

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA COSTA DE AZEVEDO

INVESTIGAÇÃO DA DEUBIQUITINASE USP2b COMO UM POSSÍVEL
ESTABILIZADOR DO RECEPTOR DE EGF

CURITIBA

2019

JULIANA COSTA DE AZEVEDO

INVESTIGAÇÃO DA DEUBIQUITINASE USP2b COMO UM POSSÍVEL
ESTABILIZADOR DO RECEPTOR DE EGF

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Azevedo, Juliana Costa de

Investigação da deubiquitinase USP2b como um possível estabilizador do receptor de EGF. / Alessandra Luisa Kosiol. – Curitiba, 2019.
60 p.: il.

Orientador: Silvio Marques Zanata

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Enzimas 2. Ubiquitina 3. Homeostase 4. Endocitose 5. Apoptose I.
Título II. Zanata, Silvio Marques III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 572.7



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de JULIANA COSTA DE AZEVEDO intitulada: **INVESTIGAÇÃO DA DEUBIQUITINASE USP2b COMO UM POSSÍVEL ESTABILIZADOR DO RECEPTOR DE EGF**, sob orientação do Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Setembro de 2019.

SILVIO MARQUES ZANATA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

JULIANA FERREIRA DE MOURA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador Silvio Marques Zanata pelo apoio e compreensão que permitiram a finalização deste trabalho.

Aos meus colegas do LNB, em especial a Giovana, Silvia e Soraia na condução dos experimentos, e a Ingrid por sempre ser prestativa quando precisava de ajuda no laboratório e nos experimentos.

Ao Fábio e a todos os técnicos por todo suporte e apoio com preparo de materiais.

À equipe da Imunova pelos auxílios e pela amizade.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR por todo o suporte.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite do convite.

Aos órgãos de fomento, CAPES e Fundação Araucária pela bolsa e financiamento deste projeto.

Aos colegas e equipe do SIF2518 pelos novos ensinamentos e suporte nessa nova fase profissional.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização e finalização deste trabalho, permitindo minha formação e desenvolvimento profissional.

RESUMO

A degradação seletiva de muitas proteínas intracelulares é realizada pela via ubiquitina, responsável por mecanismos homeostáticos celulares como a regulação de vias de sinalização, endocitose e apoptose. Este processo é reversível e regulado negativamente pelas enzimas deubiquitinases (DUB), dentre as quais a família USP (ubiquitin specific protease) possui grande importância no papel funcional da proliferação e sobrevivência celular. Alterações na via ubiquitina são descritas em condições patológicas, devido a ocorrência de danos em proteínas celulares, acúmulo intracelular proteico e redução da atividade proteossômica, podendo resultar em supressão da apoptose e progressão descontrolada do ciclo celular e suas diversas sinalizações. Dentre as isoformas de USP2, a USP2a tem sido amplamente associada à patogenia de tumores, seja por sua interferência em proteínas do ciclo celular, oncoproteínas, e na via de degradação de receptores tirosina cinase, como o EGFR (receptor de fator de crescimento epidermal). Por outro lado, existem poucos estudos relacionados à caracterização de USP2b, que poderiam identificar sua possível interferência em processos patológicos. Deste modo, o objetivo foi construir ferramentas e estabelecer condições experimentais para a investigação bioquímica das deubiquitinases USP2a e USP2b. USP2b recombinante com cauda de histidina foi produzida em bactérias *E. coli* Rosetta2(DE3) pLysS e submetida a protocolos de purificação. Embora sem desfecho positivo na expressão da USP2b nas condições citadas, obteve-se com sucesso a expressão de USP2a e USP2b em células de mamíferos (HeLa/HEK293T) utilizando-se diferentes métodos de transfecção (lipofectamina e co-precipitação com cálcio), possibilitando a identificação de picos de expressão conforme a metodologia aplicada. Experimentos permitiram a identificação de USP2a endógena enriquecida na fração 30% de saturação de sulfato de amônio. Além disso, o anticorpo monoclonal anti-USP2a secretado pelo hibridoma 4GD2, previamente elaborado pelo grupo, permitiu a imunoprecipitação de USP2a tanto endogenamente expressa por células HeLa como superexpressa na linhagem HEK293T. Evidências experimentais obtidas neste trabalho sugerem que a USP2b tem a capacidade de estabilizar EGFR, de modo semelhante ao já descrito para a isoforma USP2a. Espera-se que os resultados gerados possam contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas e diagnósticas bem como no mecanismo de funcionamento destas deubiquitinases.

Palavras-chave: Enzimas deubiquitinases. USP2. USP2a. USP2b. EGFR. EGF.

ABSTRACT

Selective degradation of many intracellular proteins is performed by ubiquitin pathway, which is responsible for cellular homeostatic mechanisms, such as regulation of cellular signaling, endocytosis and apoptosis. Ubiquitylating modification is reversible, negatively regulated by deubiquitinases enzymes (DUB), among which the USP family (ubiquitin specific protease) has great importance in the functional role of cell proliferation and survival. Disturbance on ubiquitin pathway are described under pathological conditions, due to cellular proteins damage, intracellular protein accumulation and reduction of proteasomic activity, may causing apoptosis suppression, and uncontrolled cell cycle and its several signals. Among USP2 isoforms, USP2a has been widely associated in tumor pathogenesis, whether by their interference with cell cycle proteins, oncoproteins, and on tyrosine kinase receptor degradation pathway, such as EGFR (epidermal growth factor receptor). Meanwhile, there are few studies on USP2b characterization, that could recognize its possible inference in pathological processes. Therefore, the aim of this study was to create tools and establish experimental conditions for deubiquitinases USP2a and USP2b biochemical investigation. Recombinant USP2b with histidine tail was produced in *E. coli* Rosetta2(DE3) pLysS bacteria for purification protocols, however, not resulting on the expected expression. USP2a and USP2b expression in mammalian cells (HeLa/HEK293T) was successfully obtained by different transfection methods (lipofectamine and calcium co-precipitation), enabling identification of expression peaks according to the methodology applied. Experiments allowed identification of endogenous USP2a enriched in the fraction of 30% ammonium sulfate saturation. Also, anti-USP2a monoclonal antibody secreted by 4GD2 hybridoma, previously obtained by the group, allowed USP2a immunoprecipitation at HeLa cells endogenously expression, and on HEK293T at overexpression conditions. Experimental evidences of this study suggest that USP2b has the ability to stabilize EGFR, in a similar manner already described in USP2a isoform. The obtained results are expected to contribute to new therapeutic and diagnostic tools development, as well as the functioning mechanism of these deubiquitinases.

Keywords: Deubiquitinases enzymes. USP2. USP2a. USP2b. EGFR. EGF.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – VIA DE MODIFICAÇÃO POR UBIQUITINA	17
FIGURA 2 – DIFERENTES MODIFICAÇÕES POR UBIQUITINA E SUAS FUNÇÕES.....	24
FIGURA 3 – MODELO PROPOSTO DA ESTABILIZAÇÃO DE EGFR POR USP2a.....	27
FIGURA 4 – TESTES DE EXPRESSÃO DE USP2b EM COLÔNIAS SELECIONADAS DE <i>E. coli</i> Rosetta2 (DE3) pLysS COM INDUÇÃO DE 0,5mM DE IPTG A 37°C POR 5h EM MEIO LB.....	37
FIGURA 5 – EXPRESSÃO DE USP2b EM COLÔNIAS SELECIONADAS DE <i>E. coli</i> Rosetta2 (DE3) pLysS COM INDUÇÃO DE 0,5mM DE IPTG A 37°C POR 5h EM MEIO LB.....	38
FIGURA 6 – EXPRESSÃO DE USP2b E USP2a EM CÉLULAS HeLa	40
FIGURA 7 – USP2a ESTÁ ENRIQUECIDA NAS FRAÇÕES 30-45% DE SATURAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO.....	42
FIGURA 8 – ANTICORPO MONOCLONAL 4GD2 IMUNOPRECIPITA USP2a ENDOGENA EXPRESSA NA LINHAGEM HeLa.....	43
FIGURA 9 – USP2a-HA É ESPECIFICAMENTE IMUNOPRECIPITADA NA LINHAGEM HEK293T TRANSFECTADA COM O VETOR pBABE-USP2a.....	44
FIGURA 10 – AS ISOFORMAS USP2a e USP2b ESTABILIZAM O RECEPTOR DE EGF NA PRESENÇA DO SEU LIGANTE	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADOS DE TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS HEK293T E HeLa COM VETORES DE USP2a e USP2b.....	41
--	----

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

aa	–	aminoácidos
AMSH	–	<i>Associated molecule with SH3 domain of STAM</i>
D.O.	–	Densidade óptica
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
DUB	–	Enzimas deubiquitinases
<i>E. coli</i>	–	<i>Escherichia coli</i>
EGF	–	Fator de crescimento epidermal
EGFR	–	Receptor de fator de crescimento epidermal
GFP	–	<i>Green fluorescent protein</i>
Ig	–	Imunoglobulina
IPTG	–	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
LB	–	Meio luria-bertani
mRNA	–	RNA mensageiro
MVB	–	<i>Multivesicular body</i>
Ni	–	Níquel
NTA	–	Ácido nitrilotriacético
PBS	–	<i>Phosphate buffer saline</i>
siRNA	–	small interfering RNA
PVDF	–	Polivinilideno difluorado
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
RNA	–	Ácido ribonucléico
RTK	–	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
tRNA	–	RNA transportador
USP	–	<i>Ubiquitin-specific proteases</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.2	OBJETIVOS	14
1.2.1	Objetivo geral	14
1.2.2	Objetivos específicos.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	SISTEMA UBIQUITINA	16
2.2	VIA DE DEGRADAÇÃO ENDOCÍTICA DOS RTK.....	19
2.3	VIA DE DEGRADAÇÃO ENDOCÍTICA DO EGFR.....	21
2.4	RELAÇÃO DAS DUB NA DEGRADAÇÃO DE EGRF	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	EXPRESSÃO DE USP2b EM BACTÉRIAS	28
3.1.1	Protocolo de mini-expressão	28
3.1.2	Teste de solubilidade e protocolo de purificação	29
3.1.3	Protocolo de purificação de USP2b	30
3.2	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE USP2a E USP2b EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	31
3.3	CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI- USP2a (CLONE 4GD2)	33
3.3.1	Ensaio de imunoprecipitação.....	33
3.3.2	Enriquecimento de proteínas através de precipitação sequencial com sulfato de amônio saturado (<i>salting out</i>).....	34
3.4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE USP2a E USP2b NA VIA DE DEGRADAÇÃO DE EGFR	34
4	RESULTADOS.....	36
4.1	EXPRESSÃO DE USP2b EM BACTÉRIAS	36
4.2	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE USP2a E USP2b <i>IN</i> <i>VITRO</i>	38

4.3	CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DO ANTICORPO MONOCLONAL anti-USP2a (CLONE 4GD2)	41
4.4	AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DE USP2a E USP2b NA VIA DE DEGRADAÇÃO DE EGFR	45
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A degradação seletiva de muitas proteínas intracelulares em eucariotos é realizada pela via ubiquitina, responsável por vários mecanismos homeostáticos celulares. Dentre eles, a sinalização de proteínas para degradação por proteossomos ou lisossomos, e demais funções essenciais no ciclo celular, como a regulação de endocitose e apoptose (DOWNES et al., 2005; HOCHSTRASSER, 2009) são alguns exemplos.

Ubiquitinação é um processo reversível, e atua como sinalizador importante ao direcionar a localização, o destino e a interação entre proteínas (HAGLUND; DIKIC, 2005). Enzimas deubiquitinases (DUBs) são proteases capazes de remover ou remodelar a ubiquitina ou suas cadeias, permitindo um equilíbrio no processo de ubiquitinação (REYES-TURCU; VENTII; WILKINSON, 2009).

Entre as DUBs, destaca-se a família USP, no qual USP2 possui papel importante na proliferação e sobrevivência celular, regulando proteínas essenciais para a progressão celular (SHEN et al., 2013). O gene *usp2* têm três formas de processamento alternativo de RNA, resultando em diferentes isoformas de USP2, como USP2a, USP2b e USP2c (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998; GOUSSEVA; BAKER, 2003; YE; RAPE, 2009).

A função de USP2 no contexto da fisiologia normal das células ainda está sendo investigada, entretanto sua expressão alterada pode resultar em condições patológicas, caracterizadas pelo aumento de danos em proteínas celulares, acúmulo intracelular proteico e redução da atividade proteossômica (PRIOLO et al., 2009; SCHMIDT; FINLEY, 2014). Como exemplo, ocorrem em neoplasias, quando geralmente observa-se uma superexpressão ou hiperativação de proteínas capazes de promover uma progressão descontrolada na via do ciclo celular ou supressão da apoptose (JOHNSON, 2015).

Neste contexto, já foi observado a relação da USP2a em vários tipos de câncer por sua interação com proteínas específicas envolvidas em várias fases do ciclo celular, demais oncoproteínas (GRANER et al., 2004; STEVENSON et al., 2007; ALLENDE-VEGA et al., 2010; JEONG et al., 2015), e na via de degradação de EGFR (LIU et al., 2013; McCANN et al., 2016; SAVIO et al., 2016).

O EGFR é responsável pela regulação de processos fisiológicos de proliferação celular, diferenciação e sobrevivência celular (SCHLESSINGER, 2000).

Sua endocitose é consequência normal da ativação do receptor, sendo essencial para regulação de sua sinalização (BURKE; SCHOOLER; WILEY, 2001). Entretanto, existem diversos complexos proteicos ao longo da via endocítica capazes de interagir e modular a endocitose dos receptores (GLAGUE; URBE, 2006). Dentre esses complexos, destaca-se o papel da ubiquitina, que atua como sinal de direcionamento das proteínas da superfície celular internalizadas, direcionando-as para a degradação lisossomal e, conseqüentemente, atuando como regulador negativo de sua sinalização (KATZMANN; ODORIZZI; EMR, 2002).

Existem diferentes DUBs capazes de interferir na endocitose de EGFR por diferentes mecanismos (SAVIO et al., 2016), influenciando positiva ou negativamente neste processo (McCANN et al., 2016). A relação de USP2 na via de degradação do EGFR já foi previamente estudada por nosso grupo, observando a interferência da USP2a como regulador negativo da degradação deste receptor (LIU et al., 2013), entretanto, desconhece-se a função da isoforma USP2b nesse processo.

Apesar dos grandes esforços no desenvolvimento de inibidores de USP2, nenhum composto tem comprovado efeitos clínicos específicos e altamente eficazes (D'ARCY; WANG; LINDER, 2015). Esforços têm sido feitos para obtenção de proteínas recombinantes USP2, sendo obtido com sucesso a expressão da USP2a em bactérias e células de mamíferos por nosso grupo. Entretanto, a isoforma USP2b ainda carece de informações sobre sua expressão, cinética e demais características, como forma de contribuir na compreensão contextualizada da função destas proteínas em situações fisiológicas normais e patológicas, para futuramente inferir tais produtos no desenvolvimento de ferramentas terapêuticas e diagnósticas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Construir ferramentas e estabelecer condições experimentais para a investigação bioquímica das deubiquitinases USP2a e USP2b.

