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

DIMITRIUS SANTIAGO PASSOS SIMÕES FRÓES GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CELULAR DA
PROTEÍNA TRIM49**

Ribeirão Preto/SP

2017

Dimitrius Santiago Passos Simões Fróes Guimarães

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CELULAR DA PROTEÍNA TRIM49

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

Ribeirão Preto

2017

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

Guimarães, Dimitrius Santiago Passos Simões Fróes

Caracterização bioquímica e celular da proteína TRIM49

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

Ribeirão Preto – Agosto 2017. 54p.

Orientador: Dr. Marcelo Damário Gomes

1-TRIM49, 2-Autofagia, 3- Ubiquitinação, 4-Proteassomo

FICHA DE APROVAÇÃO

Dimitrius Santiago Passos Simões Fróes Guimarães

Caracterização bioquímica e celular da proteína TRIM49

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

Área de concentração:
Bioquímica

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

Ass: _____

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP

Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

Ass: _____

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Ass: _____

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP

Prof. Dr. Adriano Silva Sebollela

Ass: _____

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. Introdução.....	7
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Clonagem molecular.....	18
3.2 Mutagênese sítio dirigida.....	19
3.3 Cultivo de células	20
3.4 Transfecção.....	20
3.5 Western blot	20
3.6 Expressão heteróloga e purificação.....	22
3.7 Coloração com Coomassie G-250.....	23
3.8 Expressão em células HEK293T e imunoprecipitação.....	23
3.9 Ensaio de atividade das enzimas E2	23
3.10 Ensaio de autoubiquitinação <i>in vitro</i>	24
3.11 Ensaio de ubiquitinação <i>in vivo</i>	24
3.12 Ensaio de lactato desidrogenase (LDH) para citotoxicidade	25
3.13 Microscopia de fluorescência	25
4. Resultados.....	26
4.1 Clonagem e mutagênese	26
4.2 Expressão heteróloga e purificação.....	28
4.3 Atividade de autoubiquitinação intrínseca das enzimas E2	30
4.4 Atividade de ubiquitinação <i>in vitro</i> de GST-TRIM49	32
4.5 Atividade de ubiquitinação <i>in vitro</i> de 3xFLAG-TRIM49.....	34
4.6 Atividade de E3 ligase de TRIM49 <i>in vivo</i>	36
4.6 Ensaio de citotoxicidade	38
4.7 Localização celular de TRIM49	40
4.8 Colocalização com GFP-LC3	44
5. Discussão	46
6. Conclusão.....	49
7. Bibliografia	50

RESUMO

Caracterização bioquímica e celular da proteína TRIM49. Guimarães, D. S. P. S. F, 2017. Dissertação de mestrado 54p. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Agosto 2017.

A autofagia é o processo de degradação de estruturas celulares através do seu direcionamento ao lisossomo. As proteínas TRIMs reconhecem as “cargas” autofágicas e reúnem o complexo de nucleação do fagóforo, contudo se desconhece a função de cada domínio e a importância da atividade de E3 ligase para a sua atividade. A proteína TRIM49 clonada e expressa em *E. coli* ou em células humanas HEK293T não apresentou atividade de E3 ubiquitina ligase *in vitro* e reduziu os níveis totais de ubiquitinação *in vivo*, indicando que não é um E3 ubiquitina ligase. Células desafiadas com Htt74Q apresentaram menores níveis de citotoxicidade quando co-transfectadas com TRIM49 selvagem, mas não com os mutantes do domínio RING ou SPRY, indicando os dois domínios são necessários para sua atividade celular. A proteína selvagem se colocaliza com o marcador autofágico LC3, após o bloqueio da autofagia com bafilomicina A1. Os resultados indicam que a TRIM49 pode atuar na degradação intracelular de proteínas, por um mecanismo não dependente de atividade de E3 ligase.

PALAVRAS-CHAVE: 1-TRIM49, 2-Autofagia, 3- Ubiquitinação, 4-Proteassomo

ABSTRACT

Biochemical and cellular characterization of the TRIM49 protein

Guimarães, D. S. P. S. F, 2017. Dissertação de mestrado 54p. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Agosto 2017.

Autophagy is the process of degradation of intracellular proteins through their direction to the lysosome. TRIM proteins can directly recognize autophagic cargo and also act as a hub for the phagophore nucleation complex, however the function of each domain and the role of the E3 ligase activity in this process is unknown. The TRIM49 protein cloned and expressed in *E. coli* or in human cells HEK23T showed no ubiquitin E3 ligase activity *in vitro* and cells transfected with the wild type protein showed lower levels of polyubiquitinated proteins, indicating that TRIM49 is not a *bona fide* E3 ubiquitin ligase. Cells challenged with Htt74Q presented lower cytotoxicity levels when cotransfected with wild type TRIM49, when compared with the RING domain mutant or with the truncated protein lacking the SPRY domain, indicating that both domains are required for its cellular activity. The wild type protein colocalizes with the autophagic marker LC3 after treatment with the autophagy inhibitor bafilomycin A1. Taken together, these results indicate that the TRIM49 protein plays a role in protein degradation independently of a E3 ligase activity.

KEY WORDS: 1- TRIM49, 2-Autophagy, 3-Ubiquitination, 4-Proteasome

1. INTRODUÇÃO

Sob a ótica da termodinâmica, a manutenção de estruturas autorreplicáveis com alto grau de complexidade tais como as células é um processo energeticamente dispendioso, tendo em vista que a diferença entrópica entre o sistema e a vizinhança vai contra a tendência de dissipação energética. Dessa forma, as células se mantêm distantes do equilíbrio através de processos catabólicos, que liberam moléculas simples e oxidadas nas vizinhanças, produzindo durante esse processo energia para ser utilizada nos processos anabólicos (Nelson; Cox, 2013). A própria natureza cíclica da divisão celular torna necessária a alteração da composição de biomoléculas presentes na célula em um determinado instante (Chang et al., 2015). Além disso, um organismo deve ser capaz de responder às condições ambientais constantemente alteradas para se perpetuar. Nesse contexto, os eucariotos possuem dois sistemas principais que atuam de forma a reduzir proteínas complexas a peptídeos e aminoácidos: o sistema ubiquitina proteassomo e o sistema de degradação lisossomal. Embora atuem separadamente em determinados contextos, os dois sistemas não são mutuamente exclusivos e atuam em conjunto em diversos processos celulares, como na degradação de componentes intracelulares pela via autofágica (Lu; Psakhye; Jentsch, 2014).

1.1 O sistema ubiquitina-proteassomo (UPS)

A descoberta de que parte da degradação de proteínas intracelulares é dependente de ATP, em 1971, surgiu como um paradoxo bioquímico para a época, já que ao alto gasto energético de síntese proteica seria adicionado o gasto energético do processo de catabolismo de proteínas, tornando o *turnover* proteico pouco eficiente energeticamente (Mayer; Ciechanover; Rechsteiner, 2006). Posteriormente, os mecanismos responsáveis por esse tipo de degradação foram elucidados e da década de 1980 até os anos 2000, os componentes do sistema ubiquitina proteassomo foram isolados e caracterizados, incluindo as enzimas envolvidas no processo de ubiquitinação e o proteassomo (LARSSON; MASUCCI, 2016).

A cascata de ubiquitinação envolve três reações catalisadas de forma sequencial pelas seguintes enzimas: enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e ubiquitina ligase (E3). Na primeira etapa, a E1 aumenta o potencial de transferência da ubiquitina, através da hidrólise de uma molécula de ATP para ativar a glicina carboxiterminal da ubiquitina, ocorrendo a liberação de fosfato inorgânico e a formação de uma ligação fosfodiéster. Essa ligação é hidrolisada e a energia liberada é utilizada para a formação da ligação tioéster entre ubiquitina e o resíduo de cisteína no sítio ativo da E1. Na reação seguinte, a E2 transfere a ubiquitina previamente ligada a E1 para um de seus resíduos de cisteína, catalisando a formação de uma ligação tioéster. Na etapa final, a E3 transfere a ubiquitina ligada a E2 para um grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina no substrato ou a um grupo amino de uma ubiquitina previamente ligada ao substrato, formando uma ligação isopeptídica (Buetow; Huang, 2016). Recentemente, foram descritos processos de ubiquitinação com a participação de um quarto fator de ubiquitinação (E4), processos de ubiquitinação sem a participação das enzimas E1 e E2 e ubiquitinação sem participação de enzimas E3 (Cyr; Höhfeld; Patterson, 2002).

