteína p53 (TALIS *et al*, 1998). Já a família U-box possui um domínio que, apesar da ausência de aminoácidos que interagem com zinco, assume a conformação globular semelhante ao domínio RING. (HATAKEYAMA *et al*, 2001 e PICKART *et al*, 2004).

As associações entre os domínios RING, HECT e U-box das E3s e as enzimas E2 são essencialmente importantes para as funções biológicas destas E3s (JOAZEIRO *et al*, 1999 e JACKSON *et al*, 2000). Nas famílias de ligases de ubiquitina de domínio RING e U-box, a ubiquitina ligada a E2 é transferida diretamente para o substrato; excluindo qualquer ligação direta da enzima E3 com a ubiquitina (PICKART *et al*, 2004). O domínio RING ou U-box interage com a enzima E2, favorecendo a aproximação entre o substrato e a ubiquitina, ligada a E2 (ZHENG *et al*, 2000). Já nos eventos envolvendo ligases de ubiquitina da família HECT, este domínio interage com as enzimas E2, recebe a ubiquitina e a transfere para o substrato (TALIS *et al*, 1998).

As ligases de ubiquitina também podem funcionar como grandes complexos formados pela reunião de várias proteínas, como o APC (Anaphase-promoting complex) e o SCF (Skp1, cullin, F-box). Esses complexos contêm

culinas responsáveis pelo ancoramento de proteínas que apresentam o domínio RING, essencial para a interação com a E2. O complexo APC, o primeiro a ser descrito, é responsável pela degradação de substratos que controlam o ciclo celular na transição da metáfase para anáfase e pela degradação da ciclina B, indicando o término da mitose (CIECHANOVER *et al*, 2000).

1.2.1- Ligases de Ubiquitina (E3) e Regulação do Sistema Imune

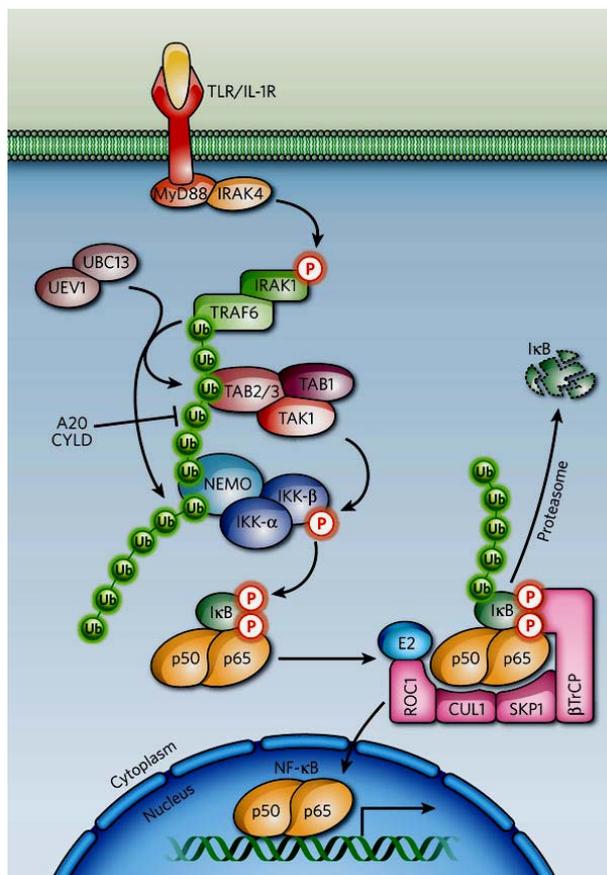
As ligases de ubiquitina vêm sendo descritas como proteínas importantes para a regulação das respostas imunes, pois contribuem para o balanço ativação/tolerância. As E3s estão envolvidas tanto em eventos da resposta imune inata (controle de infecções virais) quanto da resposta imune adaptativa (desenvolvimento de tímócitos, apresentação de antígeno, regulação da ativação de células-T e regulação de processos de anergia), como será discutido abaixo (BHOJ *et al*, 2009 e MARTÍN *et al*, 2007).

1.2.1.1- E3 na Imunidade Inata

A imunidade inata consiste na primeira linha de defesa contra microorganismos. Quando patógenos rompem a barreira física, eles entram em contato com células que pertencem ou não ao sistema imune. A detecção dos patógenos é dada pela interação entre receptores do tipo TLRs (Toll-like receptors) ou RLRs (RIG-I-like receptors); e os PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos). A partir daí, cascatas de sinalização são ativadas acarretando a indução de quimiocinas, citocinas e uma série de moléculas antimicrobianas.

Os TLRs (Toll-like receptors) são receptores associados à membranas e que possuem uma porção citosólica formada pelo domínio TLR/IL-1R (TIR). Após um estímulo por fungos, bactérias, parasitas ou vírus; a porção TIR interage com a proteína adaptadora MyD88, que por sua vez recruta proteínas da família IRAK: IRAK4 e IRAK1. A cinase IRAK4 é ativada após interagir com

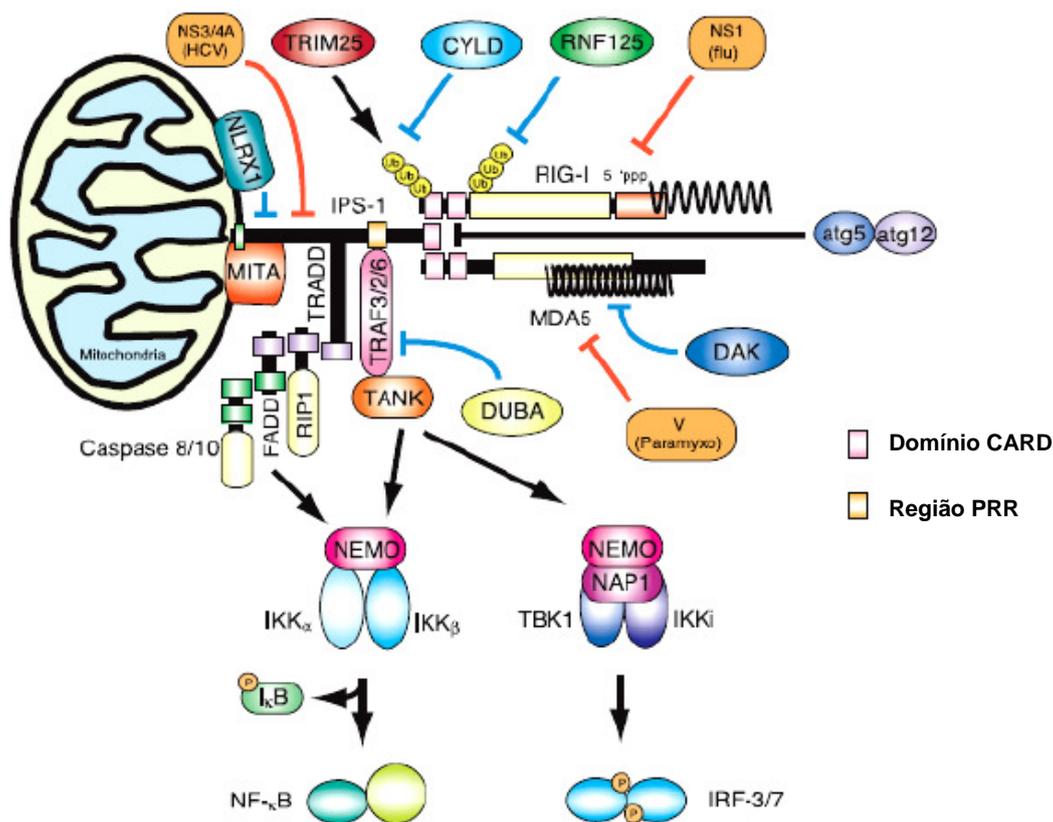
o adaptador MyD88, e com isso fosforila IRAK1 que se associa com TRAF6. Esta é uma ligase de ubiquitina capaz de formar cadeias de poliubiquitinas via K63, possibilitando o ancoramento de TAK1 e IKK- β . Essa aproximação leva à fosforilação de IKK- β por TAK1, que uma vez fosforilado, também fosforila I κ B. A partir daí, I κ B fosforilada é reconhecida pelo complexo SCF-E3, que juntamente com uma E2, formam cadeias de poliubiquitinas via K48 levando a degradação via proteassoma. Esta degradação libera no citoplasma o NF- κ B, que imediatamente é translocado para o núcleo para regulação transcricional de vários genes que irão contribuir para a resposta imune (Figura 6). Outros TLRs são capazes de ativar diferentes cascatas de sinalização que culminam na indução de IFN-I (interferon do tipo-I) (BHOJ *et al*, 2009).



BHOJ *et al*, 2009 – Nature

Figura 6: Regulação de NF- κ B via TLR e Ubiquitinação. A sinalização mediada pelos TLRs envolve eventos de fosforilação por cinases (IRAK4 e TAK1), ubiquitinação via K63 (TRAF6) e K48 (SCF E3), resultando na degradação de I κ B e translocação de NF- κ B para o núcleo.

Os RLRs (RIG-I-like receptors) são constituídos pelos sensores virais RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) e LGP2. Esses receptores possuem domínios de RNA helicase capazes de reconhecer RNAs de fita simples ou dupla no citoplasma da célula. A porção N-terminal de RIG-I e MDA5 possui dois domínios CARD (caspase recruitment domain) que interagem com o domínio CARD presente na porção N-terminal da molécula adaptadora IPS-1 (interferon- β promoter stimulator 1), possibilitando uma intensificação do sinal estimulatório. Além do domínio CARD, IPS-1 apresenta uma região rica em prolina (PRR) e uma porção C-terminal ancorada à membrana externa da mitocôndria (YONEYAMA *et al*, 2009 e NAKHAEI *et al*, 2009 – Figura 7).



YONEYAMA ET AL, 2009 – Immunological Reviews

Figura 7: Cascata de Sinalização mediada por RIG-I. Durante infecções virais, RIG-I é ativado e interage com o adaptador IPS-1, que por sua vez interage com a membrana externa da mitocôndria promovendo uma cascata de sinalização que culmina na produção de INF- β e NF- κ B. As setas pretas e as linhas azuis representam regulações positivas e negativas do sinal, respectivamente. As linhas vermelhas representam a regulação por inibidores virais.

Durante infecções virais, RIG-I é marcado por cadeias de poliubiquitinas via K63 pela ligase de ubiquitina TRIM25 (RING). Essa ubiquitinação de RIG-I promove uma forte ligação entre RIG-I e IPS-1, levando a uma amplificação do sinal estimulatório. A partir daí, a região PRR do IPS-1 promove o recrutamento de uma série de moléculas como membros da família TRAF (TRAF3/2/6), que por sua vez transmitem sinais para a família de moléculas IKK; as quais são essenciais para ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e IRF-3/7 (Interferon regulatory factor) (Figura 7). Células deficientes em TRIM25 são incapazes de estimular a produção de interferon do tipo-I, em resposta a infecções virais. Além disso, apesar da semelhança entre RIG-I e MDA5; TRIM25 não é capaz de ubiquitinar MDA5, evidenciando diferentes regulações para o domínio CARD (GACK *et al*, 2007).

Ao contrário de TRIM25, a ligase de ubiquitina TRAC-1/RNF125 é descrita como um regulador negativo de RIG-I, já que é capaz de marcar RIG-I com cadeias de poliubiquitinas via K48; o que resulta na sua degradação pelo proteassoma, interrompendo a resposta antiviral. O mecanismo completo da participação de TRAC-1/RNF125 nesta via de sinalização ainda é desconhecido (ARIMOTO *et al*, 2006 - Figura 7). Além de TRAC-1/RNF125, a proteína ISG15 (IFN stimulated gene 15kDa) também é capaz de regular negativamente RIG-I (ARIMOTO *et al*, 2007 e KIM *et al*, 2008).

A proteína TRIM5 α , também uma ligase de ubiquitina com domínio RING, é caracterizada como um fator de restrição ao vírus HIV. TRIM5 α presente no citoplasma é capaz de inibir a entrada do cDNA viral no núcleo ou até mesmo a sua síntese (WU *et al*, 2006). Outro possível mecanismo de restrição viral de TRIM5 α é a rápida indução da degradação de Gag (gene que codifica proteínas do capsídeo) (SAKUMA *et al*, 2007). Apesar de apresentar uma estrutura similar a ligase de ubiquitina TRIM25, TRIM5 α não é capaz de interagir com RIG-I (GACK *et al*, 2007).

1.2.1.2- E3 na Imunidade Adaptativa

A resposta imune adaptativa é controlada pelas células T e células B. Os receptores de células T (TCR) reconhecem antígenos quando estes são apresentados na membrana de uma célula apresentadora de antígeno, ligados a uma molécula de MHC (complexo principal de histocompatibilidade); como as células dendríticas. O reconhecimento do complexo antígeno-MHC pelo TCR gera o primeiro sinal, mas é necessário também que ocorram sinais adicionais (co-estimulatórios) para a efetiva ativação das células T. Na ausência de co-estímulo, os sinais do complexo TCR/CD3 podem levar à inativação celular, um processo chamado de anergia. Após a ativação, as células T sofrem expansão clonal nos linfonodos e depois migram para o tecido infeccionado sendo guiadas por moléculas quimiotáticas, denominadas quimiocinas. As células T CD8⁺, após a interação MHC/antígeno-TCR, reconhecem células infectadas e provocam a sua morte diretamente por lise celular. Os linfócitos T CD4⁺ têm o papel de secretar citocinas que estimulam outras células a agir durante as respostas imunes. Por fim as células B são ativadas diretamente pelo contato antígeno-BCR (receptor de células B). Após a ativação, essas células proliferam, amadurecem e passam a secretar anticorpos específicos (BHOJ *et al*, 2009).

A ativação dos receptores de células T inicia cascatas de sinalização que são essenciais não só para o desenvolvimento do extenso repertório de linfócitos T no timo, como também na resposta imunológica de linfócitos T periféricos. Estas vias de sinalização envolvem vários eventos de fosforilação, mediado por cinases como Lck e Zap-70, de vários substratos como a cadeia ζ do complexo TCR/CD3 e das próprias cinases acima mencionadas. Além de eventos de fosforilação, ocorrem também eventos de ubiquitinação, mediados pela ligase de ubiquitina Cbl. Após ativação, o TCR é ubiquitinado, o que resulta na endocitose deste receptor e degradação em lisossomas (HICKE, 2001). Como mencionado acima, as tirosinas cinases Lck e Zap-70 também são ubiquitinadas após o engajamento do TCR. Lck, é um substrato de Cbl e esta cinase, depois de ativada, sofre alterações conformacionais que culminam na sua ubiquitinação e destruição (KANE, 2000; SINGER, 2002 e GIANNINI *et al*, 2004). Os sinais gerados pelo engajamento do TCR ativam múltiplas vias de

sinização, como a via Ras-MAP cinase e a via de PLC γ 1 (fosfolipase C), que uma vez fosforilada promove um aumento de Ca $^{2+}$ citosólico e DAG (diacilglicerol); levando a ativação das enzimas distais de sinização calcineurina e PKC, importantes para a ativação de fatores de transcrição como NFAT (fator nuclear das células T ativadas) e NF- κ B, respectivamente (ABBAS *et al*, 2008- Figura 8).

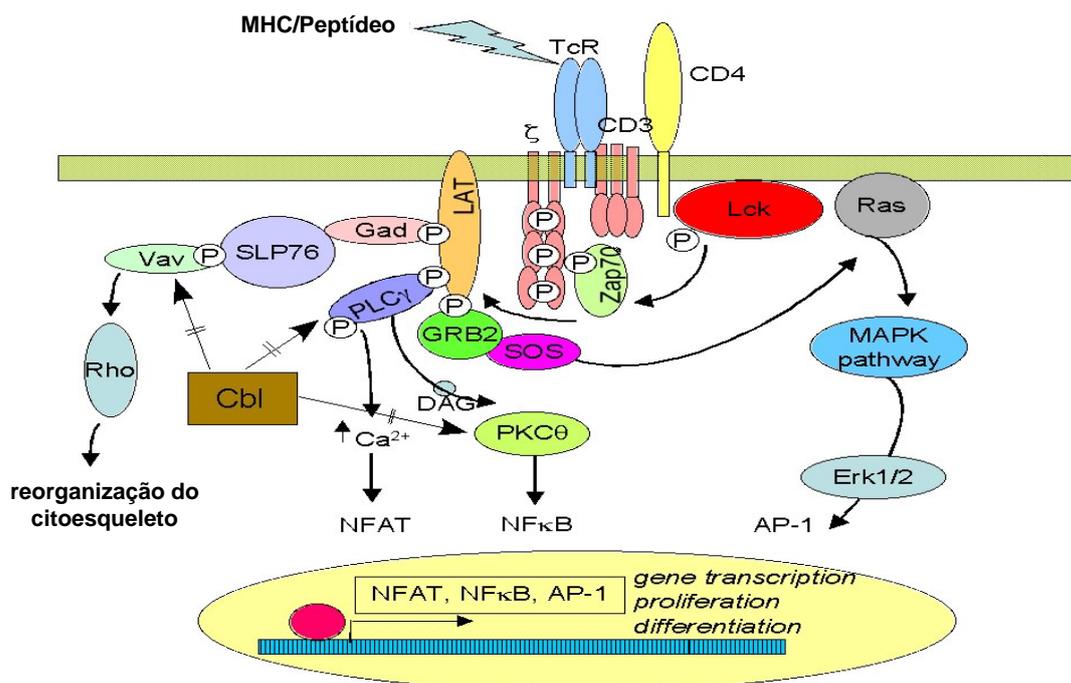


Figura 8: Eventos de sinalização celular após a ativação do receptor de células T. A interação do peptídeo/MHC das APCs com o TCR/co-receptores inicia eventos de sinalização que resultam na fosforilação da cadeia ζ do complexo TCR/CD3 por Lck, ligação de Zap70 a cadeia ζ fosforilando a molécula adaptadora LAT, que por sua vez ativa várias enzimas celulares (calcineurina e PKC) importantes para a ativação de fatores de transcrição (NF- κ B e NFAT); responsáveis pela regulação da expressão de genes envolvidos na resposta imune de células T.

A família de ligases de ubiquitina Cbl inclui 5 membros conhecidos: c-Cbl, Cbl-b e Cbl 3 em vertebrados, e Sli-1 (*Caenorhabditis elegans*) e D-Cbl (*Drosophila melanogaster*). Estas ligases de ubiquitina possuem o domínio RING e em vertebrados tem papel fundamental no desenvolvimento e funcionamento do sistema imune (SANJAY *et al*, 2001). Resultados obtidos com animais “knock-out” para ambas as ligases de ubiquitinas c-Cbl(-/-) e Cbl-

b(-/-) mostram um comprometimento direto na modulação do TCR e conseqüentemente na sua internalização (NARAMURA *et al*, 2002). Outros estudos mostram que animais “knock-out” para a ligase de ubiquitina Cbl-b(-/-) desenvolvem auto-imunidade espontânea, sugerindo assim que esta ligase de ubiquitina é importante para a manutenção da autotolerância. Cbl-b também está envolvida na indução de anergia em linfócitos T (JEON *et al*, 2004). Por outro lado, os camundongos c-Cbl(-/-) possuem uma maior percentagem de tímócitos que expressam somente o receptor CD4 (CD4⁺ single positive cells) quando comparados aos animais controle que expressam Cbl (BACHMAIER *et al*, 2000 e CHIANG *et al*, 2000).

Os camundongos Itchy, nos quais o gene para a ligase de ubiquitina Itch (família HECT) é inativo devido a uma mutação natural, apresentam perda da autotolerância e essa deficiência está associada à inabilidade do seu sistema imune em inativar linfócitos auto-reativos. Por causa disso, esses animais sofrem diversas disfunções imunológicas, como constante inflamação do epitélio (PERRY *et al*, 1998). Em seres humanos, mutações que resultam na produção de uma proteína Itch truncada acarretam quadros de doenças auto-imunes, além de resultarem em defeitos morfológicos (LOHR *et al*, 2010).

A ligase de ubiquitina GRAIL (Gene related to anergy in lymphocytes) é codificada pelo gene RNF128. GRAIL é uma proteína transmembrana tipo I que se localiza no compartimento endossomal, mas cuja porção citoplasmática possui um domínio do tipo RING essencial no estabelecimento de anergia de linfócitos T. A superexpressão de GRAIL em hibridomas de células T resulta na inibição da secreção de IL-2 e IL-4, citocinas relacionadas à ativação de linfócitos. Já uma forma inativa de GRAIL (chamada H2N2 RING) que apresenta mutações em resíduos conservados no domínio RING, mostra que esse mutante dominante negativo não é capaz de promover a anergia de células T (ANANDASABAPATHY *et al*, 2003 e SEROOGY *et al*, 2004). Recentemente foi mostrado que GRAIL medeia a ubiquitinação de TCR-CD3 resultando em sua degradação, podendo assim induzir tolerância em células T naive e regular a função de células T regulatórias (NURIEVA *et al*, 2010).

Outro exemplo de ligase de ubiquitina com atividade no sistema imune é a E3 Roquin. Camundongos sanroque, que possuem uma mutação no gene que codifica Roquin (família RING), apresentam alta expressão de IL-21 e

ICOS (molécula co-estimulatória). A superexpressão de ICOS leva a uma quebra na tolerância, resultando em um fenótipo semelhante à doença auto-imune Lupus (VINUESA *et al*, 2005 e VINUESA *et al*, 2007). Recentemente foi descrito que Roquin, em situações de estresse, se acumula em grânulos de estresse onde se liga ao mRNA de ICOS levando a sua repressão transcricional (ATHANASOPOULOS *et al*, 2010).

1.3- TRAC-1/RNF125 (T-cell Ring protein in activation)

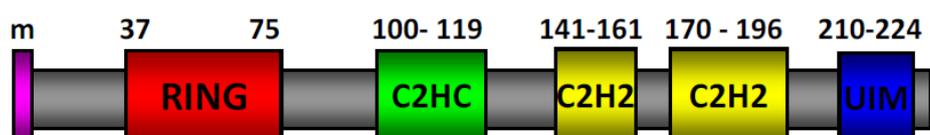
1.3.1- Identificação da Proteína

A proteína TRAC-1/RNF125 foi citada pela primeira vez durante uma varredura de possíveis proteínas regulatórias importantes no processo de ativação de células T. Peter Chu e colaboradores tinham como objetivo, identificar novas proteínas que estivessem atuando na cascata de sinalização após a ativação do receptor de células T e com isso tentar entender melhor a regulação da resposta imune e utilizar os dados obtidos, no desenvolvimento de terapias contra desordens imunológicas (CHU *et al*, 2003).

A partir de uma biblioteca de cDNA derivada de tecidos linfóides (baço, timo e linfonodo), células Jurkat foram transfectadas com vetores retrovirais contendo os cDNAs isolados, estimuladas com os anticorpos anti-TCR/anti-CD3 e marcadas com o anticorpo anti-CD69 (marcador de ativação de linfócitos). As células que apresentaram falha na regulação da ativação do TCR foram separadas por citometria de fluxo e os clones expressos por estas células contendo possíveis genes relacionados a esta falha na ativação foram isolados. Dentre vários genes, foi isolado o gene da proteína TRAC-1/RNF125. Primeiramente, TRAC-1/RNF125 foi obtida na sua forma truncada na porção C-terminal com apenas 170 aminoácidos (TRAC-1- Δ 170); porém a proteína selvagem possui ao todo 232 aminoácidos. O domínio RING-C3HC4, presente em diversas ligases de ubiquitina foi identificado na porção N-terminal da proteína. Apesar de estar na sua forma truncada, a superexpressão de TRAC-1- Δ 170 em células Jurkat “naive”, foi capaz de inibir fortemente a ativação do TCR visualizada pela diminuição de expressão de CD69; levando a concluir que o domínio RING é importante para esta atividade da proteína (CHU *et al*, 2003).

1.3.2- Caracterização Funcional dos Domínios de TRAC-1/RNF125

A proteína TRAC-1/RNF125 apresenta importantes domínios em sua estrutura. Além do domínio RING (C3HC4), a proteína apresenta um sítio de miristoilação também na porção N-terminal; três domínios do tipo “dedo de zinco” e um domínio UIM na sua porção C-terminal (Figura 9).



GIANNINI *et al*, 2008 – Biochem. J.

Figura 9: Esquema da estrutura da proteína TRAC-1/RNF125 com seus principais domínios. Na porção N-terminal estão presentes o sítio de miristoilação (roxo) e o domínio RING (vermelho), em verde e amarelo estão representados os domínios do tipo dedo de zinco C2H2/C2HC e em azul o domínio UIM.

Zhao e colaboradores demonstraram que mutações em resíduos conservados de cisteínas presentes no domínio RING acarretavam na perda total da atividade de ligase de ubiquitina desta proteína (ZHAO *et al*, 2005). TRAC-1/RNF125 é uma proteína instável, com um curto tempo de permanência nas células em torno de 30 minutos; e esta instabilidade estaria relacionada ao fato da proteína ser capaz de ubiquitinar seus próprios resíduos de lisina, sofrendo poliubiquitinações. Quando mutada em seu domínio RING, TRAC-1/RNF125 torna-se estável, devido a não interação com enzimas E2; comprometendo assim sua capacidade de auto-ubiquitinação (GIANNINI *et al*, 2008).

Na sua porção inicial do N-terminal; TRAC-1/RNF125 apresenta uma seqüência consenso (M)GXXT/S, a qual prediz que esta proteína é modificada pós-traducionalmente pela adição de um ácido mirístico no aminoácido glicina na posição 2. A miristoilação é uma modificação irreversível e confere a uma série de proteínas uma afinidade por membranas (RESH, 1999 e BIJLMAKERS, 2009). Após a síntese de TRAC-1/RNF125, esta proteína recebe um ácido mirístico que medeia a sua interação com membranas

celulares (GIANNINI *et al*, 2008). Esta localização poderia, por exemplo, garantir a proximidade de TRAC-1/RNF125 ao TCR ou a outras proteínas de membrana, onde possíveis alvos estariam presentes.

Os domínios do tipo “dedo de zinco”, C2H2 e C2HC, encontrados ao longo da estrutura de TRAC-1/RNF125 ainda não foram caracterizados e divergem da forma clássica $CX_{2-5}CX_3(F/Y)X_5\Phi X_2HX_{3-4}H$ (Φ é um resíduo hidrofóbico) dos domínios de ligação ao DNA, sendo considerados atípicos. Os domínios dedo de zinco são bem caracterizados na literatura e estão presentes não só em fatores de transcrição, mas em diversas proteínas que medeiam interações com RNAs e proteínas (BRAYER *et al*, 2008). O primeiro domínio C2HC apresenta a seqüência consenso $CX_2CX_3\Phi X\Phi X_2\Phi RXHX_2T/SC$, já os demais apresentam domínios C2H2 que possuem as seqüências consensos $CPXCX_{2-3}\Phi X_4\Phi\Phi XHCX_3C$ e $CP\Phi CX_2\Phi PX_3PX_3T/SX_2\Phi X_2H\Phi X_3H$. A presença dos domínios “dedo de zinco” atípicos pode contribuir para importantes interações que ocorram além do domínio RING, como interações entre proteínas (GIANNINI *et al*, 2008).

Por último, TRAC-1/RNF125 apresenta um domínio na sua porção C-terminal denominado de UIM (“ubiquitin-interacting motif”). Esse domínio faz parte de um conjunto de 16 motivos consenso que possuem afinidades por ubiquitinas. A interação com ubiquitinas acontece de maneira não covalente através do aminoácido isoleucina na posição 44 da ubiquitina, diferentemente da ligação isopeptídica usual (HURLEY *et al*, 2006). O domínio UIM é geralmente encontrado em proteínas que fazem parte de subunidades do proteassoma, enzimas deubiquitinases e em ligases de ubiquitinas (POLO *et al*, 2002 e UCHIKI *et al*, 2009).

O domínio UIM da proteína TRAC-1/RNF125 é caracterizado como uma região essencial para a sua auto-ubiquitinação, cooperando com o domínio RING e controlando a estabilidade da proteína. Essa região é capaz de interagir com cadeias de poliubiquitinas via K48 e mutações em resíduos conservados do UIM acarretam em uma diminuição da capacidade desta proteína de interagir com ubiquitinas (GIANNINI *et al*, 2008).

