



Identificação de E3 ligases parceiras de interação da enzima conjugadora de ubiquitina UBE2A, associada à Deficiência Intelectual ligada ao X do tipo Nascimento

Palavras-Chave: deficiência intelectual, ubiquitina, interação proteína-proteína

Autoras:

Estefanny Guimarães de Abreu, IB – UNICAMP

Profª. Drª. Ângela Saito (orientadora), LNBio - CNPEM

INTRODUÇÃO:

A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional envolvida em vários processos celulares, como mitofagia, reparo de dano ao DNA, degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassomo e transmissão sináptica¹. Sabe-se que a UBE2A, uma enzima conjugadora de ubiquitina (E2), pode desempenhar essas funções descritas interagindo com outras proteínas, como E3 ligases¹. Devido às funções celulares dependentes da ação de UBE2A, mutações no seu gene estão relacionadas a diversas doenças, como alguns cânceres, doenças neurodegenerativas e à Deficiência Intelectual (DI) de herança ligada ao X do tipo Nascimento². Estudos demonstraram que a mutação *missense* p.Q93E, próxima ao sítio catalítico da enzima, encontrada em uma família brasileira com a DI do tipo Nascimento, afeta a sua atividade enzimática³ e também estudos preliminares, utilizando modelo murino *knockin* para a mutação, demonstraram que está associada a alterações na citoarquitetura neuronal e na transmissão sináptica. Contudo, não há conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares que levam a essas alterações e dos parceiros de interação envolvidos, em especial E3 ligases que atuam em conjunto com a UBE2A.

Existem alguns métodos para estudar os parceiros de interação de uma dada proteína, como ensaios com TurboID⁴, co-imunoprecipitação⁵ e ensaios de PLA⁶ (*Proximity Ligation Assay*). Ensaios com TurboID, uma biotina ligase (BirA) de *E. coli* modificada ligada a uma isca, permitem a identificação de interatores dispostos a até 20nm de distância da isca⁷. As proteínas que estão interagindo são marcadas com biotina, permitindo o enriquecimento destas por meio de *pull-down* com resina de estreptavidina, que captura as proteínas biotiniladas. Assim, é possível identificar posteriormente com espectrometria de massas os possíveis parceiros de interação da proteína de interesse, no caso a UBE2A (Figura 1). Após esses ensaios, que permitem a identificação de várias proteínas, é possível realizar validação desses parceiros da UBE2A com os outros dois métodos anteriormente citados, que permitem a visualização da existência de interação entre uma E3 ligase específica e a UBE2A.

O conhecimento desses parceiros contribui para entender a influência do mau funcionamento dessa enzima e as vias celulares por ela afetadas, possibilitando estudos de mecanismo dessas vias em patogêneses e proposição de estratégias terapêuticas.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é identificar as possíveis E3 ligases parceiras da UBE2A em células neuronais, utilizando a tecnologia do TurboID e espectrometria de massas em células de neuroblastoma SH-SY5Y, e validar a interação por meio de co-imunoprecipitação e de PLA em células SH-SY5Y e do cérebro do camundongo UBE2A selvagem (WT).

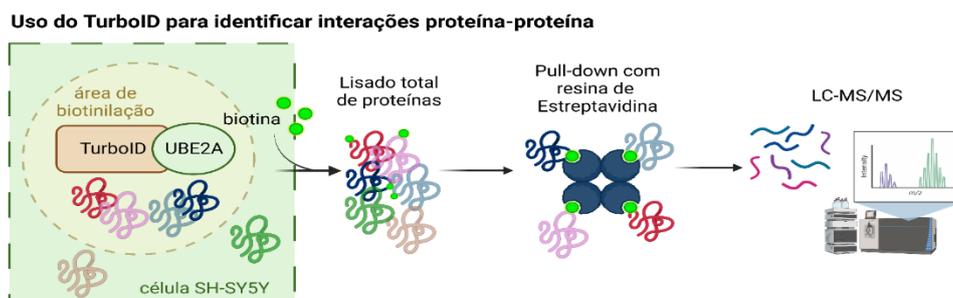


Figura 1 Etapas envolvidas na identificação de parceiros de interação utilizando a tecnologia TurboID. Criado no Biorender.com.

