

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA e EVOLUÇÃO

**ESTUDOS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE HUMANA UBE2G2 (Ubiquitin-conjugating
enzyme E2G2)**

Luis Fernando Reyes

São Carlos-SP

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ESTUDOS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE HUMANA UBE2G2 (Ubiquitin-conjugating
enzyme E2G2)**

Luis Fernando Reyes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração : Genética e Evolução.

São Carlos-SP

2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R457ef

Reyes, Luis Fernando.
Estudos funcionais e estruturais da proteína
recombinante humana UBE2G2 (Ubiquitin-conjugating
enzyme E2G2) / Luis Fernando Reyes. -- São Carlos :
UFSCar, 2005.
71 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2005.

1. Genética molecular. 2. Expressão heteróloga. 3.
Dicroísmo circular. 4. Sistema de ubiquitinação. 5.
Ubiquitina. 6. Família UBC I. Título.

CDD: 574.87328 (20^a)

Orientador:
Prof. Flavio Henrique da Silva

Dedico este trabalho aos meus pais, família e amigos.

*“Para vencer un peligro
Salvar de cualquier abismo,
por experiencia lo afirmo:
Más que el sable y que la lanza
Suele servir la confianza
que el hombre tiene en uno mismo.”*

~ Martín Fierro ~

Agradecimentos

Aproveito esse espaço para expressar os meus sentimentos de gratidão para todas aquelas pessoas que em forma direta ou indireta me ajudaram nesta etapa da minha vida, especialmente...

Ao Professor Dr. Flavio Henrique da Silva, meu orientador, pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da Universidade de São Carlos UFSCar.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, PPGEV, pelo auxílio a realização deste trabalho.

A agência Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado concedida e ao programa CEPED (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento) pelo apoio financeiro.

Ao pessoal do laboratório de Professora Dra. Heloisa Araújo, pela colaboração prestada.

A Professora Leila Beltrami, pela colaboração com os ensaios estruturais da proteína e a Andressa pela sua ajuda e boa predisposição.

Ao pessoal do instituto de Física da USP, em especial a Monique Mantovani (de Calgaro) e a Adriana Rojas, pela ajuda e amizade.

Aos meus colegas do laboratório, especialmente aqueles que já foram embora e com os quais aprendi muito, em especial agradeço ao Camillo del Cistia Andrade, quem teve a façanha de me ensinar a purificar e mexer no HPLC.

Aos meus amigos, César, Marcos e Pamela pelos momentos compartilhados.

Aos meus pais e família, os pilares da minha vida.

E finalmente a Deus por ter me mostrado a existência do Absoluto, e vice-versa.

Resumo

O Sistema de Ubiquitinação representa o mecanismo de degradação protéica intracelular mais importantes em todos nas células eucarióticas e envolve a atividade seqüencial de três enzimas conhecidas como E1, enzima ativadora de ubiquitina, a E2 enzima conjugante de ubiquitina e a E3 enzima ligante de ubiquitina. A identificação destas proteínas e seus alvos protéicos, assim como as obtenções de dados estruturais são essenciais para entender a função deste sistema dentro da célula eucariótica. No presente trabalho, a fase de leitura aberta (ORF) do gene humano *ube2g2* foi isolado de um painel de cDNA de cérebro humano, foi clonado no vetor pET28a e expressado em bactérias *Escherichia coli*. A proteína de 18,5 kDa em fusão com uma cauda de histidinas foi posteriormente purificada por cromatografia de afinidade e submetido a ensaios estruturais e funcionais a traves do medição do CD e a traves do ensaio de pull-down, respectivamente. A cromatografia de afinidade rendeu 27 mg de proteína solúvel, logo após de tê-la expressado heterologamente a baixas concentrações de indutor IPTG 0,1 mM em três horas de indução. O espectro de CD da proteína purificada mostrou o conteúdo de estrutura secundaria de acordo ao esperado para um membro típico da família de enzimas E2, apresentando um 35 % de hélices α , 21 % de folhas β e 23 % de giros. Além do mais, a proteína purificada foi capaz de ligar molécula de ubiquitina quando misturada com um extrato de células HeLa, durante o ensaio de pull-down. Desta maneira e com esses resultados apresentados aqui pode se inferir que a proteína humana UBE2G2 foi expressa na sua forma ativa.

Abstract

The ubiquitin system represents a selective mechanism for intracellular proteolysis in eukaryotic cells that involves the sequential activity of three enzymes, E1 (Ubiquitin activating enzyme), E2 (Ubiquitin-conjugating enzyme), and E3 (Ubiquitin-protein ligase). The identification of these proteins and their targets as well as structural data is essential to understand their function in the eukaryotic cell. In the present study the open reading frame of human Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2G2 was isolated from a human brain cDNA panel, cloned into pET28 vector and expressed in *Escherichia coli*. His-tagged protein was then purified by nickel-affinity chromatography and subjected to structural and functional studies using circular dichroism (CD) and an in vitro ubiquitin-binding assay, respectively. The affinity chromatography assay rendered approximately the 27 mg of the soluble recombinant HisUBE2G2 after expressed in bacteria at low amounts of IPTG (0,1mM) in 3 hours of induction. The CD spectra of recombinant pure protein showed a secondary structure content according with the expected for a member of the E2 family (Ubiquitin-conjugating enzyme), with 35 % of α -Helix, 21 % of β sheets and 23 % of turns. Moreover, purified protein was able to bind ubiquitin molecules when mixed with a HeLa cell extract during the pull-down assay. Taken together the results presented in this work allow inferring that HisUBE2G2 was expressed in their active form.

1.INTRODUÇÃO	10
<hr/>	
1.1 O SISTEMA DE UBIQUITINAÇÃO	10
1.2. MECANISMO DE AÇÃO	12
1.3 A FAMÍLIA E2 (UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYMES)	14
1.4 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL (3D) DAS E2	15
1.5 O GENE UBE2G2	17
1.6 A PROTEÍNA UBE2G2 (UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME E2G2)	21
2. OBJETIVOS:	24
<hr/>	
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
<hr/>	
3.1 MATERIAIS	25
3.1.2 PAINÉIS DE cDNA	26
3.1.3 VETOR DE PROPAGAÇÃO PGEM-T	26
3.1.4 VETOR DE EXPRESSÃO PET	27
3.1.5 CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS	28
3.2 MÉTODOS	29
3.2.1 AMPLIFICAÇÃO DA FASE ABERTA DE LEITURA (ORF) DO GENE UBE2G2	29
3.2.2 CLONAGEM NO VETOR PGEM-T	30
3.2.3 ANÁLISE POR “PCR DE COLÔNIA” DAS BACTÉRIAS TRANSFORMADAS	32
3.2.4 SEQUENCIAMENTO DE DNA	32
3.2.5 CLIVAGEM DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	34
3.2.6 SUBCLONAGEM DO GENE UBE2G2 NO VETOR PET28A	35
3.2.7 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO EM <i>E. COLI</i> BL21 (DE3)	35
3.2.8 TESTE DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE UBE2G2	36
3.2.9 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA _{HIS} UBE2G2 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	36
3.2.10 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A PURIFICAÇÃO	37
3.2.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS (MÉTODO DE BRADFORD)	38
3.2.12 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS	39
3.2.13 ENSAIO DE WESTERN BLOT	40
3.2.14 MEDIÇÃO DO ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR	41
3.2.15 CULTURA DE CÉLULAS HELA	42
3.2.16 DETERMINAÇÃO DE UBIQUITINA NO EXTRATO CELULAR DE HELA	43
3.2.17 ENSAIO DE PULL-DOWN	44
4. RESULTADOS	47
<hr/>	
4.1 AMPLIFICAÇÃO DA FASE ABERTA DE LEITURA (ORF) DO GENE UBE2G2	47
4.2 PCR DE COLÔNIAS DE <i>E. COLI</i> (PGEM-UBE2G2)	48
4.3 SUBCLONAGEM DA ORF UBE2G2 NO VETOR PET28A	49
4.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE _{HIS} UBE2G2	50
4.5 TESTE DE SOLUBILIDADE DE _{HIS} UBE2G2	51
4.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA _{HIS} UBE2G2 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	51
4.8 ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD) PARA _{HIS} UBE2G2	54
4.9 ENSAIO DE PULL-DOWN	56

5. DISCUSSÃO GERAL	58
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. Introdução

1.1 O sistema de Ubiquitinação

O **Sistema de Ubiquitinação (SU)** representa o mecanismo de proteólise intracelular programada mais importante em todos os eucariotos, desde leveduras até humanos, onde as proteínas mal enoveladas ou que apresentam qualquer tipo de anormalidade funcional ou estrutural e as proteínas de meia vida curta são marcadas e direcionadas para a degradação pelo proteasomo, por meio da ligação covalente de moléculas de ubiquitina (**Ub**) [Hochstrasser *et al.*, 1996; Weissman *et al.*, 2000; Hershko *et al.*, 1983].

A molécula de ubiquitina, de 76 aminoácidos, foi isolada pela primeira vez a partir do timo bovino, associando a proteína ao processo de diferenciação celular de linfócitos [Goldstein *et al.*, 1975]. Posteriormente demonstrou-se que a molécula era ubiquamente (daí o nome, ubiquitina) expressa em todos os tipos celulares e em todas as espécies, apresentando quase nenhuma variação de aminoácidos entre elas. A primeira observação da união covalente da Ub a outra proteína foi feita analisando a chamada “proteína A24”, a qual demonstrou ser na realidade um complexo de duas proteínas ligadas entre si covalentemente, a histona H2a e uma molécula de ubiquitina [Busch *et al.*, 1977].

Um passo importante na descoberta do SU foi realizado através do estudo da degradação de proteínas dependente de energia implementando o sistema livre de células (constituído por um extrato de reticulócitos de coelho) capaz de degradar proteínas anormais em presença de ATP a pH neutro e que

evidentemente não envolvia aos lisossomos [Etlinger e Goldberg, 1977]. A partir desse sistema foi identificado e isolado cada um dos componentes do SU, incluindo a própria. Os posteriores ensaios bioquímicos realizados para desvendar o mecanismo de ubiquitinação e a sua relação com a homeostase celular fizeram que a “Royal Swedish Academy of Science”, (Academia Sueca de Ciência) conceda aos cientistas, Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwing Rose o “Premio Nobel em Química 2004”.

Graças a esses estudos hoje se conhecem múltiplos substratos reconhecidos e degradados por este Sistema que incluem: fatores de transcrição, kinases, fosfatases, supressores de tumores, etc. Assim como os processos que regula através dessa degradação seletiva (Ciclo Celular, Reparo de DNA, Transdução de Sinal e Qualidade de proteínas associadas ao Reticulo ou em inglês Reticulum Associated Degradation).

O fato de ser uma via altamente regulada e seletiva o torna o principal mecanismo de manutenção da homeostase celular. Em humanos, o interesse pelo sistema é conhecido devido à associação de diferentes doenças tais como Alzheimer, Parkinson, entre outras, com falhas em alguns dos componentes do SU [Ciechanover *et al.*, 2004]. Por exemplo, a desordem hereditária Fibrose Cística (FC) é causada pela ausência do canal de cloro chamado CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Pela sua vez, a ausência do canal é devida à uma deleção de uma fenilalanina que desestabiliza a conformação da proteína nativa provocando a retro-translocação desde o reticulo endoplasmático para o citoplasma, aonde finalmente é “ubiquitinada” e degradada [Ward *et al.*, 1995].

1.2. Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação do SU envolve a atividade seqüencial de três enzimas conhecidas como: E1 (Ubiquitin-activating enzyme) enzima ativadora de ubiquitina, E2 ou UBC (Ubiquitin-conjugating enzyme) enzima “conjugante” de ubiquitina, e a E3 (Ubiquitin-protein ligase) enzima que liga ubiquitina. O primeiro passo da reação, catalisado pela enzima E1, ativa às moléculas de Ub livres no citoplasma da célula de maneira dependente de ATP. A E1 estabelece uma ligação covalente do tipo tiol-éster entre um resíduo de cisteína (presente no sítio catalítico da E1) e o grupo carboxila terminal do resíduo glicina (G-76) da molécula de Ub [Haas *et al.*, 1997]. Logo no segundo passo e uma vez ativada, a Ub é transferida para a E2, com a qual também estabelece uma ligação tiol-éster entre uma cisteína conservada no sitio catalítico da E2 e a glicina 76 da Ub. No terceiro passo, a E2 conjuntamente com a enzima E3 transferem as moléculas de Ub para o substrato, estabelecendo uma ligação covalente entre a G76 da Ub e a cadeia lateral de uma lisina do substrato. Essa transferência é repetida varias vezes até formar uma “cauda” composta de varias Ub ligadas entre si formando uma cauda de ubiquitinas [Siepmann et al, 2003; Pickart et al, 2001]. As proteínas marcadas desta maneira são posteriormente reconhecidas e degradadas pelas subunidades multi-proteolíticas do proteasomo (Figura 1.1).

