

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROBERTA SCHRODER ROCHA

**PRODUÇÃO DE BIOFERRAMENTAS PARA O ESTUDO DA
DEUBIQUITINASE USP2**

CURITIBA

2016

ROBERTA SCHRODER ROCHA

**PRODUÇÃO DE BIOFERRAMENTAS PARA O ESTUDO DA
DEUBIQUITINASE USP2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA-PR

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Rocha, Roberta Schroder

Produção de bioferramentas para o estudo da deubiquitinase USP2. /
Roberta Schroder Rocha. – Curitiba, 2016.
70 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Silvio Marques Zanata

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Ubiquitina 2. Anticorpos monoclonais 3. Proteínas I. Título II.
Zanata, Silvio Marques III. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

CDD (20. ed.) 574.19296

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Examinador/Afiliação

Assinatura

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Luiza Helena Gremski
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Priscilla Fanini Wowk
Instituto Carlos Chagas - ICC

Suplente:

Prof. Dr. Marcel Ramirez
Universidade Federal do Paraná

Após arguir a mestrandia **Roberta Schroder Rocha**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Produção de bioferramentas para o estudo da deubiquitinase USP2", são de parecer favorável à APROVAÇÃO..... da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 12 de Dezembro de 2016



Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por toda a dedicação e apoio durante todos esses anos de estudo, inclusive me acompanhando no laboratório tarde da noite e nos finais de semana. Agradeço pela confiança e investimento no meu crescimento profissional e pessoal.

À minha família, Marlene, Danielle, Patrick, Cibelle, Danilo e Brian por mesmo distante estarem sempre perto apoiando e torcendo por mim.

Agradeço meu orientador, Dr. Silvio Marques Zanata por toda a confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e por ter me dado a oportunidade de crescer tanto profissionalmente quanto pessoalmente.

Às professoras Dra. Adriana Mercadante e Dra. Lia Nakao pela boa convivência, ensinamentos e disponibilização de equipamento e reagentes durante o período passado no laboratório de neurobiologia.

Ao Max Ingberman e Celso Fávoro pela amizade, por terem me aceitado na Imunova e pela paciência de me ensinar tudo do zero.

À Imunova pela oportunidade de realizar meu estágio obrigatório que foi o início de toda essa jornada.

Ao Luiz Rizzo pelas infinitas ajudas com as imunizações, coleta de sangue dos animais e amizade.

À Caroline Fidalgo por toda a ajuda dentro do laboratório, pelos primers construídos juntos, pela ajuda com USP e principalmente pela amizade.

Às queridas amigas do lab Neurobiologia, Larissa Richter, Zaine Lyra, Camila Vianna, Ingrid Souza, Karime França, Silvia Rodrigues, Maiara Lazaretti e Letícia Baby pela amizade, conversas, saídas e apoio incondicional.

Aos demais colegas do Laboratório, Valentin, Soraia, Sze, Carla, Nathly, Bruna e Susumo obrigada pela convivência e disposição de sempre ajudar.

Aos alunos de iniciação científica, Bruno, Evellyn, Isabela e, principalmente, Pedro Sousa e Henrique Luithardt pela ajuda nos experimentos e amizade.

Ao Laboratório de Matriz Extracelular (LME) pelos empréstimos de reagentes e equipamentos.

Aos amigos Adriano Morgon, Thiago e Gabriel do LME por sempre estarem disponíveis para me socorrer com algum reagente, opiniões e ideias.

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

Aos meus amigos da farmácia pra vida, Maiana Marçal e José Lucas pelas conversas intermináveis e apoio incondicional.

Ao meu melhor amigo, confidente e apoiador, Henrique Kotovicz por todos os puxões de orelha e opiniões que me ajudaram durante toda essa jornada.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR por todo o suporte.

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

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

Meus agradecimentos a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o desenvolvimento da minha formação durante este período.

RESUMO

A ubiquitinação está envolvida em vários processos no organismo, desde ciclo celular até vias de sinalização de apoptose. Por esse amplo envolvimento, é de extrema importância uma fina regulação que é realizada por enzimas chamadas deubiquitinases (DUBs) que hidrolisam ligações isopeptídicas. Dentre todas as DUBs, USP é a família mais extensa tendo como membro USP2 que possui duas isoformas fruto de processamento alternativo: USP2a (de 69kDa) e USP2b (de 45kDa) que se diferenciam apenas na região N-terminal. Alguns estudos relacionam essas isoformas com a via da p53, miogênese, tumores de próstata, agressividade de tumores de mama e manutenção dos níveis de Na^+ e pressão sanguínea. Apesar desses estudos, a distribuição tecidual da USP2 ainda não está completamente estabelecida. A presença de duas isoformas distintas de processamento e a inexistência de anticorpos comerciais que possam distinguir entre as duas isoformas justifica a produção de reagentes confiáveis para o estudo de USP2. Desde modo, o objetivo foi produzir anticorpo monoclonal, isoforma específico, para USP2a e clonar, produzir proteína recombinante em bactérias e superexpressar USP2b em células eucariontes. USP2a foi produzida em *E. coli* BL21(DE3)STAR fusionada com etiqueta de histidina e purificada por coluna de Ni-NTA. A proteína purificada foi usada para imunizar camundongos balb/c. O soro policlonal desses animais foi testado por western blot para a presença de anticorpo anti-USP2a quanto ao reconhecimento da proteína endógena e superexpressa em linhagens de próstata LNCaP e RWPE-1 tendo dois animais positivos usados para a fusão com mieloma. Os hibridomas após a diluição limitante foram varridos por ELISA chegando-se a um clone 4GD2 que reconheceu USP2a superexpressa em HEK293T e não reconheceu USP2b superexpressa em HEK293T, indicando que obteve-se sucesso na produção de um anticorpo monoclonal isoforma específico para USP2a. Além disso, a isoforma USP2b foi clonada com sucesso nos vetores pET28a(+) e pcDNA3.1(-)6his. Esta isoforma não foi expressa em *E. coli* mesmo com várias mudanças no sistema, desde cepa bacteriana até temperatura, meio e tempo de expressão, mas foi superexpressa em HEK293T. As ferramentas produzidas serão de extrema importância para estudos de mapeamento tecidual, análise de cinética e busca de novos parceiros moleculares para essas isoformas.

Palavras-chave: USP2, USP2a, USP2b, anticorpo monoclonal, proteína recombinante.

ABSTRACT

Several physiological processes involve ubiquitylating modification, from cell cycle to apoptosis pathways. Because this involvement has a large range, it is extremely important that this post-translational modification be tightly regulated. Enzymes called deubiquitinases (DUBs) hydrolyze isopeptide bond and have a pivotal role in this regulation. Among all DUBs, the USP is the largest family. USP2, a member of this family, has two isoforms from alternative splicing: USP2a (69kDa) and USP2b (45kDa) and differences rely within their N-terminal regions. These isoforms have related to p53 pathway, myogenesis, prostate tumors, breast tumors aggressiveness and maintenance of Na⁺ levels and blood pressure. Despite these studies, the tissue distribution of USP2 is not completely established. Absences of commercial antibody that recognize specific isoforms justify the production of reliable reagents to study USP2. Thus, the aims of this study were (1) to express both USP2a and USP2b in heterologous bacterial system; (2) to overexpress USP2b in mammalian cells and (3) to produce monoclonal antibodies specific to USP2a isoform. USP2a was produced in *E. coli* BL21(DE3)STAR fused with polyhistidine tag and purified by Ni-NTA column. The purified protein was used to immunize Balb/c mice strain. We have tested the polyclonal serum of these animals by western blot to the presence of antibody anti-USP2a that recognize endogenous and overexpressed protein in prostate line LNCaP and RWPE-1. Two animals were positive and employed in fusion procedures. After hybridoma supernatant screenings for anti-USP2a presence by ELISA, we isolated the clone 4GD2, which was stable and still secreting antibodies after several freeze-thaw cycles. Monoclonal antibody 4GD2 recognizes USP2a overexpressed in HEK293T cells and does not cross-react with USP2b, suggesting that MoAb 4GD2 is highly specific. In addition, USP2b was successfully cloned in pET28a(+) and pcDNA3.1(-)6his vectors, both expression vectors for prokaryotic and eukaryotic systems, respectively. We were not able to express successfully USP2b in *E. coli* under different protocols (e.g. temperature, medium and time parameters changes), however we expressed His-tagged USP2b in HEK293T cells. The produced tools will be extremely important in further studies, such as tissue and temporal USP2 expression mapping, USP2 expression and disappearing kinetics in cell lines and characterization of new molecular partners for this DUB.

Key words: USP2, USP2a, USP2b, monoclonal antibody and recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE UBIQUITINAÇÃO.....	15
FIGURA 2 - UBIQUITINAÇÃO E SUAS MODIFICAÇÕES CELULARES.....	17
FIGURA 3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO PROTEASSOMO 26S.....	18
FIGURA 4 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL POR FUSÃO.....	33
FIGURA 5 – ESQUEMA DE REPRESENTAÇÃO DA DILUIÇÃO LIMITANTE.....	35
FIGURA 6 – EXPRESSÃO DE USP2a É INDUZIDA POR IPTG EM ENSAIO DE MINI-EXPRESSÃO.	42
FIGURA 7 – USP2a É PURIFICADA EM COLUNA DE Ni-NTA AGAROSE.....	44
FIGURA 8 – SORO POLICLONAL RECONHECE USP2a SUPEREXPRESSA E ENDÓGENA EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.....	45
FIGURA 9 – HIBRIDOMA PRODUZINDO ANTICORPOS ANTI-USP2a.	46
FIGURA 10 – HIBRIDOMAS PRODUZINDO ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-USP2a APÓS DILUIÇÃO LIMITANTE.	47
FIGURA 11 – ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-USP2a 4GD2 RECONHECE USP2a SUPEREXPRESSA EM CÉLULAS HEK293T.	49
FIGURA 12 – ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-USP2A 4GD2 É ESPECÍFICO PARA A ISOFORMA USP2a.....	50
FIGURA 13 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA REFERÊNCIA COM O VETOR pET28a(+)+USP2b CLONADO.	51
FIGURA 14 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA REFERÊNCIA COM O VETOR pcDNA(-)6his+USP2b CLONADO.....	52
FIGURA 15 - USP2b NÃO É EXPRESSA EM <i>E. coli</i> BL21 (DE3) STAR COM INDUÇÃO DE 0,2mM DE IPTG A 37°C POR 3h EM MEIO LB.....	53
FIGURA 16 - USP2b NÃO É EXPRESSA EM <i>E. coli</i> BL21 (DE3) STAR COM INDUÇÃO DE 1mM DE IPTG A 30°C POR 3h EM MEIO LB.....	54

FIGURA 17 - USP2b NÃO É EXPRESSA EM <i>E. coli</i> BL21 pLysS COM INDUÇÃO DE 1mM DE IPTG A 37°C POR 3h EM MEIO LB.	55
FIGURA 18 - USP2b NÃO É EXPRESSA EM <i>E. coli</i> Rosetta pLysS COM INDUÇÃO DE 1mM DE IPTG A 37°C POR 3h EM MEIO LB.....	56
FIGURA 19 - USP2b NÃO É EXPRESSA EM <i>E. coli</i> Rosetta pLysS COM INDUÇÃO DE 1mM DE IPTG A 37°C POR 3h EM MEIO TB.....	56
FIGURA 20 – ISOFORMA USP2b É SUPEREXPRESSA EM CÉLULAS HEK293T.	58

LISTA DE SIGLAS

ATCC - American Type Culture Collection
ECL - Enhanced chemiluminescence
EGFR - Receptor de fator de crescimento epidermal
ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay
FAS - Fatty acid synthase
GSH - Glutathione
HPRT - Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase
IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
LB - Meio Luria-Bertani
MJD - Machado-Josephin domain proteases
UBP - Ubiquitin-specific proteases
UCH - Ubiquitin c-terminal hydrolases
USP - Ubiquitin-specific proteases
OUT - Ovarian tumor proteases
PCR - Polymerase chain reaction
PVDF - Polivinilideno difluorado
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SDS - Dodecil sulfato de sódio
TB - Meio Terrific Broth
TMB - 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Sistema Ubiquitina	13
2.2 Deubiquitinasas.....	19
2.3 USP	21
2.3.1 USP2	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA UPS2a	27
3.1.1 Transformação bacteriana	27
3.1.2 Produção de antígeno recombinante	27
3.1.3 Purificação do antígeno recombinante	28
3.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI USP2a	29
3.2.1 Imunização dos camundongos e teste do soro policlonal.....	29
3.2.2 Fusão de células mielóides e esplenócitos de camundongos imunizados contra USP2a.....	30
3.2.3 Varredura dos hibridomas por ELISA (enzima imunoensaio)	33
3.2.4 Diluição limitante.....	34
3.2.5 Caracterização do anticorpo monoclonal por Western Blotting ..	35
3.3 CLONAGEM DA USP2b	36
3.3.1 Estratégias de clonagem	36
3.3.1.1 Reação de digestão do inserto e dos vetores	36

3.3.1.2 Reação de ligação do inserto com os vetores pcDNA3.1(-)6his e pET28a(+)	36
3.3.1.3 Transformação em bactérias <i>E. coli</i> DH5 α e PCR de colônia	37
3.3.1.4 Purificação plasmidial em Pequena Escala (mini-prep) de pcDNA3.1(-) e pET28a(+) com inserto USP2b	38
3.3.1.5 Reação de sequenciamento	39
3. 4 EXPRESSÃO EM BACTÉRIA DA USP2b	39
3.4.1 Transformação bacteriana	39
3.5 EXPRESSÃO EM EUCARIOTO DA USP2b	40
4 RESULTADOS	42
4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA USP2a	42
4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI USP2a	44
4.2.3 Caracterização do anticorpo monoclonal por Western Blot	48
4.3. CLONAGEM DA USP2b	50
4.3.1 Clonagem em pET28a(+)	50
4.3.2 Clonagem em pcDNA3.1(-)6his	51
4.4 EXPRESSÃO EM BACTÉRIA DA USP2b	52
4.4.1 Expressão em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) STAR	52
4.4.2 Expressão em <i>E. coli</i> BL21 pLysS	54
4.4.3 Expressão em <i>E. coli</i> Rosetta pLysS	55
4.5 EXPRESSÃO EM EUCARIOTO DA USP2b	57
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O sistema de ubiquitina-proteassomo está envolvido em muitas vias sinalizadoras e seu mau funcionamento pode levar a diversas doenças desde cânceres até doenças neurodegenerativas. Esse sistema tem como principal elemento a ubiquitina, que é uma proteína de 76 aminoácidos que marca proteínas alvo para diferentes destinos (HERSHKO & CIECHANOVER, 1998; HICKE, 2001).

A ubiquitinação é reversível e esta ação é realizada por enzimas chamadas deubiquitinases (DUBs) que removem a ubiquitina ligada às proteínas alvos mudando o destino e/ou a função das mesmas. Por ter essa reversibilidade, o sistema ubiquitina-proteassomo é comparado com a fosforilação/defosforilação.

Várias prováveis DUBs foram identificadas no genoma humano e divididas em cinco famílias: UCH, USP, OTU, MJD e JAMM. A maior família é USP (ubiquitin specific protease) que compreende 58 membros, dentre eles, USP2 que possui duas isoformas, USP2a e USPb (AMERIK & HOCHSTRASSER, 2004; NIJMAN *et al.*, 2005).

USP2 está comprovadamente envolvida na via de sinalização de p53, tendo como substrato MDMX e MDM2 (STEVENSON *et al.*, 2007; ALLENDE-VEGA *et al.*, 2010). Além de estabilizar ciclina D1 e aurora A que estão envolvidas na progressão do ciclo celular (SHAN *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2011). Também foi demonstrado seu envolvimento na reciclagem do receptor de EGF, mantendo assim a sinalização para proliferação celular (LIU *et al.*, 2013).

A distribuição tecidual da USP2 ainda não está completamente estabelecida. A inexistência de anticorpos comerciais que possam distinguir entre as duas isoformas justifica a produção de reagentes confiáveis para o estudo de USP2. Uma vez que a USP2a possui comprovadas propriedades oncogênicas torna-se relevante o seu estudo mais aprofundado, particularmente aquele que possa levar ao desenho racional de inibidores da progressão tumoral.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver anticorpos monoclonais para a deubiquitinase USP2a e USP2b para utilização em ensaios de imunomapeamento da expressão das isoformas de USP2 em diferentes compartimentos celulares

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar a proteína recombinante USP2a.
- Clonar, expressar e purificar a proteína recombinante USP2b.
- Obter anticorpos policlonais e monoclonais reativos para a USP2a e USP2b.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sistema Ubiquitina

O balanço síntese/degradação de proteínas é responsável por várias respostas biológicas e falhas nesses processos estão envolvidas em doenças. Existe duas formas de degradação proteica, a degradação seletiva e a não seletiva. A não seletiva é mediada pelos lisossomos e autofagia, apesar de atualmente existir algumas evidências de que essas vias de degradação possam ter alguma seletividade.

Já a degradação seletiva é mediada pelo sistema ubiquitina-proteassomo e oferece algumas vantagens em relação a outros meios regulatórios de respostas biológicas. Quando a síntese de uma determinada proteína é aumentada devido a um estímulo, o acionamento da degradação seletiva diminui a meia vida da mesma atingindo-se assim um novo estagio estacionário mais rápido. Além disso, a degradação seletiva, por ser irreversível, permite que as proteínas degradadas não estejam mais disponíveis para ação quando se quer atenuar uma resposta (HOCHSTRASSER, 1996).

Claro que todo esse processo tem um alto custo energético já que em uma próxima estimulação todas as proteínas degradadas necessitam ser sintetizadas novamente. Mas tudo é uma questão de custo-benefício onde as vantagens desse processo rápido e sensível acabam sendo maiores do que o lado negativo do alto custo energético.

A ubiquitinação está relacionada com vários processos no organismo. A progressão do ciclo celular, por exemplo, pela degradação de proteínas regulatórias do ciclo celular, é diretamente guiada por ela. Além de ser responsável pela regulação da endocitose e de histonas, por exemplo, as histonas H2A e H2B são monoubiquitinadas ou ligadas a pequenas cadeias de poliubiquitina alterando assim o acesso ao DNA (HERSHKO & CIECHANOVER, 1998; HICKE, 2001).

O sistema ubiquitina tem como principal protagonista a ubiquitina, que é um polipeptídeo de 76 aminoácidos com aproximadamente 8kDa codificada por 2 genes diferentes, que não codificam monômeros livres. Um dos genes codifica cadeias lineares de poliubiquitina nas quais as ubiquitinas estão ligadas por ligações peptídicas entre o resíduo de glicina C-terminal de uma ubiquitina e o resíduo de metionina N-terminal da próxima. O outro gene codifica uma ubiquitina fusionada com um proteína ribossomal. (BAEK *et al.*, 1997; CHUNG & BAEK, 1999).