1.2.2 Objetivos específicos

- Expressão e obtenção de USP2b recombinante em bactérias;

- Caracterização adicional do anticorpo monoclonal anti-USP2a secretado pelo hibridoma 4GD2;
- Avaliação da cinética de expressão de USP2a e USP2b em sistema de células de mamíferos;
- Avaliação da estabilização de EGFR em condições de superexpressão de USP2b.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SISTEMA UBIQUITINA

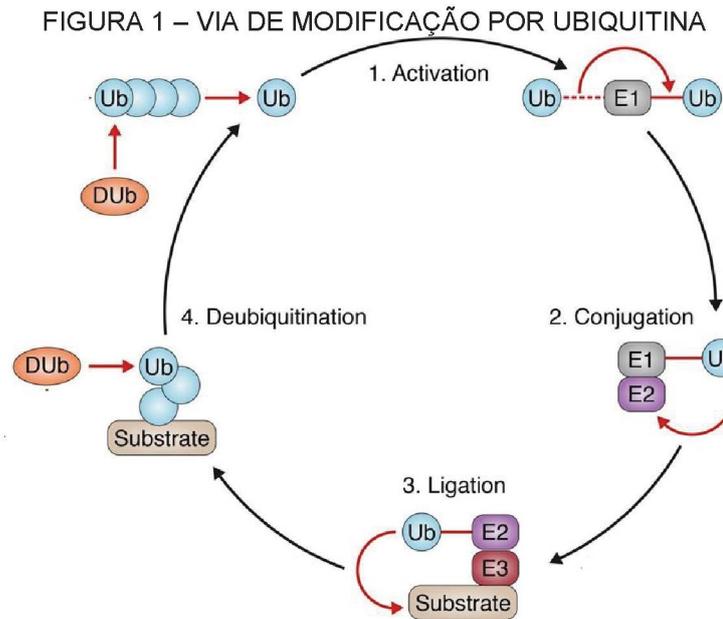
A degradação seletiva de muitas proteínas intracelulares e da membrana plasmática em células eucariotas é realizada pela via ubiquitina. Processo dinâmico no qual a ubiquitina, um polipeptídeo de 76 aminoácidos altamente conservado, se liga a proteínas para promover seu direcionamento de degradação proteossômica ou lisossomal. Esta via é responsável por funções essenciais no controle e progressão do ciclo celular, como na sinalização de transdução, transcrição, regulação da endocitose e apoptose, assim como no reparo de DNA e complexos proteicos (HOCHSTRASSER, 2009; HUANG; D'ANDREA, 2006).

A ligação ubiquitina-substrato (ubiquitinação) ocorre por meio da ação de uma cascata enzimática, resultando na conjugação da região C-terminal da ubiquitina ao resíduo de lisina na proteína alvo. Neste processo, há envolvimento de enzimas ativadoras (E1), conjugadoras (E2) e ubiquitina-ligases (E3), sendo estas últimas responsáveis pelo reconhecimento e especificidade da ligação (JOHNSON, 2015).

Ubiquitinação é uma modificação pós-traducional reversível, e a regulação desta via é particularmente importante. A ubiquitina atua como sinalizador específico de ativação de funções celulares (por exemplo, na degradação ou tráfego intracelular), enquanto as DUBs servem como reguladores negativos, por remover a ubiquitina de seus substratos, e então, impedir o seu processo de degradação ou modificar sua rota de direcionamento intracelular (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998).

Enzimas deubiquitinases desempenham funções importantes em diversos processos celulares, incluindo: regulação da degradação proteossômica, regulação no ciclo celular, reparo de DNA danificado, ativação de enzimas cinases, e endocitose (REYES-TURCU; VENTII; WILKINSON, 2009). Alterações na via de degradação por deubiquitinases podem resultar em condições patológicas, como câncer, doenças neurodegenerativas e desordens metabólicas (SCHMIDT; FINLEY, 2014).

A ubiquitinação e o destino de proteínas alvo são, portanto, resultados da ação de enzimas ubiquitina-ligases e deubiquitinases, nos quais uma infinidade já foi identificada, sendo o desafio atual identificar seus alvos associados (ROUGIER et al., 2015).



FONTE: Adaptado de HEATON; BORG; DIXIT (2016).

NOTA: Ubiquitina (Ub) se liga a proteína alvo (substrate) por meio da cascata formada pelas enzimas ativadoras (E1), conjugadoras (E2) e ubiquitina-ligases (E3). Enquanto as enzimas deubiquitinases (DUB) remodelam as modificações de ubiquitina, antagonizando os efeitos funcionais da ubiquitina.

O genoma humano codifica aproximadamente 100 DUBs que são classificadas em cinco famílias de acordo com os seus domínios catalíticos: cisteína ou zinco (NIJMAN et al., 2005). A existência de muitas enzimas deubiquitinases distribuídas em famílias sugere um alto grau de especificidade de substratos (REYES-TURCU; VENTII; WILKINSON, 2009).

Dentre essas famílias, a USP é uma das maiores e mais distintas famílias do tipo cisteíno proteases, possuindo cerca de 56 enzimas que apresentam duas regiões altamente conservadas em seu sítio catalítico: Cys-box e His-box (YE; RAPE, 2009; SHEN et al., 2013). Enzimas do grupo USP têm uma diversidade de funções regulatórias de processos biológicos, como controle do ciclo celular, reparo do DNA, remodelamento da cromatina, e nas várias vias de sinalização alterada em neoplasias (HOELLER; DIKIC, 2009).

Dentre as várias isoformas de USP2, pelo menos três são resultantes do processamento alternativo de RNA: USP2-69 (USP2a), USP2-45 (USP2b), e USP241 (USP2c), compartilhando similaridades de sítio catalítico mas com diferenças nas extensões N-terminais, sendo produzidas proteínas de 69 kDa, 45 kDa e 41 kDa, respectivamente (GOUSSEVA; BAKER, 2003).

As isoformas USP2a e USP2b, apesar de possuírem o mesmo sítio catalítico, apresentam diferenças nos seus domínios N-terminais, que podem então estar

envolvidos na sua especificidade. Além disso, USP2a possui um domínio N-terminal mais longo, que possivelmente pode regular sua localização subcelular ou atuar como domínio auto inibitório (OBERFELD et al., 2011).

De fato, DUBs contêm inserções e extensões nas regiões N- ou C-terminais que participam nas etapas de reconhecimento do substrato, em suas interações com proteínas, e na localização celular e atividade catalítica da DUB. Dessas extensões, existem os domínios de interação da proteína com o substrato ou seus adaptadores; e domínios de ligação da ubiquitina, que podem atuar no reconhecimento da ubiquitina e suas cadeias. Por isso, algumas DUBs possuem capacidade de reconhecer as ligações de cadeias poli-ubiquitinadas, ou diretamente a própria proteína ubiquitinada (REYES-TURCU; VENTII; WILKINSON, 2009).

De acordo com RENATUS et al. (2006), USP2 e ubiquitina possuem a capacidade de formar um complexo de possível alta seletividade para os substratos ligados com ubiquitina.

Em comparação com USP2b e USP2c, a função da USP2a foi estudada extensivamente (ZHANG et al., 2014), principalmente na patogênia de tumores. A relação de USP2a com propriedades oncogênicas já foi demonstrada em vários tipos de câncer (por exemplo, próstata, pulmão e bexiga) devido à interação com proteínas específicas envolvidas em várias fases do ciclo celular, como FASN, Mdm2, MdmX e demais oncoproteínas relevantes que são utilizadas como substratos (GRANER et al., 2004; STEVENSON et al., 2007; ALLENDE-VEGA et al., 2010; JEONG et al., 2015).

A relação USP2a-EGFR avaliada pelo nosso grupo também demonstrou a interferência em tumores de células não-pequenas do câncer de pulmão, no qual a superexpressão de USP2a promove alteração na regulação negativa do receptor por endocitose, resultando na reciclagem da forma ativa do receptor EGFR, o qual é associado com carcinogênese. Portanto, USP2a antagoniza a endocitose de EGFR e amplifica a atividade de sinalização do receptor (LIU et al., 2013).

Estudos com a isoforma USP2b relataram sua interação em diversos processos, como: na deubiquitinação de canais de sódio epiteliais (EnaC) do rim, responsáveis pela homeostasia e controle da pressão sanguínea (OBERFELD et al., 2011); na deubiquitinação em canais de cálcio voltagem dependentes da membrana plasmática, responsáveis pela homeostasia celular de cálcio (ROUGIER et al., 2015); na regulação de complexos do ciclo circadiano (SCOMA et al., 2011); na regulação negativa de produção de interferon em infecções virais (ZHANG et al., 2014); no

balanço de sódio no organismo por meio do direcionamento do receptor de mineralocorticóide para degradação (FARESSE; DEBONNEVILLE; STAUB, 2013); e na regulação circadiana de glicose no fígado, mantendo homeostasia de glicose plasmática (MOLUSKY et al., 2012).

Previamente, nosso laboratório desenvolveu projetos que permitiram a clonagem e expressão com sucesso da isoforma USP2a e a geração de hibridomas específicos para esta isoforma (ROCHA, 2016). Entretanto, não há anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis que sejam capazes de distinguir as isoformas USP2a e USP2b.

Além disso, uma vez que ainda não foi estabelecido se a USP2b (USP2-45) poderia ter propriedades oncogênicas, a produção de anticorpos monoclonais para esta proteína certamente será fundamental para compreender seu papel no estabelecimento do fenótipo tumoral e sua possível relação na endocitose de receptores, como o EGFR.

2.2 VIA DE DEGRADAÇÃO ENDOCÍTICA DOS RTK

Fatores de crescimento são ativados por receptores tirosina-kinases (RTK) na superfície celular, o complexo formado EGF-EGFR são rapidamente internalizados por endocitose e desencadeando a sinalização do crescimento e proliferação celular (MIZUNO et al., 2005). A endocitose é, portanto, a principal via de regulação da sinalização de processos de transdução iniciados por RTK (GOH; SORKIN, 2013), permitindo a interação dos receptores com moléculas de sinalização e, conseqüentemente, respondendo aos estímulos extracelulares, sendo sua sinalização regulada pela reciclagem ou degradação de seus receptores (DOHERTY; MCMAHON, 2009).

A intensidade, duração e especificidade da transdução de sinal de RTK são reguladas pela via endocítica sendo que, após a sua rápida internalização, estes receptores são direcionados para degradação intracelular via endossomos e, conseqüentemente, permitindo uma regulação negativa da sinalização (DIKIC; GIORDANO, 2003).

Os endossomos compreendem um sistema de compartimentos heterogêneos, sendo geralmente caracterizados como 'iniciais' ou 'tardios' dependendo da cinética de seus compartimentos carregados com o material

endocitado. Esses endossomos também se diferenciam por sua morfologia, sendo que os iniciais tendem a ser tubulares e localizados na periferia celular, enquanto os endossomos tardios são mais esféricos e localizados principalmente próximos ao núcleo (MARMOR; YARDEN, 2004).

A internalização dos RTK ativados com seus ligantes pode ocorrer por invaginações da membrana plasmática dependente ou independente de clatrina. Ambas as formas destinam proteínas da superfície celular para os endossomos iniciais, sendo a endocitose mediada por clatrina a principal e a mais rápida via de internalização de RTK e seus ligantes (GOH; SORKIN, 2013).

Na via dependente de clatrina, as invaginações da membrana são transportadas para os endossomos iniciais, que procedem a um processo de maturação e fusão com um subconjunto de endossomos tardios. A segregação em endossomos tardios envolve invaginação da membrana limitante do lúmen, formando vesículas internas conhecidas como corpos multivesiculares (MVB). O MVB eventualmente se funde com o lisossoma, destinando o conteúdo interno de suas vesículas para a degradação por enzimas hidrolíticas no lisossoma (KATZMANN; ODORIZZI; EMR, 2002; MARMOR; YARDEN, 2004).

Nesta via de degradação endocítica, os endossomos iniciais atuam como ponto de classificação dos receptores endocitados, para serem reciclados ou destinados a degradação lisossomal (CLAGUE; LIU; URBÉ, 2012). Da mesma forma que os RTK localizados na membrana de endossomos iniciais, os que se localizam nas membranas dos MVBs também podem ser reciclados para a superfície celular, enquanto os RTK já internalizados nas vesículas intraluminais dos MVBs são incapazes de serem reciclados, permanecendo nas MVBs para maturação em endossomos tardios (GOH; SORKIN, 2013).

Entretanto, a internalização constitutiva é muito mais demorada do que a reciclagem dos endossomos para a superfície celular, desta forma, os RTK se acumulam na superfície celular, permitindo maior acesso aos seus ligantes extracelulares. E as taxas de internalização, reciclagem e degradação determinam a meia-vida de uma RTK, variando com a sua natureza e tipo celular, mas normalmente se correlaciona positivamente com o seu nível de expressão (GOH; SORKIN, 2013).

Neste sentido, o direcionamento de RTK para degradação lisossomal determina crucialmente a duração da sinalização dos fatores de crescimento

(FUTTER et al., 1996), sendo determinante para o término da sinalização para proliferação celular exacerbada das células (MIZUNO et al., 2005).

A ubiquitinação atua como sinal de direcionamento de endossomas iniciais para lisossomas, atuando como regulador negativo da sinalização de proteínas da superfície celular (KATZMANN; ODORIZZI; EMR, 2002; MARMOR; YARDEN, 2004). De acordo com GRUENBERG (2001), os receptores endocitados não ubiquitinados escapam à incorporação nas vesículas de MVB e retornam à superfície celular por meio da reciclagem dos endossomos.

A incorporação da ubiquitina é mediada pela enzima c-Cbl, que é um tipo de ubiquitina ligase (E3), que interage com proteínas levando a ubiquitinação de RTK em múltiplos resíduos de lisina (HAGLUND et al., 2003). A ubiquitinação de muitos receptores e canais iônicos resulta na sua endocitose e degradação, mas até que elas sejam incorporadas às vesículas invaginadas do lúmen de MVBs, o destino desses receptores pode ser revertido por meio da ação de DUBs (McCANN et al., 2016).

Enzimas DUBs são capazes de remover a ubiquitinação, e são descritas em diferentes processos biológicos, tais como reciclagem de proteínas ubiquitinadas que são direcionadas para degradação proteassomal ou lisossomal; ou na alternância de cadeias poli- para monoubiquitinadas (AMERIK; HOCHSTRASSER, 2004).

A endocitose e sua consequente degradação de receptores e canais iônicos precisam ser rigidamente controlados a fim de evitar sinalização exacerbada e seu possível potencial patológico. O papel das DUBs na regulação de endocitose, na classificação endossomal e na degradação do receptor foram amplamente estudadas na última década, entretanto, ainda há outras questões a serem estudadas, em especial, sua implicação exata na regulação deste processo (McCANN et al., 2016).

2.3 VIA DE DEGRADAÇÃO ENDOCÍTICA DO EGFR

O EGFR é um RTK responsável pela regulação de processos fisiológicos de proliferação celular, diferenciação e sobrevivência celular (SCHLESSINGER, 2000). Entretanto, sua atividade anormal como superexpressão de EGFR, mutação ou defeitos na regulação negativa do receptor podem prolongar a sua sinalização, resultando em crescimento ou desenvolvimento celular anormal (KATZMANN; ODORIZZI; EMR, 2002), podendo influenciar na formação de células tumorais e contribuindo para sua malignidade (MELLINGHOFF; CLOUGHESY; MISCHERL, 2007).