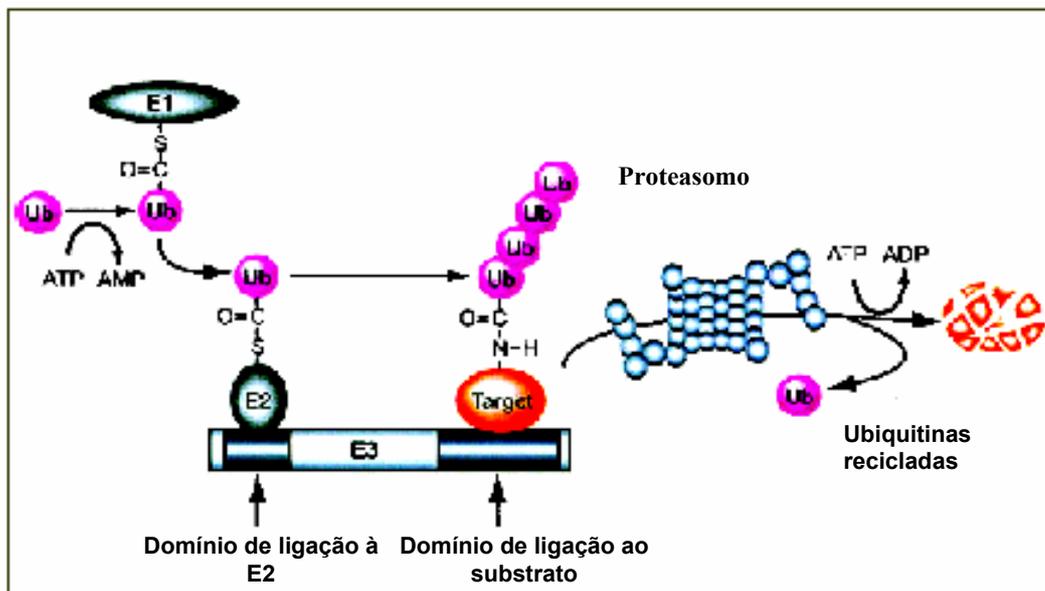


Figura 1.1: Esquema representando os componentes da cascata de ubiquitinação, reconhecendo o substrato alvo (**Target**), marcando-o com moléculas de ubiquitina (**Ub**) e direcionando-o para degradação pelo proteassomo (**26S**). [Figura modificada de Hatakeyama *et al.*, 2003]

Existe uma particularidade importante em relação aos aminoácidos envolvidos na formação da cauda de ubiquitinas: o típico sinal de degradação reconhecido pelo proteassomo esta constituído de 4 a 9 ubiquitinas ligadas através de uma K48 (lisina na posição 48) e G76, mas existe outra lisina (K63) que pode ser utilizada na poli-ubiquitinação e que não direciona as proteínas para o proteassomo [Spence *et al.*, 2000]. Existe uma outra particularidade na relação de interações entre as enzimas E1, E2, e E3. Apenas um tipo de E1 (por célula) interage com vários tipos E2 diferentes e ao mesmo tempo estas ultimas interagem com múltiplas E3 pertencentes a diversas famílias, o qual amplia o espectro de interações com diferentes substratos. O último passo na transferência de Ubs pode ser realizado de duas maneiras diferentes, dependendo da interação

E2-E3: caso houver interação da E2 com uma enzima E3 membro da família HECT-Domain E3 (**H**omologous to **E**6-AP **C**arboxil **T**erminus), a molécula de ubiquitina é transferida, em primeiro lugar, para o resíduo de Cisteína do sítio catalítico da E3 e logo em seguida para o substrato; De uma outra maneira, se houver interação entre uma E2 e um dos membros das **RING-E3** (que não possuem a cisteína catalítica), é a E2 quem transfere diretamente a ubiquitina para o substrato, mas sempre é a E3 quem reconhece a este último. [Huibregtse *et al.*, 1995; Lorick *et al.*, 1999].

1.3 A família E2 (Ubiquitin-conjugating enzymes)

A família das E2 (ou UBC) está bem caracterizada funcional e estruturalmente [Lester *et al.*, 2000]. Só em leveduras já foram identificados e caracterizados 13 membros e em humanos já foram descritos ao menos 30 genes [Huoben *et al.*, 2004]. O alinhamento das seqüências de aminoácidos de todos os membros da família demonstra a existência de um “core” protéico conservado de aproximadamente 150-160 aminoácidos, com um 35-40 % de identidade de seqüência, no qual se inclui o resíduo de cisteína (Cys) envolvido na formação da ligação tiol-éster [Weissman, 1997]. Existem alguns membros da família que além deste “core” apresentam extensões nas regiões amino terminal ou (-NH₂), nas regiões carboxila terminal (-COOH) e/ou ambas as duas extensões [Cook *et al.*, 1993; Matuschewski, *et al.* 1996]. Assim, as proteínas com apenas o “core” protéico foram classificadas como de **Classe I** e as outras variantes como **Classe II, III e IV**, respectivamente (Figura 1.2).

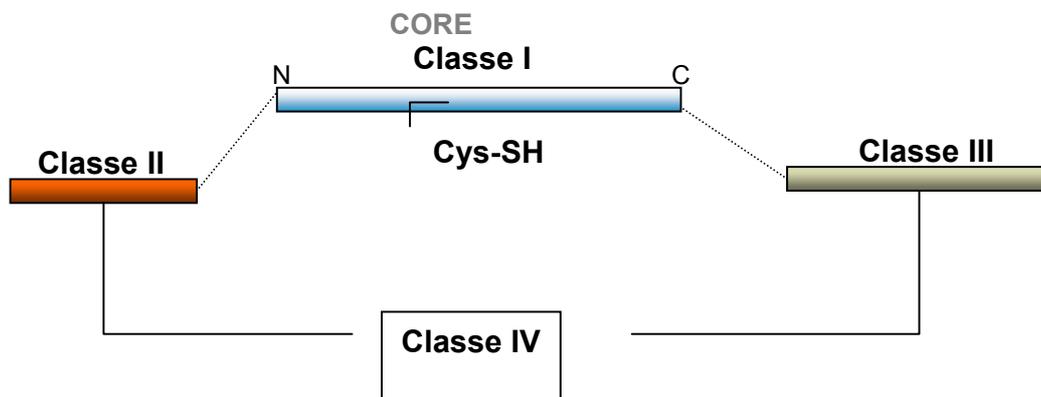


Figura 1.2: Diferentes classes de E2 dependendo das variações em comprimento das regiões N e C terminal do core de 150 aminoácidos.

1.4 Estrutura Tridimensional (3D) das E2

Recentemente tem sido determinada a estrutura tridimensional de alguns dos membros da família pertencentes a diferentes espécies sendo aproximadamente nove estruturas resolvidas por Difração de Raios X ou RX e uma estrutura resolvida através da Ressonância Magnética Nuclear ou NMR [Houben, *et al* 2004]. Com os dados obtidos das diferentes estruturas conseguiu-se demonstrar que todas elas possuem um enovelamento globular compacta formada por 4 hélices- α e 1 folha- β antiparalela [Cook *et al*, 1997 ; Biederer *et al* 1996]. Neste tipo de enovelamento, conhecido como α/β , a primeira hélice α (H1) se localiza na extremidade N-terminal da proteína, seguida pelas quatro fitas antiparalelas da folha- β e seguidamente por três hélices α (H1-H3) no extremo C-terminal (exemplificado na figura 1.3).

Em todas as E2 conhecidas, o resíduo de cisteína catalítico está situado entre as regiões variáveis que conectam a folha- β e a H2 (Hélice α 2)

denominadas de "Loops". Estes formam uma depressão sobre a superfície da enzima, aonde encaixaria a molécula de ubiquitina. Além do resíduo de cys existem outros essenciais, por exemplo, o resíduo asparragina [Huoben *et al.*, 2004], localizado na região chamada de "loop" e próximo ao sitio catalítico [Wu *et al.*, 2004], importante não só para estabilização da estrutura 3D senão também para interagir com ubiquitina [Tong *et al.*, 1997; Pickart *et al.*, 2001; Berinier *et al.*, 2002].

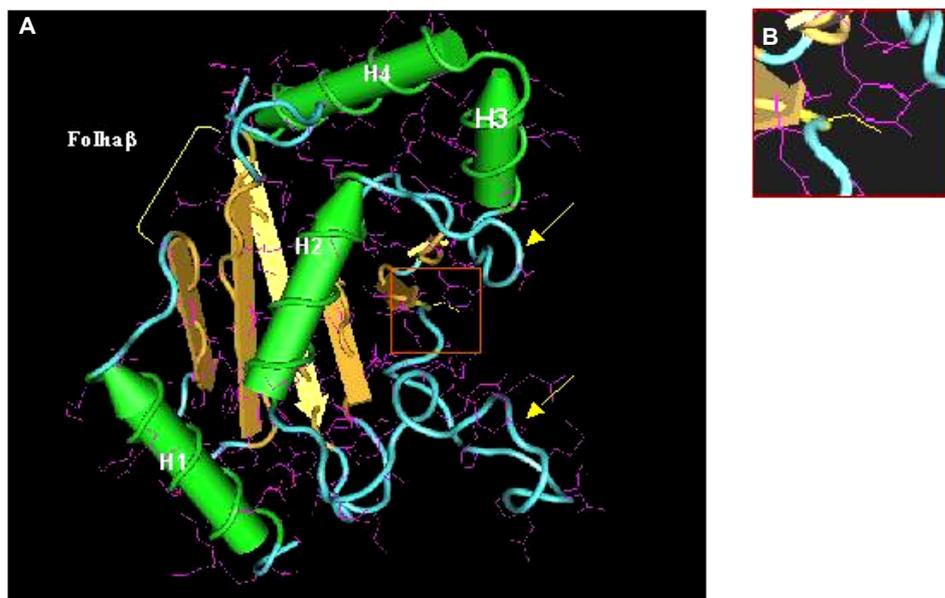


Figura 1.3: Estrutura 3D da proteína scUBC7 resolvida por RX. Em **A**, se destacam as quatro hélices α , H1-H4 em verde e as fitas da folha β -antiparalela em dourado. Enmarcado em vermelho se acha localizado o resíduo de Cys do sítio catalítico, ampliado em **B**. As setas amarelas indicam os loops variáveis que flanqueiam a esse resíduo.(figura obtida do NCBI, National Center of Biotechnology Information, e processada com o programa RasMol).

Com todos esses dados estruturais em conjunção com os dados funcionais confirmou-se o importante papel de reconhecimento específico que as enzimas E2 desenvolvem dentro do sistema de ubiquitinação, mas ainda falta por esclarecer como essa especificidade se manifesta na estrutura das E2 quando interagem

com os diferentes componentes do “interactoma”, isto é, tanto com as outras enzimas do sistema como com o substrato. Recentemente tem se sugerido que, provavelmente, o potencial eletrostático das E2 seja fundamental [Winn *et al*, 2004] para desenvolver a sua função, apoiado pelo fato de que em outros sistemas enzimáticos é um fator fundamental que determina o reconhecimento e direcionamento do substrato até o sitio catalítico [Livesay, 2003]

1.5 O gene Ube2g2

A primeira evidencia da existência do gene *ube2g2* (Ubiquitin Conjugating Enzyme E2G2) surgiu após o início do projeto de Seqüenciamento do Genoma Humano, mais especificamente durante o seqüenciamento do cromossomo 21 [Hattori *et al*, 2000] e através da análise de seqüências transcritas desse cromossomo, chamadas de “EST” (Expressed Sequence Tags) ou “Fragmentos de Seqüências Expressas”.

A partir da análise de EST foi possível isolar um transcrito de 2,9 kilobases (kb) de comprimento, o qual demonstrou corresponder ao RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) de *ube2g2* (Número de acesso: AF032456). Esta seqüência possui uma *Fase de Leitura Aberta* (de agora em diante chamada de **ORF**, em inglês, **Open Reading Frame**) 495 pb codante para uma proteína pertencente a família de enzimas conjugante de ubiquitina, UBC ou simplesmente E2. Segundo a análise realizada através de Northern blot descobriu-se que o transcrito de *ube2g2* era expresso na maioria dos tecidos humanos analisados,

como : coração, cérebro, placenta, pulmão, fígado, músculo esquelético, rim e pâncreas [Katsanis *et al.*, 1998].

Posteriormente, várias análises foram realizadas para determinar o mapeamento do gene sobre o cromossomo 21 humano [Basel et al, 1998], as quais permitiram localizar o gene *ube2g2* na banda 22.3 (Figura 1.4) do braço longo do cromossomo (21q22.3) próximo à região telomérica abarcando 33219 pb (Gene Identification: 7327). Segundo as seqüências depositadas e analisadas no NCBI (NCBI, National Center Of Biotechnology Information/Entrez Gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi>) o gene *ube2g2* possuiria 2 transcritos alternativos ou isoformas: a ***Isoforma 1*** (NM_003343) de 2,9 kb esta constituída por 6 éxons e codifica para uma proteína (analisada no presente trabalho) 165 aa (NP_00334) e 18,5 kDa; a seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos está representada na figura 1.5A e 1.5B . A ***Isoforma 2*** (NM_182688) de aproximadamente ~ 3,03 kb está constituída de 4 éxons e produz uma proteína menor de 134 aa (NP 872630) não identificada até o momento *in vivo* ou *in vitro*.