1.3.3- Funções de TRAC-1/RNF-125

Em 2005, Zhao e colaboradores realizaram os primeiros ensaios de atividade de ligase de ubiquitina *in vitro* com a TRAC-1/RNF125. Eles mostraram que essa proteína possui atividade de ligase de ubiquitina e que é capaz de interagir com as enzimas conjugadoras de ubiquitina E2: Ubc4, UbcH5c e Ubc13/Uev1A catalisando a formação de cadeias de poliubiquitinas via K48 e K63, sugerindo diferentes destinos para uma mesma proteína. Além disso, TRAC-1/RNF125 é expressa em tecidos linfóides; sendo encontrada em maior quantidade em linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ (ZHAO *et al*, 2005 – Figura 10).

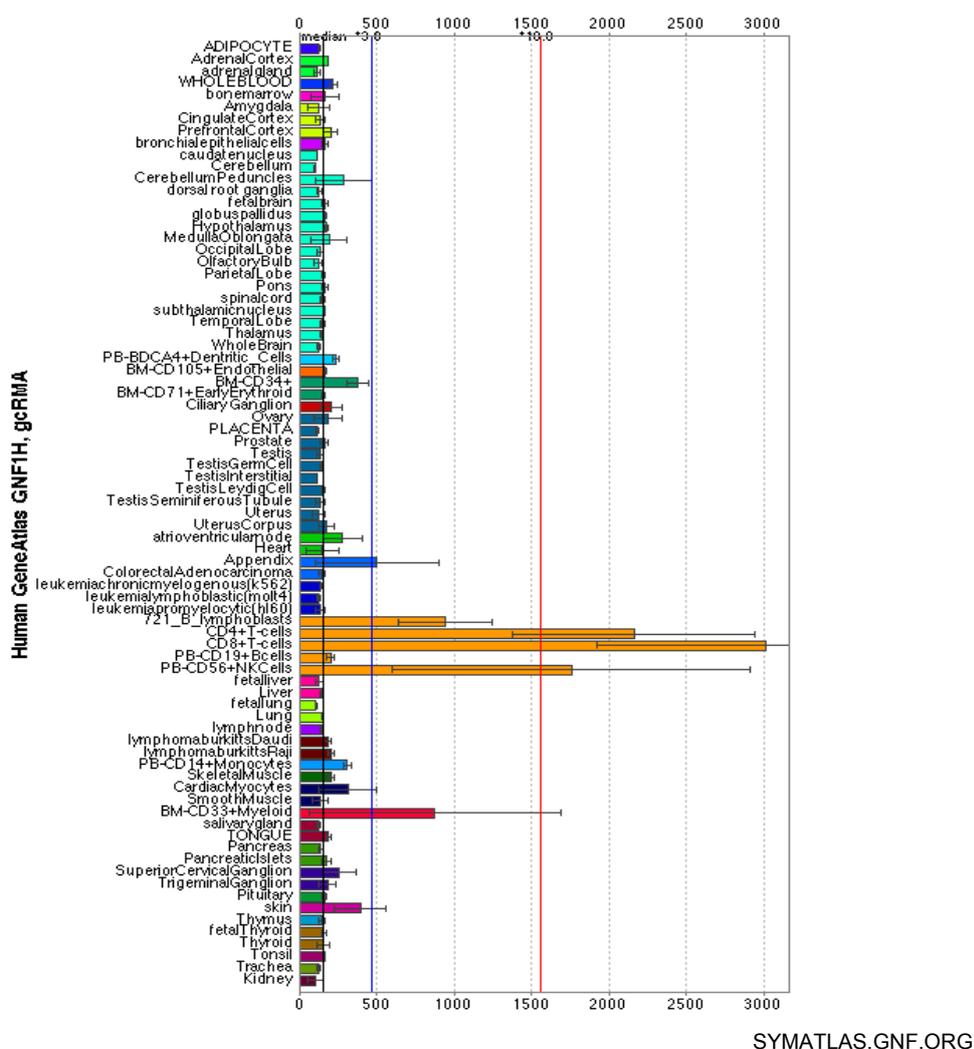


Figura 10: Análise de expressão gênica de TRAC-1/RNF125 em diferentes tipos celulares. TRAC-1/RNF125 encontra-se mais expressa em linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD8+.

Ensaio de duplo-híbrido identificaram TRAC-1/RNF125 como sendo uma ligase de ubiquitina capaz de ubiquitinar a proteína RIG-I e outro membro da sua família MDA5 (ARIMOTO *et al*, 2007). Durante infecções virais, RIG-I é ativado pela presença de RNAs virais no citoplasma da célula e sua atuação é estritamente controlada por um mecanismo de “feed-back” negativo. RIG-I é capaz de aumentar a produção de interferon que resulta em maior produção de TRAC-1/RNF125. Esta por sua vez, ubiquitina RIG-I causando sua degradação. A diminuição da quantidade de RIG-I teria como consequência a inibição da produção de IFN- β . (NAKHAEI *et al*, 2009). A proteína RIG-I também é regulada pela enzima E2 Ubch8 e pela proteína ISG15. ISG15 é estimulada por interferons do tipo I e, assim como TRAC-1/RNF125, regula negativamente a atividade de RIG-I (ARIMOTO *et al*, 2008).

Em pacientes infectados com o vírus da Hepatite C (HCV), não respondedores às terapias antivirais, foi visto que a expressão da proteína TRAC-1/RNF125 encontra-se baixa em relação à grande quantidade de RIG-I, MDA5 e IFN- β . A superexpressão de IFN- β exógeno é capaz de suprimir a expressão de TRAC-1/RNF125, o que poderia explicar os baixos níveis de TRAC-1/RNF125 em pacientes não respondedores em razão de uma alta regulação de IFN- β (ASAHINA *et al*, 2008 e MASUMI *et al*, 2010).

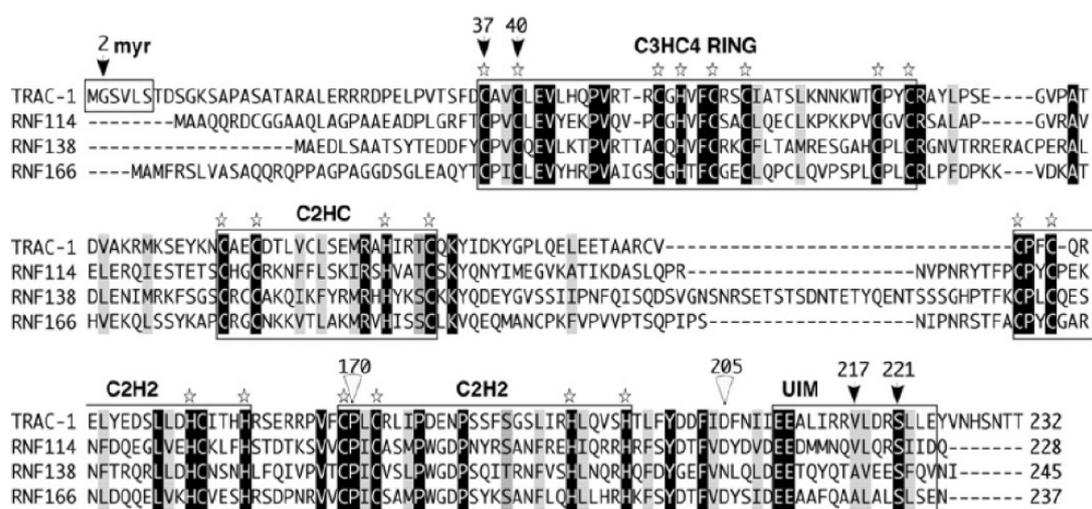
TRAC-1/RNF125 também está envolvida na inibição da replicação do vírus HIV em linhagens celulares e linfócitos T periféricos. Inicialmente foi mostrado que a co-expressão da proteína TRAC-1/RNF125 e do vírus HIV-1 acarreta uma baixa produção de vírus por essas células. Em seguida, foram realizados ensaios utilizando somente o promotor viral do HIV. A superexpressão de TRAC-1/RNF125 sob tais condições mostrou que esta ligase de ubiquitina era capaz de regular a transcrição desse genoma viral, existindo a possibilidade de que TRAC-1/RNF125 tenha como substrato fatores de transcrição envolvidos na regulação da transcrição de genes virais (KAWATA *et al*, 2007).

Além de estar envolvido no controle de infecções virais, TRAC-1/RNF125 também foi descrito como um possível gene associado a tumores metastáticos de câncer colorretal. A expressão de TRAC-1/RNF125 é mais elevada em tumores que apresentam um alto grau de metástase em linfonodos (SASAKI *et al*, 2008). Interessantemente, análises de expressão de RIG-I

mostram que esse gene é mais expresso em células normais do que em células tumorais, sugerindo que RIG-I tenha propriedades supressoras de tumor (ZAO-ZHONG *et al*, 2007). Sendo assim, é possível que esses achados estejam correlacionados.

1.4- Novas Proteínas da Sub-família de TRAC-1/RNF125

Através de um alinhamento de proteínas (BLAST), a seqüência de aminoácidos da proteína humana TRAC-1/RNF125 apresentou homologia com outras três seqüências humanas denominadas de RNF114, RNF138 e RNF166. As quatro proteínas apresentam tamanhos comparáveis: TRAC-1/RNF125 com 232 aminoácidos, RNF114 com 228, RNF138 com 245 e RNF166 com 237 aminoácidos. Além disso, todos os domínios (RING, C2H2, C2HC e UIM) de TRAC-1/RNF125 também se encontram presentes nessas proteínas, exceto o sítio de miristoilação na porção N-terminal (GIANNINI *et al*, 2008). Devido à grande semelhança entre as seqüências; é possível que RNF114, RNF138 e RNF166 desempenhem atividades similares as da proteína TRAC-1/RNF125, sendo importante o estudo destas proteínas (Figura 11).



GIANNINI *et al*, 2008 -Biochem. J.

Figura 11: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas humanas TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166. Os resíduos idênticos foram marcados de preto, os resíduos conservados e hidrofóbicos marcados em cinza e outros resíduos conservados marcados em cinza escuro. Os domínios conservados foram destacados nos boxes (RING, C2H2, C2HC e UIM) e o sítio de miristoilação foi destacado na porção n-terminal de TRAC-1/RNF125. As estrelas identificam os resíduos conservados de cisteínas e histidinas.

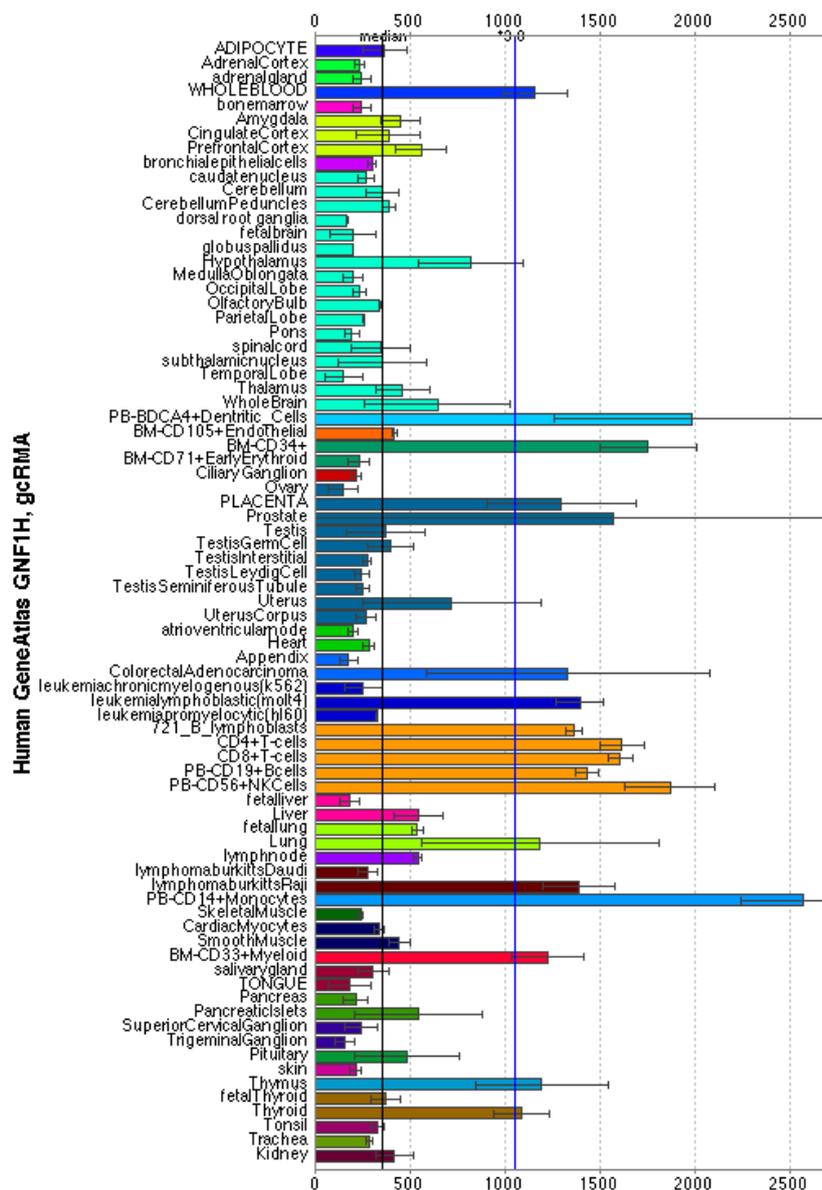
1.4.1- RNF114 / ZNF313

A ligase de ubiquitina RNF114 foi identificada pela primeira vez em 2003, por Yong-Xi e colaboradores, durante uma varredura de genes associados à fertilidade masculina. O estudo mostra que RNF114 encontra-se bastante expressa em testículos de indivíduos férteis e pouco expressa em indivíduos inférteis e fetos (Gene ID: 55905 e YONG-XI *et al*, 2003).

Mais tarde em 2008, outro trabalho foi publicado sugerindo que o gene RNF114 estaria envolvido na susceptibilidade ao desenvolvimento de uma doença denominada Psoríase. Esta é uma doença inflamatória de pele, relacionada à transmissão genética que atinge pelo menos 4% da população mundial. Uma análise de expressão de RNF114 em células relacionadas a essa doença (células dendríticas, linfócitos T CD4+ e células da pele), mostrou que este gene encontrava-se altamente expresso nesses tipos celulares. Além disso, altos níveis de expressão de RNF114 foram detectados em amostras de colorretal, testículos, próstata e baço (CAPON *et al*, 2008 - Figura 12).

Como mencionado anteriormente; a proteína RNF114 apresenta em sua estrutura o domínio RING-C3HC4 característico em ligases de ubiquitina, três domínios atípicos comparáveis a domínios dedo de zinco C2H2 e C2HC; e um domínio C-terminal de interação com ubiquitinas UIM (GIANNINI *et al*, 2008 - Figura 11). Ensaios de pull-down *in vitro*, somente com o domínio UIM, mostraram que RNF114 é capaz de interagir com cadeias de poliubiquitinas via K48 e K63 (CAPON *et al*, 2008).

Portanto, a caracterização estrutural, funcional e a identificação de substratos para a ligase de ubiquitina RNF114 é de grande interesse, tanto na descoberta de novos caminhos que esclareçam os mecanismos de ação das doenças inflamatórias de pele como em outras disfunções do sistema imune e também o envolvimento desta proteína na fertilidade masculina.



SYMATLAS.GNF.

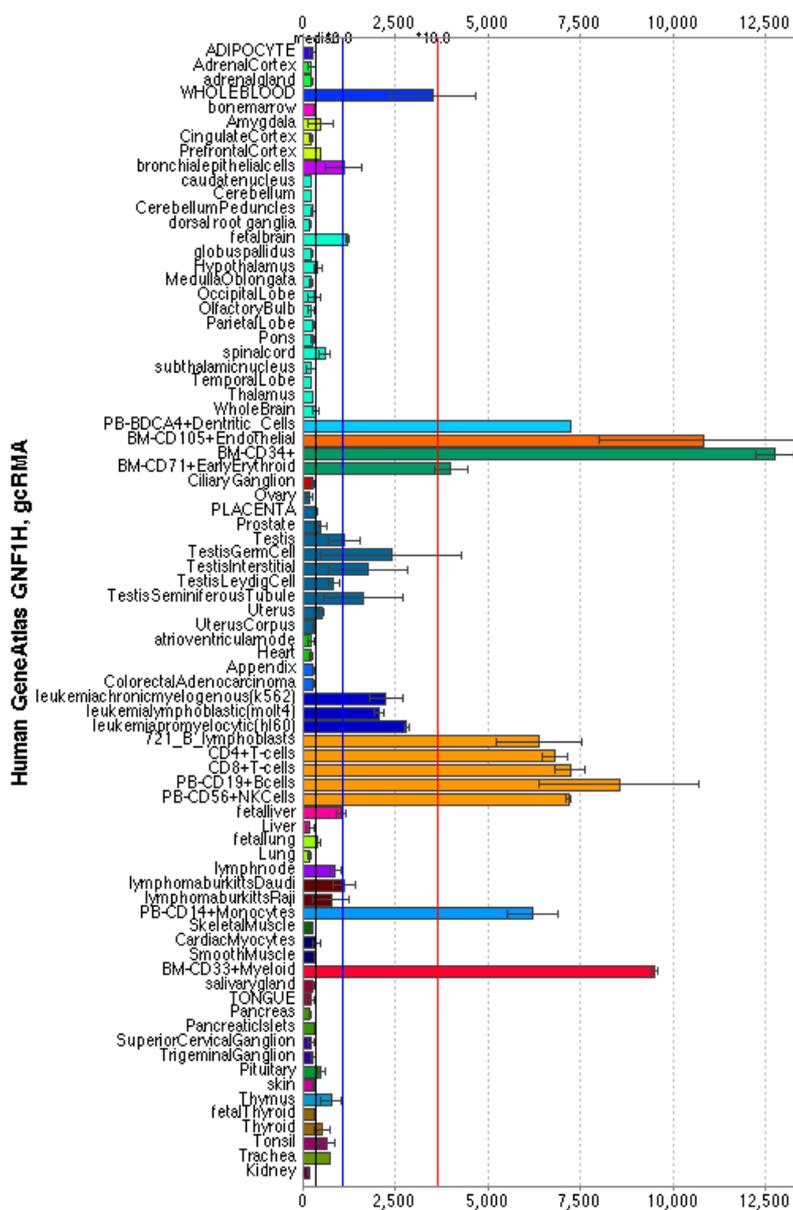
Figura 12: Análise de expressão gênica de RNF114 em diferentes tipos celulares. RNF114 encontra-se expressa em vários tipos celulares, com destaque para células do sistema imune.

1.4.2- RNF138

A proteína RNF138 foi identificada pela primeira vez em uma varredura de duplo híbrido em *Xenopus*, na qual foi mostrado que essa ligase de ubiquitina é capaz de se associar a porção C-terminal de uma Nemo-like Kinase (NLK), levando a ubiquitinação e degradação via proteossoma dos fatores de transcrição TCF (T-cell factor) e LEF (lymphoid enhancer factor). A partir daí, RNF138 passou a ser denominada de NARF (“NLK-associated Ring Finger Protein”) (YAMADA *et al*, 2006 e HUELSKEN *et al*, 2002). Os fatores de transcrição TCF/LEF estão diretamente envolvidos na via canônica de sinalização mediada por Wnt/ β -catenina. Nesta via, o estímulo de Wnt faz com que a β -catenina não seja degradada via proteossoma, e com isso ela migra para o núcleo onde se liga aos fatores de transcrição TCF/LEF, ativando uma variedade de genes que contribuem para o perfeito desenvolvimento dos linfócitos T (STAAL *et al*, 2008).

A análise da expressão gênica em *Homo sapiens*, realizada pelo banco de dados SymAtlas mostra que o gene RNF138 encontra-se mais expresso em células do sistema imune como linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, células dendríticas, linfócitos B, células NK e monócitos (Figura 13).

Em 2009, RNF138 foi citada por Nielsen e colaboradores em um estudo envolvendo pacientes acometidos pela doença de Crohn (CD). A doença de Crohn é uma doença crônica inflamatória, que atinge principalmente o íleo e o cólon. A CD está associada tanto a fatores genéticos como a fatores ambientais, por exemplo, o fumo. Neste trabalho, o gene RNF138 foi encontrado mais expresso em pacientes fumantes com CD do que em pacientes não fumantes com CD. A via de sinalização Wnt é essencial para o controle do balanço entre proliferação e diferenciação da mucosa do intestino. Sabendo que RNF138 é uma ligase de ubiquitina que promove a degradação dos fatores TCF/LEF e com isso inibe a via de sinalização de Wnt, é possível que a superexpressão de RNF138 possa ser um fator que explique o fato de pacientes fumantes com CD possuírem um pior prognóstico da doença em relação aos pacientes não fumantes com CD (NIELSEN *et al*, 2009).



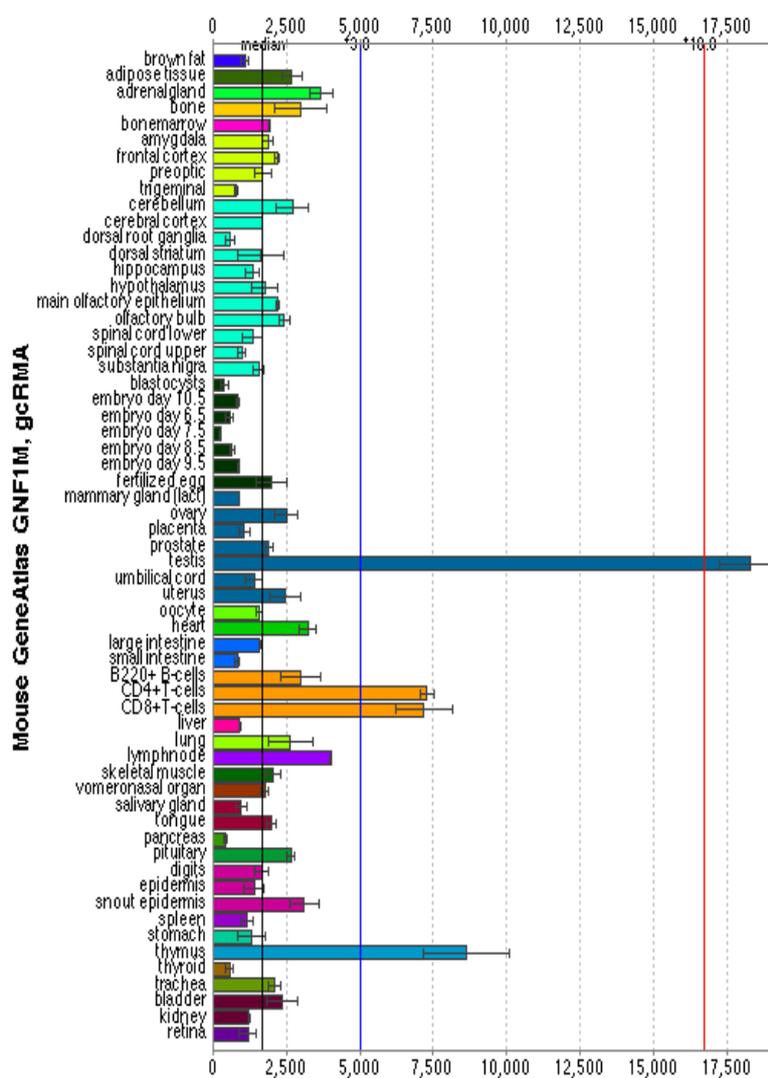
SYMATLAS.GNF.ORG

Figura 13: Análise de expressão gênica de RNF138 em diferentes tipos celulares. O gene RNF138 encontra-se mais expresso em células do sistema imune.

1.4.3- RNF166

A proteína RNF166, quarto membro dessa família de ligases de ubiquitina, ainda não possui qualquer descrição na literatura. Sua primeira identificação ocorreu durante um alinhamento de seqüências de aminoácidos em diferentes espécies, tendo a ligase de ubiquitina TRAC-1/RNF125 como referência. Através deste alinhamento foi possível visualizar os domínios semelhantes aos existentes em TRAC-1/RNF125, excetuando-se o sítio de miristoilação (GIANNINI *et al*, 2008 – Figura 11).

Uma análise de expressão de RNF166 murino (não existem dados em humanos) realizada em diferentes tipos celulares mostrou que este gene é preferencialmente expresso em células dos testículos, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e células do timo (Figura 14). Assim como TRAC-1/RNF125, RNF114 e RNF138; RNF166 pode ser extremamente importante para a regulação e bom funcionamento do sistema imune.



SYMATLAS.GNF.ORG

Figura 14: Análise de expressão gênica de RNF166 murino em diferentes tipos celulares. O gene RNF166 encontra-se mais expresso nos testículos, como também em células do sistema imune.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Buscar uma melhor caracterização da ligase de ubiquitina RNF125/TRAC-1 e de outros membros desta família de ligases de ubiquitina: RNF114, RNF138 e RNF166.

2.2 - Objetivos Específicos

- Parte I

- Comparar a meia-vida da proteína selvagem RNF125/TRAC-1 com as dos mutantes C37,40A-TRAC-1, ALLK-TRAC-1, V217,S221Q-TRAC-1 e G2A-TRAC-1.
- Analisar o perfil de localização celular dos mutantes acima citados em relação à proteína selvagem, por microscopia de fluorescência.
- Verificar se o mutante ALLK-TRAC-1 ainda é capaz de interagir com ubiquitinas *in vivo*.
- Avaliar o papel funcional da expressão dos mutantes de TRAC-1/RNF125 na ativação de linfócitos da linhagem Jurkat.
- Avaliar se TRAC-1/RNF125 é fosforilada por PKC *in vitro*.

- Parte II

- Caracterizar a meia-vida das ligases de ubiquitina RNF114, RNF138 e RNF166.
- Analisar a localização celular das proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 por microscopia de fluorescência e ensaios de gradiente de sacarose.
- Verificar se as proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 são capazes de interagir com ubiquitinas *in vivo*.
- Avaliar o papel funcional da expressão das proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 na ativação de linfócitos da linhagem Jurkat.
- Avaliar se RNF114, RNF138 e RNF166 são fosforiladas por PKC e CKII *in vitro*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Plasmídeos

A seqüência completa do gene que codifica a proteína TRAC-1/RNF125 foi amplificada a partir de uma biblioteca de cDNA preparada de linfócitos T primários humanos utilizando oligonucleotídeos confeccionados baseados na seqüência do mRNA publicada (NM_017831). O fragmento obtido desta amplificação, de aproximadamente 700pb, foi subclonado, utilizando as enzimas de restrição EcoRI e BamHI, nos vetores pcDNA3.1A(-) (Invitrogen) e pEGFP-N3 (Invitrogen) para expressar proteínas de fusão com myc-His tag, e GFP tag (Enhanced Green Fluorescent Protein) no C-terminal da proteína. Os mutantes de TRAC-1/RNF125; C37,40A-TRAC-1 (mutação no domínio RING), G2A-TRAC-1 (mutação no sítio de miristoilação), V217P/S221Q-TRAC-1 (mutação no domínio UIM) e ALLK-TRAC-1 (todos os resíduos de lisina mutados); foram gerados por mutação sítio dirigida diretamente no vetor de expressão pcDNA3.1A(-) e depois subclonados no vetor pEGFP-N3. Os genes RNF114, RNF138, RNF166 e o mutante A229P,S233Q-RNF166 também foram subclonados nos vetores pcDNA3.1A(-) e pEGFP-N3. Todos os mutantes gerados foram confirmados por seqüenciamento. Os plasmídeos foram gentilmente cedidos pela colaboradora Dr^a. Marie-José Bijlmakers, Kings College, Londres (GIANNINI *et al*, 2008).

Todos os DNAs plasmidiais foram mantidos e amplificados em bactérias *E.coli* TOP10 ou DH5 α eletrocompetentes e purificados utilizando o QIAGEN Plasmid Midi Kit de acordo com as instruções do fabricante.

3.2- Alinhamentos de Seqüências de Aminoácidos

3.2.1- TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138, RNF166 e mutantes

As seqüências de aminoácidos das proteínas humanas TRAC-1/RNF125 (NP_060301.2), RNF114 (NP_061153.1), RNF138 (NP_057355.2) e RNF166 (NP_849163.1) foram obtidas do banco de seqüências genéticas do NIH, o Genbank (NCBI). As seqüências das proteínas selvagens e mutantes foram alinhadas utilizando o programa Vector NTI software (Invitrogen) e formatadas pelo programa GeneDoc.