METODOLOGIA:

O projeto foi separado inicialmente em duas frentes: produção de linhagem estável com as construções FLAG-TurboID e padronizações do experimento para a espectrometria de massas.

A produção de linhagens estáveis, expressando FLAG-TurboID, FLAG-TurboID-UBE2A selvagem (WT) ou FLAG-TurboID-UBE2A mutante (Q93E), é necessária para esse projeto porque o TurboID é uma enzima que, em grandes quantidades, atua inespecificamente, o que geraria identificações falso-positivas na espectrometria de massas. A linhagem estável contribui para diminuir esse impacto, uma vez que há regulação da célula para expressão dessas proteínas, o que não acontece na expressão transiente. Então, para a produção das linhagens, é realizada algumas padronizações, como o método de transfecção (FuGENE6, Lipofectamine2000 ou Lipofectamine3000, usando vetor de GFP), a curva de morte com antibiótico puomicina em SH-SY5Y (de 50 a 3000 ng/mL, com foco nas menores concentrações que matavam todas as células depois de 3 e 7 dias), linearização dos vetores (digestão com enzimas de restrição para facilitar integração no genoma) e a condição da transfecção estável (proporção 5:1 ou 4:2 entre uma das construções FLAG-TurboID e o vetor de resistência à puomicina).

Padronizadas as condições, transfecção com Lipofectamine3000 na proporção de 4:2 entre FLAG-TurboID e vetor de resistência à puomicina com seleção por 12 dias em meio DMEM-F12, suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina, com 300 ng/mL de puomicina, esse método é realizado para as três construções. Cada um dos clones, posteriormente isolados, é caracterizado em número de integrações no genoma (PCR de sensibilidade), sequenciamento e *Western Blot* para avaliar a expressão da construção, sendo mantidos os clones que possuem maior semelhança entre as três construções para ser utilizado na espectrometria de massas.

Para as padronizações para espectrometria de massas, é realizado o teste funcional das construções, usando FLAG-TurboID e FLAG-TurboID-UBE2A WT, e também a padronização do tempo de tratamento com biotina (1h ou 6h, por meio de *pull-down* com resina de estreptavidina e *Western Blot*, para visualizar saturação de marcação para biotina na membrana), uma vez que longas exposições com o TurboID também podem gerar falsas interações, sendo necessária a padronização do melhor tempo para o experimento.

No teste funcional das construções, as células são cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% FBS dialisado e 1% penicilina/estreptomicina (P/S) sem biotina e, após a transfecção de duas placas de 100mm (p100) para cada construção, adiciona-se biotina com concentração final de 50 μ M em uma placa de cada construção e em um dos controles não-transfectado por 24 horas. São coletadas 6 placas de células e realizada a imunoprecipitação de um alvo já reconhecido de UBE2A, PCNA, seguido de *Western Blot* anti-PCNA e anti-Ubiquitina, para visualizar se há ubiquitinação do alvo, e *Western Blot* do lisado total com anti-FLAG e Estreptavidina conjugada a HRP, para visualizar a expressão das construções FLAG-TurboID e a biotinylation realizada.

A Figura 2 resume em esquema os processos necessários para esse projeto, que resulta na identificação das E3 ligases por espectrometria de massas e sua validação funcional por co-

imunoprecipitação e PLA em células de neuroblastoma SH-SY5Y e de cérebro de camundongo UBE2A WT.