O EGF, seu ligante, é um peptídeo secretado que estimula o crescimento e divisão celular por meio da ligação e ativação de seu receptor EGFR na membrana plasmática, que por sua vez, recruta e fosforila moléculas sinalizadoras intracelulares (KATZMANN; BABST; EMR, 2001).

Uma vez que o EGFR é ativado, o complexo formado com seu ligante passa por diversas modificações estruturais e bioquímicas, seja por efeitos alostéricos, pela fosforilação da tirosina (VAN DER GEER; HUNTER; LINDBERG, 1994; KOVACS et al., 2015) e ubiquitinação, levando ao recrutamento de moléculas adicionais de sinalização e ativando sua regulação negativa via endocitose (LEVKOWITZ et al., 1998).

Dependendo da dose de EGF, o EGFR-EGF pode ser internalizado por vias dependentes ou independente de clatrina, os quais estão associados a resultados distintos de sinalização. A via dependente de clatrina é ativada por baixas concentrações de EGF e é crucial para manter a sinalização do EGFR, enquanto a via independente de clatrina é essencial para a degradação de EGFR em altas concentrações (CONTE; SIGISMUND, 2017).

Portanto, quando há acúmulo suficiente de EGFR ativado na superfície celular, há saturação da via dependente de clatrina, e então, o conjunto de receptores ativados são internalizados pelas vias de internalização independentes de clatrina (SIGISMUND et al., 2005). Desta forma, em condições de alta ativação do receptor por altas doses de EGF, a ativação de internalização por vias independentes de clatrina protege as células da superestimulação (SIGISMUND et al., 2008).

Por outro lado, na ausência do seu ligante, os complexos são endocitados e os receptores reciclados de volta à superfície celular, mas não especificamente recrutados para invaginações revestidas com clatrina (MELKER et al., 2001).

Na via de degradação por endocitose, o complexo formado EGF-EGFR é conduzido por uma série de compartimentos endossomais, dos endossomos iniciais ao destino final de degradação lisossômica, determinado por meio da fusão de proteínas nos MVBs com os lisossomos pré-existentes (KATZMANN; ODORIZZI; EMR, 2002).

Os EGFR internalizados ainda podem associar-se a proteínas de sinalização para ativar efetores intracelulares, entretanto, quando essas proteínas alcançam os MVB resultam na segregação do domínio citoplasmático do seu receptor, encerrando a sinalização (MARMOR; YARDEN, 2004).

Este processo de degradação endocítica resulta na regulação negativa do receptor e sua sinalização, conseqüentemente, falhas nessa regulação podem prolongar a sinalização do fator de crescimento. Desta forma, a regulação negativa do EGFR é uma etapa fundamental para garantir a correta sinalização celular (KATZMANN; BABST; EMR, 2001). Sendo a duração, intensidade e especificidade do processo de sinalização diretamente influenciada pela sua via de degradação (SORKIN; ZASTROW, 2002). E embora a degradação seja o destino final dos receptores internalizados, a taxa de degradação é muito mais lenta do que sua taxa de internalização (BURKE; SCHOOLER; WILEY, 2001).

Na sinalização para degradação lisossomal, alguns efetores possuem função essencial, como a ubiquitinação do EGFR, que refere-se à conjugação da ubiquitina ao grupo 3-amino de um resíduo de lisina ao substrato EGF pela enzima E3 ubiquitina (Ub) ligase (c-Cbl) (LEVKOWITZ et al., 1998).

De acordo com o modelo proposto de MELKER et al. (2001), a ubiquitinação mediada por c-Cbl auxilia o recrutamento de EGFR ativado para as invaginações revestidas por clatrina, e então aumentando a internalização do complexo por endocitose e posteriormente direcionado para o lisossoma juntamente com o EGFR.

Proteínas podem ser modificadas em um único ou em múltiplos resíduos de lisina, por uma única ubiquitina ou por oligômeros de ubiquitina. Variações de comprimento e configuração da ubiquitina ou de sua(s) cadeia(s) são determinantes no destino da proteína alvo (PICKART, 2001; KOMANDER; RAPE, 2012).

As proteínas podem ser ligadas a um único resíduo de ubiquitina (monoubiquitinação), por múltiplos resíduos individuais (multiubiquitinação), ou por cadeias de cadeias de quatro ou mais ubiquitinas (poliubiquitinação) (MARMOR; YARDEN, 2004) formadas pela ligação de múltiplas ubiquitinas entre si através dos seus N-terminais (cadeia linear) ou em um dos seus resíduos de lisina (K): K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63 (KOMANDER; RAPE, 2012).

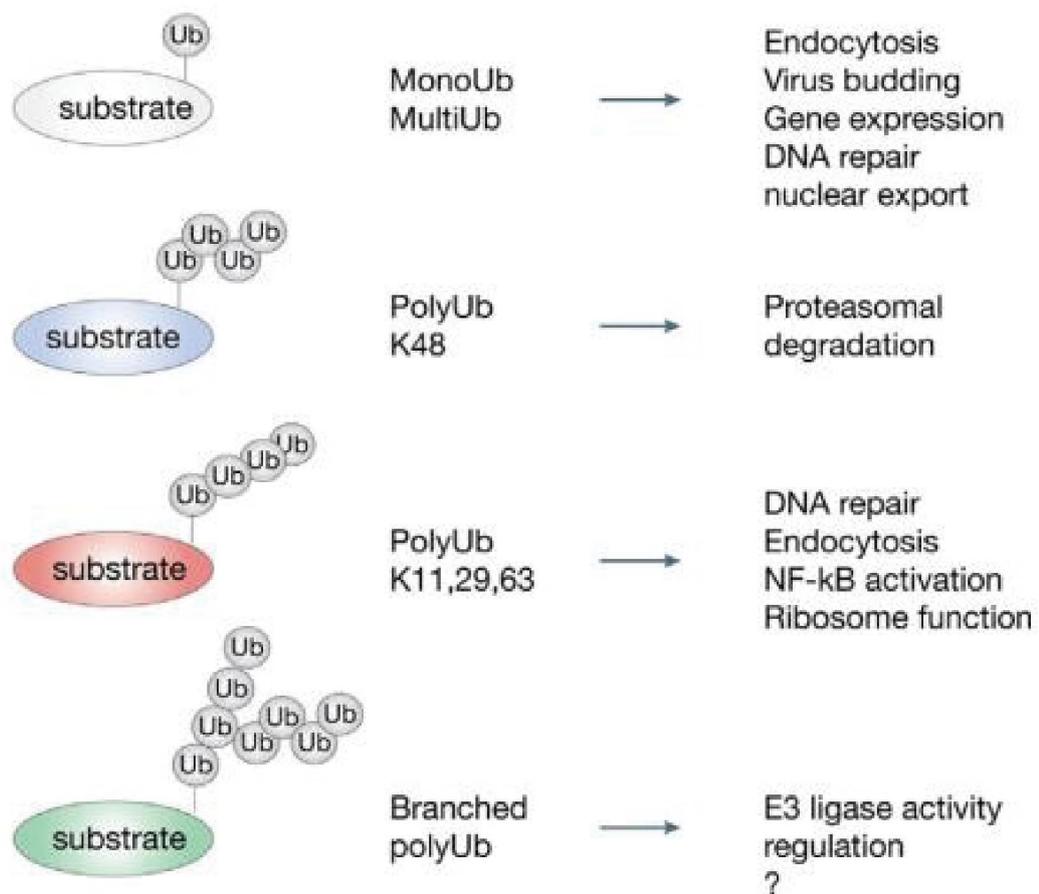
Proteínas mono e multiubiquitinadas são tipicamente marcadas para endocitose e degradação lisossomal (PICKART, 2001). E proteínas poliubiquitinadas em K48 são seletivamente marcadas para degradação por proteossomos, enquanto K63 é descrita nos processos de sinalização celular (FIGURA 1) (HAGLUND; DIKIC, 2005, WOELK et al., 2007).

A ação da enzima c-Cbl resulta na monoubiquitinação de EGFR em múltiplos sítios de lisina quando estimulados por EGF durante o processo de internalização

endocítica dependente de clatrina (HAGLUND et al., 2003), entretanto, a mudança para a via independente de clatrina é dependente da poliubiquitinação do receptor por meio de sua ligação estável com a enzima (POLO; DI FIORE; SIGISMUND, 2014).

A monoubiquitinação de uma proteína de superfície celular indica ser importante para sua internalização por endocitose, sendo suas etapas subsequentes de tráfego endossomal também dependentes dessa ligação. Da mesma forma, a internalização de alguns substratos é auxiliada pela ligação de ubiquitina na forma de monômeros ou cadeias curtas ligadas em K63. Entretanto, o ponto mais dependente de ubiquitina após a endocitose é a classificação de proteínas na fase de maturação dos endossomos tardios e MVB (KATZMANN; ODORIZZI; EMR, 2002).

FIGURA 2 – DIFERENTES MODIFICAÇÕES POR UBIQUITINA E SUAS FUNÇÕES



FONTE: WOELK et al. (2007).

Nota: Representação esquemática das diferentes modificações por ubiquitina e seus respectivos papéis funcionais. O ponto de interrogação indica funções ainda desconhecidas da forma de cadeias ramificadas.

Concordantemente, demais autores observaram que receptores com a adição de cadeias de poliubiquitina ligadas a K63 apresentam potencialização de sua endocitose (LAUWERS; JACOB; ANDRÉ, 2009; HUANG et al., 2013).

Nos estudos com EGFR, esta função da ubiquitinação tem sido controversa, sendo apontada em alguns estudos como não sendo necessária para a internalização de EGFR (HUANG; GOH; SORKIN, 2007), ou dispensável para a endocitose (DUAN et al., 2003). Em outros estudos, relata-se a ligação da ubiquitina como essencial no seu processo de endocitose, sendo implicada tanto na endocitose mediada por ligante (HUANG; D'ANDREA, 2006; KATZAMANN et al., 2002), quanto no direcionamento para a via degradação lisossomal por permitir a invaginação independente de clatrina (SIGISMUND et al., 2008).

Da mesma forma, também têm sido apontadas controvérsias quanto à forma de ubiquitinação de EGFR, sendo descritas formas monoubiquitinadas (HAGLUND et al., 2003; MOSESSON et al., 2003), poliubiquitinadas (HUANG; D'ANDREA, 2006) ou por uma mistura de cadeias mono- e poliubiquitinas (MELKER et al., 2001; LIU et al., 2013).

A ubiquitinação é um processo reversível por meio da ação de enzimas deubiquitinases, que são proteases que invertem a ubiquitinação ou remodelam a cadeia de poliubiquitina das proteínas alvo, podendo ocorrer alteração do seu destino ou modulação de sua atividade, permitindo, portanto, um equilíbrio no processo de ubiquitinação (REYES-TURCU; VENTII; WILKINSON, 2009).

A remoção da ubiquitina de seus conjugados ocorre de forma eficiente pelas DUBs, previamente à chegada das proteínas nos lisossomos (ALWAAN; LEEWEN, 2007). Desta forma, a ação de DUBs, além de atuar como reguladores negativos da proteólise, mantêm taxas fisiológicas de ubiquitina livre na célula por meio de sua reciclagem, e também atuam na modulação do tráfego, sinalização e transdução de sinal de proteínas da membrana plasmática (AMERIK; HOCHSTRASSER, 2004).

De acordo com SAVIO et al. (2016), DUBs podem atuar na via endocítica de EGFR em três níveis diferentes: na internalização, na triagem endossomal e nas MVBs. Na internalização, a ubiquitina influencia a via de entrada; na triagem, o tráfego para o lisossoma ou reciclagem de receptores; e nos MVBs, as deubiquitinases atuam na manutenção de reserva de ubiquitina livre em proteínas direcionadas à degradação lisossomal.

A endocitose e direcionamento lisossômico do EGFR são, portanto, uma consequência normal da ativação do receptor (BURKE; SCHOOLER; WILEY, 2001), sendo reguladas por diversos complexos proteicos ao longo de sua via, os quais possuem capacidade de modular suas etapas do processo (MARMOR; YARDEN, 2004). Como, por exemplo, o estado de ubiquitinação de EGFR que é determinado pelo balanço entre a ubiquitinação e a desubiquitinação (ALWAAN; LEEWEN, 2007; CLAGUE; URBÉ, 2006). Sendo assim, quando há inibição da sua degradação, conseqüentemente haverá aumento de sua sinalização, pois o processo de internalização em si não se constitui como processo de atenuação do seu sinal (BURKE; SCHOOLER; WILEY, 2001).

2.4 RELAÇÃO DAS DUB NA DEGRADAÇÃO DE EGRF

A relação das DUBs na endocitose, internalização e degradação têm sido amplamente estudadas por diversos autores, assim como as deubiquitinasas AMSH, USP8, USP2, USP18, sendo observadas funções tanto de regulação positiva ou negativa como degradação de EGFR (MCCANN et al., 2016).

Um dos estudos mais recentes realizado por Savio et al. (2016) analisou 92 DUBs por meio de triagem de siRNA, e identificou que, pelo menos, 18 possuem a capacidade de afetar a cinética de degradação de EGFR. Sendo observados três fenótipos principais ao nocautear DUBs: taxa de degradação acelerada, lenta ou similar ao controle.

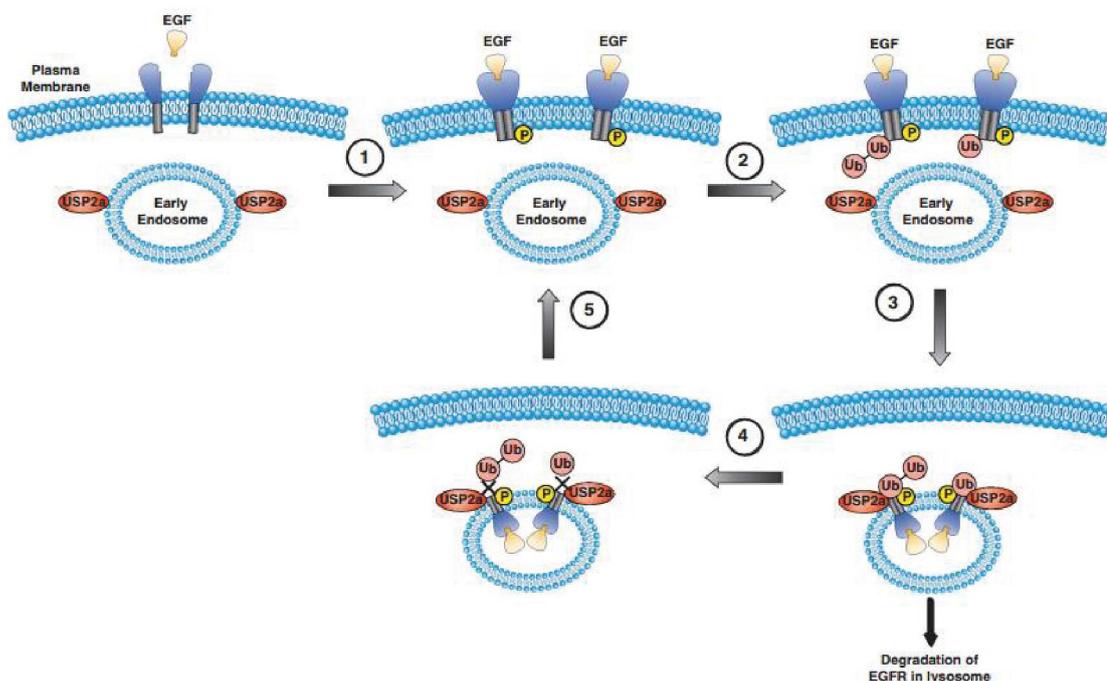
As deubiquitinasas que apresentaram característica de prevenção da regulação negativa de EGFR são AMSH, USP8, USP2a (MCCULLOUGH; CLAGUE; URBÉ, 2004; MIZUNO et al., 2005; LIU et al., 2013). Dentre estas DUBS, AMSH e USP8 apresentam ações controversas em alguns estudos, sendo demonstrado também o seu papel no aumento da regulação negativa de EGFR (MA et al., 2007; ALWAN; LEEWEN, 2007).