A ligação da ubiquitina ao substrato é resultado de uma série de reações muito bem estabelecidas e conservadas ao longo das espécies. Três enzimas participam sequencialmente desde a ativação à sua ligação covalente ao substrato: enzima ativadora de ubiquitina E1, enzima conjugadora de ubiquitina E2 e ubiquitina ligase E3 (D'AZZO *et al.*, 2005).

Um passo essencial na ligação da ubiquitina ao substrato é a ativação dependente de ATP do resíduo de glicina 76 C-terminal da ubiquitina pela enzima E1. Somente uma E1 existe no organismo e sua deleção é letal. Em seguida, esta ubiquitina ativada é transferida para o sítio ativo da enzima E2 que sozinha ou em conjunto com a enzima E3 promove sua ligação ao grupo ϵ -amino do resíduo de lisina do substrato formando uma ligação isopeptídica (FIGURA 1) (HERSHKO & CIECHANOVER, 1998; PICKART, 2001).

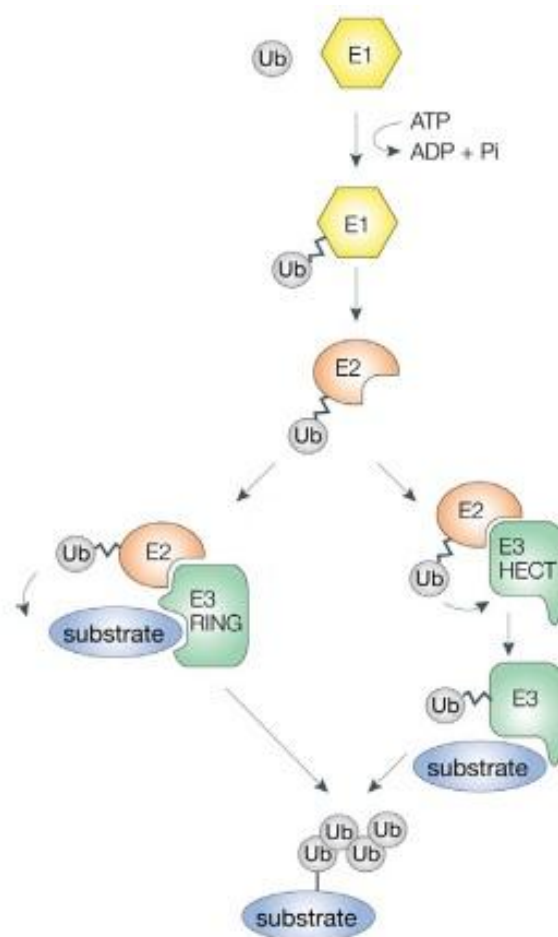


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE UBIQUITINAÇÃO.
 FONTE: WOELK *et al.* (2007).

Apesar de bem estabelecida, estudos revelaram a existência de um outro fator na série de reações de conjugação da ubiquitina ao substrato. Na ausência do fator chamado E4, apenas poucas ubiquitinas são ligadas ao substrato, sendo insuficiente para a degradação proteossomal. Os autores dividiram a poliubiquitinação do substrato em duas fases: fase de iniciação e polimerização. Na iniciação o substrato é reconhecido pelos fatores E1, E2 e E3 mas apenas poucas ubiquitinas são conjugadas. Já na fase de polimerização ocorre o alongamento dessa cadeia pelo fator E4. Mas esta enzima E4 parece estar relacionada apenas com uma gama limitada de substratos. (KOEGL *et al.*, 1999; CIECHANOVER *et al.*, 2000).

As proteínas podem ser poliubiquitinadas, monoubiquitinadas ou multiubiquitinadas. A poliubiquitinação (uma cadeia de ubiquitinas ligadas na mesma lisina) dependendo da lisina envolvida leva a um destino diferente. Proteínas monoubiquitinadas e multiubiquitinadas são tipicamente marcadas para endocitose e posterior degradação nos lisossomos/vacúolos, regulação de histonas e liberação de retrovírus pela membrana plasmática, indicando que o sistema ubiquitina não está envolvido somente na degradação de proteínas (PICKART, 2001).

A ubiquitina possui sete resíduos de lisina que podem ser usados para a ligação isopeptídica com o substrato (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63). Apesar de todas essas possibilidades, apenas K48 e K63 estão bem descritas quanto sua funcionalidade. Proteínas poliubiquitinadas em K48 são seletivamente marcadas para degradação nos proteassomos. Já ubiquitinação através da ligação K63 está envolvida na sinalização celular. Alguns estudos demonstraram também que pode existir uma cadeia de poliubiquitina ligadas em diferentes resíduos de lisina, mas não se sabe ainda sua função (FIGURA 2) (HAGLUND & DIKIC, 2005; WOELK *et al.*, 2007).

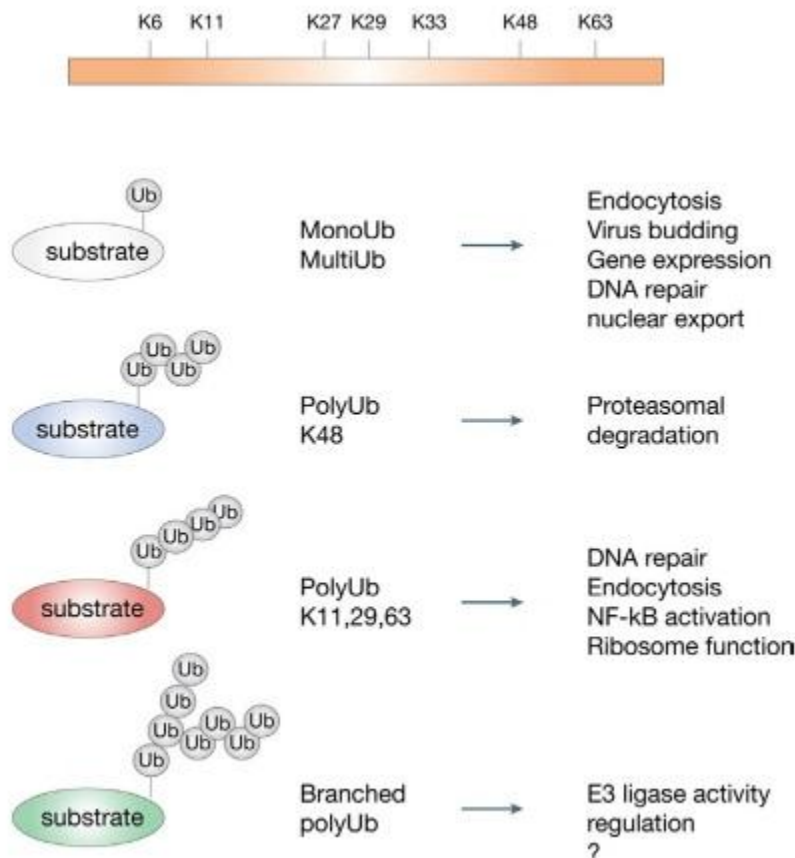


FIGURA 2 - UBIQUITINAÇÃO E SUAS MODIFICAÇÕES CELULARES.
 FONTE: WOELK *et al.* (2007).

A ligação ao substrato de cadeias de poliubiquitinas K48 é a principal e mais conhecida função do sistema ubiquitina-proteassomo. Como dito anteriormente, esta marcação, leva o substrato a ser degradado pelo proteassomo. O proteassomo 26S é um complexo composto por duas subunidades, a parte catalítica 20S e o complexo regulatório 19S (FIGURA 3) (HERSHKO & CIECHANOVER, 1998).

O proteassomo é composto por duas subunidades 19S nas extremidades que regulam a entrada do substrato ao 20S e medeia o reconhecimento da cadeia de poliubiquitina ligada ao substrato. Ele pode ser subdividido em 2 subcomplexos, um na base que possui 6 ATPases da família AAA e mais três proteínas e um outro subcomplexo que possui 8 subunidades. A subunidade 20S tem formato de barril e é composta por 4 anéis, 2 anéis α na porção exterior e 2

anéis β na porção interior e cada um desses anéis são formados por 7 subunidades diferentes (CIECHANOVER *et al.*, 2000).

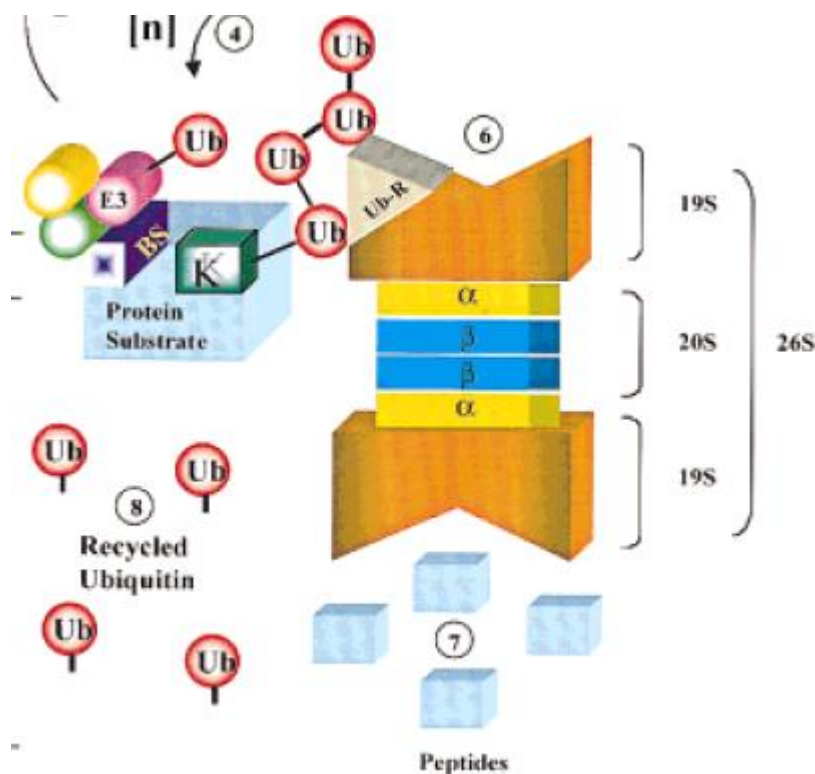


FIGURA 3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO PROTEASSOMO 26S.
 FONTE: CIECHANOVER *et al.* (2000).

Quando os substratos ubiquitinados são degradados pelo proteassomo, algumas moléculas podem ser geradas: peptídios livres, pequenos peptídios ligados ainda a ubiquitina ou cadeias de poliubiquitina livre. Além dessas moléculas geradas, alguns estudos mostraram que o proteassomo também pode ajudar a gerar peptídeos que compõem o MHC de classe I (GROETTRUP *et al.*, 1996; HERSHKO & CIECHANOVER, 1998).

Várias alterações em vias de sinalização estão relacionadas com doenças em humanos. E muitas dessas vias tem participação do sistema ubiquitina na regulação de seus componentes. O controle do ciclo celular e das vias do NF- κ B, TGF- β e β -catenina são exemplos de rotas sinalizadoras funcionalmente ligadas

ao desenvolvimento do câncer e que têm o sistema de ubiquitinação envolvido em algum ponto regulatório (CROSETTO *et al.*, 2006).

Muitas doenças neurodegenerativas são relacionadas com problemas nesse sistema de degradação. A grande maioria é caracterizada pela presença de agregados proteicos intraneurais e alguns estudos já revelaram a presença de proteínas ubiquitinas nesses agregados, indicando que problemas na proteólise estão diretamente ligados com essas condições (LAYFIELD *et al.*, 2001).

Uma outra doença do sistema nervoso que envolve disfunção do sistema ubiquitina é a Síndrome de Angelman que leva à um distúrbio motor e severo retardamento mental. FANG *et al.* (1999) correlacionou esta síndrome com uma mutação na E3 ligase E6-AP mas ainda não se sabe qual o substrato desta enzima que se acumula e que é tóxico para o sistema nervoso.

Existem outros tipos de moléculas envolvidas no sistema ubiquitina que não são as ubiquitinas. Estas são chamadas de proteínas tipo ubiquitinas, pela sua similaridade com as ubiquitinas, e inclui moléculas como NEDD8, SUMO e ISG15. Sua ligação ao substrato se dá de maneira semelhante à ligação da ubiquitina ao substrato mas levam a destinos diferentes, como por exemplo, modificação da atividade e localização celular do seu alvo (NALEPA *et al.*, 2006).

2.2 Deubiquitinases

Como o sistema ubiquitina está envolvido em vários processos biológicos e sua disfunção pode levar a doenças é necessário que ele seja finamente regulado. De forma similar à fosforilação, a ubiquitinação também é reversível, e é contra balanceada pela ação de enzimas chamadas deubiquitinases (DUBs).

Proteases são divididas em cinco grupos dependendo do seu mecanismo de ação: aspártico, metálico, serino, treonino e cisteíno proteases. DUBs representam duas dessas famílias: cisteíno e metaloproteases apesar que a grande maioria se encaixa no grupo das cisteíno proteases (NIJMAN *et al.*, 2005).

As DUBs possuem várias atividades dentro do sistema ubiquitina. Elas são responsáveis pelo controle negativo de degradação de diversas proteínas, por

retirar a marcação de ubiquitina que levaria a mesma ao proteassomo; por manter o níveis de ubiquitina livre na célula dentro dos valores necessário para o bom funcionamento do sistema já que estas não são sintetizadas como monômeros livres e que podem formar espontaneamente aductos com nucleófilos intracelulares (glutationas ou aminas); além de agir em cadeias de ubiquitinas não ancoradas que competem com as proteínas poliubiquitinadas pelo sítio do proteassomo 26S (HOCHSTRASSER, 1996; LAM *et al.*, 1997; D'ANDREA & PELLMAN, 1998).

Essas enzimas reguladoras tem sido relacionadas com controle do crescimento, diferenciação, oncogênese e integridade do genoma (WILKINSON, 1997). Devido sua importância em vários processos, é essencial que também sejam reguladas. Tem-se evidências de que na ausência do substrato, as DUBs são inativas e que a interação com a ubiquitina ligada ao substrato altera sua conformação ativando-a. Além disso, as DUBs também podem ser reguladas transcricionalmente e por degradação pelo proteassomo (TURNER & VARSHAVSKY, 2000). Assim como várias cisteíno proteases, algumas DUBs podem sofrer regulações redox por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KOMANDER *et al.*, 2009).

As DUBs são divididas em cinco grupos: USP, UCH, MJD, OTU e JAMM. Destes, os quatro primeiros são cisteíno proteases e o último é uma metaloprotease (AMERIK & HOCHSTRASSER, 2004). NIJMAN *et al.* (2005) fizeram uma análise genômica das possíveis DUBs existentes em humanos pela busca de domínios característicos e encontrou 95 prováveis genes que codificam para DUBs nas seguintes divisões: 58USP, 4UCH, 5MJD, 14OTU e 14JAMM. Dessas 95, 72 são provavelmente funcionais.

As cisteíno proteases variam bastante em tamanho e funcionalidade mas tem como semelhança a presença de uma tríade catalítica em sua estrutura composta por resíduos de cisteína, histidina e ácido aspártico. Atribui-se fortes características catalíticas para a cisteína e a histidina (CHUNG & BAEK, 1999).

Uma das deubiquitinases mais bem caracterizadas é a Ubp14p e seu homólogo humano Isopeptidase T. Essa DUB de 93kDa hidrolisa cadeias de

ubiquitina que ficaram livres do substrato após a degradação proteossomal começando a hidrólise pela ubiquitina proximal livre na cadeia. Ubp4/Doa4 também é uma DUB bem caracterizada e está envolvida na hidrólise de ubiquitinas que permaneceram ligadas a peptídeos após passagem pelo proteossomo (CHUNG & BAEK, 1999).

2.3 USP

USP (ubiquitin specific protease) é a maior família de DUBs e são conhecidas por serem cisteino-proteases. Tem ações tanto em precursores de ubiquitina linear quanto em cadeias de ubiquitina ligadas ao substrato. Além disso, são homólogas à família UBP de leveduras (GOUSSEVA & BAKER, 2003).

Segundo uma análise estrutural feita por QUESADA *et al.* (2004), USP tem um resíduo de cisteína (Cys Box) conservado, que tem atividade catalítica, entre todas as USPs, exceto na USP52 que tem uma alanina em vez da cisteína. Após o Cys Box essa família possui uma região chamada de QQD Box que contém ácido aspártico que é conservado em todas as USP. Em seguida, existe um resíduo de histidina (His Box) que também apresenta atividade catalítica e só não existe na USP52. Todas as USPs estudadas possuem sinais em sua estrutura para localização celular. Somente a USP30 possui sinal para localização na mitocôndria e muitas outras tem sinais nucleares.

Várias USPs foram implicadas em uma gama de processos celulares. USP1 está envolvida no câncer relacionado com a anemia de Falconi (ZHANG *et al.*, 2007). USP7 está envolvida na cascata de sinalização da p53 estabilizando Mdm2 e p53 além de ter como substrato também a proteína ICPO do herpes vírus tipo I que é importante na indução do ciclo lítico do vírus (BOUTELL *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2004). Já USP9 mostrou-se envolvida no desenvolvimento por atuar nas vias de sinalização Delta e Notch (KHUT *et al.*, 2007) e USP10 atua no transporte retrógrado e anterógrado entre golgi e retículo endoplasmático (SONCINI *et al.*, 2001).

2.3.1 USP2

USP2 tem em sua estrutura 9 α -hélices e 14 folhas- β além de possuir um sítio de ligação ao zinco. A funcionalidade desse sítio de ligação ao metal ainda continua obscura mas sabe-se que ele não é requerido para a atividade deubiquitinante dessa proteína. Além disso, descobriu-se que USP2 e ubiquitina formam um complexo não covalente e que possuem formas complementares, o que explica a alta seletividade por substratos ubiquitinados (RENATUS *et al.*, 2006).

O gene da USP2 produz duas isoformas bem estabelecidas como resultado de processamento alternativo de RNA: são elas USP2a ou USP2-69 que possui 69kDa e USP2b ou USP2-45 de 45kDa. Este gene possui 13 éxons, dos quais os de número 3 ao 13 são responsáveis pela porção catalítica da enzima e são comuns a todas as isoformas. Diferentes combinações dos éxons 1A, 1B, 1C, 1D e 3 ao 13 formam a isoforma USP2a enquanto que combinações do éxon 2 com 3 ao 13 são responsáveis pela isoforma USP2b. Deste modo, são iguais no C-terminal e diferentes no N-terminal. USP2b tem 49 aminoácidos no C-terminal e USP2a tem 272 aminoácidos (GOUSSEVA & BAKER, 2003).