As enzimas E3 podem ser classificadas em três famílias principais de acordo com o domínio de interação com a E2: U-box, *Really Interesting New Gene* (RING) e *Homologous to E6-AP Carboxi terminus* (HECT). As HECTs E3 ligases são caracterizadas pelo domínio HECT de 350 resíduos na porção carboxi terminal e se distinguem mecanisticamente das RINGs E3 ligases por formarem ligação tioéster com a ubiquitina antes de transferi-la ao substrato (Buetow; Huang, 2016). As U-box E3 ligases possuem o domínio U-box que, a exemplo do domínio RING possui cerca de 70 resíduos e se dobra em braços cruzados, contudo essa estrutura não coordena íons Zn^{2+} , sendo mantida por ligações de hidrogênio e pontes salinas. Esse domínio foi identificado primeiramente em leveduras na E4 UFD2 e posteriormente em humanos. Os membros dessa família atuam principalmente no controle de qualidade via degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) (Cyr; Höhfeld; Patterson, 2002).

O primeiro membro da família das RINGs E3 ligases, a proteína AO7, foi identificado em 1999 através de ensaio de duplo híbrido em levedura utilizando a E2 humana UbcH5B como isca. Após isolada, AO7 apresentou atividade de autoubiquitinação *in vitro* dependente de E2, desde então essa tem sido a definição de E3 ligase (Mayer; Ciechanover; Rechsteiner, 2006). O domínio RING possui cerca de 70 resíduos com a sequência geral $CX_2CX_{(9-39)}CXHX_{(2-3)}C/HX_2CX_{(4-48)}CX_2C$, na qual os resíduos de histidina e cisteína coordenam íons Zn^{2+} e fazem o domínio adquirir dobramento do tipo braços cruzados. Variações na ordem dos resíduos de histidina e cisteína do domínio RING, possibilitam a classificação do domínio em dois tipos: C3HC4 e C3H2C3 (Ikeda; Inoue, 2012). As RINGs E3 ligases se dividem em monoméricas ou multiméricas, nas últimas as funções de reconhecimento de substrato e de interação com a E2 são distribuídas entre os diferentes componentes do complexo E3. De acordo com a presença da proteína culina no complexo E3, as RINGs multiméricas podem ser ainda subdivididas em culina e não-culina.

A discriminação da proteína alvo de ubiquitinação fica a cargo da enzima E3, que reconhece sequências específicas nesses substratos chamadas de motivos de degradação ou *degrons* (Skaar; Pagan; Pagano, 2013). Dessa forma, a variedade de substratos do UPS é refletida na variedade das enzimas da cascata de ubiquitinação: enquanto as enzimas E1 e E2 totalizam cerca de 50 isozimas cada, já foram identificadas mais de 900 E3 diferentes em humanos. O processo de reconhecimento do substrato pela E3 correspondente é o principal ponto de regulação do processo de ubiquitinação. Os domínios de reconhecimento de substrato da E3 podem, por exemplo, reconhecer apenas motivos de degradação fosforilados e parceiros de interação podem alterar a distribuição subcelular de E3 ou de substrato durante a ativação de determinada via de sinalização celular (Antonioli et al., 2017).

A ubiquitina possui sete resíduos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63), além do grupo amino terminal, que possibilitam a formação de cadeias de poliubiquitina com diferentes topologias, tanto homotípicas quanto heterotípicas (Swatek; Komander, 2016). Embora o destino clássico das proteínas ubiquitinadas seja a degradação proteossomal, a topologia da cadeia de ubiquitina é o determinante do destino das proteínas ubiquitinadas (Lu et al.,

2015). Enquanto a monoubiquitinação de proteínas tem papel de regulação de atividade ou de localização, a poliubiquitinação é considerada como sinal clássico para degradação, com as cadeias ligadas por K48 compondo mais de 50% dos substratos poliubiquitinados. Adicionalmente, as cadeias de poliubiquitina podem ser modificadas por fosforilação, acetilação ou por outras modificações semelhantes a ubiquitina, como SUMOilação e NEDDilação, criando um código de sinalização estruturalmente semelhante ao observado nas histonas (Swatek; Komander, 2016). O processo de ubiquitinação de proteínas é contrabalanceado pelas hidrolases e proteases de ubiquitina, que hidrolisam as ligações isopeptídicas e peptídicas das cadeias de poliubiquitina, respectivamente. Dessa forma, o código da ubiquitina é composto por proteínas portadoras dos domínios UBD e UIM, que são capazes de ler a topologia e as modificações das ubiquitinas, pelos escritores, que são as enzimas que compõe a cascata de ubiquitinação e pelos apagadores, formados pelas enzimas desubiquitinadoras (DUBS) e peptidases de ubiquitina (Dikic; Wakatsuki; Walters, 2009).

O proteasomo é um complexo protéico de 2,5 MDa com atividade proteolítica dependente de ATP, que reconhece as cadeias de ubiquitina dos substratos e os direciona para o interior da cavidade onde estão os sítios ativos de suas subunidades proteolíticas, que possuem atividade de caspase, tripsina e quimotripsina. Essas subunidades fazem parte do subcomplexo da partícula central 20S, que faz contato com um subcomplexo regulatório 19S em cada extremidade, esses últimos contém as subunidades Rpn10, Rpn13 e Rpn1 que formam os receptores de ubiquitina (Saeki, 2017). O subcomplexo 19S tem atividade de chaperona, responsável pelo desenovelamento da proteína alvo, possibilitando seu acesso a cavidade proteolítica após o reconhecimento da cadeia de poliubiquitina (Lu et al., 2015; Mayer; Ciechanover; Rechsteiner, 2006). Ao passo que o substrato é desenovelado e hidrolisado, o subcomplexo 19S promove a hidrolise das ligações isopeptídicas entre as moléculas de ubiquitina, restituindo o pool celular de ubiquitina (Mayer; Ciechanover; Rechsteiner, 2006).

1.2 Autofagia

Autofagia é o processo de degradação de estruturas celulares via lisossomo. Existem três tipos mecanisticamente distintos de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia assistida por chaperona (CMA) (Larsson; Masucci, 2016). Nos dois primeiros tipos, a estrutura alvo é engolfada por membranas duplas, contudo durante a microautofagia este processo ocorre diretamente na membrana do lisossomo, ao passo que na macroautofagia a compartimentalização ocorre no citoplasma e posteriormente ocorre a fusão da vesícula formada, denominada autofagossomo, com o lisossomo (Mizushima; Yoshimori; Levine, 2010). À semelhança da microautofagia, na CMA a proteína alvo é entregue diretamente ao lisossomo, porém neste caso sequências sinal são reconhecidas por chaperona, que catalisam a translocação para o lisossomo (Larsson; Masucci, 2016).

A macroautofagia, doravante autofagia, é responsável pela degradação de grandes estruturas como agregados proteicos, organelas, bactérias e vírus, e pelo *turnover* de proteínas de meia vida longa, participando de eventos como diferenciação celular, embriogênese, resposta a falta de nutrientes, reciclagem de organelas e remoção de agregados proteicos citotóxicos, dessa forma a desregulação da autofagia, seja pelo seu aumento ou redução, leva a patologias como câncer, Parkinson, Alzheimer e ao envelhecimento. (Hönscheid; Datta; Muders, 2014; White; Mehnert; Chan, 2015). A autofagia é um processo altamente dinâmico, que responde rapidamente a estímulos externos, alterando o fluxo autofágico, ou seja, a velocidade com que as vesículas autofágicas são formadas e entregues ao lisossomo (Mizushima; Yoshimori; Levine, 2010).

A formação da vesícula autofágica pode ser dividida duas etapas: nucleação e alongação da membrana de isolamento, ou fagóforo (Yang; Klionsky, 2009). O complexo de serina/treonina cinases ULK é o principal responsável por iniciar a nucleação do fagóforo ao fosforilar Beclin-1, o que promove a ativação do complexo VPS34 I. O complexo VPS34 I é formado pela fosfatidilinositol-3-cinase VPS34, ATG4, Beclin-1 e VPS15 e, ao ser ativado, produz fosfatidilinositol-3-fosfato em locais específicos das membranas retículo

endoplasmático, sinalizando para o recrutamento de ATG9 e fatores autofágicos da família de parálogos de Atg8 de levedura, como LC3 e GABARAP. Esse processo leva a expansão da membrana do fagóforo através da adição de lipídios transportados do complexo de Golgi pela ATG9. LC3 é sintetizado na forma de pro-LC3 e após perder os 22 resíduos amino terminais dá origem a LC3-I (Mizushima; Yoshimori; Levine, 2010). A ancoragem de LC a membrana ocorre através da conjugação com fosfatidiletanolamina em uma cascata catalítica semelhante a ubiquitinação: ATG7 atua como E1, ativando a fosfatidiletanolamina, em seguida ATG3 atua como E2 e o complexo ATG5/12/16L1 completam a lipidação de LC3 I, dando origem a LC3-II, que passa a atuar na hemifusão das vesículas e como ponto de ancoragem para fatores autofágicos (Antonioli et al., 2017). São três os tipos de LC3 em humanos (LC3A, LC3B e LC3C) e, embora apresentem padrões de localização celular diferentes e especificidade em algumas interações, se desconhece qualquer função diferencial para os três membros. Ao contrário das outras proteínas que participam da nucleação do fagóforo, LC3 pode ser detectado em etapas posteriores da elongação, o que permite o monitoramento do fluxo autofágico através da quantificação dos pontos de LC3 por microscopia de fluorescência (Ni et al., 2011).