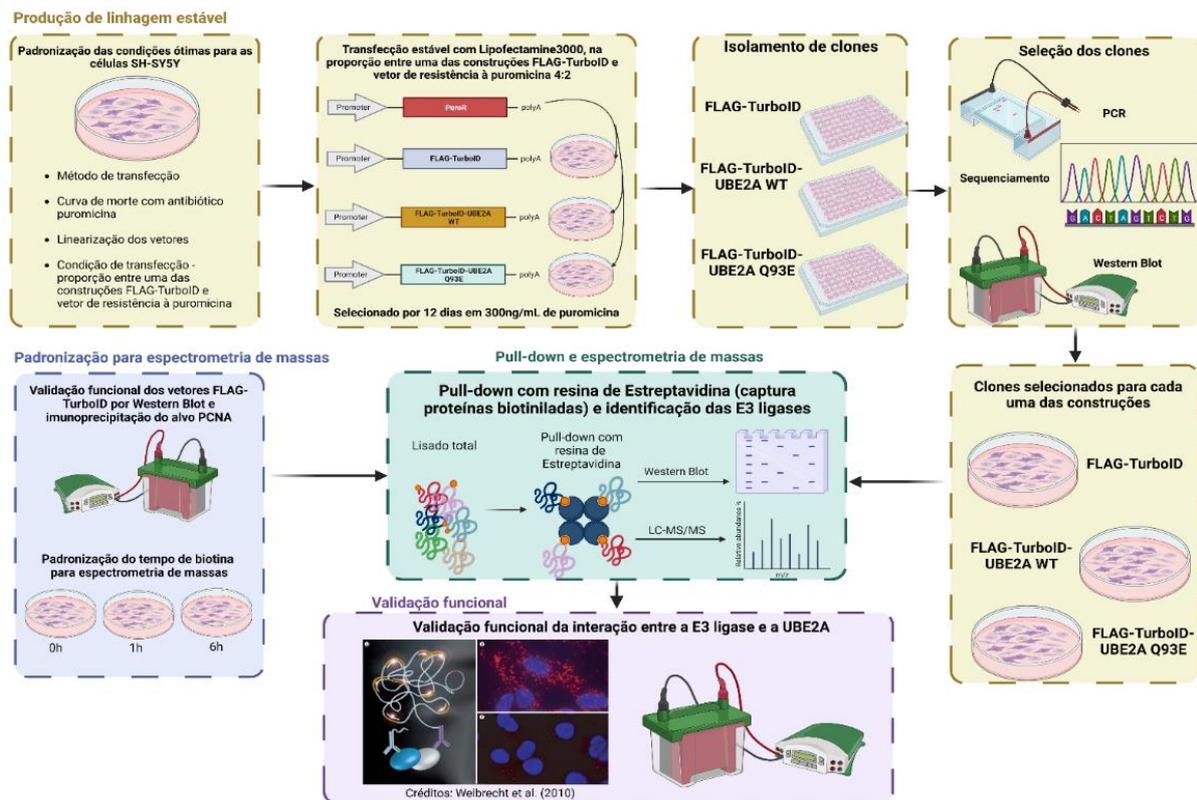


Figura 2 Padronizações e processos para a identificação de E3 ligases que interagem com a enzima UBE2A, a partir de linhagens estáveis que expressam uma das construções FLAG-TurboID, fusionada ou não a UBE2A selvagem WT ou mutante Q93E. Criado no Biorender.com.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Com o método de transfecção escolhido conforme descrito na Metodologia, fiz a transfecção estável em 3 placas, sendo que somente uma delas desenvolveu bem. Então, com essas células em que houve sucesso de inserção no genoma, fiz padronização de PCR com os vetores FLAG-TurboID e DNAs genômicos (gDNA) de uma célula transfectada e uma não-transfectada para verificar a inserção no genoma das células, o que foi bem sucedido conforme ilustrado na Figura 3, cuja eletroforese e sequenciamento indicam o inserto FLAG-TurboID.

