

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIA BARBIERI DEBIASI

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO EXON 2 DA USP2B E SEU USO COMO
ANTÍGENO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

CURITIBA

2021

JULIA BARBIERI DEBIASI

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO EXON 2 DA USP2B E SEU USO COMO
ANTÍGENO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

Co-orientadora: MSc. Soraia Ferreira

CURITIBA

2021

Este trabalho é dedicado a vocês, meus pais. Que me trouxeram até aqui e sempre foram minha segurança e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jair Marcelo Debiasi e Michelle Zambenedetti Barbieri, eu agradeço por todo carinho, esforço e paciência que vivencio desde a infância. Agradeço por serem meu lugar seguro e por serem minha referência de toda bondade no mundo. Meu coração é cheio de amor por vocês.

À toda minha família, eu agradeço pelo apoio incondicional ao meu sonho, mesmo que de longe. Por toda disposição em contribuir na minha trajetória, cada um com seu jeitinho. Agradeço a minha prima Cecília Debiasi Duarte, não só pela companhia nesses últimos anos em Curitiba, mas também por todas as revisões e dicas gramaticais (em várias línguas).

Aos meus amigos Eduarda Baggio Paglia e Gabriel Biberg Pinto, agradeço por todas as risadas e conselhos que deixam minha vida mais leve desde o último ano do ensino médio.

A todos os meus amigos de Curitiba, agradeço por serem meu amparo e alegria nos momentos mais difíceis da universidade. O caminho teria sido bem mais cansativo sem vocês.

Agradeço a todo grupo do laboratório pelo acolhimento e pelos incalculáveis auxílios nos experimentos. Em especial, à Soraia Ferreira, que me aceitou como sua pupila e dividiu comigo todo seu conhecimento com muita tranquilidade e consideração.

Ao meu orientador, Dr. Silvio Marques Zanata, agradeço por ter me admitido como sua aluna em uma circunstância tão incomum e complicada para mim. Agradeço pela oportunidade, por toda paciência, toda sabedoria transmitida e por reavivar meu amor pela ciência.

Aos que infelizmente nos deixaram, meus avós paternos, Jair Debiasi e Santa Vilma Debiasi, agradeço por terem me ensinado que é possível transformar a saudade em força. Eu tenho certeza que vocês estariam orgulhosos e com o coração alegre. Obrigada por todo amor em vida.

RESUMO

A ubiquitinação é um processo biológico indispensável para a homeostase celular. Por isso, é natural a exigência de um fino mecanismo regulatório. As deubiquitinases atuam nesse propósito por removerem a marcação de ubiquitina dos substratos proteicos, o que redireciona a finalidade da proteína. A USP2b é uma das isoformas da deubiquitina USP2 e ambas já foram associadas à patogênese de inúmeras doenças, incluindo o câncer. Por não existirem anticorpos comerciais eficientes na distinção das isoformas, faz-se necessário o desenvolvimento local dessa bioferramenta. Com esse recurso, o estudo da USP2b pode progredir em todos os aspectos, desde a pesquisa básica até a diagnóstica.

Palavras-chave: USP2; USP2b; anticorpo policlonal.

ABSTRACT

Ubiquitination is an essential biological process for cellular homeostasis. Therefore, a requirement for a fine regulatory mechanism is reasonable. Deubiquitinating enzymes serve this purpose by removing the ubiquitin tag from substrates, which redirects the protein's purpose. USP2b is one of the isoforms of the deubiquitin USP2, both have been associated with the pathogenesis of numerous diseases, including cancer. Local development of commercial antibodies is necessary, as the ones currently available are not efficient in distinguishing between the isoforms. Taking this initiative into account, the study of USPb can advance in all aspects, from basic research to diagnostics.

Key-words: USP2, USP2b, polyclonal antibodies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral da ubiquitinação	13
Figura 2 - Diferentes formas de ubiquitinação	13
Figura 3 - Estrutura cristalográfica geral do sítio catalítico da USP7.....	15
Figura 4 - Estrutura cristalográfica do complexo USP2-ubiquitina	16
Figura 5 - Plasmídeo pET28a 4rep	18
Figura 6 - Teste de solubilidade USP2b-4T recombinante.....	24
Figura 7 - Purificação após expressão em larga-escala: 1,5L de cultura	25
Figura 8 - Purificação após expressão em larga-escala: 3L de cultura	26
Figura 9 - Resultado ELISA.....	27
Figura 10 - Westernblotting	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM23 – Proteína com domínio desintegrina e metaloprotease 23
LB – Meio Luria-Bertani
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
DUB – Deubiquitinase
EGF – Fator de crescimento epidermal
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidermal
ELISA – Ensaio enzima-ligado de absorção
FAS – Ácido graxo sintase
IFN- β – Interferon β
IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
JAMM – Proteases Jab1/Mov34/Mpr1
MJD – Domínio de Machado-Joseph
OTU – Protease de tumor de ovário
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PTEN – Fosfatase homóloga à tensina
QSOX – Sulfidril oxidase 1
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
STI1 – Proteína induzida por estresse 1
SCB-UFPR – Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná
TBK-1 – Cinase TANK-binding 1
TCR – Receptor de célula T
Ub - Ubiquitina
UCH – Hidrolase de ubiquitina C-terminal
USP – Protease ubiquitina-específica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO GERAL	11
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 UBIQUITINAÇÃO	12
3.2 DEUBIQUITINASES.....	14
3.2.1 USP (Proteases ubiquitina-específicas)	14
3.3 ANTICORPOS POLICLONAIS.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 ABORDAGEM EXPERIMENTAL RESUMIDA.....	18
4.2 EXPRESSÃO DO PLASMÍDEO PET28A 4REP	19
4.3 LISE E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA USP2B RECOMBINANTE	20
4.4 DIÁLISE DA PROTEÍNA	20
4.5 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS E PRODUÇÃO SORO HIPERIMUNE	21
4.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE - ELISA.....	22
4.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE - WESTERNBLOTTING	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 EXPRESSÃO DO PLASMÍDEO PET28A 4REP	23
5.2 LISE E PURIFICAÇÃO DA USP2B-4T RECOMBINANTE	23
5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES EM REAGIR COM O ANTÍGENO RECOMBINANTE USP2B 4REP – ELISA.....	26
5.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES EM REAGIR COM A PROTEÍNA USP2B EXPRESSA EM CÉLULAS 293T - WESTERNBLOTTING	27
6 CONCLUSÃO	29

1 INTRODUÇÃO

A ubiquitinação é um mecanismo natural e relevante na manutenção da homeostase celular, em que a protagonista é a proteína ubiquitina: um polipeptídeo de 76 aminoácidos que marca substratos proteicos para os mais variados destinos (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998).

Por estar envolvido em inúmeras vias celulares, é necessário que esse processo seja finamente regulado. Sendo assim, a ubiquitinação é um processo bioquímico reversível, ação que é mediada pelas deubiquitinases (DUBs), enzimas que retiram a ubiquitina do substrato e encaminham a proteína para outro destino ou função. Qualquer desequilíbrio nesse processo pode promover respostas celulares anormais e colaborar para a patogênese de diversas doenças.

A deubiquitinase foco desse projeto é a USP2b, isoforma da USP2, que está envolvida em várias patologias (ZHU; GAO, 2017; KITAMURA; HASHIMOTO, 2021). No momento, nosso grupo de pesquisa tem interesse em elucidar o papel da USP2b como possível estabilizador do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) em diferentes linhagens celulares, uma vez que já demonstramos que a USP2a tem esta propriedade em células não pequenas de câncer de pulmão (LIU et al., 2013).

Nesta linha, trabalhos mais aprofundados são certamente necessários para definir a significância da USP2b na carcinogênese. Uma vez que anticorpos comerciais não estão disponíveis para esta deubiquitinase, a obtenção desta bioferramenta para o estudo da USP2b mostra-se relevante, tanto na investigação do papel da USP2b no contexto celular e de sinalização molecular, como no seu potencial uso no diagnóstico diferencial de tumores que tenham expressão modificada da USP2b.