O processo de iniciação da autofagia é regulado por cinases, que fazem a transdução de sinal entre os mecanismos de *nutrient sensing*, a degradação de estruturas celulares e a regulação do metabolismo celular. Em condições adequadas de nutrientes, o complexo 1 da cinase *mechanistic target of rapamycin* (mTORC1) fosforila os resíduos S638/S758 de ULK1 e S258 de ATG13 inibindo suas atividades. Na ausência de nutrientes, principalmente aminoácidos, mTORC1 deixa de interagir com ULK1, que por sua vez fosforila diversos complexos *downstream*, incluindo Beclin-1 nos resíduos S15/30/96/279 e ATG14 nos resíduos S29. Beclin-1 é regulada adicionalmente por fatores de crescimento via AKT e EGFR (Antonioli et al., 2017).

1.3 Proteínas TRIMs e autofagia

O paradigma de que a autofagia é um processo não seletivo foi sendo quebrado à medida que diferentes receptores autofágicos foram sendo descobertos, tais receptores fazem a conexão entre LC3 e a “carga” autofágica (Khaminets; Behl; Dikic, 2016). O reconhecimento da “carga” autofágica pode ser dependente de ubiquitinação, no qual os receptores reconhecem as cadeias de ubiquitina no substrato através de domínios UBA, ou independente de ubiquitinação, quando receptores reconhecem outras modificações pós-traducionais no substrato. Recentemente, o termo autofagia de precisão foi adotado (Kimura; Mandell; Deretic, 2016) para destacar os receptores que reconhecem a proteína alvo diretamente, sem a necessidade de marcação com ubiquitina, e que também regulam a formação do autofagossomo ao atuar como plataforma de montagem para os fatores autofágicos (Kimura et al., 2015; Mandell et al., 2014).

As principais mediadoras da autofagia de precisão são as proteínas TRIMs (*tripartite motif proteins*), caracterizadas originalmente pela presença do domínio tripartite, que consiste em um domínio RING na porção amino terminal, seguido de um ou dois domínios B-box e um domínio *coiled coil* (Sardiello et al., 2008), contudo análises de bioinformática incluem membros que não apresentam domínio *coiled coil* e/ou RING (Hatakeyama, 2017). A classificação das TRIMs como E3 ligases é devida à presença do domínio RING, contudo poucas TRIMs tiveram sua atividade de autoubiquitinação *in vitro* demonstrada (Napolitano et al., 2011). Adicionalmente ao motivo tripartite, as proteínas TRIMs possuem diversos domínios de reconhecimento de substrato na porção carboxiterminal, a maioria possui o domínio SPRY/B30.2, mas os domínios PHD, BROMO, FIL, NHL, MATH, ARF, TM e FN3 podem estar presentes em substituição e a organização desses domínios dita a categorização das TRIMs em 11 grupos (Versteeg et al., 2013).

Diversas proteínas TRIMs podem atuar como homo ou heterodímeros através do domínio *coiled coil*, formando uma estrutura alongada que coloca os domínios RING e B-box em posições opostas em relação ao eixo longitudinal, posicionamento este que parece favorecer a interação do dímero com a enzima

E2 (Esposito; Koliopoulos; Rittinger, 2017). A proteína TRIM5 α é um fator do hospedeiro que restringe a infecção por retrovírus e que é capaz de constituir estruturas com alto número de associação formadas por dímeros conectados pelo segundo domínio B-box e de maneira independente do domínio SPRY (Li et al., 2011). Contudo, embora tenha sido demonstrado que a formação dessas estruturas não é dependente do domínio SPRY na maioria dos casos, o mesmo não é válido para TRIM34 pertencente ao grupo de TRIMs que TRIM5. Além do domínio B-box, o domínio *coiled coil* também pode mediar homodimerização, em alguns casos se mostrando necessário e suficiente para tal (Koliopoulos et al., 2016). A diversidade de mecanismos para oligomerização das proteínas TRIMs aparenta ser reflexo da necessidade de dimerização intra ou intermolecular dos domínios RING para atividade de ubiquitina ligase, como demonstrado para TRIM32, que constitui tetrâmeros conectados pelo domínio *coiled coil* e para TRIM5 (Koliopoulos et al., 2016).

Ensaio de duplo híbrido em leveduras mostraram que a maioria das TRIMs interage com o grupo UBE2 de enzimas E2 e, em geral, não há preferência por uma UBE2 específica (Napolitano et al., 2011). A flexibilidade do posicionamento dos domínios RING nos oligômeros é um dos requisitos para atividade de ubiquitina ligase das TRIMs, provavelmente pela necessidade de acomodar a interação com E2 (Esposito; Koliopoulos; Rittinger, 2017).

As proteínas TRIMs participam na formação do autofagossomo e reconhecimento da “carga” autofágica, agindo como plataforma para reunir ULK1 e Beclin-1 no complexo de iniciação chamado de TRIMossomo de maneira dependente do domínio SPRY (Mandell et al., 2014). Utilizando TRIM5 α como modelo, demonstrou-se que as TRIMs podem promover a ativação da autofagia por promover o deslocamento de Beclin-1 de seus inibidores TAB2 e BCL-2. Algumas TRIMs também podem interagir com outros fatores autofágicos como ATG16L1, GABARAP e p62.

Diversas TRIMs tem papel na resposta imune diretamente, através da ubiquitinação e/ou direcionamento de proteínas do patógeno para degradação autofágica, ou indiretamente, através da estimulação da produção de

interferon, peptídeos antimicrobianos, citocina pro-inflamatórias e quimiocinas (Versteeg et al., 2013). Em acordo com essa função, mais da metade das TRIMs conhecidas tem a expressão aumentada quando os receptores do tipo *toll-like* (TLRs) são ativados por diferentes estímulos (Jiang et al., 2017). A proteína TRIM27 é responsável pela ubiquitinação e degradação proteassomal de NOD2 (Zurek et al., 2012), uma proteína citoplasmática com função de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que elicit a resposta imune via NFκB ao ser ativada por peptidoglicanos. TRIM27 reconhece o domínio NBD em NOD2 através do domínio SPRY e se colocaliza com NOD2 no núcleo de células HeLa (Zurek et al., 2012).

1.4 TRIM49

A proteína TRIM49 faz parte do grupo IV de proteínas TRIMs e possui um domínio RING do tipo C3HC4 na porção amino terminal, seguido por um domínio B-box e por um domínio B30.2/SPRY na extremidade carboxiterminal.

Figura 1 Domínios de TRIM49 e mutantes produzidos nesse trabalho Os domínios da proteína TRIM49 humana (UNIPROT P0CI25) foram anotados utilizando a ferramenta PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) Marcados em preto na figura superior estão os motivos de interação com LC3 preditos pela ferramenta ELM. Os mutantes produzidos nesse trabalho estão ilustrados nas figuras inferiores. Ilustração produzida com o software IBS 1.0.2 (<http://ibs.biocuckoo.org/>).

O cDNA da TRIM49 foi isolado nos anos 2000 através da técnica de sequencia transcrita virtualmente (Yoshikawa et al., 2000). No mesmo estudo,

ao se comparar a abundância do transcrito em diferentes tecidos, o mesmo foi detectado apenas no testículo e o baço, sendo mais abundante neste primeiro. O gene da TRIM49 está localizado no cromossomo 11 e está sob o controle do fator de transcrição DUX4, que regula sua expressão durante o desenvolvimento do zigoto em humanos (De Iaco et al., 2017) e bovinos (Thélie et al., 2007). Em um estudo recente (Jiang et al., 2017), mostrou-se que a TRIM49 faz parte do grupo de TRIMs que tem a expressão aumentada em células THP-1 tratadas com diferentes ligantes para TLRs e que tem expressão estimulada por LPS e poli imunocomplexo de forma dose e tempo dependente.

No trabalho de Mandell et al., em 2014, foi demonstrado por experimentos de *pull down* e co-imunoprecipitação que a TRIM49 é capaz de interagir com ULK1, GABARAP, Beclin-1, LC3A e p62 (Mandell et al., 2014), o que se reflete na redução do número de *puncta* de LC3 formados durante a indução de autofagia pelo pp242, um inibidor seletivo da mTOR, em células transfectadas com siRNA para TRIM49.