Entretanto, o consenso sobre a classificação endossomal sugere que AMSH e USP8, na maioria das vezes, favorecem a incorporação de receptores nas vesículas dos MVBs e conseqüentemente, auxiliam na degradação lisossomal. Sendo que as variações observadas por diferentes grupos sobre essas DUBs na endocitose e degradação de EGFR pode ser resultado das diferenças nos modelos e condições celulares utilizadas em cada estudo (MCCANN et al., 2016).

A relação de USP8 na degradação de EGFR foi observada de forma indireta, por meio da regulação de renovação de proteínas do complexo ESCRT-0, Hrs e STAM (ALWAN; LEEUWEN, 2007). Enquanto a USP18 foi observada como reguladora de EGFR por meio de interferência na tradução de proteínas (DUEX; SORKIN, 2009).

Estudos prévios do nosso grupo com USP2a (LIU et al., 2013) observaram a regulação negativa de degradação de EGFR nos endossomos iniciais, e a reciclagem de receptores ativos por ação da USP2a, observadas por meio de co-localização com Rab11 (marcador de reciclagem de vesículas), impedindo a sua degradação lisossomal. De acordo com o modelo proposto (FIGURA 2), USP2a desencadeia a deubiquitinação de EGFR nos endossomos iniciais, sendo o receptor reciclado para a membrana plasmática ao invés de ser incorporado aos lisossomas, e consequentemente impedindo seu direcionamento para degradação lisossomal.

FIGURA 3 – MODELO PROPOSTO DA ESTABILIZAÇÃO DE EGFR POR USP2a



FONTE: LIU et al. (2013).

Nota: De acordo com o modelo proposto, (1) EGFR localizado na membrana plasmática se liga ao EGF e é dimerizado, (2) o EGFR é ativado por autofosforilação, que por sua vez, estimula a ubiquitinação do receptor. (3) EGFR ubiquitinado é internalizado em endossomos iniciais, onde USP2a se localiza, (4) que por sua vez, estimula a deubiquitinação de EGFR. (5) EGFR deubiquitinado é reciclado de volta para a membrana plasmática, e desta forma, USP2a previne a sua degradação lisossomal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPRESSÃO DE USP2b EM BACTÉRIAS

3.1.1 Protocolo de mini-expressão

Os plasmídeos utilizados nestes experimentos foram previamente elaborados por nosso grupo (ROCHA, 2016). Foi utilizado o vetor pET28a(+) com cauda de histidina contendo o inserto com a sequência completa de USP2b, sequência NM_171997.3, (pET28a(+) + USP2b) para realizar transformação bacteriana em *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLySs eletrocompetentes.

Para obter bactérias eletrocompetentes, foi utilizada a metodologia conforme Sambrook e Russel (2001), preparando previamente alíquotas de 50 µL do cultivo da bactéria desejada, e adição do vetor e posterior eletroporação – ação potencial de 1.40 kV para a introdução do DNA na célula (eletroporador BioRad®). Após os pulsos elétricos induzidos, a alíquota foi adicionada a 1 mL de meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L) para recuperação celular durante 1 h em estufa à 37°C.

Em seguida à incubação, a cultura foi plaqueada em meio sólido LB-Ágar contendo 30 µg/mL de canamicina (antibiótico de resistência do plasmídeo) e cloranfenicol (antibiótico de resistência de *E. coli* Rosetta2 (DE3) e incubada durante a noite à 37° C, para confirmação do crescimento e indução.

Colônias obtidas em meio sólido foram selecionadas para transformação e expressão em pequena escala (mini-expressão), sendo também plaqueadas e incubadas novamente em placas com meio sólido, isoladamente para cada colônia identificada, para fins de armazenamento e identificação destas.

Para realizar a mini-expressão, primeiramente, foram preparados pré-inóculos, nos quais as colônias selecionadas foram inoculadas em frasco com 3 mL de meio LB adicionado de seus antibióticos (12 g/L triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L glicerol, 170 mM KH₂PO₄ e 720 mM K₂HPO₄), e submetidas a incubação sob agitação à 37° C. Posteriormente, os pré-inóculos foram incubados em frascos contendo 10 mL de meio LB seletivo, na proporção 1:50, submetidos a agitação de 210 RPM à 37° C até obtenção de D.O. entre 0,5 e 0,8/600 nm.

Com a obtenção da D.O. desejada, primeiramente foram separadas alíquotas de 1 mL para fins de controle negativo, e então foi adicionado 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) à cultura a qual foi incubada por 3 h à 37° C sob agitação, para a indução da expressão da proteína recombinante.

As culturas foram centrifugadas por rotações e tempos variados, e o sedimento ressuspendido em 100 μ L de tampão de amostra redutor (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0.01% azul de bromofenol) (LAEMMLI, 1970) e aquecido a aproximadamente 95° C por 20 min. Essas amostras foram então preparadas para separação eletroforética por SDS-PAGE e coradas com azul de coomassie para verificar a capacidade da taxa de expressão da proteína recombinante.

3.1.2 Teste de solubilidade e protocolo de purificação

As alíquotas do sedimento (*pellet*) obtidos na etapa anterior foram congeladas em freezer -80° C para realização de testes posteriores de solubilidade e purificação. Primeiramente, para avaliar a produção de proteínas solúveis, foi realizado um experimento utilizando o *pellet*, que foi dissolvido em 2 mL de tampão de lise nativo (500 mM NaH₂PO₄, 0,5 mM NaCl, pH 8,0) sonificado com 5 pulsos de 20 segundos em potência máxima, e então centrifugado a 4.000 x g por 3 min, sendo obtido o sobrenadante nativo e o *pellet*.

O sobrenadante nativo foi adicionado a 50 μ L de Ni-NTA agarose e incubado por 1 h sob constante movimentação à temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugado por 4.000 x g por 3 min, reservando o *void* do supernadante, e o *pellet* formado com a resina lavado de 3 a 4 vezes com PBS, e centrifugado a 4000 RPM por 2 min, descartando os sobrenadantes e obtendo como produto final a resina lavada.

O *pellet* resultante da sonicação, por sua vez, foi dissolvido em 1 mL de tampão de lavagem com 8 M de ureia (8 M de ureia, 150 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄), centrifugado a 4.000 x g por 3 min, desprezando o *pellet* e obtendo o sobrenadante com ureia, o qual foi incubado com resina de Ni-NTA agarose por 1 h sob constante movimentação à temperatura ambiente. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 4000 RPM por 2 min, separando o *void* desnaturante e

armazenando o *pellet* formado com a resina, o qual é lavado de 3 a 4 vezes com PBS, e obtendo como produto final a resina desnaturante.

As alíquotas dos produtos finais obtidos em cada etapa do teste foram adicionados ao tampão de amostra redutor (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0.01% azul de bromofenol) (LAEMMLI, 1970) e aquecido a aproximadamente 95° C por 20 min, sendo utilizados para análise por separação eletroforética por SDS-PAGE e coradas com azul de coomassie para verificar a capacidade da taxa de expressão da proteína recombinante nos diferentes produtos obtidos e então, direcionando o protocolo de purificação da proteína com a porção do produto com maior concentração proteica.

Para confirmação da especificidade das proteínas produzidas, paralelamente foi realizada análise por Western blotting (WB), por meio de transferência das proteínas para uma membrana de PVDF (polivinilideno difluorado) GE®, sendo esta incubada com o anticorpo primário anti-6his (Roche®), e posterior incubação com anticorpo secundário anti-mouse (Sigma®), e a reação revelada com ECL (Thermo Fisher Scientific®).

3.1.3 Protocolo de purificação de USP2b

O protocolo de purificação da proteína foi realizado em amostras preparadas em maior escala conforme metodologia descrita no tópico 3.1.1, e seguindo o protocolo conforme o tópico 3.1.2. O *pellet* resultante das etapas anteriores foi ressuscitado em tampão de lise nativo (500 mM NaH₂PO₄, 0,5 mM NaCl, pH 8,0) sonificado com 5 pulsos de 20 segundos em potência máxima, e então centrifugado a 12.000 x g por 30 min à 4°C, obtendo o *pellet* e o sobrenadante. Ao sobrenadante foi adicionado resina de Ni-NTA agarose equilibrada com 20 mM de imidazol diluído em tampão de lise nativo, e mantido sob constante agitação por 1 h e 30 min à 4° C. Após a homogeneização, o sobre sobrenadante foi inserido em coluna de Ni-NTA agarose, seguidas de duas lavagens com tampão de lavagem 1 (100 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,87), duas lavagens de tampão de lavagem 2 (100 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 40 mM imidazol, pH 9,0) e uma lavagem com tampão de eluição (100 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 9,7).

O produto obtido da purificação foi armazenado em alíquotas, bem como os resíduos de cada etapa de lavagem, sendo as amostras utilizadas para análise por

separação eletroforética por SDS-PAGE e avaliadas sua especificidade por WB conforme metodologia utilizada em 3.1.2.

3.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE USP2a E USP2b EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Os vetores utilizados para expressão de USP2b em células eucariotas foram previamente elaboradas por nosso grupo, utilizando o vetor pcDNA3.1(-)6his, construído no próprio laboratório com cauda de histidina C-terminal, contendo o fragmento a sequência completa de USP2b (pcDNA3.1(-)6his + USP2b) (ROCHA, 2016). O vetor de USP2a (pDEST+USP2a), também foi previamente elaborado por nosso grupo (RIBEIRO, 2016), sendo utilizado para realizar as transfecções em células eucariotas.

As transfecções foram realizadas em células HEK293T e HeLa, em placas previamente preparadas com 5×10^5 células por mL. Foram utilizadas diferentes metodologias: co-precipitado com fosfato de cálcio (apenas em HEK293T) e por lipossomos (lipofectamina), sendo testados tempos de transfecção variados (0, 12, 24, 26 e 48 h pós-transfecção) para fins de se obter melhor pico de expressão das proteínas USP2b e USP2a. Como controle das transfecções, placas de células foram transfectadas com vetor pGFP (controle de transfecção) e observadas em microscópio de fluorescência.

A transfecção por co-precipitação com fosfato de cálcio em células HEK293T foi realizada por meio da adição de 750 μ L de água milliQ autoclavada em tubos contendo 12 μ g do plasmídeo, sendo adicionados 250 μ L de cloreto de cálcio (CaCl_2 1 M) pelas paredes do tubo e 1000 μ L de BBS (50 Mm BES, 280 Mm NaCl, 1,5 Mm $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, água deionizada) (2x) em jato forte. O tubo foi reservado por 5 min a temperatura ambiente, adicionado posteriormente de 8 mL de meio MEM com 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico. Foram removidos o meio de cultivo das placas previamente preparadas com as células, procedendo a adição da solução de transfecção por 5 h-6 h à 37° C em estufa com 5% de CO_2 . Posteriormente, o meio de transfecção foi removido, as placas foram lavadas com 5 mL de PBS estéril, adicionado novo meio de cultivo (MEM, 10% soro fetal bovino e antibióticos) para nova incubação em estufa conforme o tempo desejado pós-transfecção.

A transfecção por lipossomos foi realizada em células HeLa e HEK293T com o kit *Lipofectamine™ 2000* (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Para transfecção foram preparados tubos com as soluções A (3 µg do plasmídeo diluído em 250 µL de meio Opti-MEM™-Thermofisher) e B (6 µL de *Lipofectamine™ 2000* e 250 µL de meio Opti-MEM™-Thermofisher) da transfecção. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, a solução A foi adicionada a solução B, permanecendo por 20 min à temperatura ambiente para formação dos complexos DNA-lipossomo. As placas de cultivo, com as células previamente preparadas, tiveram seus meios removidos e as placas lavadas com PBS, adicionando meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino e sem antibiótico (DMEM para células HeLa; e MEM para HEK293T) e, então, a mistura resultante da junção das soluções de transfecção A e B. As placas foram incubadas a 37° C em estufa com 5% de CO₂ por 4-6 h. Após esse período, o meio de transfecção foi removido e adicionado meio de cultivo com 10% de soro fetal bovino e antibióticos, permanecendo incubado por tempos variados.

Para obtenção do extrato celular, as placas com células foram lavadas com 1 mL de PBS gelado, e em seguida foram adicionados 70 µL de tampão de lise (50 mM Tris HCl pH 7,4, 0,2% deoxicolato, 0,5% triton X-100, 1 mM PMSF, 1 mM NEM) despreendendo fisicamente as células das placas. Os conteúdos obtidos foram mantidos por 30 min em gelo, e posteriormente centrifugados a 12.500 x g por 10 min à 4°C, separando os *pellets* formados para análise por Western blotting (WB), o qual permite a avaliação da especificidade da expressão da proteína desejada.

Os extratos obtidos foram quantificados pelo método de Bradford (Bradford, 1976), para que fossem igualmente aplicadas concentrações semelhantes de proteínas, para então serem avaliados por Western blotting (WB). Para marcação de proteínas USP2b foi utilizado anticorpo primário anti-6his (Roche®), enquanto que para a marcação de proteínas USP2a, foram utilizadas alíquotas de anticorpos monoclonais anti-USP2a (4GD2), obtidos por experimentos anteriores de nosso grupo (ROCHA, 2016) posteriormente marcados com anticorpo secundário anti-mouse (Sigma®), e para revelação ECL (Thermo Fisher Scientific®).

3.3 CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-USP2a (CLONE 4GD2)

3.3.1 Ensaio de imunoprecipitação

A caracterização inicialmente feita do anticorpo anti-USP2a secretado pelo hibridoma 4GD2 foi descrita previamente por outro membro do grupo (ROCHA, 2016). Entretanto a capacidade daquele anticorpo em reconhecer a USP2a, tanto endogenamente expressa (linhagem humana HeLa) como superexpressa (células HEK293 transfectadas com vetor de expressão), em ensaios de imunoprecipitação ainda não havia sido verificada.

Para a imunoprecipitação de USP2a endógena (linhagem HeLa) foram utilizadas tipicamente o lisado obtido de 2 placas de cultivo (100 mm de diâmetro) contendo culturas confluentes por condição experimental. Já para células transfectadas (linhagem HEK293T) foi utilizada 1 placa de cultivo (60mm de diâmetro) por condição experimental. Após a obtenção dos lisados (ver abaixo) todas as operações foram executadas a 4 °C ou em banho de gelo.