Alguns estudos evidenciam a existência de uma terceira isoforma, USP2c, que teria 41kDa. Inclusive, relacionando-a com o metabolismo ósseo onde teria participação nos efeitos anabólicos e catabólicos do PTH e indução de apoptose em células HEK293T e HeLa (MILES *et al.*, 2002; GEWIES & GRIMM, 2003).

USP2 está relacionada com uma gama de processos biológicos. Homólogos da USP2a e USP2b estão envolvidos na miogênese. Experimentos levaram a conclusão de que essas duas isoformas são expressas diferentemente dependendo da fase do processo e possuem ações antagônicas na diferenciação muscular. Essa expressão diferencial é responsável pela fusão das membranas plasmáticas e acúmulo de proteínas músculo específicas durante a miogênese (PARK *et al.*, 2002).

A isoforma USP2a tem sido amplamente correlacionada com tumores de próstata. USP2a tanto em nível proteico como mRNA está superexpressa em 51%

dos tumores de próstata e é regulada por andrógenos. Por imunoprecipitação descobriu-se que USP2a interage com a enzima ácido graxo sintase (FAS). FAS que é uma proteína anti-apoptótica, é estabilizada por USP2a conferindo assim atividades oncogênicas a esta DUB (GRANER *et al.*, 2004).

Ainda relacionando USP2a com cânceres de próstata, PRIOLO *et al.* (2006) mostrou que o silenciamento dessa proteína em linhagens LNCaP e DU145 levam a um aumento da apoptose. Além disso, quando expressa em células epiteliais de próstata imortalizadas tratadas com taxol e cisplatina, confere resistência a apoptose causada pela quimioterapia. Os autores também testaram em outras linhagens tumorais não prostáticas (SW480, SW620, LoVo, HCT15, BT549, SKBR3, HT1080, MG63 e MNNG/HOS), e em todas, o silenciamento de USP2a levou a um aumento da apoptose.

Homólogas em ratos da USP2a e USP2b, UBP-t1 e UBP-t2, respectivamente, são altamente expressas em testículos de ratos. Por análise nos níveis de mRNA, essas proteínas são mais expressas em células germinativas e as isoformas tem expressões diferenciadas, já que UBP-t1 aparece mais cedo enquanto que UBP-t2 é mais expressa em estágios mais tardios. Nesse estudo também chegou-se a conclusão de que o N-terminal diferencial entre as duas isoformas determina a localização celular (LIN *et al.*, 2000).

Mdm2 e MdmX são proteínas envolvidas na via da p53 e são substratos comprovados para USP2a, que através de sua ação deubiquitinante leva ao aumento da degradação de p53 sem interagir diretamente com este (STEVENSON *et al.*, 2007; ALLENDE-VEGA *et al.*, 2010). De fato BENASSI *et al.* (2012) recentemente evidenciou o papel da USP2a, em tumores de próstata, na regulação negativa de microRNAs, os quais coletivamente aumentam os níveis de Myc através da deubiquitinação da Mdm2 e subsequente inativação de p53.

Ciclina D1 é uma proteína envolvida na progressão do ciclo celular de G1 para S. SHAN *et al.* (2009) testaram 72 DUBs para deubiquitinação dessa proteína *in vitro*, selecionando 9 responsivas que foram testadas então em células humanas, onde somente USP2a apresentou ação. Por análises de pulldown e imunoprecipitação confirmou-se a interação de USP2a com ciclina D1. Confirmou-

se também que USP2a aumenta a meia-vida da ciclina D1 de 20min para mais de 90min, indicando que esta isoforma pode estabilizar ciclina D1 por antagonizar a proteólise mediada pela ubiquitinação.

Um estudo correlacionou a superexpressão de USP2a com o grau de mudanças patológicas observadas em glomerulonefrites e que citocinas e imunocomplexos podem estimular o aumento de USP2a em células mesangiais (WANG *et al.*, 2010).

Essa DUB também está envolvida com o crescimento de linhagens de origem tumoral que apresentam altos níveis de ciclina A1 em cânceres de bexiga (KIM *et al.*, 2012), estabilidade da Aurora-A que medeia a progressão do ciclo celular (SHI *et al.*, 2011) e alta expressão de USP2 a qual promove o potencial migrativo e invasivo de células de câncer de mama (QU *et al.*, 2015).

USP2a é requerida para ativação do NF- κ B por TNF- α , estando assim, envolvida na expressão de genes dependentes do fator NF- κ B e secreção de IL-8 em diferentes tipos celulares. A desregulação dessa via está envolvida em doenças como inflamação crônica e câncer (METZIG *et al.*, 2011; MAHUL-MELLIER *et al.*, 2012; MAHUL-MELLIER *et al.*, 2012).

BENASSI *et al.* (2013), demonstraram que USP2a tem propriedades antioxidantes já que na presença desta, a quantidade de espécie reativas de oxigênio (ROS) é menor. Essa propriedade antioxidante pode ser devido a regulação de miRNA-34b/c que leva à um aumento de c-Myc. Este oncogene está envolvido na síntese de γ -GCS envolvido na síntese de GSH, e com este aumentado, aumenta-se a quantidade de GSH, levando à uma diminuição de ROS.

Camundongos machos com falta de USP2 mostraram ter severo defeito na fertilidade devido os espermatozoides terem dificuldade de penetração na zona pelúcida (BEDARD *et al.*, 2011). Outro estudo em camundongos com falta de USP2 levou ao conhecimento do envolvimento dessa DUB no ritmo circadiano, pois estes animais se mostraram hipersensíveis à luz durante a transição dia-noite (SCOMA *et al.*, 2011).

Um estudo recente vinculou USP2a com o processo de ubiquitinação de EGFR. Esta enzima foi localizada em endossomos primários e diminuiu a presença de EGFR ubiquitinado, sua internalização e degradação. Observou-se ainda a colocalização de EGFR com Rab11, marcador de vesícula de reciclagem, sugerindo no conjunto que a USP2a promove a reciclagem da forma ativa do EGFR e conseqüentemente sustenta positivamente a via de sinalização mediada por este receptor (LIU *et al.*, 2013).

Expressão anormal de USP2a foi encontrada em macrófagos de tecidos adiposos em camundongos obesos. A deficiência dessa proteína leva a adipogênese e inflamação do tecido adiposo que são eventos cruciais pré-diabéticos. USP2a regula toda essas funções adipócitas provavelmente por estimular a secreção parácrina de moléculas solúveis regulando assim a transcrição de alguns genes alvos (KITAMURA *et al.*, 2013).

REGLINSKI *et al.* (2015), demonstrou que a USP2 possui sinal de importação para o peroxissomo, PEX-5 e que essa importação realmente ocorre, apesar de parecer não ser muito eficiente já que uma parte permanece no citosol. Não se sabe a função dessa DUB nos peroxissomos, uma vez que não existe evidências de proteínas ubiquitinadas no interior dos mesmos. Desde modo, os autores propõem que a importação da USP2 para os peroxissomos pode ser uma forma de regular a quantidade e a ação dessa proteína no citosol, já que a degradação nos peroxissomos consumiria menos energia e seria mais rápido que a degradação pelo proteassomo.

Estudos demonstraram que USP2a estabiliza tAIF no citosol por retirar ubiquitinas que marcam para degradação pelo proteassomo. AIF é uma oxidoretutase mitocondrial que sob stress leva a morte celular por apoptose não dependente de caspase. Esse processo se inicia quando AIF é clivado e tAIF é liberado da matriz mitocondrial para o citosol. O tAIF é translocado para o núcleo onde exerce sua função levando à apoptose. Com a estabilização de tAIF pela USP2a, ele fica disponível para agir no núcleo e levar a célula à apoptose (OH *et al.*, 2011).

Já a isoforma USP2b deubiquitina canais de sódio epiteliais (ENaC) controlando sua expressão e função na superfície celular. Ação da USP2b aumenta a quantidade de canais na membrana plasmática e esse aumento causa retenção de sódio, potássio e, conseqüentemente, hipertensão (OBERFELD *et al.*, 2011).

Ainda relacionado com o balanço de sódio no organismo, esta isoforma também remove a monoubiquitinação do receptor de mineralocorticoide (MR) abrindo caminho para poliubiquitinação e posterior degradação do mesmo, interferindo assim na resposta induzida por aldosterona (FARESSE *et al.*, 2013).

USP2b interage com TBK1 deubiquitinando a mesma. TBK1 é importante na resposta antiviral por ativar IRF3 e IRF7 que induz IFN tipo I. Para sua ativação, TBK1 precisa ser fosforilada ou poliubiquinada em K63. Superexpressão de USP2b deubiquitina TBK1 inativando-a, e impedindo assim a resposta antiviral (ZHANG *et al.*, 2014).

Sabe-se também que superexpressão de USP2b diminui a quantidade de canais de $Ca_v1.2$ inseridos na membrana. Esses canais são os principais canais de entrada de Ca^{+2} em miócitos vasculares e cardíacos e também são alvos do tratamento de doenças cardiovasculares (ROUGIER *et al.*, 2015).

Além disso, USP2b participa da regulação circadiana no fígado e está envolvida na regulação diurna da glicose, sendo importante para a homeostase da glicose no plasma. Também evidenciou-se que esta isoforma aumenta a atividade de gliconeogênese por aumentar a ação de glicocorticoide no fígado, exacerbando a intolerância a glicose na presença de resistência a insulina (MOLUSKY *et al.*, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA USP2a

3.1.1 Transformação bacteriana

A transformação para expressão foi realizada a partir de alíquotas de 50µL de *E. coli* BL21(DE3)STAR eletrocompetentes, preparadas conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). A alíquota foi adicionada do plasmídeo pET28a(+)+USP2a e submetidas a uma diferença de potencial de 1.40 kV para a introdução do DNA na célula (eletroporador Bio-Rad®). Após os pulsos elétricos, foi adicionado às células 1 mL de meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 10g/L) para recuperação celular durante 1h a 37°C (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Após a transformação as bactérias foram plaqueadas em meio ágar LB (Tryptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L e ágar 17g/L) + canamicina 30µg/mL e incubadas à 37°C durante a noite.

3.1.2 Produção de antígeno recombinante

8 colônias que cresceram na placa após a transformação foram selecionadas e utilizadas para expressão em pequena escala (mini-expressão) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) para escolher a colônia com melhor expressão para posteriormente utilizar esta em larga escala.

As colônias selecionadas foram inoculadas em uma placa separada para depois ter acesso a colônia específica com melhor resultado e em seguida inoculadas em um frasco com 3mL de meio LB + canamicina (30 µg/mL). Incubou-se a placa durante a noite à 37°C na estufa e o frasco no agitador à 37°C. Essas culturas em fase de crescimento estacionário foram usadas como pré-inoculo do processo de mini-expressão. Em novos frascos, contendo 10mL de meio LB seletivo, fez-se a inoculação 1:50 e incubou-se à 37°C, 210RPM até que atingissem D.O. entre 0,5 e 0,8 quando medidas em 600nm. Para controle

negativo de expressão, 1mL de cada cultura foi separado. Nesse momento, 0,2mM de isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) foi adicionado à cultura induzindo o operon Lac que regula a expressão da proteína recombinante inserida no vetor pET28a. A indução ocorreu por 3h mantendo-se as condições de cultivo e em seguida coletou-se 1mL de cultura induzida.

As culturas induzidas e não-induzidas foram centrifugadas 4000xg por 5 min. O sedimento foi então ressuspendido em 100 μ L de tampão de amostra redutor (60mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0.01% azul de bromofenol) (LAEMMLI, 1970) e aquecido a 95°C por 20 min. Dessa amostra 20 μ L foram submetidos a uma separação eletroforética por SDS-PAGE (10% de poliacrilamida) e corada com azul de coomassie para verificação do clone com melhor taxa de expressão (SHAPIRO *et al.*, 1967).

Para expressão em larga escala, utilizou-se um processo análogo ao de pequena escala, no entanto o pré-inóculo foi feito em 20mL de meio LB seletivo e os 20mL dessa cultura foi usado como inóculo de uma cultura com volume final de 1L, ficando na concentração de 1:50. As condições e tempo de indução foram os mesmos da miniexpressão.

3.1.3 Purificação do antígeno recombinante

O *pellet* de bactéria referente a 200mL de cultura obtido na expressão em larga escala foi ressuspendido em 20 mL de tampão de lise (50mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, 50mM NaCl, 1mM PMSF) e lisados na prensa de French. Após a lise centrifugou-se a 6000xg por 20min. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 5mL de tampão de lavagem 1 (5mM EDTA, 5mM DTT, 2M ureia, 2% triton x-100) e centrifugou-se a 9000xg por 30min. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes. O último *pellet* da etapa anterior foi ressuspendido em 5mL de tampão de lavagem 2 (PBS, 5mM EDTA) e centrifugado a 9000xg por 30min. Esta etapa foi repetida mais duas vezes. O último *pellet* obtido foi congelado no -80°C para o término da purificação no dia seguinte.

O *pellet* foi descongelado e ressuspendido em 10mL de tampão desnaturante (10mM Tris-HCl, pH 6,8, 100mM NaH₂PO₄, 6M hidrocloreto de guanidina, 10mM imidazol) e incubado por 30min à 65°C vortexando a cada 10min. Centrifugou-se à 9000xg por 30min.

A purificação do antígeno foi feita por cromatografia de afinidade a metal imobilizado em resina de Ni-NTA agarose. Antes de incubar a proteína com a resina acertou-se o pH do sobrenadante da solubilização anterior para 7,0 e incubou-se de 1-3h à 4°C. A amostra foi passada pela resina e a fração não ligada recuperada. A primeira lavagem foi feita com 10mL de tampão de lavagem 1 (8M ureia, 100mM NaH₂PO₄, 150mM NaCl, 20mM imidazol). A segunda lavagem utilizou-se 10mL de tampão de lavagem 2 (8M uréia, 100mM NaH₂PO₄, 150mM NaCl, 40mM imidazol). Na eluição utilizou-se 10mL de tampão de eluição (8M uréia, 100mM NaH₂PO₄, 150mM NaCl, 500mM imidazol), recolhendo frações a cada 1mL.

A pureza foi testada por SDS-PAGE seguido por coloração do gel por coomassie. Frações comprovadamente puras foram submetidas à diálise a 4°C contra PBS. Após diálise, a concentração da proteína foi medida pelo método de Bradford e alíquotas congeladas para posterior imunização.

3.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI USP2a

3.2.1 Imunização dos camundongos e teste do soro policlonal

Os animais foram imunizados três vezes com intervalos de 15 dias entre cada uma das imunizações com um volume de suspensão de 100µL por animal. Todas as imunizações se deram por via intraperitoneal com 30µg (volume variável conforme a concentração em solução da proteína) de USP2a purificada, o mesmo volume de adjuvante de Freund completo na primeira imunização e incompleto nas demais, 1mg de Al(OH)₃ e PBS completando o volume para 100µL.

Após 7 dias da última imunização os animais foram sangrados via periorbital para coleta do soro para verificação da resposta imune. Caso os soros

estivessem respondendo para USP2a endógena adequadamente e com bom título, esse animal passou para o procedimento de fusão.

A verificação da resposta imune foi feita por meio de western blot no qual correu-se SDS-PAGE com 50µg de extrato de células LNCaP, RWPE-1, LNCaP e RWPE-1 transfectadas com USP2a e transferiu-se para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi incubada com o soro do animal durante a noite. No dia seguinte, incubou-se a membrana com anticorpo secundário anti-mouse (Sigma®) durante 1h para em seguida revelar com ECL (Enhanced chemiluminescence) (Thermo Fisher Scientific®).

3.2.2 Fusão de células mielóides e esplenócitos de camundongos imunizados contra USP2a

A obtenção dos hibridomas ocorre da fusão dos esplenócitos do animal imunizado com células de mieloma. Para as fusões, foram utilizadas células mielóides da linhagem P3X63Ag8.653 (ATCC nº CRL-1580™).

Antes da fusão, as células mielóides foram mantidas em meio de manutenção (RPMI (Gibco), 10% de soro fetal bovino, 10µg/mL estreptomicina e 10U/mL de penicilina). Um dia antes da fusão, as células foram repicadas de forma que as placas ficassem com uma confluência de 60 a 80% no momento da fusão. O ideal é soltar cerca de 3 placas p100 de mieloma por baço fusionado.

Três dias antes do dia programado para a fusão, os animais escolhidos foram imunizados via intravenosa com 20µg da proteína recombinante purificada em 60µl de PBS. No dia programado, o animal hiperimune foi anestesiado com uma dose única contendo 20mg/kg de cloridrato de xilazina (relaxante muscular), 100mg/kg de cloridrato de cetamina (anestésico) e 3mg/kg de maleato de acepromazina (tranquilizante) e o sangue total coletado por punção cardíaca (eutanásia por exosanguinação e posterior uso do soro como repertório de anticorpos policlonais).

Em seguida, o baço foi retirado assepticamente em fluxo laminar, sendo então macerado em meio de manutenção sem soro fetal bovino, para liberação

dos esplenócitos. Com o auxílio de uma micropipeta, as células foram dissociadas, e o material então filtrado em seringa contendo um elemento filtrante constituído por uma malha de nylon estéril. Tais células foram centrifugadas por 10min a 500xg e então adicionadas de 5mL de cloreto de amônio gelado (150mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 0,1mM EDTA pH7,2), incubado por 5min em banho de gelo para que ocorra a lise seletiva de hemácias. Adicionou-se 25mL de meio de manutenção sem soro e a suspensão foi centrifugada novamente por 10min a 500xg. Novamente, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se mais 25mL de meio de manutenção sem soro. As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e o sobrenadante descartado, com o sedimento celular ressuspendido em mais 20mL de meio sem soro e sua quantificação feita por contagem em câmara de Neubauer.

As células de mieloma também foram contadas em câmara de Neubauer e misturadas aos esplenócitos na proporção de 1:5 centrifugando em seguida a mistura celular por 10min a 500xg. O sobrenadante foi descartado e, durante 1min, 1mL de PEG 1500 (polietilenoglicol 1500) Roche® aquecido a 37 °C foi gotejado à mistura em constante agitação branda. Adicionou-se então 1mL de meio de manutenção sem soro gotejando-o durante 1min (com agitação branda), sendo esse passo repetido uma vez. Por fim, adicionou-se 7mL de meio de manutenção sem soro gotejando-o durante 2min (com agitação branda) e a mistura centrifugada por 5min a 500xg. As células foram ressuspendidas em volume suficiente de meio de manutenção e distribuídas em placas de 96 poços, a 100µL/poço na razão de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células por poço.