Embora alguns estudos tenham descrito a participação direta da TRIM49 na formação do autofagossomo e que sua expressão seja regulada por determinados estímulos e estágios do desenvolvimento, não se conhece a sua função e mecanismo de atuação nesses cenários. Até o momento, não há estudos explorando a funcionalidade dos diferentes domínios de interação, nem sua atividade como E3 ligase.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade de E3 ligase da proteína TRIM49 e a influência de seus domínios de interação para a sua função na autofagia.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar a TRIM49 em diferentes vetores de expressão
- Obter a proteína TRIM49 purificada para ensaios de atividade
- Definir localização subcelular de TRIM49 através de microscopia de fluorescência.
- Verificar a participação dos domínios de TRIM49 na formação de *puncta* de LC3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem molecular

As subclonagens das versões *wild type* e truncada de TRIM49 foram feitas a partir da sequência codificadora previamente clonada em vetor pCR®2.1-TOPO (Thermo Fisher Scientific) utilizando clonagem clássica via enzimas de restrição. Na estratégia de clonagem utilizada, a proteína é introduzida em *frame* com uma *tag* já presente no vetor de destino. Os sítios para enzimas de restrição foram introduzidos nas extremidades do gene através de PCR em reações de 25 µL utilizando *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), que contém a DNA polimerase Phusion, dNTPS e cofatores enzimáticos; ao *master mix* foram adicionados 100 ng DNA molde, 10 pmol de cada primer e água ultrapura qsp. 25 µL. A reação para a clonagem da versão *wild type* procedeu com os seguintes parâmetros: 98 °C por 10 segundos, 5 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 35 segundos, 20 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 65 °C por 20 segundos e 72 °C por 35 segundos, e última extensão a 72 °C por 5 minutos. Para a versão truncada, omitiram-se os primeiros 5 ciclos do protocolo anterior. O produto de PCR foi purificado utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), conforme recomendação do fabricante. Os amplicons purificados foram digeridos com as enzimas de restrição de acordo com a tabela[abaixo], em reação contendo 5 unidades de cada enzima, 2 µL 10x tampão Tango, 12,5 µL da reação de PCR e água ultrapura qsp. 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 80 minutos, seguido de inativação a 65 °C por 10 minutos. Paralelamente, 900 ng dos vetores de destino foram digeridos da mesma maneira. Os produtos da digestão foram separados em gel de 0,5% agarose contendo *Gel Red* [marca] 1:20000 (v:v) em tampão TA a 10V/cm por 50 minutos. As bandas dos amplicons e dos vetores digeridos foram cortadas com auxílio de um bisturi e purificadas do gel utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), conforme recomendação do fabricante. As extremidades coesivas dos insertos e dos vetores foram ligadas em reação contendo 0,2 unidades da enzima T4 ligase (Invitrogen), 2 µL de tampão para ligase 10X, 33 ng do inserto e 50 ng do vetor digerido, incubada a 14 °C por 18 horas.

Bactérias *E. coli* DH5 α foram transformadas com 5 μ L da reação com T4 ligase e plaqueadas em LB-ágar contendo o devido antibiótico de seleção.

Tabela 1 Primers utilizados para clonagem da sequência codificante de TRIM49 humana

	Primers (5'-3')	Enzima	Amplicon	Vetor
FWD	CGGGATCCAATTCTGGAATCTTACAGG	BamHI	WT	pCDNA3.1/ pGEX4T1
REV	GGAATTCTCAGAAGTGAATACAGCAAAAGAT AGG	EcoRI		
WD	CGGGATCCAATTCTGGAATCTTACAGG	BamHI	Δ SPRY	pCDNA3.1/ pGEX4T1
REV	GGAATTCCTACAGAGTAATATGCACTCGGAA TTGG	EcoRI		
FWD	GGAATTCATGAACTCTGGAATCTTACAGGTC TTTCAGGG	EcoRI	WT	pmCherry -N1
REV	CGGGATCCAAGTGAATACAGCAAAAGATAGG	BamHI		
FWD	GGAATTCATGAACTCTGGAATCTTACAGGTC TTTCAGGG	EcoRI	Δ SPRY	pmCherry -C1
REV	CGGGATCCAGAGTAATATGCACTCGGAATTG G	BamHI		
FWD	GGAATTCATGAACTCTGGAATCTTACAGGTC TTTCAGGG	EcoRI	WT	pmCherry -N1
REV	CGGGATCCTCAGAAGTGAATACAGCAAAAGA TAGG	BamHI		
FWD	GGAATTCTTCTGGAATCTTACAGGTCTTTCAG GG	EcoRI	Δ SPRY	pmCherry -C1
REV	CGGGATCCCTACAGAGTAATATGCACTCGGA ATTGG	BamHI		

3.2 Mutagênese sítio dirigida

A fim de se produzir uma enzima cataliticamente inativa, uma mutação pontual *missense* foi introduzida no códon correspondente ao resíduo de cisteína 35 do domínio RING de TRIM49 via PCR, para substituí-lo por um resíduo de serina. A reação de PCR foi feita da mesma maneira que para clonagem, com os primers indicados na tabela abaixo, com exceção da ciclagem que foi modificada para: 98 °C por 10 segundos, 18 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 68 °C por 30 segundos e 72 °C por 110 segundos, seguido por uma última extensão de 5 minutos a 72 °C. Ao fim da reação adicionou-se

0,2 µL (4 unidades) da enzima de restrição específica para metilação DpnI e incubou-se a reação a 37 °C por 18 horas, seguido de inativação a 80 °C por 15 minutos. Bactérias DH5a foram transformadas com o produto da reação e plaqueadas em meio contendo o antibiótico adequado.

Tabela 2 Primers utilizados na mutagênese sítio dirigida

	Primers (5'-3')	Amplicon
FWD	GGCACAGCTTTAGCAGGCCTTGTTTCTACC	C35S
REV	GGCCTGCTAAAGCTGTGCCACAGTC	

3.3 Cultivo de células

Células humanas HEK293T e U2OS foram cultivadas em meio DMEM [sigla, marca] suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/ml gentamicina a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂

3.4 Transfecção

Células HEK293T em 70%-80% de confluência foram transfectadas por 48 horas utilizando-se Lipofectamina 3000[marca] ou polietilenimina (pEi) [marca] conforme indicado no experimento. Na transfecção utilizando pEi, o DNA plasmidial e o polímero na proporção de 3:1 (m:m) foram diluídos em meio DMEM sem soro, vortexados por 15 segundos, incubados por 15 minutos e, decorrido este período, a solução contendo DNA-polímero foi gotejada sobre as células. No método lipossomal, seguiu-se as recomendações do fabricante, utilizando-se 0,5 µL de Lipofectamine 3000 por 100 ng DNA.

3.5 Western blot

O meio de cultura de células aderentes foi removido e as células lavadas com PBS e conforme necessidade experimental, os extratos protéicos foram obtidos por lise desnaturante ou por lise hipotônica. Na lise desnaturante, as células foram lisadas em tampão de amostra para SDS-PAGE (0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol, 0,0005% (m/m) bromofenol blue, 10% (v/v) glicerol, 2% (m/v)

SDS, 63 mM Tris-HCl pH 6,8), o lisado foi aquecido a 98 °C por 15 minutos e sonificado por 30 segundos [marca aparelho, haste, potência, amplitude]. Na lise hipotônica, as células foram coletadas em 15 mM EDTA em PBS com auxílio de um *cell scrapper*, centrifugadas por 2 minutos a 3000 x *g* a 4 °C e lisadas com tampão de lise (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 225 mM KCl, 1% NP-40) adicionado de inibidores de protease Sigma Fast (Sigma) e fosfatases (10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) por 30 minutos a 4°C. O lisado foi centrifugado a 20100 x *g* a 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante resultante coletado. As proteínas do extrato foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose [poro, marca] em sistema semi seco (*TransBlot SemiDryer*, BIORAD) utilizando tampão de transferência (39 mM glicina, 48 mM Tris, 10% SDS, 20% metanol) por 40 minutos a 0,5 mAmp. A membrana foi bloqueada em 5% leite desnatado em TBST [componentes] por 60 minutos sob agitação suave, lavada por 2 vezes de 5 minutos com TBS, incubada com o anticorpo primário *overnight*, lavada 4 vezes de 5 minutos com TBST, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com HRP adequado por 60 minutos e lavadas novamente por 4 vezes de 5 minutos com TBST. As proteínas foram detectadas por quimioluminescência com luminol (ECL, Santa Cruz Biotechnology ou ECL Select, GE) em fotodocumentador ImageQuant (GE).