2 OBJETIVO GERAL

Produzir um anticorpo policlonal em camundongos contra a proteína deubiquitinase USP2b.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar construção imunogênica da proteína recombinante USP2b em sistema procarioto
- Purificar a proteína por cromatografia de afinidade à metal imobilizado
- Imunizar animais para obtenção de anticorpos policlonais contra USP2b
- Avaliar a capacidade dos soros dos animais imunizados no reconhecimento específico da USP2b

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

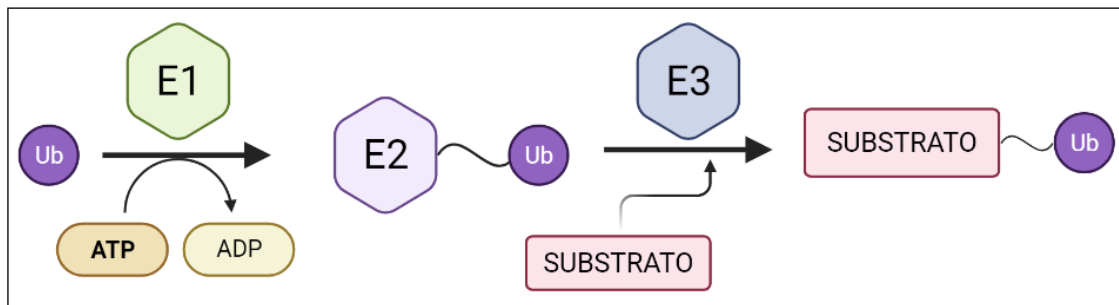
3.1 UBIQUITINAÇÃO

A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional em que resíduos de lisina são modificados com o polipeptídeo ubiquitina, o que geralmente resulta em marcação da proteína para degradação pela via do proteassomo (HERSHKO et al., 1983). A ubiquitina é ligada covalentemente a resíduos de lisina do substrato, o que ocorre de forma seriada em uma cascata de reações envolvendo três enzimas: ativadora de ubiquitina (E1), conjugadora de ubiquitina (E2) e ubiquitina ligase (E3). O primeiro passo é a ativação dependente de ATP da glicina 76 na extremidade C-terminal da ubiquitina pela enzima E1, então a Ub é transferida para o sítio ativo da enzima E2. Na sequência, a E3 ligase une o intermediário E2-Ub com a proteína alvo para catalisar a ligação entre a glicina C-terminal da ubiquitina e o resíduo de lisina do substrato (figura 1) (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998).

As proteínas podem ser poliubiquitinadas, monoubiquitinadas e multiubiquitinadas (figura 2). A mono ou multiubiquitinação envolve, tipicamente, endocitose, reparo de DNA e tráfego de proteínas (GRABBE; HUSNJAK; DIKIC, 2011). Substratos poliubiquitinados têm um maior espectro de resultados possíveis, uma vez que a topologia das cadeias de Ub e a localização celular das proteínas influenciam no destino apropriado. Desta forma, cadeias nas lisinas K48 e K11 são relacionadas à degradação pelo proteassomo, enquanto proteínas poliubiquitinadas

nas lisinas K6 e K27 são associadas às respostas ao dano no DNA e manutenção mitocondrial. Por fim, K29 e K33 poliubiquitinadas têm papel na degradação lisossomal e sinalização do TCR (receptor de célula T), respectivamente (MANSOUR, 2018). Sendo assim, é possível entender porque falhas no sistema de ubiquitinação são importantes no desenvolvimento de patologias como câncer, síndromes metabólicas, infecções e desordens neurodegenerativas (POPOVIC; VUCIC; DIKIC, 2014).

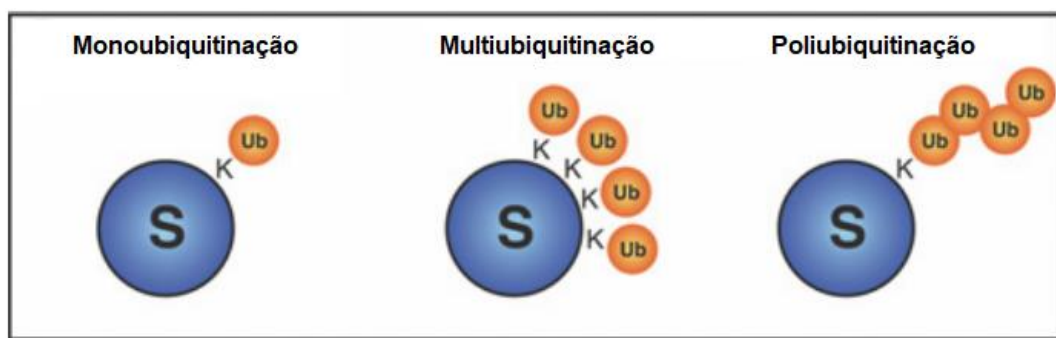
Figura 1 - Esquema geral da ubiquitinação



FONTE: A autora, 2021.

A ubiquitinação já mostrou ter um papel importante na degradação do EGFR em diversos estudos (LEVKOWITZ et al., 1999; JIANG et al., 2003; HUANG et al., 2006). Também foi observado que mais de 50% da ubiquitinação do EGFR ocorre por meio da poliubiquitinação do resíduo de lisina K63 (HUANG et al., 2006). Isso demonstra que o complexo é significativo para a endocitose do receptor (LIU et al., 2013).

Figura 2 - Diferentes formas de ubiquitinação



FONTE: Adaptado de (KOMANDER, 2009).

3.2 DEUBIQUITINASES

As deubiquitinases (DUBs) são proteases que, com base em seu mecanismo de catálise, pertencem às classes das cisteíno e metaloproteases. A maioria delas, entretanto, é considerada cisteíno-protease (NIJMAN et al., 2005). DUBs são responsáveis por clivar especificamente moléculas ligadas à Ub após a extremidade C-terminal do último resíduo de ubiquitina (Gly 76) (WILKINSON, 1997). A atividade e especificidade das DUBs podem variar dependendo de sua habilidade em reconhecer ubiquitina, mas todas elas possuem pelo menos um sítio ligante de Ub: o sítio S1. Ele guia a ubiquitina C-terminal para o sítio ativo, onde ocorre a hidrólise (MEVISSSEN; KOMANDER, 2017).

São descritas pelo menos 6 subfamílias de deubiquitinases, separadas de acordo com a similaridade de suas sequências e mecanismos de ação: USP, UCH, OTU, MJD, MINDY e JAMM. As cinco primeiras pertencem ao grupo das cisteíno-proteases, enquanto a última engloba metaloproteases dependentes de zinco (MEVISSSEN; KOMANDER, 2017).

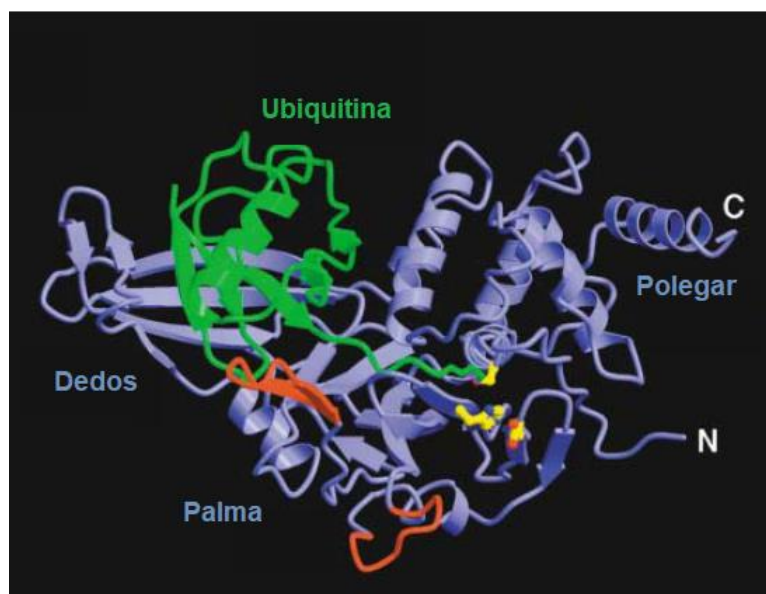
Deubiquitinases têm uma variedade de funções visando manter o equilíbrio de moléculas ubiquitinadas na célula, como: resgatar proteínas da degradação pelo proteassomo e lisossomo, reciclar ubiquitina e controlar o tráfego de proteínas (RUMPF; JENTSCH, 2006; NIKKO; ANDRE, 2007; RYU et al., 2007). DUBs também podem atuar como moléculas oncogênicas ou supressoras de tumor (BROOKS; GU, 2006; NICHOLSON et al., 2007).