Os alinhamentos foram realizados com base nos domínios conservados da proteína TRAC-1/RNF125: domínio RING (C3HC4), domínios do tipo “dedo de zinco” (C2H2 e C2HC) e o domínio UIM. Junto à proteína TRAC-1/RNF125 foram alinhados os mutantes ALLK-TRAC-1; C37,40A-TRAC-1; G2A-TRAC-1 e V217P/S221Q-TRAC-1. As seqüências das proteínas relacionadas à TRAC-1/RNF125: RNF114, RNF138 e RNF166; também foram alinhadas juntamente com o mutante A229P,S233Q-RNF166.

3.2.2- TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138, RNF166 de diferentes espécies

As seqüências das proteínas TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166, em outras espécies, foram alinhadas com base nos domínios conservados das proteínas humanas (*Homo sapiens sp.*). Para isso foram utilizados os programas Vector NTI software (Invitrogen) e GeneDoc.

Para TRAC-1/RNF125 foram encontradas seqüências homólogas para as espécies *Equus caballus* (XM_001495403.1); *Pan troglodytes* (XM_001160124.1); *Mus musculus* (NM_080577.1); *Bos taurus* (XM_597764.2); *Cannis lupus familiaris* (XM_547620.2); *Macaca mulatta* (XM_001099929.1) e *Rattus norvegicus* (NM_001101894.1).

As seqüências encontradas para a proteína RNF114 foram de *Pan troglodytes* (NM_001120978.1); *Bos taurus* (NM_001019702.1); *Rattus norvegicus* (NM_001001517.1); *Danio rerio* (NM_001001828.2); *Gallus gallus* (NM_001001767.2); *Canis lupus familiaris* (XM_534453.2), *Xenopus (Silurana)*

tropicalis (NM_001001857.1); *Mus musculus* (NM_109668.2) e *Sus scrofa* (NM_001001869.1).

A proteína RNF138 apresentou homólogos nas espécies *Pan troglodytes* (XM_512083.2); *Bos taurus* (NM_001033263.1); *Rattus norvegicus* (NM_446040.1); *Xenopus laevis* (NM_001089974.1); *Xenopus (Silurana) tropicalis* (NM_001016429.1), *Canis lupus familiaris* (XM_537288.2); *Macaca mulatta* (XM_001100574.1) e *Mus musculus* (NM_997506.1).

Por fim, as seqüências homólogas para a proteína RNF166 foram encontradas para as espécies *Mus musculus* (NM_001028314.1); *Rattus norvegicus* (NM_001002279.1); *Gallus gallus* (NM_001012953.1); *Bos taurus* (NM_001092604.1); *Canis lupus familiaris* (XM_851172.1); *Pan troglodytes* (XM_523462.2); *Xenopus laevis* (NM_001089778.1) e *Xenopus (Silurana) tropicalis* (NM_001072227.1).

3.3- Cultura de Células

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens celulares HEK-293T, HeLa e Jurkat. A linhagem HEK-293T tem origem de células embrionárias de rim humano, são aderentes e foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-GIBCO) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (GIBCO). A linhagem HeLa, isolada de um adenocarcinoma de cérvix humano, também é aderente e foi mantida em meio RPMI (RPMI 1640- GIBCO) com 10% de soro fetal bovino (GIBCO). As células da linhagem Jurkat crescem em suspensão e são células T leucêmicas (humano). Esta linhagem foi cultivada em meio de cultura RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino. As linhagens celulares utilizadas foram obtidas do American Type Culture Collection-ATCC e gentilmente cedidas pela Dr^a Marie-José Bijlmakers (Kings College, Londres). Rotineiramente as células eram testadas por PCR para verificação de contaminação por micoplasma.

As linhagens HEK-293T e HeLa eram mantidas em placas de 100 x 20 mm (TPP) e a linhagem Jurkat em garrafas de 250 mL (Corning) a 37 °C em atmosfera úmida de 4% de CO₂. As células eram monitoradas diariamente utilizando microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100- Zeiss) para o

controle de possíveis focos de contaminação. Os repiques aconteciam a cada dois dias ou quando as células atingiam 80% de confluência.

Para isso, as células aderidas ao fundo da placa eram lavadas com 2 mL de solução de Hanks (Hanks` Balanced Salts, Modified – Sigma) e posteriormente incubadas com 1mL de solução de Tripsina-EDTA 2,5 g/L (Cultilab) por 1 minuto na estufa a 37° C. As células eram retiradas da placa com a ajuda de uma micropipeta e transferidas para um tubo falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio contendo 10% de soro, com a finalidade de cessar o efeito da tripsina.

A contagem das células era realizada em câmara de Neubauer e $1,5 \times 10^6$ células eram colocadas em novas placas com 10 mL de meio fresco e retornavam à estufa. A linhagem Jurkat era centrifugada em tubos falcon de 50 mL por 5 minutos a 1000 x g em temperatura ambiente, o meio antigo era descartado e o precipitado de células era ressuspenso em meio de cultura fresco e transferido para uma nova garrafa. Todos os procedimentos foram realizados em uma capela de fluxo laminar previamente esterilizada por 20 minutos sob luz ultravioleta e álcool 70%.

3.4- Transfecção de Células

Para as análises de estabilidade, ubiquitinação e localização celular das proteínas selvagem e mutantes, foram realizados ensaios de transfecção, como descritos a seguir. As células HEK-293T ou Hela foram transfectadas utilizando o sistema Lipofectamina 2000 (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. A lipofectamina é um reagente de transfecção que permite a formação de lipossomos, possibilitando a entrada do DNA de interesse na célula.

Resumidamente, as transfecções nos ensaios de estabilidade foram realizadas da seguinte forma: 24 horas antes do início de cada transfecção; $1,5 \times 10^6$ de células (HEK 293T) eram transferidas para novas placas de 100 x 20 mm. No dia seguinte; tubos de 1,5 mL contendo 500 µL de meio DMEM sem soro eram preparados: a um dos tubos eram adicionados 10 µg do respectivo DNA e ao outro, eram acrescentados 60 µL de Lipofectamina 2000. Cada tubo era

incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida os conteúdos de ambos os tubos eram misturados e desta vez incubados por 20 minutos, para permitir a formação dos lipossomos contendo o DNA. Passado o tempo de incubação, a mistura era adicionada a cada placa de célula correspondente. As células permaneciam na estufa com o meio de transfecção por 24 horas e depois eram processadas dependendo dos ensaios a serem realizados.

Para os ensaios de ubiquitinação, as transfecções foram realizadas em uma escala menor como descrito a seguir: as células HEK-293T foram repicadas 24 horas antes da transfecção em uma concentração de 3×10^5 células por poço (placa de 6 poços - TPP). No dia seguinte, cada poço foi transfectado pelo método de Lipofectamina 2000 com 2,5 μg do DNA de interesse e 2,5 μg de ubiquitina fusionada ao tag HA (ub-HA). Foram utilizados 4 μL de Lipofectamina 2000 por poço.

Para os ensaios de imunofluorescência, as células HeLa foram repicadas 24 horas antes da transfecção em placas de 24 poços. Cada poço, contendo uma lamínula redonda estéril de 13 mm de diâmetro, recebeu 8×10^4 células em 500 μL de meio RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino. No dia seguinte, cada poço foi transfectado utilizando 1 μg de DNA e 1 μL de Lipofectamina 2000, como já descrito anteriormente. A quantidade de Lipofectamina foi previamente normalizada para cada tipo celular a fim de minimizar seus efeitos citotóxicos.

3.5- Tratamento com Cicloheximida

Após a transfecção, prosseguimos com os ensaios de estabilidade das proteínas de interesse. Assim 24 horas pós-transfecção, as células foram soltas com 1 mL de solução de Tripsina/EDTA e redistribuídas igualmente em 4 poços (250 μL por poço) de uma placa de 6 poços. Cada poço recebia mais 2 mL de meio DMEM fresco enriquecido com 10% de soro fetal bovino. A partir daí, a placa retornava à estufa para permitir que as células voltassem a aderir ao fundo do poço (4-5 horas). Esta etapa era realizada para garantir a homogeneidade das células antes do tratamento com cicloheximida, garantindo que as diferenças observadas na expressão das proteínas de interesse não

fossem resultado de diferentes eficiências de transfecção.

Quando aproximadamente 90% das células estivessem aderidas ao fundo da placa, cada poço era tratado com meio DMEM fresco contendo cicloheximida (SIGMA) numa concentração de 100 µg/mL. A cicloheximida é um inibidor de síntese protéica que atua bloqueando a elongação traducional. Todas as proteínas e os seus mutantes foram primeiramente tratados por 30, 60 e 120 minutos. De acordo com os resultados obtidos, as proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 também foram tratadas com cicloheximida por até 6 horas. Foram realizados também os pontos controles, sem tratamento.

Ao final dos tratamentos, as células eram transferidas por pipetagem, para tubos de 2,0 mL e centrifugadas a uma velocidade de 1000 x g por 10 minutos a 4° C. Em seguida, o meio era retirado sem perturbar o precipitado e este era ressuscitado em PBS 1X (136,8 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄.12H₂O e 2 mM de KH₂PO₄) gelado para eliminar o resto do meio de cultura ali presente. Novamente as células eram centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos a 4° C.

Após a formação de um novo precipitado, este agora era ressuscitado em 100 µL de tampão de lise NP-40 1X (1% de NP-40, 150 mM de NaCl, 50 mM de NaF, 20 mM de Tris pH 8,0, 2 mM de MgCl₂) gelado acrescido de inibidores de protease (1 mM de PMSF, 5 µg/mL de antipaína, 5 µg/mL de quimostatina, 5 µg/mL de pepstatina A e 10 µg/mL de leupeptina). As células permaneciam incubando, em gelo, por aproximadamente 30 minutos e depois eram centrifugadas a uma velocidade de 12000 x g por 5 minutos a 4° C. Por fim, o sobrenadante contendo o extrato total das proteínas era transferido para um novo tubo de 1,5 mL e armazenado em freezer a -80° C (GIANNINI *et al*, 2008).

3.6- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blot*

Aproximadamente 30 µL do extrato total de proteínas de cada amostra foram desnaturados por fervura durante 5 minutos em presença de tampão de amostra (50 mM de Tris pH 6,8, 100 mM de DTT, 2% de SDS, 0,1% de Azul de Bromofenol, 10% de glicerol) e separados por SDS-PAGE ("Sodium

Dodecylsulfate- Polyacrylamide Gel Eletrophoresis") em gel de poliacrilamida 10% utilizando tampão de corrida Tris-Glicina (25 mM de Tris, 250mM de Glicina pH 8.3, 0,1% de SDS) a uma amperagem constante de 25 mA por gel.

Após a eletroforese, as proteínas contidas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de tamanho 8,5 x 5,5 cm². O sistema de transferência consiste em placas "sanduíche", esponjas, papéis de filtro cortados nas dimensões das esponjas, membrana de nitrocelulose e aproximadamente 1L de tampão de transferência gelado (39mM Glicina, 48 mM Tris base, 0.037% SDS, 20% Metanol). Todo o material foi previamente embebido em tampão de transferência. A montagem foi realizada da seguinte forma: sobre um lado da placa "sanduíche" (correspondente ao pólo negativo) foi colocado uma esponja, depois o papel de filtro, o gel de poliacrilamida, a membrana de nitrocelulose, o outro papel de filtro e por fim a última esponja. Teve-se o cuidado de não deixar bolhas de ar entre o gel e a membrana, o que comprometeria a transferência. Em seguida, a placa "sanduíche" foi fechada e colocada em um suporte dentro de uma cuba contendo o tampão de transferência gelado. Todo o sistema utilizado foi o da BioRad e a transferência foi realizada a uma voltagem constante de 100 V por 1 hora a 4°C.

Ao término da transferência, a membrana foi corada durante 3 minutos com vermelho de Ponceau (2% de Ponceau S em 0,3% de TCA) e descorada em água destilada para a visualização das proteínas. O padrão de peso molecular pré-corado utilizado foi o PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em TBS-Tween 0,1% (136,8 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 24,7 mM de Tris e 0,1% de Tween) , por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação constante. Ao final do bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-myc clone 9E10 (SIGMA) na diluição de 1:1000 em 5% de leite - TBS-Tween 0,1% por 2 horas à temperatura ambiente ou overnight a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada em três etapas de 5 minutos com TBS-Tween 0,1%. Em seguida, a mesma foi incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de rato - Sinapse), conjugado à peroxidase, na diluição de 1:5000 em 5% de leite-TBS1x-0,1% Tween por 1 hora a temperatura ambiente. Após essa etapa, mais três lavagens de 5

minutos foram realizadas utilizando TBS-Tween 0,1%. A expressão da proteína RNF114 endógena foi avaliada utilizando o anticorpo primário anti-RNF114.

Por fim, a membrana foi revelada utilizando o kit de quimioluminescência SuperSignal West Femto (Thermo), seguindo as instruções do fabricante. A imunodeteção se dá pela clivagem do substrato, contido no kit de quimioluminescência, pela peroxidase (conjugada ao anticorpo secundário). Esta clivagem acarreta uma emissão de luz que impressiona o filme de raio X. A membrana foi exposta a filmes de raio-X (GE-Amersham) de 1 a 5 minutos. Os filmes utilizados foram revelados e fixados em soluções Kodak. Todo o procedimento de revelação foi realizado dentro de uma câmara escura.

Para um controle endógeno, a mesma membrana foi lavada por 1 hora em TBS-Tween 0,1% e em seguida novamente bloqueada em solução de 5% de leite em TBS-Tween 0,1% por mais 1 hora sob agitação constante. A partir daí, a membrana foi incubada com o anticorpo primário HSP90 α/β (Santa Cruz) numa concentração 1:1000 em solução de 5% de leite em TBS-Tween 0,1%. O resto do procedimento seguiu as condições acima descritas, com a diferença da utilização do anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Sinapse) (GIANNINI *et al*, 2004).

3.7- Quantificação: Densitometria de Bandas

Para a análise de densitometria ótica, os filmes de raio X foram digitalizados através do aparelho Scanner Samsung SCX-4200 e as imagens submetidas ao programa Scion Image. A quantificação relativa de cada banda de proteína foi calculada pelo valor de cada banda correspondente à proteína superexpressa em relação ao controle endógeno (myc/HSP90). A partir daí, foi calculado um valor arbitrário para cada banda em relação à percentagem total (100%) equivalente à quantidade de proteína inicial (condição sem tratamento) na análise. Os dados foram submetidos ao programa GraphPad software, onde foram gerados gráficos correspondentes aos *Western blots*.

3.8- Imunoprecipitação de Proteínas

Para os ensaios de interação com ubiquitinas foram utilizados a linhagem HEK-293T e os DNAs ALLK-TRAC-1-myc (comparado à proteína TRAC-1/RNF125-myc selvagem e ao mutante V217P/S221Q-TRAC-1-myc), RNF114-myc, RNF138-myc, RNF166-myc e A229P,S233Q-RNF166-myc. As transfecções foram realizadas como descrito acima (item 3.4). Após 24 horas de transfecção, as células foram submetidas à lise celular em 400 μ L de tampão de lise NP-40 1X enriquecido de inibidores de proteases. Foi adicionado também ao tampão de lise 0,1% de SDS e 5 mM de NEM (N-etilmaleimida). Após o preparo do extrato total, este foi submetido a uma imunoprecipitação.

Primeiramente, foram adicionados 30 μ L de proteína A sefarose (Sigma) hidratada (segundo instruções do fabricante) ao extrato e este ficou incubando sob agitação constante por aproximadamente 1 hora a 4° C. Esta etapa é fundamental, pois permite excluir qualquer ligação inespecífica à resina. Depois o extrato foi centrifugado a uma velocidade de 1000 x g por 2 minutos a 4°C, para a precipitação da resina, e somente o sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL. Aos novos tubos foram adicionados 1 μ L (~1 mg/mL) de anticorpo anti-myc (clone 9E10-Sigma) e novamente incubados por 2 horas no gelo. Após as 2 horas, foram adicionados 30 μ L da proteína A sefarose 50% e a incubação continuou por mais 1 hora a 4° C, sob agitação constante. Ao término da imunoprecipitação, o extrato foi centrifugado por 2 minutos a 1000 x g e descartado, restando apenas as proteínas de interesse ligadas a resina. Essa resina foi então lavada por cinco vezes com tampão de lise NP-40 1X e fervida durante 5 minutos em presença de 30 μ L de tampão de amostra 1X (50 mM de Tris pH 6.8, 100 mM de DTT, 2% de SDS, 0,1% de Azul de Bromofenol, 10% de glicerol). As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C (GIANNINI *et al*, 2004).

Os 30 μ L de amostra foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, realizamos o *western blot* utilizando o anticorpo anti-HA na diluição 1:1000 (item 3.6). Após incubação com anticorpo secundário e as lavagens, a membrana foi revelada utilizando um kit de

quimioluminescência SuperSignal West Pico (Thermo) seguindo as instruções do fabricante e posteriormente expostas a um filme de Raio-X (GE-Amersham) de 1 a 5 minutos. Os filmes utilizados foram revelados e fixados em soluções Kodak.

3.9- Imunofluorescência

Para o ensaio de localização celular das proteínas selvagens TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166 e dos mutantes ALLK-TRAC-1, C37,40A-TRAC-1, G2A-TRAC-1 e V217P/S221Q-TRAC-1 utilizamos a linhagem celular HeLa, pois esta apresenta uma melhor aderência em placas de cultura. Esse experimento foi realizado sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro dispostas em placas de 24 poços (TPP). Todos os DNAs utilizados estavam subclonados no vetor pcDNA3.1A(-) contendo myc-his tag (Invitrogen).

Após as 24 horas de transfecção, as lamínulas foram lavadas, delicadamente, por três vezes com PBS 1X; fixadas em paraformaldeído 3% por 15 minutos em temperatura ambiente e posteriormente permeabilizadas por 5 minutos em solução contendo 0,1% de Triton X-100. Todas as soluções foram feitas em PBS 1X. Em seguida, as células foram pré-incubadas em solução contendo 2% de soro fetal bovino por 10 minutos. Após a pré-incubação, as lamínulas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo primário anti-myc Clone9E10 (Sigma) diluído 1:300 em solução contendo 2% de soro fetal bovino. Passado o tempo de incubação com o anticorpo primário, as células foram novamente incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado à rodamina (anti-IgG de rato - Perbio Science) na diluição de 1:300. Ao mesmo tempo foi também realizada a marcação de núcleo utilizando o marcador DAPI (4',6' - diamidino, 2' fenilindol - Invitrogen), na concentração 0,03 mM/mL. Ao final da imuno-marcação, as lamínulas foram lavadas 3 vezes em PBS 1X, 1 vez em água MilliQ, secas em papel filtro e montadas em lâminas com a ajuda de 5 µL de Mowiol (Calbiochem-Novachem), com o cuidado para não deixar bolhas entre a lâmina e lamínula (BIJLMAKERS *et al*, 1997).

As lâminas foram analisadas no microscópio invertido Zeiss Axio Observer.Z1 equipado com uma lente objetiva de 100X de aumento, um filtro para Rodamina (Alexa Fluor 546), um filtro para DAPI, um filtro para DIC e uma câmera AxioCam MRm. As imagens foram capturadas utilizando o programa Axion Vision (Zeiss, Berlim, Germany) e analisadas pelo programa ImageJ.

3.10- Gradiente de Sacarose

Para os ensaios de gradiente de sacarose foram utilizados os DNAs das proteínas RNF114, RNF138 e RNF166; todos subclonados em plasmídeo pcDNA3.1(-) (Invitrogen). A linhagem HEK-293T foi utilizada para o experimento e a transfecção das células foi realizada pelo método de Lipofectamina 2000, já descrito anteriormente.

No dia anterior ao ensaio de gradiente; células HEK-293T, aderidas ao fundo de placas de 100 x 20 mm (TPP) na concentração de 2×10^6 , foram transfectadas com 10 μg do respectivo DNA. Em seguida, as placas voltaram à estufa onde permaneceram por 24 horas. No dia seguinte, após o descarte do meio de transfecção, as células foram lavadas com 2 mL de PBS 1X gelado e posteriormente soltas em 1 mL de tampão NTE (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4 e 1 mM EDTA) acrescido dos inibidores de protease (1 mM de PMSF, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antipaína, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de quimostatina, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pepstatina A e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptina). O tampão NTE é uma solução isotônica livre de detergentes, que permite a lise celular com a manutenção da integridade das membranas. O homogenato de células foi então transferido para tubos eppendorfs de 2 mL e levados para a sonicação. A sonicação foi realizada em duas etapas de 15 segundos cada; sendo que no período entre pulsos (1 minuto) as células voltavam ao gelo. Após a sonicação, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1000 x g e os sobrenadantes transferidos para novos tubos.

Para o fracionamento das proteínas, foram utilizadas soluções de sacarose nas concentrações 94% (ajustada para 70% pela adição dos extratos preparados acima), 65% e 10%. Todas as soluções foram preparadas em

tampão NTE. O extrato de celular foi misturado à solução de sacarose 94%, de forma que sua concentração final ficasse em 70%. A partir daí, o volume de 2,5 mL da solução a 70% foi delicadamente colocado no fundo de um tubo de ultracentrifugação (Beckman) com capacidade final para 12 mL. Após a solução de 70%, foram colocados 6 mL de sacarose 65% e por fim 2,5 mL de sacarose 10%. O gradiente foi centrifugado a 120000 x g por 18 horas. No dia seguinte, alíquotas de 1 mL foram retiradas sucessivamente do topo para o fundo do tubo. As amostras foram ajustadas a 1% em tampão de lise NP-40 1X e submetidas a análise por SDS-PAGE e Western blot (SWANSON *et al*, 2004). A marcação das proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 foi realizada com anticorpo primário anti-myc clone 9E10 (Sigma) na concentração de 1:1000 e com o anticorpo secundário (anti-IgG de rato - Sinapse), conjugado à peroxidase, na diluição de 1:5000. O anticorpo contra o receptor de transferrina (TFR) foi utilizado como controle positivo para proteínas de membrana.

3.11- Produção de Proteínas de Fusão e Ensaio de Fosforilação *in vitro*

Para os experimentos de fosforilação *in vitro*; TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166 foram subclonadas no vetor de expressão PGEX-5X-2 (Amersham Pharmacia Biotech) para expressar proteínas fusionadas a GST (glutathiona S-transferase). Os DNAs foram gentilmente cedidos pela Dr^a. Marie-Jose Bijlmakers, do Kings College London.

O programa NetPhosK 1.0 (BLOM *et al*, 2004) foi utilizado para a predição dos supostos sítios de fosforilação, levando em consideração a seqüência primária de aminoácidos da proteína e também os resíduos que tivessem um índice superior a 0,70. De acordo com os resultados da predição, os ensaios foram realizados utilizando as enzimas PKC (clássicas - isoformas α , β_I , β_{II} e γ) (BIOMOL) e CKII (caseína cinase II) (PROMEGA). A enzima CKII e a proteína HMGB1 foram cedidas gentilmente pela aluna de doutorado Isabel Caetano de Abreu e pelo professor Marcelo Rosado Fantappié, IBqM, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. A proteína HMGB1 de *Schistosoma mansoni* foi utilizada como controle positivo de fosforilação por PCK e CKII (DE ABREU DA

SILVA ISABEL CAETANO, 2008 - Mestrado). As cinases PKC e CKII fosforilam resíduos de serinas e treoninas.

As células (BL21-DE3 / Novagen) foram transformadas por eletroporação com os plasmídeos TRAC1/RNF125-GST, RNF114-GST, RNF138-GST e RNF166-GST; plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) contendo ampicilina na concentração 100 µg/mL e posteriormente incubadas a 37° C. As colônias positivas foram isoladas, inoculadas e crescidas em meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL a 37° C em agitação constante de 180 rpm; até que atingissem a densidade óptica (D.O.) de 600 nm de 0,6. A partir daí, foram adicionados 0,5 mM de IPTG e a cultura voltou a ser mantida a 37° C por mais 5 horas. Uma pequena parte da cultura foi recolhida e submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) para a análise da expressão das proteínas. Somente a proteína RNF138 não conseguiu ser expressa durante esses ensaios, e portanto não foi submetida aos ensaios de fosforilação.

Após as 5 horas de indução, a suspensão de células foi centrifugada a 7700 x g por 10 minutos a 4° C. O precipitado resultante foi ressuspendido em tampão de lise NP40 1X (1% de NP-40, 150 mM de NaCl, 50 mM de NaF, 20 mM de Tris pH 8,0, 2 mM de MgCl₂) gelado acrescido de inibidores de protease (1 mM de PMSF, 5 µg/mL de antipaína, 5 µg/mL de quimostatina, 5 µg/mL de pepstatina A e 10 µg/mL de leupeptina) e sonicado (5 vezes, 20 segundos cada, com intervalos de 20 segundos em gelo). O extrato de bactérias foi novamente centrifugado a 20000 x g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado e filtrado através de uma membrana de 0.45 µm (Millipore). Para a purificação, foram utilizadas esferas de glutationa-sefarose (Amersham) que permaneciam incubando no extrato por aproximadamente 1 hora a 4° C. Após a incubação, as esferas eram lavadas por 5 vezes em tampão de lise NP40 1X, para retirada de interações inespecíficas.

As reações de fosforilação por PKC foram realizadas em tampão de reação contendo 30 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 6 mM de Acetato de Magnésio, 0,4 mM de CaCl₂. Foi acrescido também 120 µM de ATP, 1 µCi [³²P]ATP (PerkinElmer), 100 ng/µL de fosfatidilserina, 20 ng/µL diacilglicerol e 35 ng PKC (BIOMOL), em um volume final de 30 µL. As reações de fosforilação por CKII foram realizadas em tampão de reação contendo 25 mM Tris-HCl pH

7.4, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 µCi [³²P]ATP (PerkinElmer) e 0,1 mM ATP em um volume final de 30 µL. As reações foram iniciadas com a adição de 1 U de CKII (Promega). Para as reações de PKC e CKII, foram utilizados 30 µL de resina ligada as proteínas TRAC-1/RNF125, RNF114 e RNF166. Além disso, as reações permaneceram incubando por 1 hora a 37°C para CKII e 1 hora a 20°C para PKC. Os controles com HMGB1 e HMGB1 + resina foram realizados com 1 µg de proteína recombinante.

Ao término das reações, as amostras foram fervidas por 5 minutos em tampão de amostra (50 mM de Tris pH 6.8, 100 mM de DTT, 2% de SDS, 0,1% de Azul de Bromofenol, 10% de glicerol) e submetidas a eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. O gel foi corado com Coomassie Blue R-250 (0,25% em 45% Álcool Metílico e 10% ácido Acético), descorado em solução descorante (50% Álcool Metílico, 10% ácido Acético), desidratado e exposto a filmes de raio-X (GE-Amersham) por 24 horas para visualizar a SmHMGB1 e 1 ou 2 semanas para as outras proteínas. Os filmes utilizados foram revelados e fixados em soluções Kodak.

Os sistemas de eletroporação e sonicação foram cedidos gentilmente pelo Laboratório de Bioquímica de Insetos Hematófagos e Laboratório de Estrutura-Função de Proteínas, ambos localizados no Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

3.12- Ensaio de Ativação de Células T

A linhagem Jurkat foi utilizada neste experimento com o objetivo de avaliar o efeito da expressão das proteínas humanas RNF125/TRAC-1, RNF114, RNF138, RNF166 e dos mutantes ALLK-TRAC-1, C37,40A-TRAC-1, G2A-TRAC-1 no papel funcional de células do sistema imune. Como controle negativo de transfecção foi utilizado a proteína GFP (plasmídeo pEGFP-N3) e também células não transfectadas. Todos os DNAs foram subclonados em vetor pEGFP-N3 utilizando os sítios de restrição EcoRI e BamHI.