Tabela 3 Anticorpos utilizados nesse trabalho

Espécie	Antígeno	Diluição	Marca	Catálogo
Camundongo	FLAG (DYKDDDDK)	1:500	Sigma	F1804
Coelho	FLAG (DDDDK)	1:1000	Abcam	ab1162
Camundongo	GFP	1:500	Santa Cruz	Sc9996
Camundongo	GST	1:2000	Sigma	G1160
Camundongo	Mono/poli ubiquitina	1:1000	Enzo Life Sciences	PW8810
Cabra	IgG camundongo	1:2000	KPL	041806
Cabra	IgG coelho	1:2500	KPL	
Coelho	mCherry	1:1000		

3.6 Expressão heteróloga e purificação

Bactérias da cepa de expressão Origami (Novagen) termocompetentes foram transformadas com plasmídeos pGEX 4T1 codificando para GST-TRIM49WT ou GST-TRIM49 C35S por choque térmico e plaqueadas em LB-ágar contendo 50 ug/mL gentamicina, 15 ug/mL kanamicina e 12,5 ug/mL tetraciclina. O pré-inóculo foi feito com 5 colônias em meio LB com os antibióticos citados anteriormente, incubado a overnight a 37 °C e 225 RPM. 500 mL de LB foram inoculados com 10 mL do pré-inóculo até atingir OD₆₀₀ próxima a 0,6, quando então a cultura foi resfriada por 15 minutos a 28 °C, adicionada de 50 µM ZnCl₂ e expressão do gene da TRIM49 induzida com 0,2 mM IPTG por 3 horas. Decorrido esse tempo, a cultura foi centrifugada a 7500 x g por 15 minutos, as células foram lavadas com 50 mM Tris-HCl pH 7,6, centrifugadas novamente a 12000 x g por 20 minutos e o *pellet* resultante estocado a -80 °C overnight. As células foram adicionadas de 10 mL de tampão gelado contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,5% Triton-X100 e 0,15 mM PMSF e sonicadas no gelo por 8 vezes de 30 segundos a 60% de amplitude, com intervalos de 30 segundos entre os pulsos. O lisado foi centrifugado a 20000 x g por 25 minutos a 4 °C e o sobrenadante recolhido. As proteínas com a *tag* de GST foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna empacotada com 1 mL de resina Glutathione Sepharose 4FF (Pharmacia Biotech) acoplada a FPLC Akta (GE), pré-equilibrada com tampão A (25 mM Tris-HCl pH 8). O extrato foi aplicado na coluna a um fluxo de 0.2 mL/min e após aplicação do extrato, a coluna foi lavada a um fluxo de 1 mL/min com tampão A e foi introduzido um gradiente com tampão B (25 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 300 mM KCl), de 0-100% em 15 mL, 100% durante 3 mL e de 100%-0 por 4 mL. A eluição foi realizada a 1 mL/min com 50 mM glutathione reduzida em Tris-HCl pH 8.0 por 5 mL, as frações do eluato foram avaliadas em gel SDS-PAGE corado com Coomassie e as amostras relevantes reunidas. O pool foi concentrado aplicado em Centriprep (millipore) com membrana com poro de exclusão de 10 kDa, centrifugado a 2000 x g por 25 minutos e, após remoção do flow through, centrifugado novamente a 2500 x g por 10 minutos. Ao final da concentração, obteve-se cerca de 400 µL de amostra, que foi adicionada de 100 µL de glicerol e estocada a -80 °C. Alíquotas em diferentes

etapas do processo foram recolhidas para monitoramento da purificação através de gel de poliacrilamida corado com Coomassie G-250.

3.7 Coloração com Coomassie G-250

Os geis de SDS-PAGE foram fixados por 30 minutos em solução fixadora (50% metanol, 10% ácido acético), incubados em solução corante (0,2 % Coomassie G-250, 50% metanol, 10% ácido acético) por 30 minutos e descorados por 3 horas com solução fixadora, trocando a solução por 4 vezes durante o período.

3.8 Expressão em células HEK293T e imunoprecipitação

Células HEK293T transfectadas por 48 horas com pCDNA3.1-3xFLAG TRIM49WT ou C35S foram lisadas com tampão de lise hipotônico. As proteínas foram imunoprecipitação com 40 µL de suspensão da resina agarose anti FLAG M2 (*ANTI-FLAG M2 Affinity Gel*, SIGMA) overnight em um agitador *rotisserie*. A resina foi lavada por 3 vezes com tampão de lise e por mais 4 vezes com tampão de eluição FLAG (10 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% NP-40, 225 mM KCl), sendo centrifugada por 30 segundos a 2 000 x g entre as lavagens. As proteínas foram eluídas com 300 µg/mL de peptídeo 3xFLAG (Sigma) em tampão de eluição FLAG por 100 minutos a 4 °C sob agitação. A resina foi centrifugada a 3000 x g por 2 minutos e o sobrenadante recolhido. Parte do sobrenadante foi aplicada em gel SDS-PAGE para quantificação densitométrica das proteínas expressas no gel corado com Coomassie.

3.9 Ensaio de atividade das enzimas E2

As reações de autoubiquitinação de enzimas E2 foram realizadas em 5 µL. Foi preparado o mix de reação (0,5 µL tampão para ubiquitinação 10x, 2 mM ATP, 0,2 mM MgCl₂, 0,37 mM ubiquitina biotinilada no N-terminal, 1,48 mM

ubiquitina) e, a exceção do controle negativo, foi adicionada a enzima E1 na concentração final de 0,17 μ M e as seguintes enzimas E2 na concentração final de 1 μ M: Ubch5c, Ubch5b, Ubch2, Ubch3, Ubch6, Ubch7, Ubch10. A reação procedeu-se a 37 °C por 60 minutos, parada com 5 μ L tampão de amostra 2x e aquecida a 98 °C por 5 minutos. A ubiquitinação foi avaliada por western blot utilizando peroxidase marcada com estreptavidina (KPL 474 3000).

3.10 Ensaio de autoubiquitinação *in vitro*

A atividade das enzimas expressas em *E. coli* ou em HEK293T foi testada em ensaio de autoubiquitinação *in vitro*. O mix reacional foi preparado como descrito anteriormente e após a adição das enzimas E1 na concentração final de 0,17 μ M e enzimas E2 na concentração final de 0,5 μ M, foi incubado a 30 °C por 5 minutos. Após a incubação, foram adicionados 3 μ L de TRIM49 WT ou C35S, ou 3 μ L de água nos controles negativos. Como controle positivo para as reações, utilizou-se a ubiquitinação da proteína p53 pela E3 ligase MDM2 utilizando o mesmo *mix* reacional. A reação procedeu-se a 37 °C por 60 minutos, parada com 5 μ L tampão de amostra 2x e aquecida a 98 °C por 5 minutos. A ubiquitinação foi avaliada por western blot utilizando peroxidase marcada com estreptavidina.

3.11 Ensaio de ubiquitinação *in vivo*

Células HEK293T foram co-transfectadas com uma das três versões da 3xFLAG TRIM49 e plasmídeo codificando para a proteína TR-TUbE, com exceção do controle negativo. Após 48 horas de transfecção as células foram lisadas com tampão hipotônico e as proteínas precipitadas com resina agarose anti-FLAG M2 (Sigma) como descrito anteriormente. As proteínas poliubiquitinadas foram detectadas por western blot com o anticorpo anti poliubiquitina.

3.12 Ensaio de lactato desidrogenase (LDH) para citotoxicidade

Utilizou-se 50 µL do sobrenadante de cultura de células HEK293T co-transfectadas por 48 horas com uma das diferentes versões de 3xFLAG TRIM49 e com o exon 1 da proteína huntingtina contendo 74 resíduos de glutamina com *tag* de GFP (74Q-GFP) para medir a atividade da lactato desidrogenase (Non-radioactive Cytotox 96 LDH assay kit, PROMEGA), seguindo as recomendações do fabricante. Após recolher o meio, visualizou-se as células por microscopia de fluorescência e foi feito o extrato desnaturante para observar os níveis de 74Q-GFP por western blot com anticorpo anti-GFP.

3.13 Microscopia de fluorescência

Células U2OS foram plaqueadas em lamínulas de vidro pré-tratadas com poli-L-lisina e co-transfectadas com TRIM49WT ou TRIM49ΔSPRY subclonada em plasmídeos pmCherry, contendo a *tag* fluorescente na porção amino ou carboxi terminal e com GFP-LC3, utilizando pEi. O meio de cultura foi trocado após 5 horas de transfeccção e em 44 horas de transfecção, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com DPBS e colocadas em *starvation* em meio HBSS por 4 horas. Ao fim do período, o meio foi removido, as células lavadas com DPBS e fixadas com 4% paraformaldeído em PBS por 15 minutos a 37 °C. A solução fixadora foi removida e as lamínulas seladas com *ProLong Gold Antifade Mountant* (Thermo Fischer Scientific) contendo DAPI. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência Leica DMI4000 B (Leica Microsystems)

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem e mutagênese

A sequência codificadora da proteína TRIM49 humana foi subclonada em vetores de expressão em *E. coli* (pGEX 4T1) e em células de mamíferos (pCDNA3.1 e pmCherry N1/C1) com diferentes *tags* para purificação via cromatografia de afinidade, imunoprecipitação e microscopia de fluorescência. Além da proteína *wild type*, uma versão truncada sem o domínio B30.2/SPRY foi produzida (TRIM49 Δ SPRY) a fim de se verificar a dependência da atividade, interação e localização subcelular nesse domínio (FIGURA).