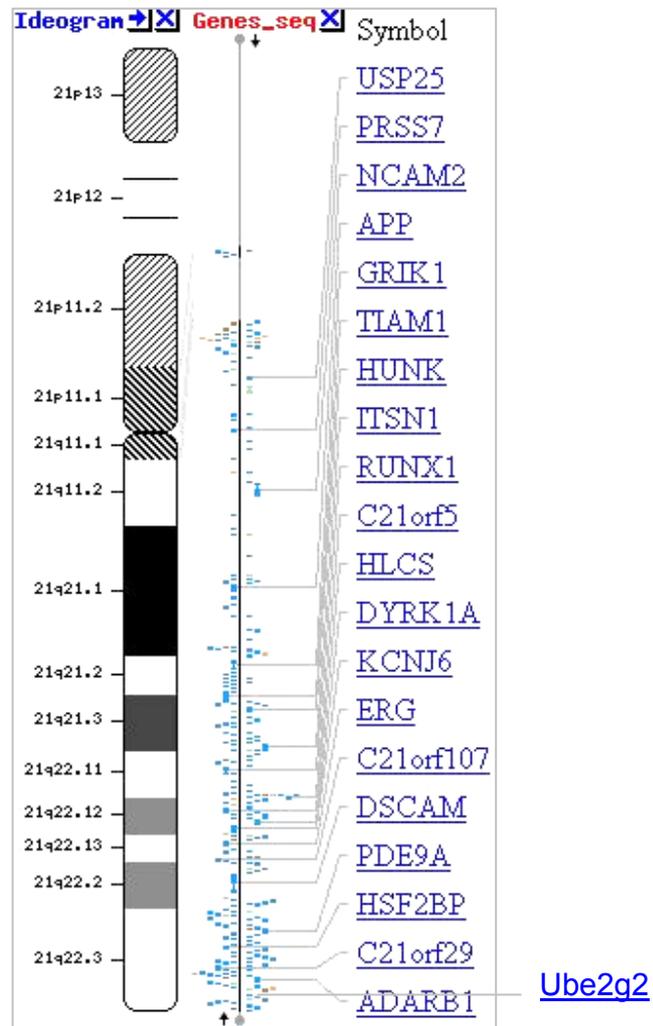


Figura 1.4: Idiograma do cromossomo 21 humano, representando os braços p, longo e q, curto com as bandas que determinam uma determinada região. Especificamente, o gene *ube2g2* mapeia na região q22.3 do braço longo, perto da região telomérica. Indicado à direita da figura; conjuntamente se representam alguns outros genes localizados sobre o mesmo cromossomo. (figura extraída do NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi>)

Fig.1.5 A

ATG GCG GGG ACC GCG CTC AAG AGG CTG ATG GCC GTG TAC AAA CAA TTA ACA CTG AAT
CCT CCG GAA GGA ATT GTA GCA GGC CCC ATG AAT GAA GAG AAC TTT TTT GAA TGG GAG
GCA TTG ATC ATG GGC CCA GAA GAC ACC TGC TTT GAG TTT GGT GTT TTT CCT GCC ATC
CTG AGT TTC CCA CTT GAT TAC CCG TTA AGT CCC CCA AAG ATG AGA TTT ACC TGT GAG
ATG TTT CAT CCC AAC ATC TAC CCT GAT GGG AGA GTC TGC ATT TCC ATC CTC CAC GCC
CCA GGC GAT GAC CCC CAT GGG CTA CGA GAG CAG CCG GAG CGG TGG AGT CCT GTG
CAG AGT GTG GAG AAG ATC CTG CTG TCG GTG GTG AGC ATG CTG GCA GAG CCC AAT GAC
GAA AGT GGA GCT AAC GTG GAT GCG TCC AAA ATG TGG CGC GAT GAC CGG GAG CAG

Fig.1.5 B

M A G T A L K R L M A V Y K Q L T L N P P E G I V A G P M N E E N F F E
W E A L I M G P E D T C F E F G V F P A I L S F P L D Y P L S P P K M R F
T C E M F H P N I Y P D G R V C I S I L H A P G D D P H G L R E Q P E R
W S P V Q S V E K I L L S V V S M L A E P N D E S G A N V D A S K M W
R D D R E Q F Y K I A K Q I V Q K S L G L*

Figura 1.5 A: Seqüência de nucleotídeos correspondentes aos 6 éxons da ORF para ube2g2 (isoforma 1). As diferentes cores indicam, seqüencialmente de 1-6, cada um dos éxons que codifica para a proteína UBE2G2 (representada na figura 1.5B). Figura 1.5B: Seqüência de aminoácidos da proteína UBE2G2 humana codificada por 6 éxons (ver em A). Mostra-se sublinhado o primeiro aminoácido Metionina e os diferentes aminoácidos codificados pelos éxons: éxon 1(azul), éxon 2(vermelho), éxon 3 (verde) éxon 4 (violeta) éxon 5 (azul escuro) e éxon 6 (marrom).

1.6 A proteína UBE2G2 (Ubiquitin Conjugating Enzyme E2G2)

Como foi mencionando, o produto do gene *ube2g2* é uns dos membros da família de enzimas capazes de ligar e transferir moléculas de ubiquitina ao substrato, durante a via de ubiquitinação, isto é a família E2, especificamente à classe I (Katsanis *et al.*,1998; Rose *et al.*, 1998; Chau *et al.*,1989).A primeira análise da seqüência de aminoácidos mostrou que UBE2G2 era similar à proteína UBC7 de *Saccharomyces cerevisiae*, com 60% de identidade de seqüência, recentemente tem se descoberto uma nova proteína homóloga em camundongo, entre outros, como se mostra na tabela 1.8 extraídas do analise da seqüência feito no NCBI.

Alignment Scores			
Species	Gene	aa%ID	nt%ID
H.sapiens	UBE2G2		
➔ vs. <i>M.musculus</i>	Ube2g2	100.0	89.1
➔ vs. <i>R.norvegicus</i>	LOC294331	100.0	89.5
vs. <i>G.gallus</i>	LOC424837	98.2	82.4
vs. <i>D.melanogaster</i>	crl	81.8	71.7
vs. <i>A.gambiae</i>	1269385	82.4	70.9
vs. <i>C.elegans</i>	ubc-14	77.0	65.1
vs. <i>S.pombe</i>	ubcp3	68.3	60.2
➔ vs. <i>S.cerevisiae</i>	QR18	62.8	56.7
vs. <i>K.lactis</i>	KLLA0E07711g	59.8	57.3
vs. <i>E.gossypii</i>	ABR059W	62.4	60.6
vs. <i>M.grisea</i>	MG04081.4	63.6	62.8
vs. <i>N.crassa</i>	NCU03623.1	64.0	60.5
vs. <i>A.thaliana</i>	At5g59300	60.8	59.0

Figura 1.8: Porcentagem de identidade de seqüência de *ube2g2* em humanos quando comparado com outros genes homólogos. Na primeira coluna à direita encontra-se as espécies comparadas, na segunda coluna o nome do gene ou o lócus que o identifica e na ultimas duas colunas as porcentagens de identidade de aminoácidos (aa%) e de nucleotídeos (nt%). As setas vermelhas indicam três homólogos de importância a nível funcional (ver parágrafos seguintes).

Até recentemente, muito pouco era conhecido sobre a funcionalidade da proteína humana UB2G2. Ela foi apenas relacionada com o sistema de ubiquitinação por comparação das seqüências de aminoácidos de outras E2, como por exemplo, UBC7, proteína de levedura relacionada à degradação de proteínas provenientes do RE (retículo endoplasmático), via de ubiquitinação que requer a retrotranslocação do substrato desde o lúmen do RE ao citoplasma [Jungmann et al 1993; Yamazaky et al 1996; Tiwari et al., 2001]. Nos últimos anos isto tem mudado a partir do seqüenciamento do genoma de camundongo [Waterston et al 2002] e com a descoberta e isolamento do gene homônimo e homólogo em *Mus musculus*, com o qual possui 100% de identidade de seqüência de aminoácidos (indicados com uma seta na figura 1.8). A proteína murina codificada pelo gene *ube2g2*, chamada de MmUBC7, tem sido estudada intensamente desde o ponto de vista funcional, mostrando estar associada claramente à degradação de proteínas do retículo endoplasmático (no caso de MmUBC7, a subunidade α do receptor de linfócitos, TCR) função também atribuída à de leveduras [Tiwari et al., 2001].

Devido à identidade de seqüência mostrada com a homóloga humana, a proteína MmUBC7 (também chamada de ^{mam}UBC7) tem sido utilizada tanto para análises *in vitro* como *in vivo*, sobre tudo quando a proteína é superexpressa em células humanas. Desta maneira tem sido demonstrado que a proteína está diretamente envolvida na degradação do receptor (tipicamente localizado na membrana do RE) do Inositol tri-fosfato InsP₃R quando superexpresso em células de neuroblastoma humano, SY5Y [Webster et al, 2003]. Além disso foi

demonstrado que a proteína estaria associada à degradação da proteína humana (também do RE), iodinase D2 [Kim et al 2003], enzima envolvida na homeostase da glândula tiróides, quando ambas foram co-expressas em células embrionárias de rim ,HEK-293. Nesses estudos a meia vida da proteína D2 estava diretamente associada à presença das formas nativas e mutantes (sem a cisteína que liga ubiquitina) de MmUBC7, sendo a forma mutante a que estabiliza a expressão da D2.

Quanto à associação de MmUBC7 com as enzimas E3, peças chave para o reconhecimento do substrato e marcação com ub, tem sido demonstrado que a E2 murina interage com a proteína E3, gp78 (glucoproteína de transmembrana, inicialmente isolada de melanoma murino e associada à migração do tumor) a qual pertence à família RING [Fang et al , 2001]. Nos último ano também tem se descoberto a interação *in vivo* e *in vitro* com outros membros da família RING-E3: HRD1 [Kikkert *et al.*, 2004], TEB4 [Hassink *et al.*, 2005] e com fator de transcrição SNURF/RNF4 [Hakli *et al.*, 2004].

Hoje em dia não há publicado nenhum trabalho sobre a estrutura tridimensional da proteína ou algum dado sobre a estrutura secundária. É por isso que UBE2G2/UBC7 humano é um alvo interessante não apenas do ponto de vista funcional. É por isso que durante esse trabalho tentou-se alcançar os objetivos a seguir:

2. Objetivos:

- Isolar e expressar, no sistema bacteriano o produto do gene humano *ube2g2*.
- Purificar a proteína recombinante por Cromatografia de Afinidade.
- Produzir anticorpos policlonais em camundongos.
- Determinar a funcionalidade da proteína UBE2G2 *in vitro*.
- Determinar o enovelamento da proteína através de Dicroísmo Circular.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

A maioria dos reagentes e antibióticos utilizados durante o trabalho foram da marca Merck (grau analítico P. A). O painel de cDNA (DNA complementar) usado para isolar a fase aberta de leitura (ORF, Open Reading Frame) do gene *ube2g2* foi da Clontech. Os oligonucleotídeos específicos do gene foram sintetizados pela empresa Invitrogen. Da mesma marca foram os reagentes necessários para realizar a cultura de células HeLa. As cepas bacterianas *Escherichia coli* DH5 α e BL21(DE3) usadas durante a clonagem e expressão do gene foram adquiridas da Promega, assim como o vetor de clonagem pGEM-T. O vetor de expressão pET28a foi da Novagen. As enzimas de restrição NdeI e XhoI foram da Invitrogen. As colunas His-trap assim como o sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography) usado para purificar a proteína UBE2G2 foi da marca AmershamBiosciences. A resina de níquel (Ni-NTA) usada durante o ensaio de "pull-down" foi da Qiagen. O anticorpo anti-ubiquitina humana foi adquirido da R&D Systems. Os filtros de 42 μ m e as membranas de Nitrocelulose foram da marca Millipore. E os reagentes e meios de cultura para células de mamíferos foram da marca Invitrogen.

3.1.2 Painéis de cDNA

Os painéis de DNA complementar (ou cDNA) usados para amplificar a fase de leitura aberta do gene *ube2g2* estavam constituídos por um conjunto de moléculas de DNA de fita simples, complementares ao RNAm (poli A+) gerados e isolados de diferentes tecidos e linhagens celulares de humanos, usando a técnica de RT-PCR (Reverse transcriptase - Polymerase Chain Reaction), segundo os dados do fabricante.

3.1.3 Vetor de propagação pGEM-T

O plasmídeo pGEM-T foi desenhado especificamente para a clonagem de produtos de PCR (Polimerase Chain Reaction) amplificados usando a enzima "Taq DNA polimerase" (Polimerase de DNA de *Termus aquaticus*), a qual adiciona um desoxi-nucleotídeo Adenina nas extremidades 3' do fragmento amplificado (Figura 3.1).

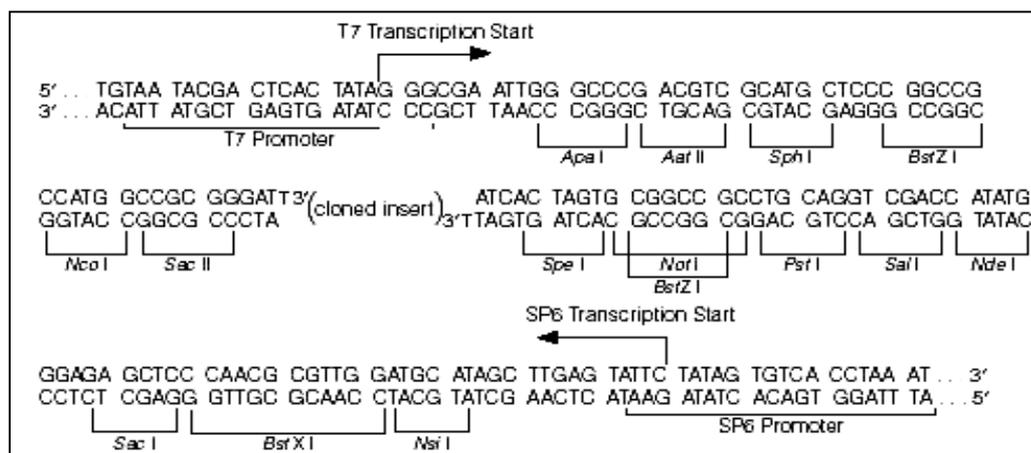


Figura 3.1: Sítio de múltipla clonagem do vetor pGEM-T (Promega Corp.)

Este vetor é preparado através da clivagem com a enzima Eco RV e a posterior adição de uma timina em cada uma das extremidades 3' resultantes. Além de ser um vetor de alta cópia, ele contém duas regiões promotoras para a enzima RNA polimerase dos fagos T7 e SP6 flanqueando a região de clonagem múltipla (ou polilinker). Dentro desta região de clonagem encontra-se localizada a sequência codificante para o peptídeo alfa da enzima β -galactosidase, enzima esta que, ao hidrolisar o X-gal (análogo da lactose) gera um produto precipitado de cor azul nas bactérias. Ao contrário, quando um fragmento de DNA é inserido no polilinker, a fase de leitura da enzima é interrompida e inativa, o que gera colônias de bactérias (transformadas com o vetor) brancas. Isto facilita a identificação dos clones com o fragmento de interesse.