Como a linhagem de mieloma utilizada é deficiente para HPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferase) e a via de salvamento de produção de nucleotídeos é dependente de HPRT, uma vez que a aminopterina bloqueia a via de novo da síntese de nucleotídeos, as células deficientes em HPRT (mielomas não fusionados) irão morrer. Os esplenócitos que não se fundiram são inviáveis em cultivo e morrem em cerca de uma semana. Portanto, os hibridomas formados pela fusão entre a célula de mieloma e os esplenócitos que possuem a HPRT e tem a capacidade de sobreviver ao meio HAT. Os hibridomas, mesmo

com a via de novo bloqueada, são capazes de sintetizar nucleotídeos pela via de salvamento (da qual a hipoxantina e a timidina são intermediários) e são, portanto, as únicas células que sobrevivem ao período de seleção. Tendo isso em mente, no dia seguinte à fusão, 100µl de meio HAT (meio de manutenção, 0,1mM hipoxantina de sódio, 0,4µM aminopterina, 0.8mM timidina) foram adicionados a cada poço. Durante a semana seguinte as células tiveram o seu meio parcialmente trocado duas vezes por meio HAT, essas duas trocas devem fazer com que a concentração de meio HAT fique em torno de 87,5%, suficiente para a ação da aminopterina. No total, são três adições de meio HAT com uma periodicidade de duas vezes por semana.

Em seguida foram feitas três trocas parciais de meio com meio HT (meio de manutenção, 0,1mM hipoxantina de sódio, 0.8mM timidina) mantendo-se a periodicidade. Esse procedimento mantém elevados os níveis dos intermediários da via de salvamento e vão diluindo a aminopterina até aproximadamente 11%. Dessa forma, os hibridomas foram mantidos pelos intermediários até que as diluições sucessivas em meio RPMI fossem suficientes para que a concentração da aminopterina não afete mais as células.

As células foram mantidas em meio de manutenção com a mesma periodicidade de troca, cerca de 72 horas, até o fim do período de varredura dos hibridomas.

Os clones considerados negativos no processo de varredura foram eliminados com a adição de uma solução de NaOH 1M corada com azul de metileno. Este procedimento reduz a possibilidade de contaminação e identifica facilmente os poços que já foram inutilizados na placa de cultivo.

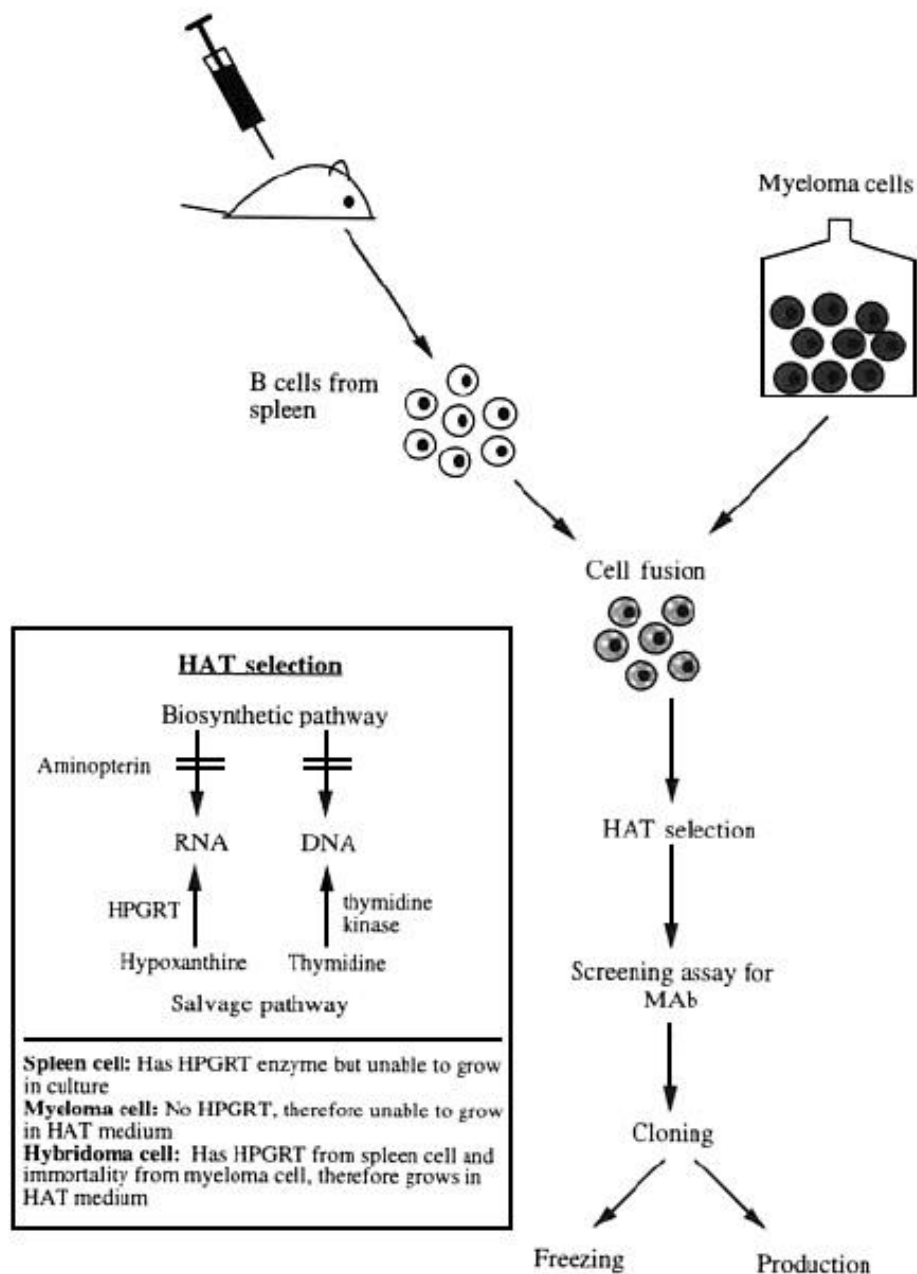


FIGURA 4 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL POR FUSÃO.
 FONTE: KING (2003).

3.2.3 Varredura dos hibridomas por ELISA (enzima imunoenensaio)

A presença ou ausência de anticorpos produzidos contra antígeno recombinante nos sobrenadantes de cultura foi avaliada através de ensaio imunoenzimático ELISA. As placas para ELISA foram sensibilizadas com 100ng

de proteína recombinante USP2a em 50µL de tampão carbonato por poço durante a noite a 4°C. Bloqueou-se as placas com 200µL por poço de PBS+BSA 1% por 1h a 37°C. Incubou-se 100µL dos sobrenadantes dos hibridomas selecionados por 2h a 37°C. Após esse tempo, a placa foi lavada 5 vezes de 2min com água destilada. Incubou-se 100µL de anticorpo secundário anti-mouse HRP GE® por 1h a 37°C. A placa foi lavada com água destilada novamente e revelou-se a reação com 100µL de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) Sigma® por poço durante 30min. A reação foi parada com 50µL de H₂SO₄ 1M e fez-se leitura em filtro de 450nm.

3.2.4 Diluição limitante

Após a varredura dos hibridomas, as células positivas para a secreção de anticorpo contra USP2a passam por um processo chamado de diluição limitante. Essa etapa tem por objetivo isolar apenas uma célula secretora de anticorpo, garantindo a produção de um anticorpo monoclonal.

Para essa diluição limitante, foi utilizada uma placa de 96 poços para cada clone secretor de anticorpos. Na primeira linha da placa (linha A) foram plaqueadas 200 células do hibridoma em 200 µL de meio de cultivo, e as linhas restantes (linhas B a H) receberam apenas 100 µL do meio de cultivo. Da linha A foram removidos 100µL, que foram então solubilizados na linha B, bastante homogêneos, e novamente 100 µL foram removidos da linha B e passados para a linha C. Esse processo foi repetido até a linha H, onde os últimos 100 µL foram removidos e descartados (FIGURA 5). Desse modo, criou-se na placa de cultivo uma quantidade decrescente de células, indo de 100 células/poço até 0,8 célula/poço.

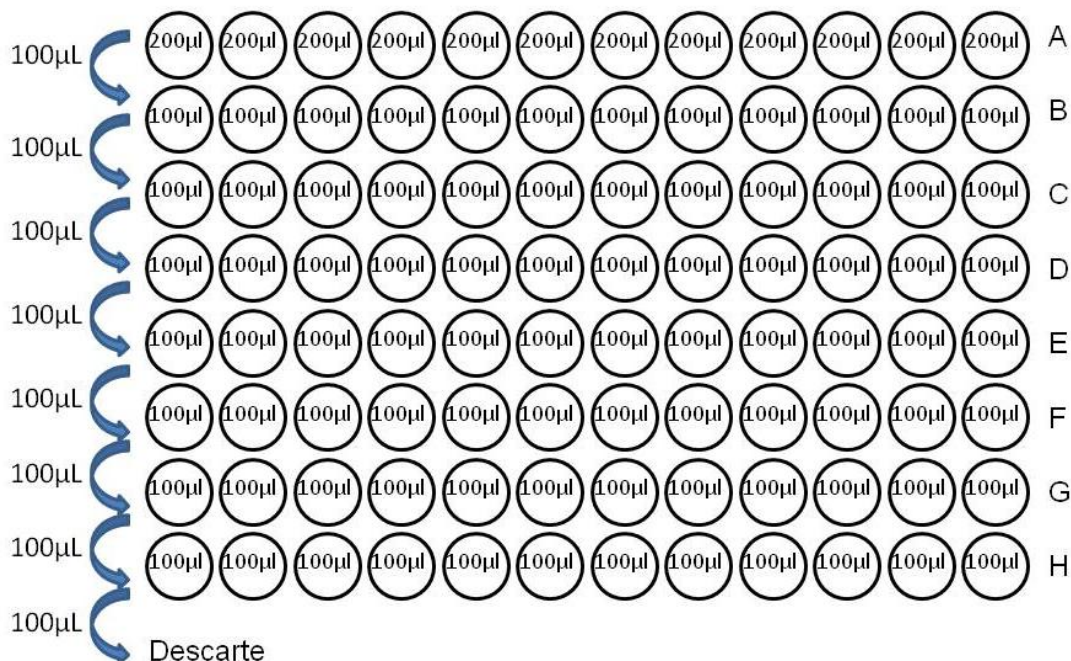


FIGURA 5 – ESQUEMA DE REPRESENTAÇÃO DA DILUIÇÃO LIMITANTE.

NOTA: Inicia-se com 200µL de meio com 200 células na linha A, homogeneiza e passa 100µL para a próxima linha (B). Homogeneiza e passa 100µL para a linha C e assim sucessivamente até chegar na linha H, homogeneizar e descartar 100µL.

FONTE: A autora (2016)

3.2.5 Caracterização do anticorpo monoclonal por Western Blotting

Para verificar se o anticorpo anti-USP2a identificava USP2a superexpressa, foi feito western blotting no qual realizou-se SDS-PAGE com 40µg de extrato de células HEK-293T superexpressando USP2a transientemente (plasmídeo pDEST+USP2a com etiqueta de FLAG) e transferiu-se para membrana de PVDF que antes foi ativada com metanol por 5min. A membrana foi bloqueada com TBST+leite por 1h para evitar ligações inespecíficas do anticorpo. Esta membrana foi incubada com o monoclonal na diluição 1:500 para reagirem com as proteínas overnight. No dia seguinte, incubou-se a membrana com anticorpo secundário anti-mouse (Sigma®) na diluição de 1:4000 durante 1h para em seguida revelar com ECL (Thermo Fisher Scientific®).

3.3 CLONAGEM DA USP2b

3.3.1 Estratégias de clonagem

Para basear as estratégias da USP2b, foi utilizada a sequência do mRNA para *Homo sapiens* (NM_171997.2 do banco de dados da NCBI). Os vetores escolhidos para a expressão foram pcDNA3.1(-)6his construído no próprio laboratório com cauda de histidina C-terminal na proteína para expressão em célula de mamífero e pET28a(+) também com cauda de histidina para expressão em bactéria.

A sequência completa da proteína foi sintetizada pela ferramenta GeneArt Gene Synthesis® da Thermo Fisher Scientific® com acréscimo de duas enzimas de restrição, NheI e XhoI, nas extremidades para clonagem nos vetores escolhidos.

3.3.1.1 Reação de digestão do inserto e dos vetores

A digestão foi feita simultaneamente para as duas enzimas. A digestão dupla foi feita incubando-se 1,5µg de pcDNA3.1(-)6His, pET28a(+) ou inserto (USP2b sequência completa) com 2µL de tampão “Tango” 10 vezes concentrado (Thermo Fisher Scientific®), 5U da enzima NheI (Thermo Fisher Scientific®), 20U de XhoI (Thermo Fisher Scientific®) e água ultrapura completando para 20µL de meio reacional. As reações foram incubadas a 37 °C por 16h com inativação a 80°C por 20 minutos e analisadas direto em gel de agarose 1%.

Verificada a digestão adequada, o produto duplamente digerido foi gel extraído usando-se kit comercial da QIAGEN®.

3.3.1.2 Reação de ligação do inserto com os vetores pcDNA3.1(-)6his e pET28a(+)

Para a reação de ligação, 50ng (0,014pmol) de pcDNA3.1(-)6his digerido com as enzimas NheI e XhoI foram incubados com 0,042pmol do inserto também digerido (proporção plasmídeo:inserto de 1:3), 2µL de tampão para T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific®) concentrado 10 vezes, 2U de T4 DNA ligase recombinante (Thermo Fisher Scientific®) e água ultrapura completando para um volume reacional de 20µL. A reação de ligação foi realizada a 16°C por 16h, sem inativação da enzima. Paralelamente foi repetida a mesma reação, porém sem adição do inserto, para ser usada como controle negativo. As mesmas condições foram aplicadas na reação de ligação de pET28a(+) com o inserto.

3.3.1.3 Transformação em bactérias *E. coli* DH5α e PCR de colônia

Após a reação de ligação foi feita a eletroporação dos plasmídeos em bactérias *E. coli* da estirpe DH5α.

A transformação foi feita a partir de alíquotas de 50µL de bactérias eletrocompetentes, preparadas conforme descrito por Sambrook (2001). A alíquota foi adicionada do produto de ligação e submetidas a uma diferença de potencial de 1.40 kV para a introdução do DNA na célula (eletroporador Bio-Rad®). Após os pulsos elétricos, foi adicionado às células 1mL de meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 10g/L) para recuperação celular durante 1h a 37°C.

Posteriormente a recuperação das células, a cultura foi plaqueada em meio sólido LB-Ágar contendo 30µg/mL de canamicina no caso do vetor pET28a(+) e 50µg/mL de ampicilina no caso do vetor pcDNA3.1(-)6his.

As colônias que conseguiram crescer em meio seletivo foram usadas para reação de PCR de colônia, na qual ao invés de se usar um molde de DNA para amplificar uma região determinada pelos iniciadores, utiliza-se a própria cultura bacteriana.

Essa reação foi feita coletando-se colônias de bactérias em palitos que foram então passados no fundo de microtubos próprios para reações de PCR. Cada amostra recebeu 1µL de tampão para Taq DNA Polimerase 10 vezes

concentrado, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,5μM de iniciador forward, 0,5μM de iniciador reverse, 1U/μL Taq DNA polimerase e água ultrapura autoclavada completando para volume reacional de 10μL.

Os iniciadores usados e as condições da reação foram os seguintes:

pcDNA3.1(-)6his + USPb

Forward: T7 promoter – 5' – TAATACGACTCACTATAGGG – 3'

Reverse: BGH – 5' – TAGAAGGCACAGTCGAGG – 3'

pET28a(+) + USP2b

Forward: T7 promoter – 5' – TAATACGACTCACTATAGGG – 3'

Reverse: T7 terminator – 5' – GCTAGTTATTGCTCAGCGG – 3'

A incubação das reações foi a 95°C por 5min, seguida de 30 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95°C por 1min, 45,5°C 2min, 72°C por 1min e, após termino dos ciclos, 72°C por 10min. As reações foram então analisadas em gel de agarose 1%.

3.3.1.4 Purificação plasmidial em Pequena Escala (mini-prep) de pcDNA3.1(-) e pET28a(+) com inserto USP2b

Algumas colônias que apresentaram resultados positivos na PCR de colônia foram usadas para fazer preparação plasmidial em pequena escala (mini-prep). Essa etapa foi necessária para se purificar o plasmídeo, de modo que se conheça sua concentração para uso em demais análises.

Os clones recombinantes foram cultivados em 5mL de meio LB contendo o antibiótico canamicina a 30μg/mL (para pET28a(+)) ou ampicilina 50μg/mL (para pcDNA3.1(-)6his) durante 16h sob agitação constante a 37°C. Esta cultura foi então centrifugada a 5400xg por 10min a 4°C e os plasmídeos recombinantes purificados com o sistema de mini preparação de plasmídeo QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN®) de acordo com as recomendações do fabricante.

A quantificação do plasmídeo obtido foi feita por análise de absorvância em 260nm, verificando-se também a absorvância em 230nm e 280nm, que estão relacionadas com contaminação do plasmídeo por solventes orgânicos e

proteínas, respectivamente. Essa análise foi realizada no nanodrop (Thermo Fisher Scientific®).

3.3.1.5 Reação de sequenciamento

Com o plasmídeo purificado a partir das colônias que apresentaram o inserto na PCR de colônia, foi feita a reação de sequenciamento de nucleotídeos. As reações de sequenciamento foram feitas incubando 1µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems®), 1,5µL de tampão para sequenciamento 5 vezes concentrado, 5 pmol de iniciador forward e reverso para sequenciamento do sítio de policlonagem do pcDNA3.1(-)6his e 300ng do plasmídeo em um volume final de 10µL. A reação foi realizada a 96°C por 2min seguida de 40 ciclos de 96°C por 15s, 45,5°C por 15s e 60°C por 4 minutos. Os iniciadores utilizados para cada vetor foram os mesmos do PCR de colônia.

As sequências obtidas foram analisadas por alinhamento com a sequência referência usando-se o programa Clustal Omega.

3. 4 EXPRESSÃO EM BACTÉRIA DA USP2b

3.4.1 Transformação bacteriana

A transformação foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) STAR, BL21 pLysS e Rosetta pLysS eletrocompetente da mesma maneira que em 3.3.1.3 com o vetor pET28a(+)+USP2b. Após a transformação as bactérias foram plaqueadas em meio ágar LB (10g/L de triptona, 5g/L extrato de levedura, 10g/L NaCl e 17g/L de ágar) + canamicina 30 µg/mL (resistência do plasmídeo) e demais antibióticos necessário para cada cepa bacteriana e incubadas à 37°C durante a noite.

3.4.2 Produção de antígeno recombinante

Foram selecionadas 4 colônias que cresceram na placa após a transformação e fez-se uma expressão em pequena escala (mini-expressão) para escolher a colônia com melhor expressão para posteriormente utilizar esta para larga escala.