Em paralelo, realizei um teste funcional transfectando transientemente as células com as construções FLAG-TurboID e FLAG-TurboID-UBE2A selvagem (WT) com o objetivo de verificar se as enzimas UBE2A e biotina ligase (TurboID) estavam funcionando de acordo com o esperado, isto é, se as atividades de biotilação e ubiquitinação de um parceiro de interação de UBE2A poderiam ser alcançadas nesse sistema. Esse teste permitiu verificar que as construções realizam biotilação aumentada na presença do meio suplementado com biotina, assim como esperado, além de ser possível visualizar ubiquitinação de PCNA na amostra com FLAG-TurboID-UBE2A WT suplementado com biotina.

A membrana do lisado total foi primeiro incubada com anticorpo anti-FLAG para visualizar a expressão das construções FLAG-TurboID (Figura 4). É possível visualizar a diferença de tamanho entre a construção sem a UBE2A (~40 kDa) e a fusionada com a UBE2A (~55 kDa) e a ausência dessas construções nas células não-transfectadas. Como a proteína estreptavidina tem alta afinidade com a biotina, a membrana foi incubada com Estreptavidina conjugada a HRP (Estreptavidina-HRP) para observar a biotilação de proteínas do lisado total na presença de TurboID. Com isso, observei que a

biotinilação acontece quando há o tratamento com biotina nas condições em que existem as construções FLAG-TurboID, enquanto que nas células não-transfectadas praticamente não há biotinilação independentemente do tratamento com biotina.

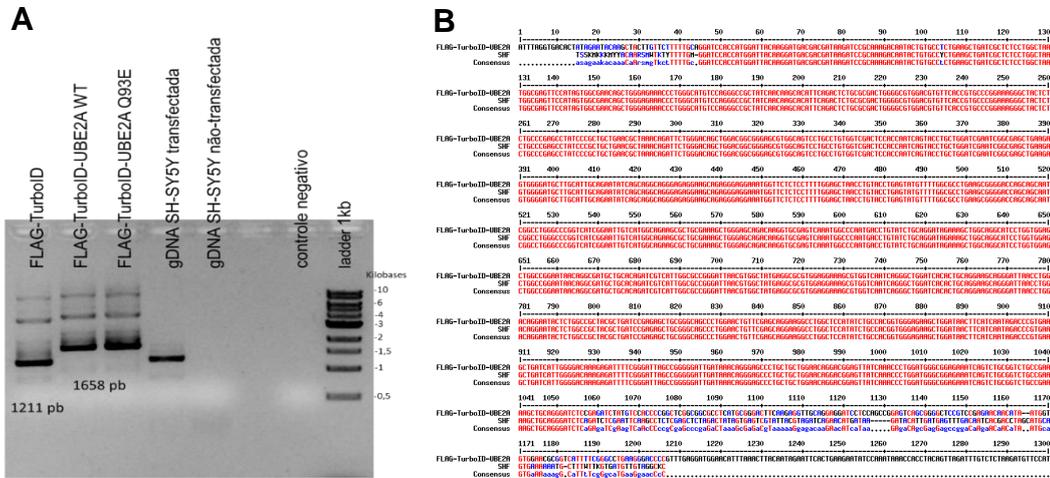


Figura 3 A) Gel de padronização da PCR para verificar inserção de FLAG-TurboID no genoma de SH-SY5Y e B) sequenciamento da PCR da SH-SY5Y transfetada. A amplificação do gDNA transfetado corresponde ao do FLAG-TurboID (1211 pb). O sequenciamento da PCR evidencia também essa sequência do FLAG-TurboID sem a sequência da UBE2A (sequência presente na referência e que não parece no final do sequenciamento a partir do nucleotídeo 1060 no alinhamento).