3.2.1 USP (Proteases ubiquitina-específicas)

A subfamília USP é a com maior número de integrantes. As deubiquitinases desse grupo possuem um domínio catalítico conservado de aproximadamente 350 resíduos de aminoácidos. Esse domínio adota uma conformação que lembra uma mão aberta, com dedos, palma e polegar e foi primeiro estabelecido na USP7 (figura 3) (HU et al., 2002).

As funções fisiológicas das proteínas USP são variadas e muitas estão envolvidas em vias desreguladas de patologias humanas, como câncer e doenças neurodegenerativas (Kitamura e Hashimoto, 2021; Clague, Coulson e Urbé, 2012). A USP7, por exemplo, é bem conhecida por ter substratos associados à supressão tumoral, como p53, PTEN e FOXO4 (CLAGUE et al., 2013).

Figura 3 - Estrutura cristalográfica geral do sítio catalítico da USP7



FONTE: Adaptado de Hu et al., 2002

3.2.1.1 USP2

A proteína USP2 possui um desenho cristalográfico bem definido que inclui como estrutura secundária nove α -hélices e quatorze folhas- β (figura 4). USP2 e Ub possuem formatos complementares, o que pode explicar a alta seletividade dessas proteínas ao substrato ubiquitina. Como algumas outras USPs, a USP2 possui um sítio de ligação ao metal zinco, mas sua função ainda não foi muito bem estabelecida (RENATUS et al., 2006)

O gene da USP2 está localizado no cromossomo 11 humano e possui um total de 17 exons. Por processamento alternativo do RNA codifica para 7 variantes, sendo que 5 delas geram proteínas. Todas as isoformas possuem a mesma estrutura C-

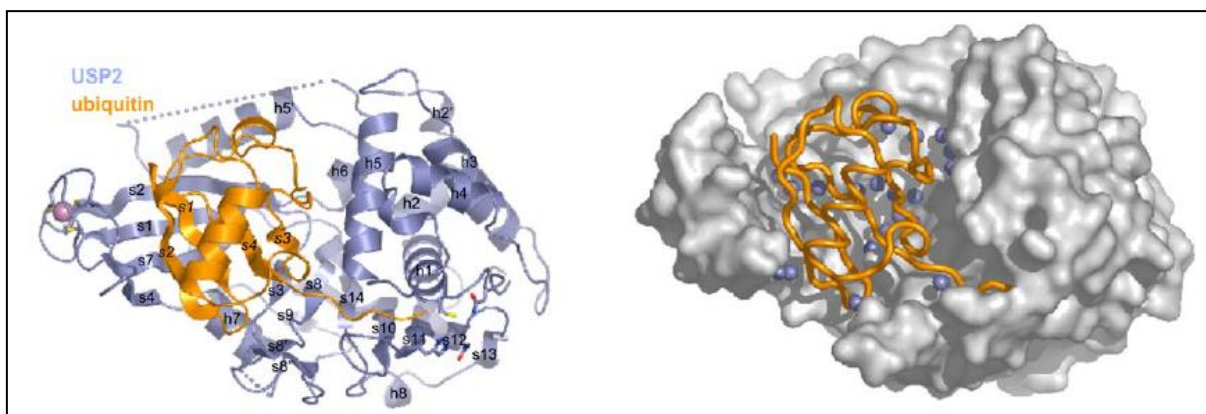
terminal (localização do sítio catalítico), e diferem apenas na composição N-terminal (ZHU; GAO, 2017).

A associação da USP2 com a tumorigenese já é bem estabelecida e estudada. Câncer de próstata, carcinoma hepatocelular, e glioma são tumores com alta expressão de USP2, por exemplo. Além disso, foi descoberto que a isoforma USP2a potencializa a estabilidade da enzima ácido graxo sintase (FASN) por inibir a degradação via proteassoma nos mesmos tipos tumorais. A FASN é uma enzima que age inibindo apoptose, o que confere um caráter oncogênico à USP2a (GRANER et al., 2004; CALVISI et al., 2011; REZA et al., 2016).

Outro alvo da USP2 é o EGFR. A expressão desse receptor na membrana plasmática é fortemente regulada por internalização, logo, problemas nesse mecanismo podem levar à ativação constitutiva de sinalização por EGF e consequente carcinogênese (DU et al., 2020). Em células não-pequenas de câncer de pulmão, foi descoberto que USP2a remove a cadeia de poliubiquitina de EGFR internalizado em endossomos primários, com potencial de aumentar a quantidade do receptor na membrana (LIU et al., 2013).

Evidências sugerem que a isoforma USP2b deubiquitina a enzima TBK1, que tem importante papel na resposta antiviral por induzir a expressão de INF- β . Para ser ativada, TBK1 precisa ser fosforilada ou poliubiquitinada, ou seja, a superexpressão de USP2b inativa esse processo e prejudica a resposta antiviral (ZHANG et al., 2014).

Figura 4 - Estrutura cristalográfica do complexo USP2-ubiquitina



FONTE: Adaptado de Renatus et. al., 2006.

3.3 ANTICORPOS POLICLONAIS

Anticorpos são glicoproteínas produzidas e secretadas por um tipo especializado de linfócitos B: os plasmócitos. Os anticorpos policlonais são denominados dessa forma pois cada linhagem (clone) de plasmócito produz um anticorpo contra um epítopo específico de determinado antígeno, o que deixa a especificidade dos anticorpos séricos bastante heterogênea. Ao isolar um único plasmócito secretor, obtém-se o anticorpo monoclonal, que reconhece o epítopo exclusivo definido por aquele clone (LIPMAN et al., 2005).

Os anticorpos são largamente utilizados como bioferramentas, tanto na pesquisa básica como na diagnóstica. Nosso grupo tem optado pela produção de anticorpos monoclonais e policlonais para a investigação de diferentes proteínas, destacando ST11 (ZANATA et al., 2002; DA FONSECA et al., 2021) QSOX1 (ZANATA et al., 2005) e ADAM23 (BORGONOVO et al., 2018).

Para anticorpos específicos contra USP2, incluindo aqueles capazes de distinguir as diferentes formas resultantes de processamento alternativo de RNA (e.g. USP2a e USP2b), infelizmente não existem reagentes comerciais disponíveis com garantia de especificidade. A título de exemplo, um anticorpo oferecido pela empresa Cell Signalling Technologies, Inc (produto #8036) se mostrou tão inespecífico e impróprio para uso (Silvio Zanata e Massimo Loda, relatório técnico privado e dados não publicados) que a empresa o retirou do mercado, após envio de relatório produzido pelo grupo de pesquisa.

Visto que temos estudado a USP2a e USP2b por mais de uma década, optamos pela produção local de anticorpos específicos para estas moléculas. Produzimos um hibridoma (4GD2, R. Rocha e S. Zanata, dados não publicados) específico para a USP2a, que não exhibe reação cruzada com USP2b, provavelmente por se ligar a um epítopo presente apenas no produto gênico do exon 1 (ROCHA, 2016).