A metodologia utilizada foi essencialmente aquela previamente estabelecida pelo grupo para o monoclonal anti-ADAM23 (clone DL11C8, BORGONOVO et al., 2018). Brevemente, lisados celulares (HeLa) clarificados por centrifugação (10.000 x g) foram incubados com 25 µL de fluidos ascíticos dos hibridomas 4GD2, DL11C8, e 10 µg de imunoglobulina irrelevante de camundongo (controle negativo) e posterior incubados com matriz cromatográfica. Após lavagem da resina com tampão de lise, os imunocomplexos foram extraídos com tampão de amostra contendo SDS e beta-mercaptoetanol e analisadas por WB conforme anteriormente descrito.

Para fins de avaliar a capacidade de imunoprecipitação do anticorpo monoclonal anti-USP2a do clone 4GD2, células HEK293T foram cultivadas e transfectadas com os vetores pBABE-USP2a, pcDNA-USP2b e não-transfectadas. As placas foram incubadas com 20 µL de fluido ascítico do hibridoma 4GD2 e os imunocomplexos foram avaliados por meio de WB com o anti-USP2a.

3.3.2 Enriquecimento de proteínas através de precipitação sequencial com sulfato de amônio saturado (*salting out*)

O enriquecimento de proteínas através da técnica de *salting out* foi feito como inicialmente realizado pelo grupo para a caracterização da proteína ligante de PrPc (MARTINS et al., 1997). Para isso, células HeLa foram cultivadas em 4 placas de cultivo (100 mm de diâmetro) até obtenção de 80-90% confluência e lisadas com tampão RIPA. Uma fração (ca. 20%) do lisado foi armazenada e o restante foi incubado sequencialmente com concentrações crescentes (30, 45 e 55%) de solução saturada de sulfato de amônio. Após a adição do volume necessário do sulfato de amônio, a mistura foi mantida por 10min em banho de gelo e centrifugada por 10 min a 10.000 x g. O sedimento proteico foi mantido em gelo e o sobrenadante acrescido de mais solução de sulfato de amônio para obtenção da concentração final desejada. Os precipitados foram ressuspensos em tampão RIPA e dialisados contra PBS gelado por 16 h (duas trocas). O extrato total e a cada uma das frações de precipitação tiveram sua concentração proteica determinada e a mesma massa de cada amostra analisada em SDS-PAGE e por WB, utilizando anticorpo anti-USP2a (4GD2).

3.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE USP2a E USP2b NA VIA DE DEGRADAÇÃO DE EGFR

Foram utilizadas células HeLa para transfecção com lipofectamina dos vetores de expressão de USP2a e USP2b (conforme descrito em 3.2), previamente elaborados por nosso grupo (ROCHA, 2016; RIBEIRO, 2016). Sendo separados em placas respectivamente para cada vetor e seus controles, com 1×10^5 células por placa de 35 mm de diâmetro. As incubações das placas após a transfecção foram mantidas por 16 h, em estufa de CO₂ com meio sem soro fetal bovino. Em seguida, o tratamento com EGF foi realizado a partir da adição de 100ng/mL de EGF (Peprotec Co.) por 0, 2 e 3 horas. Um grupo controle (transfectado com o vetor vazio) foi utilizado neste ensaio sob as mesmas condições que os demais grupos.

Após o período de tratamento das células com EGF, foram obtidos os extratos, conforme protocolo em seção 3.2, sendo mensuradas as concentrações proteicas por Bradford e seguida de análise por WB. Devido a presença de proteínas de diferentes massas moleculares, foi utilizado gel de poliacrilamida com diferentes concentrações

(10% na porção inferior do gel e 8% na porção superior do gel), de forma que fosse obtida melhor separação eletroforética. Para as marcações de USP2a e USP2b foram utilizados os mesmos anticorpos citados em 3.2, enquanto que para marcação de EGFR foram utilizados os anticorpos primário anti-EGFR (sc-03, Santa Cruz, CA, EUA), e secundário anti-rabbit (A0545, Sigma, MO, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DE USP2b EM BACTÉRIAS

Em trabalho anterior do grupo (ROCHA, 2016) diversas condições de expressão da proteína USP2b foram avaliadas e a que, aparentemente, mostrou-se mais promissora foi aquela que empregou a estirpe de *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS. Esta estirpe apresenta-se adequada pois tem a capacidade de codificar tRNA de códons raros, além de ser corriqueiramente empregada para a produção de proteínas de gene alvo clonados em vetores pET por indução com IPTG. Entretanto, ainda naquelas condições estudadas, os níveis de expressão da proteína recombinante não se apresentaram adequados para a obtenção de largas quantidades de antígeno.

Assim foram realizadas novas tentativas de expressão da USP2b na estirpe *E. coli* Rosetta2(DE3) pLysS, modificando-se condições de temperatura de crescimento bacteriano e diferentes concentrações de IPTG para a indução de expressão de proteína.

Previamente ao protocolo de expressão, foi conduzido o teste de solubilidade com os produtos obtidos da indução em mini-expressão (seção 3.1.2) – *pellet* e sobrenadante - e foi observado maior quantitativo de proteínas expressas no sobrenadante nativo, especificamente na resina lavada após o protocolo de purificação (dados não mostrados). Desta forma, o protocolo de purificação em maior escala foi direcionado para esta fração das amostras (FIGURA 3: INP, IP1, IP2 e IP3 produtos obtidos da resina lavada do sobrenadante nativo).

Na FIGURA 3 pode ser observado que, após a adição de IPTG nas culturas (linha INP), nenhuma banda proeminente com migração eletroforética equivalente à 45 kDa foi evidenciada após essa indução (comparar linhas NI com INP para ambas colônias 1 e 2).

Ainda, na tentativa de melhor evidenciar a presença da proteína recombinante nos extratos bacterianos procurou-se enriquecê-la a partir de seu pré-isolamento com diferentes quantidades de resina Ni-NTA agarose: 50, 100 ou 150 µL de resina, respectivamente as colunas IP1, IP2, IP3, mas não observando diferenças entre as purificações resultantes (FIGURA 3).

Outras tentativas de expressão da USP2b utilizando variações em tempo e temperatura de incubação não foram bem sucedidas (dados não mostrados), sendo

que tipicamente foram encontradas proteínas massas moleculares diferentes daquela esperada para a proteína recombinante, e ausência de banda pronunciada de 45kDa após a pré-purificação dos extratos proteicos obtidos das colônias após indução por IPTG.

FIGURA 4 – TESTES DE EXPRESSÃO DE USP2b EM COLÔNIAS SELECIONADAS DE *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS COM INDUÇÃO DE 0,5mM DE IPTG A 37°C POR 5h EM MEIO LB



FONTE: A autora (2019).

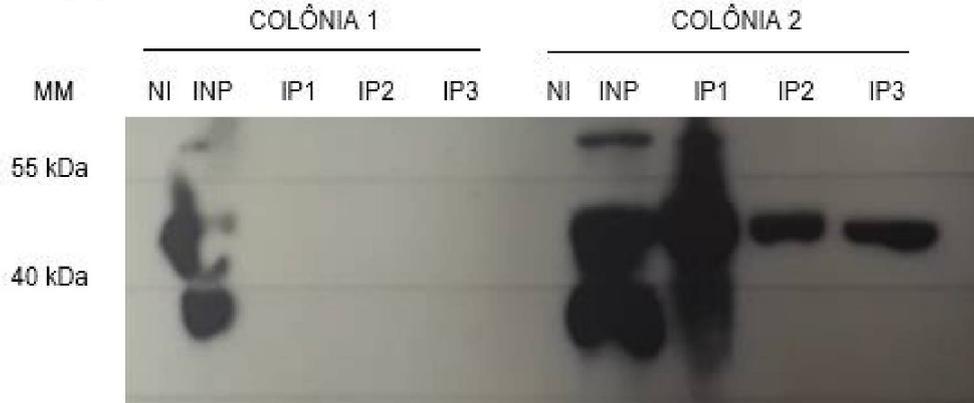
NOTA: Ausência de marcação pronunciada na altura aproximada de 45 kDa nas colunas INP, IP1, IP2 e IP3 após a indução. Foram selecionadas duas colônias, realizando indução de 0, 5mM de IPTG a 37° C por 5 h, e utilizando diferentes quantidades de Ni-NTA agarose para purificação: 50 (IP1), 100 (IP2) e 150 µL (IP3) de resina. Não obtendo sucesso nas diferenças da purificação. Legenda: MM – Marcador de massa molecular; NI– Cultura de bactéria não induzida; INP – Cultura de bactéria induzida não purificada; IP1 – Cultura de bactéria induzida purificada com 50 µL resina; IP2 – Cultura de bactéria induzida purificada com 100 µL resina; IP3 – Cultura de bactéria induzida purificada com 150 µL resina.

Apesar da ausência de banda proeminente na região de massa molecular esperada para a USP2b (45 kDa), observado na FIGURA 3, foi realizada reação de Western blotting com anticorpos que reagem com a etiqueta de poli-histidina contida na proteína recombinante (FIGURA 4). Assim, caso houvesse alguma proteína recombinante nas amostras seria possível estimar sua quantidade ou eficiência de expressão nas condições testadas. Além disso, poderia ser também avaliado se algum vazamento de expressão estaria ocorrendo durante a fase de crescimento exponencial bacteriano, ou seja, na ausência de IPTG.

Como pode ser observado na FIGURA 4, as amostras não induzidas não apresentaram bandas específicas correspondentes à USP2b (linhas NI, colônia 1 e 2), enquanto bandas compatíveis com sua massa molecular foram observadas nas culturas tratadas com IPTG (linhas INP, colônias 1 e 2) e nas frações purificadas da colônia 2 (IP1-3). A isoforma USP2b possui massa de 45 kDa com a etiqueta de poli-

histina, e portanto, a observação de banda próximas a esta massa molecular é um indicativo da presença da proteína desejada. Apesar de confirmar a expressão de USP2b nas condições experimentais utilizadas, o rendimento estimado empregando tal procedimento mostrou-se inadequado para utilização em ensaios subsequentes.

FIGURA 5 – EXPRESSÃO DE USP2b EM COLÔNIAS SELECIONADAS DE *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS COM INDUÇÃO DE 0,5mM DE IPTG A 37°C POR 5h EM MEIO LB



FONTE: A autora (2019).

NOTA: **Colônia 1:** ausência de marcação específica na coluna não induzida (NI) e presença de bandas marcantes em amostra induzida não purificado (INP) e ausência de marcação nas amostras induzidas purificadas (IP1-IP3). **Colônia 2:** ausência de bandas em não induzido (NI), presença de bandas específicas (45 kDa) e inespecíficas em induzido não purificado (INP) e induzido purificado com 50 μ L (IP1); presença de bandas específicas de 45 kDa nas amostras induzidas purificadas com 100 (IP2) e 150 μ L de resina (IP3).

LEGENDA: MM – Marcador de massa molecular;
 NI – Cultura de bactéria não induzida;
 INP – Cultura de bactéria induzida não purificada;
 IP1 – Cultura de bactéria induzida purificada com 50 μ L resina;
 IP2 – Cultura de bactéria induzida purificada com 100 μ L resina;
 IP3 – Cultura de bactéria induzida purificada com 150 μ L resina.

4.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE USP2a E USP2b *IN VITRO*

Em experimentos previamente conduzidos pelo grupo foi largamente empregado o modelo de células HeLa transfectadas com o vetor de expressão para a USP2a através do uso de lipofectamina (LIU et al., 2013; RIBEIRO, 2016). A metodologia que emprega a linhagem HEK293 e a transfecção de vetores de expressão através de co-precipitado de fosfato de cálcio também tem sido utilizada com sucesso em outros projetos (ZANATA et al., 2002a,b; COSTA et al., 2009) e apresenta-se como uma alternativa menos dispendiosa e mais alinhada à atual necessidade do grupo. Desta forma, a verificação da eficiência de expressão da USP2a na linhagem HEK293 teve que ser avaliada na perspectiva de uso desta

linhagem em substituição e ou complementação aos resultados já obtidos com a linhagem HeLa, ou seja, se aquela linhagem apresentaria comportamento bioquímico equivalente ou comparável daquele obtido com a linhagem HeLa.

Além disso, dados obtidos pelo grupo e não publicados (ZANATA; LODA, comunicação pessoal) indicavam que, apesar da linhagem HeLa ser transfectada com um vetor de expressão proteica contendo uma forte região promotora, o pico máximo de expressão da USP2a era atingido entre 24 e 36 h, sugerindo que a presença de USP2a na célula possa estar sob rígido controle.

Para avaliar a cinética da expressão de USP2a e USP2b em duas diferentes linhagens de células eucariotas (HeLa e HEK293T) foram transfectados com os vetores pDEST+USP2a e pcDNA3.1(-)6his+USP2b por dois diferentes métodos (lipofectamina e co-precipitação com fosfato de cálcio), e a expressão proteica avaliada em diferentes tempos. Com o uso do anticorpo monoclonal anti-USP2a (clone 4GD2) produzido pelo grupo, foi possível observar (FIGURA 5, linhas 5-8) que em células HeLa transfectadas com lipofectamina o pico de expressão de USP2a é de 12 h, com diminuição gradual até o último ponto temporal investigado (36 h).

Resultado semelhante foi observado para a USP2b (FIGURA 5, linhas 1-4) e evidenciado com o uso de anticorpos anti-poliHis, o qual reconhece epítipo presente na região amino terminal da USP2b. Ainda nesta linhagem, a USP2a é aparentemente mais estável que USP2b, uma vez que em 36 h praticamente não se detecta a presença desta última, enquanto USP2a ainda pode ser detectada nestas condições (FIGURA 5, comparar linhas 4 e 8 e TABELA 1). Em 48 h pós-transfecção nenhuma das duas isoformas foram detectadas nesta linhagem (TABELA 1), indicando que, ou não estão mais presentes nos lisados, ou encontram-se presentes em quantidades muito pequenas, estando fora do limite de detecção do método.

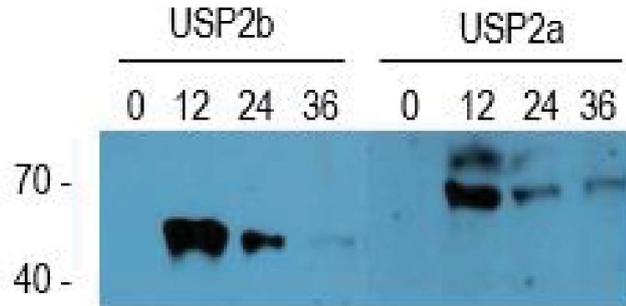
Quando a linhagem HEK293T foi transfectada com os vetores de interesse com lipofectamina, pode-se observar a expressão tanto de USP2a como USP2b nos tempos 24 e 48 h (TABELA 1), apesar da expressão em 48 h ser sempre inferior àquela observada em 24 h (dado não mostrado).