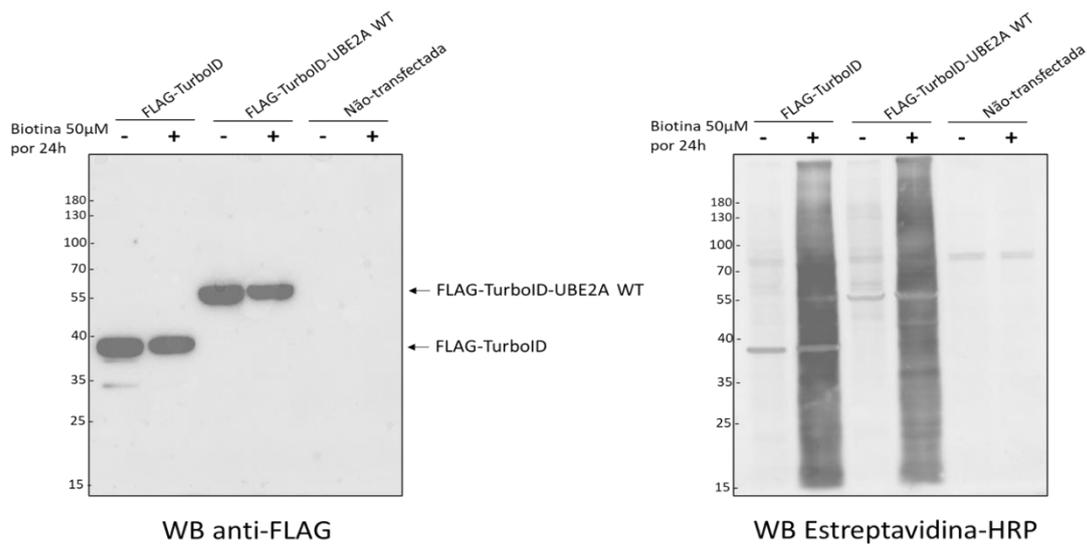


Figura 4 Membrana do lisado total revelada com anticorpo anti-FLAG e Estreptavidina-HRP. Com a incubação anti-FLAG foi visualizada a banda com o tamanho correspondente às construções FLAG-TurboID (~40 kDa) e FLAG-TurboID-UBE2A WT (~55 kDa). Com a Estreptavidina-HRP, foi visualizado o efeito da adição de biotina na biotinilação de proteínas.

A membrana da imunoprecipitação de PCNA foi primeiro incubada com anticorpo anti-PCNA para verificar modificações pós-traducionais, biotinilação ou ubiquitinação, ocorridas nessa proteína com a superexpressão das construções (Figura 5). Só foi possível observar modificação diferencial na situação de FLAG-TurboID-UBE2A WT com biotina, o que pode indicar a especificidade da interação da construção fusionada a UBE2A com uma proteína que se sabe que a UBE2A interage. Com a incubação anti-Ubiquitina era esperado visualizar a ubiquitinação do alvo, PCNA, de forma independente da adição da biotina; no entanto, só foi possível observar ubiquitinação na condição com FLAG-TurboID-UBE2A WT e adição de biotina. A hipótese levantada é que a reação com o TurboID-UBE2A continuou além das demais, o que pode ter acarretado em mais modificações pós-traducionais, causando o arraste visualizado na revelação.