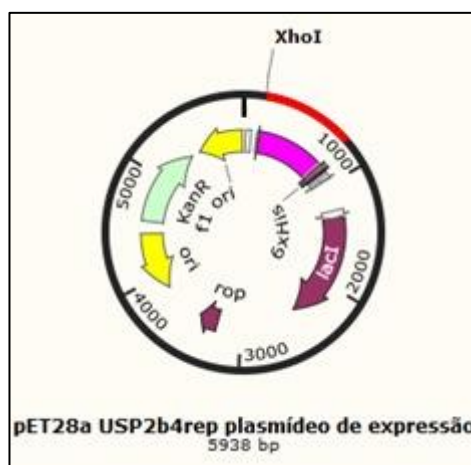
Neste projeto, pretendemos expressar apenas o exon diferencial da USP2b (exon 2) e utilizar a proteína obtida como antígeno na imunização de camundongos para a produção de anticorpos policlonais específicos contra a USP2b.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ABORDAGEM EXPERIMENTAL RESUMIDA

A sequência gênica que codifica o exon 2 da USP2b, e que não está presente na USP2a, foi clonada em vetor de expressão (pET28a). Como essa sequência, quando expressa, produz um polipeptídeo de apenas ca. 5,3 kDa, a ideia foi construir um vetor que expresse a sequência de interesse na forma de um tandem contendo 4 repetições do exon 2. Desta forma, temos a produção de uma proteína com ca. 26 kDa, que é mais conveniente para ser purificada e com maior potencialidade imunogênica em relação a um antígeno de menor massa molecular com apenas uma repetição do exon 2, por exemplo. Essa construção já estava disponível para uso no laboratório. O plasmídeo possui gene de resistência à canamicina e uma sequência codificante para cauda de histidinas, que será adicionada ao gene de interesse a fim de facilitar a purificação proteica.

Figura 5 - Plasmídeo pET28a 4rep



Nota: A linha em vermelho representa onde o gene será inserido, após o corte com as enzimas de restrição apropriadas.

As técnicas corriqueiramente empregadas para transformação de bactérias, propagação e purificação de plasmídeos e transfecção em células de mamíferos estão amplamente estabelecidas no grupo de pesquisa, conforme pode ser verificado pelas publicações mais recentes (DE SOUZA et al., 2014; BORGONOVO et al., 2018; SOUZA et al., 2021). As metodologias que envolvem a tecnologia do DNA recombinante foram levadas a cabo com o emprego de protocolos largamente

validados e publicados (AUSUBEL et al., 1988; HORNBECK, 1992). Anticorpos policlonais foram obtidos em camundongos, como descrito na literatura (HARLOW; LANE, 1988). A escolha de camundongos se dá pela facilidade de obtenção desses animais no Biotério do SCB-UFPR, simplicidade de manejo e pela perspectiva de uso dos esplenócitos dos animais hiperimunes na produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais. O uso de animais neste projeto foi aprovado pelo CEUA - Setor de Ciências Biológicas – UFPR. A caracterização dos anticorpos foi feita por ELISA (HORNBECK, 1992) e westernblotting (GALLAGHER et al., 1998).

4.2 EXPRESSÃO DO PLASMÍDEO PET28A 4REP

Bactérias da estirpe BL21DE3Star foram transformadas com o plasmídeo e selecionadas com o antibiótico canamicina (50µg/mL). As colônias obtidas foram utilizadas para uma mini expressão: em meio LB, as colônias foram crescidas e a expressão induzida com meio ZYM. Uma alíquota de cada amostra foi submetida à separação eletroforética por SDS-PAGE para confirmar a expressão da proteína.

As colônias que expressaram a proteína de interesse foram selecionadas para expressão em grande escala. Um pré-inóculo foi produzido com 20mL de meio LB, 20uL de canamicina (antibiótico de resistência do plasmídeo) e uma colônia de BL21DE3Star previamente transformada com pET28a 4rep e plaqueada. O pré-inóculo foi mantido durante a noite a 37°C com rotação de 150rpm. Na manhã seguinte, o inóculo foi elaborado com 980mL de meio LB com 1% de glucose, 980µL de canamicina e todo conteúdo do pré-inóculo. O recipiente foi mantido nas condições anteriores de temperatura e rotação. A glucose adicionada ao LB inibe a expressão proteica por impedir a ativação do operon lac, isso garante que a proteína recombinante não seja produzida enquanto as bactérias se multiplicam (importante no caso de proteínas tóxicas).

A densidade óptica do inóculo foi monitorada por espectrofotometria até atingir o valor de 1,0 (cerca de 6 horas). Isso garante que a concentração ideal de bactérias seja atingida para posterior indução da expressão proteica. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 6000 rpm para que o meio de cultivo pudesse ser trocado.

O sedimento resultante da centrifugação foi ressuscitado em meio ZYM (total de 1,5L). Então, adicionado 1,5ml de canamicina e MetalMix suficiente para concentração de 0,2ml/L. A solução foi mantida a 37°C com rotação de 150rpm durante a noite. Na manhã seguinte, a suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 6 mil rpm em 4°C. O sedimento foi ressuscitado em 30mL de água destilada e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante final foi descartado e os tubos com as bactérias congelados.

Foi realizada uma eletroforese em SDS-PAGE para confirmar a expressão proteica.

4.3 LISE E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA USP2B RECOMBINANTE

Depois de comprovada a expressão, o sedimento bacteriano congelado da seção anterior foi ressuscitado em tampão de lise nativo (50mM NaH₂PO₄ + 500mM NaCl) acrescido de coquetel de inibidores de protease (Roche®) e lisado na prensa de French. Na sequência, os tubos com a suspensão de bactérias lisadas foi centrifugado por 30 minutos a 9000xg em 4°C.

Como a USP2b recombinante é insolúvel, ela precipita e se mantém no sedimento. Assim, o agregado foi ressuscitado em tampão desnaturante (nativo + 8M de ureia) com coquetel de inibidores de protease (Roche®). A solução foi novamente centrifugada, nas mesmas condições, e o sobrenadante preservado.

A purificação foi realizada em resina de Ni-NTA agarose (ThermoFischer®). A coluna foi equilibrada com 500µL de tampão desnaturante e a exigência estabelecida com 20mM de imidazol. A amostra foi incubada e em seguida foram realizadas duas lavagens, a primeira com uma solução de 40mM de imidazol e a segunda com 60mM. A eluição foi executada com 300mM de imidazol.

4.4 DIÁLISE DA PROTEÍNA

A proteína recombinante purificada foi submetida a um processo de diálise, com o objetivo de retirar todo o imidazol proveniente da purificação e garantir uma solução com tampão apropriado para as imunizações.

A diálise foi realizada em quatro etapas, com concentrações decrescentes de ureia. Na primeira, o tampão PBS estava com 6M de ureia. A segunda etapa foi contra um tampão PBS com 4M de ureia e a terceira em 2M de ureia, todas por 2 horas em temperatura ambiente. O último passo foi dialisar contra um tampão PBS sem ureia a 4°C durante a noite.

4.5 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS E PRODUÇÃO SORO HIPERIMUNE

O uso de animais neste projeto foi aprovação pela CEUA - Setor de Ciências Biológicas – UFPR e está registrado sob número 1412.

Cinco camundongos da estirpe Balb/c foram imunizados duas vezes com intervalo de 21 dias entre as duas imunizações. A coleta de sangue foi feita 14 dias após a segunda imunização. Todas as administrações (volume total de 100 uL/animal) foram feitas por via intraperitoneal, com 20ug de antígeno recombinante solúvel por animal.

A primeira e segunda imunizações foram feitas, respectivamente, com adjuvante de Freund completo e incompleto. Para a produção da emulsão óleo-aquosa, partes iguais (v/v) de adjuvante e solução contendo antígeno foram emulsionados – a temperatura ambiente – em agitador tipo vortex na potência máxima por 15 minutos, de modo que não houvesse separação de fases após o término da incubação.

Para a coleta do sangue, os camundongos foram anestesiados com mistura (1:1) cloridrato de cetamina (10%, Laboratório Farmacêutico Syntec®)/ cloridrato de xilazina (2%, Syntec®), 25 uL da mistura por animal. Para facilitar a inoculação do anestésico, 25uL da mistura cetamina/xilazina foram acrescidos em 75uL de PBS e os 100 uL resultantes injetados em cada animal. O sangramento pelo plexo retro orbital foi feito com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, seguido da identificação de cada camundongo com um perfurador de orelha e hidratação dos olhos dos animais com salina, para evitar o ressecamento, até que o animal estivesse completamente desperto.