Células HEK293T transfectadas com co-precipitado fosfato de cálcio também expressaram as proteínas de interesse (TABELA 1), sugerindo que este método também poderia ser utilizado como alternativa a lipofectamina. Para a construção USP2a, quando se compara a expressão proteica obtida pelos dois métodos (TABELA 1, comparar linhas 3 e 5) observa-se que o primeiro método, lipofectamina, é mais

eficiente, uma vez que a expressão proteica foi mantida por 48 h sob estas condições, enquanto apenas expressão em 24 h foi observada com a utilização de co-precipitado. Curiosamente este último método foi eficaz na expressão de USP2b apenas em 48 h, resultado oposto àquele obtido com lipofectamina (TABELA 1, comparar linhas 4 e 6).

Em ambas as linhagens, os métodos de transfecção mostraram algum grau de sucesso na transfecção dos vetores, sendo observada a marcação de bandas de proteínas específicas no WB de 45 kDa para USP2b quando reagido com anti-6his, e de 69 kDa para USP2a quando reagido com o anticorpo monoclonal anti-USP2a (4GD2), e não sendo observada a marcação de bandas para os controles não transfectados para os vetores. Ainda, nenhuma marcação de antígeno apresentando migração eletroforética aparente de 45 kDa em células superexpressando USP2b foi observada quando o anticorpo monoclonal 4GD2 foi empregado, sugerindo que este anticorpo se liga de forma específica a USP2a e não se liga a USP2b, confirmando dados obtidos previamente pelo grupo (ROCHA, 2016).

FIGURA 6 – EXPRESSÃO DE USP2b E USP2a EM CÉLULAS HeLa



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Extratos de células HeLa transfectadas por lipofectamina com os vetores pDEST-USP2a e pcDNA-USP2b foram obtidos em diferentes tempos, e a presença de USP2a e USP2b avaliada por reação de WB com anticorpos anti-USP2a (clone 4GD2) e anti-6his, respectivamente. A especificidade da reação é indicada pela ausência de bandas no tempo 0 e a presença de bandas correspondentes a massa molecular esperada para cada uma das construções (69 kDa e 45 kDa para USP2a e 2b, respectivamente). Os números do lado esquerdo da imagem correspondem aos marcadores de massa molecular em kDa.

TABELA 1 – RESULTADOS DE TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS HEK293T E HeLa COM VETORES DE USP2a e USP2b

Método	Células + Vetores	Tempo de incubação			
		12h	24h	36h	48h
Lipofectamina	HeLa +USP2a	Sim	Sim	Sim	Não
	HeLa +USP2b	Sim	Sim	Não	Não
	HEK293T +USP2a	-	Sim	-	Sim
	HEK293T +USP2b	-	Sim	-	Sim
Cálcio	HEK293T +USP2a	-	Sim	-	Não
	HEK293T +USP2b	-	Não	-	Sim

FONTE:A autora (2019).

LEGENDA: Sim: obtenção de proteínas expressas;

Não: ausência de proteína expressa no protocolo utilizado.

4.3 CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DO ANTICORPO MONOCLONAL anti-USP2a (CLONE 4GD2)

Uma dificuldade experimental que tem sido enfrentada pelo grupo é a de se conseguir detectar a forma endógena das isoformas de USP2. Dados gerados neste trabalho (FIGURA 5, tempo 0, USP2a) e anteriormente publicados pelo grupo de pesquisa apontam que a expressão endógena de USP2a é pequena nas linhagens empregadas, como por exemplo: HeLa, HEK293, e três diferentes linhagens de células de câncer de pulmão do tipo não-pequenas, NSCLC (LIU et al., 2013). Ainda, a expressão de USP2a pode estar ausente ou fora do limite de detecção nas condições dos experimentos utilizadas (tipicamente 10 a 60 ug de proteína total resolvida por SDS-PAGE e analisadas por WB).

Uma técnica utilizada anteriormente pelo grupo para a caracterização da ST11 (Stress-Inducible-Protein 1) com uma proteína ligante de PrPc (MARTINS et al., 1997; ZANATA et al., 2002) foi a precipitação proteica diferencial através da adição sequencial de diferentes concentrações de sulfato de amônio. Esta técnica, conhecida como “ammonium sulfate salting-out” (GREEN; HUGHES, 1995), tem sido utilizada com êxito na purificação e enriquecimento de determinado alvo proteico contido em uma mistura complexa de proteínas (WINGFIELD, 2001).

Na FIGURA 6 é possível observar que na linhagem HeLa a USP2a endogenamente sintetizada pode ser parcialmente enriquecida na fração de 30% de saturação de sulfato de amônio (comparar linha 1 e 2), uma vez que banda de

migração eletroforética correspondente a USP2a (69 kDa) foi nesta fração detectada com maior intensidade a partir do uso de anticorpos anti-USP2a (clone 4GD2). A presença de USP2a ainda pode ser detectada na fração de 45% (linha 3). Ainda, nenhuma detecção específica foi evidenciada na fração 55% (FIGURA 6, linha 4) e no sobrenadante da fração 55% (dado não mostrado), indicando que USP2a está enriquecida entre as frações 30-45% de saturação de sulfato de amônio.

Outro método de enriquecimento de determinado alvo contido em uma mistura complexa de proteínas é aquele que emprega anticorpos imobilizados em uma matriz cromatográfica (imunoprecipitação). Uma vez que foi possível verificar que a USP2a endógena expressa pelas células HeLa era capaz de ser identificada com o anticorpo 4GD2 após precipitação sequencial com sulfato de amônio (FIGURA 6), procurou-se verificar se este enriquecimento poderia ser feito empregando condições mínimas de desnaturação com o uso do próprio anti-USP2a em reações de imunoprecipitação.

FIGURA 7 – USP2a ESTÁ ENRIQUECIDA NAS FRAÇÕES 30-45% DE SATURAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO



FONTE: A autora (2019).

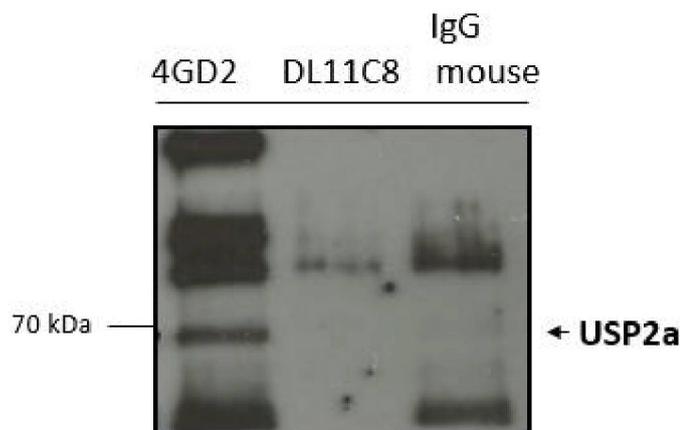
NOTA: O lisado obtido de 4 placas de 100 mm de diâmetro contendo culturas confluentes da linhagem HeLa foi incubado sequencialmente com as concentrações crescentes indicadas de solução saturada de sulfato de amônio. Os precipitados formados após cada incubação foram isolados por centrifugação e as proteínas contidas em cada fração de corte resolvidas por SDS-PAGE (80ug/linha) e analisadas por WB com anti-USP2a. Pode ser observado que USP2a está proeminentemente presente na fração 30%, podendo ainda ser observada tanto na fração 45% como no próprio extrato total.

A FIGURA 7 mostra que o anticorpo anti-USP2a (clone 4GD2) é capaz de imunoprecipitar uma banda com migração eletroforética aparente de 69kDa compatível com a massa esperada para USP2a (4GD2, linha 1). Por outro lado, tanto o anticorpo monoclonal anti-ADAM23 produzido no laboratório (clone DL11C8, BORGONOVO et al., 2018, linha 2) como imunoglobulina irrelevante de camundongo (IgG mouse, linha 3), e utilizados como controles negativo, não foram capazes de imunoprecipitar qualquer antígeno com perfil eletroforético semelhante a USP2a

(FIGURA 7, comparar a linha 1 com as linhas 2 e 3). Este resultado sugere que o anti-USP2a, nas condições experimentais aqui apresentadas, é capaz de reagir diretamente com a USP2a expressa pela linhagem HeLa.

Apesar do estabelecimento de duas formas distintas de purificação e/ou enriquecimento da proteína USP2a a partir da linhagem HeLa que não sofreu nenhuma manipulação genética, isto é, a transfecção de vetor de expressão ou transdução de vírus de expressão, o uso da proteína endógena em experimentos bioquímicos (por exemplo, co-imunoprecipitação, cinética de degradação de receptores, entre outros) é operacionalmente inviável, pois necessita de uma grande quantidade de células (tipicamente de 3 a 4 placas de 100 mm de diâmetro para cada condição experimental).

FIGURA 8 – ANTICORPO MONOCLONAL 4GD2 IMUNOPRECIPITA USP2a ENDOGENA EXPRESSA NA LINHAGEM HeLa



FONTE: A autora (2019).

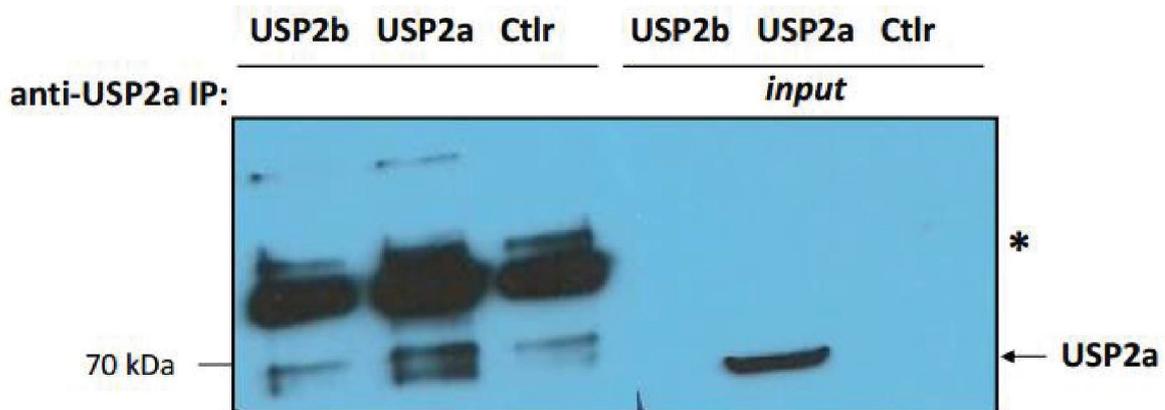
NOTA: Extrato proteico da linhagem HeLa obtido de 3 placas de 100 mm de diâmetro foi utilizado em cada condição reacional indicada. Flúido ascítico (25 uL) de cada hibridoma (4GD2 e DL11C8) e Ig irrelevante de camundongo (10 ug) foram reagidos com os extratos e em seguida incubados com a matriz cromatográfica. Os imunocomplexos resolvidos por SDS-PAGE foram analisados por WB com anticorpo anti-USP2a (4GD2).

Por outro lado, o uso de vetores de expressão (pBABE-USP2a) tem se mostrado importante ferramenta no estudo da USP2a (LIU et al., 2013; PRIOLO et al., 2006; GRANER et al., 2004) de forma a contornar a baixa expressão desta proteína e permitir a utilização de um número bem menor de células por condição experimental (por exemplo, uma placa de cultivo de 35 mm ou 60 mm por condição experimental). Desta forma foi possível verificar (FIGURA 8, linha 2, USP2a) que o anti-USP2a imunoprecipitou um dubleto proteico o qual provavelmente representa a USP2a

endógena (banda superior) e a USP2a-HA superexpressa (banda inferior) em células HEK293T. Uma vez que uma pequena quantidade de lisado total de cada extrato é utilizado como controle para a expressão da proteína de interesse, a proeminente banda presente no extrato da linhagem que superexpressa USP2a-HA (FIGURA 8, linha 5) reforça a suposição que a banda inferior da reação de imunoprecipitação (comparar linha 2 e 5) é provavelmente USP2a-HA.

Além disso, banda com o mesmo perfil eletroforético da USP2a endógena, porém com intensidade inferior que a USP2a-HA, foi observada nos três lisados celulares empregados, incluindo aí as outras duas condições experimentais utilizadas como controle (células transfectadas com USP2b e não-transfectadas, linhas 1 e 3, respectivamente). Este resultado era esperado e reproduz aquele obtido para células HeLa (FIGURA 7). Ainda, a USP2a endógena não foi detectada em nenhum dos três lisados (linhas 4-6) pois como dito anteriormente a expressão endógena da molécula é baixa e sua detecção direta fica assim prejudicada quando a massa total de proteína utilizada é pequena (por exemplo, 20 ug/linha).

FIGURA 9 – USP2a-HA É ESPECIFICAMENTE IMUNOPRECIPITADA NA LINHAGEM HEK293T TRANSFECTADA COM O VETOR pBABE-USP2a



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Extratos de células HEK293T transfectadas com os plasmídeos pBABE-USP2a, pcDNA-USP2b e não-transfectadas (1 placa de 60 mm de diâmetro por condição o experimental) foram incubados com o anti-USP2a (20 uL de ascite / condição experimental) e os imunocomplexos avaliados por WB com o anticorpo anti-USP2a. Uma alíquota de 5% do volume final de cada lisado foi reagido em paralelo (input, linhas 4-6, 10% lisado total, ca. 50 ug/linha) com anti-USP2a.

LEGENDA: * indica cadeias de imunoglobulina reduzidas parcialmente e reconhecidas pelo secundário anti-Ig-camundongo-HRPO.

4.4 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DE USP2a E USP2b NA VIA DE DEGRADAÇÃO DE EGFR

Nosso grupo demonstrou inicialmente que a expressão aumentada de USP2a estava relacionada diretamente à estabilização do EGFR em células HeLa (LIU et al., 2013). Ainda, a estabilização do EGFR neste modelo se dá pela reciclagem aumentada deste receptor para a membrana plasmática, evitando assim a sua degradação através da rota endossomo-lisossomo.

Procurou-se estabelecer condições experimentais para reproduzir os resultados previamente obtidos, assim a linhagem HeLa foi transfectada com o vetor de expressão para USP2a e a degradação do EGFR foi acompanhada em diferentes tempos. A escolha dos pontos temporais de 2 e 3 h após a adição de EGF deu-se a partir do fato de que, apesar da fosforilação e ubiquitinação do EGFR serem observadas já nos primeiros 15 min após o desafio das células com EGF, a degradação do receptor acaba sendo mais adequadamente observada a partir da primeira hora (LIU et al., 2013).