No dia anterior ao experimento, a linhagem Jurkat foi repicada em novas garrafas de cultura de 250 mL contendo meio RPMI acrescido de 10% soro fetal bovino, como descrito acima. O total de células presente no frasco foi

contado com a ajuda de uma câmara de Neubauer e alíquotas contendo 1×10^7 células foram separadas em diversos tubos falcon de 15 mL. Cada tubo correspondia a uma condição do experimento. Os falcons foram centrifugados a uma velocidade de $1200 \times g$ por 3 minutos a 25°C , o meio RPMI delicadamente descartado e o precipitado ressuscitado em $200 \mu\text{L}$ de meio Opti-MEM® (Gibco-Invitrogen). Em seguida, cada falcon recebia $20 \mu\text{g}$ do seu respectivo DNA e a mistura era colocada de forma cuidadosa em uma cubeta de eletroporação para células eucarióticas (Bio-Rad). As cubetas foram colocadas no gelo até o início da eletroporação. Simultaneamente, foram colocados 10 mL de meio RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino em garrafas de cultura TPP de 60 mL para acondicionar as células imediatamente após a eletroporação.

O sistema utilizado para a eletroporação foi o Gene Pulser X cell Electroporation Systems (Bio-Rad) nas condições de 250 V e $975 \mu\text{F}$. As cubetas foram submetidas a um pulso único e imediatamente as células foram ressuscitadas em 10 mL de meio RPMI e colocadas em seus respectivos frascos na estufa a 37°C em atmosfera úmida de 4% de CO_2 por 24 horas. O sistema de eletroporação foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Virologia Molecular Animal (LAVIMOAN), Departamento de Genética – UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Após as 24 horas, as células eletroporadas foram visualizadas em microscópio de fluorescência para verificar a eficiência mínima de 50% de transfecção. Cada condição foi novamente centrifugada a uma velocidade de $1200 \times g$ por 3 minutos à temperatura ambiente; e o precipitado ressuscitado em 4 mL de meio RPMI com 10% soro fetal bovino. As células em suspensão foram repartidas em 2 poços de uma placa de 12 poços. Foi realizado o mesmo procedimento para todas as condições (células+DNA) e também para a condição controle de células não transfectadas. Em seguida, foram adicionados a somente um dos poços de cada condição $1 \mu\text{g/mL}$ do éster de forbol PMA (Calbiochem) e $1 \mu\text{M}$ de Ionomicina (Calbiochem). O éster de forbol PMA e a ionomicina promovem a ativação de linfócitos, mimetizando uma ativação promovida pelo engajamento do receptor de linfócitos T. As células foram incubadas por 24 horas na estufa a 37°C , após a adição destes ativadores.

Ao final do tempo de incubação; cada condição, tratada ou não com

PMA/ionomicina, foi ressuspensa e colocada em tubos eppendorfs. Os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 1200 x g por 3 minutos a 37°C. O meio foi descartado e os precipitados de células foram ressuspensos em 100 µL de PBS 1X acrescido de 2% de soro fetal bovino e do anticorpo anti-CD69 conjugado a APC (Alofocianina - BD Pharmingen) na concentração 1:100. As células controles (não transfectadas ou só com pEGFP) foram ressuspensas em 100 µL de PBS 1X acrescido de 2% de soro fetal bovino sem marcação para CD69. Os tubos ficaram incubando no gelo por 30 minutos e ao final do tempo, a cada condição foram adicionados 100 µL de paraformaldeído 4% (PFA) para a fixação das células. As amostras seguiram para análise por citometria de fluxo (FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorting).

3.13- Análise por Citometria de Fluxo (FACS)

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho BD FACSCalibur (BD Biosciences) localizado no Centro de Citometria de Fluxo (Bloco D, CCS-UFRJ). As análises de cada experimento foram realizadas com a ajuda do programa CellQuest Software (Benton Dickinson) presente no aparelho.

Os parâmetros SSC, FCS, FL-1 (GFP) e FL-4 (APC) foram utilizados para a aquisição das amostras. A configuração inicial foi realizada através de um gráfico de pontos (Dot Plot) com o eixo x correspondendo ao FSC (Forward Scatter), o eixo y correspondendo ao SSC (Side Scatter) e utilizando inicialmente as células Jurkat não transfectadas, não tratadas com PMA e sem marcação para CD-69 (células não ativadas). Foi criada uma região delimitando somente a população de células saudáveis. Em seguida, abriram-se novos gráficos de pontos (Dot Plot) com eixos FL-1 x SSC (x e y), FL-4 x SSC (x e y) e FL-1 x FL-4 (x e y). Os gráficos FL-1 x SSC e FL-4 x SSC foram criados para delimitar a região de células negativas tanto para GFP quanto para alofocianina. A partir daí, foram realizadas as aquisições de todas as amostras ativadas com PMA/Ionomicina e com marcação para CD69. Para cada aquisição, foram adquiridos 50.000 eventos por amostra. O controle

negativo para este experimento foram as células transfectadas somente com o plasmídeo pEGFP-N3.

Após todas as aquisições, analisamos a expressão de CD69 para cada amostra e comparamos a expressão de CD69 (indicativo de células ativadas) entre a população expressando GFP (GFP ou proteínas fusionadas a GFP) ou não. Esta comparação foi realizada pela razão da expressão de CD69 na população GFP (-) e a expressão de CD69 na população GFP(+).

Foram realizados ao todo 4 experimentos, os quais foram analisados pelo programa GraphPad Software e submetidos ao teste estatístico por ANOVA Bonferroni com o intervalo de confiança de 95%. Foram consideradas estatisticamente significativas as amostras com $p < 0,05$ e $p < 0,001$ em relação à amostra controle GFP.

4 - RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão divididos em duas partes. Na primeira parte são mostrados os resultados referentes à ligase de ubiquitina RNF125/TRAC-1 e aos mutantes ALLK-TRAC-1, C37,40A-TRAC-1, G2A-TRAC-1 e V217P/S221Q-TRAC e a na segunda são mostrados os resultados relativos às ligases de ubiquitina RNF114, RNF138 e RNF166.

4.1- Parte I

4.1.1- Alinhamento das Seqüências de Aminoácidos da Proteína TRAC-1/RNF125 de diferentes Espécies

A seqüência de aminoácidos da proteína humana TRAC-1/RNF125 foi retirada do banco de seqüências genéticas, Genebank (NCBI). Utilizando a ferramenta “Nucleotide”, a seqüência da proteína TRAC-1/RNF125 foi identificada em sete outras espécies de vertebrados além da espécie humana, indicando que ela não é restrita a *Homo sapiens* (Figura 15). Essas seqüências foram alinhadas utilizando o programa Vector NTI software (Invitrogen) e formatadas pelo programa Genedoc.

Primeiramente, notamos que a maior parte das espécies analisadas apresenta um número de aminoácidos similar ao da proteína humana TRAC-1/RNF125, exceto as proteínas de cão e camundongo. A proteína TRAC-1/RNF125 apresenta 232 aminoácidos em *Homo sapiens* (humano), *Pan troglodytes* (chimpanzé), *Equus caballus* (cavalo), *Macaca mulatta* (macaco rhesus), *Bos taurus* (boi); 233 aminoácidos em *Rattus norvegicus* (rato); 416 em *Canis lúpus familiaris* (cão) e 140 aminoácidos em *Mus musculus* (camundongo). Além disso, os domínios C3HC4-RING, C2HC, C2H2, UIM e sítio de miristoilação também se encontram conservados nestas espécies (Figura 15).

A espécie *Canis lupus familiaris* apresentou a maior seqüência com 416 aminoácidos, sendo que a sua porção N-terminal é bem mais longa do que a

da proteína humana. Por causa disso, o sítio de miristoilação encontra-se dentro da proteína, e desta forma não seria utilizado para a adição do ácido mirístico. Já a espécie *Mus musculus* apresentou a menor seqüência de aminoácidos, com apenas 140. Para esta espécie, TRAC-1/RNF125 não apresentou homologia para o importante domínio RING e para o sítio de miristoilação (Figura 15).

O alinhamento também mostra o grau de identidade entre as seqüências de TRAC-1/RNF125 em diferentes espécies. TRAC-1/RNF125 humana apresenta 99,6% de identidade quando comparada a seqüência da espécie *Pan troglodytes*; 93,5% com *Equus caballus*; 89,7% com *Bos taurus*; 85,4% com *Rattus norvegicus*; 50,7% com *Canis lupus familiaris*; 97% com *Macaca mulatta* e 51,7% de identidade com a seqüência de *Mus musculus*.

4.1.2- Alinhamento entre as Seqüências de Aminoácidos da Proteína Humana TRAC-1/RNF125 e respectivos Mutantes

No presente trabalho caracterizamos a proteína humana TRAC-1/RNF125 em conjunto com os diversos mutantes construídos com base na seqüência original da proteína. A seqüência selvagem de TRAC-1/RNF125 foi alinhada às seqüências dos mutantes ALLK-TRAC-1, C37,40A-TRAC-1, G2A-TRAC-1 e V217P/S221Q-TRAC-1 utilizando o programa Vector NTI software (Invitrogen) e formatadas pelo programa Genedoc.

A figura 16 mostra dentro dos boxes os principais domínios da proteína TRAC-1 (C3HC4-RING, C2HC, C2H2, UIM - GIANNINI *et al*, 2008) e também o sítio de miristoilação na porção N-terminal. Em amarelo estão indicadas as trocas de aminoácidos que foram realizadas durante o processo de mutação sítio-dirigida.

Como já descrito anteriormente, o evento de ubiquitinação acontece com a adição de moléculas de ubiquitina a resíduos de lisina localizados na proteína alvo. TRAC-1/RNF125 sofre auto-ubiquitinação, que resulta na sua rápida degradação (GIANNINI *et al*, 2008). Com o objetivo de estudar os resíduos de lisina envolvidos neste processo de auto-ubiquitinação produzimos um mutante que teve os 8 resíduos de lisina mutados (ALLK-TRAC-1). No seqüenciamento realizado para confirmar a seqüência de aminoácidos deste mutante foi constatado que as lisinas 11 e 98 foram mutadas para arginina, a lisina 66 para glutamina e as lisinas 69, 91, 94, 121 e 125 modificadas para alanina. Desta forma, esta proteína perderia a sua capacidade de ser ubiquitinada via lisinas. Somando-se a isso, as mutações nos resíduos 66 e 69 fazem parte do importante domínio RING, o que também poderia comprometer parcialmente a atividade deste mutante (Figura 16).

A proteína mutante C37,40A-TRAC-1 teve suas cisteínas 37 e 40 modificadas para o aminoácido alanina. Esses dois resíduos conservados de cisteínas fazem parte do principal domínio da proteína TRAC-1/RNF125, o C3HC4-RING. O mutante G2A-TRAC-1 foi criado a partir da alteração do aminoácido glicina na posição 2 pelo aminoácido alanina, localizado na porção N-terminal da proteína (GIANNINI *et al*, 2008 – Figura 16).

Por fim, o mutante V217P/S221Q-TRAC-1 foi gerado a partir da modificação do aminoácido valina na posição 217 pelo aminoácido prolina e da serina na posição 221 pela glutamina. As mutações aconteceram em aminoácidos conservados na região do domínio UIM, o domínio de interação com ubiquitinas e necessário para o evento de auto-ubiquitinação da proteína (GIANNINI *et al*, 2008 – Figura 16).

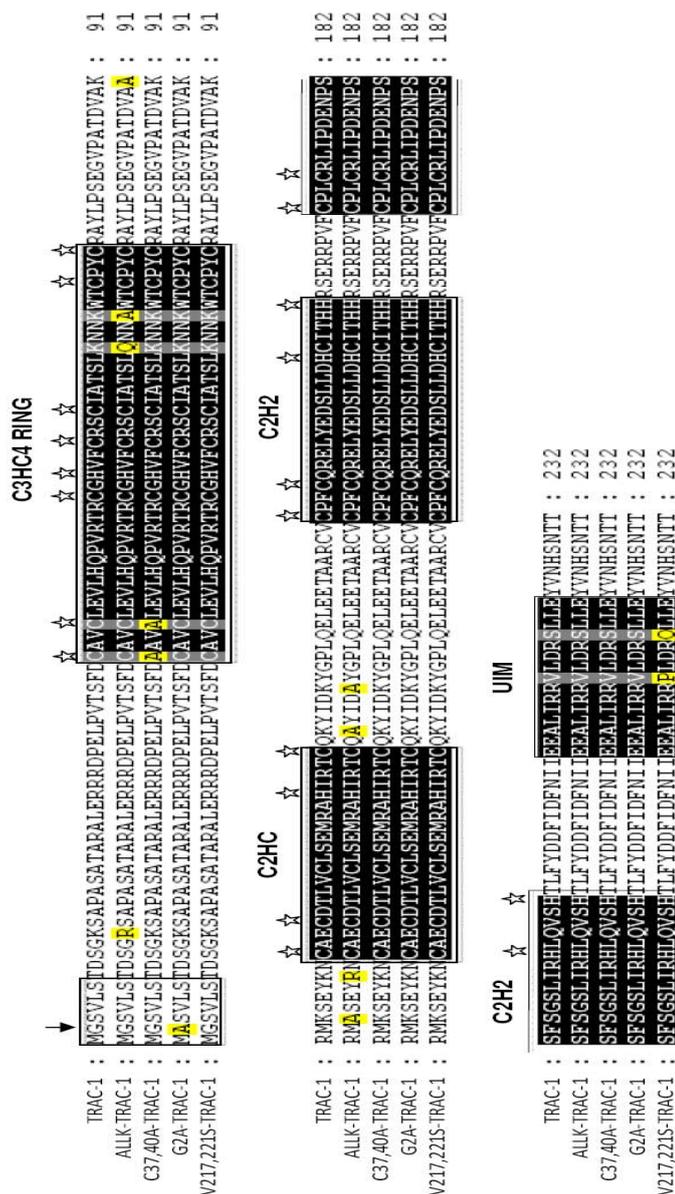


Figura 16: Alinhamento da proteína humana TRAC-1/RNF125 e seus respectivos mutantes. Os domínios C3HC4-RING, C2HC, C2H2 e UIM da proteína TRAC-1 estão destacados dentro dos boxes, assim como o sítio de miristoilação. A marcação em amarelo identifica os aminoácidos mutados e em preto os resíduos com 100% de identidade. As estrelas marcam os resíduos conservados de cisteínas e histidinas nos diferentes domínios e a seta localiza o aminoácido glicina (G²) na porção N-terminal. As seqüências foram alinhadas e formatadas pelos programas Vector NTI (Invitrogen) e Genedoc.

4.1.3- Análise da Estabilidade da Proteína Humana TRAC-1/RNF125 e de seus diferentes Mutantes

Nestes ensaios, TRAC-1/RNF125 e seus mutantes foram expressos em células da linhagem HEK293T e suas estabilidades foram avaliadas pela adição do inibidor de síntese protéica, a cicloheximida. Desta forma, toda proteína detectada, representa o total de proteína produzida pela célula antes da adição de cicloheximida e que ainda não foi degradada.

Já foi descrito na literatura que a proteína selvagem TRAC-1/RNF125 é pouco estável, não sendo mais detectada 30 minutos após a adição de cicloheximida. Quando mutada em seu domínio C3HC4-RING, o qual confere a atividade de ligase de ubiquitina, a proteína mutante C37,40A-TRAC-1 mostrou ser bastante estável sendo detectada mesmo após 2 horas de tratamento com cicloheximida (GIANNINI *et al*, 2008). Esses resultados foram repetidos como controles para os demais mutantes de TRAC-1/RNF125, cuja estabilidade ainda não havia sido avaliada.

Como destacado na figura 17, a proteína TRAC-1/RNF125 é bastante instável no decorrer de todo tratamento. Em 30 minutos, podemos visualizar somente 30% de expressão de proteína em relação ao controle não tratado. Já o mutante C37,40A-TRAC-1 teve uma redução de apenas 32% de expressão ao final dos 120 minutos de tratamento (Figura 17). Apesar destes resultados não serem novos, precisávamos destas proteínas para comparação com os outros mutantes.

A proteína mutante ALLK-TRAC-1, modificada em todas as suas lisinas, apresentou uma meia-vida em torno de 60 minutos. A estabilidade deste mutante é maior do que a da proteína selvagem TRAC-1/RNF125, porém menor do que a estabilidade do mutante C37,40A-TRAC-1. Ao final dos 120 minutos de tratamento, ALLK-TRAC-1 apresentou um nível de expressão de proteína de aproximadamente 40% em relação ao controle não tratado (Figura 18). A proteína HSP90 foi utilizada como controle endógeno, pois apresenta uma meia-vida superior a 15 horas (CHANG *et al*, 2006).

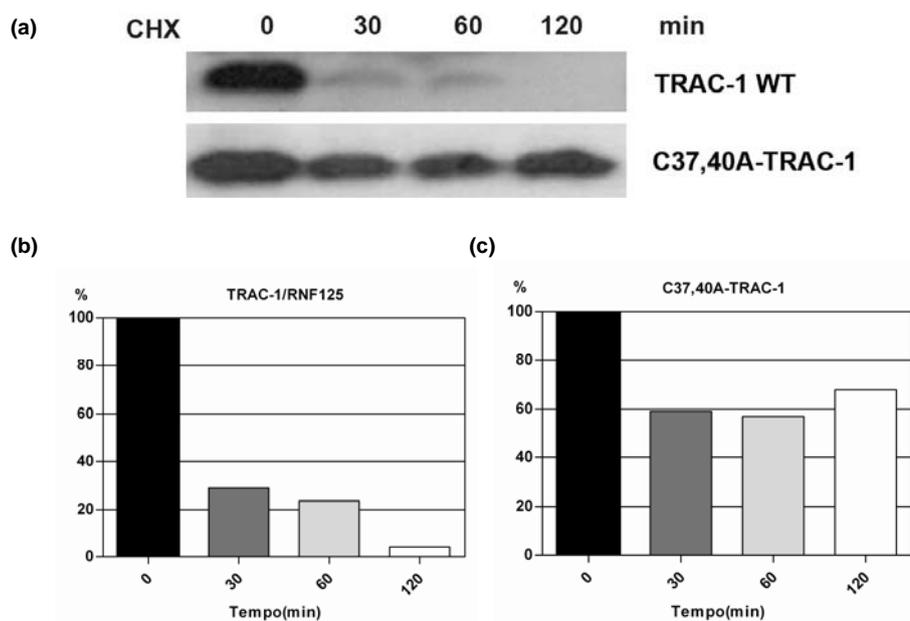


Figura 17: A proteína TRAC-1/RNF125 possui uma meia-vida inferior a 30 minutos. (a) A linhagem HEK-293T foi transfectada com TRAC-1 WT-myc ou C37,40A-TRAC-1-myc. As células foram incubadas com CHX (100 ug/mL) por 0, 30, 60 e 120 min. Quantidades equivalentes dos extratos totais de células de cada ponto foram analisadas por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-myc. (b e c) Análise de Densitometria dos blots mostrados no item (a). A percentagem de cada ponto foi obtida em relação à condição controle (n=1).

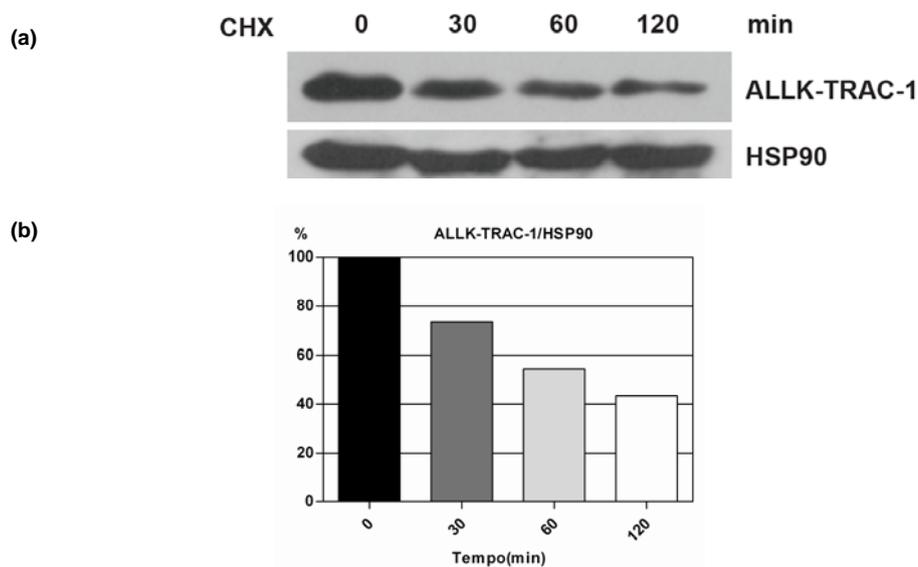


Figura 18: A proteína ALLK-TRAC-1 possui uma meia-vida em torno de 60 minutos. (a) A linhagem HEK-293T foi transfectada, com o mutante ALLK-TRAC-1-myc. As células foram incubadas com CHX (100 ug/mL) por 0, 30, 60 e 120 min. Quantidades equivalentes dos extratos totais de células de cada ponto foram analisados por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-myc. A proteína HSP90 foi utilizada como controle endógeno. (b) Análise de Densitometria dos blots mostrados no item (a). A percentagem de cada ponto foi obtida pela razão ALLK-TRAC-1/HSP90 em relação à condição controle (n=2, figura representativa).

Em seguida, avaliamos a estabilidade do mutante V217P/S221Q-TRAC-1. Esta proteína apresenta uma mutação no domínio UIM que é bastante importante na auto-ubiquitinação de TRAC-1/RNF125. Como mostrado na figura 19, a proteína mutante apresentou uma grande estabilidade, superior até ao mutante dominante negativo C37,40A-TRAC-1. Ao longo de todo tratamento, a proteína V217P/S221Q-TRAC-1 não apresentou qualquer redução em seus níveis de expressão.

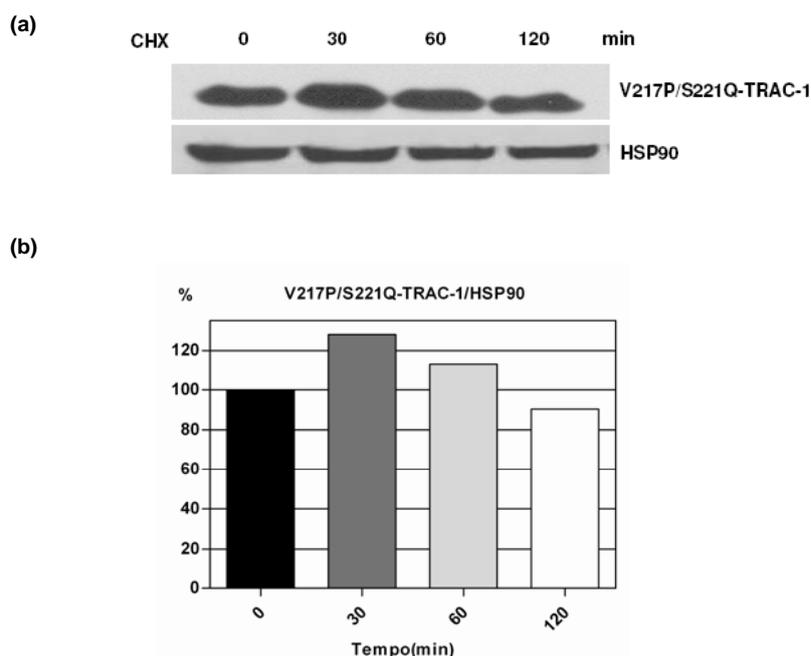


Figura 19: A proteína V217P/S221Q-TRAC-1 continua estável após 120 minutos de tratamento com cicloheximida. (a) A linhagem HEK-293T foi transfectada, com o mutante V217P/S221Q-TRAC-1-myc. As células foram incubadas com CHX (100ug/mL) por 0, 30, 60 e 120 min. Quantidades equivalentes dos extratos totais de células de cada ponto foram analisados por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-myc. A proteína HSP90 foi utilizada como controle endógeno. (b) Análise de Densitometria dos blots mostrados no item (a). A percentagem de cada ponto foi obtida pela razão V217P/S221Q-TRAC-1/HSP90 em relação à condição controle (n=2, figura representativa).

4.1.4- Localização Intracelular da Proteína TRAC-1/RNF125 e de seus diferentes Mutantes

A análise de localização intracelular da proteína TRAC-1/RNF125 e dos mutantes ALLK-TRAC-1; C37,40A-TRAC-1; G2A-TRAC-1 e V217P/S221Q-TRAC-1 foi realizada por microscopia de fluorescência. Todos os DNAs transfectados foram subclonados em vetor pcDNA3.1(-) contendo myc-his tag e a marcação foi realizada utilizando os anticorpos primário anti-myc (Clone9E10) e secundário anti-mouse conjugado à rodamina, como já descrito em material e métodos.

A proteína selvagem TRAC-1/RNF125 já foi caracterizada em ensaios de gradiente de sacarose como uma proteína parcialmente associada à membranas celulares devido à presença do sítio de miristoilação na sua porção N-terminal. TRAC-1/RNF125 é predominantemente perinuclear e já foi co-localizada em regiões do complexo de Golgi. Quando mutada no sítio de miristoilação (G2A-TRAC-1), essa proteína adquire um perfil difuso por toda a célula, sendo capaz de se localizar tanto no núcleo quanto no citoplasma. Já uma mutação no domínio UIM (V217P/S221Q-TRAC-1) não é capaz de alterar o perfil de localização celular desta proteína, em relação à selvagem (GIANNINI *et al*, 2008 – Figura 20).

Os mutantes ALLK-TRAC-1 e C37,40A-TRAC-1 também foram analisados por microscopia de fluorescência. A localização celular do mutante ALLK-TRAC-1 se mostrou bem delimitada na região perinuclear e bastante distribuída por todo o citoplasma e periferia da célula. Apesar disso, ainda não foram realizados ensaios de gradiente de sacarose para este mutante, e assim não podemos dizer se essas mutações contribuem ou não para a sua localização em membranas celulares. A proteína mutada no domínio RING (C37,40A-TRAC-1) também apresenta uma distribuição perinuclear e parece estar fortemente associada à membranas por todo o citoplasma da célula (aspecto pontilhado). Esse resultado reforça os dados de gradiente de sacarose publicados por Giannini e colaboradores, que mostram que o mutante C37,40A-TRAC-1 se localiza quase na sua totalidade associado à membranas celulares, ao contrário da proteína selvagem. (Figura 20).

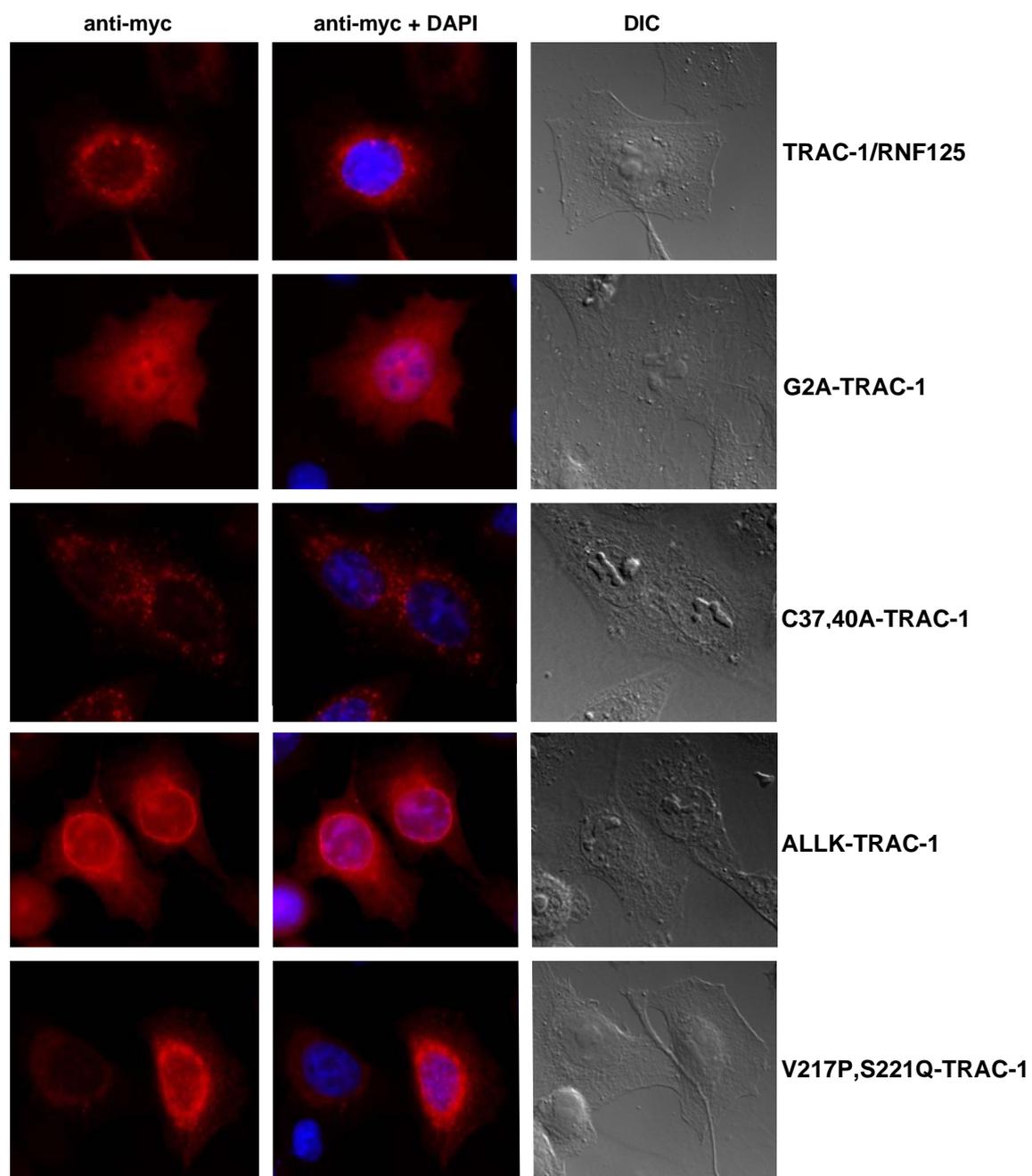


Figura 20: Localização celular da proteína TRAC-1/RNF125 e de seus respectivos mutantes. (a) Linhagem HeLa transfectada com TRAC-1-myc; G2A-TRAC-1-myc ou V217P/S221Q-TRAC-1-myc. (b) Linhagem HeLa transfectada com C37,40A-TRAC-1-myc ou ALLK-TRAC-1-myc. Após a transfecção, as células foram marcadas com o anticorpo primário anti-myc (clone 9E10) e pelo anticorpo secundário conjugado à rodamina. As imagens foram capturadas em microscópio invertido de fluorescência sob um aumento de 100X e analisadas pelo programa ImageJ.