O sangue foi coletado em microtubos e incubado por 2 horas em temperatura ambiente e 4 - 16 horas a 4°C, para completa retração do coágulo. O soro foi então separado do coágulo por centrifugação a temperatura ambiente, por 10 minutos a

13.000xg (Sorvall Fresco®). O soro livre de eritrócitos foi transferido para novo tubo e mantido a 4°C até o momento de ser testado.

4.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE - ELISA

As alíquotas de soro hiperimune foram utilizadas para analisar a produção de anticorpos anti-USP2b 4rep pelos camundongos. Uma placa de 96 poços foi incubada com 50µL de proteína recombinante purificada (40ng/µL) e deixada a 4°C durante a noite. Na manhã seguinte, a placa foi lavada 5 vezes com água deionizada e foram adicionados 200µL de BSA 1% para bloqueio por 30 minutos. Mais 5 lavagens com água deionizada foram realizadas e, então, 100µL de soro diluído em BSA 1% foram adicionados em cada poço. A titulação foi entre 1:500 e 1:64000. Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada 5 vezes e na sequência adicionados 100µL de anticorpo anti-mouse (ThermoFischer) diluído em BSA 0,1% para concentração 1:5000. O anticorpo secundário foi incubado por 45 minutos e, por fim, 5 lavagens com água deionizada. O substrato utilizado para revelação foi o TMB (ThermoFischer), 100µL por poço até a coloração ficar intensa (cerca de 2 minutos). A reação foi interrompida com 20µL de 0,5M de ácido sulfúrico e a absorbância lida em 450nm.

4.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE - WESTERNBLOTTING

Para caracterizar os anticorpos presentes nos soros, foi corrido um gel SDS-PAGE com extratos de células 293T transfectadas com: plasmídeo de expressão para USP2b e plasmídeo de expressão para USP2a. A transferência para membrana de nitrocelulose foi imersa em tanque a 4°C por 1h30. Na sequência, a membrana foi bloqueada com leite exclusivo para o método (Bio-Rad®) diluído para 5% em tampão tris com tween (TBST) por 1 hora. Após o bloqueio, a membrana foi lavada em TBST e foi adicionado o soro dos animais diluído em leite 1% para concentração 1:500. Para os controles, foi utilizado anticorpo anti-HisTag 1:2000 (clone HIS.8, Invitrogen®) e anti-USP2a 1:500 (clone 4GD2, dados não publicados). Os anticorpos primários foram incubados durante a noite. No dia seguinte, a membrana foi lavada 5 vezes por 5

minutos cada e então incubada com anti-mouse (ThermoFischer®) dissolvido em leite 0,5% para concentração de 1:15000. Após as lavagens, a membrana foi revelada com Amersham ECL™ (GE Healthcare®).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPRESSÃO DO PLASMÍDEO PET28A 4REP

Foram realizados diversos testes empregando o meio LB, que é normalmente utilizado para o crescimento de bactérias transformadas e indução de expressão proteica por IPTG. Todavia, o rendimento da expressão não era como esperado, uma vez que não foi observada diferença de expressão da proteína de interesse, sob condições de presença ou ausência de IPTG (dados não mostrados). Além disso, a proteína recombinante parecia ser tóxica, inibindo o crescimento bacteriano, pois o padrão total de bandas proteicas separadas por SDS-PAGE apresentou menor intensidade nas culturas induzidas com IPTG do que os respectivos controles não induzidos (dados não mostrados).

Em razão disso, foi testado um protocolo de indução de expressão em meio ZYM, que se mostrou vantajoso. O meio ZYM é um meio de cultivo auto-indutor com uma composição mais rica se comparado ao LB, e sua eficácia na expressão de proteínas recombinantes dificilmente expressas através do uso de protocolos tradicionais está amplamente descrita na literatura (Studier, 2005; Studier, 2018; Crowley e cols., 2019).

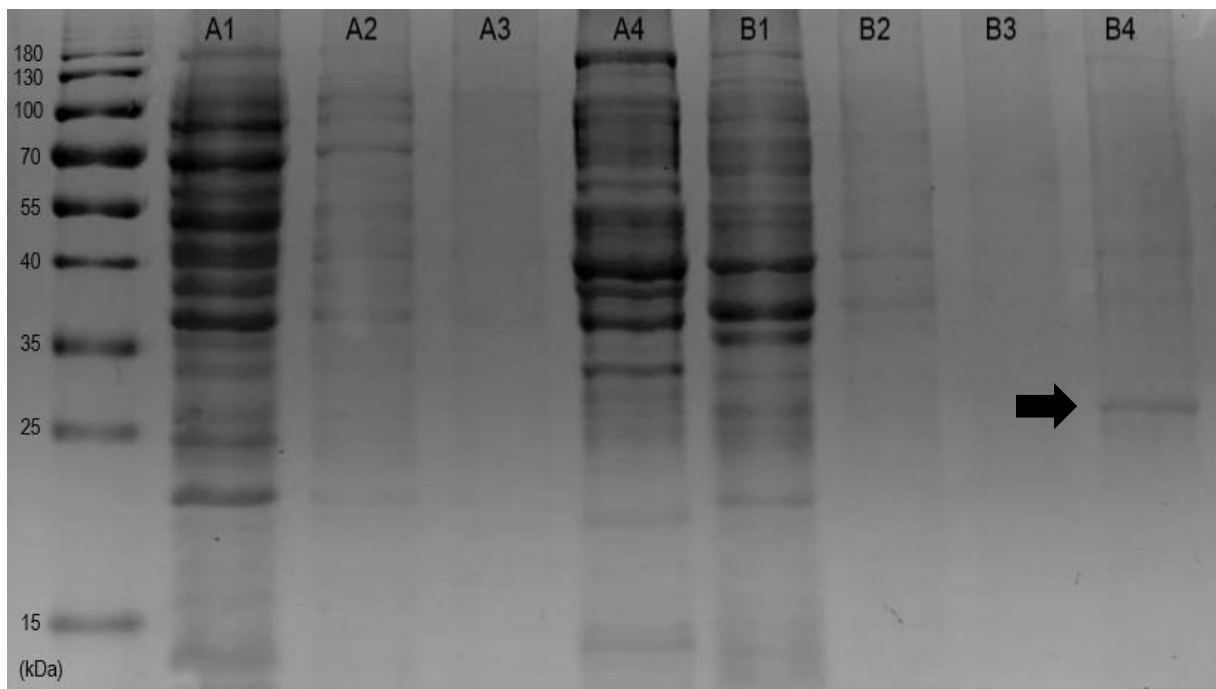
5.2 LISE E PURIFICAÇÃO DA USP2B-4T RECOMBINANTE

A partir de uma expressão em pequena escala, foi testada a solubilidade da proteína USP2b recombinante. Após a lise bacteriana em prensa de French, foram realizadas duas condições de purificação: (1) em tampão de lise nativo com o sobrenadante obtido por centrifugação e (2) solubilização do sedimento resultante desta centrifugação em tampão de lise desnaturante. Os produtos das purificações foram submetidos à separação eletroforética em SDS-PAGE e o resultado está

exposto na figura 6. As linhas A1 a A4 representam o teste em tampão de lise nativo e de B1 a B4 em tampão desnaturante. A USP2b-4T recombinante possui massa molecular aproximada de 26kDa e, apenas em B4, nota-se uma banda perto desse valor, indicando que a purificação foi eficiente na condição desnaturante.

Isso leva a duas possibilidades: (1) a proteína recombinante forma corpos de inclusão e precipita ou (2) a estrutura terciária da proteína é organizada de forma que a cauda de histidinas fique indisponível para ligação com o níquel da coluna, o que é solucionado com a desnaturação promovida pela ureia.