3.1.4 Vetor de expressão pET

O sistema pET tem sido desenvolvido para a clonagem e expressão de genes em bactérias *E.coli*. Os genes clonados dentro deste tipo de vetores se encontram sob controle do promotor do Fago T7. A adição do IPTG na cultura de bactérias induz a expressão da enzima RNA polimerase do fago T7 (presente no genoma bacteriano) e esta pela sua vez reconhece a sequência promotora no vetor pET e promove a transcrição dos genes clonados “downstream” dessa região. A enzima é tão seletiva e ativa que uma vez induzida, a expressão com IPTG a bactéria orienta a maioria dos recursos energéticos para esse processo

Neste trabalho escolheu-se o vetor pET28a (Figura 3.2) para clonar o gene de interesse devido a que este vetor possibilita a clonagem em fusão com uma seqüência codificante para vários resíduos de histidina (His) e por tanto permite expressar e gerar uma proteína quimérica com uma “cauda” de His, na posição N ou C terminal da mesma; isto permite posteriormente, a purificação do produto recombinante por cromatografia de afinidade em colunas de Níquel. Nesse vetor existem também múltiplos sítios para a clivagem com as enzimas de restrição desejadas, o que facilita a clonagem.

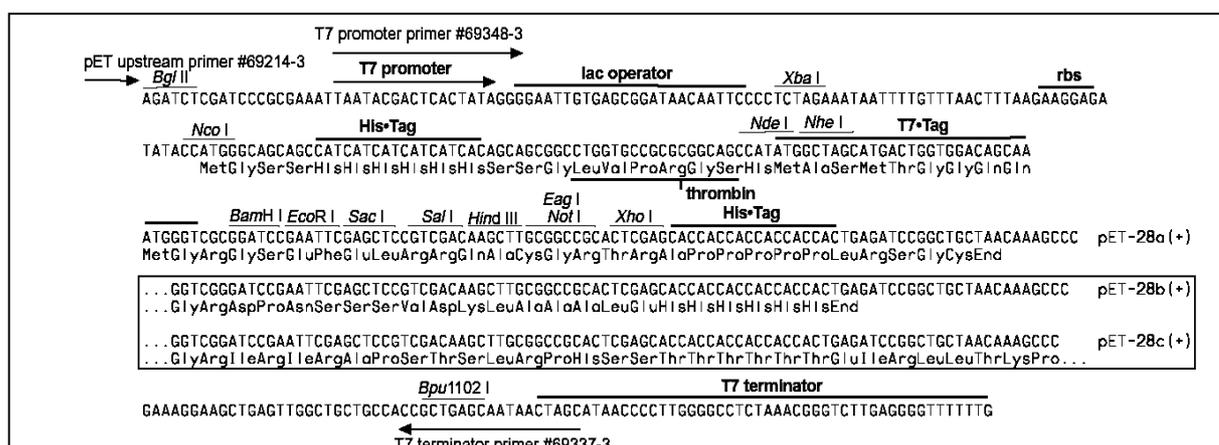


Figura 3.2 Sítio de múltipla clonagem e expressão do vetor pET28a (Novagen):

3.1.5 Cepas bacterianas utilizadas

Os genes a serem expressos devem ser propagados inicialmente em bactérias que não possuam o gene da RNA polimerase do fago T7, para eliminar desta maneira a possível instabilidade do plasmídeo devido à potencial toxicidade da proteína. Por esse motivo foi utilizado primeiramente a cepa de *E.coli* DH5 α . A

cepa bacteriana utilizada para a expressão do gene de interesse foi *E.coli* BL21(DE3), a qual possui o gene da RNA polimerase do fago T7 inserido no genoma controlado a sua vez pelo repressor lac (Studier e Moffatt, 1986).

3.2 Métodos

3.2.1 Amplificação da Fase Aberta de Leitura (ORF) do gene Ube2g2

A fase aberta de leitura de 495 pb (pares de bases) do gene ube2g2 foi obtida mediante reação de PCR, em termociclador Gene Amp PCR System 2400, Perkim Elmer, utilizando como molde uma amostra de painel de cDNA de cérebro humano, usando oligonucleotídeos ("Primers") específicos desenhados a partir da seqüência do RNAm depositada no banco de genes, GeneBank (Numero de acesso: AF032456):

-Primer F (Forward): 5` catgg catat ggcggggaccgcgctca 3`
-Primer R (Reverse): 5` ccctcgag tcacagtcccagagaccttctgg 3`

As seqüências em **negrito** em F e R representam os sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *XhoI*, respectivamente.

A reação para um volume de 25 µl foi realizada misturando os seguintes componentes e as seguintes condições de amplificação:

♦ Tampão Taq DNA pol (10X)	2,5	µl
♦ dNTPs (10 µM)	0,5	µl
♦ Primer F (10 µM)	1,25	µl
♦ Primer R (10 µM)	1,25	µl
♦ Taq pol (Cl2Mg)	0,125	µl
♦ H ₂ O	18,50	µl
♦ Molde	<u>1,00</u>	µl
♦ Volume Final	25,00	µl

As condições de amplificação foram 35 ciclos de: 94 °C, 15"; 55 °C, 30 " e 72 °C 1'. O resultado da amplificação foi revelado através da técnica de eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose 1% contendo uma solução de Brometo de Etídeo 0,3 ug/ml, em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X. Após revelação do resultado, o fragmento foi purificado do gel de agarose, seguindo o procedimento descrito no Kit "Concert Rapid PCR Purification System"(Gibco, BRL).

3.2.2 Clonagem no vetor pGEM-T

Uma vez estimada a concentração do fragmento no gel de agarose 1% foi realizada a reação de ligação do mesmo ao vetor pGEM-T. A massa de inserto utilizado na reação foi calculada segundo a seguinte formula:

ng do vetor x kb inserto/ kb vetor x relação molar inserto/vetor (3/1) = ng de inserto

A reação foi feita a 4 graus durante 16 hs usando 50 ng (nano gramas) de vetor e 10 µl de volume final:

<u>Reação Padrão</u>	
-Tampão da ligase T4(2X)	5µl
- Vetor pGEMT (50ng)	1µl
- Inseto puro	xµl
- Ligase de T4 (3 unid/µl)	1µl
- Água estéril q.sp	10µl

Depois de finalizada a ligação do inserto no vetor pGEM-T uma alíquota da reação foi utilizada para transformar bactérias competentes da cepa *E.coli* DH5α pelo método de choque térmico. As células competentes foram previamente preparadas por tratamento com CaCl₂, segundo o protocolo de Sambrook, *et al* 1989. Para realizar a transformação, pegou-se uma alíquota de bactérias competentes, manteve-se no gelo até o descongelamento e adicionaram-se 2 µl da ligação pGEM-ube2g2, homogeneizou-se por agitação suave e deu-se um choque térmico a 42 °C por 90 segundos. Adicionaram-se 800 ul de meio de cultura LB (líquido), incubou-se por 45 a 60 minutos a 37 °C e plaqueou-se a mistura em placa de petri com meio LB (sólido) contendo IPTG (0,5 mM), X-gal (80 µg/ml) e o antibiótico ampicilina (100 µg/ml).

3.2.3 Análise por “PCR de Colônia” das bactérias transformadas

Para confirmar a presença das construções realizadas (pGEM-ube2g2 e posteriormente no pET28-ube2g2) nas bactérias transformadas, realizou-se um “PCR de colônia”. Amostras de 10 clones escolhidos arbitrariamente foram ressuspendidas em 50 µl de H₂O bidestilada estéril, em tubo de 1,5 ml. Colocou-se em água fervendo (100 °C) por 5 minutos e centrifugou-se 2 minutos a máxima velocidade. Tomou-se 1 µl do sobrenadante e usou-se como molde da reação de amplificação. A reação, em todos os casos, foi realizada como em 3.2.1.

Os do PCR revelaram-se por eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA plasmidial dos clones positivos contendo o gene inserido no vetor foi purificado por meio do método de Lise Alcalina usando o kit Concert Rapid Plasmid Miniprep System™ (Gibco, BRL). Posteriormente esses plasmídios foram utilizados para as reações de sequenciamento e clivagem com enzimas de restrição, com o intuito de confirmar a identidade da construção.

3.2.4 Sequenciamento de DNA

A reação de sequenciamento DNA pelo método de Didesoxinucleotídeos, (Sanger, 1977) é um método simples e confiável para a identificação de seqüências de interesse. Durante o presente trabalho os vetores construídos com o gene de interesse foram seqüenciados por este método para a confirmação da seqüência de ube2g2 assim como a seu correto posicionamento dentro dos

vetores. Em todos os casos usou-se o seqüenciador automático “ABI-Prism 377-DNA Sequencer” (Perkin Elmer) e seguiu-se o seguinte protocolo básico:

<u>Mistura da Reação</u>	
DNA (500ng)	4 µl
Tampao “Save Money”	2 µl
Mix “ET Dye”	2 µl
Oligo (5 pmol/ul)	<u>2 µl</u>
Volume final	10 µl

E as condições de ciclagem foram:

1 ciclo inicial	96 °C, 2 minutos
35 ciclos	95 °C, 20 segundos
	50 ° C, 15 segundos
	60 °C, 1 minuto

As seqüências obtidas foram analisadas comparativamente no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando o programa BLAST-X e também alinhadas usando o programa Multalin [Corpet *et al*,1998].

3.2.5 Clivagem de DNA com enzimas de restrição

A clivagem do DNA com as endonucleases de restrição permite entre outras coisas o isolamento de um fragmento clonado dentro de um vetor qualquer (que possua o sitio de reconhecimento pela enzima escolhida) assim a permite a linearização de um outro vetor necessário para a clonagem. No presente trabalho realizaram-se duas reações de clivagem com fins diferentes: uma para isolar o gene ube2g2 do vetor pGEM-T e outra para linearizar o vetor pET28a e possibilitar a posterior subclonagem do gene nesse vetor de expressão.

As reações de clivagem realizaram-se usando as enzimas NdeI e XhoI e com seguindo o protocolo básico [Sambrook et al 2001]:

- Em um tubo de 1,5 ml misturar:

-DNA	0,1 a 0,4 µg
-Tampão da enzima	1X
- NdeI/XhoI	1Unidade /µg de DNA
- H ₂ O estéril	completar q.s.p 20

As reações foram incubadas a 37 °C durante 3 ou 4 horas . Os resultados foram analisados em gel de agarose 1% , usando como controle da reação um fragmento de DNA sem clivar.

3.2.6 Subclonagem do gene *ube2g2* no vetor pET28a

Para subclonar o gene *ube2g2* no vetor de expressão pET28 usou-se uma alíquota do fragmento clivado (com as enzimas NdeI e XhoI) e isolado do vetor pGEM-T e uma alíquota do vetor pET28 também clivado com as mesmas enzimas, realizando a reação de ligação e subsequente transformação das cepas bacterianas *E.coli* DH5 α e BL21(DE3), seguindo os passos descritos em 3.2.2.

3.2.7 Indução da expressão em *E.coli* BL21 (DE3)

As bactérias *E.coli* BL21 (DE3) transformadas a construção **pET28*ube2g2*** (previamente confirmada por seqüenciamento) foram crescidas em meio LB liquido contendo o antibiótico canamicina durante 2hs a 37°C em agitação constante até a cultura atingir uma densidade óptica, DO= 0,6 (medida a 600 nm em espectrofotômetro). Nesta densidade coletou-se uma amostra (500ul) da cultura antes da indução com IPTG, como controle negativo da indução reação. Logo após realizou-se então a indução da expressão colocando ao meio o indutor em concentrações finais que variaram entre 0,1 mM e 1mM. As células foram induzidas durante 3 hs a 30 °C ou 37 °C. Para analisar o resultado da expressão a amostra, coletadas a cada uma hora apos a indução, foram centrifugadas, fervidas e ressuspendidas no tampão de corrida para eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE em condições desnaturantes, segundo o método de Laemmli, (1970).

3.2.8 Teste de solubilidade da proteína recombinante UBE2G2

O teste de solubilidade é feito para determinar se a proteína recombinante é expressa de maneira solúvel ou insolúvel na bactéria. Para isto, depois de terminada a indução, a cultura de bactérias (acima de 50 ml de meio) é centrifugada, lisada e fracionada, para obter as frações de proteínas solúveis (S, sobrenadante) e as frações insolúveis (P, pellet). A análise de cada uma através de SDS-PAGE permite determinar em qual das duas frações a proteína de interesse se encontra.

Para realizar o teste, 250 ml de cultura induzida foram centrifugadas durante 10 minutos a 4 °C e a 10.000 RPM. O precipitado ou pellet de bactérias foi logo ressuspenso em tampão de lise (20 mM Fosfato, 500 mM NaCl, pH 7,4) e as células lisadas por sonicação, 10 pulsos de 20 mA durante 1 minuto cada um, a 4 °C. Após a sonicação as frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação, 10 minutos a 4 °C e 10.000 RPM e alíquotas de ambas frações foram processadas e usadas para revelar o resultado em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%.