4.1.5- Ensaio de Interação do Mutante ALLK-TRAC-1 com Ubiquitinas

Após as análises de estabilidade e localização intracelular das proteínas mutantes, o passo seguinte foi verificar se mutações em todos os resíduos de lisina de TRAC-1/RNF125 (ALLK-TRAC-1) comprometeriam a capacidade deste mutante de interagir com ubiquitinas. Neste ensaio utilizamos a proteína selvagem TRAC-1/RNF125 e o mutante V217P/S221Q-TRAC-1 como controles.

A proteína TRAC-1/RNF125 já foi descrita na literatura como uma ligase de ubiquitina capaz de ligar cadeias de poliubiquitinas *in vitro* e *in vivo* (ZHAO *et al*, 2005). Além disso, esta proteína também interage com ubiquitinas via domínio UIM. Quando mutada em seu domínio RING, TRAC-1/RNF125 perde totalmente a sua capacidade de ligar ubiquitinas, deixando de atuar como uma ligase de ubiquitina; e mutações em resíduos conservados do domínio UIM acarretam uma redução na capacidade de interagir com ubiquitinas (GIANNINI *et al*, 2008).

A figura 21 confirma os resultados descritos na literatura para a proteína selvagem TRAC-1/RNF125 e para o mutante V217P/S221Q-TRAC-1. Os ensaios *in vivo* sugerem que a TRAC-1/RNF125 é capaz de interagir com ubiquitinas, visto o rastro identificado por Ub que sugere que ubiquitinas estejam interagindo com a proteína via domínio UIM. Quando o domínio UIM é mutado em dois resíduos conservados, a proteína perde parcialmente a capacidade de interagir com ubiquitinas. O *blot* das proteínas V217P/S221Q-TRAC-1 e TRAC-1/RNF125 imunoprecipitadas valida a comparação entre essas amostras, visto que a quantidade da proteína mutada no UIM é um pouco maior do que a da proteína selvagem, porém sua interação com ubiquitinas é menor.

Em relação ao mutante ALLK-TRAC-1, os resultados sugerem que mutações nos oito resíduos de lisina da proteína TRAC-1/RNF125 não interferem na sua capacidade de interagir com ubiquitinas. Em ALLK-TRAC-1, o rastro de interação com ubiquitinas (Ub) é muito mais intenso em relação ao da proteína selvagem, porém a quantidade de proteína ALLK-TRAC-1 imunoprecipitada é um pouco maior do que a proteína selvagem (Figura 21). É possível que por causa de suas mutações, o domínio UIM de ALLK-TRAC-1

esteja mais exposto a associação com ubiquitinas. Apesar desses resultados, somente com ensaios *in vitro* poderemos afirmar se o mutante ALLK-TRAC-1, além de interagir via UIM, ainda é capaz de ligar covalentemente cadeias de ubiquitinas.

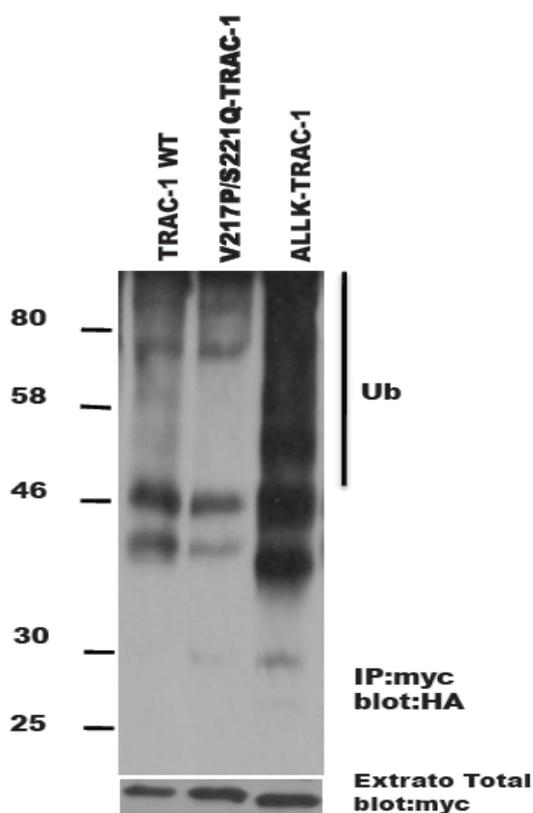


Figura 21: A proteína ALLK-TRAC-1 é capaz de interagir com ubiquitinas. Os plasmídeos TRAC-1-myc, ALLK-TRAC-1-myc ou V217P/S221Q-TRAC-1-myc foram co-transfectados com o plasmídeo Ub-HA em linhagem HEK-293T. As proteínas foram imunoprecipitadas em anti-myc (clone9E10) e analisadas por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-HA. Os extratos totais foram analisados por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-myc.

4.1.6- Avaliação Funcional da Expressão da Proteína Mutante ALLK-TRAC-1 em Células Jurkat

Sabendo que a expressão da proteína TRAC-1/RNF125, em linfócitos T primários e em linhagem Jurkat, leva a uma redução da ativação destas células pela análise de expressão do marcador CD69 e de IL-2 (GIANNINI et al, 2008); buscamos avaliar se o mutante ALLK-TRAC-1, que é mais estável, seria capaz de desempenhar uma função inibitória maior do que a exercida pela proteína selvagem.

Para este experimento, foram utilizados como controle a proteína selvagem TRAC-1/RNF125, o mutante C37,40A-TRAC-1 (que não apresenta atividade de ligase de ubiquitina), a proteína GFP (que atua como controle de transfecção e de ativação) e os mutantes G2A-TRAC-1 e ALLK-TRAC-1. A ativação dos linfócitos foi realizada utilizando PMA e Ionomicina.

Como mostrado na figura 22, a expressão de TRAC-1/RNF125 resultou em uma redução em torno 56% na expressão de CD69 após a ativação das células, quando comparado ao controle expressando GFP. Em contraste com a proteína selvagem; o mutante C37,40A-TRAC-1 não apresentou uma redução significativa na expressão de CD69, mostrando que o domínio RING é importante para a regulação negativa da ativação das células T. Os demais mutantes ALLK-TRAC-1 e G2A-TRAC-1 também diminuíram significativamente, cerca de 60%, a expressão do marcador de ativação CD69. Apesar de ser mais estável, o mutante ALLK-TRAC-1 não teve um efeito inibitório maior do que a proteína selvagem. Além disso, a localização celular da proteína não parece ser importante para esta atividade funcional, visto que o mutante G2A-TRAC-1 ainda sim foi capaz de reduzir a ativação das células T.

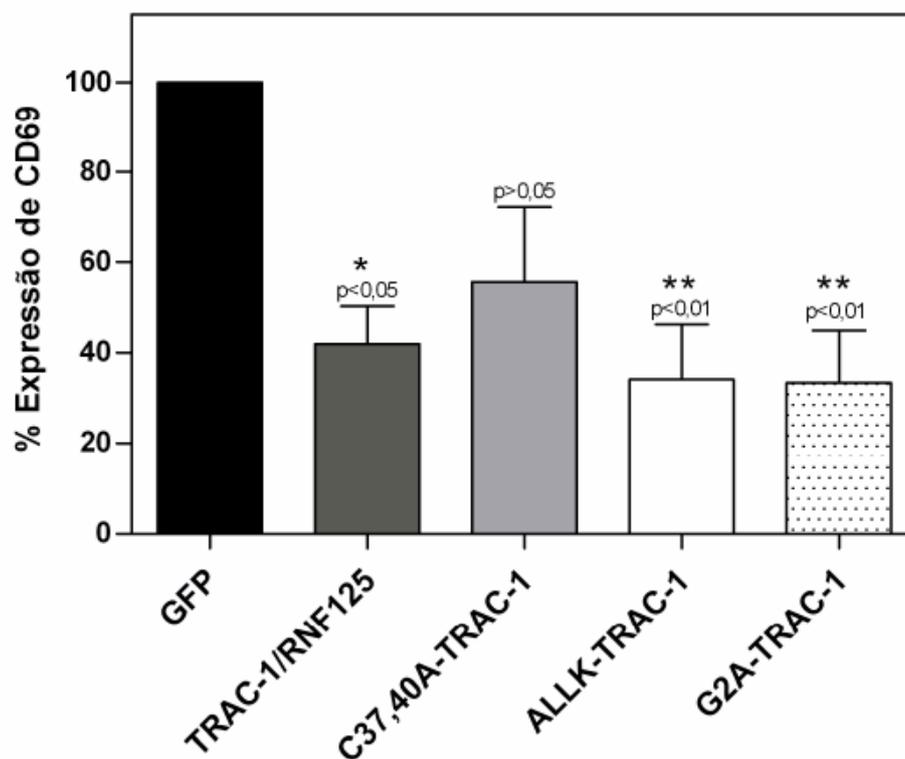


Figura 22: A proteína ALLK-TRAC-1 é capaz de reduzir a ativação de células T. A linhagem Jurkat foi eletroporada com o plasmídeo peGFP-N3 fusionado ou não aos DNAs TRAC-1/RNF125, ALLK-TRAC-1, C37,40A-TRAC-1 e G2A-TRAC-1. Após a transfecção, as células foram estimuladas com 1ug/mL do éster de forbol PMA e 1uM de Ionomicina, por 24 horas. Para a marcação foi utilizado o anticorpo anti-CD69. Foram realizados 4 experimentos independentes e cada análise foi calculada através da razão das populações GFP(-)/GFP(+). O teste estatístico considerou significativo (**) $p < 0,001$ e (*) $p < 0,05$ em relação a amostra controle GFP.

4.1.7- Ensaio de Fosforilação *in vitro* com a Proteína TRAC-1/RNF125

Durante os ensaios de ativação de células T (item 4.1.7), a expressão da proteína TRAC-1/RNF125 aumentava após 24 horas de incubação com PMA e ionomicina. Esse aumento de expressão era visualizado através da microscopia de fluorescência, já que os DNAs estavam subclonados em pEGFP-N3. Esta observação poderia ser explicada pelo aumento da atividade traducional das células T ativadas por PKC ou ainda a proteína TRAC-1/RNF125 poderia ser substrato de fosforilação por PKCs.

Levando em consideração os dados acima, foi realizada uma análise de predição de supostos sítios de fosforilação para a seqüência primária da proteína TRAC-1/RNF125 utilizando o programa NetPhosK 1.0. A análise de predição mostra que a proteína TRAC-1/RNF125 apresenta um grande número de resíduos (serinas e treoninas) que possivelmente possam ser fosforilados por PKC. Foram considerados os resíduos com índice superior a 0,70 (Figura 23).

```
Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: Trac-1
```

Site	Kinase	Score
S-6	PKC	0.62
T-7	PKC	0.70
T-7	cdc2	0.50
S-9	PKC	0.66
T-18	PKC	0.66
S-59	PKC	0.61
T-63	PKC	0.80
S-64	PKC	0.88
S-64	cdc2	0.51
S-95	RSK	0.69
S-95	PKA	0.57
Y-122	INSR	0.50
Y-126	INSR	0.51
S-152	CKI	0.53
S-182	cdc2	0.52
S-183	CKI	0.51
S-187	PKC	0.78
S-187	cdc2	0.52
S-221	PKG	0.51
T-232	PKC	0.61

Highest Score: 0.88 PKC at position 64

Figura 23: A proteína TRAC-1/RNF125 apresenta sítios putativos de fosforilação por PKC. A seqüência primária da proteína TRAC-1/RNF125 foi analisada pelo programa NetPhosK 1.0 e os resíduos com índice superior a 0,70 foram marcados pelas setas verdes.

A partir daí, foram realizados os ensaios de fosforilação por PKC *in vitro*. Para isso, utilizamos a proteína TRAC-1/RNF125 subclonada no vetor PGEX-5X-2 para expressar uma proteína de fusão contendo uma cauda GST, a proteína HMGB1 de *Schistosoma mansoni* como controle positivo e o fosfato radioativo γ 32P[ATP]. As PKCs utilizadas no experimento correspondem as isoformas clássicas α , β _I, β _{II} e γ .

O resultado desse experimento sugere que a ligase de ubiquitina TRAC-1/RNF125 não é fosforilada por PKC, já que não houve a incorporação do fosfato radioativo a proteína (Figura 24). A figura 24A corresponde ao gel de poli-acrilamida contendo as proteínas recombinantes TRAC-1/RNF125 no tamanho de 60 kDa e HMGB1 com tamanho aproximado de 26 kDa; e a figura 24B corresponde ao filme de raio X que apresenta somente a marcação radioativa na posição da proteína HMGB1, indicando que somente ela foi fosforilada. O poço contendo HMGB1 + resina confirma que a resina não está inibindo a reação de fosforilação.

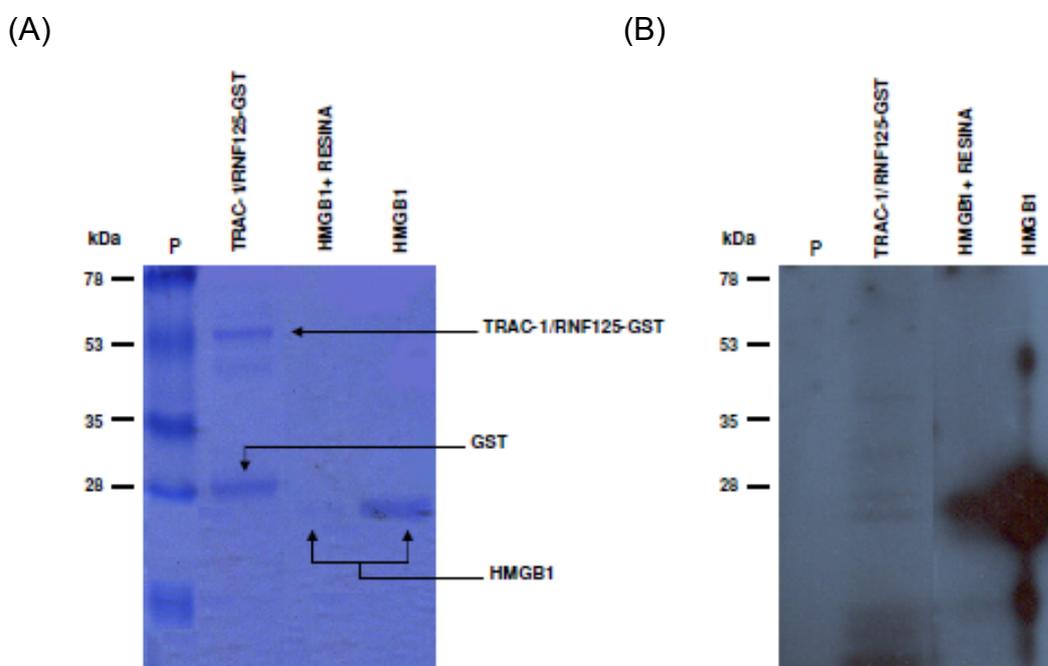


Figura 24: A proteína TRAC-1/RNF125 não é fosforilada por PKC. (A) Visualização das proteínas de fusão TRAC-1/RNF125 e HMGB1 no gel de poli-acrilamida 12% corado com coomassie blue. (B) Filme de raio X com a marcação das proteínas fosforiladas por PKC. Os filmes foram expostos por 1 semana. O controle negativo, sem a enzima PKC, não aparece na figura; visto que o forte sinal da HMGB1 ficou sobreposto a ele (n=3).

4.2- Parte II

4.2.1- Alinhamentos das Seqüências de Aminoácidos das Proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 de diferentes Espécies

As seqüências humanas das proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 também apresentaram homólogos em outras espécies. Os alinhamentos foram realizados utilizando o programa Vector NTI software (Invitrogen) e as imagens formatadas pelo programa Genedoc.

As seqüências de aminoácidos de RNF114, RNF138 e RNF166 apresentaram tamanhos semelhantes em diferentes espécies quando comparado a seqüência humana. Além disso, os domínios C3HC4-RING, C2H2, C2HC e UIM não são restritos a espécie humana. Semelhante a proteína TRAC-1/RNF125 canina, as proteínas RNF114 e RNF138 em *Canis lúpus familiaris* apresentam a porção N-terminal maior do que a proteína humana. Por causa disso, os alinhamentos entre *Canis lúpus familiaris* e as proteínas humanas apresentaram uma identidade sempre menor do que nas outras espécies.

Os alinhamentos com RNF114 mostraram que a seqüência de aminoácidos da proteína humana possui 99,6% de identidade com a seqüência em *Pan troglodytes* (chimpanzé); 94,3% com *Sus scrofa* (javali); 91,7% com *Bos taurus* (boi); 89,1% com *Mus musculus* (camundongo); 88,2% com *Rattus norvegicus* (rato); 69,7% com *Gallus gallus* (galo); 54,8% com *Xenopus (Silurana) tropicalis* (rã); 50% com *Danio rerio* (peixe) e 41,3% de identidade com a espécie *Canis lupus familiaris* (cão) (Figura 25).

A seqüência de aminoácidos da proteína humana RNF138 apresentou 99,2% de identidade com a espécie *Macaca mulatta* (macaco rhesus); 97,1% com *Bos taurus*; 93,9% com *Mus musculus*; 87,5% com *Pan troglodytes*; 77,6% com *Rattus norvegicus*; 65,2% com *Canis lupus familiaris*; 45,7% com *Xenopus (Silurana) tropicalis* e 45,3% de identidade com a espécie *Xenopus laevis* (Figura 26).

Já a proteína RNF166 apresentou o maior grau de identidade entre as espécies analisadas. Em comparação com a seqüência de aminoácidos da proteína humana, RNF166 mostrou 100% de identidade com a espécie *Pan*

troglydites; 98,7% com as espécies *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*; 94,9% com *Canis lupus familiaris*; 94,5% com *Bos taurus*; 87,2% com *Xenopus (Silurana) tropicalis*; 85,5% com *Xenopus laevis* e 80,5% com a espécie *Gallus gallus* (Figura 27).

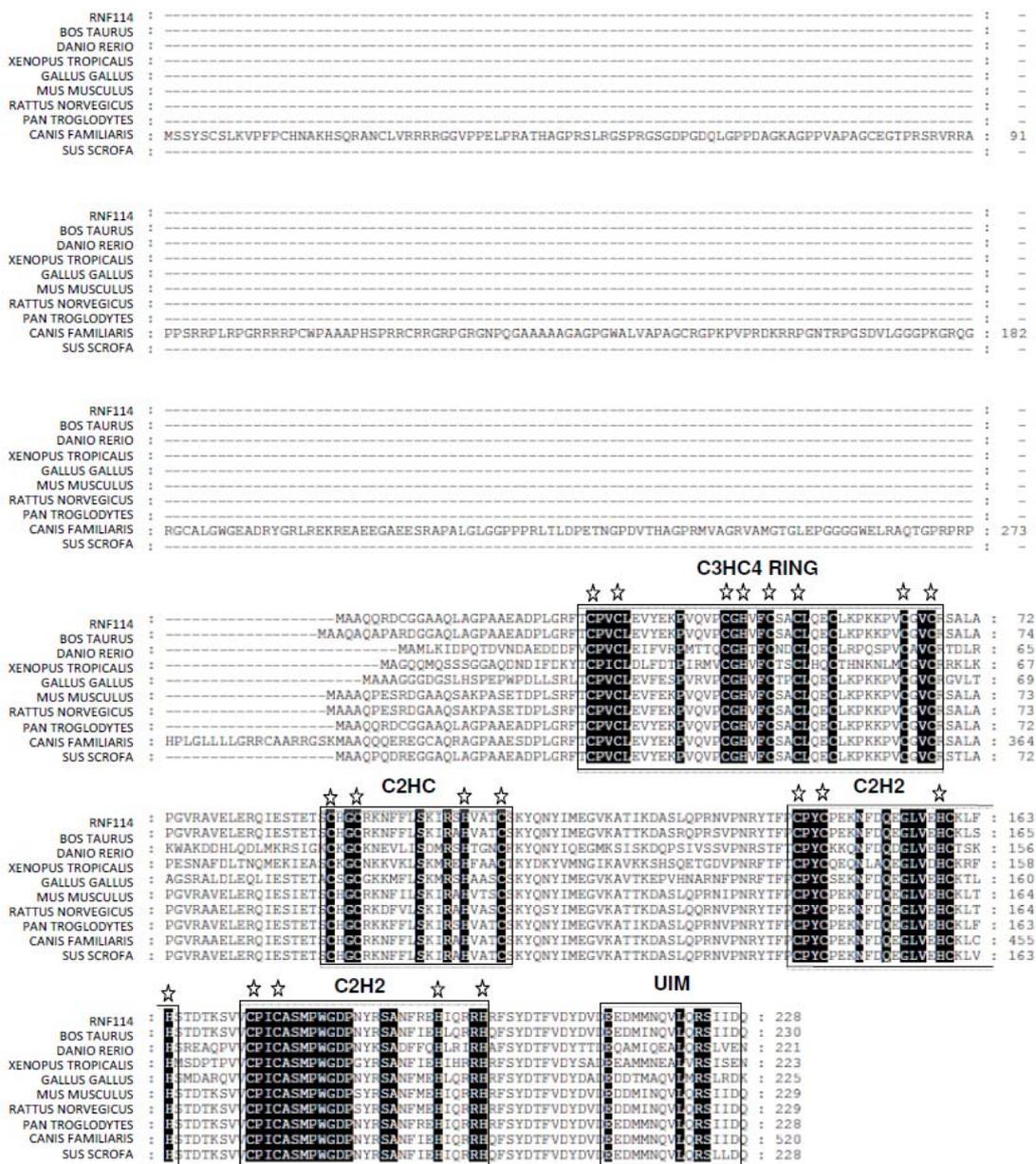


Figura 25: Alinhamento das proteínas RNF114 de diferentes espécies. Foram alinhadas as seqüências das proteínas RNF114 *Homo sapiens sp.*; *Xenopus (Silurana) tropicalis sp.*; *Pan troglodytes sp.*; *Mus musculus sp.*; *Bos taurus sp.*; *Gallus gallus sp.*; *Sus scrofa sp.*; *Canis lupus familiaris sp.*; *Danio rerio sp.* e *Rattus norvegicus sp.* Os domínios C3HC4-RING, C2HC, C2H2 e UIM da proteína RNF114 estão destacados dentro dos boxes. Em preto estão marcados os resíduos com 100% de identidade e as estrelas marcam os resíduos conservados de cisteínas e histidinas nos diferentes domínios. As seqüências foram alinhadas e formatadas pelos programas Vector NTI (Invitrogen) e Genedoc.

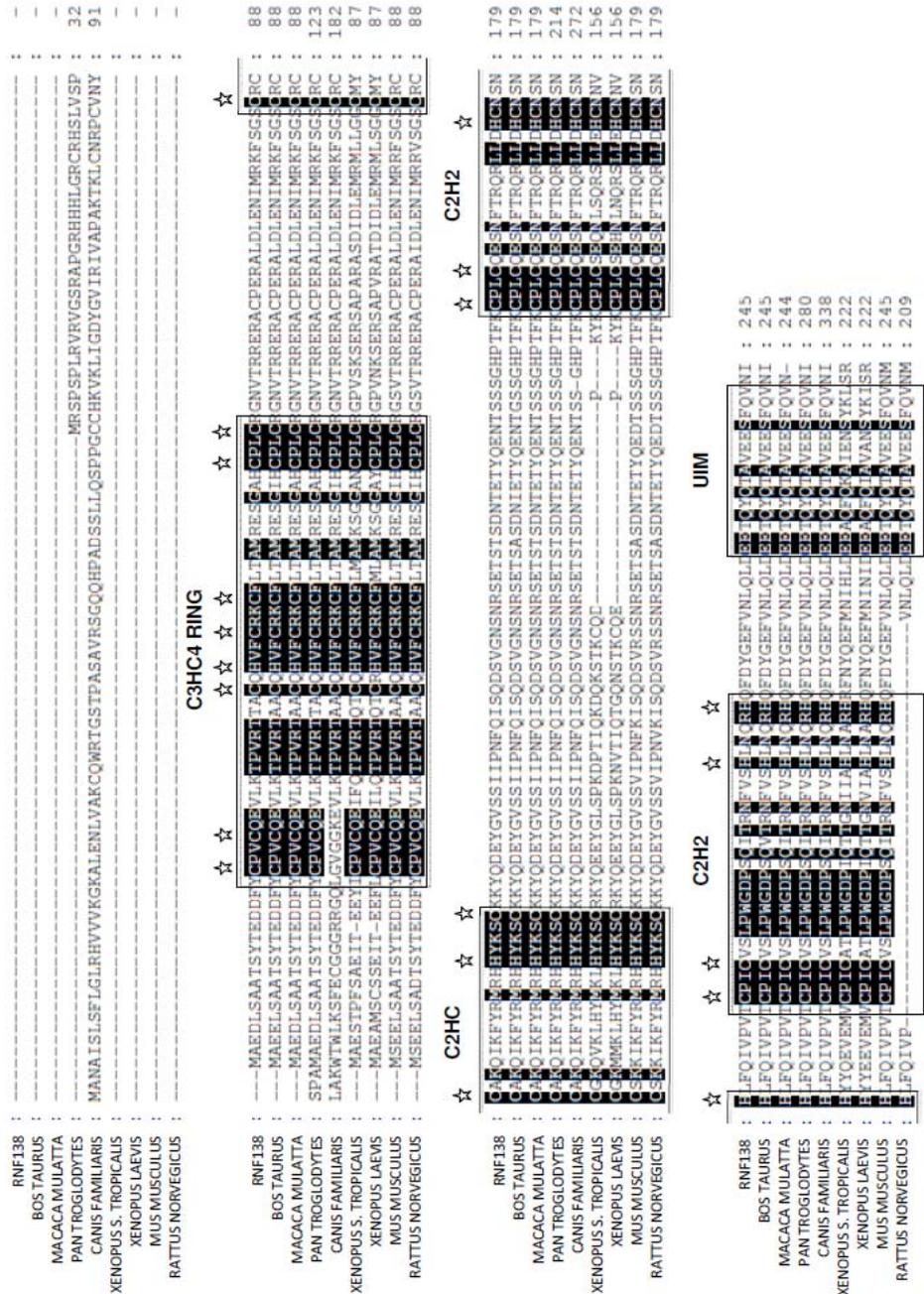


Figura 26: Alinhamento das proteínas RNF138 de diferentes espécies. Foram alinhadas as seqüências das proteína RNF138 *Homo sapiens sp.*; *Xenopus (Silurana) tropicalis sp.*; *Pan troglodytes sp.*; *Mus musculus sp.*; *Bos taurus sp.*; *Macaca mulatta sp.*; *Canis lupus familiaris sp.*; *Xenopus laevis sp.* e *Rattus norvegicus sp.* Os domínios C3HC4-RING, C2HC, C2H2 e UIM da proteína RNF138 estão destacados dentro dos boxes. Em preto estão marcados os resíduos com 100% de identidade e as estrelas marcam os resíduos conservados de cisteínas e histidinas nos diferentes domínios. As seqüências foram alinhadas e formatadas pelos programas Vector NTI (Invitrogen) e Genedoc.