As colônias selecionadas foram inoculadas em uma placa separada para depois ter acesso a colônia específica com melhor resultado e em seguida inoculadas em um frasco com 3mL de meio LB ou TB (12g/L triptona, 24g/L extrato de levedura, 4mL/L glicerol, 170mM KH₂PO₄ e 720mM K₂HPO₄) + antibióticos. A placa ficou durante a noite à 37°C na estufa e o frasco no agitador à 37°C. Essas culturas em fase de crescimento estacionário foram usadas como pré-inoculo do processo de mini-expressão. Em novos frascos, contendo 10mL de meio LB ou TB seletivo, fez-se a inoculação 1:50 e incubou-se à 37°C, 210RPM até que atingissem D.O. entre 0,5 e 0,8 quando medidas em 600nm. Para controle negativo de expressão, 1mL de cada cultura foi separado. Nesse momento, 1mM de isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) foi adicionado à cultura induzindo o operon Lac que regula a expressão da proteína recombinante inserida no vetor pET28a. A indução ocorreu em condições de tempo e temperatura variáveis e em seguida coletou-se 1mL de cultura induzida. As culturas induzidas e não-induzidas foram centrifugadas 4000xg por 5min. O sedimento foi então ressuscitado em 100 μ L de tampão de amostra redutor (60mM 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 20min. Dessa amostra 20 μ L foram submetidos a uma separação eletroforética por SDS-PAGE (10% de poliacrilamida) e corada com azul de coomassie para verificação do clone com melhor taxa de expressão (SHAPIRO *et al.*, 1967).

3.5 EXPRESSÃO EM EUCARIOTO DA USP2b

Para expressão da USP2b em eucarioto, os plasmídeos pcDNA3.1(-)6his + USP2b e pGFP (controle de transfecção) foram transfectados em células

HEK293T de acordo com Sambrook, *et al* (1989). As células foram mantidas por 24h e depois foi feito o extrato celular.

Após 24h da transfecção, as células foram lavadas com PBS gelado. Soltou-se todas as células com 1mL de PBS 1x gelado e centrifugou-se 2000g por 2min a 4°C para sedimentar as células. Adicionou-se de 2 a 3 vezes o volume do sedimento de tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% deoxicolato, 0,5% triton X-100, 1mM PMSF, 1mM NEM) e ressuspendeu-se. As células foram deixadas lisando por 30min no gelo e centrifugadas a 13000g por 10min a 4°C.

A verificação da expressão de USP2b foi feita por meio de western blotting. Fez-se separação eletroforética por SDS-PAGE com 60µg de extrato de células HEK293T transfectada com USP2b e GFP e transferiu-se para membrana de PVDF (polivinilideno difluorado) GE®. Esta membrana foi incubada com o primário anti-his (Roche®) durante a noite. No dia seguinte, incubou-se a membrana com anticorpo secundário anti-mouse (Sigma®) durante 1h para em seguida a reação foi revelada com ECL (Thermo Fisher Scientific®).

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA USP2a

USP2a foi expressa em *E. coli* BL21(DE3)STAR com pET28a(+)+USP2a após indução com 0,2mM de IPTG em ensaio de mini-expressão. Como pode ser observado na FIGURA 6, há presença de uma banda pronunciada próxima a altura de 69kDa nas colunas 2, 4, 6 e 8 (a proteína USP2a tem aproximadamente 69kDa), indicando que todas as colônias escolhidas expressaram USP2a quando induzidas com IPTG. Ausência de bandas nas colunas 1, 3, 5 e 7 (culturas não induzidas) com mesma intensidade de coloração daquela observada para culturas induzidas (2, 4, etc) sugerem que a super expressão da proteína de interesse ocorreu de forma adequada. Como as bandas da USP2a possuem aproximadamente as mesmas intensidades em todas as culturas, qualquer colônia poderia ser escolhida para expressão em larga escala.

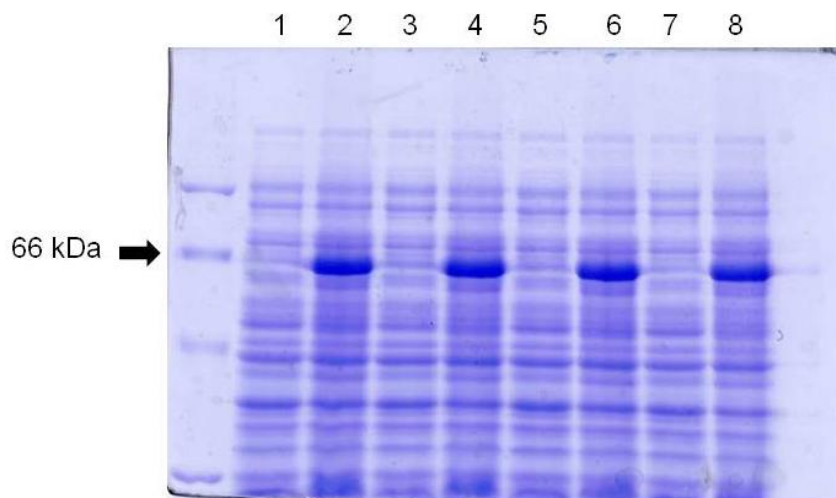


FIGURA 6 – EXPRESSÃO DE USP2a É INDUZIDA POR IPTG EM ENSAIO DE MINI-EXPRESSÃO.

NOTA: a presença de uma banda pronunciada na altura próxima de 69kDa nas colunas 2, 4, 6 e 8 (colônias induzidas) indicam que USP2a foi induzida por IPTG. A ausência de banda pronunciada na mesma altura nas colunas 1, 3, 5 e 7 (colônias não induzidas) leva a conclusão que a banda que aparece nas colônias induzidas corresponde a expressão da USP2a. Como todas as colônias tiveram expressões parecidas, qualquer uma poderia ser escolhida para expressão em larga escala. 1 – colônia 1 não induzida; 2 – colônia 1 induzida; 3 - colônia 2 não induzida; 4 - colônia 2

induzida; 5 - colônia 3 não induzida; 6 - colônia 3 induzida; 7 - colônia 4 não induzida; 8 - colônia 4 induzida.

FONTE: A autora (2016).

Uma vez que não houve diferença grosseira na quantidade de USP2a expressa pelas diferentes colônias nos ensaios de mini-expressão, a colônia 1 foi escolhida para a expressão em larga escala da proteína recombinante. A análise de amostras de cada uma das etapas de purificação da USP2a pode ser vista na FIGURA 7. Foi possível obter a maior parte da USP2a em uma única fração (coluna 5). A proteína obtida é razoavelmente pura uma vez que banda única de ca. 66 kDa pode ser observada nesta fração. A ausência de banda correspondente a 66 kDa nas amostras provenientes da resina após eluição (coluna 2) e efluente das lavagens (colunas 3 e 4) indica que as perdas por precipitação ou desligamento prematuro da USP2a da matriz cromatográfica podem ser consideradas desprezíveis. Além disso, pouca USP2a permaneceu na fração não ligada (coluna 1) quando se compara ao enriquecimento proporcionado pela matriz NTA-Agarose, indicando que as condições de exigência de ligação (10mM de imizadol) foram adequadas para permitir a ligação de USP2a à matriz e a não-interação de contaminantes com a resina (ex. duas bandas de massa molecular superior que são observadas na coluna 1). Ao final da purificação obteve-se um rendimento de 19,6mg/L.

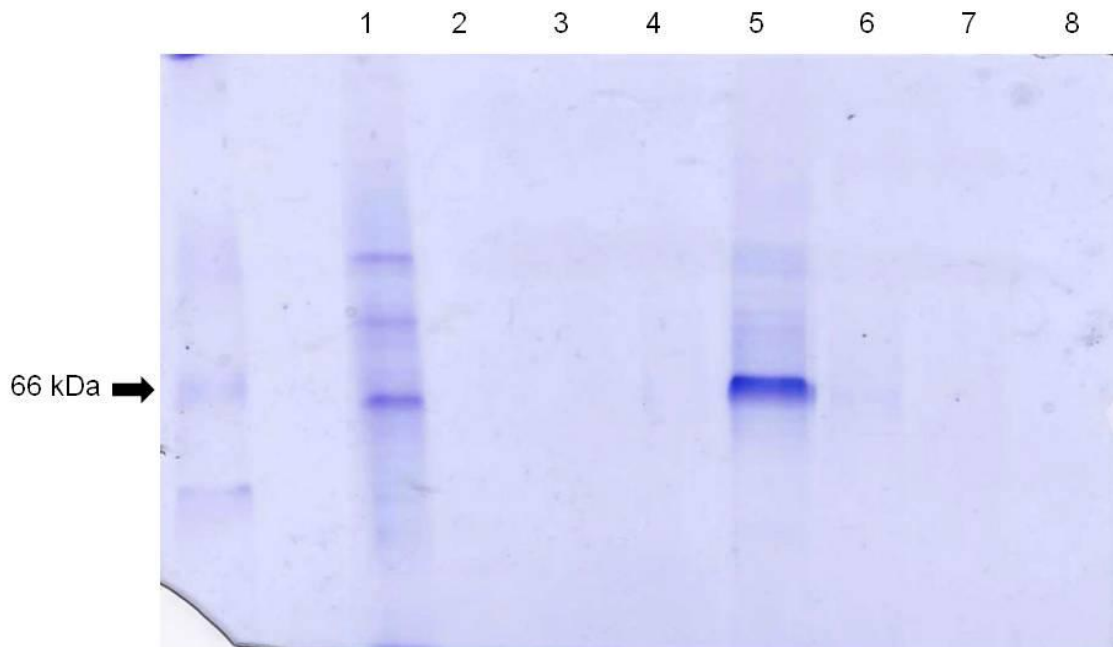


FIGURA 7 – USP2a É PURIFICADA EM COLUNA DE Ni-NTA AGAROSE.

NOTA: gel de poliacrilamida 10% mostrando as etapas da purificação. A proteína, por conter cauda de 6 histidinas, foi purificada por coluna de níquel, obtendo assim ao final uma solução com proteína pura. Banda próxima a altura de 69kDa na coluna 1 indica que após a incubação do lisado de bactéria com a resina de níquel, uma pequena quantidade de USP2a não se ligou a coluna. Praticamente nenhuma proteína foi perdida durante a lavagem e a ausência de banda na coluna 2 indica que USP2a não precipitou na resina durante a purificação. Na coluna 5 pode-se ver o primeiro eluato com uma banda pronunciada e praticamente única na altura próxima a 69kDa que corresponde a USP2a razoavelmente pura. 1 – fração não ligada; 2 – resina; 3 – lavagem 1; 4 – lavagem 2; 5 – Eluato 1; 6 – Eluato 2; 7 – Eluato 3; 8 – Eluato 4.

FONTE: A autora (2016).

4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI USP2a

4.2.1 Imunização dos camundongos e teste dos soros policlonais

Após o período de imunização e o procedimento para a coleta de sangue, os soros de 3 animais foram testados quanto ao reconhecimento de USP2a por western blot (FIGURA 8). Foi avaliada a presença de anticorpos específicos para USP2a reagindo esses soros com lisados de linhagens celulares humanas RWPE-1 (ATCC® CRL-11609™), que são células normais de próstata e LNCaP (ATCC® CRL-1740™), que são células cancerígenas de próstata superexpressando ou não a proteína USP2a fundida com etiqueta de hemaglutinina (HA) (RIBEIRO, 2016).

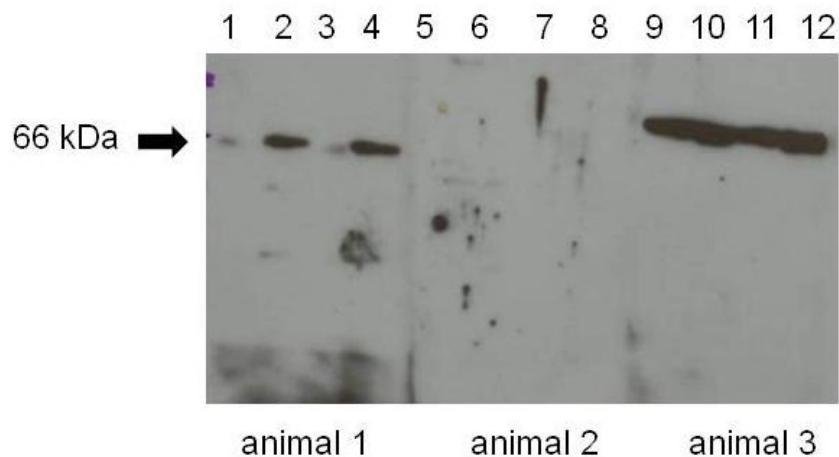


FIGURA 8 – SORO POLICLONAL RECONHECE USP2a SUPEREXPRESSA E ENDÓGENA EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.

NOTA: Western blot do soro policlonal de três camundongos imunizados com USP2a purificada. A massa molecular esperada para USP2a-HA e a forma endógena é praticamente a mesma, 69 kDa. Como a massa total de proteína aplicada em cada linha é a mesma, uma maior intensidade de sinal obtida nas linhagens transfectadas com USP2a-HA sugere que o sinal seja a somatória dos sinais para a forma endógena e a superexpressa. Os camundongos 1 e 3 reconheceram USP2a em extrato de células LNCaP, LNCaP transfectada com USP2a, RWPE1 e RWPE1 transfectada com USP2a, tendo o camundongo três respondido melhor. 1 – LNCaP; 2 – LNCaP transfectada com USP2a; 3 – RWPE1; 4 – RWPE1 transfectada com USP2a; 5 – LNCaP; 6 – LNCaP transfectada com USP2a; 7 – RWPE1; 8 – RWPE1 transfectada com USP2a; 9 – LNCaP; 10 – LNCaP transfectada com USP2a; 11 – RWPE1; 12 – RWPE1 transfectada com USP2a.

FONTE: A autora (2016).

Os soros dos animais 1 e 3 possuíam anticorpos que se ligaram tanto a USP2a endógena (colunas 1, 3, 9 e 11) como aquela superexpressa permanentemente nas linhagens que continham o plasmídeo pBABE-USP2a-HA (colunas 2, 4, 10 e 12). O resultado obtido para cada soro foi semelhante nas linhagens LNCaP e RWPE1. A massa molecular esperada para USP2a-HA é praticamente a mesma que a da forma endógena (ca. 69 kDa) assim não é possível diferenciar as duas formas nas linhagens que expressam USP2a-HA. Por outro lado, como a massa total de proteína aplicada em cada coluna é a mesma (50 µg/linha), uma maior intensidade de sinal obtida nas linhagens superexpressando USP2a-HA sugere que o sinal seja o somatório dos sinais para a forma endógena e a superexpressa. Este resultado pode ser melhor observado no soro do animal 3 (comparar colunas 09 e 10, para LNCaP, ou 11 e 12, para

RWPE1). Outro fato interessante é que os anticorpos do animal 3 aparentemente se ligam mais eficientemente à forma endógena da USP2a do que aqueles presentes no soro do animal 1 (comparar colunas 1 com 9 e 3 com 11). Entretanto não podemos excluir a possibilidade que a diferença na intensidade de sinais seja consequência da concentração relativa de anti-USP2a presente em cada uma das amostras de soros. O soro do animal 2 apresentou apenas uma reatividade difusa e não-específica para a USP2a, frente aos quatro diferentes extratos proteicos (Figura 4, linhas 5-8). Desta forma o animal 3 foi selecionado como sendo a melhor fonte de esplenócitos para a obtenção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais após procedimento de fusão celular.

4.2.2 Varredura dos hibridomas por ELISA (enzima imunoensaio)

Os sobrenadantes das culturas celulares resultantes do procedimento de fusão foram testados quanto a presença de anticorpos anti-USP2a por ELISA de captura de anticorpo (FIGURA 9). No gráfico de barras estão dispostas as absorbâncias do controle positivo (soro policlonal), controle negativo (meio de cultura de manutenção do hibridoma) e sobrenadantes de diferentes hibridomas obtidos ao final da fusão.

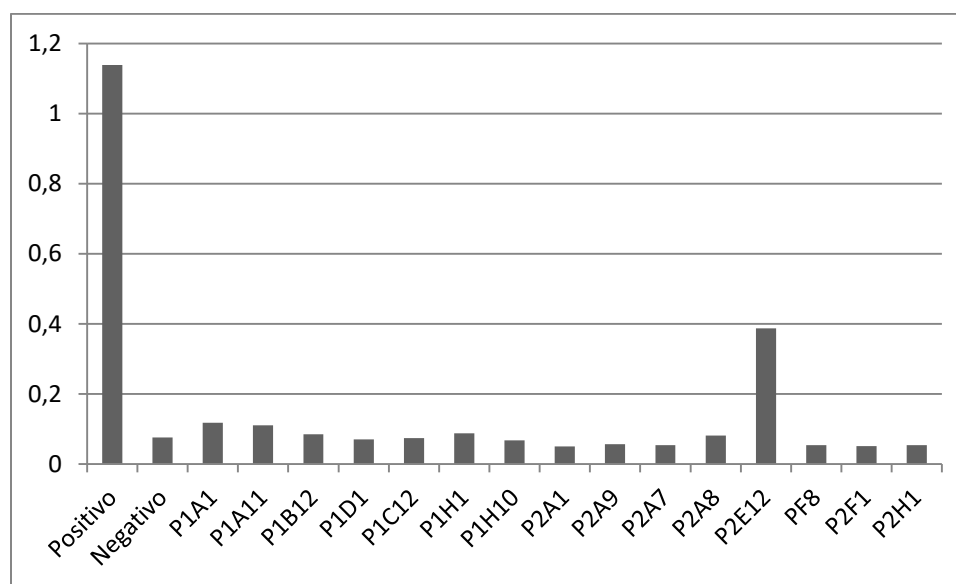


FIGURA 9 – HIBRIDOMA PRODUZINDO ANTICORPOS ANTI-USP2a.

NOTA: Os sobrenadantes dos hibridomas foram testados por varredura por ELISA de captura de anticorpo após a fusão a fim de identificar a presença de anticorpos anti-USP2a. Neste gráfico de barras tem-se uma comparação da absorbância dos controles positivos e negativos com os hibridomas. Somente o hibridoma P2E12 secretava anti-USP2a no sobrenadante de cultura já que sua absorbância é pelo menos de 2 a 3 vezes maiores que o controle negativo. Controle positivo - soro policlonal dos camundongos usados para a fusão. Controle negativo – meio de cultura de manutenção dos hibridomas.

FONTE: A autora (2016).