3.2.9 Purificação da proteína *His*UBE2G2 por Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade (Porath et al.,1975) para a purificação de proteínas se baseia na capacidade de determinados aminoácidos doadores de elétrons tais como: histidina (his), triptofano (trp) e fenilalanina (phe) de se ligarem

de maneira reversível a íons metálicos (como o níquel) imobilizados em uma matriz. Esta técnica oferece uma alta seletividade, uma alta resolução e um alto rendimento do produto desejado na forma pura. Por outro lado, o Kit His-trap (Amersham-Pharmacia) utilizado neste trabalho está desenhado para a rápida e reproduzível purificação de proteínas expressas com cauda de histidinas. A coluna utilizada consta de uma matriz de sefarose de alta performance capaz de reter átomos de metais como o níquel; as proteínas são retidas pela afinidade das histidinas ao níquel ligado à matriz. Uma vez retidas as mesmas são eluídas com uma solução tampão contendo o competidor das histidinas, o Imidazol.

3.2.10 Preparação das amostras para a purificação

Uma vez finalizada a expressão na cultura de bactérias, as amostras foram processadas e reveladas em gel SDS-PAGE 15 %, descrito em 3.2.7 e 3.2.8 para obter a fração solúvel contendo a proteína *HIS*UBE2G2 .

Antes de injetar a amostra na coluna de níquel a mesma foi filtrada em filtro de 45 µm. A coluna His-trap foi previamente lavada com 5 ml de H₂O destilada e deareada. Foi carregada com 0,5 ml de solução de sulfato de Níquel, 0,1M e novamente lavada com 5 ml de H₂O para eliminar o excesso de níquel. Mais tarde, a coluna foi equilibrada com 10 ml de tampão Fosfato 20mM, 500 mM NaCl. Uma vez equilibrada a coluna injetou-se, manualmente, a amostra proveniente da fração solúvel de proteínas da bactéria. Finalmente a coluna foi conectada ao sistema HPLC, o qual automaticamente iniciou o processo de purificação em gradiente de concentração de imidazol (de 0% até 100%).

Para revelar o resultado, alíquotas de diferentes frações obtidas durante o processo foram processadas com já descrito anteriormente para serem aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%.

3.2.11 Quantificação de Proteínas (Método de Bradford)

O método de Bradford, desenvolvido para medir a concentração de proteínas, é baseado na quantidade de corante Coomassie Blue que se liga nas proteínas de interesse comparado com a quantidade do corante ligado a uma outra proteína de concentração conhecida; normalmente utiliza-se BSA (Bovine Serum Albumine) para realizar a curva de calibração. Este método é eficiente na medição de quantidades de proteína de 1 a 10 µg.

No presente trabalho usou-se esta metodologia sempre que foi necessária a quantificação de proteínas, tanto após a purificação de ube2g2 como quando foi necessário determinar a quantidade de proteínas solúveis em células HeLa. O protocolo usado foi o seguinte:

1. Em tubos de microcentrífuga, alíquotar (por duplicata ou triplicata) 5, 10, 15 e 20 µl da solução de BSA (0,5 mg/ml) e completar até 100 µl com uma solução de NaCl (0,15 M). Em dois tubos diferentes alíquotar a mistura para ser usada como branco.
2. Adicionar 1 ml de Coomassie Brilliant Blue e mexer no vortexador. Deixar 2 minutos repousando.

3. Colocar as amostras em cubetas de quartzo de 1ml e determinar a absorbância (Abs a 595 nm) e realizar uma curva padrão, Absorbância vs Concentração de BSA.
4. Para a proteína de interesse, realizar varias diluições e medir a absorbância como em 3. Comparar os valores de Abs com os da curva padrão e determinar a concentração meia da proteína.

Para a medição foi utilizado o espectrofotômetro Gensys 2 ,Spectronic.

3.2.12 Imunização de camundongos para produção de anticorpos

Com o intuito de obter anticorpos policlonais contra a proteína UBE2G2 cinco camundongos machos adultos foram imunizados por injeção sub-cutânea, utilizando adjuvante para ativar a resposta imune. Para ser usada como antígeno, a proteína foi purificada segundo descrito em 3.2.10 e a medição da concentração como descrito 3.2.11.

Um camundongo foi imunizado com 50 ug da proteína purificada mais o adjuvante completo de Freund (Sigma) e quatro camundongos foram imunizados com 50 µg de proteína com adjuvante incompleto.

Após 45 dias fez-se uma segunda imunização usando 50 µg de proteína mais adjuvante incompleto de Freund. A coleta do sangue e o processamento do soro foram realizados no dia 11° após a segunda imunização.

3.2.13 Ensaio de Western Blot

Para testar os anticorpos anti-ubiquitina (R&B systems) e os anticorpos anti-UBE2G2 (produzidos nos camundongos) foi realizado um ensaio de Western Blot. As amostras protéicas a serem analisadas foram resolvidas através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Após a corrida este gel foi imerso em tampão de transferência (Tris 200mM, Glicina 50mM, metanol 15%), juntamente com uma membrana de nitrocelulose (Millipore) e dois pedaços de papel Whatman 3MM. O gel foi então colocado em um aparato de eletroforese (Cuba de eletroforese Mini V8 - GIBCO BRL - Life Technologies), e submetido à voltagem de 150V e 160mA durante 1 hora e 30 minutos, para realizar a transferência das proteínas do gel para a membrana. Terminada a transferência, a membrana foi corada durante 5 minutos em solução de Ponceau (Ponceau 0,5%, ácido acético 0,1%), para visualização das bandas. Esta membrana foi então incubada em solução de bloqueio (leite em pó 5% em TBS), durante 60 minutos, lavada 4 vezes com TBS 1X (Tris 50mM e NaCl 150mM), e incubada por 2 horas com o anticorpo primário : soro proveniente dos camundongos imunizados no caso do western blot para Ube2g2 (diluído em TBS, 1:10.000) e anticorpo monoclonal anti-ubiquitina (1ug/ml, em TBS) no caso do ensaio de western blot de HeLa ou durante a revelação de ensaio de pull-down. A membrana foi novamente lavada com TBS e incubada com o anticorpo secundário (Anti-Mouse IgG conjugado à fosfatase alcalina; Sigma) diluído 1:10.000 por 2 horas sob agitação suave. A membrana foi lavada novamente e revelada com uma solução NBT-BCIP AP ("Western Blue" - Sigma).

3.2.14 Medição do Espectro de Dicroísmo Circular

As macromoléculas biológicas, tais como as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucleicos, são compostos de muitas unidades opticamente ativas que exibem sinal de Dicroísmo Circular ou CD, do inglês, Circular Dichroism. Essas moléculas opticamente ativas absorvem a luz polarizada e provocam alteração na polarização da luz incidente. A técnica de CD detecta essa alteração através da medida da diferença da absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda após esta passar através de uma amostra (Figura 3.1). A ausência de uma estrutura regular resulta em um valor de zero para o CD, em quanto a presença de uma estrutura ordenada resulta em um espectro que pode conter sinais positivos ou negativos.

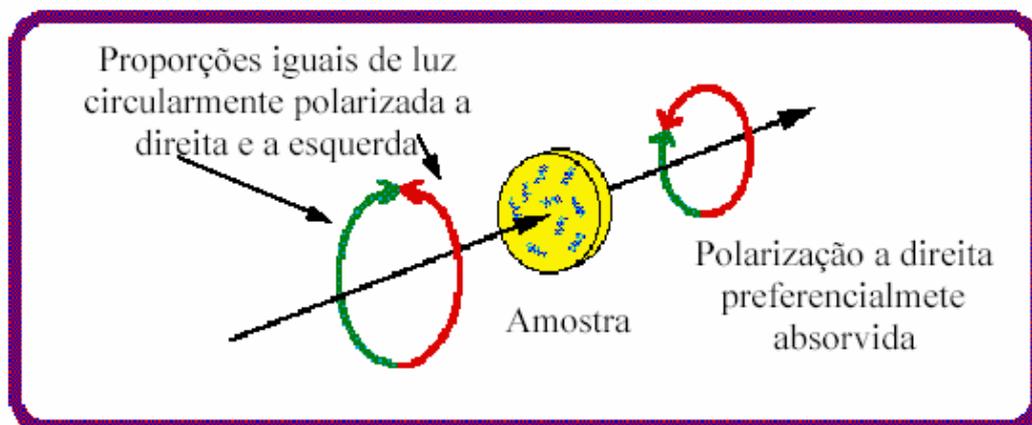


Figura 3.1: Ilustração esquemática do fenômeno de dicroísmo circular.

No caso das proteínas o dicroísmo circular é particularmente útil para:

- ❖ A determinação do enovelamento da estrutura secundária, e dessa maneira à família a qual ela pertenceria.
- ❖ Comparação de proteínas extraídas de diferentes recursos ou métodos.
- ❖ Determinação do comportamento da proteína em diferentes soluções

No intuito de obter dados preliminares sobre a estrutura secundária de *His*UBE2G2 humana expressa em bactérias realizou-se a medição do Espectro de Dicroísmo Circular da proteína. Para isto foi utilizado o espectropolarímetro Jasco J-720 e luz circularmente polarizada na faixa dos 195 e 250 nm e cuvetas de quartzo de 1 mm. A proteína *his*UBE2G2 usada foi purificada por cromatografia de afinidade como já descrito em 3.2.9 e dialisada contra o tampão Tris-Cl (pH 7,4); após isso a concentração da proteína foi medida como descrito em 3.2.11e posteriormente diluída até a concentração final de medição [0,28 mg/ml]. A análise do CD em termos do conteúdo de estruturas secundária foi realizada usando o programa SELCOM 2, baseado no “Self-Consistent Method algorithm [Sreerama et al 1993]

3.2.15 Cultura de células HeLa

As células *HeLa* são uma linhagem epitelial imortalizada derivada do carcinoma cervical mortal humano [*Henrietta Lacks*, 1951]. As células são do tipo aderente (se grudam nas superfícies) e apresentam inibição de crescimento por

contato, isto é, uma vez espalhadas na garrafa de cultura elas param de crescer quando entram em contato entre si, devido a sinais de inibição do ciclo celular. Para crescer as células HeLa, elas foram descongeladas e semeadas em duas garrafas de 75 cm², contendo o meio de cultura D-MEM (invitrogen) suplementado com soro fetal bovino (10%), glutamina (2 mM), e os antibióticos, penicilina (100 U/ μ l) e estreptomicina (100 μ g/ml). A cultura foi mantida a 37 °C, com uma tensão de CO₂ 5 %, até atingir uma densidade de 6 x 10⁵ células/ml. Posteriormente estas células foram processadas para a obtenção do extrato celular: as duas garrafas de cultura foram tratadas com uma solução de tripsina para desgrudar as células do frasco e seguidamente centrifugou-se a máxima velocidade durante 2 minutos. Isto permitiu separar as células do meio de cultura e dispensar este último. O precipitado contendo as células (ou pellet) foi logo ressuspensão no tampão de reação, "BR": Tris-Cl (20 mM), NaCl (120 mM), PMSF (10mM), pH 7,4 e posteriormente sonificado com 8 pulsos de 1 minuto (cada um) a 20 mA para romper a integridade celular. A separação da fração solúvel (contendo a ubiquitina) foi separada por centrifugação durante 10 minutos a 4 °C. Assim o sobrenadante foi coletado e a medição da concentração de proteínas foi feita segundo descrito em 3.2.11.

3.2.16 Determinação de Ubiquitina no extrato celular de HeLa

Com o intuito de demonstrar a existência de moléculas de ubiquitina na linhagem de células humana HeLa, antes de preparar o ensaio de pull-down,

realizou-se a imunodeteção da proteína mediante a técnica de Western Blotting, usando anticorpos monoclonais anti-Ub humana.

Uma alíquota do sobrenadante da linhagem obtido e processado segundo descrito em 3.2.15 foi aplicada e corrida no gel de poliacrilamida 15 % com SDS e mais tarde transferida para uma membrana de nitrocelulose segundo descrito 3.2.13, para a posterior detecção com o anticorpo comercial anti-ubquitina (1µg/ml).

3.2.17 Ensaio de pull-down

O ensaio de “pull-down” [Kaenli et al, 1991] é um método realizado *in vitro* para determinar a interação física entre duas ou mais proteínas. Pode ser usado para confirmar interações proteína/proteína já demonstradas por outras técnicas, por exemplo, co-immunoprecipitação, duplo híbrido, e também para realizar um “screening” para a identificação de novos interactomas.

A técnica, basicamente precisa da presença de uma proteína pura e em fusão com GST ou His-tag [Soutoulgu *et al* , 2000] como a “isca” usada para “pescar” a contraparte de interação (presa), como se mostra na figura 3.2.

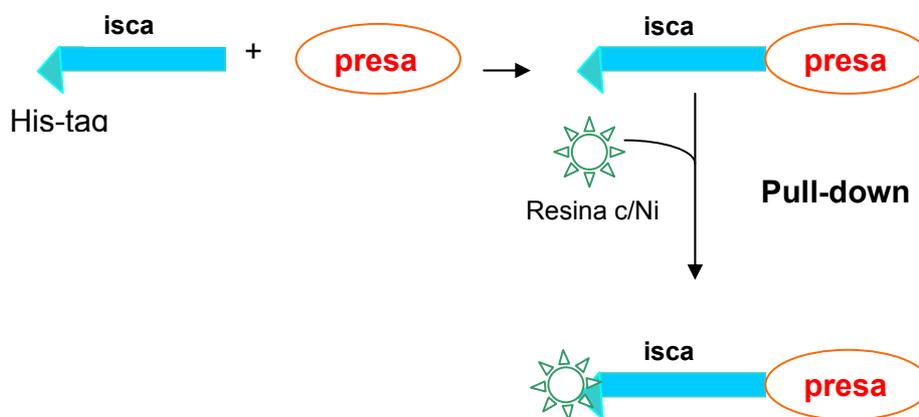


Figura 3.2: Interação proteína/proteína e “pull-down” entre a isca e presa alvo. A isca está em fusão com a cauda N-terminal de histidinas (his-tag).