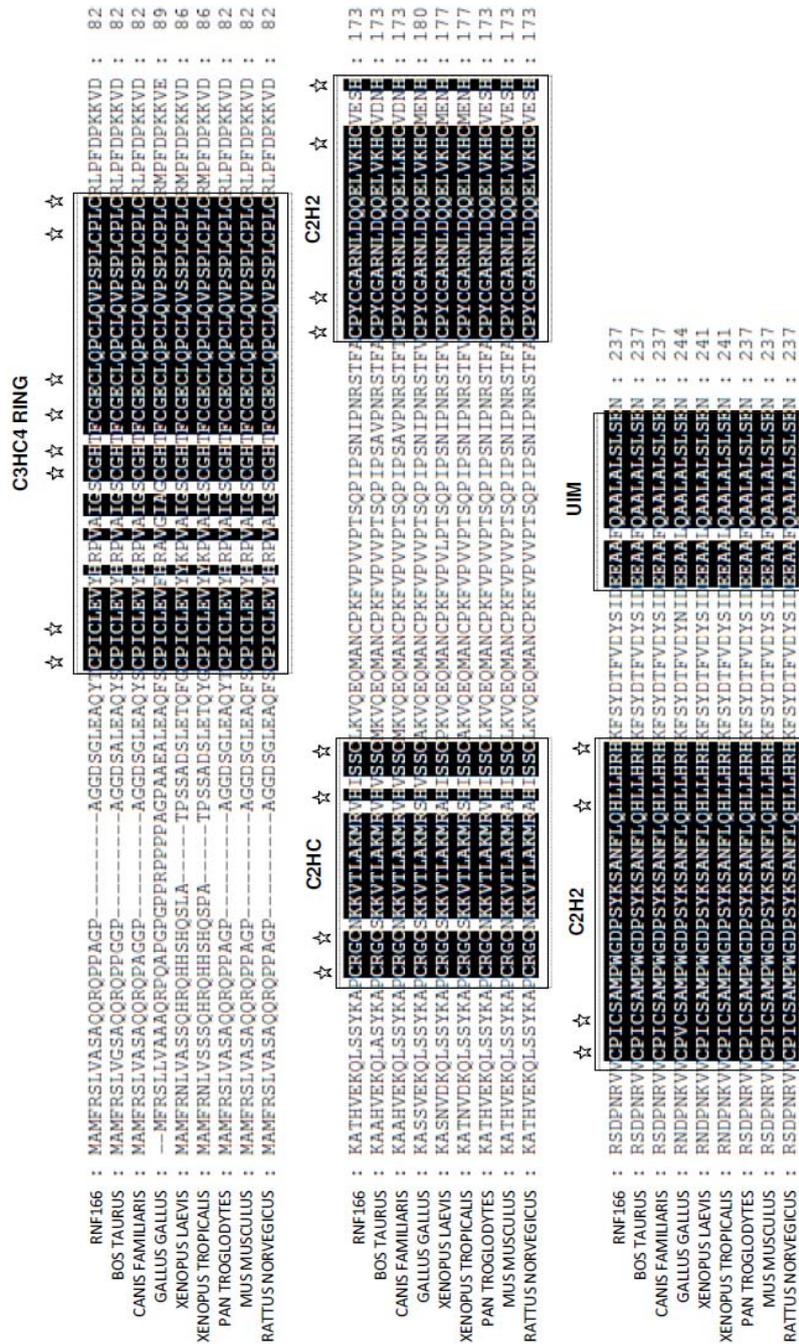


Figura 27: Alinhamento das proteínas RNF166 de diferentes espécies. Foram alinhadas as seqüências das proteína RNF166 *Homo sapiens sp.*; *Xenopus (Silurana) tropicalis sp.*; *Gallus gallus sp.*; *Canis lupus familiaris sp.*; *Pan troglodytes sp.*; *Mus musculus sp.*; *Bos taurus sp.*; *Xenopus laevis sp.* e *Rattus norvegicus sp.* Os domínios C3HC4-RING, C2HC, C2H2 e UIM da proteína RNF166 estão destacados dentro dos boxes. Em preto estão marcados os resíduos com 100% de identidade e as estrelas marcam os resíduos conservados de cisteínas e histidinas nos diferentes domínios. As seqüências foram alinhadas e formatadas pelos programas Vector NTI (Invitrogen) e Genedoc.

4.2.2- Alinhamento entre as Seqüências de Aminoácidos das Proteínas Humanas RNF114, RNF138, RNF166 e o Mutante A229P,S233Q-RNF166 .

As seqüências de aminoácidos das proteínas humanas RNF114, RNF138, RNF166 e do mutante A229P,S233Q-RNF166 também foram alinhadas para uma melhor visualização dos domínios ali presentes. Como já descrito anteriormente, os tamanhos das proteínas são bastante próximos. Diferentemente de TRAC-1/RNF125, essas ligases de ubiquitina não possuem a seqüência consenso N-terminal de miristoilação, sugerindo uma localização não associada à membranas. Os demais domínios C3HC4-RING, C2H2, C2HC e UIM estão presentes ao longo de todas as seqüências como em TRAC-1/RNF125. Neste trabalho foi utilizado somente o mutante A229P,S233Q-RNF166, o qual foi mutado em seu domínio UIM, na alanina 229 para o aminoácido prolina e na serina 233 para o aminoácido glutamina (Figura 28).

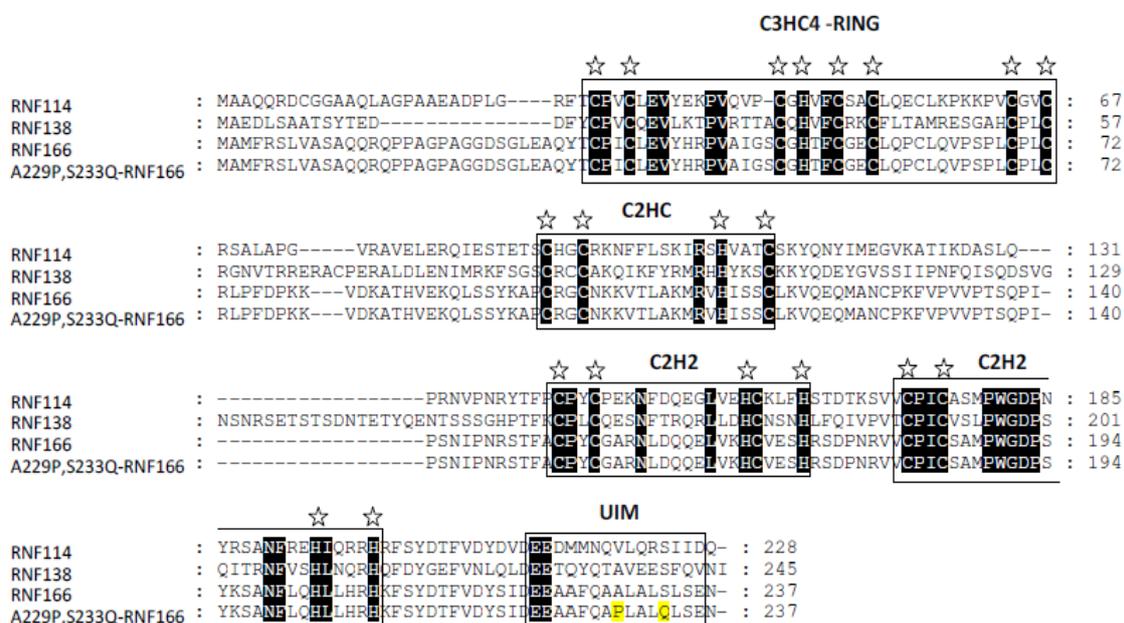


Figura 28: Alinhamento das proteínas humanas RNF125, RNF114, RNF138, RNF166 e do mutante A229P,S233Q-RNF166. Os domínios C3HC4-RING, C2HC, C2H2 e UIM estão destacados dentro dos boxes. A marcação em amarelo identifica os aminoácidos mutados, em preto os resíduos com 100% de identidade e as estrelas marcam os resíduos conservados de cisteínas e histidinas nos diferentes domínios. As seqüências foram alinhadas e formatadas pelos programas Vector NTI (Invitrogen) e Genedoc.

4.2.3- Análise da Estabilidade das Proteínas Humanas RNF114, RNF138 e RNF166

As proteínas humanas e relacionadas à RNF125/TRAC-1 (RNF114, RNF138 e RNF166) também foram submetidas ao tratamento com cicloheximida para a análise de estabilidade. Primeiramente, foram realizados ensaios nos tempos de 30, 60 e 120 minutos de tratamento, como havia sido realizado para TRAC-1/RNF125. De acordo com os resultados obtidos, os tempos de tratamento se estenderam por até 6 horas.

A proteína RNF114 mostrou-se bastante estável durante todo o tratamento com cicloheximida (Figura 29). Nos primeiros 30 minutos, observamos uma redução de somente 16% no nível de expressão e ao final do tratamento de 2 horas, a redução total foi de apenas 35%.

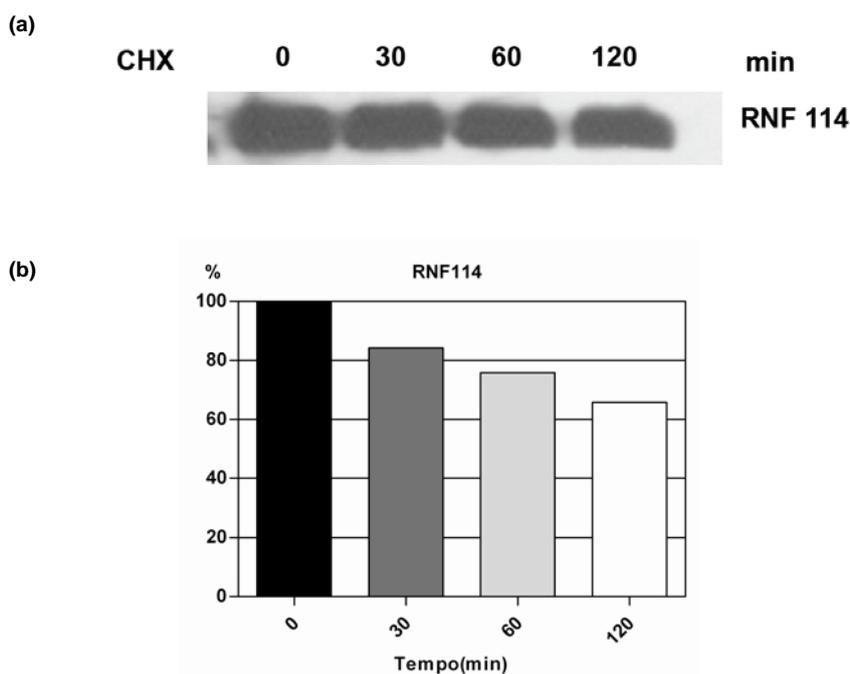


Figura 29: A proteína RNF114 continua estável após 2 horas de tratamento com cicloheximida. (a) A linhagem HEK-293T foi transfectada com RNF114-myc. As células foram incubadas com CHX (100µg/mL) por 0, 30, 60 e 120 min. Quantidades iguais dos extratos totais de células de cada ponto foram analisadas por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-myc. (b) Análise de Densitometria dos blots mostrados no item (a). A percentagem de cada ponto foi obtida em relação à condição controle (n=1).

Em razão do resultado anterior, a proteína RNF114 foi submetida a um tratamento mais longo por 2, 4 e 6 horas. As novas condições mostraram que a proteína RNF114 continuava bastante expressa em relação à condição não tratada, apresentando uma meia-vida superior a 6 horas (Figura 30A). De posse de um anticorpo anti-RNF114, foi realizada também uma marcação com o mesmo, para verificar o nível de expressão da proteína endógena na presença de cicloheximida. O resultado mostrou um nível de expressão de aproximadamente 70% ao final das 6 horas, confirmando a estabilidade da proteína endógena durante todo o tratamento (Figura 30B). A proteína HSP90 foi utilizada como controle endógeno, já que possui uma meia vida em torno de 15 horas.

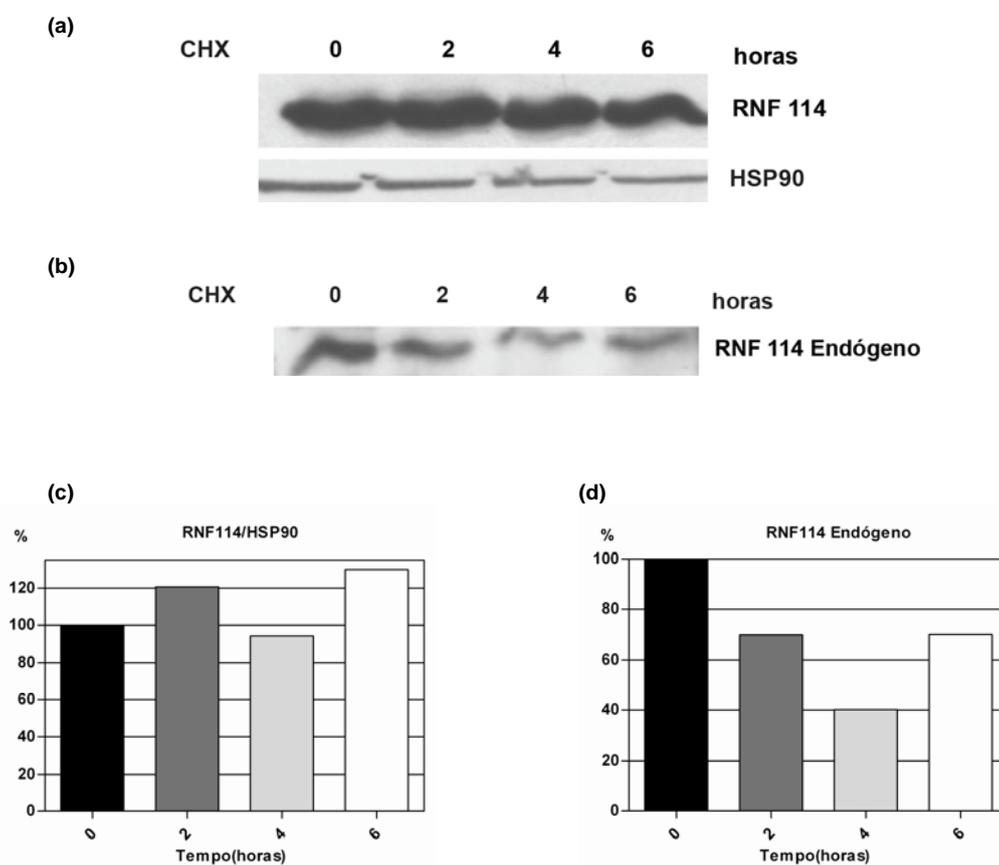
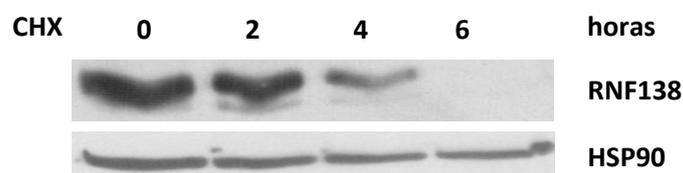


Figura 30: A proteína RNF114 endógena continua estável após 6 horas de tratamento com cicloheximida. (a) A linhagem HEK-293T foi transfectada com RNF114-myc. As células foram incubadas com CHX (100µg/mL) por 0, 2, 4 e 6 horas. Quantidades iguais dos extratos totais de células de cada ponto foram analisados por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-myc. Para controle de carregamento foi utilizada a marcação para a proteína HSP90. (b) A membrana foi marcada com o anticorpo anti-RNF114 para a visualização da expressão de proteína endógena. (c e d) Análise de Densitometria dos blots mostrados nos itens (a e b). A percentagem de cada ponto foi obtida em relação à condição controle (n=2, figuras representativas).

Em seguida, foi realizada a análise de estabilidade da ligase de ubiquitina RNF138. A proteína RNF138 foi submetida ao tratamento prolongado com cicloheximida por até 6 horas. Foi utilizado como controle endógeno a proteína HSP90. A figura 31 mostra que a proteína RNF138 manteve-se estável por até 2 horas de tratamento com cicloheximida. Nas primeiras 2 horas, o nível de expressão de RNF138 reduziu apenas 15% em relação à condição sem tratamento. A partir de 4 horas de incubação, a proteína apresentou uma queda de expressão bastante marcante de aproximadamente 63%. Ao final das 6 horas, podemos detectar apenas 2,71% de expressão da proteína RNF138, comparada à expressão na condição sem cicloheximida.

(a)



(b)

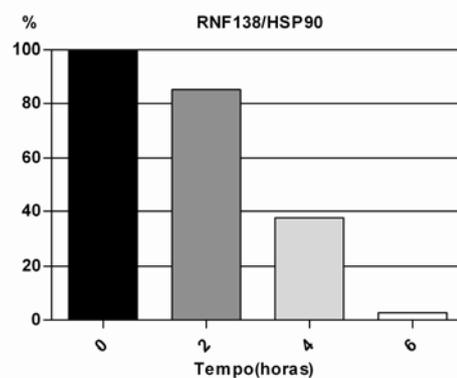


Figura 31: A proteína RNF138 é estável por até 120 minutos . (a) A linhagem HEK-293T foi transfectada com RNF138-myc. As células foram incubadas com CHX (100µg/mL) por 0, 2, 4 e 6 horas. Quantidades iguais dos extratos totais de células de cada ponto foram analisadas por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-myc. Para controle de carregamento foi utilizada a marcação para a proteína HSP90. (b) Análise de Densitometria do blot mostrado no item (a). A percentagem de cada ponto foi obtida pela razão RNF138/HSP90 em relação à condição controle (n=2, figura representativa).

Por fim, foram realizadas as análises de estabilidade da proteína RNF166, ainda sem qualquer descrição na literatura. Primeiramente, a proteína RNF166 foi submetida a um tratamento inicial com cicloheximida por até 120 minutos. O resultado da figura mostra que em 2 horas, o nível de expressão de RNF166 ficou reduzido em aproximadamente 40% em relação ao nível inicial; porém manteve-se assim até o final das 6 horas de tratamento (Figura 32).

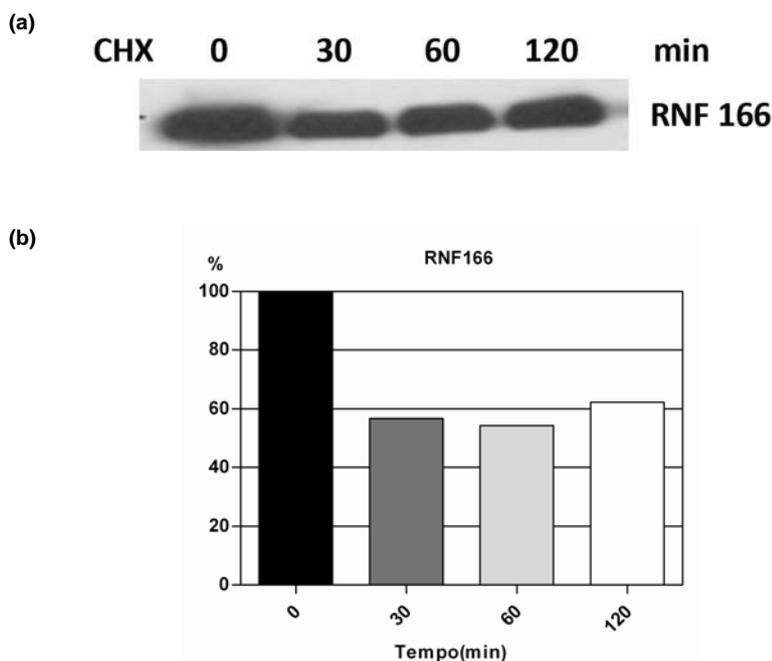


Figura 32: A proteína RNF166 continua estável após 2 horas de tratamento com cicloheximida. (a) A linhagem HEK-293T foi transfectada com RNF166-myc. As células foram incubadas com CHX (100µg/mL) por 0, 30, 60 e 120 min. Quantidades iguais dos extratos totais de células de cada ponto foram analisadas por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-myc. (b) Análise de Densitometria dos blots mostrados no item (a). A porcentagem de cada ponto foi obtida em relação à condição controle (n=1).

Dando continuidade ao ensaio de meia-vida da proteína RNF166, foram realizados novos experimentos onde o tempo de tratamento com cicloheximida foi estendido por até 6 horas. Os resultados mostraram que ao final das 6 horas de tratamento, detectamos uma redução de apenas 33% na expressão de RNF166. Foi utilizado como controle endógeno à proteína HPS90 (Figura 33).

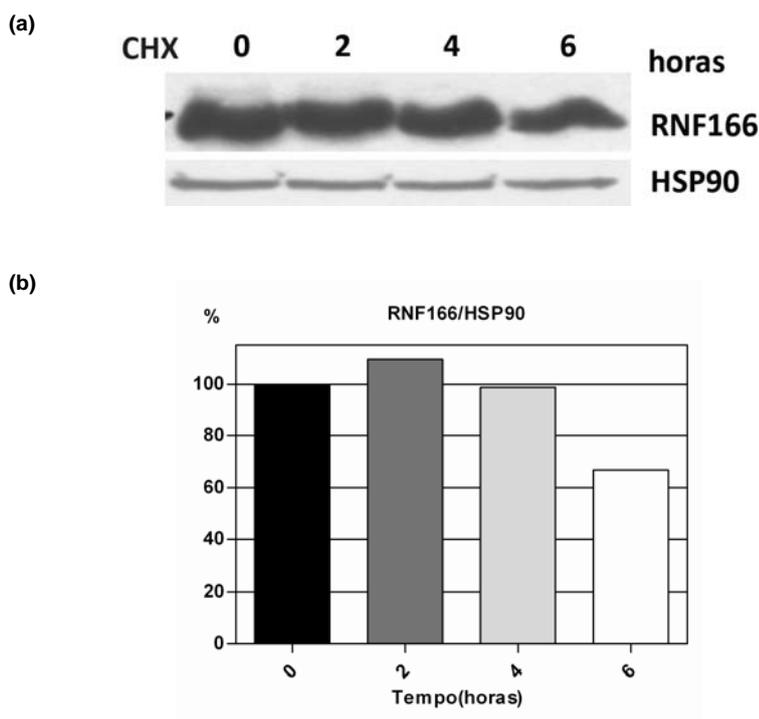


Figura 33: A proteína RNF166 continua estável após 6 horas de tratamento com cicloheximida. (a) A linhagem HEK-293T foi transfectada com RNF166-myc. As células foram incubadas com CHX (100µg/mL) por 0, 2, 4 e 6 horas. Quantidades iguais dos extratos totais de células de cada ponto foram analisadas por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-myc. Para controle de carregamento foi utilizada a marcação para a proteína HSP90. (b) Análise de Densitometria do blot mostrado no item (a). A porcentagem de cada ponto foi obtida pela razão RNF166/HSP90 em relação à condição controle (n=2, figura representativa).

Todos os tratamentos com cicloheximida foram realizados por no máximo 6 horas e a uma concentração final já estabelecida de 100 µg/mL.

4.2.4- Localização Intracelular das Proteínas RNF114, RNF138 e RNF166

As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 foram analisadas por microscopia de fluorescência e gradiente de sacarose, da mesma forma que a proteína selvagem e os mutantes de TRAC-1/RNF125 (GIANNINI *et al*, 2008). Como já descrito anteriormente, essas três ligases de ubiquitina não possuem o sítio de miristoilação, o qual confere a diversas proteínas uma localização associada à membranas. As imagens de microscopia de fluorescência mostram que RNF114 encontra-se na sua totalidade excluída do núcleo e distribuída por todo o citoplasma. Ao contrário de RNF114, a proteína RNF138 localiza-se predominantemente no núcleo. Já a distribuição da proteína RNF166 é bastante homogênea nas células, sendo encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo (Figura 34).

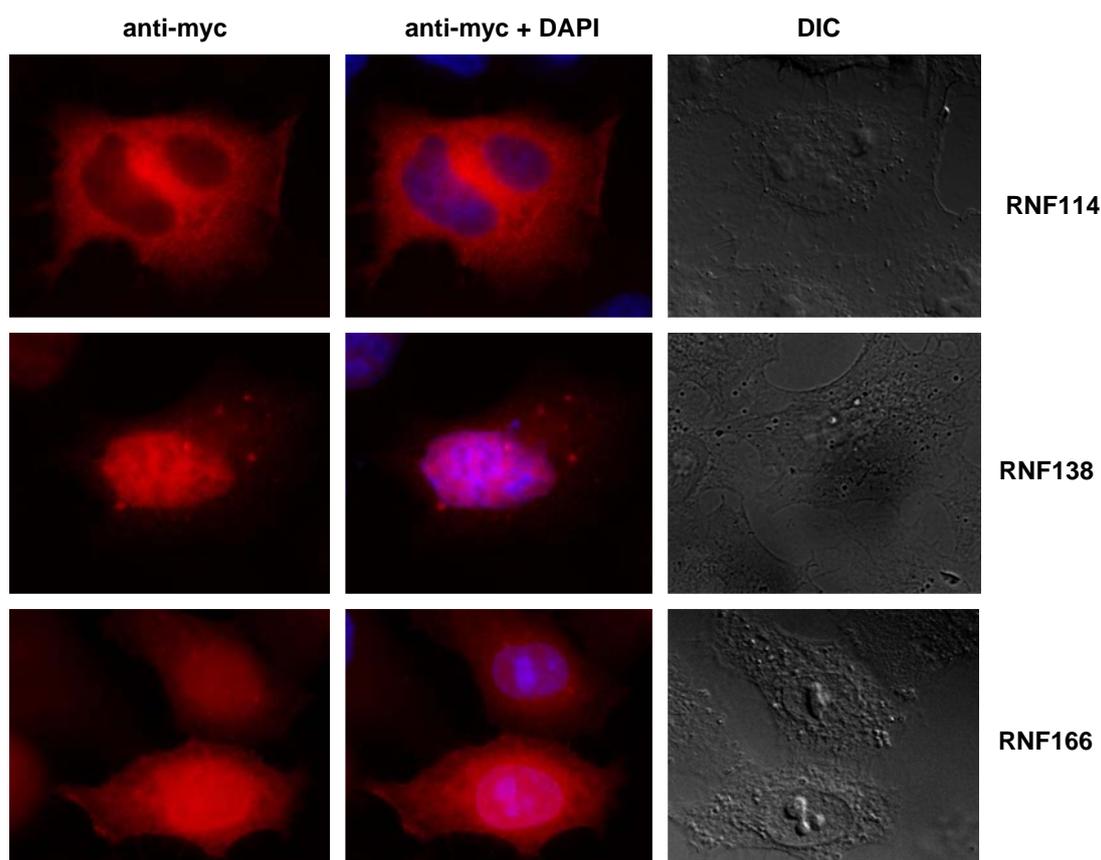


Figura 34: Localização celular das proteínas RNF114, RNF138 e RNF166. A linhagem HeLa foi transfectada com RNF114-myc, RNF138-myc ou RNF166-myc. Após a transfecção, as células foram marcadas com o anticorpo primário anti-myc (clone 9E10) e pelo anticorpo secundário anti-mouse conjugado a rodamina. As imagens foram capturadas em microscópio invertido de fluorescência sob um aumento de 100X e analisadas pelo programa ImageJ.