Como pode ser visto na FIGURA 9, somente as células P2E12 responderam positivamente para a presença de anticorpos anti-USP2a com absorbância maior que 2 a 3 vezes o valor do controle negativo. Desde modo, essas células foram escolhidas para prosseguir no processo de isolamento de apenas um clone celular através da técnica de diluição limitante.

A varredura da diluição limitante é mostrada na FIGURA 10 na qual todos os clones testados mostraram positividade para a presença de anticorpos monoclonais anti-USP2a com base nas suas absorbâncias comparadas com os controles. Com base na intensidade de sinal no ensaio de ELISA e a análise em microscopia óptica através da qual pode-se comprovar a existência de colônia única garantindo assim que o anticorpo é monoclonal, um hibridoma foi selecionado para dar continuidade à caracterização: 4GD2.

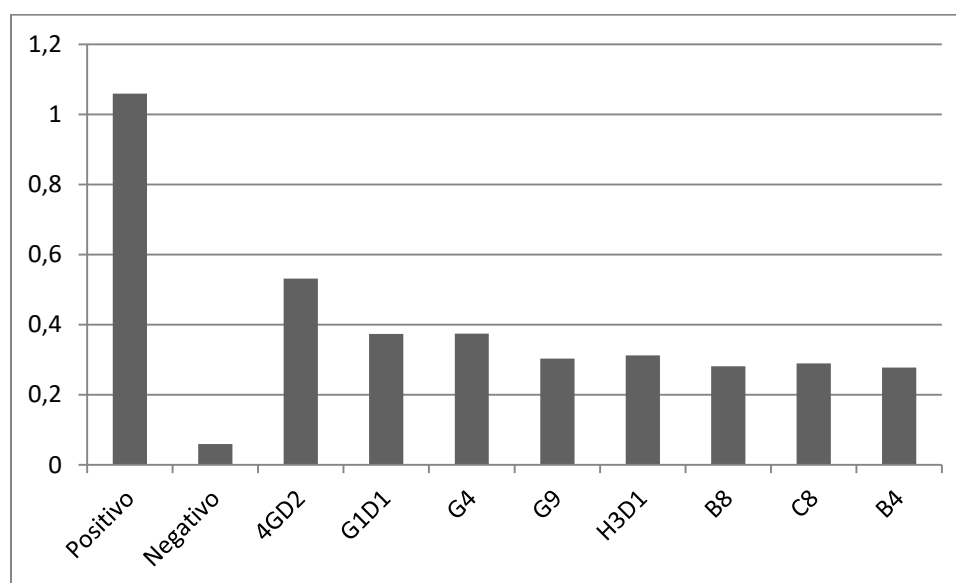


FIGURA 10 – HIBRIDOMAS PRODUZINDO ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-USP2a APÓS DILUIÇÃO LIMITANTE.

NOTA: Hibridomas foram testados por varredura por ELISA de captura de anticorpo após a diluição limitante a fim de identificar a presença de anticorpos monoclonais anti-USP2a secretados pelos mesmos. Neste gráfico de barras tem-se uma comparação da absorbância dos controles positivos e negativos com as células monoclonais. Todas as células secretavam anti-USP2a no sobrenadante de cultura já que suas absorbâncias eram pelo menos de 2 a 3 vezes maiores que o controle negativo. Com o auxílio de análise em microscopia óptica, um clone foi escolhido para dar seguimento à caracterização do anticorpo: 4GD2. Controle positivo - soro policlonal dos camundongos usados para a fusão. Controle negativo – meio de cultura de manutenção dos hibridomas.

FONTE: A autora (2016).

É de extrema importância garantir que o anticorpo seja monoclonal para que todos os experimentos realizados com este não apresentem variações que aconteceriam na utilização de anticorpos policlonais, já que estes provêm de clones de células diversas. Com a garantia da monoclonaridade, o anticorpo secretado pelo hibridoma escolhido foi então caracterizado por western blot quanto a sua capacidade de reconhecer a proteína endógena expressa por diferentes células.

4.2.3 Caracterização do anticorpo monoclonal por Western Blot

Após os testes de ELISA com os sobrenadantes dos hibridomas da fusão e da diluição limitante os anticorpos secretados pelo clone selecionado foram avaliados quanto ao reconhecimento de USP2a em lisado de HEK293T que superexpressava transientemente a proteína USP2a fundida com etiqueta de FLAG (FIGURA 11). Na coluna 3 o lisado de HEK293T superexpressa foi reagido com o monoclonal 4GD2 e a presença da banda na altura esperada (aproximadamente 69kDa) indica que o monoclonal reconhece USP2a superexpressa em eucarioto. Com a ausência de banda na coluna 1 (controle negativo), lisado celular de HEK293T sem USP2a superexpressa, pode-se inferir que a banda presente na coluna 3 é específica para a proteína em questão. As demais colunas 2 e 4 são os controles positivos da transfecção, sendo a coluna 2 controle da transfecção com pGFP vazio e a coluna 4 controle da transfecção com anti-FLAG. A presença de bandas nos controles positivos valida o teste. Este resultado também sugere que a expressão endógena de USP2a pela linhagem

HEK293 seja nula ou presente abaixo do limite de detecção do método analítico empregado (tipicamente 0,1 ng de proteína).

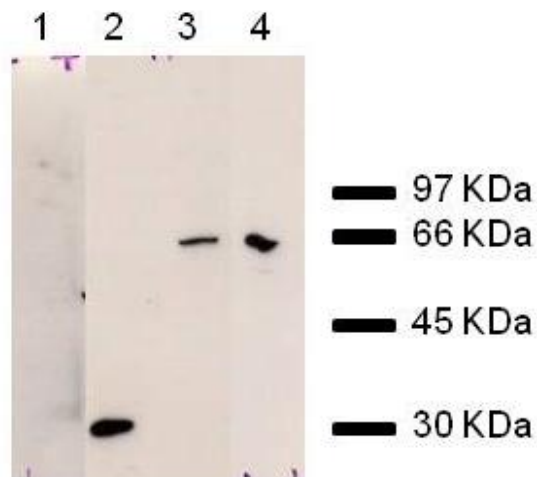


FIGURA 11 – ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-USP2a 4GD2 RECONHECE USP2a SUPEREXPRESSA EM CÉLULAS HEK293T.

NOTA: Western blot do anticorpo monoclonal 4GD2. A massa molecular esperada para USP2a-FLAG é próxima de 69kDa. A presença de uma banda na coluna 3 na altura esperada indica que o anticorpo está reconhecendo USP2a superexpressa em HEK293T transientemente. Já a ausência de banda na coluna 1 indica que em células HEK293T não transfectada o anticorpo não reconhece nada, levando a conclusão de que a banda mostrada na coluna 3 é específica e que a USP2a endógena em HEK293T não é detectável. As colunas 2 e 4 que são controles da transfecção GFP e anti-FLAG, respectivamente validam o resultado. 1 – Controle negativo: lisado celular de HEK293T não transfectada reagido com o monoclonal 4GD2. 2 – Controle positivo: lisado celular de HEK293T transfectada com pGFP vazio reagido com anti-GFP. 3 – lisado celular de HEK293T transfectada com pDEST+USP2a reagido com o monoclonal 4GD2. 4 – Controle positivo: lisado celular de HEK293T transfectada com pDEST+USP2a reagido com anti-FLAG.

FONTE: A autora (2016).

Como o objetivo é produzir anticorpo monoclonal específico para a isoforma USP2a, realizou-se outro western blot para verificar se o monoclonal 4GD2 também reconhecia a isoforma USP2b. Como pode ser observado na FIGURA 12, o monoclonal gerado é específico para USP2a. Na coluna 2, que é o lisado celular de HEK293T superexpressando USP2b (*cf.* item 4.5), não apareceu nenhuma banda, indicando que o anticorpo não reconhece a proteína em questão. Para garantir que o resultado negativo não era devido a falta de USP2b no lisado, reagiu-se o mesmo lisado da coluna 3 com anticorpo anti-His (direcionado para a etiqueta de hexa-His presente na proteína). Com a presença de uma banda na

altura próxima de 45kDa garantiu-se a presença de USP2b no lisado, validando o resultado. Já as colunas 1 (lisado células de HEK293T superexpressando USP2a) e 4 (USP2a recombinante feita em bactéria) são os controles positivos dos anticorpos 4GD2 e anti-His, respectivamente.

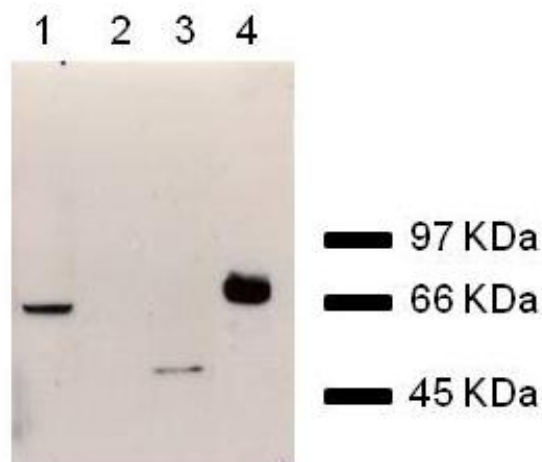


FIGURA 12 – ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-USP2A 4GD2 É ESPECÍFICO PARA A ISOFORMA USP2a.

NOTA: O monoclonal 4GD2, como pode ser demonstrado nesta figura, é específico para USP2a já que na coluna 2, o lisado celular de HEK293T superexpressando USP2b reagido com o anticorpo em questão não apresentou nenhum padrão de banda correspondente ao reconhecimento de USP2b. Para validar esse resultado, reagiu-se na coluna 3 o lisado de HEK293T superexpressando USP2b com anti-his (etiqueta presente na proteína), garantindo assim a presença de USP2b no lisado (presença de banda na altura próxima de 45kDa). Como controle positivo dos anticorpos foi reagido na coluna 1 lisado de HEK293T superexpressando USP2a (controle do monoclonal 4GD2) e na coluna 4 USP2a recombinante feita em bactéria com cauda de histidina (controle do anti-his). 1 - Controle positivo: lisado celular de HEK293T superexpressando USP2a reagido com o monoclonal 4GD2. 2 – Lisado celular de HEK293T superexpressando USP2b reagido com o monoclonal 4GD2. 3 – Controle positivo: lisado celular de HEK293T superexpressando USP2b reagido com anti-his. 4 – Controle positivo: USP2a recombinante feita em bactéria reagido com anti-his.

FONTE: A autora (2016).

4.3. CLONAGEM DA USP2b

4.3.1 Clonagem em pET28a(+)

Após as etapas de clonagem, os vetores purificados por mini-preparação foram submetidos ao sequenciamento para analisar se não houve nenhuma

mutação ou deleção na sequência clonada que poderia interferir no produto final. Como pode ser visto na FIGURA 13 a sequência clonada alinha perfeitamente com a sequência referência, sem presença de nenhuma mutação, deleção ou inserção de pares de base.

```

CLUSTAL O (1.2.3) multiple sequence alignment

Seqref      -----
Seqclonada  GGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCOCGGCGGCACCATAT

Seqref      -GCTAGCGCCGCCACCATGAGAACCAAGCTACACCGTGACCCCTGCCCGAGGATCCACAGC
Seqclonada  GGGTAGCGCCGCCACCATGAGAACCAAGCTACACCGTGACCCCTGCCCGAGGATCCACAGC

Seqref      CGCTCCATTTCCAGCCCTGGCCAAAGAGCTGAGGCCAAGAAGCCCTCTGAGCCCTCTCT
Seqclonada  CGCTCCATTTCCAGCCCTGGCCAAAGAGCTGAGGCCAAGAAGCCCTCTGAGCCCTCTCT

Seqref      GCTGCTGTCCACTTTGTGGGCTGCTGCTGACAGGGCCAGAACAGCAGAGCCCA
Seqclonada  GCTGCTGTCCACTTTGTGGGCTGCTGCTGACAGGGCCAGAACAGCAGAGCCCA

Seqref      GGGCTGGCCGGCTGAGAAATCTGGCAATACCTGCTTCTGAACAGCATCCTGACAGT
Seqclonada  GGGCTGGCCGGCTGAGAAATCTGGCAATACCTGCTTCTGAACAGCATCCTGACAGT

Seqref      CCTGAGCAACACAGAGAGCTGGGGACTACTGCCCTGACAGGGCTGTACATGAGGGACT
Seqclonada  CCTGAGCAACACAGAGAGCTGGGGACTACTGCCCTGACAGGGCTGTACATGAGGGACT

Seqref      GCACCAAGCAGCAATGCCACACAGCCCTGGTGAAGAGTTCGCCAAGCTGATCCAGAC
Seqclonada  GCACCAAGCAGCAATGCCACACAGCCCTGGTGAAGAGTTCGCCAAGCTGATCCAGAC

Seqref      CATCTGGAACAGCAGCCCAACGACGTGGTGTCCCCAGCGAGTTCAGAACCCAGATCCA
Seqclonada  CATCTGGAACAGCAGCCCAACGACGTGGTGTCCCCAGCGAGTTCAGAACCCAGATCCA

Seqref      GAGATCGCCCCAGATTCGTGGGCTACAAACAGCAGGACGCCCGAGGAAATTTCTCGGTT
Seqclonada  GAGATCGCCCCAGATTCGTGGGCTACAAACAGCAGGACGCCCGAGGAAATTTCTCGGTT

Seqref      CCTGCTGGACGGCTGCACAACGAAAGTAAACAGAGTGACCTGAGGCCAAGAGCAACC
Seqclonada  CCTGCTGGACGGCTGCACAACGAAAGTAAACAGAGTGACCTGAGGCCAAGAGCAACC

Seqref      CGAGAACCTGACCATCTGCCACGACGAGAGGGCAGACAGATGTGGCGAAGTACTT
Seqclonada  CGAGAACCTGACCATCTGCCACGACGAGAGGGCAGACAGATGTGGCGAAGTACTT

Seqref      GGAAGAGAGGACAGCCGGATCGCGACCTGTCTGTGGGCTAGCTGAAAGTCCAGCTGAC
Seqclonada  GGAAGAGAGGACAGCCGGATCGCGACCTGTCTGTGGGCTAGCTGAAAGTCCAGCTGAC

Seqref      CTGTACCGACTGGGCTACTGCTTACCGTGTCTGACCCCTCTGGACCTGAGCCTGCC
Seqclonada  CTGTACCGACTGGGCTACTGCTTACCGTGTCTGACCCCTCTGGACCTGAGCCTGCC

Seqref      TATGCCAAGCGGGCTACCCGAAAGTACACTGATGATCTGCATCGCCCTGTTCACAA
Seqclonada  TATGCCAAGCGGGCTACCCGAAAGTACACTGATGATCTGCATCGCCCTGTTCACAA

Seqref      AGAAGATGTGCTGGACGGGACGAGAGCCTACTCTGTCAGATGCCGGGACGAAAGCG
Seqclonada  AGAAGATGTGCTGGACGGGACGAGAGCCTACTCTGTCAGATGCCGGGACGAAAGCG

Seqref      GTGCATCAGAAGTTCAGCATCCAGCGGTTCCCAAGATCTTGTGCTGCACTGAAAGCG
Seqclonada  GTGCATCAGAAGTTCAGCATCCAGCGGTTCCCAAGATCTTGTGCTGCACTGAAAGCG

Seqref      GTTCAGCGAGAGCCGGATCAGAACCCAGACTGACCACTTCGTGAACCTCCCTCTGG
Seqclonada  GTTCAGCGAGAGCCGGATCAGAACCCAGACTGACCACTTCGTGAACCTCCCTCTGG

Seqref      GGACTGGACTGAGAGAGTTTGGCAGCGAGAACCAACACCGCCGTGTACACTGTA
Seqclonada  GGACTGGACTGAGAGAGTTTGGCAGCGAGAACCAACACCGCCGTGTACACTGTA

Seqref      CGCCGTGTCCAATCACAGCGCACCAAGTGGCGGCCACTACACCGCCTACTGCAGATC
Seqclonada  CGCCGTGTCCAATCACAGCGCACCAAGTGGCGGCCACTACACCGCCTACTGCAGATC

Seqref      TCCAGGCACCGGAGTGGCAACCTTCAAGATAGCAGGTGACCCCATGAGCAGCG
Seqclonada  TCCAGGCACCGGAGTGGCAACCTTCAAGATAGCAGGTGACCCCATGAGCAGCG

Seqref      CCAAGTGGGACCTCCGACGCTATCTGCTGTCTACGAGCTGGCTCCCCACCCAGCG
Seqclonada  CCAAGTGGGACCTCCGACGCTATCTGCTGTCTACGAGCTGGCTCCCCACCCAGCG

Seqref      AATGACTCGAGCACCAACCAACCACTGAGATCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAG
Seqclonada  AATGACTCGAGCACCAACCAACCACTGAGATCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAG

Seqref      -----
Seqclonada  GCTAGGC

```

FIGURA 13 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA REFERÊNCIA COM O VETOR pET28a(+)+USP2b CLONADO.

NOTA: a clonagem do vetor foi bem sucedida já que a sequência obtida no sequenciamento alinhou corretamente com a sequência referência pelo programa Clustal Omega. Os * indicam pares de bases iguais. O códon em amarelo indica o códon de início e o códon em vermelho corresponde ao stop códon.

FONTE: A autora (2016).