A proteína “isca” em fusão com as histidinas (entre 6 e 10 aminoácidos) ou com a proteína GST é capturada por um suporte ao qual se liga por afinidade, gerando assim um segundo ligando para purificar outras proteínas que vão interagir com a isca.

No intuito de demonstrar que a proteína recombinante *His*UBE2G2 tinha sido expressa na sua forma ativa, isto é, como uma enzima ligante de ubiquitina, realizou-se o ensaio de “Pull-Down”, utilizando a proteína *His*UBE2G2 purificada por cromatografia de afinidade e um extrato de células humanas, como fonte de moléculas de ubiquitina livres. A linhagem de células utilizadas no caso foi a HeLa, e o extrato celular foi obtido segundo descrito em 3.2.15.

Aproximadamente 500 µg de proteína solúvel (em tampão BR pH 7,4) do extrato foi misturada com 50 µg de *HIS*UBE2G2 (previamente dialisada contra o tampão BR) e mistura incubada por 2 hs a 4°C. Adicionou-se aproximadamente 50

μ l de resina Ni-NTA (Qiagen) e incubando novamente por 4 hs a 4°C em agitação constante. Finalmente o complexo **resina-HIS $UBE2G2$ /Presa** foi submetido a eletroforese SDS-PAGE e logo transferido a membrana de nitrocelulose de 45- μ m (Millipore) para revelar os resultados pela técnica de Western blotting, usando para detectar a interação o anticorpo monoclonal anti-ub humana. Como controle negativo o mesmo experimento foi realizado em ausência da proteína “isca”. (ver discussão).

4. Resultados

4.1 Amplificação da Fase Aberta de Leitura (ORF) do gene Ube2g2

A fase aberta de leitura do gene *ube2g2* foi amplificada por PCR a partir de um painel de cDNAs de cérebro humano (CLONTECH). O produto amplificado apresentou um tamanho similar ao esperado (495 pb) quando analisado em gel de agarose 1% (Figura 4.1). Este fragmento foi eluído do gel de agarose, purificado e ligado no vetor pGEM-T. Após a transformação e seleção das colônias recombinantes, o DNA plasmidial foi purificado e seqüenciado, seguindo os passos descritos em 3.2.4. A seqüência obtida foi comparada com a seqüência do gene publicada por Katsanis e colaboradores (1998) usando o programa BLAST, confirmando a autenticidade do inserto.

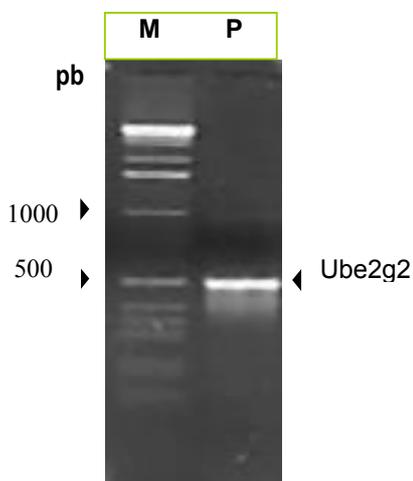


Figura 4.1: Amplificação (PCR) do fragmento 495 pb correspondentes à ORF de *ube2g2*, usando com molde, cDNA de cérebro humano. **M**: Marcador de peso molecular de DNA, **P**: alíquota da amplificação. O gene se indica com uma seta . (revelado por eletroforese em gel de agarose 1 % e brometo de etídio)

4.2 PCR de Colônias de *E.coli* (pGEM-ube2g2)

A reação de PCR de Colônia realizada, segundo descrito 3.2.3, usando os primers específicos para o gene, demonstrou que as 10 colônias brancas escolhidas aleatoriamente e analisadas possuíam o vetor recombinante, com o inserto ube2g2 de 495 pb, pGEMube2g2 (Figura 4.2). Além dessa reação foram feitas outras utilizando os primers *SP6_{promoter}* e *T7_{terminator}*, específicos do vetor e que correspondem as seqüências franqueadoras 5' e 3' respectivamente, da região de clonagem. Isto foi realizado para eliminar qualquer dúvida de contaminação nas amostras. O tamanho esperado de 700 (inserto + seqüências franqueadoras adjacentes) foi evidenciado também em gel de agarose 1% (dados não apresentados). Em ambas as reações de utilizou-se água bidestilada e estéril como controle negativo da reação.

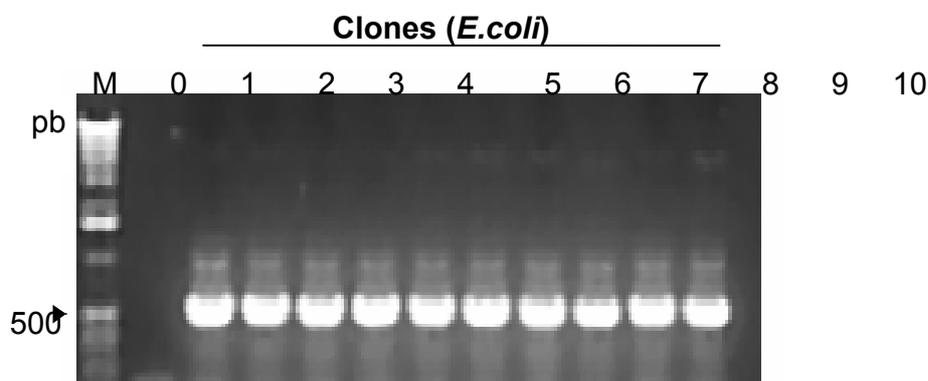


Figura 4.2: PCR de colônias em *E.coli* DH5 α transformadas com o vetor pGEM-Ube2g2 (usando primers específicos para o gene). A banda esperada de 495 pb se apresenta fortemente intensa nos 10 clones (numerados de 1 a 10) analisados. **M**: marcador de peso molecular de DNA, 1Kb.

Esses resultados permitiram prosseguir com o passo de extração de DNA plasmidial segundo a metodologia de mini preparação descrita em obtendo aproximadamente 180 a 200 ng/ μ l de concentração do vetor para as colônias selecionadas.

4.3 Subclonagem da ORF ube2g2 no vetor pET28a

Para acelerar o processo de subclonagem da ORF no vetor de expressão realizaram-se clivagens duplas tanto do plasmídeo recombinante pGEM-ube2g2 como do vetor pET28 (circularizado). Usou-se para este motivo as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* numa mesma reação, como descrito em 3.2.5. Por um lado, isto evitou a perda de material como consequência dos passos adicionais de purificação do DNA clivado, caso tiver clivado o mesmo com as enzimas separadamente e por outro lado permitiu obter grandes quantidades de vetor linearizado e de inserto.

A construção pET-ube2g2 foi realizada com sucesso assim como a transformação das bactérias *E. coli*. Uma vez crescidas estas, em placas de meio LB-agar suplementado com canamicina, realizou-se o PCR de colônia como já descrito, revelando resultados similares aos obtidos e esperados durante a clonagem do vetor pGEM.

As posteriores reações de seqüenciamento realizadas com o vetor pETube2g2 permitiram demonstrar que o gene ube2g2 tinha sido clonado com sucesso no vetor, com a fase de leitura correta e com a orientação esperada, isto

é, em fusão com a seqüência codificante para as histidinas na posição “upstream” do primeiro ATG do gene.

4.4 Expressão heteróloga de *HIS*UBE2G2

Para expressar a proteína *HIS*UBE2G2 primeiramente realizou-se a transformação das bactérias *E.coli* BL21 (DE3) com um dos vetores pET-ube2g2 (purificado através da técnica de “miniprep”) cuja seqüência tinha sido previamente confirmada por seqüenciamento. Das bactérias transformadas escolheram-se duas as quais foram crescidas em meio líquido, segundo descrito em 3.2.7. O resultado da indução demonstrou que a expressão da proteína recombinante foi bem sucedida em apenas 3hs de indução a 30 °C, 200 RPM após ter adicionado o indutor IPTG na concentração final de 0,1 mM, como se revela na figura 4.3.

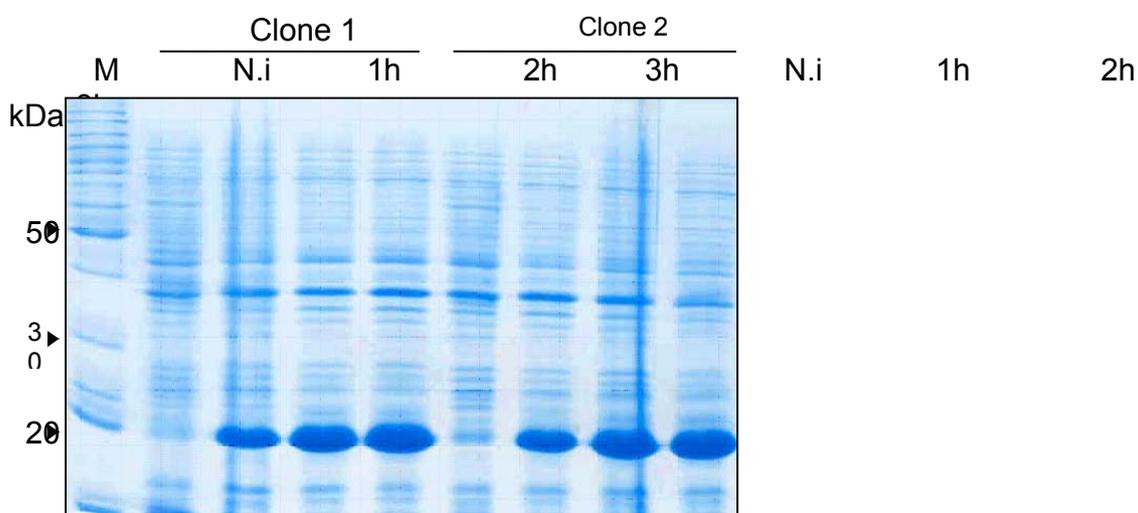


Figura 4.3: Resultado da expressão da proteína *HIS*UBE2G2 (20 kDa) em duas colônias de bactérias *E.coli* BL21 (DE3) induzidas durante 3 hs a 30C, 200 r.p.m. com 0,1 mM de IPTG . **M**: marcador de peso molecular para proteínas. **N.I**: Controle negativo não induzido e 1h, 2h, 3h: amostras da expressão coletadas após uma, duas, e três horas de indução. A seta vermelha à direita indica a banda de expressão da proteína. Gel SDS-PAGE15%

O peso molecular esperado para a proteína recombinante era de 20 kilodaltons (kDa) devido aos 18,5 kDa estimados para a seqüência de aminoácidos da UBE2G2 mais a fusão N-terminal (contendo a cauda de histidinas) de aproximadamente 2 kDa adicionais.

4.5 Teste de solubilidade de *HIS*UBE2G2

O teste de solubilidade demonstrou que a proteína *HIS*UBE2G2 foi expressa de maneira solúvel, usando o sistema de expressão pET e a cepa bacteriana *E.coli* BL21 (DE3) nas condições de expressão já descritas 4.4. O resultado do teste foi revelado através do gel de poliacrilamida (figura 4.4) junto aos resultados da purificação. O fato de ter obtido a proteína de maneira solúvel facilitou grandemente a continuação do trabalho e do passo seguinte que foi a purificação mediante a cromatografia de afinidade em colunas de níquel.

4.6 Purificação da proteína *HIS*UBE2G2 por cromatografia de afinidade

Durante o passo de purificação por cromatografia de afinidade em colunas de níquel usaram-se aproximadamente 20 ml de sobrenadante, os quais foram obtidos a partir de 1 litro de cultura, seguindo os passos descritos em 3.2.7 e 3.2.8. Esses 20 ml foram filtrados (usando filtro de 0,45 μ m) e injetados manualmente numa coluna de 1 ml (Hi-trap). Finalizada a cromatografia de afinidade (usando o sistema HPLC), conseguiu-se coletar 8 frações de 8 ml cada uma, contendo a proteína *HIS*UBE2G2 completamente purificada. As 8 frações se

corresponderam a eluição da proteína com concentrações de imidazol dentre 50 a 250 mM (em tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4). Na figura 4.4 se apresentam o resultados da purificação (três frações após a eluição, chamadas de: E1, E2 e E3) conjuntamente com os resultados da expressão e o teste de solubilidade para a proteína.

A concentração da proteína purificada (medida pelo método de Bradford) foi de aproximadamente de 3,4 mg/ml de proteína pura. Sendo então o rendimento da expressão, sob essas condições, de 27 mg de *His*UBE2G2 pura por litro de cultura induzida.