Simultaneamente a esses resultados, os ensaios de gradiente de sacarose das proteínas humanas RNF114, RNF138 e RNF166 sugerem que as três ligases de ubiquitina encontram-se exclusivamente nas frações 9, 10 e 11 correspondentes às proteínas solúveis e, portanto não associadas à membranas celulares (Figura 35). Durante um gradiente de sacarose, as proteínas associadas à membranas localizam-se na interface das concentrações 65% e 10% podendo ser visualizada uma espécie de banda difusa; ao contrário das proteínas solúveis/citosólicas que são visualizadas nas frações finais do gradiente. O controle do experimento representado pelo receptor de transferrina (TFR) indica as frações de proteínas associadas à membranas celulares (Figura 35).

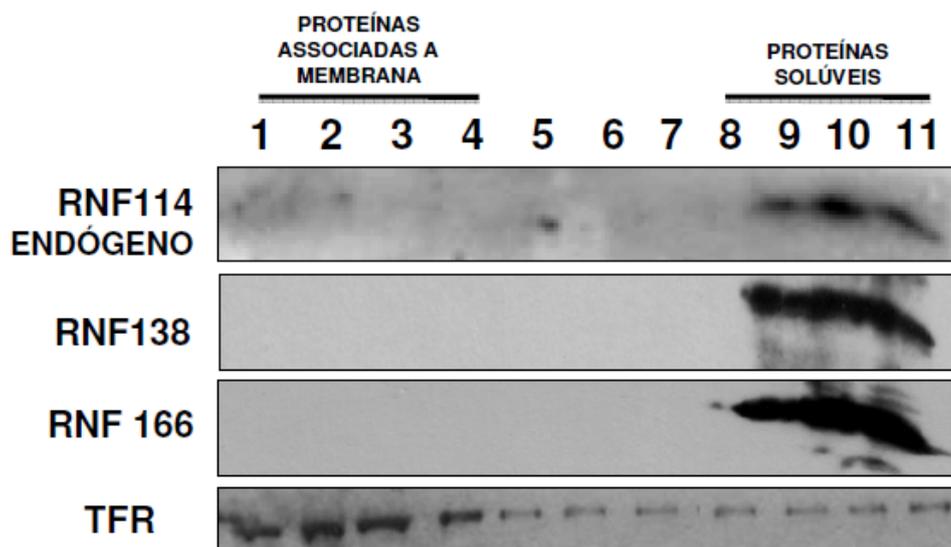


Figura 35: As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 não são associadas à membranas celulares. Os plasmídeos RNF114-myc, RNF138-myc, RNF166-myc foram transfectados em linhagem HEK-293T. As células foram lisadas em um tampão isotônico e o extrato total fracionado por um gradiente de sacarose 70%/65%/10%. Foram recolhidas 11 frações do sentido do topo para o fundo do tubo e alíquotas foram analisadas por SDS-PAGE e *Western blot*. As proteínas foram marcadas utilizando o anticorpo anti-myc. O receptor de transferrina foi utilizado como marcador de proteínas associadas à membranas celulares.

4.2.5- Ensaio de Interação das Proteínas RNF114, RNF138, RNF166 e do Mutante A229P,S233Q-RNF166 com Ubiquitinas

Após as análises de estabilidade e localização celular, foram realizados ensaios de interação entre a ubiquitina e as proteínas RNF114, RNF138, RNF166 e A229P,S233Q-RNF166. As proteínas de interesse foram co-transfectadas com a ubiquitina, imunoprecipitadas e as interações foram visualizadas pelo anticorpo contra ubiquitina.

De acordo com a figura 36A, o rastro identificado pelo anticorpo anti-ubiquitina (Ub) indica que a proteína RNF166 foi capaz de interagir com ubiquitinas, e que mutações em resíduos conservados no domínio UIM (A229P,S233Q-RNF166) acarretam a uma perda parcial dessas interações. Esse rastro (Ub) maior que 30 kDa pode corresponder à proteínas ubiquitinadas que estavam associadas por ligações não covalentes ao domínio UIM, e que foram rompidas após a fervura com o DTT do tampão de amostra. Além disso, as bandas inferiores a 30 kDa podem corresponder à cadeias de ubiquitinas livres. A marcação das proteínas imunoprecipitadas mostra que a mesma quantidade de proteína foi utilizada para cada condição, sendo possível a comparação dos resultados.

A proteína RNF114 também foi testada e mostrou ser capaz de interagir com ubiquitinas, assim como RNF166 (Figura 36C). Ensaios *in vitro* já mostraram que o domínio UIM desta proteína interage com cadeias de ubiquitinas via K63 e K48 (CAPON, 2008).

Por último, realizamos os mesmos ensaios *in vivo* com RNF138, e esta proteína também apresentou a capacidade de interagir com ubiquitinas. RNF138 já foi caracterizada em ensaios *in vitro* como uma ligase de ubiquitina capaz de ubiquitinar os fatores de transcrição TCF/LEF (YAMADA,M.; 2006 e Figura 36B).

Apesar dos resultados sugerirem que RNF114 e RNF166 são capazes de interagir com ubiquitinas via UIM, não é possível afirmar também se essas proteínas possuem atividade de ligase de ubiquitina ou se estão sendo ubiquitinadas, sendo necessária a realização de ensaios de ubiquitinação *in vitro*.

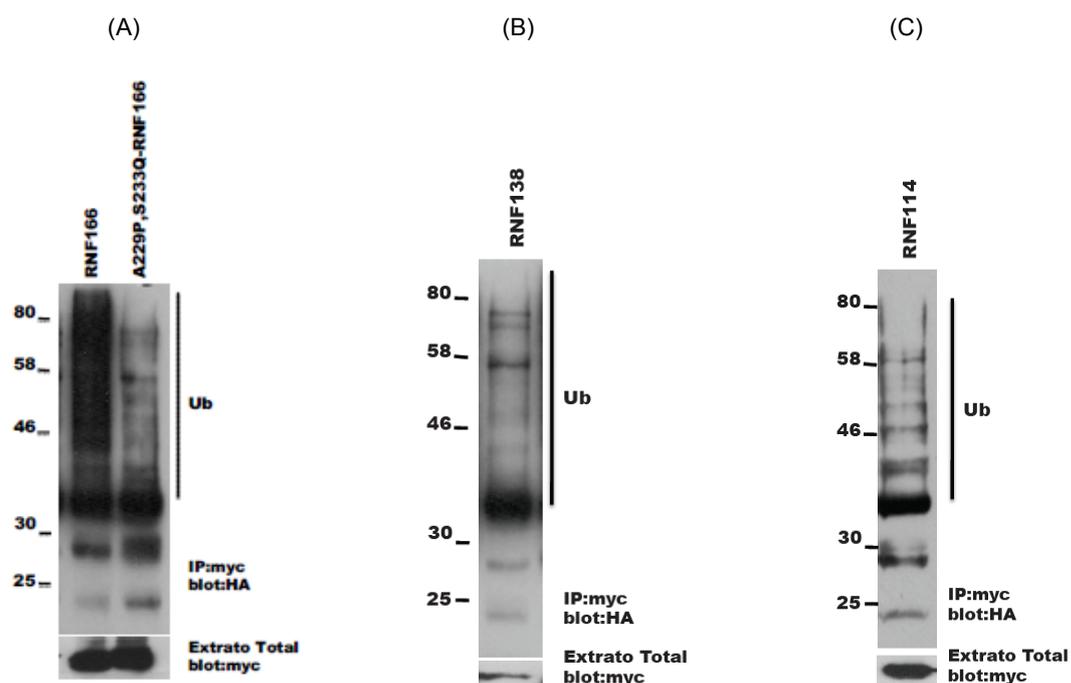


Figura 36: As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 são capazes de interagir com ubiquitinas. Os plasmídeos RNF114-myc, RNF138-myc, RNF166-myc e A229P,S233Q-RNF166-myc foram co-transfectados com Ub-HA em HEK-293T. As proteínas foram imunoprecipitadas em anti-myc e marcadas com o anticorpo anti-HA. O extrato total foi marcado com anticorpo anti-myc para detecção das proteínas imunoprecipitadas.

4.2.6- Avaliação Funcional da Expressão das Proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 em células Jurkat

Como as proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 apresentam domínios com bastante similaridade aos presentes em TRAC-1/RNF125 e também são em sua maior parte expressas em células do sistema imune, buscamos avaliar o papel destas ligases de ubiquitina durante o evento de ativação de células T.

Para o experimento foram utilizadas as proteínas RNF114-GFP, RNF138-GFP e RNF166-GFP; a proteína TRAC-1/RNF125-GFP como controle positivo de inibição de expressão de CD69 e a proteína GFP como controle de transfecção e de ativação. As células foram eletroporadas com os respectivos plasmídeos e ativadas com PMA e Ionomicina.

Como mostrado na figura 37, apenas a proteína RNF138 foi capaz de reduzir significativamente a ativação das células T Jurkat, indicado no gráfico pela menor expressão de CD69. Esta inibição foi de 56% quando comparado à ativação obtida em células expressando apenas o controle negativo GFP e é semelhante à observada nas células expressando TRAC-1/RNF125. Este resultado sugere que a proteína RNF138 possa ter uma função semelhante à de TRAC-1/RNF125 em eventos de ativação de linfócitos T. Já proteína RNF114 não provocou qualquer alteração na expressão de CD69 quando comparada aos controles; sugerindo que a mesma não participa de eventos mediados pela ativação de células T. Por fim, a proteína RNF166 apresentou uma pequena redução na expressão de CD69, porém esta diferença não foi significativa quando comparada à condição controle GFP.

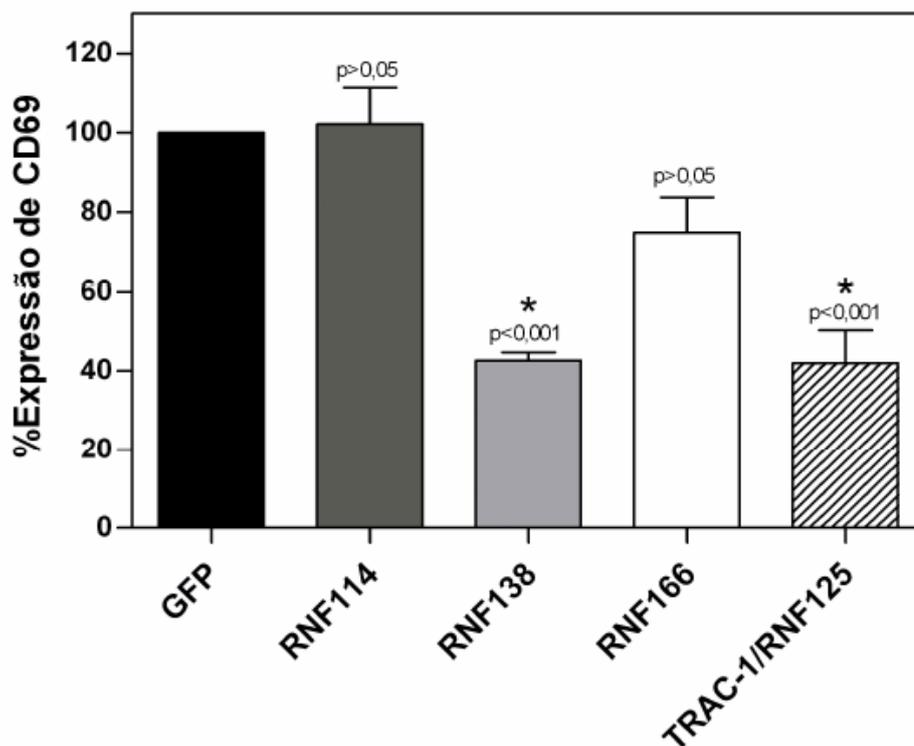


Figura 37: A proteína RNF138 é capaz de reduzir a ativação de células T. A linhagem Jurkat foi eletroporada com o plasmídeo pEGFP-N3 fusionado ou não aos DNAs TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166. Após a transfecção, as células foram estimuladas com 1 μ g/mL do éster de forbol PMA e 1 μ M de Ionomicina, por 24 horas. Para a marcação foi utilizado o anticorpo anti-CD69. Foram realizados 4 experimentos independentes e cada análise foi calculada através da razão das populações GFP(-)/GFP(+). O teste estatístico considerou significativo (*) p < 0,001 em relação a amostra controle GFP.

4.2.7- Ensaio de Fosforilação *in vitro* com as Proteínas RNF114 e RNF166

As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 também foram submetidas aos ensaios de fosforilação *in vitro*. As três proteínas foram subclonadas no vetor de expressão PGEX-5X-2 contendo uma cauda GST e a proteína HMGB1 foi utilizada como controle positivo. Devido às dificuldades na produção da proteína de fusão RNF138-GST, esta proteína não foi utilizada nos ensaios de fosforilação *in vitro*.

Primeiramente, a seqüência primária das proteínas RNF114 e RNF166 foi analisada pelo programa de predição de supostos sítios de fosforilação, NetPhosK 1.0. As duas proteínas apresentam sítios putativos de fosforilação para PKC, com índices superiores a 0,70. Além disso, o programa mostrou a existência de resíduos que poderiam ser fosforilados pela cinase CKII (Figura 38).

Method: NetPhosK without ESS filtering: Query: RNF 114			Method: NetPhosK without ESS filtering: Query: rnf-166		
Site	Kinase	Score	Site	Kinase	Score
-----			-----		
S-50	cdc2	0.51	S-6	PKA	0.52
S-86	CKII	0.51 ←	S-25	CKII	0.55 ←
S-90	CKI	0.59	S-66	p38MAPK	0.57
S-101	PKC	0.86 ←	S-66	cdk5	0.55
T-109	PKC	0.70 ←	S-66	cdc2	0.51
S-111	PKC	0.70 ←	T-85	PKC	0.66
T-124	PKC	0.79 ←	S-93	PKC	0.92 ←
S-129	DNAPK	0.53	T-106	PKC	0.57
S-129	PKA	0.50	S-116	PKC	0.62
S-164	cdc2	0.52	S-137	DNAPK	0.61
T-167	PKC	0.70 ←	S-137	ATM	0.61
S-177	cdc2	0.53	S-142	PKG	0.51
Y-185	EGFR	0.51	S-172	PKC	0.85 ←
S-201	PKA	0.57	S-186	PKG	0.53
-----			S-194	PKC	0.59
Highest Score:	0.86 PKC at position 101		Y-195	SRC	0.52
			S-211	PKA	0.60
			Y-212	INSR	0.52
			S-219	CKII	0.70 ←
			S-233	CKII	0.52 ←

			Highest Score:	0.92 PKC at position 93	

Figura 38: As proteínas RNF114 e RNF166 apresentam sítios putativos de fosforilação por PKC e CKII. A seqüência primária de aminoácidos de RNF114 e RNF166 foram analisadas pelo programa NetPhosK 1.0. Os resíduos para PKC estão indicados através das setas verdes e os resíduos para CKII pelas setas vermelhas.

Apesar da presença de possíveis de sítios de fosforilação por PKC e CKII (Figura 38), os ensaios de fosforilação *in vitro* sugerem que as proteínas RNF114 e RNF166 não são fosforiladas por PKC ou CKII (Figuras 39 e 40).

Como visualizado na figura 39, as proteínas RNF114 e RNF166 não foram capazes de incorporar o fosfato radioativo (γ 32P[ATP]) na presença da enzima PKC, demonstrando que tais proteínas não são fosforiladas por essa cinase. A banda radioativa que aparece no poço da proteína RNF166 não condiz com o tamanho real da proteína de fusão que teria aproximadamente 60 kDa. A proteína HMGB1 foi utilizada como controle positivo da reação.

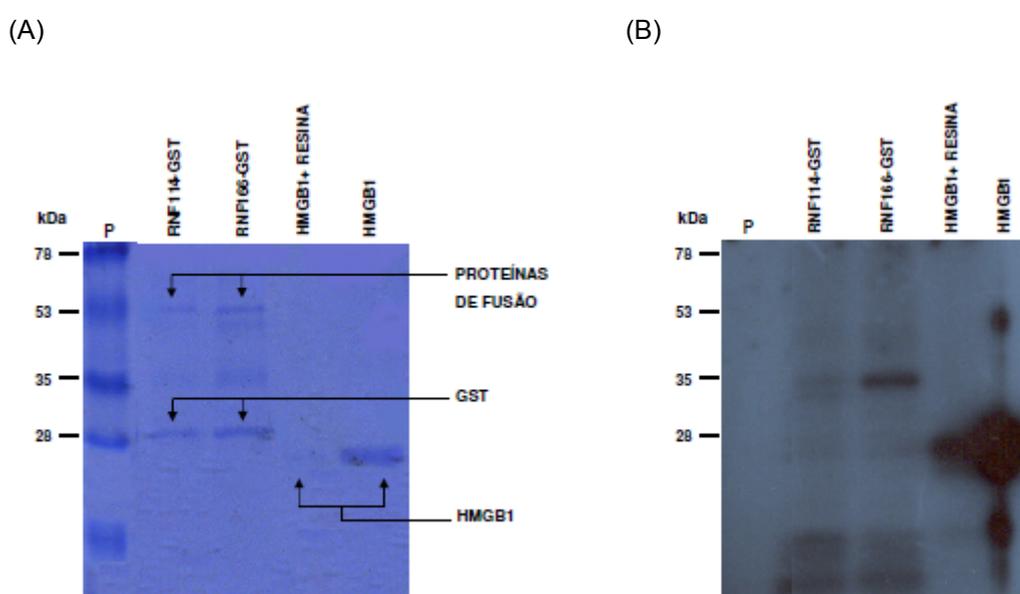


Figura 39: As proteínas RNF114 e RNF166 não são fosforiladas por PKC. (A) Visualização das proteínas de fusão RNF114, RNF166 e HMGB1 no gel de poliacrilamida 12% corado com coomassie blue. (B) Filme de raio X com a marcação das proteínas fosforiladas por PKC. Os filmes foram expostos por 1 semana. O controle negativo, sem a enzima PKC, não aparece na figura; visto que o forte sinal da HMGB1 ficou sobreposto a ele.

As proteínas RNF114 e RNF166 também foram avaliadas nos ensaios de fosforilação *in vitro* para a enzima CKII. Como mostrado na figura 40, RNF114 e RNF166 não são fosforiladas por CKII. O filme de raio X não apresenta bandas radioativas na altura de 60 kDa, que corresponderiam aos tamanhos esperados para as proteínas de fusão. A fosforilação da proteína HMGB1 pela CKII validou o experimento, mostrando uma banda radioativa de aproximadamente 26 kDa.

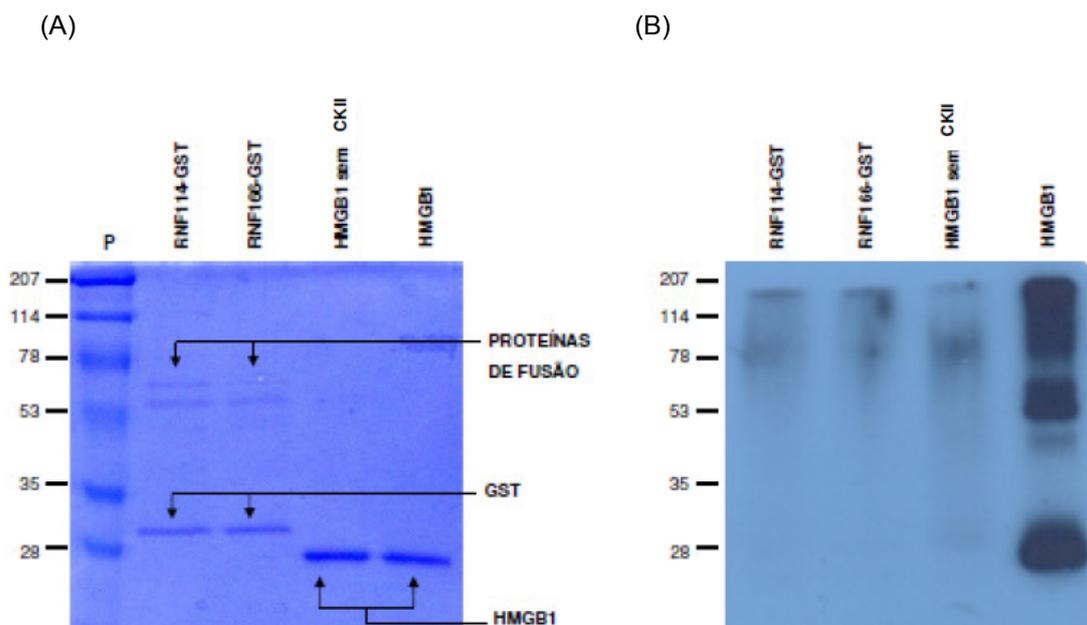


Figura 40: As proteínas RNF114 e RNF166 não são fosforiladas por CKII. (A) Visualização das proteínas de fusão RNF114, RNF166 e HMGB1 no gel de poliacrilamida 12% corado com coomassie blue. (B) Filme de rai X com a marcação das proteínas fosforiladas por CKII. Os filmes foram expostos por 1 semana.

5- DISCUSSÃO

Este trabalho buscou ampliar informações a respeito das proteínas humanas TRAC-1/RNF125, RNF114 e RNF138 e a caracterização parcial da proteína RNF166. Como mencionado anteriormente (item 1.4), as proteínas TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166 fazem parte de uma mesma subfamília de ligases de ubiquitina que apresenta não só o domínio RING, como compartilha os domínios atípicos do tipo “dedo de zinco” C2H2 e C2HC; e o domínio C-terminal UIM (Figura 11 – GIANNINI *et al*, 2008).

Além da espécie humana, seqüências de aminoácidos semelhantes à TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166 também são encontradas em outras espécies de mamíferos (Figura 15) e em algumas aves, répteis e peixes (Figuras 25, 26 e 27). Apesar disso, não é possível afirmar que as proteínas estariam desempenhando o mesmo papel de ligase de ubiquitina nas diferentes espécies, já que não existem ainda dados na literatura para confirmar esta possibilidade.

As ligases de ubiquitina desempenham um papel fundamental na célula, já que possuem a capacidade de reconhecer especificamente substratos-alvo que serão marcados pelo sistema ubiquitina para degradação ou para eventos de sinalização celular (DESHAIES *et al*, 2009).

A proteína TRAC-1/RNF125 é uma ligase de ubiquitina bastante instável, apresentando uma meia-vida inferior a 30 minutos (Figura 17). O domínio RING confere a TRAC-1/RNF125 sua atividade de ligase de ubiquitina; sendo capaz de formar cadeias de ubiquitinas via lisina 48 ou lisina 63 (ZHAO *et al*, 2005 e GIANNINI *et al*, 2008). No C-terminal, TRAC-1/RNF125 possui o domínio UIM que permite a interação desta proteína com cadeias de poliubiquitinas via lisina 48, e juntamente com o RING possibilita a sua rápida degradação (GIANNINI *et al*, 2008). Quando mutada no domínio UIM (V217P/S221Q-TRAC-1), TRAC-1/RNF125 torna-se estável (Figura 19) e sua capacidade de interação com ubiquitinas fica bastante comprometida (Figura 21). Ensaios de ubiquitinação *in vitro* realizados com esta proteína sugerem que TRAC-1/RNF125 seja substrato de auto-ubiquitinação, porém não sabemos se isso acontece em “*cis*” ou “*trans*” (GIANNINI *et al*, 2008).

Ao longo de sua estrutura, TRAC-1/RNF125 apresenta oito resíduos de lisina passíveis de receberem ubiquitinas (Figura 16). Com o objetivo de gerar uma proteína estável e funcional, foram realizadas mutações sítio dirigidas alterando todos os resíduos de lisina presentes na proteína selvagem. Por conta disso, a proteína mutante ALLK-TRAC-1 teve sua meia-vida aumentada para 60 minutos (Figura 18) e ainda mostrou ser capaz de interagir com ubiquitinas (Figura 21). Como não foram realizados ensaios de ubiquitinação *in vitro*, não podemos afirmar que esta proteína é capaz de formar cadeias de poliubiquitinas ou se a adição de ubiquitinas em ALLK-TRAC-1 acontece via algum outro aminoácido (CADWELL *et al*, 2005).

Além dos domínios RING e UIM, TRAC-1/RNF125 apresenta três domínios do tipo “dedo de zinco” C2H2 e C2HC, ainda sem caracterização (Figura 9). É possível que esses domínios sejam importantes para interações que ocorram além do domínio RING, como interações com outras proteínas, DNA ou RNA (BRAYER *et al*, 2008).

Devido à presença de um sítio de miristoilação, a proteína TRAC-1/RNF125 é encontrada parcialmente associada à membranas celulares. Além disso, sua localização é predominantemente perinuclear (Figura 20). Uma mutação neste sítio (G2A-TRAC-1) impede a adição de ácido mirístico a esta proteína, comprometendo sua associação à membranas; resultando numa proteína difusa por toda a célula, inclusive permitindo a sua entrada no núcleo (GIANNINI *et al*, 2008 – Figura 20). Como esta proteína tem peso inferior a 50 kDa é possível que sua entrada no núcleo ocorra devido ao seu tamanho e não à interação com DNA, porém a possibilidade destes domínios dedo de zinco serem capazes de se ligar à ácidos nucléicos ainda não foi avaliada e não pode ser descartada. As mutações no domínio UIM não interferem na localização celular desta proteína, sugerindo que este domínio não parece ser importante para a distribuição da proteína na célula (Figura 20). Já mutações no domínio RING parecem contribuir para uma maior associação de TRAC-1/RNF125 à membranas celulares, representada na microscopia de fluorescência pelo aspecto pontilhado, característico em proteínas de membrana (Figura 20). Esse resultado confirma os ensaios de gradiente de sacarose, onde o mutante C37,40A-TRAC-1 se mostra predominantemente associado à membranas em relação a proteína selvagem; sugerindo a importância do domínio RING na

localização da proteína (GIANNINI *et al*, 2008). Por fim, as mutações nos oito resíduos de lisina da proteína TRAC-1/RNF125 conferiram a esta proteína uma marcação bem delimitada na região perinuclear, além de uma maior distribuição pelo citoplasma (Figura 20). Buscando uma melhor análise de localização celular desta proteína e de seus mutantes, realizaremos novos experimentos utilizando a microscopia confocal e também testaremos diferentes marcadores de membranas, como retículo e mitocôndrias; visto que TRAC-1/RNF125 já foi co-localizada em membranas do complexo de golgi. Além disso, realizaremos ensaios de gradiente de sacarose com o mutante ALLK-TRAC-1.

Funcionalmente, TRAC-1/RNF125 é uma proteína com alta expressão em tecidos linfóides e já foi descrita como um possível regulador negativo da ativação de células T, inibindo a secreção de IL-2 (ZHAO *et al*, 2005 e GIANNINI *et al*, 2008). Células da linhagem Jurkat quando ativadas com PMA (via ativação de PKC) e ionomicina na presença de TRAC-1/RNF125 também apresentam uma redução significativa da expressão do marcador de ativação CD69 (Figura 22). Apesar do mutante ALLK-TRAC-1 ser mais estável, sua expressão não resultou em uma maior inibição da ativação das células T em comparação com a proteína selvagem. É possível que apesar da sua estabilidade, esta proteína não consiga interagir perfeitamente com seus substratos por causa de suas mutações. A alteração de localização celular do mutante G2A-TRAC-1 também não influenciou na sua função em relação à ativação de células T (Figura 22). Em contrapartida, mutações nos resíduos de cisteínas 37 e 40 do domínio RING de TRAC-1/RNF125 acarretam a uma perda total de função desta proteína, demonstrando mais uma vez a importância deste domínio para as ligases de ubiquitina (Figura 22).

A participação de TRAC-1/RNF125 nesta via ainda é desconhecida, porém em experimentos não mostrados aqui, observamos o aumento da expressão de proteína após o tratamento com PMA e ionomicina, o que nos levou a avaliar a possibilidade de TRAC-1/RNF125 ser estabilizada por eventos de fosforilação mediados por PKCs. Assim buscamos avaliar a presença de supostos sítios de fosforilação que poderiam indicar que a função de TRAC-1/RNF125 na inibição da ativação de linfócitos T seria regulada via fosforilação

por PKC (Figura 23). Apesar dessa hipótese, os ensaios de fosforilação *in vitro* sugerem que TRAC-1/RNF125 não é fosforilada por PKC (Figura 24).