Figura 6 - Teste de solubilidade USP2b-4T recombinante



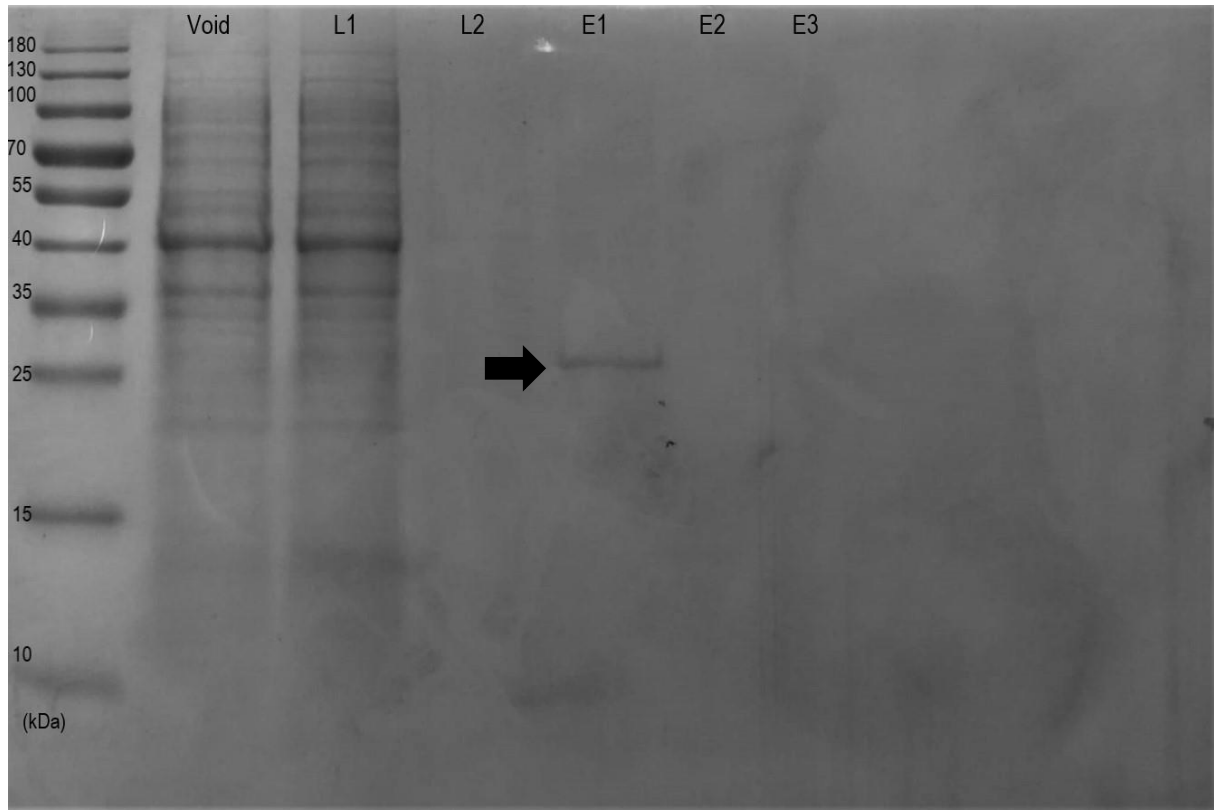
Nota: A1 – A4: purificação em condição nativa; B1 – B4: purificação em condição desnaturante. Linhas 1: separação do void (todo conteúdo que foi passado, mas não ligado na coluna). Linhas 2: Primeira lavagem (40mM de imidazol). Linhas 3: Segunda lavagem (60mM de imidazol). Linhas 4: eluição (300mM de imidazol). A seta evidencia a banda de ~26kDa correspondente à USP2b recombinante.

A USP2b-4T recombinante pode ser purificada pelo método citado pois possui uma cauda com 6 histidinas. Esse aminoácido tem afinidade com o níquel da resina e se liga fortemente à ela, assegurando que a proteína recombinante só seja eluída com uma solução bastante concentrada (acima de 0,1M) de imidazol (composto orgânico também com alta afinidade ao níquel).

A primeira expressão em larga escala (1,5L) demonstrou um rendimento satisfatório, mas ainda assim muito baixo para a quantidade de proteína necessária

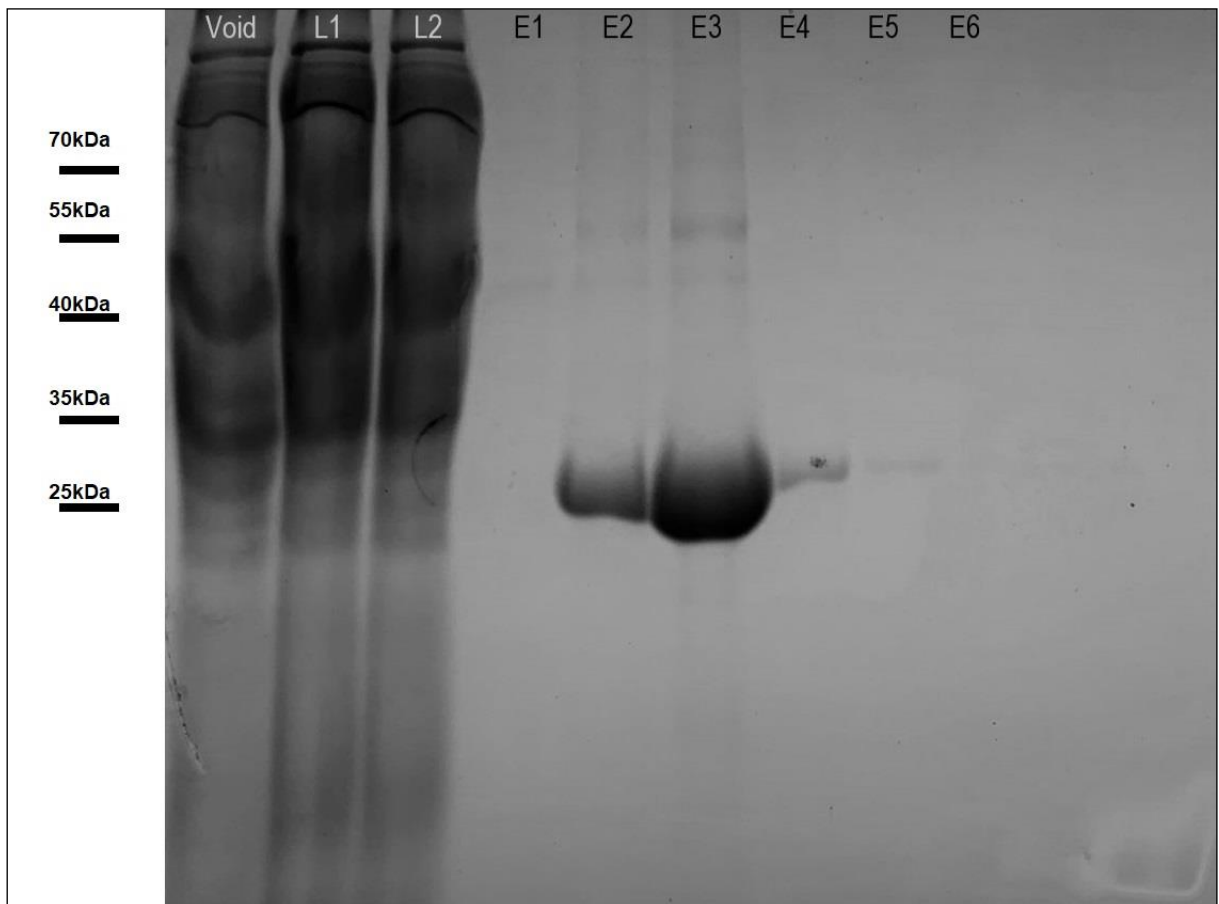
para as imunizações (fig. 7), pois a quantidade obtida foi de apenas 300µg/L. Dessa forma, desenvolveu-se a expressão em 3L de meio, o que garantiu um rendimento de 2,5mg/L (fig. 8)

Figura 7 - Purificação após expressão em larga-escala: 1,5L de cultura



Nota: Void: conteúdo passado, mas não ligado na coluna. L1: primeira lavagem (20mM de imidazol). L2: segunda lavagem (40mM de imidazol). E1: primeira fração da eluição (300mM de imidazol). E2: segunda fração da eluição. E3: terceira fração da eluição. A seta aponta uma banda fraca próxima a 25kDa (correspondente à proteína recombinante) indicando uma baixa concentração proteica.