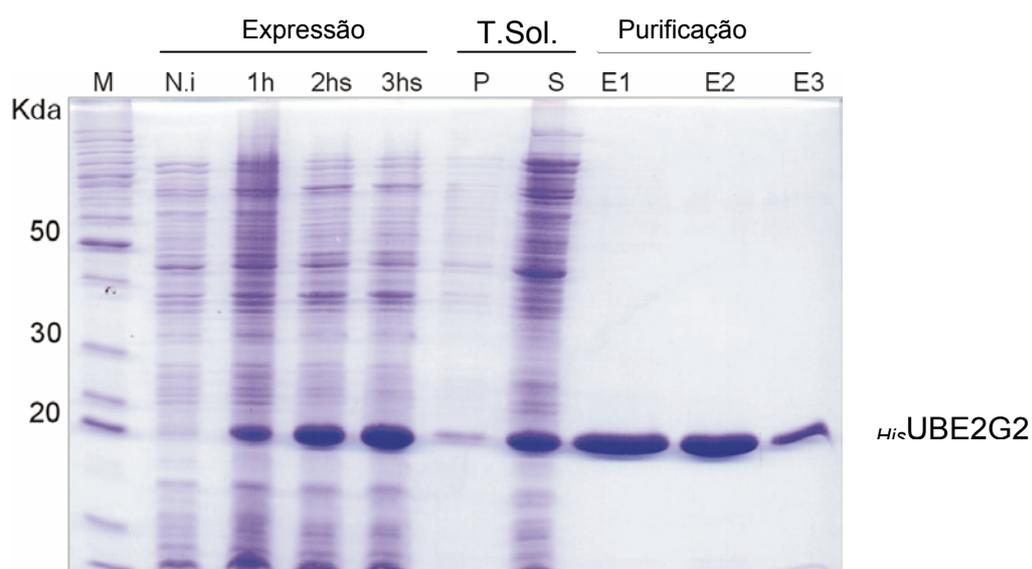


Figura 4.4: Resultados da Expressão, teste de solubilidade e Purificação da proteína *His*UBE2G2 (revelado por SDS-PAGE 15%). Note-se que, no teste de solubilidade (T.Sol) a banda de 20kDa da proteínas aparece majoritariamente na fração solúvel (S) embora haja uma minoria na fração insolúvel (P). As frações coletadas durante a purificação (E1, E2 e E3) contêm a proteína altamente pura sem contaminastes bacterianos. M: Marcador de Peso Molecular para proteínas, Ni: controle negativo da indução, 1-3hs: tempo de indução da expressão protéica.

4.7 Análise dos anticorpos policlonais anti- $_{\text{His}}$ UBE2G2.

Com o intuito de produzir anticorpos contra a proteína $_{\text{His}}$ UBE2G2 foram imunizados cinco camundongos utilizando-se o protocolo descrito em 3.2.12. O soro dos animais foi processado e analisado através do ensaio de “Western Blot” para detectar a presença de anticorpos anti- $_{\text{His}}$ UBE2G2 com descrito em 3.2.13. Como mostra a figura 4.5, apenas o soro extraído de dois animais imunizados gerou uma resposta imune específica contra a proteína, reconhecendo uma banda do tamanho esperado para a proteína recombinante. Este resultado indica que o soro produzido possui anticorpos capazes de reconhecer especificamente a proteína.

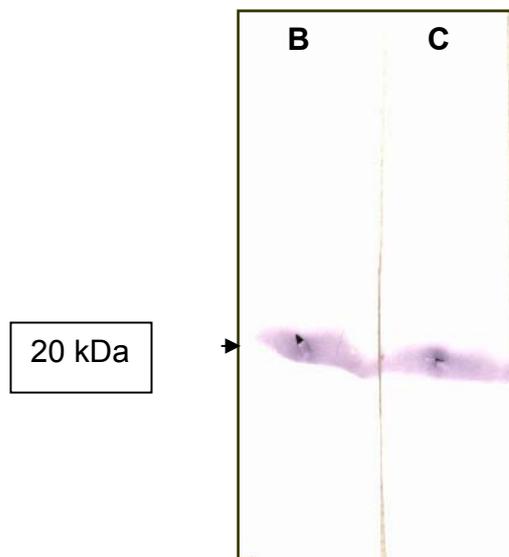


Figura 4.5: Western Blot (revelado com NBT-BCIP AP) onde se mostra o reconhecimento da proteína $_{\text{His}}$ UBE2G2 por parte dois anti-soros imuno-específicos (B e C). A diluição dos soros utilizados foi de 1/10.000.

Esses mesmos soros foram utilizados para ensaiar a detecção da proteína nativa endogenamente expressa em células humanas. Para isto foi realizado outro western blot (3.2.13) a partir do extrato de células HeLa, mas com resultados negativos.

4.8 Espectro de dicroísmo circular (CD) para *His*UBE2G2

No intuito de obter as primeiras evidências sobre a estrutura secundária ou o tipo de enovelamento que esta possui logo de ter sido expressa num sistema heterólogo e logo de ter sofrido um passo de purificação, foi medido o espectro de dicroísmo circular da proteína recombinante em tampão Tris-HCl como descrito em.

O espectro de CD mostrou um mínimo local a 208 nm e um Maximo a 197 nm com interseção em zero a 201,5 nm (figura4.6). O conteúdo de estrutura secundária da proteína *His*UBE2G2 estimado pelo programa SELCOM 2 resultou em :

- **35 % Hélices α**
- **21 % Folhas β -antiparalelas**
- **23 % Giros**
- **21 % Desordenada**

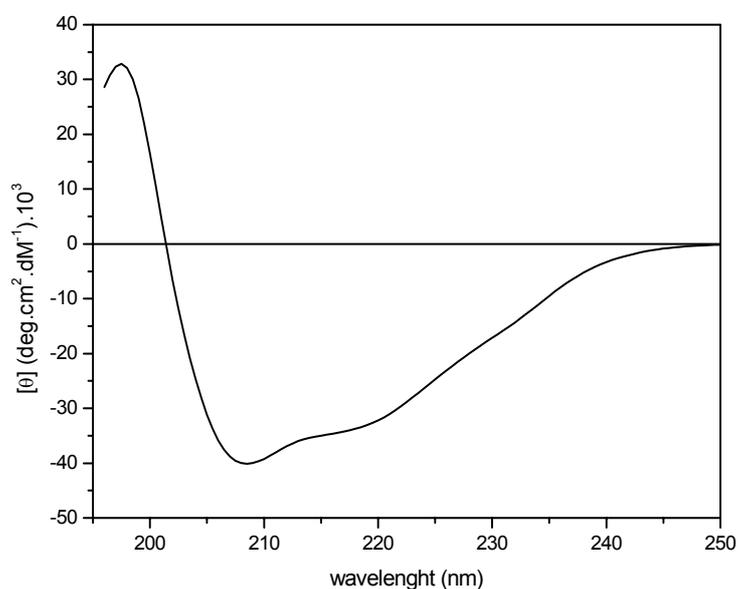


Figura 4.6: Espectro de Dicroísmo Circular da proteína $HISUBE2G2$, em tampão Tris-Cl (pH 7,4). Usaram-se nessa medição aproximadamente 0,28 mg/ml de proteína em cuvetas de quartzo. O gráfico representa os valores de elipticidade (θ) em função da luz ultravioleta (far-uv) na faixa dos 190 a 250 nm de comprimento de onda.

Como mostram esses resultados a proteína $HISUBE2G2$ apresentou o conteúdo de estrutura secundária esperado para uma proteína enovelada e semelhante à estrutura do tipo α/β , segundo a desconvolução feita depois de terminada a medição do CD. Quando comparados os valores para Hélices α e Folhas β , formadoras do core típico na família E2, com a proteína scUBC7 percebe-se que são semelhantes; também o foram quando comparados com a proteína humana UBC9, ver figura 4.7:

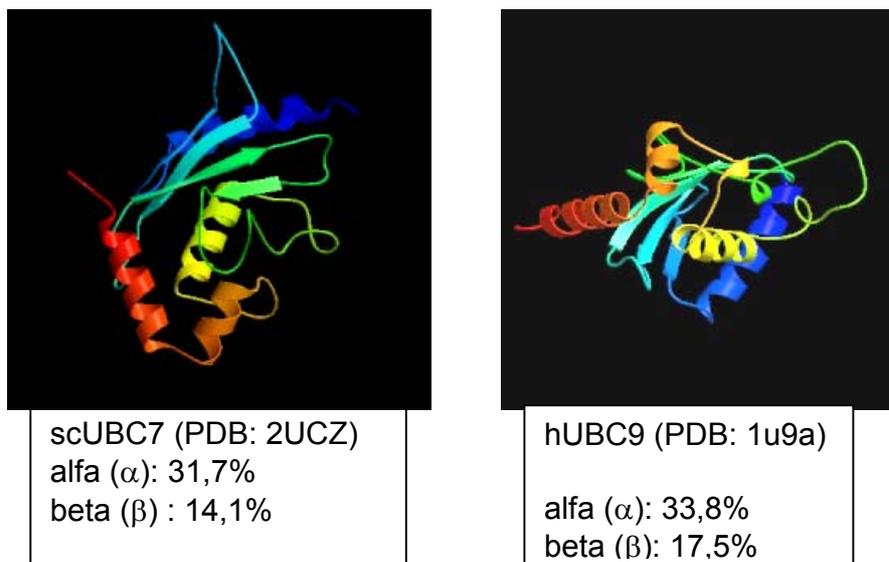


Figura 4.7: Estruturas tridimensionais de dois dos membros da família UBC, usados como referentes para a comparação com UBE2G2.

4.9 Ensaio de Pull-Down

4.9.1 Western blot de células HeLa

Antes de analisar a habilidade da proteína ube2g2 de ligar moléculas de ubiquitina (*in vitro*) a partir de um extrato de células HeLa, foi realizado o western blot dessas células usando os anticorpos monoclonais específicos anti-ub segundo descrito em 3.2.13. Depois de revelado o resultado do ensaio demonstrou que efetivamente existiam moléculas de ubiquitinas no sobrenadante celular, como se evidencia na figura 4.8 A. Isto permitiu continuar com o ensaio de Pull-Down, detalhado a continuação.

4.9.2 Pull-Down de ubiquitina-*HIS*UBE2G2

Durante este experimento foi observada a capacidade da proteína pura *HIS*UBE2G2 de ligar ou “seqüestrar” moléculas da proteína ubiquitina, *in vitro*, obtidas do estrato celular de HeLa. Uma única banda de aproximadamente 8 kDa foi detectada (Figura 4.8B-II) quando o extrato foi misturado com a proteína e incubada no tampão de reação BR, segundo descrito em 3.2.17. Quando a proteína estava ausente na mistura de reação na foi evidenciada a presença da molécula de ubiquitina, indicando que é necessária a presença da “isca” UBE2G2. Para ter certeza que os anticorpos anti-ub não estavam reconhecendo de maneira inespecifica resina de NI-TA usada para precipitar o complexo ub-ube2g2, realizou o western blot apenas com a resina aonde não houve reação alguma (figura 4.7B-III)

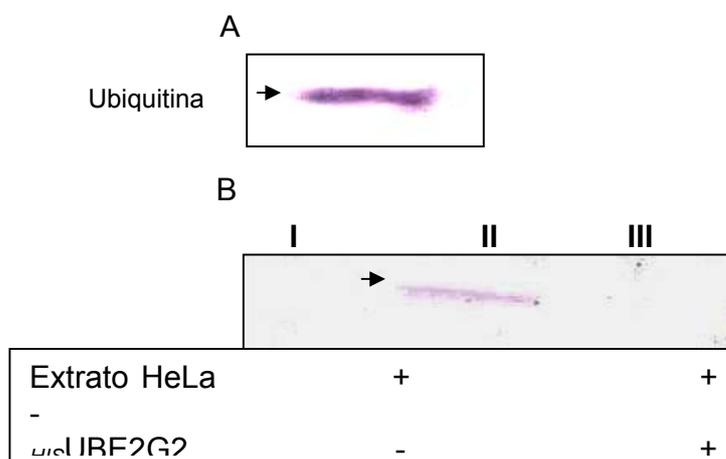


Figura 4.8. **A:** Ensaio de western blot do extrato de células HeLa, usando anti-ub, detectando a presença da molécula de 8 kDa (segundo descrito em MeM). **B:** Três ensaios independentes de pull-down revelados através do western blot com anticorpo anti-ub. **I:** Misturou-se apenas o extrato de HeLa com a resina de Ni-TA, sem a presença da isca UBE2G2; **II:** misturou-se o extrato mais a isca junto com a resina, sendo detectada a banda esperada para ubiquitina, e **III:** controle onde se misturou apenas a isca e a resina, demonstrando assim que o anti-ub não reconheceu à proteína isca, UBE2G2. A diluição do anticorpo utilizada em todos os ensaios foi de 1 μ g/ml (segundo especificado pelo fabricante)

5. Discussão Geral

A tecnologia do DNA recombinante hoje em dia é usada rotineiramente para a preparação e obtenção de proteínas para estudos estruturais através das técnicas de CD, RX, NMR, entre as mais comuns. Entre outros benefícios permitem incrementar a quantidade do produto de interesse quando comparado com outras técnicas de extração y purificação de proteínas [Derewenda, 2004].

Durante o desenvolvimento deste trabalho logrou-se isolar a fase aberta de leitura pertencente ao gene humano *ube2g2*, através da amplificação por PCR e usando como fonte de DNA, um painel de cDNA de cérebro humano. Devido a que a informação previamente publicada que indicava que este gene se achava amplamente expresso em vários tecidos humanos [Katsanis et al, 1998], a escolha deste do painel de cérebro humano foi simplesmente arbitrária. Desta maneira o isolamento da ORF-*ube2g2* possibilitou as subseqüentes reações de clonagem e subclonagem nos vetores utilizados .

A expressão da proteína UBE2G2 foi bem sucedida utilizando o vetor de expressão pET28 e a cepa de bactérias *E.coli* BL 21 (DE3). Dentre os diversos sistemas de expressão de proteínas disponíveis atualmente, o sistema bacteriano continua sendo o mais utilizado, devido principalmente aos altos níveis de expressão protéica, ao baixo custo e à possibilidade de obter resultados em um curto período de tempo e de maneira reproduzível [Sambrook et al, 2001]. E os resultados da expressão e purificação de *ube2g2* confirmaram a sua utilidade: a partir de 1 lt de cultura de células obteve-se aproximadamente 27 mg de proteína pura e solúvel, utilizando baixas concentrações do indutor IPTG (0,1 mM), curto

tempo de indução e apenas um passo de purificação por cromatografia de afinidade. A quantidade de proteína obtida nessas condições permitiu prosseguir com os passos posteriores (e mais relevantes do trabalho) que foram: a medição do espectro de dicroísmo circular (CD) para a análise estrutural, os ensaios de atividade *in vitro* (pull-down) medindo a capacidade de ligar moléculas de ubiquitina assim também com a m como a produção de anticorpos policlonais em camundongos e teste de interação proteína-proteína em leveduras.