As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 não apresentaram a mesma instabilidade que TRAC-1/RNF125 no interior da célula. As estabilidades das proteínas RNF114 e RNF166 foram superiores a 6 horas após o tratamento com cicloheximida (Figuras 30A e 33), enquanto que a proteína RNF138 permaneceu estável por até 120 minutos (Figura 31). A visualização da proteína endógena RNF114 confirmou a estabilidade desta proteína no interior das células (Figura 30B). Somando-se a isso, os ensaios de imunoprecipitação mostram a capacidade dessas proteínas de interagir com ubiquitinas (Figura 36). Acreditamos que essa interação seja conferida pelo domínio UIM dessas proteínas, visto que há uma grande perda de interação com ubiquitinas quando comparamos a proteína selvagem RNF166 ao mutante A229P,S233Q-RNF166 (Figura 36A). A proteína RNF138 já foi descrita na literatura como uma ligase de ubiquitina capaz de ubiquitinar *in vitro* os fatores de transcrição TCF/LEF (YAMADA *et al*, 2006) e também foi capaz de interagir com ubiquitinas (Figura 36B). As proteínas, RNF114 e RNF166, ainda não foram caracterizadas como ligases de ubiquitina, sendo necessária esta confirmação por ensaios de ubiquitinação *in vitro*.

RNF114, RNF138 e RNF166 apesar de apresentarem tamanhos similares e os mesmos domínios da proteína TRAC-1/RNF125, suas localizações celulares são bastante distintas. A proteína RNF114 encontra-se bastante distribuída pelo citoplasma e completamente excluída do núcleo, já proteína RNF166 se localiza tanto no citoplasma como no núcleo das células. A ligase de ubiquitina RNF138 é inteiramente nuclear, corroborando ao fato de que seus substratos são fatores de transcrição (Figura 34 – YAMADA *et al*, 2006). Além disso, essas proteínas não se encontram associadas à membranas, devido à ausência do sítio de miristoilação (Figura 35). Essa ausência de associação com membranas diminui a possibilidade de interação destas proteínas com outras proteínas membranares, sugerindo que os substratos-alvo de RNF114, RNF138 e RNF166 são possivelmente proteínas citosólicas ou nucleares.

As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 também foram submetidas a ensaios funcionais de ativação de células T, já que estas também são

encontradas em células do sistema imune. Os resultados mostram que somente a proteína RNF138 foi capaz de regular negativamente a ativação de linfócitos T, mensurada pela expressão do marcador CD69 (Figura 37). Como RNF138 é encontrada no núcleo e também foi capaz de inibir a ativação de células T, é possível que esta proteína atue a jusante aos eventos iniciais de ativação mediados pelo TCR, e no nosso caso mimetizado por PMA e ionomicina. Esta proteína já foi descrita como um regulador negativo da via canônica de Wnt/ β -catenina, ubiquitinando os fatores de transcrição TCF/LEF (YAMADA *et al*, 2006). Diversos trabalhos já mostraram que a ausência dos fatores de transcrição TCF e LEF compromete a proliferação, sobrevivência e diferenciação dos timócitos (HOSSAIN *et al*, 2008). Porém, existem poucos trabalhos relacionando a via de sinalização Wnt com ativação de linfócitos T. Em 1998, Staal e colaboradores mostraram que a expressão de um gene repórter regulado por promotor responsivo a TCF não era detectada em células Jurkat ativadas com PMA/ionomicina, sugerindo uma ausência de atividade transcricional de TCF (STAAL *et al*, 1998). Recentemente, análises de *microarray* mostraram que TCF e LEF são expressos em células T CD8⁺ naive, porém essa expressão é regulada negativamente após o engajamento do TCR (WILLINGER *et al*, 2010). Portanto, é possível que a sinalização Wnt não esteja relacionada somente ao desenvolvimento dos linfócitos T; mas também à diferenciação das células T periféricas, podendo RNF138 participar desta regulação (STAAL *et al*, 2008).

Outra hipótese para essa redundância de função poderia ser explicada pelo fato dos genes de TRAC-1/RNF125 e RNF138 estarem localizados em um mesmo cromossomo (18q12.1) e dispostos em *tandem*, sinalizando para uma possível duplicação gênica. Nos casos de duplicação, os genes parólogos quase sempre mantêm a mesma função, porém é possível que ao longo da evolução esses genes assumam novas funções biológicas (ZHANG, 2003; ZHANG *et al*, 1998).

Apesar de já ter sido implicada no desenvolvimento de uma doença de caráter imunológico (Psoríase), a expressão de RNF114 não foi capaz de interferir na ativação das células T Jurkat (Figura 37). Ainda não são conhecidos os alvos para esta possível ligase de ubiquitina, mas visto que a ativação de linfócitos não foi diretamente afetada na presença de RNF114;

acreditamos que as proteínas envolvidas na cascata de sinalização que culmina na ativação de linfócitos T não sejam ubiquitinadas por esta proteína.

Com relação aos efeitos da expressão de RNF166 na ativação das células Jurkat, apesar de haver uma inibição na expressão de CD69, comparada ao controle expressando somente GFP, esta diferença não foi significativa, sugerindo então que RNF166 não participa de eventos relacionados à ativação de linfócitos T (Figura 37).

Os ensaios de fosforilação *in vitro* também foram realizados com RNF114 e RNF166 e mostraram que, assim como TRAC-1/RNF125, essas proteínas não são fosforiladas por PKC e CKII (Figuras 39 e 40).

Devido ao conjunto de resultados apresentados neste trabalho, continuaremos a caracterização das proteínas TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166 buscando identificar novas proteínas parceiras e substratos para estas ligases de ubiquitina, que sejam importantes para o correto funcionamento do sistema imune.

6- CONCLUSÕES

- As proteínas TRAC-1/RNF125, RNF114, RNF138 e RNF166 não são restritas a espécie humana. TRAC-1/RNF125 também é encontrada em outras espécies de mamíferos, enquanto que RNF114, RNF138 e RNF166 também são encontradas em outros vertebrados além de mamíferos; como aves, répteis e peixes.
- A proteína mutante ALLK-TRAC-1 (mutada nas 8 lisinas) apresenta uma meia-vida de 60 minutos, que é superior a da proteína TRAC-1/RNF125 selvagem (~30 minutos).
- Apesar das mutações em resíduos de lisinas, a proteína mutante ALLK-TRAC-1 ainda é capaz de interagir com ubiquitinas.
- A localização celular do mutante ALLK-TRAC-1 é bem delimitada na região perinuclear, mas também se estende pelo citoplasma até a periferia da célula. Igualmente à proteína selvagem, ALLK-TRAC-1 se apresenta excluída do núcleo.
- A proteína RNF138 é estável por até 120 minutos, enquanto que RNF114 e RNF166 possuem uma estabilidade superior a 6 horas após o tratamento com cicloheximida.
- As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 também possuem a capacidade de interagir com ubiquitinas. O domínio UIM intacto é importante para a interação da proteína RNF166 com ubiquitinas.
- A localização celular das proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 é bastante distinta. RNF114 encontra-se distribuída por todo o citoplasma da célula e excluída do núcleo, RNF138 é inteiramente nuclear e a proteína RNF166 encontra-se difusa por toda a célula (núcleo e citoplasma).

- As proteínas RNF114, RNF138 e RNF166 não se encontram associadas à membranas celulares, provavelmente devido à ausência de um sítio de miristoilação.
- Os ensaios funcionais em células T Jurkat mostram que os mutantes ALLK-TRAC-1 e G2A-TRAC-1 também são capazes de reduzir a expressão de CD69 nessas células, assim como a proteína selvagem TRAC-1/RNF125, inibindo a indução da ativação das células T.
- A proteína nuclear RNF138 também foi capaz de inibir a ativação das células Jurkat, ao contrário das proteínas RNF114 e RNF166 que não mostraram participação significativa em tal evento.
- As proteínas TRAC-1/RNF125, RNF114 e RNF166 não são fosforiladas *in vitro* por PKCs e nem por CKII.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. AND LITCHMAN, A. H. Vírus da Imunodeficiência Humana e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, IN:Imunologia Celular e Molecular. 6°ed. Elsevier, 2008; p.478-489.

AMERICAN TYPE CULTURE COLECTION (ATCC) - <http://www.atcc.org/>

ANANDASABAPATHY N. *et al.* GRAIL: an E3 ubiquitin ligase that inhibits cytokine gene transcription is expressed in anergic CD4+ T cells. *Immunity*, 2003; (18): 535–547.

ARIMOTO, K.-I.; KONISHI, H. AND SHIMOTOHNO, K. UbcH8 regulates ubiquitin and ISG15 conjugation to RIG-I. *Molecular Immunology*, 2008; (45): 1078-1084.

ARIMOTO, K.-I.; TAKAHASHI, H.; HISHIKI, T.; KONISHI, H.; FUJITA, T. AND SHIMOTOHNO, K. Negative regulation of the RIG-I signaling by ubiquitin ligase RNF125. *PNAS*, 2007; (104): 7500-7505.

ASAHINA, Y.; IZUMI, N.; HIRAYAMA, I. *et al.* Potencial Relevance of Cytoplasmatic Viral Sensors and Related Regulators Involving Innate Immunity in Antiviral Response. *Gastroenterology*, 2008; (134): 1396-1405.

ATHANASOPOULOS, V.; BARKER, A.; YU, D.; TAN, A.H.M.; SRIVASTAVA, M.; CONTRERAS, N.; WANG, J.; KAM, K.-P.; BROWN, S.H.J.; GOODNOW, C.C.; DIXON, N.E.; LEEDMAN, P.J.; SAINT, R. AND VINUESA, C.G. The ROQUIN family of proteins localizes to stress granules via the ROQ domain and binds target mRNAs. *FEBS Journal*, 2010; (277): 2109–2127.

BACHMAIER, K.; KRAWCZYK, C.; KOZIERADZKI, I.; KONG, Y.Y.; SASAKI, T.; OLIVEIRA DOS SANTOS, A.; MARIATHASAN, S.; BOUCHARD, D.; WAKEHAM, A. AND ITIE, A. Negative Regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature*, 2000; (403): 211-216.

BHOJ, V.G. AND CHEN, Z.J. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, 2009; (458): 430-437.

BIJLMAKERS, M.J. Protein acylation and localization in T cell signaling (Review). *Mol. Membr. Biol.*, 2009; (1): 93-103.

BIJLMAKERS, M.J.; ISOBE-NAKAMURA, M.; RUDDOCK, L.J. AND MARSH, M. Intrinsic signals in the unique domain target p56^{lck} to the plasma membrane independently of CD4. *J. Cell Biol.*, 1997; (137): 1029-1040.

BORDEN, K.L. RING domains: master builders of molecular scaffolds. *J. Mol. Biol.*, 2000; (295): 1103-1112.

BRAYER, K.J. AND SEGAL, D.J. Keep Your Finger Off My DNA: Protein-Protein Interactions Mediated by C2H2 Zinc Finger Domains. *Cell Biochem Biophys*, 2008; (50): 111-131.

BREITSCHOPF, K; BENGAL, E.; ZIV, T.; ADMON, A. AND CIECHANOVER, A. A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *The EMBO Journal*, 1998; (17): 5964–5973.

CADWELL, K. AND COSCOY, L. Ubiquitination on Nonlysine Residues by a Viral E3 Ubiquitin Ligase. *Science*, 2005; (309): 127-130.

CAPON, F.; BIJLMAKERS, M.J., TREMBATH, R.C. *et al.* Identification of ZNF313/RNF138 as a novel psoriasis susceptibility gene. *Human Molecular Genetics*, 2008; (17): 1938-1945.

CHIANG, Y.J. *et al.* Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature*, 2000; (6766):216-220.

CHU, P.; PARDO, J.; ZHAO, H. *et al.* Systematic identification of regulatory proteins critical for T-cell activation. *Journal of Biology*, 2003; (2): 21.1-21.6.

CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome pathways: on protein death and cell life. *The EMBO Journal*, 1998; (17): 7151-7160.

CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; ELIAS, S.; HAAS, A.L. AND HERSHKO, A. 6.ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *PNAS*, 1980; (77): 1365-1368.

CIECHANOVER, A.; ORIAN, A.; SCHWARTZ, A.L. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioAssays*, 2000; (22): 442-451.

DIKIC, I.; WAKATSUKI, S. AND WALTERS, K.J. Ubiquitin-binding domains – from structures to functions. *Molecular Cell Biology*, 2009; (10): 659-671.

DESHAIES, R.J. AND JOAZEIRO, C.A.P. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annu. Rev. Biochem*, 2009; (78): 399-434.

DE ABREU DA SILVA ISABEL CAETANO, 2008. Estudos da fosforilação por CK2 da proteína HMGB1 de *Schistosoma mansoni* (SmHMGB1). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

EDDINS, M.J. AND PICKART, C.M. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004; (21): 55-72.

FINLEY, D.; CIECHANOVER, A. AND VARSHAVSKY, A. Ubiquitin As a Central Cellular regulator. *Cell*, 2004; (S116): S29-S32.

FREEMONT, P.S. RING for destruction? *Curr. Biol*, 2000; (2): 84-87.

GACK, M.U.; SHIN, Y.C.; JOO, C.-H.; URANO, T.; LIANG, C.; SUN, L.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; CHEN, Z.; INOUE, S. AND JUNG, J.U. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*, 2007; (446): 916-920.

GIANNINI, A.L.M. AND BIJLMAKERS, M.J. Regulation of the Src family kinase Lck by Hsp90 and ubiquitination. *Molecular Cell Biology*, 2004; (13): 5667-5676.

GIANNINI, A.L.M.; GAO, Y. AND BIJLMAKERS, M.J. T cell regulator RNF125/TRAC-1 belongs to a novel family of ubiquitin ligases with zinc fingers and a ubiquitin-binding domain. *Biochem. Journal*, 2008; (410): 101-111.

HUNTER, T. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Molecular Cell*, 2007; (28): 730-738.

HATAKEYAMA, S.; YADA, M.; MASUSMOTO, M., ISHIDA, N. AND NAKAYAMA, K.I. U-box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.*, 2001; (276): 33111-33120.

HERRMANN, J.; LERMAN, L.O. AND LERMAN, A. Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in Protein Regulation. *Circ. Res.*, 2007; (100): 1276-1291.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; HAAS, A.L. AND ROSE, I.A. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *PNAS*, 1980; (77): 1783-1786.

HICKE L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2001; (3): 195-201.

HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, 1996; (30):405-439.

HOCHSTRASSER, M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 2009; (458): 422-429.

HOSSAIN, M.Z.; YU, Q.; XU, M. AND SEN, J.M. ICAT expression disrupts β -catenin-TCF interaction and impairs survival of thymocytes and activated mature cells. *International Immunology*, 2008; (20): 925-935.

HUELSKEN, J. AND BEHRENS, J. The Wnt signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 2002; (113): 3977-3978.

HURLEY, J.H.; LEE, S. AND PRAG, G. Ubiquitin-binding domains. *Biochem. Journal*, 2006; (399): 361-372.

JACKSON, P.K.; ELDRIDGE, A.G.; FREED, E.; FURSTENTHAL, L.; HSU, J.Y.; KAISER, B.K. AND REIMANN, J.D.R. The lore of the RINGS: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Cell Biology*, 2000; (10): 429-439.

JEON, M.S. *et al.* Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction. *Immunity*, 2004; (2):167-177.

JOAZEIRO, C.A.P. AND WEISSMAN, A.M. RING Finger Proteins: Mediators of Ubiquitin Ligase Activity. *Cell*, 2000; (102): 549-552.

JOAZEIRO, C.A.; WING, S.S.; HUANG, H.; LEVERSON, J.D.; HUNTER, T. AND LIU, Y.C. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science*, 1999; (286): 309-312.

KANE, L.P.; LIN, J. AND WEISS, A. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol*, 2000; (12): 242-249.

KAWATA, S.S.; ZHONG, Q.; KAMEOKA, M.; IWABU, Y.; SAPSUTTHIPAS, S.; LUFTING, R.B. AND IKUTA, K. The RING finger ubiquitin ligase RNF125/TRAC-1 down-modulates HIV-1 replication in primary human peripheral blood mononuclear cells. *Virology*, 2007; (368): 191–204.

KIM, M.J.; HWANG, S.Y.; IMAYZUMI, T. AND YOO, J.Y. Negative feedback regulation of RIG-I- mediated antiviral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation. *J. Virol*, 2008; (102): 10200-10205.

KOEGL, M.; HOPPE, T.; SCHLENKER, S.; ULRICH, H.D.; MAYER, T.U. AND JENTSCH, S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 1999; (5): 635-644.

LEHNINGER AND LESTER, A. Principles of Biochemistry, 2006 ; 4th Ed.: 1075.

LOHR, N.J.; MOLLESTON, J.P.; STRAUSS, K.A.; TORRES-MARTINEZ, W.; SHERMAN, E.A.; SQUIRES, R.H.; RIDER, N.L.; CHIKWAVA, K.R.; CUMMINGS, O.W.; MORTON, D.H. AND PUFFENBERGER, E.G. Human ITCH E3 ubiquitin ligase deficiency causes syndromic multisystem autoimmune disease. *Am J Hum Genet.*, 2010; (3):447- 453.

MARTÍN, D.G.; ZAMUDIO, M.D. AND VARELA, J.A. Ubiquitination system and autoimmunity: The bridge towards the modulation of the immune response. *Autoimmunity Reviews*, 2008; (7): 284-290.

MASUMI, A.; ITO, M.; MOCHIDA, K; HAMAGUCHI, I. *et al.* Enhanced RIG-I expression is mediated by interferon regulatory factor-2 in peripheral blood B cells from hepatitis C virus-infected patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010; (391): 1623–1628.

MUELLER, D.L. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nature Review Immunology*, 2004; (5): 883-890.

NAKHAEI, P.; GENIN, P.; CIVAS, A. AND HISCOTT, J. RIG-I-like receptors: Sensing and responding to RNA virus infection. *Seminars in Immunology*, 2009; (21): 215-222.

NARAMURA, M.; JANG, I.K.; KOLE, H.; HUANG, F.; HAINES, D. AND GU, H. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nature Immunology*, 2002; (3): 1192-1199.

NERIAH, Y.B. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nature Immunology*, 2002; (3): 20-26.

NIELSEN, O.H.; BJERRUM, J.T.; CSILLAG, C.; NIELSEN, F.C. AND OLSEN, J. Influence of Smoking on Colonic Gene Expression Profile in Crohn's Disease. *PLoS ONE*, 2009; (4): 1-7.

NURIEVA, R.I.; ZHENG, S.; JIN, W.; CHUNG, Y.; ZHANG, Y.; MARTINEZ, G.J.; REYNOLDS, J.M.; WANG, S.-L.; LIN, X.; SUN, S.-C.; LOZANO, G. AND DONG, C. The E3 Ubiquitin Ligase GRAIL Regulates T Cell Tolerance and Regulatory T Cell Function by Mediating T Cell Receptor-CD3 Degradation. *Immunity*, 2010; (32): 670-680.

PEARCE, M.J.; MINTSERIS, J.; FERREYRA, J.; GYGI, S.P. AND DARWIN, K.H. Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of Mycobacterium tuberculosis. *Science*, 2008; (5904):1104-1107.

PERRY, W.L.; HUSTAD, C.M.; SWING, D.A.; O'SULLIVAN, T.N.; JENKINS, N.A. AND COPELAND, N.G. The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nature Genetics*, 1998; (18): 143-146.

PETROSKI, M.D. The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochemistry*, 2008; (9): 1-15.

PICKART, C.M. Back to the Future with Ubiquitin. *Cell*, 2004; (116): 181-190.

PICKART, C.M. AND EDDINS, M.J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004; (1695): 55-72.

POLO, S.; SIGISMUND, S.; FARETTA, M.; GUIDI, M.; CAPUA, M.R.; BOSSI, G.; CHEN, H.; DE CAMILLI, P. AND DI FIORI, P.P. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*, 2002; (416): 451-455.

RESH, M.D. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; (1451): 1-16.

SAKUMA, R.; NOSER, J.A.; OHMINE, S. AND IKEDA, Y. Rhesus monkey TRIM5 α restricts HIV-1 production through rapid degradation of viral Gag polyproteins. *Nature Medicine*, 2007; (13): 631 - 635.

SANJAI, A.; HORNE, W.C. AND BARON, R. The Cbl Family: Ubiquitin Ligases Regulating Signaling by Tyrosine Kinases. *Science Signaling*, 2001; (110): 1-4.

SASAKI, H. MIURA, K.; HORII, A.; KANEKO, N. *et al.* Orthotopic implantation mouse model and cDNA microarray analysis indicates several genes potentially involved in lymph node metastasis of colorectal cancer. *Cancer Si*, 2008; (99): 711-719.

SATO, Y.; YOSHIKAWA, A.; YAMAGATA, A.; MIMURA, H.; YAMASHITA, M.; OOKATA, K.; NUREKI, O.; IWAI, K.; KOMADA, M. AND FUKAI, S. Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature*, 2008; (455): 358-363.

SEROOGY, C.M.; SOARES, L.; RANHEIM, E.A.; SU, L.; HOLNESS, C.; BLOOM, D. AND FATHMAN, C.G. The gene related to anergy in lymphocytes, na E3 ubiquitin ligase, is necessary for anergy induction in CD4 T cells. *Journal Immunology*, 2004; (173): 79-85.

SINGER, A.L. AND KORETZKY, G.A. Control of T cell function by positive and negative regulators. *Science*, 2002; (296): 1639- 1640.

SOROKIN, A.V.; KIM, E.R. AND OVCHINNIKOV, L.P. Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc)*, 2009; (13): 1411-42.

SPENCE, J.; SADIS, S.; HAAS, A.L. AND FINLEY, D. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol.*, 1995; (3): 1265-1273.

STAAL, F.J. AND SEN, J.M. The canonical Wnt signaling pathway plays an important role in lymphopoiesis and hematopoiesis. *Eur J Immunol*, 2008; (7):1788-1794.

STAAL, F.J.T; LUIS, T.C.; TIEMESSEN, M.M. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nature*, 2008; (8): 581-593.

STAAL, F.J.T.; BURGERING, B.M.T.; WETERING, M.V. AND CLEVERS, H.C. Tcf-1 mediated transcription in T lymphocytes: differential role for glycogen synthase kinase-3 in fibroblast and T cells. *International Immunology*, 1998; (11): 317-323.

SUN, Y. Targeting E3 Ubiquitin Ligases for Cancer Therapy. *Cancer Biology and Therapy*, 2003; (6): 623-629.

SYMATLAS.GNF.ORG

SWAMINATHAN, G. AND TSYGANKOV, A.Y. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol*, 2006; (1): 21-43.

SWANSON, C.M.; PUFFER, B.A.; AHMAD, K.M.; DOMS, R.W. AND MALIM, M.H. Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. *EMBO J.*, 2004; (23): 2632-2640.

TALIS, A.L.; HUIBREGTSE, J.M. AND HOWLEY, P.M. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J. Biol. Chem.*, 1998; (11): 6439-6445.

THIEN, C.B.F. AND LANGDON, W.Y. c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. *Biochem.J.*, 2005; (391): 153-166.

UCHIKI, T.; KIM, H.T.; ZHAI, B.; GYGI, S.P.; JOHNSTON, J.A.; O'BRYAN, J.P. AND GOLDBERG, A.L. The Ubiquitin-interacting Motif Protein, S5a, Is Ubiquitinated by All Types of Ubiquitin Ligases by a Mechanism Different from Typical Substrate Recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009; (284): 12622–12632.

VENTII, K.H. AND WILKINSON, D. Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochemical Journal*, 2008; (444): 161-175.

VIJAY, G.B. AND ZHIJIAN, J.C. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, 2009; (458): 430-437.

VINUESA, C.G. *et al.* A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature*, 2005; (435): 452-458.
VINUESA, C.G. AND COOK, M.C. Genetic analysis of systemic autoimmunity. *Novartis Found Symp.*, 2007; (281):103-120.

YAMADA, M.; OHNISHI, J.; OHKAWARA, B.; LEMURA, S.; SATOH, K.; HYODO-MIURA, J.; KAWACHI, K.; NATSUME, T. AND SHIBUYA, H. NARF, an Nemo-like Kinase (NLK) – associated Ring Finger Protein Regulates the Ubiquitylation and Degradation of T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF). *The Journal of Biological Chemistry*, 2006; (281): 20749-20760.

YONEYAMA, M. AND FUJITA, T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological Reviews*, 2009; (227): 54-65.

YONG-XI, M.; ZI-ZHONG, Z.; YI-PING, HOU; XIN-LI, H.; QIA-QING, W. AND YAN, S. Identification of a Novel Human Zinc Finger Protein Gene ZNF313. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003; (35): 230-237.

WANG, X.; TAPLICK, J.; GEVA, N. AND OREN, M. Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation. *FEBS Lett.*, 2004; (561): 195-201.

WILKINSON, K.D. Ubiquitination and deubiquitination: Targeting of proteins for degradation by proteasome. *Cell & Developmental Biology*, 2000; (11): 141-148.

WILKINSON, K.D. The Discovery of ubiquitin – dependent proteolysis. *PNAS*, 2005; (102): 15280-15282.

WU, X.; ANDERSON, J.L.; CAMPBELL, E.M.; JOSEPH, A.M. AND HOPE, T.J. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5 α restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *PNAS*, 2006; (19):7465-7470.

WILLINGER, T.; FREEMAN, T.; HERBERT, M.; HASEGAWA, H.; MCMICHAEL, A.J. AND CALLAN, M.F.C. Human Naïve CD8 T Cells Down-Regulate Expression of the WNT Pathway Transcription Factors Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 and Transcription Factor 7 (T Cell Factor-1) following Antigen Encounter In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*, 2010; (176): 1439-1446.

ZAO-ZHONG, S.; DEVANAND, S.; LUNI, E.; BARRAL, P.M. AND FISHER, P.B. Central Role of Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) In Controlling Retinoic Acid Inducible Gene-1 (RIG-I) Expression. *J. Cell Physiol*, 2007; (213): 502-510.
ZHANG, J. Evolution by gene duplication: an update. *Ecology and Evolution*, 2003; (18): 292-298.

ZHANG, J. et al. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *PNAS*, 1998; (95): 3708-3713.

ZHAO, H.; LI, C.C.; PARDO, J.; CHU, P.C.; LIAO, C.X. et al. A Novel E3 Ubiquitin Ligase TRAC-1 Positively Regulates T Cell Activation. *The Journal of Immunology*, 2005; (174): 5288-5297.

ZHENG, N.; WANG, P.; JEFFREY, P.D. AND PAVLETICH, N.P. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell*, 2000; (102): 533-539.

CURRICULUM VITAE

Nome: Paula Pezzuto

Nascimento: 30/07/2010

Naturalidade: Rio de Janeiro

- Formação Acadêmica

. Graduação em Ciências Biológicas - Modalidade Médica. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Brasil. Título: Efeito Anti-proliferativo do Butirato de Sódio em Linhagens de Pulmão de não-pequenas células. Orientador: Nivea Dias Amoedo, Franklin Rumjanek e Ana Lúcia Giannini (2004-2007).

. Mestrado em Química Biológica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. Título: Caracterização Parcial das Ligases de Ubiquitina TRAC-1/RNF125 (T-cell RING Protein in Activation), RNF114, RNF138 e RNF166. Orientador: Franklin David Rumjanek (2008-2010).

- Orientação de Estudante

1. Alan Messala de Aguiar Britto. Análise dos níveis de expressão da ligase de ubiquitina TRAC-1/RNF-125 em indivíduos saudáveis, portadores do vírus HIV não progressores e progressores rápidos. Início: 2008. Iniciação científica (Graduando em Enfermagem) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. (co-orientador). Em andamento.

2. Ana Carolina Vieira. Caracterização da Ligase de Ubiquitina RNF166. Início: 2010. Iniciação científica (Graduando em Biomedicina) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Orientador). Em andamento.

- Comunicação em Congresso

. 6 participações em Congressos Nacionais.

- Publicações

AMOEDO, N. D. ; CASTELO-BRANCO, MTL ; Paschoal, M.E.M. ; PEZZUTO, P. ; Esperança, A.B.T ; RUMJANEK, V.M. ; RUMJANEK, F.D. . Expression of ABC transporters, p53, Bax, Bcl-2 in an archival sample of non-small cell lung cancer bearing a deletion in the EGFR gene.. International Journal of Molecular Medicine, v. 23, p. 609-614, 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)