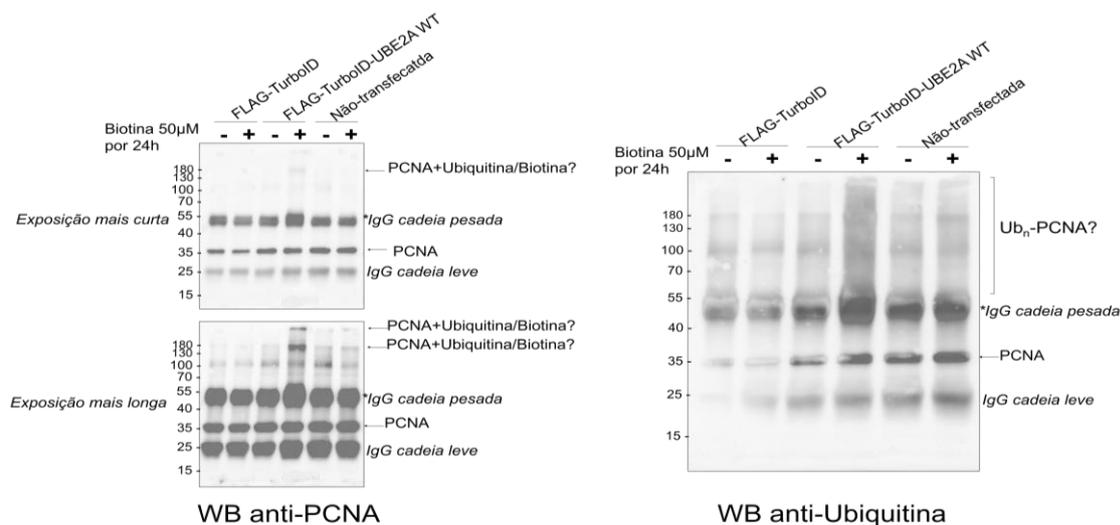


Figura 5 Membrana da imunoprecipitação anti-PCNA revelada com anticorpos anti-PCNA e anti-Ubiquitina. Com a incubação anti-PCNA foi visualizada a banda com o tamanho correspondente ao PCNA endógeno (~35 kDa) e suas versões com modificações pós-traducionais. Com a anti-Ubiquitina, foi visualizada um sinal maior de ubiquitinação na condição FLAG-TurboID-UBE2A WT tratada com biotina.

CONCLUSÕES:

A padronização para a transfecção estável foi realizada e o teste funcional das construções comprovou a funcionalidade das duas enzimas, o que permite o prosseguimento para as próximas etapas. Para os próximos meses, temos planejado o estabelecimento das linhagens estáveis e seu uso para o experimento de espectrometria de massas. A identificação das enzimas E3 ligases que atuam com a UBE2A na modificação de proteínas neurais abrirá caminhos para o melhor entendimento dos mecanismos associados a DI ligada ao X do tipo Nascimento.

BIBLIOGRAFIA

- SCHEFFNER, M., SMITH, S. & JENTSCH, S. The Ubiquitin-Conjugation System. *In*: PETERS, J.-M. *et al* (org.). **Ubiquitin and the Biology of the Cell**. Boston, MA: Springer, 1998. p.65–98, doi: 10.1007/978-1-4899-1922-9_3;
- NASCIMENTO, R. M. P., OTTO, P. A., DE BROUWER, A. P. M. & VIANNA-MORGANTE, A. M. UBE2A, Which Encodes a Ubiquitin-Conjugating Enzyme, Is Mutated in a Novel X-Linked Mental Retardation Syndrome. **The American Journal of Human Genetics** 79 (3): 549–55 (2006). doi: 10.1086/507047;
- DE OLIVEIRA, J. F. *et al*. Mechanistic insights revealed by a UBE2A mutation linked to intellectual disability. **Nature Chemical Biology** 15 (1): 62–70 (2019). doi: 10.1038/s41589-018-0177-2;
- LAROCHELLE, M., BERGERON, D., ARCAND, B. & BACHAND, F. Proximity-dependent biotinylation mediated by TurboID to identify protein-protein interaction networks in yeast. **Journal of Cell Science** 132 (11): jcs232249 (2019). doi: 10.1242/jcs.232249;
- BURCKHARDT, C. J., MINNA, J. D., & DANUSER, G. Co-immunoprecipitation and semi-quantitative immunoblotting for the analysis of protein-protein interactions. **STAR Protocols**, 2 (3): 100644 (2021). doi: 10.1016/j.xpro.2021.100644;
- GULLBERG, M., GÖRANSSON, C. & FREDRIKSSON, S. Duolink-“In-cell Co-IP” for visualization of protein interactions in situ. **Nature Methods** 8, i–ii (2011). doi: 10.1038/nmeth.f.351;
- CHUA, X. Y., ABALLO, T., ELNEMER, W., TRAN, M. & SALOMON, A. Quantitative Interactomics of Lck-TurboID in Living Human T Cells Unveils T Cell Receptor Stimulation-Induced Proximal Lck Interactors. **Journal of Proteome Research** 20 (1): 715–726 (2021). doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00616.