Para confirmar a “construção” correta do vetor, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição que tiveram sítio de restrição inseridos na reação de PCR e por sequenciamento de Sanger. Os resíduos de cisteína do domínio RING de TRIM49 que coordenam íons Zn^{2+} foram identificados por análise de sequência e, através de mutagênese sítio dirigida, foi introduzida uma mutação *missense* no códon do resíduo de cisteína da posição 35, substituindo por um resíduo de serina. A mutação foi confirmada através de sequenciamento de Sanger.

Figura 2. Análise da subclonagem de TRIM49 em diferentes vetores de expressão. A sequência codificante de TRIM49 foi amplificada via PCR com *primers* flanqueados por sítios para enzimas de restrição, o fragmento foi digerido com as enzimas adequadas e ligado com T4 ligase ao vetor de expressão digerido com as mesmas enzimas. Para confirmar a ligação do inserto, o construto foi digerido e os produtos separados em gel de 0,7% agarose.

4.2 Expressão heteróloga e purificação

Algumas cepas de bactéria para expressão foram testadas e optou-se por produzir proteína GST-TRIM49 foi *E. coli* BL21(DE3) Origami, que carrega mutações nos genes de tioredoxina redutase (*trxB*) e glutathione redutase (*gor*), o que auxilia na formação de pontes de dissulfeto por manter o ambiente mais oxidante. A introdução de ZnCl_2 no meio de cultura durante a indução foi utilizada como artifício para auxiliar no dobramento e solubilidade da proteína, como reportado para outras proteínas contendo domínio RING. Notou-se que a proteína apresentou certo grau de toxicidade para as células, visto que a taxa de crescimento foi reduzida após indução. A GST-TRIM49 WT e C35S foram expressas e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna glutathione Sepharose, durante a purificação a coluna foi lavada com gradiente salino adicionado de cloreto de magnésio para remoção de proteínas que possam interagir inespecificamente com a coluna e com a proteína expressa, como chaperoninas. Devido a sua baixa expressão, as frações coletadas do eluato foram reunidas em um *pool* e concentradas. Os processos de expressão e purificação foram monitorados por gel de poliacrilamida corado com *Coomassie Blue* G-250, no qual foi possível observar duas bandas proeminentes, uma no tamanho esperado de 79 kDa e outra menor próxima a 55 kDa, que pode corresponder as subunidades da chaperonina GroEL. A identidade da proteína purificada foi confirmada adicionalmente por *western blot*, utilizando anticorpo produzido contra GST, no qual se observa uma banda forte na altura esperada e não foram identificados possíveis produtos de degradação.

A)

B)

Figura 3. Purificação por cromatografia de afinidade de GST-TRIM49 Bactérias *E. coli* BL21 (DE3) Origami portando plasmídeos para TRIM49WT ou TRIM49C35S foram cultivadas em meio LB suplementado com 50 μ M de $ZnCl_2$ até OD_{600} próxima a 0,6, quando foram induzidas com 150 μ M IPTG por 3 horas a 23 °C. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a por minutos e lisadas com auxílio de um sonicator de haste. O lisado foi passado por uma coluna glutiona Sepharose 4FF (A) e as proteínas contendo GST foram eluídas com 50 μ M glutatona reduzida. Aliquotas de diferentes fases do processo de purificação de GST-TRIM49 expressa em *E. coli* foram separadas por SDS-PAGE e o gel foi corado com *Coomassie Blue G-250* (B) ou transferido para membrana de nitrocelulose (C) e revelado com anticorpo anti GST. As setas indicam a banda de aproximadamente 79 kDa correspondente a GST-TRIM49. NI: não induzido; TOT: lisado total; SOB: sobrenadante; POOL: frações do eluato reunidas

4.3 Atividade de autoubiquitinação intrínseca das enzimas E2

Tendo em vista que relatos anteriores reportaram certo grau de promiscuidade na interação entre proteínas TRIMs e enzimas E2 e que a autoubiquitinação de enzimas E2 pode interferir na identificação de padrões de autoubiquitinação *in vitro* de E3, testou-se a atividade *in vitro* de uma série de E2. A E2 UBCH6 apresentou o maior nível de autoubiquitinação dentre as E2 testadas, enquanto as enzimas UBCH5C e UBCH5B, usadas recorrentemente em ensaios de ubiquitinação, e as enzimas UBCH3 e UBCH7, apresentaram apenas baixa autoubiquitinação. A banda acima do marcador de 116 kDa corresponde a enzima E1 e controle negativo, que consiste no *mix* reacional sem a enzima E1 não apresentou ubiquitinação detectável.

Figura 4 Atividade de autoubiquitinação das enzimas E2 disponíveis A atividade foi avaliada em mix de reação (0,5 μ L tampão para ubiquitinação 10x, 2 mM ATP, 0,2 mM MgCl₂, 0,37 mM ubiquitina biotinilada no N-terminal, 1,48 mM ubiquitina), foi adicionada a enzima E1 na concentração final de 0,17 μ M e as enzimas E2 na concentração final de 1 μ M. O controle negativo sem a enzima E1 (-E1) contém a E2 UBCH5c. A ubiquitinação foi avaliada por *western blot* utilizando peroxidase marcada com estreptavidina. Os triângulos indicam bandas de ubiquitinação.

4.4 Atividade de ubiquitinação *in vitro* de GST-TRIM49

A atividade de autoubiquitinação *in vitro* das TRIM49 WT e C35S purificadas foi avaliada utilizando as enzimas UBCH6 e UBCH5C. Não foi possível detectar aumento nos níveis de ubiquitinação na presença de TRIM49 WT ou C35S em relação ao ensaio anterior de ubiquitinação das enzimas E2. A eficácia do ensaio foi confirmada pelo controle positivo utilizando a ubiquitinação de p53 pela enzima E3 Hdm2, no qual se observou espécies de massa molecular mais alta na presença de da enzima E1.

Figura 5. Ensaio de autoubiquitinação in vitro de GST-TRIM49 O *mix* reacional foi preparado como descrito anteriormente para autoubiquitinação de enzimas E2. Foram adicionados 3 μ L de TRIM49 WT ou C35S, ou 3 μ L de água nos controles negativos. Como controle positivo para as reações, utilizou-se a ubiquitinação da proteína p53 pela E3 ligase MDM2 utilizando o mesmo *mix* reacional. A ubiquitinação foi avaliada por *western blot* utilizando peroxidase ligada à estreptavidina.

4.5 Atividade de ubiquitinação *in vitro* de 3xFLAG-TRIM49

Tendo em vista que o correto enovelamento proteico e possíveis modificações pós-traducionais podem ser necessários para a atividade enzimática *in vitro*, estendeu-se a tentativa de detectar a atividade de autoubiquitinação de TRIM49 com a proteína purificada a partir de células de mamífero. 3xFLAG-TRIM49 WT e C35S foram expressas em células HEK293T e imunoprecipitadas com resina de agarose conjugada a anticorpo anti-FLAG. A atividade de autoubiquitinação *in vitro* foi testada com as enzimas UBCH6 e UBCH5C e não se detectou ubiquitinação em nenhum dos pares E3-E2. Para determinar se a falta de atividade foi decorrente de especificidade para enzima E2, outras enzimas E2 foram testadas, mas não houve aumento na ubiquitinação na presença de TRIM49 WT imunoprecipitada. Curiosamente, a presença do extrato reduziu a atividade de ubiquitinação da enzima E2 UbcH10.

Figura 6. Ensaio de autoubiquitinação de 3xFLAG-TRIM49 O mix reacional foi preparado como descrito anteriormente para autoubiquitinação de enzimas E2. Foram adicionados 3 μ L de TRIM49 WT ou C35S, ou 3 μ L de água nos controles negativos. A atividade da proteína WT foi comparada a atividade da proteína mutante (A) e em (B) foram testados diferentes pares de E2-TRIM49. (C) Gel da proteína imunoprecipitada utilizado para quantificação. A ubiquitinação foi avaliada por *western blot* utilizando peroxidase ligada à estreptavidina.

4.6 Atividade de E3 ligase de TRIM49 *in vivo*

A atividade de E3 ligase de TRIM49 foi avaliada *in vivo* utilizando a estratégia de *Tandem Ubiquitin Binding Entities* (TUBE), gentilmente cedida pelo Dr. Keiji Tanaka do *Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science*. A estratégia se baseia na capacidade dos domínios UBA se ligarem especificamente à ubiquitina, dessa forma construiu-se uma proteína contendo uma *tag* FLAG amino terminal e quatro domínios UBA em sequência, que se ligam ao substrato ubiquitinada e bloqueiam o reconhecimento das cadeias de poliubiquitina por outros, incluindo aqueles presentes no subcomplexo 19S do proteassomo, protegendo o substrato da degradação. Logo, a tecnologia leva ao acúmulo de proteínas ubiquitinadas na célula e permite capturar proteínas ubiquitinadas por imunoprecipitação. 3xFLAG-TRIM49 WT, C35S e Δ SPRY foram co-transfectadas com o plasmídeo codificando a proteína TR-TUBE e imunoprecipitadas com resina agarose anti-FLAG. As proteínas ubiquitinada foram visualizadas por *western blot* com anticorpo anti-ubiquitina e, ao contrário do esperado, os níveis de ubiquitinação foram reduzidos nas células transfectadas com a versão WT de TRIM49.