4.3.2 Clonagem em pcDNA3.1(-)6his

O vetor pcDNA3.1(-)6his+USP2b purificado por mini-preparação foi sequenciado e alinhado com a sequência referência com o programa Clustal Ômega. Como pode ser visto na FIGURA 14 a sequência clonada alinha perfeitamente com a sequência referência, sem presença de nenhuma mutação,

deleção ou inserção de pares de base garantindo assim que a proteína expressa corresponderá exatamente a USP2b.

```

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment
Seqref      AAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATC
Seqclonada  -----

Seqref      GACTCACTATAGGGAGACCCAGCTGGCTAGCGCCGCCACCTAGAGAACCAGTACACCG
Seqclonada  -----
                *..*
                ..

Seqref      TGAACCTGCCCGAGGATCCACGAGCCCTCCATTTCCAGCCCTGGCCAAAGAGCTGAGGC
Seqclonada  -----

Seqref      CCAGAGCCCTCTGAGCCCTCTCTGCTGCTGCCACTTTGTGGCCCTGCTGTGAACA
Seqclonada  -----

Seqref      AGGCCAAGAACAGCAAGAGCGCCAGGCCCTGGCCGCTGAGAATCTGGCAATACCT
Seqclonada  -----

Seqref      GCTTCATGAACAGCATCTTGCAGTGCCTGAGCAACCCAGAGACTGCGGGACTACTGCC
Seqclonada  -----

Seqref      TGCAGCGGCTGTACATGAGGGACTGCAACCAGGCGCAATGCCACACAGCCCTGGTGG
Seqclonada  -----

Seqref      AAGAGTTCGCCAAGCTGATCCAGACCATCTGGACCGCAGCCCAACGAAGTGGTGTCC
Seqclonada  -----

Seqref      CCAGCGAGTTCAGAGCCAGATCCAGAGATAGGCCCCAGATTCGTGGGCTACAAACCAG
Seqclonada  -----

Seqref      AGGAGCGCCAGGAATTTCTGCGGTTCTGCTGGACGGCTGACACAGAGTGAACAGAG
Seqclonada  -----

Seqref      TGAACCTGAGGCTTAAGAGCAACCCGAGAACCTGGACCATCTGCCGAGSACGAGAGS
Seqclonada  -----

Seqref      GCAGACAGATGTGCCGGAATACCTGGAAAGAGAGGACAGCCGGATCGGGACCTGTTCG
Seqclonada  -----

Seqref      TGGGCCAGCTGAAGTCCAGSCTGACCTGTACCGACTGCGGCTACTGCTCAACGGTGTTCG
Seqclonada  -----

Seqref      ACCCTTCTGGGACTGAGCCTGCTATCGCAAGCGGGGCTACCCGAGTGAACCTGA
Seqclonada  -----

Seqref      TGGACTGCATGCCCTGTTCACCAAAGAGATGTGCTGGACGGGGACGAGAGCTTACCT
Seqclonada  -----

Seqref      GCTGCAGATGCCGGGCGAAGCGGTGCATCAAGAGTTCAGCATCCAGCGGTCCCCA
Seqclonada  -----

Seqref      AGATCTTGGTGTGTCACCTGAGCGGTTGACGAGAGCCGGATCAGAACCAAGAGCTGA
Seqclonada  -----

Seqref      CCACCTTCGTGAATTCCTCCCTGCGGGACTGGACCTGAGAGATTTGCCACGGAGAAC
Seqclonada  -----

Seqref      CCAACCACCGCTGTACAACTGTACGCCGTGTCCATCACAGCGGACACAAATGGGG
Seqclonada  -----

Seqref      GCCACTACCCGCTACTGCAGATCTCCAGCCACCGCGAGTGGCACCTTCAACGATA
Seqclonada  -----

Seqref      GCAGGTTGACCCCATGAGCAGAGCCAGTSCGGACTCCGAGCCCTATCTGCTGTCT
Seqclonada  -----

Seqref      ACGAGCTGGCTCCCCACCAGAGAACTCGAGCGGCGCCACTGTGCTGGATATCT
Seqclonada  -----

Seqref      GCAGATTCACCAACTGGACTAGTGGATCCCATCATCATCATCATCAITAGGTACCA
Seqclonada  -----

Seqref      GCTTAAGTTTAAACCGTGTATCAGCCCTGACCTGTGCCITCTAGTGGCAACCACTGTTCG
Seqclonada  -----

```

FIGURA 14 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA REFERÊNCIA COM O VETOR pcDNA(-)6his+USP2b CLONADO.

NOTA: a clonagem do vetor foi bem sucedida já que a sequência obtida no sequenciamento alinhou corretamente com a sequência referência pelo programa Clustal Omega. Os * indicam pares de bases iguais. O códon em amarelo indica o códon de início e o códon em vermelho corresponde ao stop códon.

FONTE: A autora (2016).

4.4 EXPRESSÃO EM BACTÉRIA DA USP2b

4.4.1 Expressão em *E. coli* BL21 (DE3) STAR

A primeira escolha para expressão em bactérias foi em *E. coli* BL21 (DE3) STAR com indução de 0,2mM de IPTG a 37°C por 3h em meio LB. Como pode ser visto na FIGURA 15, a ausência de uma banda pronunciada na altura próxima de 45kDa nas colônias induzidas indica que USP2b não foi expressa nessas condições. Esta isoforma da USP2 possui tamanho de 45kDa mesmo com a

etiqueta de hexa-His, deste modo, banda próximas de 45kDa é um indicativo da presença da proteína de interesse. Este conjunto de condições experimentais geralmente é a primeira escolha para tentativa de expressão de novas proteínas já que essa cepa de *E. coli* é a mais comum e a que se mostra mais bem sucedida na expressão de uma grande maioria de proteínas recombinantes.

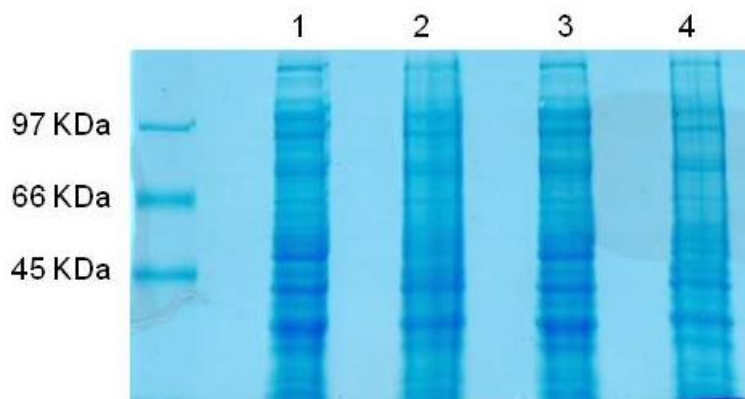


FIGURA 15 - USP2b NÃO É EXPRESSA EM *E. coli* BL21 (DE3) STAR COM INDUÇÃO DE 0,2mM DE IPTG A 37°C POR 3h EM MEIO LB.

NOTA: A ausência de uma banda pronunciada na altura próxima de 45kDa nas colunas 2 e 4 (culturas de bactérias induzidas) indicam que a isoforma USPb não foi expressa em *E. coli* BL21(DE3)STAR após indução com 0,2mM de IPTG. As colunas 1 e 3 são os controles negativos (culturas de bactérias não induzidas). 1 – Cultura de bactéria 1 não induzida. 2 – Cultura de bactéria 1 induzida. 3 – Cultura de bactéria 2 não induzida. 4 – Cultura de bactéria 2 induzida.

FONTE: A autora (2016).

Como a expressão da proteína não foi adequada com as condições mais comuns, fez-se algumas modificações nos parâmetros experimentais. A temperatura de indução foi modificada para minimizar alguma possível degradação da proteína durante a expressão. De acordo com a FIGURA 16, este modelo também não se mostrou eficiente na produção de USP2b já que também não se observa presença de uma banda pronunciada na altura próxima de 45kDa nas culturas induzidas que corresponderia a expressão da proteína desejada.

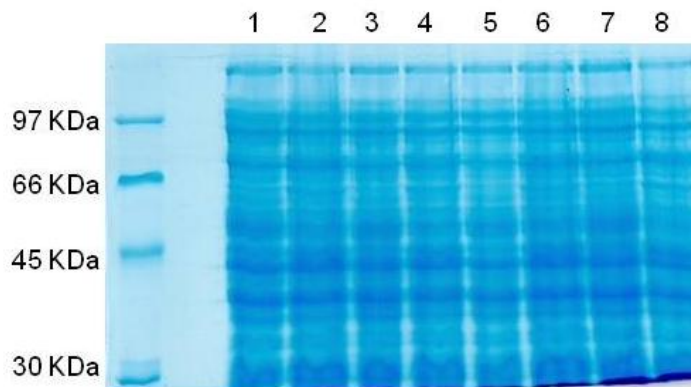


FIGURA 16 - USP2b NÃO É EXPRESSA EM *E. coli* BL21 (DE3) STAR COM INDUÇÃO DE 1mM DE IPTG A 30°C POR 3h EM MEIO LB.

NOTA: A ausência de uma banda pronunciada na altura próxima de 45kDa nas colunas 2, 4, 6 e 8 (culturas de bactérias induzidas) indicam que a isoforma USPb não foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) STAR após indução com 1mM de IPTG a 30°C. As colunas 1, 3, 5 e 7 são os controles negativos (culturas de bactérias não induzidas). 1 – Cultura de bactéria 1 não induzida. 2 – Cultura de bactéria 1 induzida. 3 – Cultura de bactéria 2 não induzida. 4 – Cultura de bactéria 2 induzida. 5 – Cultura de bactéria 3 não induzida. 6 – Cultura de bactéria 3 induzida. 7 – Cultura de bactéria 4 não induzida. 8 – Cultura de bactéria 4 induzida.

FONTE: A autora (2016).

4.4.2 Expressão em *E. coli* BL21 pLysS

Na FIGURA 17, a expressão foi realizada em uma cepa diferente de bactéria, *E. coli* BL21 pLysS com indução de 1mM de IPTG a 37°C por 3h em meio LB. Esta cepa foi utilizada pensando na possibilidade da USP2b ser tóxica já que a pLysS apresenta um menor nível basal de T7 RNA polimerase, diminuindo assim a expressão basal da recombinante e evitando a morte da bactéria por toxicidade. Neste modelo também não houve a expressão da proteína UPS2b que pode ser observado pela não diferença entre as culturas induzidas e não induzidas (FIGURA 17).

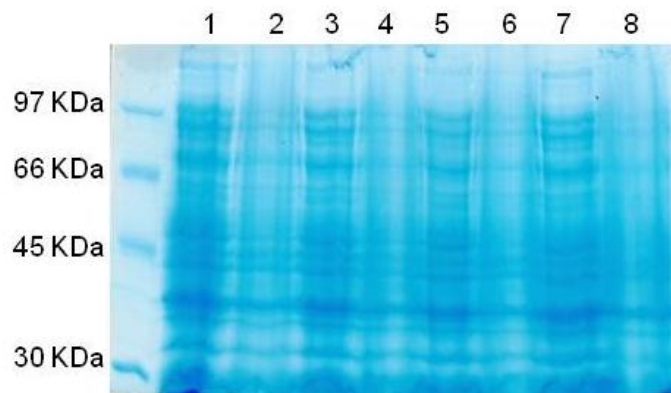


FIGURA 17 - USP2b NÃO É EXPRESSA EM *E. coli* BL21 pLysS COM INDUÇÃO DE 1mM DE IPTG A 37°C POR 3h EM MEIO LB.

NOTA: ausência de uma banda pronunciada na altura próxima de 45kDa nas colunas 2, 4, 6 e 8 (culturas de bactérias induzidas) indicam que a isoforma USPb não foi expressa em *E. coli* BL21 pLysS após indução com 1mM de IPTG a 37°C. As colunas 1, 3, 5 e 7 são os controles negativos (culturas de bactérias não induzidas). 1 – Cultura de bactéria 1 não induzida. 2 – Cultura de bactéria 1 induzida. 3 – Cultura de bactéria 2 não induzida. 4 – Cultura de bactéria 2 induzida. 5 – Cultura de bactéria 3 não induzida. 6 – Cultura de bactéria 3 induzida. 7 – Cultura de bactéria 4 não induzida. 8 – Cultura de bactéria 4 induzida.

FONTE: A autora (2016).

4.4.3 Expressão em *E. coli* Rosetta pLysS

Ao fazer uma análise da frequência de códons raros na sequência da USP2b, encontrou-se uma frequência acima da recomendada, por este motivo, tentou-se expressar a proteína em *E. coli* Rosetta pLysS, já que esta cepa carrega um plasmídeo que codifica tRNA para códons raramente empregados por genes bacterianos, mas comumente encontrados em genes eucarióticos. Do mesmo modo que nos modelos anteriores, a expressão não foi bem sucedida, e isto pode ser verificado na ausência de quantidade significativa de proteína na altura próxima de 45kDa em oposição a cultura não induzida (FIGURA 18).

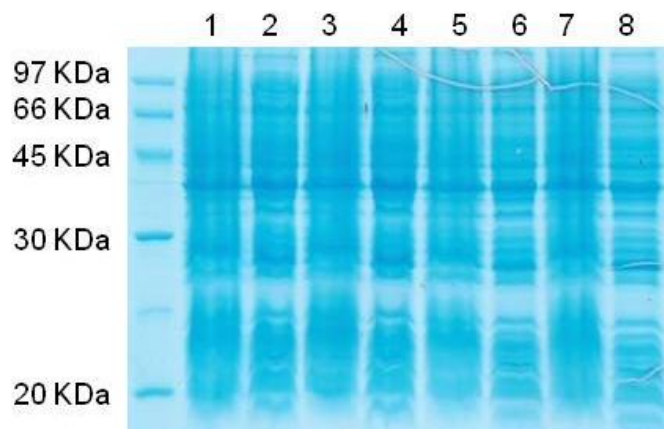


FIGURA 18 - USP2b NÃO É EXPRESSA EM *E. coli* Rosetta pLysS COM INDUÇÃO DE 1mM DE IPTG A 37°C POR 3h EM MEIO LB.

NOTA: A ausência de uma banda pronunciada na altura próxima de 45kDa nas colunas 2, 4, 6 e 8 (culturas de bactérias induzidas) indica que a isoforma USPb não foi expressa em *E. coli* Rosetta pLysS após indução com 1mM de IPTG a 37°C. As colunas 1, 3, 5 e 7 são os controles negativos (culturas de bactérias não induzidas). 1 – Cultura de bactéria 1 não induzida. 2 – Cultura de bactéria 1 induzida. 3 – Cultura de bactéria 2 não induzida. 4 – Cultura de bactéria 2 induzida. 5 – Cultura de bactéria 3 não induzida. 6 – Cultura de bactéria 3 induzida. 7 – Cultura de bactéria 4 não induzida. 8 – Cultura de bactéria 4 induzida.

FONTE: A autora (2016).

Em uma última tentativa de expressão da UPS2a em bactéria testou-se um meio com mais nutrientes, o meio Terrific Broth (TB). Como pode ser visto na FIGURA 19, a proteína também não é expressa nestas condições e isto é comprovado por não ter diferença na presença de proteína na altura de 45kDa entre as culturas induzidas e não induzidas.

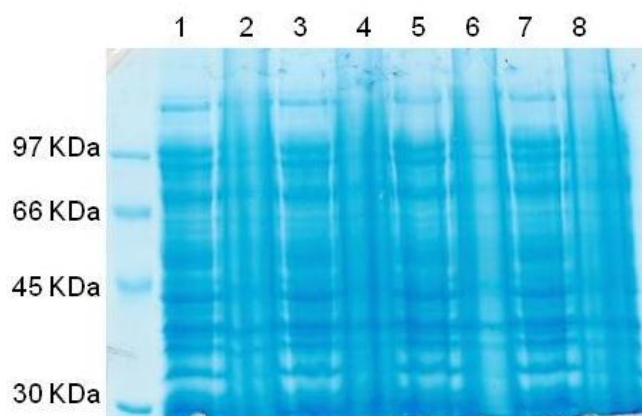


FIGURA 19 - USP2b NÃO É EXPRESSA EM *E. coli* Rosetta pLysS COM INDUÇÃO DE 1mM DE IPTG A 37°C POR 3h EM MEIO TB.

NOTA: A ausência de uma banda pronunciada na altura próxima de 45kDa nas colunas 2, 4, 6 e 8 (culturas de bactérias induzidas) indicam que a isoforma USPb não foi expressa em *E. coli* Rosetta pLysS após indução com 1mM de IPTG a 37°C em meio TB. As colunas 1, 3, 5 e 7 são os controles negativos (culturas de bactérias não induzidas). 1 – Cultura de bactéria 1 não induzida. 2 – Cultura de bactéria 1 induzida. 3 – Cultura de bactéria 2 não induzida. 4 – Cultura de bactéria 2 induzida. 5 – Cultura de bactéria 3 não induzida. 6 – Cultura de bactéria 3 induzida. 7 – Cultura de bactéria 4 não induzida. 8 – Cultura de bactéria 4 induzida.

FONTE: A autora (2016).

4.5 EXPRESSÃO EM EUCARIOTO DA USP2b

Com o objetivo de expressar em células eucariontes a isoforma USP2b, o vetor pCDNA3.1(-)6his + USP2b foi transfectado em células HEK293T e o sucesso da expressão foi analisado por western blot, mostrado na FIGURA 20. Esta isoforma possui tamanho de 45kDa mesmo com a etiqueta de poli-histina, deste modo, banda próximas de 45kDa é um indicativo da presença da proteína em questão. Na coluna 2 e 3 pode-se ver o controle negativo (lisado de células HEK293T não transfectadas) e lisado de células HEK293T superexpressando USP2b, respectivamente. A presença de uma banda próxima a 45kDa somente na coluna 3 indica que esta banda corresponde especificamente a USP2b, já as demais banda acima deste tamanho, por aparecerem tanto na coluna 3 como no controle negativo (coluna 2), são bandas inespecíficas. Deste modo, tem-se a expressão de USP2b em células HEK293T. A coluna 1 corresponde ao controle positivo do anticorpo anti-hexa-His.

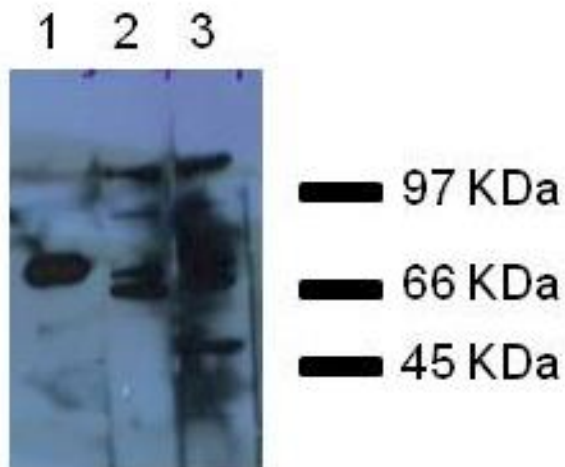


FIGURA 20 – ISOFORMA USP2b É SUPEREXPRESSA EM CÉLULAS HEK293T.

NOTA: Por meio de transfecção por co-precipitação de fosfato de cálcio do plasmídeo pCDNA3.1(-)6his+USP2b, a isoforma USP2b foi expressa em células HEK293T. Nas colunas 2 e 3 têm-se o controle negativo (lisado de HEK293T não transfectado) e lisado de HEK293T superexpressando USP2b, respectivamente. Pode-se observar a presença de uma banda próxima a 45kDa somente na coluna 3, indicando que esta banda corresponde especificamente a USP2b superexpressa. A coluna 1 corresponde ao controle positivo do anticorpo. 1 - Controle positivo: USP2a recombinante feita em bactéria reagido com anti-his. 2 – Controle negativo: lisado celular de HEK293T não transfectado reagido com anti-his. 3 – Lisado celular de HEK293T superexpressando USP2b reagido com anti-his.

FONTE: A autora (2016).