Figura 8 - Purificação após expressão em larga-escala: 3L de cultura



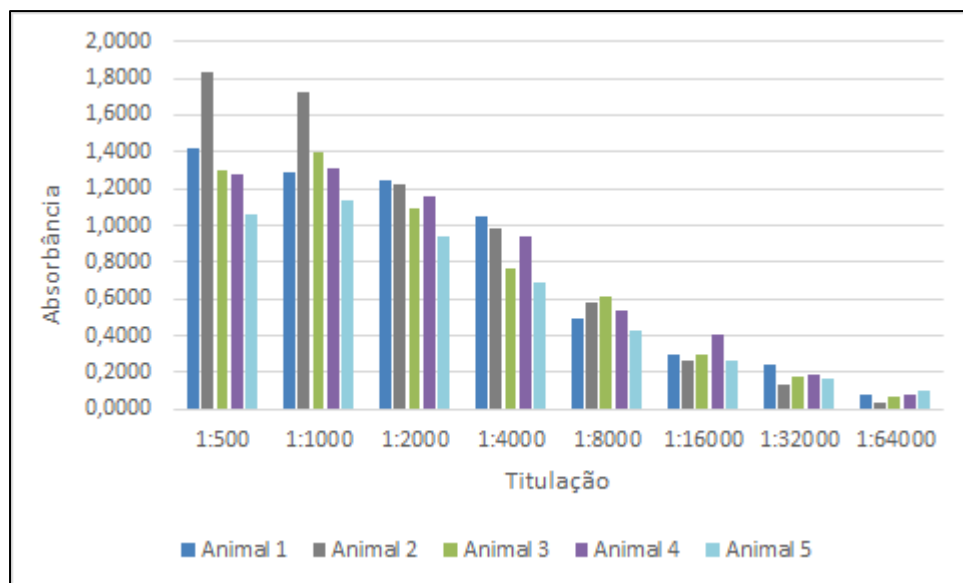
Nota: As bandas intensamente coradas com azul de Coomassie, próximas a 25kDa em E2 e E3, representam a grande quantidade de proteína USP2b recombinante purificada. Também é possível observar menor quantidade em E4 e E5. Void: conteúdo passado, mas não ligado na coluna. L1: primeira lavagem (20mM de imidazol). L2: segunda lavagem (40mM de imidazol). E1: primeira fração da eluição (300mM de imidazol). E2: segunda fração da eluição. E3: terceira fração da eluição.

5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES EM REAGIR COM O ANTÍGENO RECOMBINANTE USP2B 4REP – ELISA

Após a imunização de grupo contendo cinco animais e a obtenção dos soros hiperimunes dos camundongos, foram realizados testes de ELISA para identificar a presença de anticorpos capazes de reconhecer o antígeno USP2b-4T recombinante purificado. No primeiro ensaio, cada soro foi titulado a partir da concentração 1:100 até 1:800. Todos chegaram ao limite superior de detecção da técnica e ficaram com valores de absorbância visivelmente saturados. Por conta disso, foi desenhado um segundo experimento com titulação entre 1:500 e 1:64000. Na figura 9, nota-se que todos os soros apresentaram positividade frente ao antígeno. Ainda, diluições na faixa

de 1:32000 continuam se mostrando específicas frente ao antígeno, uma vez que a absorbância do controle negativo pareado (mesma diluição do soro, mas ausência de antígeno adsorvido) apresentou valores baixos e comparáveis ao da condição de ausência de soro. Esse resultado sugere que os animais produziram uma resposta imune adaptativa humoral bastante satisfatória frente o antígeno de interesse.

Figura 9 - Resultado ELISA



Nota: O gráfico foi gerado a partir dos valores absolutos (absorbância do controle diminuída da absorbância do teste). Percebe-se uma diminuição gradual com titulação satisfatória até a diluição de 1:64000.

5.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS SOROS HIPERIMUNES EM REAGIR COM A PROTEÍNA USP2B EXPRESSA EM CÉLULAS 293T - WESTERNBLOTTING

Para que seja um reagente útil nas pesquisas desenvolvidas pelo nosso grupo, é fundamental que os anticorpos produzidos contra a proteína recombinante USP2b-4T sejam capazes de se ligar a USP2b endógena ou superexpressa em células/linhagens de mamíferos. Espera-se que o soro funcione como um reagente

que identifique, de forma inequívoca, a USP2b em uma mistura complexa de proteínas.

Por conta disso, os soros hiperimunes foram reagidos com extratos proteicos de células da linhagem de 293T (rim de embrião humano) transfectadas com o plasmídeo de expressão para a USP2b. (Fig.10). Como alternativa de controle negativo, optou-se por transfectar a mesma linhagem com o vetor de expressão que codifica a isoforma USP2a (Fig. 10, linhas ímpares). Assim, pode-se avaliar, simultaneamente, a capacidade dos soros em reconhecer USP2b e não apresentar reatividade com a isoforma USP2a. Na Figura 10, a banda forte na linha 3 é correspondente à isoforma USP2a, com super expressão evidenciada pelo uso do anticorpo monoclonal 4GD2 produzido pelo nosso grupo e garante que as células foram transfectadas corretamente. Nas linhas 6, 8, 10, 12 e 14 observam-se bandas de massa molecular correspondente à USP2b, indicando que o soro produzido reconhece banda compatível com a massa molecular esperada para a USP2b superexpressa nesta linhagem (aprox. 45 kDa). A inexistência de bandas coincidentes com USP2a nas linhas 5, 7, 9, 11 e 13 (controles transfectados com USP2a) sugere que o soro não apresenta reatividade cruzada entre as isoformas.

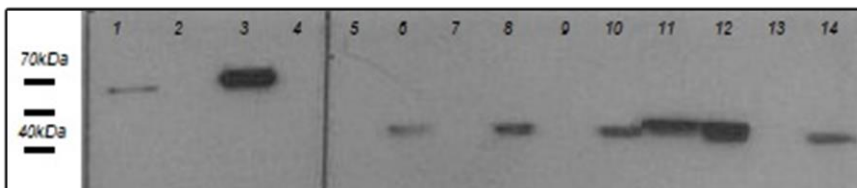
No animal 4, entretanto, nota-se uma banda correspondente à USP2b na linha 11 (controle), que não pode ser explicada apenas com os ensaios realizados. Existe a possibilidade de se tratar de alguma condição pré-imunização do próprio animal, ou mesmo alguma ligação inespecífica de outras imunoglobulinas presentes no soro. Para melhor elucidação, outros testes se mostram necessários.

Outro ponto que levanta dúvidas é a banda de aproximadamente 70kDa na linha 1, pois não se tem conhecimento de que o plasmídeo transfectado tenha uma cauda de histidinas. Portanto, pode se tratar de algum produto espúrio derivado do anticorpo primário ou mesmo alguma reação inespecífica.

Ainda, nota-se a ausência de bandas na linha 2, onde se esperaria uma marcação demonstrando a presença de USP2b por meio da cauda de histidinas (controle positivo). Apesar disso, os dados apresentados nas linhas 5 a 14 sugerem fortemente que os soros hiperimunes produzidos estão se ligando especificamente a USP2b super expressa na linhagem 293T, uma vez que nenhuma é evidenciada na linhagem não transfectada com vetor de expressão para esta proteína. Ainda, a ausência de reconhecimento da proteína USP2b endógena poderia ser explicado pela

ausência ou baixa expressão desta proteína por esta linhagem ou sob estas condições experimentais. De fato, dados do nosso grupo mostram que a expressão endógena da USP2 não é facilmente detectada (Liu, Zanata e cols., 2013; Zanata e Loda, dados não publicados) sugerindo forte controle espacial/temporal de expressão desta molécula no contexto celular.