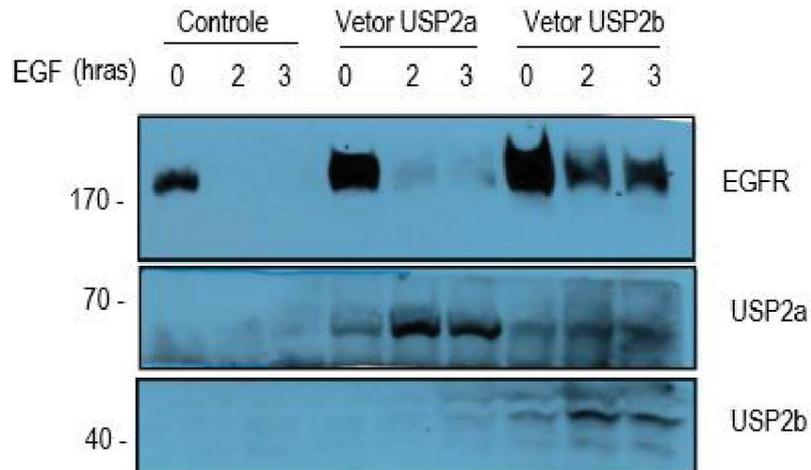
Na FIGURA 9 é possível observar que há uma presença aumentada do EGFR nas condições de expressão de USP2a quando comparada com o controle transfectado com o vetor vazio (banda 190 kDa, comparar as linhas 2 e 3 com 5 e 6). Tal resultado aponta que o EGFR está sendo estabilizado na presença de USP2a, conforme demonstrado previamente e indica que as condições experimentais estabelecidas neste trabalho são semelhantes às utilizadas em outro laboratório.

Por outro lado, ainda não havia na literatura evidências que apontassem propriedades bioquímicas semelhantes para a isoforma USP2b. Assim levantou-se a hipótese que a USP2b pudesse atuar sobre o EGFR da mesma forma que a USP2a. O resultado apresentado na FIGURA 9 indica que a USP2b pode não só estabilizar o EGFR (comparar as linhas 2 e 3 com 8 e 9), mas aparentemente o faz de forma mais eficiente (comparar linhas 5 e 6 com 8 e 9). As reações com anti-USP2a (clone 4GD2, FIGURA 9, painel intermediário, 69 kDa) e com anti-6his (para a etiqueta de expressão presente na USP2b, painel inferior, 45 kDa) evidenciam que a expressão das proteínas em cada uma das condições foi adequada.

Uma vez que a massa de proteína para cada condição experimental foi a mesma por linha, pode-se afirmar que diminuição da intensidade do sinal detectado para o EGFR é reflexo direto da sua degradação. Este resultado confirma dados

publicados pelo grupo e sugere, pela primeira vez, que a USP2b também é capaz de estabilizar o EGFR, de maneira semelhante a observada para a USP2a.

FIGURA 10 – AS ISOFORMAS USP2a e USP2b ESTABILIZAM O RECEPTOR DE EGF NA PRESENÇA DO SEU LIGANTE



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Células HeLa transfectadas com os vetores vazios (controle), pDEST-USP2a e pcDNA-USP2b foram carenciadas por 16 h na ausência de SFB e desafiadas com 100 ng/mL de EGF nos tempos indicados. A massa total de 30 µg de cada extrato celular foi analisado para a presença de EGFR (painel superior), USP2a (painel do meio) e USP2b (painel inferior). Números do lado esquerdo da imagem correspondem aos marcadores de massa molecular em kDa.

5 DISCUSSÃO

As diferentes abordagens e tentativas para a expressão de USP2b não resultaram em uma melhora nas condições anteriormente avaliadas. A expressão de USP2b em bactérias apresentou dificuldades semelhantes às aquelas anteriormente encontradas por nosso grupo. Rocha (2016) utilizou abordagens diferentes de transfecção dos vetores em *E. coli* BL21 (DE3) STAR, *E. coli* BL21 pLysS e *E. coli* Rosetta pLysS, entretanto, sem obter sucesso de expressão da proteína. A última abordagem utilizada, com *E. coli* Rosetta pLysS, foi devido a observação de códons raros em alta frequência na sequência da USP2b clonada, diante disso, a utilização desta estirpe bacteriana forneceria tRNA codificados para códons raros em genes bacterianos, mas comuns em eucariotos.

Desta forma, foram utilizadas abordagens com uma estirpe igualmente capaz de codificar códons raros e específica para utilização de vetores pET, a *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLySs, entretanto, não foram obtidas a expressão em quantidades necessárias da isoforma USP2b.

Wang et al. (2017) obteve sucesso de expressão de proteínas USP2 com cauda de histidina na região N-terminal em estirpes de *E. coli* BL21 (DE3) transfectadas com vetores pET28a contendo o gene do núcleo catalítico de USP2 humana (aa 259–605). Apesar de produzir uma proteína recombinante solúvel, essa abordagem mostra-se inadequada para o uso desta molécula como antígeno para a produção de anticorpos que possam discernir entre as formas USP2a e USP2b, uma vez que estas enzimas compartilham a mesma sequência de aminoácidos para o núcleo catalítico que é codificada pelo mesmo éxon do gene de USP2.

Ribeiro (2016) e Rocha (2016) também utilizaram vetores pET28a com expressão de cauda de histidina em N-terminal, sendo, entretanto, utilizados os sítios de restrição NheI e HindIII para a inserção da sequência de USP2a, e ambos experimentos obtendo sucesso na clonagem e expressão de proteínas USP2a em *E. coli* BL21(DE3) STAR. Entretanto, para a expressão da isoforma USP2b, há necessidade de reavaliação desta isoforma, possivelmente com novas tentativas de clonagem em outros tipos de vetores ou em diferentes organismos, tais como levedura ou células de inseto. Dados obtidos por membros do laboratório (Soraia Ferreira e Pedro Henrique Vianna, comunicação pessoal) apontam que a USP2b possa ser tóxica e que tanto o vazamento de expressão durante a fase log de crescimento como

durante a indução proteica com IPTG possam levar à extensiva morte bacteriana, resultando em baixos rendimentos de expressão.

A expressão inadequada de USP2b recombinante inviabilizou os diversos ensaios subsequentes que estavam previstos no projeto original, o qual incluíam a produção de anticorpos policlonais e monoclonais específicos para USP2b e o potencial uso da proteína recombinante em ensaios enzimáticos funcionais. De fato, essa última abordagem tem sido utilizada largamente por grupo de pesquisa interessados na prospecção, isolamento e caracterização de inibidores farmacológicos da USP2 (WANG et al., 2017; TOMALA et al., 2018; CHUANG et al., 2018).

Por outro lado, a expressão das isoformas em células de mamíferos foi obtida com sucesso nas diferentes metodologias abordadas. Na avaliação de cinética de expressão, foi observado diferentes comportamentos ao utilizar métodos de transfecção e tipos celulares distintos, apresentando inclusive maiores ou menores tempos de expressão, como no método por lipofectamina que em células HEK293T a expressão da proteína foi identificada até 48h pós-transfecção. Enquanto em células HeLa a expressão era obtida até no máximo 24 h, sendo observado pico de transfecção de 12 h para a isoforma USP2b e entre 12 a 24 h para USP2a.

Quando se compara a expressão temporal das duas isoformas de USP2 na linhagem HeLa e HEK293T, com o mesmo agente de transfecção (lipofectamina) observa-se (TABELA 1) que, aparentemente, as deubiquitinasas estão mais estavelmente presentes na linhagem HEK293T (rim embrionário, semelhante a epitélio) do que HeLa (epitélio cervical) após 48h de introdução do vetor de expressão. Tal resultado talvez possa ser consequência da origem tecidual de cada uma das linhagens, as quais provavelmente devam possuir estratégias pós-traducionais distintas de controle da proteostase. Além disso, sabe-se que mesmo quando se emprega o mesmo agente de transfecção (por exemplo, lipofecção), a eficiência de introdução do vetor e a consequente expressão da proteína de interesse pode variar entre linhagens e tipos celulares. Já o uso de co-precipitado de fosfato de cálcio nas células HEK293T mostrou-se uma alternativa ao método mais dispendioso da lipofectamina. Contudo o estabelecimento do melhor ponto temporal para obtenção da máxima expressão das proteínas foi essencial, uma vez que difere para as duas isoformas (24 h para USP2a e 48 h para USP2b).

De acordo com Kim e Eberwine (2010), vários métodos de transfecção têm sido desenvolvidos com diferentes abordagens que devem ser consideradas conforme o tipo celular e objetivo do experimento, sendo o método ideal aquele que apresenta alta eficiência, baixa toxicidade, mínimos efeitos na fisiologia normal da célula, facilidade e reprodutibilidade. A eficiência obtida pelos métodos químicos, conforme os mesmos autores, depende de vários fatores (quantidade de ácido nucléico, pH das soluções, condições da membrana celular), mas apresenta citotoxicidade relativamente baixa, variando a eficiência da transfecção conforme a célula utilizada. Concordando com o observado neste estudo, há variação de picos de expressão das isoformas nos experimentos conduzidos com células HEK293T e HeLa.

A detecção direta de USP2a endógena em linhagens celulares sempre apresentou dificuldades sob as condições empregadas, por exemplo, quantidade limitada de extrato total de proteína capaz de ser adequadamente resolvida por SDS-PAGE (50-80 ug proteína total dependendo do sistema de separação). Tal situação é drasticamente diferente quando a proteína é superexpressa a partir do uso de vetores eucarióticos (exemplo, pcDNA3.1, pBABE, pCMV e outros) em linhagens de mamíferos, onde a quantidade de lisado necessária é aproximadamente 10-20 ug por condição experimental. A precipitação com sulfato de amônio (FIGURA 6) indica que USP2a pode ser enriquecida e detectada diretamente nas células HeLa, e que apesar da sua baixa expressão nesta linhagem, é possível detectá-la em ensaios de WB. O enriquecimento da USP2a na fração 30% é curioso, uma vez que, a princípio, a USP2a é uma enzima solúvel presente no citoplasma. Tipicamente proteínas mais insolúveis como receptores associados à membrana plasmática ou ao sistema de endomembranas, por conterem domínios hidrofóbicos ou modificações pós-traducionais lipídicas (e.g. GPI ou palmitoilação) são encontradas nas frações de menor concentração de sulfato de amônio. Ao contrário, moléculas solúveis contendo domínios globulares (e.g. albumina, imunoglobulina, fatores de crescimento) são enriquecidas em frações contendo maior concentração de sulfato de amônio (acima de 50% de saturação). Este resultado indica que a USP2a presente no citoplasma poderia estar associada ao sistema de endomembranas. De fato, dados de ultracentrifugação diferencial e microscopia confocal mostram que a USP2a está presente em endossomas precoces (co-purifica com marcadores desta organela) e apresenta padrão puntiforme de expressão compatível com sua presença em vesículas (LIU et al., 2013). A associação direta da USP2a com componentes do

sistema de endomembranas e o mapeamento do sítio putativo de interação com lipídios estão sendo investigados por outros membros do grupo.

Dentro desta perspectiva de detecção da proteína endogenamente expressa, a técnica de imunoprecipitação mostrou-se mais adequada, pois emprega menor quantidade de células e lisado celular. Neste trabalho foi mostrado pela primeira vez que o anticorpo monoclonal 4GD2 é capaz de imunoprecipitar USP2a diretamente de células HeLa (FIGURA 7). Além disso, USP2a-HA superexpresso em células HEK293T, também foi imunoprecipitado com 4GD2 (FIGURA 8), sugerindo que o epítipo reconhecido por este anticorpo encontra-se acessível tanto na molécula endógena como na superexpressa, em condições de desnaturação branda (0,5 Triton X-100 e 0,5% NP-40).

A possibilidade de imunoprecipitar USP2a nestas condições de desnaturação branda permitirá que estudos de co-imunoprecipitação possam ser levados a cabo, uma vez que os parceiros moleculares da USP2a poderão manter sua interação física nestas condições e serem isolados para caracterização bioquímica posterior (espectrometria de massas ou WB).

A presença de componentes de imunoglobulina (cadeia pesada - *ca.* 56 kDa; cadeia leve – 35 kDa) como produto inerente da reação de imunoprecipitação sempre apresenta interferências de detecção quando o mesmo anticorpo é utilizado na reação de WB. Este problema se dá pelo reconhecimento direto destes componentes, na reação de WB, pelo anticorpo secundário. A separação de parte da membrana de nitrocelulose que contém estes componentes diminui este reconhecimento indesejado pelo anticorpo secundário, mas não elimina totalmente a interferência destes componentes no sinal final detectado (vide bandas detectadas e presentes acima e abaixo da USP2a nas duas reações de imunoprecipitação, FIGURAS 7 e 8).

Uma estratégia que poderia ser utilizada seria a ligação química covalente direta do anti-USP2a na matriz cromatográfica a partir do uso de cross-linkers químicos. De fato, nosso grupo tem utilizado tal estratégia com sucesso na imunoprecipitação de ADAM23 com o anticorpo monoclonal DL11C8 (BORGONOVO et al., 2018) e PrPc com anticorpos policlonais (GIMENEZ et al., 2015), evitando assim o sinal produzido pelas cadeias leve e pesadas de imunoglobulinas presentes nas reações de imunoprecipitação. A ausência de reação cruzada do anti-USP2a com USP2b sugere fortemente que o epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal 4GD2 está contido no domínio proteico codificado pelo exon exclusivamente presente

na USP2a (éxon 1), conforme demonstrado previamente por ROCHA (2016). Dados adicionais obtidos com outro vetor de expressão para a USP2b e adquirido comercialmente (Origene Co) confirmam estes resultados (Silvia Rodrigues e Giovana Nonino, comunicação pessoal).

Em relação ao estudo de interferência de USP2a e USP2b na degradação de EGFR foi observado que em células HeLa transfectadas com as isoformas há prolongamento do tempo de degradação de EGFR, por meio da observação que, em tempos prolongados pós tratamento com EGF (2 e 3 h), há presença de marcação específica para EGFR em comparação com o grupo controle.

Apesar dos diferentes tipos celulares utilizados, observou-se em demais estudos o processo de degradação de EGFR em condições normais. Estudo realizado por FUTTER et al. (1996) em células HEP-2 (human epithelial type 2) tratadas com EGF a 37° C, observaram processo de maturação das MVB com recrutamento contínuo de EGFR, sendo os complexos EGF-EGFR rapidamente direcionados para os vacúolos lisossomais, e a sua degradação já iniciada em poucos minutos e degradação em aproximadamente 30 minutos. MELKER et al. (2001), ao estudar a ação das enzimas c-Cbl em células COS-7 tratadas com EGF, indicaram que a ubiquitinação de EGFR já se inicia em apenas 2 minutos de estimulação com EGF, sendo sua internalização em 5 a 30 minutos, e após 60 minutos de estímulo, o complexo localizava-se na região perinuclear para degradação.

Neste trabalho foi mostrado pela primeira vez que a USP2b pode estabilizar o EGFR de forma semelhante como previamente verificado pela USP2a (LIU et al., 2013). Ainda, aparentemente, a USP2b parece ter maior potencial de estabilização de EGFR para degradação comparado com USP2a. Esta observação de fenótipos diferentes entre USP2a e USP2b na taxa de degradação de EGFR pode estar relacionado com a região N-terminal das isoformas. Há evidências que apontam que DUBs apresentam especificidade aos diferentes tipos de cadeias de poliubiquitina (linear ou posição de ligação na lisina) além de seus outros domínios, contribuindo para a seleção do substrato (KOMANDER et al., 2009). Apesar de ambas as isoformas USP2a e USP2b apresentam capacidade de clivagem em cadeias poliubiquitinadas ligadas a K48 e K63 (ZHANG et al., 2014).