Figura 7. Atividade in vivo de E3 ligase de 3xFLAG-TRIM49 Células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos de TR-TUBE e 3xFLAG TRIM49 WT, C35S, ΔSPRY ou vetor vazio. Após a lise, as proteínas foram imunoprecipitadas com resina agarose anti-FLAG e o eluato revelado em *western blot* com os anticorpos indicados. A banda marcada em asterisco corresponde a cadeia pesada de IgG.

4.6 Ensaio de citotoxicidade

O UPS e a autofagia agem em conjunto na eliminação de agregados citotóxicos de poliglutamina. A participação da proteína TRIM49 na redução da citotoxicidade induzida pelo mutante da proteína *Huntingtin* contendo 74 resíduos de glutamina em consecutivos foi avaliada pelo ensaio da lactato desidrogenase (LDH). Este ensaio se baseia na conversão de sais de tetrazólio no cromóforo formazan pela enzima diaforase, em uma reação acoplada que reoxida NADH produzido durante conversão de lactato a piruvato pela LDH. Não houve diferença significativa na alteração de citotoxicidade entre os grupos transfectados, contudo há uma tendência reprodutível de redução de citotoxicidade nas células transfectadas com TRIM49 WT quando comparada com os outros dois mutantes. A proteína 25Q, que não forma agregados foi utilizada como controle negativo. A homogeneidade de poliglutamina entre as amostras foi confirmada por *western blot* com anticorpo contra GFP e a formação de agregados foi confirmada por microscopia de fluorescência, na qual se visualizou a formação de agregados nas amostras transfectadas com 74Q, mas não de 25Q. A quantidade total de poliglutamina foi homogênea.

Figura 8. Ensaio de citotoxicidade induzida por agregação A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi medida no sobrenadante do meio de cultura de células HEK293T transfectadas com 3xFLAG TRIM49 WT, C35S ou ΔSPRY e com o exon 1 da proteína Huntingtina contendo 74 resíduos de glutamina com *tag* de GFP (74Q-GFP). A formação de agregados foi visualizada por microscopia de fluorescência e foi feito o extrato desnaturante para observar os níveis de 74Q-GFP por *western blot* com anticorpo anti-GFP. 25Q foi utilizada como controle não citotóxico.

4.7 Localização celular de TRIM49

Devido a presença de domínio nos extremos da proteína TRIM49, verificamos se a inserção da *tag* fluorescente mCherry tem algum efeito sobre a localização celular da proteína. Para isso, células U2OS foram transformadas com dois plasmídeos de TRIM49 marcada com mCherry na porção amino terminal ou carboxiterminal e foram observadas em microscopia de fluorescência. A proteína mCherry se distribui uniformemente no núcleo e no citoplasma, com formação de *dots* citoplasmáticos pouco frequentes. As duas construções de TRIM49 apresentaram a mesma distribuição celular, com a frequente presença de *dots* citoplasmáticos na região perinuclear e de maneira difusa no núcleo. Os ensaios subsequentes foram feitos utilizando-se a construção com a *tag* posicionada na região amino terminal.

Figura 9 Microscopia de fluorescências das duas construções de pmCherry TRIM49
 Células U2OS foram transfectadas com uma das construções de TRIM49 WT contendo a *tag* de mCherry na porção amino terminal (C1) ou carboxiterminal (N1). Após 30 horas as células foram fixadas, incubadas com 0.2 ug/mL DAPI e fotografadas utilizando microscópio de fluorescência.

Figura 10. Localização celular de TRIM49 WT e ΔSPRY Células U2OS foram transfectadas com uma das construções de TRIM49 WT ou ΔSPRY. Após 48 horas de transfecção as células foram deixadas por 6 horas em meio EBSS ou mantidas em meio DMEM. As células foram fixadas, incubadas com 0.2 ug/mL DAPI e fotografadas utilizando microscópio de fluorescência.

Figura 11. Localização celular de TRIM49 WT e ΔSPRY Células U2OS foram transfectadas com uma das construções de TRIM49 WT ou ΔSPRY. Após 48 horas de transfecção as células foram tratadas com 100 uM bafilomicina A1 ou veículo (DMSO). As células foram fixadas, incubadas com 0.2 ug/mL DAPI e fotografadas utilizando microscópio de fluorescência.

4.8 Colocalização com GFP-LC3

A fim de verificarmos a participação da TRIM49 na autofagia e o papel do domínio SPRY na sua localização celular após a indução da autofagia por privação de nutrientes ou após o bloqueio da autofagia com bafilomicina A1, células U2OS foram co-transfectadas com GFP-LC3 e mCherry-TRIM49 WT ou Δ SPRY. Após 48 horas de transfecção, as células foram colocadas em meio EBSS por 4 horas ou tratadas com 100 μ M bafilomicina A1 por 6 horas, terminado o período as células foram observadas por microscopia de fluorescência. Nesse experimento, pudemos observar que a localização de TRIM49 não se altera após o aumento do fluxo autofágico e que o mutante sem o domínio SPRY se comporta da mesma maneira que a proteína *wild type*. Nas células tratadas com bafilomicina A1, foi possível observar que a proteína selvagem se colocaliza com GFP-LC3. A eficiência na indução da autofagia foi confirmada pelo aumento na formação de *dots* de GFP-LC3 nas células tratadas.

Figura 12. Sobreposição de TRIM49 WT e LC3 Imagens de microscopia de fluorescência foram tratadas com o programa ImageJ. A região de interesse (ROI) dos canais vermelhos e verde tiveram o *background* subtraído pelo método de esferas rolantes e a correlação de intensidade dos *pixels* foi calculada.

5. DISCUSSÃO

A ubiquitinação de “cargas” autofágicas pode ser necessária para o reconhecimento dessa “carga” pelos receptores da via dependente de ubiquitina ou alternativamente pode direcioná-las para a degradação proteassomal. Diversas proteínas TRIMs aparentam atuar na interface dos dois sistemas, atuando como ubiquitina E3 ligases e como plataformas de montagem do complexo de nucleação do autofagossomo, contudo ainda não está claro porque alguns substratos são direcionados para os dois sistemas e se a ubiquitinação de substratos autofágicos pelas proteínas TRIMs é um requisito para o reconhecimento por receptores autofágicos adicionais ou se apenas fornece um mecanismo adicional de degradação pelo proteassomo. Embora várias TRIMs sejam autofágicas, não é uma característica obrigatória da família, alguns membros atuam exclusivamente na degradação proteassomal de proteínas. As características estruturais ou o contexto que determinam a forma de atuação das proteínas TRIMs na degradação autofágica ou proteassomal ainda não são definidas, por exemplo, se o domínio SPRY é necessário apenas para o reconhecimento de substratos ou se tem participação na interação com outras proteínas e se a presença do domínio RING é indicativo de atividade de E3 ligase ou se esse domínio está envolvido na interação com proteínas acessórias.

A fim de elucidar alguns dessas questões, buscamos caracterizar a atividade bioquímica da proteína TRIM49 e a sua participação na autofagia. A TRIM49 recombinante humana foi expressa em *E. coli* com a tag GST fusionada a porção amino terminal, como descrito para outras proteínas RING (Chasapis; Spyroulias, 2009; Napolitano et al., 2011; Rhodes; Trowsdale, 2007), e em células de mamífero com a tag 3xFLAG também no amino terminal, em ambos os casos não foi possível detectar atividade de E3 ubiquitina ligase *in vitro* da proteína TRIM49 purificada. O domínio RING, embora necessário para a atividade de ubiquitina E3 ligase das proteínas RINGs (Joazeiro; Weissman, 2000), não é necessariamente suficiente para a atividade de E3 ligase, como descrito para as proteínas HdmX (Linares et al., 2003), Bmi1 (Wang et al., 2004) e BARD1 (Hashizume et al., 2001), nas quais media a interação e ativação da atividade de ligase de outras proteínas RINGs.

Dessa forma, a participação da proteína TRIM49 na autofagia pode estar restrita a montagem do complexo de nucleação do autofagossomo e do reconhecimento da “carga” autofágica. Além disso, há a possibilidade da TRIM49 atuar como SUMO E3 ligase ou NEDD E3 ligase, como ocorre em outras proteínas TRIMs autofágicas (Chu; Yang, 2011).