Figura 10 - Westernblotting



Nota: linhas 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 são reações controle: células 293T transfectadas apenas com plasmídeo para USP2a. Linhas 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 são provenientes de células transfectadas com plasmídeo para USP2b. Linhas 1 e 2 são resultados da incubação com anticorpo primário anti-HisTag. Linhas 3 e 4 são resultados da incubação com anticorpo primário anti-USP2a. Linhas 5 a 14 foram incubadas com soro hiperimune (diluição 1:500). A banda presente na linha 1 não representa o esperado, uma vez que o plasmídeo USP2a não possui cauda de histidinas. A banda na linha 3 demonstra que o controle positivo foi efetivo, pois USP2a (~70kDa) reagiu com anti-USP2a. As bandas em 6, 8, 10, 12 e 14 indicam que o soro foi capaz de reconhecer a isoforma USP2b, sem reatividade cruzada com a isoforma USP2a pois não apareceram bandas ~70kDa em 5, 7, 9, 11 e 13. A banda de ~40kDa na linha 11 deve ser melhor elucidada, mas não pode indicar USP2a por conta de sua massa molecular.

6 CONCLUSÃO

- O rendimento da expressão proteica observado é bastante satisfatório nas condições estabelecidas;
- A proteína recombinante USP2b 4rep é insolúvel e, portanto, deve ser purificada em condições desnaturantes;
- A produção de anticorpos policlonais contra a proteína recombinante USP2b-4T pelos camundongos foi eficiente;
- Os animais produziram soros hiperimunes que reconhecem a proteína USP2b completa super expressa na linhagem de rim de embrião humano (293T), o que é de extrema importância para os próximos passos para a produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais

REFERÊNCIAS

- AUSUBEL, M. et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, v. 1;2, 1988.
- BORGONOVO, Z. L. M. et al. Monoclonal Antibody DL11C8 Identifies ADAM23 as a Component of Lipid Raft Microdomains. *Neuroscience*, v. 384, p. 165–177, 2018.
- BROOKS, C. L.; GU, W. p53 Ubiquitination : Mdm2 and Beyond Review. *Molecular Cell*, v. 53, p. 307–315, 2006.
- CALVISI, D. F. et al. Increased Lipogenesis, Induced by AKT-mTORC1-RPS6 Signaling, Promotes Development of Human Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, p. 1071–1083, 2011.
- CLAGUE, M. J. et al. Deubiquitylases From Genes to Organism. *Physiological Reviews*, v. 93, p. 1289–1315, 2013.
- CLAGUE, M. J.; COULSON, J. M.; URBÉ, S. Cellular functions of the DUBs. *Journal of Cell Science*, v. 124, p. 277–286, 2012.
- DA FONSECA, A. C. C. et al. The multiple functions of the co-chaperone stress inducible protein 1. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, v. 57, n. June, p. 73–84, 2021.
- DE SOUZA, L. E. R. et al. STI1 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. *Experimental Cell Research*, v. 324, n. 1, p. 84–91, 2014.
- DU, R. et al. SDCBP / MDA-9 / syntenin phosphorylation by AURKA promotes esophageal squamous cell carcinoma progression through the EGFR-PI3K-Akt signaling pathway. *Oncogene*, n. 127, 2020.
- GALLAGHER, S. et al. *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley and Sons, p. 1–20, 1998.
- GRABBE, C.; HUSNJAK, K.; DIKIC, I. The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 12, n. 5, p. 295–307, 2011.
- GRANER, E. et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*, v. 5, n. March, p. 253–261, 2004.
- HARLOW, E.; LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory, v. 17, n. 4, p. 726, 1988.

HERSHKO, A. et al. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, v. 258, n. 13, p. 8206–8214, 1983.

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

HORNBECK, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*, v. 1, n. 1, p. 2.1.1-2.1.22, 1992.

HU, M. et al. Crystal Structure of a UBP-Family Deubiquitinating Enzyme in Isolation and in Complex with Ubiquitin Aldehyde. *Cell*, v. 111, p. 1041–1054, 2002.

HUANG, F. et al. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Molecular Cell*, v. 21, n. 6, p. 737–748, 2006.

JIANG, X. et al. Grb2 Regulates Internalization of EGF Receptors through Clathrin-coated Pits. *Molecular Biology of the Cell*, v. 14, n. March, p. 858–870, 2003.

KITAMURA, H.; HASHIMOTO, M. USP2-related cellular signaling and consequent pathophysiological outcomes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 3, p. 1–32, 2021.

KOMANDER, D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, v. 37, n. 5, p. 937–953, 2009.

LEVKOWITZ, G. et al. Ubiquitin Ligase Activity and Tyrosine Phosphorylation Underlie Suppression of Growth Factor Signaling by c-Cbl / Sli-1. *Molecular Cell*, v. 4, p. 1029–1040, 1999.

LIPMAN, N. S. et al. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal*, v. 46, n. 3, p. 258–267, 2005.

LIU, Z. et al. The ubiquitin-specific protease USP2a prevents endocytosis-mediated EGFR degradation. *Oncogene*, v. 32, n. 13, p. 1660–1669, 2013.

MANSOUR, M. A. Ubiquitination: Friend and foe in cancer. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 101, p. 80–93, 2018.

MEVISSEN, T. E. T.; KOMANDER, D. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, v. 86, p. 34.1-34.33, 2017.

NICHOLSON, B. et al. Deubiquitinating enzymes as novel anticancer targets. *Future Oncology*, v. 3, p. 191–199, 2007.

NIJMAN, S. M. B. et al. Review A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes. *Cell*, v. 123, p. 773–786, 2005.

NIKKO, E.; ANDRE, B. Evidence for a Direct Role of the Doa4 Deubiquitinating Enzyme in Protein Sorting into the MVB Pathway. *Traffic*, v. 8, p. 566–581, 2007.

POPOVIC, D.; VUCIC, D.; DIKIC, I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nature Medicine*, v. 20, n. 11, p. 1242–1253, 2014.

RENATUS, M. et al. Structural Basis of Ubiquitin Recognition by the Deubiquitinating Protease USP2. *Structure*, v. 14, p. 1293–1302, 2006.

REZA, M. et al. Journal of the Neurological Sciences Overexpression of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in human gliomas. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 363, p. 249–252, 2016.

ROCHA, R. S. Produção de Bioferramentas Para O Estudo Da Deubiquitinase USP2. 2016. 2016.

RUMPF, S.; JENTSCH, S. Functional Division of Substrate Processing Cofactors of the Ubiquitin-Selective Cdc48 Chaperone. *Molecular Cell*, v. 21, p. 261–269, 2006.

RYU, K. et al. The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development , cell-cycle progression and. *The EMBO Journal*, v. 26, n. 11, p. 2693–2706, 2007.

SOUZA, I. L. M. et al. Endocytosis of the non-catalytic ADAM23: Recycling and long half-life properties. *Experimental Cell Research*, v. 398, n. 2, 2021.

WILKINSON, K. D. Regulation of ubiquitin- dependent processes by deubiquitinating enzymes. *The FASEB Journal*, v. 11, n. 14, p. 1245–1256, 1997.

ZANATA, S. M. et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *The EMBO Journal*, v. 21, n. 13, p. 3307–3316, 2002.

ZANATA, S. M. et al. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. *Redox Report*, v. 10, n. 6, p. 319–323, 2005.

ZHANG, L. et al. Ubiquitin-Specific Protease 2b Negatively Regulates IFN- β Production and Antiviral Activity by Targeting TANK-Binding Kinase 1. *The Journal of Immunology*, v. 193, p. 2230–2237, 2014.

ZHU, H.; GAO, F. The Molecular Mechanisms of Regulation on USP2 's Alternative Splicing and the Significance of Its Products. *International Journal of Biological Sciences*, v. 13, p. 1489–1496, 2017.