OBERFELD et al. (2011) observou diferentes formas de interação das isoforma USP2a e USP2b nos canais de sódio epiteliais, reforçando a ideia que a conformação N-terminal única da isoforma USP2b está provavelmente envolvida na

especificidade do alvo. Enquanto USP2a não apresentou essa atividade, sugerindo que sua porção N-terminal resulta em uma localização subcelular diferente e/ou inibição da atividade catalítica nos canais ubiquitinados. Em seu modelo proposto, USP2b possui capacidade de interação física com a enzima ubiquitina ligase dos canais de sódio, interagindo tanto com seu domínio catalítico quanto sua região N-terminal.

Estudo realizado por LIN et al. (2000) também observou diferente localização celular das isoformas USP2a (UBP-t1) e USP2b (UBP-t2) homólogas em testículos de ratos devido a região N-terminal distinta, além de diferenças na sua expressão, sendo encontrado UBP-t1 em estágios precoces e UBP-t2 em estágios tardios.

Neste contexto, investigações futuras deverão evidenciar se as duas enzimas poderiam trabalhar de forma sinérgica, por possuírem a mesma atividade enzimática ou efeitos antagônicos, uma vez que tem regiões N-terminal distintas as quais poderiam modular diferencialmente a afinidade e/ou localização subcelular destas enzimas.

6 CONCLUSÕES

- USP2a e USP2b foram adequadamente superexpressas em células HEK293T e HeLa. O método alternativo e mais acessível de transfecção empregando co-precipitado de fosfato de cálcio foi eficiente para a expressão das deubiquitinases em células HEK293T.
- Em células HeLa, USP2a e USP2b apresentaram pico de expressão entre 12 e 24 horas após a introdução dos plasmídeos de expressão.
- USP2a endógena pode ser enriquecida na fração de 30% de saturação de sulfato de amônio e visualizada diretamente com o anticorpo anti-USP2a (clone 4GD2).
- Anticorpo monoclonal 4GD2 imunoprecipita USP2a endógena, mostrando-se como interessante ferramenta na caracterização de parceiros moleculares desta deubiquitinase.
- Evidências experimentais sugerem que células superexpressando USP2b apresentam capacidade de estabilização de EGFR, inclusive superior, ao observado para a USP2a.

REFERÊNCIAS

- ALLENDE-VEGA, N. et al. MdmX is a substrate for the deubiquitinating enzyme USP2a. **Oncogene**, v. 29, n. 3, p. 432-441, jan. 2010. DOI: 10.1038/onc.2009.330.
- ALWAN, H. A.; VAN LEEUWEN, J. E. UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 3, p. 1658-1669, jan. 2007. DOI: 10.1074/jbc.M604711200.
- AMERIK, A. Y.; HOCHSTRASSER, M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1695, n. 1-3, p. 189-207, nov. 2004. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.10.003.
- BURKE, P.; SCHOOLER, K.; WILEY, H. S. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v.12, n. 6, p.1897-1910, jun. 2001. DOI: 10.1091/mbc.12.6.1897.
- CHUANG, S. J. et al. 6-Thioguanine is a noncompetitive and slow binding inhibitor of human deubiquitinating protease USP2. **Scientific Reports**, v. 8, n. 3102, fev. 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-21476-w.
- CLAGUE, M. J.; URBÉ, S. Endocytosis: the DUB version. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 11, p. 551-559, nov. 2006. DOI: 10.1016/j.tcb.2006.09.002.
- CLAGUE, M. J.; LIU, H.; URBÉ, S. Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. **Developmental Cell**, v. 23, n. 3, p. 457-467, set. 2012. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.08.011.
- CONTE, A.; SIGISMUND, S. Methods to Investigate EGFR Ubiquitination. **Methods in Molecular Biology**, v. 1652, p. 81-100, 2017. DOI: 10.1007/978-1-4939-7219-7_5.
- D'ARCY, P.; WANG, X.; LINDER, S. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 147, p. 32-54, mar. 2015. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.002.
- DIKIC, I.; GIORDANO, S. Negative receptor signalling. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, n. 2, p. 128-135, abr. 2003. DOI: 10.1016/s0955-0674(03)00004-8.
- DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of endocytosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 857-902, 2009. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- DUAN, L. et al. Cbl-mediated ubiquitylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28950-28960, ago. 2003. DOI: 10.1074/jbc.M304474200.

DUEX, J. E.; SORKIN, A. RNA interference screen identifies Usp18 as a regulator of epidermal growth factor receptor synthesis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 6, p. 1833-1844, mar. 2009. DOI: 10.1091/mbc.e08-08-0880.

FARESSE, N.; DEBONNEVILLE, A.; STAUB, O. USP2-45 Represses Aldosterone Mediated Responses by Decreasing Mineralocorticoid Receptor Availability. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 2-3, p. 462-472, 2013. DOI: 10.1159/000343382.

FUTTER, C. E. et al. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. **Journal of Cell Biology**, v. 132, n. 6, p. 1011-1023, mar. 1996. DOI: 10.1083/jcb.132.6.1011.

GIMENEZ, A. P. et al. Identification of novel putative-binding proteins for cellular prion protein and a specific interaction with the STIP1 homology and U-Box-containing protein 1. **Prion**, v. 9, n. 5, p. 355-366, 2015. DOI: 10.1080/19336896.2015.1075347.

GOH, L. K.; SORKIN, A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 5, maio 2013. DOI: 10.1101/cshperspect.a017459.

GOUSSEVA, N.; BAKER, R. T. Gene structure, alternate splicing, tissue distribution, cellular localization, and developmental expression pattern of mouse deubiquitinating enzyme isoforms Usp2-45 and Usp2-69. **Gene Expression**, v. 11, n. 3-4, p. 163-179, 2003.

GRANER, E. et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. **Cancer Cell**, v. 5, n. 3, p. 253-261, mar. 2004.

GREEN, A. A., HUGHES, W. L. Protein solubility on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods in Enzymology**, v.1, p. 67-90, 1995. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01014-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01014-8).

GRUENBERG, J. The endocytic pathway: a mosaico of domains. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n.10, p. 721-730, out. 2001. DOI: 10.1038/35096054.

HAGLUND, K. et al. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 5, p. 461-466, maio 2003. DOI: 10.1038/ncb983.

HAGLUND, K.; DIKIC, I. Ubiquitylation and cell signaling. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 24, n. 19, p. 3353-3359, out. 2005. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600808.

HEATON, S. M.; BORG, N. A.; DIXIT, V. M. Ubiquitin in the activation and attenuation of innate antiviral immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 1, p.1-13, jan. 2016. DOI: 10.1084/jem.20151531.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 425–479, 1998.

HOCHSTRASSER, M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 422-429, mar. 2009. DOI: 10.1038/nature07958.

HOELLER, D.; DIKIC, I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 438-444, mar. 2009. DOI: 10.1038/nature07960.

HUANG, T. T.; D'ANDREA, A. D. Regulation of DNA repair by ubiquitylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 323-334, maio 2006. DOI: 10.1038/nrm1908.

HUANG, F.; GOH, L. K.; SORKIN, A. EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 43, p. 16904-16909, out. 2007. DOI: 10.1073/pnas.0707416104.

HUANG, F. et al. Lysine 63-linked polyubiquitination is required for EGF receptor degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 39, p.15722-15727, set. 2013. DOI: 10.1073/pnas.1308014110.

JEONG, P. et al. Assess the expression of ubiquitin specific protease USP2a for bladder cancer diagnosis. **BMC Urology**, v. 15, n. 80, p.1-6, ago. 2015. DOI: 10.1186/s12894-015-0074-x.

JOHNSON, D. E. The ubiquitin–proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. **Endocrine-Related Cancer**, v. 22, n. 1, p.1-17, fev. 2015. DOI: 10.1530/ERC-14-0005.

KATZMANN, D. J.; BABST, M.; EMR, S. D. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. **Cell**, v. 106, n. 2, p. 145-155, jul. 2001. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00434-2.

KATZMANN, D. J.; ODORIZZI, G.; EMR, S.D. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 12, p. 893-905, dez. 2002. DOI: 10.1038/nrm973.

KOMANDER, D.; RAPE, M. The ubiquitin code. **Annual Review Biochemistry**, v. 81, p. 203-229, 2012. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060310-170328.

KOVACS, E. et al. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 84, p. 739-764, 2015. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034402.

LAUWERS, E.; JACOB, C.; ANDRÉ, B. K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. **The Journal of Cell Biology**, v. 185, n. 3, p. 493-502, maio 2009. DOI: 10.1083/jcb.200810114.

- LEVKOWITZ, G. et al. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. **Genes & Development**, v. 12, n. 23, p. 3663-3674, dez. 1998. DOI: 10.1101/gad.12.23.3663.
- LIU, Z. et al. The ubiquitin-specific protease USP2a prevents endocytosis mediated EGFR degradation. **Oncogene**, v. 32, n. 13, p. 1660-1669, mar. 2013. DOI: 10.1038/onc.2012.188.
- MA, Y. M. et al. Targeting of AMSH to endosomes is required for epidermal growth factor receptor degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9805-9812, mar. 2007. DOI: 10.1074/jbc.M611635200.
- MARMOR, M. D.; YARDEN, Y. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. **Oncogene**, v. 23, n. 11, p. 2057-2070, mar. 2004. DOI: 10.1038/sj.onc.1207390.
- MARTINS, V. R. et al. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Medicine**, v. 3, n. 12, p. 1376-82, 1997. DOI: 10.1038/nm1297-1376.
- MCCANN, A. P. et al. Deubiquitylating enzymes in receptor endocytosis and trafficking. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 24, p. 4507-4525, dez. 2016. DOI: 10.1042/BCJ20160826.
- MCCULLOUGH, J.; CLAGUE, M. J.; URBÉ S. AMSH is an endosome-associated ubiquitina isopeptidase. **The Journal of Cell Biology**, v. 166, n. 4, p. 487-492, ago. 2004. DOI: 10.1083/jcb.200401141.
- MELLINGHOFF, I. K.; CLOUGHESY, T. F.; MISCHEL, P. S. PTEN-mediated resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 2, p. 378-381, jan. 2007.
- MELKER, A. A. et al. C-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. **Journal of Cell Science**, v. 114, pt. 11, p. 2167-2178, jun. 2001.
- MIZUNO, E. et al. Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 11, p. 5163-5174, nov. 2005. DOI: 10.1091/mbc.e05-06-0560.
- MOLUSKY, M. M. et al. Ubiquitin-specific protease 2 regulates hepatic gluconeogenesis and diurnal glucose metabolism through 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1. **Diabetes**, v. 61, n. 5, p. 1025-1035, maio 2012. DOI: 10.2337/db11-0970.
- MOSESSON, Y. et al. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 24, p. 21323-21326, jun. 2003. DOI: 10.1074/jbc.C300096200.

NIJMAN, S. M. et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. **Cell**, v. 123. n. 5, p. 773-786, dez. 2005. DOI: 10.1016/j.cell.2005.11.007.

OBBERFELD, B. et al. Ubiquitin-specific protease 2-45 (Usp2-45) binds to epithelial Na⁺ channel (ENaC)-ubiquitylating enzyme Nedd4-2. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 301. n. 1, p. F189-F196, jul. 2011. DOI: 10.1152/ajprenal.00487.2010.

PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 503-533, 2001. DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.503.

POLO, S.; DI FIORE, P. P.; SIGISMUND, S. Keeping EGFR signaling in check ubiquitin is the guardian. **Cell Cycle**, v. 13, n. 5, p. 681-682, 2014. DOI: 10.4161/cc.27855.

PRIOLO, C. et al. The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis. **Cancer Research**, v. 66, n. 17, p. 8625-8632, set. 2006. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1374.

PRIOLO, C. et al. Targeting Deubiquitinating Enzymes. In: SAKAMOTO, K.; RUBIN, E. (ed.). **Modulation of Protein Stability in Cancer Therapy**, p. 121-146, 2009.

RENATUS, M. et al. Structural basis of ubiquitin recognition by the deubiquitinating protease USP2. **Structure**, v. 14. n. 8, p. 1293-1302, ago. 2006. DOI: 10.1016/j.str.2006.06.012.

REYES-TURCU, F. E.; VENTII, K. H.; WILKINSON, K. D. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 363-397, 2009. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526.

RIBEIRO, C. F. Caracterização bioquímica e funcional da deubiquitinase USP2a. 2016. 86f. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

ROCHA, S. R. Produção de bioferramentas para o estudo da deubiquitinase USP2. 2016. 73f. Curitiba: Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

ROUGIER, J. S. et al. Ubiquitin-specific protease USP2-45 acts as a molecular switch to promote alpha2delta-1-induced downregulation of Cav1.2 channels. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 467. n. 9, p. 1919-1929, set. 2015. DOI: 10.1007/s00424-014-1636-6.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SAVIO, M. G. et al. USP9X controls EGFR fate by deubiquitinating the endocytic adaptor Eps15. **Current Biology**, v. 26, n. 2, p. 173-183, jan. 2016. DOI: 10.1016/j.cub.2015.11.050.

SCHMIDT, M.; FINLEY, D. Regulation of proteasome activity in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 1, p. 13-25, jan. 2014. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.08.012.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 211-225, out. 2000. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00114-8.

SCOMA, H. D. et al. The de-ubiquitylating enzyme, USP2, is associated with the circadian clockwork and regulates its sensitivity to light. **PLoS One**, v. 6, n. 9, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025382.

SHEN, M. et al. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 17, n. 9, p. 1091-1108, set. 2013. DOI: 10.1517/14728222.2013.815728.

SIGISMUND, S. et al. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2760-2765, fev. 2005. DOI: 10.1073/pnas.0409817102.

SIGISMUND, S. et al. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. **Developmental Cell**, v. 15, n. 2, p. 209-219, ago. 2008. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.06.012.

SORKIN, A.; VON ZASTROW, M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 8, p. 600-614, ago. 2002. DOI: 10.1038/nrm883.

STEVENSON, L. F. et al. The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. **Embo Journal**, v. 26, n. 4, p. 976-986, fev. 2007. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601567.

TOMALA, M. D. et al. Identification of small-molecule inhibitors of USP2a. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 261-267, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.03.009.

VAN DER GEER, P.; HUNTER, T.; LINDBERG, R.A. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. **Annual Review of the Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 251-337, 1994. DOI: 10.1146/annurev.cb.10.110194.001343.

WANG, Z. et al. Development of a highly reliable assay for ubiquitin-specific protease 2 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 17, p. 4015-4018, set. 2017. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.07.059.

WINGFIELD, P. T. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**. Appendix 3F, maio 2001. DOI: 10.1002/0471140864.psa03fs13.

WOELK, T. et al. The ubiquitination code: a signalling problem. **Cell Division**, v. 2, p. 11, mar. 2007. DOI: 10.1186/1747-1028-2-11.

YE, Y.; RAPE, M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 11, p. 755-764, nov. 2009. DOI: 10.1038/nrm2780.

ZANATA, S. M. et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **Embo Journal**, v. 21, n. 13, p. 3307-3316, jul. 2002a. DOI: 10.1093/emboj/cdf325.

ZANATA, S. M. et al. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 471-477, jan. 2002b.

ZHANG, L. et al. Ubiquitin-specific protease 2b negatively regulates IFN-beta production and antiviral activity by targeting TANK-binding kinase 1. **Journal of Immunology**, v.193, n. 5, p. 2230-2237, set. 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1302634.