Vários fenômenos podem contribuir para a redução dos níveis de proteínas ubiquitinadas nas células transfectadas com TRIM49, devido a natureza dinâmica da degradação de proteínas pode ocorrer um aumento na taxa de degradação, uma redução na formação de proteínas poliubiquitinadas ou aumento na taxa de deubiquitinação. Ainda, é possível que TRIM49 aumente a formação de agregados de proteínas poliubiquitinadas, que seriam então detectáveis apenas na fração insolúvel do extrato, como descrito para células tratadas com o inibidor da acidificação lisossomal cloroquina (Myeku; Figueiredo-Pereira, 2011).

O ensaio da lactato desidrogenase, corrobora com os indícios de TRIM49 atuando no clearance de proteínas ubiquitinadas, já que há redução reprodutível da atividade de LDH no meio de cultura de células transfectadas com a versão WT mas não com a proteína C35S ou Δ SPRY. A atividade de LDH pode ser usada como indicativo de fluxo autofágico (Seglen et al., 2015), já que a sua degradação ocorre quase exclusivamente por essa via, dessa forma, a redução da atividade de LDH no meio de cultura, pode ser decorrente do aumento do sequestro da enzima para os vacúolos autofágicos na presença da proteína TRIM49 selvagem.

A TRIM49 atua tanto na autofagia seletiva quanto na resposta imune, neste caso, sendo responsiva ao estímulo de TLRs (Jiang et al., 2017) e também por ativar promotores de genes da resposta imune (Versteeg et al., 2013). Dessa forma, há a possibilidade de os domínios SPRY e RING atuarem no processo de ativação desses genes na resposta imune.

Relatos prévios da localização celular de TRIM49, utilizando anticorpos direcionadas a *tag* VP5 amino terminal (Versteeg et al., 2013), mostram que localização exclusivamente citoplasmática na forma de *dots*. Nesse trabalho, em adição aos *dots* citoplasmáticos, também observamos a proteína nuclear, o

que pode ser decorrente da *tag* fluorescente mCherry ou do uso de microscopia de epifluorescência. Imagens de microscopia confocal, com planos focais transversais ao núcleo podem ser adquiridas para verificar a presença de TRIM49 no núcleo.

Confirmando a interação de TRIM49 com LC3, pudemos observar a colocação da das duas proteínas em células U2OS tratadas com Bafilomicina A1, um inibidor da H⁺-ATPase do autofagossomo.

6. CONCLUSÃO

A proteína recombinante humana TRIM49 não apresentou atividade de E3 ubiquitina ligase *in vitro* ou *in vivo*, portanto é provável que sua função celular não está relacionada com esta atividade catalítica, contudo reunimos indícios que ambos os domínios SPRY e RING são necessários para seu funcionamento.

7. BIBLIOGRAFIA

- ANTONIOLI, M. et al. **Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy***Trends in Biochemical Sciences*, 2017.
- BUETOW, L.; HUANG, D. T. Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 10, p. 626–642, 2016.
- CHANG, L. et al. Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination. **Nature**, v. 522, n. 7557, p. 450–454, 2015.
- CHASAPIS, C.; SPYROULIAS, G. RING Finger E3 Ubiquitin Ligases: Structure and Drug Discovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 31, p. 3716–3731, 1 nov. 2009.
- CHU, Y.; YANG, X. SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. **Oncogene**, v. 30, n. 9, p. 1108–1116, 2011.
- CYR, D. M.; HÖHFELD, J.; PATTERSON, C. **Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold***Trends in Biochemical Sciences*, 2002.
- DE IACO, A. et al. DUX-family transcription factors regulate zygotic genome activation in placental mammals. **Nature Genetics**, 2017.
- DIKIC, I.; WAKATSUKI, S.; WALTERS, K. J. Ubiquitin-binding domains — from structures to functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 10, p. 659–671, 2009.
- ESPOSITO, D.; KOLIOPOULOS, M. G.; RITTINGER, K. Structural determinants of TRIM protein function. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 1, p. 183–191, 2017.
- HASHIZUME, R. et al. The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 Is a Ubiquitin Ligase Inactivated by a Breast Cancer-derived Mutation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14537–14540, 2001.
- HATAKEYAMA, S. **TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis***Trends in Biochemical Sciences*, 2017.
- HÖNSCHEID, P.; DATTA, K.; MUDERS, M. H. Autophagy: Detection, regulation and its role in cancer and therapy response. **International Journal of Radiation Biology**, v. 90, n. 8, p. 628–635, 2014.
- IKEDA, K.; INOUE, S. Trim proteins as ring finger E3 ubiquitin ligases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 770, p. 27–37, 2012.
- JIANG, M.-X. et al. Expression profiling of TRIM protein family in THP1-derived macrophages following TLR stimulation. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42781, 2017.

JOAZEIRO, C. A. .; WEISSMAN, A. M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. **Cell**, v. 102, n. 5, p. 549–552, set. 2000.

KHAMINETS, A.; BEHL, C.; DIKIC, I. **Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy** *Trends in Cell Biology*, 2016.

KIMURA, T. et al. TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. **Journal of Cell Biology**, v. 210, n. 6, p. 973–989, 2015.

KIMURA, T.; MANDELL, M.; DERETIC, V. Precision autophagy directed by receptor regulators – emerging examples within the TRIM family. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 5, p. 881–891, 2016.

KOLIOPOULOS, M. G. et al. Functional role of TRIM E3 ligase oligomerization and regulation of catalytic activity. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 11, p. 1204–1218, 2016.

LARSSON, N.-G.; MASUCCI, M. G. Scientific Background for the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine. 2016.

LI, X. et al. Determinants of the higher order association of the restriction factor TRIM5 α and other tripartite motif (TRIM) proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 32, p. 27959–27970, 2011.

LINARES, L. K. et al. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 21, p. 12009–14, 2003.

LU, K.; PSAKHYE, I.; JENTSCH, S. Autophagic clearance of PolyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family. **Cell**, v. 158, n. 3, p. 549–563, 2014.

LU, Y. et al. Substrate degradation by the proteasome: A single-molecule kinetic analysis. **Science**, v. 348, n. 6231, p. 1250834–1250834, 2015.

MANDELL, M. A. et al. TRIM Proteins Regulate Autophagy and Can Target Autophagic Substrates by Direct Recognition. **Developmental Cell**, v. 30, n. 4, p. 394–409, 2014.

MAYER, R. J.; CIECHANOVER, A. J.; RECHSTEINER, M. **Protein Degradation: Ubiquitin and the chemistry of life**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2006.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; LEVINE, B. **Methods in Mammalian Autophagy Research** *Cell*, 2010.

MYEKU, N.; FIGUEIREDO-PEREIRA, M. E. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: Association with sequestosome 1/p62. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 25, p. 22426–22440, 2011.

NAPOLITANO, L. M. et al. Functional interactions between ubiquitin E2 enzymes and TRIM proteins. **Biochemical Journal**, v. 434, n. 2, p. 309–319, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed.** [s.l.: s.n.].

NI, H. M. et al. Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome. **Autophagy**, v. 7, n. 2, p. 188–204, 2011.

RHODES, D. A.; TROWSDALE, J. TRIM21 is a trimeric protein that binds IgG Fc via the B30.2 domain. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 9, p. 2406–2414, mar. 2007.

SAEKI, Y. Ubiquitin Recognition by the Proteasome. **The Journal of Biochemistry**, v. 161, n. 2, p. 113–124, 2017.

SARDIELLO, M. et al. Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 225, 2008.

SEGLEN, P. O. et al. Macroautophagic cargo sequestration assays. **Methods**, v. 75, p. 25–36, 2015.

SKAAR, J. R.; PAGAN, J. K.; PAGANO, M. Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 6, p. 369–381, 2013.

SWATEK, K. N.; KOMANDER, D. Ubiquitin modifications. **Cell Research**, v. 26, n. 4, p. 399–422, 2016.

THÉLIE, A. et al. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. **BMC Developmental Biology**, v. 7, n. 1, p. 125, 2007.

VERSTEEG, G. A. et al. The E3-Ligase TRIM Family of Proteins Regulates Signaling Pathways Triggered by Innate Immune Pattern-Recognition Receptors. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 384–398, 2013.

WANG, H. et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. **Nature**, v. 431, n. 7010, p. 873–878, 2004.

WHITE, E.; MEHNERT, J. M.; CHAN, C. S. **Autophagy, Metabolism, and Cancer** *Clinical Cancer Research*, 2015.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. **An overview of the molecular mechanism of autophagy** *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2009.

YOSHIKAWA, T. et al. Isolation of a cDNA for a novel human RING finger protein gene, RNF18, by the virtual transcribed sequence (VTS) approach. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1493, n. 3, p. 349–355, 2000.

ZUREK, B. et al. TRIM27 negatively regulates NOD2 by ubiquitination and proteasomal degradation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.