5 DISCUSSÃO

A produção da proteína recombinante USP2a teve um bom rendimento. Durante a produção aconteceram alguns problemas de solubilidade, que segundo a literatura (CARRIO & VILLAVARDE, 2002) pode ser devido a alta expressão da proteína de interesse sem a presença de chaperonas suficientes para o enovelamento da proteína alvo. Na tentativa de minimizar esse problema, tentou-se expressar USP2a em *E. coli* Shuffle T7 que expressa constitutivamente a chaperona DsbC mas os resultados não foram satisfatórios (dados não mostrados). Como a proteína recombinante era para uso na imunização de camundongos, a obtenção de antígeno precipitado não foi um grande problema já que animais podem ser imunizados com proteína assim apresentada, desde modo, trabalhamos com proteína insolúvel quando necessário. De fato o uso de proteína precipitada pode até ser vantajoso, uma vez que desta forma o antígeno não é rapidamente degradado/clarificado do organismo do animal desafiado, permitindo assim uma resposta humoral prolongada (GREENFIELD, 2014).

Durante a imunização e os testes do soro policlonal, pode-se ver uma diferença acentuada de resposta dos soros de camundongos diferentes frente a proteína endógena e superexpressa. Isso pode ser devido a diferenças de resposta de cada organismo frente a um antígeno (produção de anticorpos que reconheçam ou não a endógena) além da titulação de cada soro policlonal.

Após a fusão, alguns clones se mostraram positivos para produção de anticorpo anti-USP2a. A escolha do clone para caracterização após a diluição limitante foi uma união de sinal de resposta no ELISA (clone com maior sinal) e análise microscópica (campo claro) da colônia desse clone. Como desde o primeiro dia da diluição limitante há um acompanhamento microscópico, conseguiu-se analisar as colônias que cresceram a partir de um único clone.

A obtenção do monoclonal 4GD2 é de grande importância para o laboratório já que não existem anticorpos monoclonais comerciais e precisa-se deste para uma melhor caracterização bioquímica e celular da enzima USP2a. A produção do anticorpo monoclonal anti-USP2a abre diversas possibilidades de uso

que poderão contribuir para o estudo desta proteína desde aplicar este anticorpo em experimentos de distribuição tecidual, imunohistoquímica em tecidos sob diferentes estados patológicos, cinética de expressão e degradação de USP2a, direcionamento intracelular da enzima, além de testes de reação cruzada com USP2a de camundongos, ratos e outras espécies.

Já foi descrito na literatura (GOUSSEVA & BAKER, 2003), um estudo de expressão de USP2a em alguns tecidos de camundongos o qual demonstrou que as maiores expressões dessa proteína se dão no coração, fígado, rins e pâncreas além de menores quantidades em músculo esquelético, cérebro e testículo. A base de dados do NCBI aponta que USP2 humana é homóloga a USP2 de chimpanzé, macaco Rhesus, cachorro, vaca, camundongos e ratos. Desse modo, com o uso do monoclonal obtido, pode-se testar reação cruzada com USP2 de camundongos e ratos para demonstrar a expressão de USP2a nessas espécies coletando órgãos testados pelos autores.

Uma vez que LIU *et al.* (2013) demonstrou que USP2a está envolvida com a regulação positiva do EGFR atuando provavelmente em componentes ESCRTs (endosomal sorting complexes required for transport), o anticorpo produzido pode ser usado para ensaios de co-localização com esses componentes e até mesmo componentes de outras organelas. Além disso, também poderá ser utilizado em ensaios de imunoeletromicroscopia.

Quanto aos resultados da expressão em bactérias de USP2b, por não se saber sobre cinética de expressão dessa proteína, não se sabe o porque de não ser expressa nos diversos protocolos testados. Pode ser que seja uma proteína pouco expressa e só possa ser detectada por western blot. Não testamos a expressão da USP2b por western blot nos lisados bacterianos pois proteínas passíveis de detecção apenas por este método analítico, em comparação à coloração com azul de Coomassie, sugere um rendimento de expressão aquém daquele suficiente para uso subsequente em imunização de camundongos para produção de anticorpo monoclonal.

Existe a opção de reclonar em vetores de expressão para outros organismos, o que neste momento seria inviável pelo custo, no caso de expressão

em eucariotos e por também demandar outras estruturas inexistentes no laboratório, tais como sistema de leveduras ou outros fungos ou também produção em células de inseto. Deste modo, a abordagem adotada foi a tentativa em bactéria mas com mudanças nos protocolos e cepas.

A literatura indica que as possíveis causas de baixa ou não expressão de proteína recombinante advém de alguns problemas como: toxicidade da proteína antes da indução, toxicidade depois da indução e uso de um códon sinônimo (que codifica o mesmo aminoácido) em maior frequência que outro (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

A questão da toxicidade antes da indução pode ser resolvida com o controle basal da indução por adição de glicose quando há o uso de vetores que usam o sistema *lac*. Além disso, usar cepas de *E. coli* pLysS também pode resolver esse problema. Todas essas modificações foram testadas para a expressão de USP2b já que se utilizou esta cepa e também testou-se um meio alto induzível o qual possui glicose em sua composição (dados não mostrados).

Atualmente, poucos trabalhos sobre USP2b foram publicados. Os trabalhos realizados com camundongos indicam a participação desta proteína no ciclo circadiano e canais de cálcio no rim importantes para controle da pressão arterial (OBERFELD *et al.*, 2011; SCOMA *et al.*, 2011). Devido aos poucos estudos, os esforços despendidos na tentativa da expressão de proteína recombinante para produção de anticorpo monoclonal são importantes para estudos com USP2b humana.

Com a expressão bem sucedida em eucarioto da USP2b juntamente com a falta de estudos sobre a proteína em questão, abre-se um leque de possibilidade de experimentos. Como ainda não foi produzido o monoclonal específico para esta isoforma e o monoclonal para USP2a desenvolvido nesse projeto não apresenta reação cruzada com USP2b, esta proteína só pode ser detectada com anti-histidina (etiqueta presente na proteína).

Alguns testes de western blot com anti-His comercial de marcas diferentes mostraram diferenças quanto ao reconhecimento da proteína USP2b expressa em eucarioto (dados não mostrados). Somente um fabricante (Roche®) apresentou

anti-hexa-His que agiu com USP2b-His aqui produzida, dificultando a utilização de anti-etiqueta para experimentos com expressão de USP2b em eucariotos com outros anticorpos anti-etiqueta já disponíveis no nosso laboratório. Com a utilização desse anticorpo, a superexpressão em eucarioto será importante para diversos experimentos de caracterização dessa isoforma.

Este trabalho contribuiu para o desenvolvimento de bioferramentas: anticorpo monoclonal anti-USP2a isoforma específica e vetores para expressão de USP2b em sistemas diferentes (bactéria e eucarioto). Essas bioferramentas poderão ser utilizadas para estudos futuros do papel funcional de ambas as isoformas em associações com seus parceiros moleculares e o estabelecimento da participação da USP2a e USP2b em diversos estados patológicos, conforme vem sendo sugerido pela literatura.

A literatura já relacionou USP2 com uma gama de estados patológicos como por exemplo, tumores de próstata. Sabe-se que USP2a tanto em nível proteico como mRNA está superexpressa em 51% dos tumores de próstata e é regulada por andrógenos. Com o monoclonal gerado nesse trabalho, pode-se caracterizar mais profundamente o envolvimento da USP2a com a enzima ácido graxo sintase (FAS) já que FAS que é uma proteína anti-apoptótica, é estabilizada por USP2a conferindo assim atividades oncogênicas a esta DUB. (GRANER *et al.*, 2004).

PRIOLO *et al.* (2006) mostrou que o silenciamento dessa proteína em linhagens LNCaP e DU145 levam a um aumento da apoptose. Além disso, quando expressa em células epiteliais de próstata imortalizadas tratadas com taxol e cisplatina, confere resistência a apoptose causada pela quimioterapia. Deste modo, as bioferramentas construídas poderão ser usadas para testes de resistência a quimioterapia.

Mdm2 e MdmX são substratos comprovados para USP2a, que interagem diretamente com estes por ubiquitinação e também por regular negativamente microRNAs. (STEVENSON *et al.*, 2007; ALLENDE-VEGA *et al.*, 2010; BENASSI *et al.*, 2012). Esses dados são interessantes por relacionar USP2 com cânceres causados pela inativação de p53 e por abrir um leque de oportunidades de

estudos com a utilização do anticorpo monoclonal produzido em co-localizações e até mesmo imunoeletromicroscopia.

Um estudo desse ano mostrou o envolvimento da USP2a em patologias renais como glomerulonefrites (MAO *et al.*, 2016). Já outro estudo, demonstrou a existência de um novo inibidor da USP2a, ML364. A ação desse inibidor leva ao aumento da degradação de ciclina D1 e conseqüente parada do ciclo celular (DAVIS *et al.*, 2016). Esses trabalhos recentes abrem mais possibilidades de estudo dessa proteína pelas bioferramentas produzidas além das já citadas.

6 CONCLUSÕES

- Produção bem sucedida do anticorpo monoclonal 4GD2 anti-USP2a que reconhece a proteína superexpressa em células HEK293T.
- Anticorpo monoclonal 4GD2 anti-USP2a não reconhece a isoforma USP2b superexpressa em células HEK293T, indicando sua especificidade para a isoforma USP2a.
- Clonagem com sucesso da USP2b no vetor para expressão em bactéria pET28a(+).
- Clonagem com sucesso da USP2b no vetor para expressão em eucarioto pcDNA3.1(-)6his.
- USP2b foi superexpressa em células HEK293T.

REFERÊNCIAS

ALLENDE-VEGA, N., *et al.* MdmX is a substrate for the deubiquitinating enzyme USP2a. **Oncogene**, v. 29. n. 3, p. 432-441, 2010.

AMERIK, A. Y.; HOCHSTRASSER, M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1695. n. 1-3, p. 189-207, 2004.

BAEK, S. H., *et al.* Molecular cloning of a novel ubiquitin-specific protease, UBP41, with isopeptidase activity in chick skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 272. n. 41, p. 25560-25565, 1997.

BEDARD, N., *et al.* Mice Lacking the USP2 Deubiquitinating Enzyme Have Severe Male Subfertility Associated with Defects in Fertilization and Sperm Motility. **Biology of Reproduction**, v. 85. n. 3, p. 594-604, 2011.

BENASSI, B., *et al.* MYC Is Activated by USP2a-Mediated Modulation of MicroRNAs in Prostate Cancer. **Cancer Discovery**, v. 2. n. 3, p. 236-247, 2012.

BENASSI, B., *et al.* USP2a alters chemotherapeutic response by modulating redox. **Cell Death & Disease**, v. 4. 2013.

BOUTELL, C.; SADIS, S.; EVERETT, R. D. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. **J Virol**, v. 76. n. 2, p. 841-850, 2002.

CARRIO, M. M.; VILLAVERDE, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **J Biotechnol**, v. 96. n. 1, p. 3-12, 2002.

CHUNG, C. H.; BAEK, S. H. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 266. n. 3, p. 633-640, 1999.

CIECHANOVER, A.; ORIAN, A.; SCHWARTZ, A. L. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. **Bioessays**, v. 22. n. 5, p. 442-451, 2000.

CROSETTO, N.; BIENKO, M.; DIKIC, I. Ubiquitin hubs in oncogenic networks. **Molecular Cancer Research**, v. 4. n. 12, p. 899-904, 2006.

D'ANDREA, A.; PELLMAN, D. Deubiquitinating enzymes: A new class of biological regulators. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33. n. 5, p. 337-352, 1998.

D'AZZO, A.; BONGIOVANNI, A.; NASTASI, T. E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. **Traffic**, v. 6. n. 6, p. 429-441, 2005.

DAVIS, M. I., *et al.* Small Molecule Inhibition of the Ubiquitin-specific Protease USP2 Accelerates cyclin D1 Degradation and Leads to Cell Cycle Arrest in Colorectal Cancer and Mantle Cell Lymphoma Models. **J Biol Chem**, v. 291. n. 47, p. 24628-24640, 2016.

FANG, P., *et al.* The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome. **Hum Mol Genet**, v. 8. n. 1, p. 129-135, 1999.

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.

GEWIES, A.; GRIMM, S. UBP41 is a proapoptotic ubiquitin-specific protease. **Cancer Res**, v. 63. n. 3, p. 682-688, 2003.

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, 2004.

GREENFIELD, E. A.; **Antibodies: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014.

GROETTRUP, M., *et al.* A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. **Nature**, v. 381. n. 6578, p. 166-168, 1996.

HAGLUND, K.; DIKIC, I. Ubiquitylation and cell signaling. **EMBO J**, v. 24. n. 19, p. 3353-3359, 2005.

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

HICKE, L. Protein regulation by monoubiquitin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2. n. 3, p. 195-201, 2001.

HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. **Annu Rev Genet**, v. 30. p. 405-439, 1996.

KHUT, P. Y., *et al.* Evolutionary and expression analysis of the zebrafish deubiquitylating enzyme, usp9. **Zebrafish**, v. 4. n. 2, p. 95-101, 2007.

KIM, J., *et al.* The ubiquitin-specific protease USP2a enhances tumor progression by targeting cyclin A1 in bladder cancer. **Cell Cycle**, v. 11. n. 6, p. 1123-1130, 2012.

KITAMURA, H., *et al.* Ubiquitin-specific protease 2-69 in macrophages potentially modulates metainflammation. **FASEB J**, v. 27. n. 12, p. 4940-4953, 2013.

KOEGL, M., *et al.* A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. **Cell**, v. 96. n. 5, p. 635-644, 1999.

KOMANDER, D.; CLAGUE, M. J.; URBE, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10. n. 8, p. 550-563, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227. n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAM, Y. A., *et al.* Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. **Nature**, v. 385. n. 6618, p. 737-740, 1997.

LAYFIELD, R., *et al.* The ubiquitin protein catabolic disorders. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 27. n. 3, p. 171-179, 2001.

LI, M., *et al.* A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. **Mol Cell**, v. 13. n. 6, p. 879-886, 2004.

LIN, H., *et al.* Divergent N-terminal sequences target an inducible testis deubiquitinating enzyme to distinct subcellular structures. **Mol Cell Biol**, v. 20. n. 17, p. 6568-6578, 2000.

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

MAHUL-MELLIER, A. L., *et al.* De-ubiquitinating proteases USP2a and USP2c cause apoptosis by stabilising RIP1. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823. n. 8, p. 1353-1365, 2012.

MAHUL-MELLIER, A. L., *et al.* De-ubiquitinating protease USP2a targets RIP1 and TRAF2 to mediate cell death by TNF. **Cell Death Differ**, v. 19. n. 5, p. 891-899, 2012.

MAO, X., *et al.* Usp2-69 overexpression slows down the progression of rat anti-Thy1.1 nephritis. **Exp Mol Pathol**, v. 101. n. 2, p. 249-258, 2016.

METZIG, M., *et al.* An RNAi screen identifies USP2 as a factor required for TNF-alpha-induced NF-kappa B signaling. **International Journal of Cancer**, v. 129. n. 3, p. 607-618, 2011.

MILES, R. R., *et al.* Parathyroid hormone (hPTH 1-38) stimulates the expression of UBP41, an ubiquitin-specific protease, in bone. **J Cell Biochem**, v. 85. n. 2, p. 229-242, 2002.

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, 2012.

NALEPA, G.; ROLFE, M.; HARPER, J. W. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5. n. 7, p. 596-613, 2006.

NIJMAN, S. M., *et al.* A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. **Cell**, v. 123. n. 5, p. 773-786, 2005.

OBERFELD, 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, 2011.

OH, K. H., *et al.* Control of AIF-mediated cell death by antagonistic functions of CHIP ubiquitin E3 ligase and USP2 deubiquitinating enzyme. **Cell Death Differ**, v. 18. n. 8, p. 1326-1336, 2011.

PARK, K. C., *et al.* Antagonistic regulation of myogenesis by two deubiquitinating enzymes, UBP45 and UBP69. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99. n. 15, p. 9733-9738, 2002.

PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70. p. 503-533, 2001.

PRIOLO, C., *et al.* The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis. **Cancer Res**, v. 66. n. 17, p. 8625-8632, 2006.

QU, Q., *et al.* USP2 promotes cell migration and invasion in triple negative breast cancer cell lines. **Tumor Biology**, v. 36. n. 7, p. 5415-5423, 2015.

QUESADA, V., *et al.* Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 314. n. 1, p. 54-62, 2004.

REGLINSKI, K., *et al.* Peroxisomal Import Reduces the Proapoptotic Activity of Deubiquitinating Enzyme USP2. **PLoS One**, v. 10. n. 10, p. e0140685, 2015.

RENATUS, M., *et al.* Structural basis of ubiquitin recognition by the deubiquitinating protease USP2. **Structure**, v. 14. n. 8, p. 1293-1302, 2006.

RIBEIRO, C. F.; Caracterização bioquímica e funcional da deubiquitinase USP2a. Curitiba: UFPR, 2016.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Front Microbiol**, v. 5. p. 172, 2014.

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. **Pflugers Arch**, v. 467. n. 9, p. 1919-1929, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2^a Ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A laboraroty manual**, 3^a ed. 3v. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCOMA, H. D., *et al.* The De-Ubiquitinylation Enzyme, USP2, Is Associated with the Circadian Clockwork and Regulates Its Sensitivity to Light. **Plos One**, v. 6. n. 9, 2011.

SHAN, J.; ZHAO, W. H.; GU, W. Suppression of Cancer Cell Growth by Promoting Cyclin D1 Degradation. **Molecular Cell**, v. 36. n. 3, p. 469-476, 2009.

SHAPIRO, A. L.; VINUELA, E.; MAIZEL, J. V. Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in Sds-Polyacrylamide Gels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 28. n. 5, p. 815-&, 1967.

SHI, Y., *et al.* Ubiquitin-specific Cysteine Protease 2a (USP2a) Regulates the Stability of Aurora-A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286. n. 45, p. 38960-38968, 2011.

SONCINI, C.; BERDO, I.; DRAETTA, G. Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease. **Oncogene**, v. 20. n. 29, p. 3869-3879, 2001.

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, 2007.

TURNER, G. C.; VARSHAVSKY, A. Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo. **Science**, v. 289. n. 5487, p. 2117-2120, 2000.

WANG, S., *et al.* Expression of USP2-69 in mesangial cells in vivo and in vitro. **Pathol Int**, v. 60. n. 3, p. 184-192, 2010.

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

WOELK, T., *et al.* The ubiquitination code: a signalling problem. **Cell Div**, v. 2. p. 11, 2007.

ZHANG, L., *et al.* Ubiquitin-specific protease 2b negatively regulates IFN-beta production and antiviral activity by targeting TANK-binding kinase 1. **J Immunol**, v. 193. n. 5, p. 2230-2237, 2014.

ZHANG, Y.; ZHOU, X.; HUANG, P. Fanconi anemia and ubiquitination. **J Genet Genomics**, v. 34. n. 7, p. 573-580, 2007.