Com a proteína *HIS*UBE2G2 purificada por cromatografia conseguiu-se analisar o conteúdo de estruturas durante a medição do espectro de dicroísmo circular. Os valores obtidos para hélices α e folhas β , permitiram inferir que o enovelamento da proteína humana estava acorde ao esperado para um membro da família E2 [Cook *et al.*, 1992, 1993, 1997; Tong *et al.*, 1997; Miura *et al.*, 2002; Houben *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2003]. É de destacar que o enovelamento (aparentemente) não foi afetado mesmo em presença de 20 aminoácidos adicionais presentes na cauda de histidinas (HIS tag), aportando mais uma evidencia ao respeito [Bucher *et al.*, 2002]. O uso deste tag não só influenciou positivamente os níveis de expressão e o rendimento geral da purificação, também apresentou uma vantagem sobre outras fusões igualmente apropriadas para obter grandes rendimentos da proteína de interesse: o fato da fusão não interferir no enovelamento da proteína permite realizar os ensaios estruturais sem a necessidade, na maioria dos casos, de clivá-la, independentemente da sua posição, N ou C-terminal, na proteína de interesse. Em favor deste fato se encontram as proteínas que cujas estruturas tridimensionais foram determinadas

mesmo em presença da cauda de histidinas, estudos recentes indicam que do 90% de estruturas cristalográficas já resolvidas, (fazendo uso da tecnologia do DNA recombinante), aproximadamente um 60% delas (onde se incluem proteínas de membrana) foi expressa e purificada usando algumas das variantes para HIS tag [Derewenda, 2004], com 100 estruturas publicadas com a cauda. E por isso que os do espectro de CD foram altamente informativos e confiáveis, sendo a primeira vez que se obtém dados estruturais para UBE2G2. E quando associados com os ensaios de atividade permitem inferir que a *HIS*UBE2G2 foi expressa na sua forma ativa, capaz de ligar moléculas de ubiquitina *in vitro*. Caso não estiver enovelada corretamente isso teria se evidenciado pela incapacidade de interagir com a ubiquitina, por um lado e um espectro de CD particular para a proteína por outro. E por isso que a clivagem do HIS tag da proteína humana não foi necessária o qual evitou a perda de tempo, material e até a função da proteína, problemas gerados como consequência dos passos adicionais que implicam, o uso de proteases específicas e a posterior separação dos produtos finais, isto é, a protease, o tag e a proteína de interesse (passo quase obrigatório quando se usam GST, Glutathione-S-Transferase ou MBP, Manose-Binding-Protein, por exemplo). Eventualmente em um futuro próximo, os dados obtidos aqui poderão ser comparados com os obtidos para a proteína em condições experimentais diferentes, como por exemplo, variando a temperatura, pH, concentração salina e mesmo após de ter clivado o HIS tag. Mas o que finalmente interessa obter é a estrutura 3D da proteína *HIS*UBE2G2, para o qual são necessárias grandes quantidades de proteína (~10 mg/ml) para os estudos de cristalização e difração

de raios X (RX). Com os resultados obtidos durante a expressão e purificação esse objetivo poderá ser atingido proximamente.

Em quanto à técnica de pull-down, aplicada neste trabalho para testar a capacidade da proteína E2 de seqüestrar e ligar moléculas de ubiquitina foi útil, rápida e de baixo custo relativo quando comparada com as metodologias rotineiramente utilizadas para mostrar a atividade de UBE2G2 (*in vitro*) o para uma nova E2. No ensaio de ubiquitinação ou Ubiquitination Assay (nome usado em publicações) geralmente a E2 expressa em bactérias em fusão com a proteína de 17 kDa GST, purificada por afinidade e logo submetida ao ensaio de pull-down (Sambrook et al 2000). Nos trabalhos já publicados com a proteína homóloga murina MmUCB7, sempre foi expressa dessa maneira [Fang et al 2001; Tiwari et al 2001; Kim et al 2003; Häkli et al 2004; Kikert et al 2004, Hassinki et al 2005]. Evidentemente o uso da proteína GST como fusão é válida para expressar e testar funcionalmente uma E2, inclusive a UBE2G2/MmUBC7. Mas também é igualmente válida a metodologia implementada no presente trabalho: expressando a proteína em fusão com a cauda de histidinas e purificá-la por cromatografia de afinidade (em colunas de níquel); E ao mesmo tempo é mais rápida e barata que a tradução *in vitro*, em um sistema livre de células [Pelhman et al, 1976] metodologia que tem um rendimento final de proteína entre 50-300 ng (segundo os sistemas comercialmente disponíveis, Promega e Ambion). Essa metodologia foi utilizada também durante ensaios realizados para testar a funcionalidade *in vitro* de MmUBC7 [Kim et al 2003], na qual a proteína e mutantes de mesma foram traduzidas em presença de aminoácidos radiativos, Metionina [MetS³⁵] e Cisteína [CysS³⁵].

Em quanto aos ensaios realizados através da técnica de Western blot conseguiu-se demonstrar que os anticorpos policlonais foram capazes de reconhecer a proteína heteróloga *HIS*UBE2G2, expressa em bactérias. Esses anticorpos foram úteis para a imunodeteção da proteína humana ligada à resina de Ni-NTA, durante o ensaio de pull-down. Mas os mesmos não foram capazes de reconhecer a proteína nativa UBE2G2 endogenamente expressa em células HeLa (ver em resultados, 4.7). Isto pode ter sido aos baixos níveis de expressão nessa linhagem tumoral e/ou a baixa afinidade dos anticorpos produzidos, lembrando que apenas 2 dos 5 soros de camundongos apresentaram imunoreactividade contra *HIS*UBE2G2. Por outro lado, quando analisou-se a presença de moléculas de ubiquitina nas células HeLa (utilizando os anticorpos comerciais anti-ub) obtiveram-se resultados positivos, o qual era de se esperar, devido que a molécula de ubiquitina é uma proteína constitutivamente expressa em todas as células eucarióticas (Hochstrasser, 1998).

Finalmente cabe destacar que paralelamente a este trabalho foram realizados outros ensaios com o gene *ube2g2*. A ORF de 495 pb foi utilizada por colegas do laboratório para realizar estudos de interação proteína-proteína *in vivo*, por meio da técnica de Duplo-Híbrido em leveduras [Osborne *et al.*, 1995]. Essa técnica tem sido muito útil quando se procura confirmar ou demonstrar a interação entre duas proteínas suspeitas. Mas quando se está analisando novas interações entre proteínas desconhecidas, como foi o caso para UBE2G2, as chances de encontrar interações falsas aumentam. Por este motivo ainda deverão ser realizados mais testes para confirmar os resultados preliminares obtidos pelos colegas. Possibilitou também, a construção de outros vetores nos quais a proteína UBE2G2

seria usada como fusão (aproveitando os ótimos níveis de expressão da proteína), para a clonagem e expressão de genes cujos produtos protéicos resultam normalmente em corpos de inclusão insolúveis. O vetor assim construído foi testado por colegas do laboratório e de outras instituições com resultados promissórios e em alguns casos sendo similares aos obtidos quando usado os vetores comerciais (pGEX, pET32, etc), que utilizam a proteína GST como fusão.

6. Conclusões

Com os resultados aqui apresentados pode se concluir que, os objetivos de trabalho propostos foram satisfatoriamente alcançados.

- Logrou-se isolar e expressar o gene humano ube2g2 em um sistema bacteriano de expressão heteróloga.
- Conseguiu-se purificar a proteína em fusão com a cauda de histidinas através da Cromatografia de Afinidade, se obtendo grandes quantidades da mesma.
- Foram produzidos anticorpos policlonais contra a proteína heteróloga, em camundongos.
- Determinou-se a capacidade de ligar moléculas de ubiquitina *in vitro*.
- A medição do espectro de CD da proteína pura permitiu demonstrar que efetivamente UBE2G2 é uma típica E2 com enovelamento α/β , comum nos membros da família.

7.Referências Bibliográficas

- BRADFORD, M. M., A (1976) Rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical -Biochemistry 72: 248-254.273, 6271–6276.
- BERNIER-VILLAMOR V, SAMPSON DA, MATUNIS MJ, LIMA CD. (2002) Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*. Feb 8; 108 (3): 345-56.
- BIEDERER, T.V.C., SOMMER, T. (1996) Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J. 15 (9): 2069-76.
- BUSCH, H. GOLDKNOPF, I.L (1977) Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 864-868.
- CHAU, V . TOBIAS, J. W., BACHMAIR, A., MARRIOT, D., ECKER, D. J., GONDA, D. K., AND VARSHAVSKY, A (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. Science 243, 1576-1583.
- CIECHANOVER, A., SCHUARTZ, A. L (2004). The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. Biochim Biophys Acta. 29; 1695(1-3): 3-17-
- COOK, W.J., MARTIN, P. D., EDWARDS, B. F. P., YAMAZAKI, R. K., CHAU, V (1997) Crystal structure of a Class I Ubiquitin Conjugatin Enzyme (UBC7) from

Saccharomyces cerevisiae at 2.9 Å Resolution. Biochemistry 36, 1621-1627.

- COOK, W. J., JEFFREY, L. C., SULLIVAN, M. L. & VIERSTRA, R. D. (1992). Three-dimensional structure of a ubiquitin-conjugating enzyme (E2). J. Biol. Chem. 267, 15116–15121.
- COOK, W. J., JEFFREY, L. C., XU, Y., CHAU, V. (1993) Tertiary structures of class I ubiquitin-conjugating enzymes are highly conserved: crystal structure of yeast Ubc4. Biochemistry. 32 (50): 13809-17.
- CORPET F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890.
- ETLINGER, J.D., AND GOLDBERG, A.L. (1977) A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 54-58.
- GOLDSTEIN, G., SCHEID, M.S., HAMMERLING, V., BOYSE, E.A., SCHLESINGER, D.H., AND NIALL, H.D. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 11-15.
- HAAS, A. L., SIEPMAN, T. J. (1997). Pathways of ubiquitin conjugation. FASEB J. 11, (14): 1257-68.
- HAKLI, M., LORICK K.L., WEISSMAN A. M., JANNE O. A., PALVIMO J. J., (2004) Transcriptional coregulator SNURF (RNF4) possesses ubiquitin E3 ligase activity. FEBS Lett. 560(1-3): 56-62.

- HASSINK, G., KIKKERT, M., VAN VOORDEN, S., LEE, S., SPAAPEN R., VAN LAAR, T., COLEMAN, C.S., BARTEE, E., FRÜH, K., CHAU, V., WIERTZ, E., TEB4 is a C4HC3 RING finger-containing ubiquitin ligase of the endoplasmic reticulum Biochemical Journal Immediate Publication. Published on 27 Jan 2005 as manuscript BJ20041241.
- HATAKEYAMA, S . NAKAYAMA, K (2003) Ubiquitylation as a Quality Control System for Intracellular Proteins. J Biochem; 134: 1-8.
- HATTORI, M., FUJIYAMA, A., TAYLOR, T.D., WATANABE, H., YADA, T., PARK, H.S., TOYODA, A., ISHII, K., TOTOKI, Y., CHOI DK, SOEDA E, OHKI M, TAKAGI T, SAKAKI Y, TAUDIEN S, BLECHSCHMIDT K, POLLEY A, MENZEL U, DELABAR J, KUMPF K, LEHMANN R, PATTERSON D, REICHWALD K, RUMP A, SCHILLHABEL M, SCHUDY A, ZIMMERMANN W, ROSENTHAL A, KUDOH J, SHIBUYA K, KAWASAKI K, ASAKAWA S, SHINTANI A, SASAKI T, NAGAMINE K, MITSUYAMA S, ANTONARAKIS SE, MINOSHIMA S, SHIMIZU N, NORDSIEK G, HORNISCHER K, BRANDT P, SCHARFE M, SCHON O, DESARIO A, REICHEL T, KAUFER G, BLOCKER H, RAMSER J, BECK A, KLAGES S, HENNIG S, RIESSELMANN L, DAGAND E, HAAF T, WEHRMEYER S, BORZYM K, GARDINER K, NIZETIC D, FRANCIS F, LEHRACH H, REINHARDT R, YASPO ML. The DNA sequence of human chromosome 21 (2000). Nature. 405: (6784) 311-319.
- HERSHKO, A., HELLER, H., S., CIECHANOVER, A. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. J Biol Chem. 258 (13): 8206-14
- HOCHSTRASSER, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. Annu. Rev. Genet. 30, 405–40.

- HOUBEN, K., DOMINGUEZ, C., VAN SCHAİK, F. M., TIMMERS H. T., BONVIN A. M., BOELEN, R. (2004) Solution structure of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubch5B. J Mol Biol. 19; 344(2): 513-26.
- JUNGSMANN, J., REINS, H., JENTSCH, S. (1993) Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. Nature 361, 369-371.
- KAELIN, W.G., JR., PALLAS, D.D., DECAPRIO, J.A., KAYE, F.J. AND LIVINGSTON, D.M. (1991). Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. Cell 64, 521-532.
- KATSANIS, N., FISHER, E.M.C., (1998) Identification, Expression, and Chromosomal Localization of Ubiquitin Conjugating Enzyme 7 (*UBE2G2*), a Human Homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* *UBE2G2* Gene Genomics 51, 128-131.
- KIKKERT, M., DOOLMAN, R., DAI, M., AVNER, R., HASSINK, G., VAN VOORDEN S., THANEDAR, S., ROITELMAN, J., CHAU, V., WIERTZ, E., (2004) Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 279(5): 3525-34.
- KIM, B. W., ZAVACKI, A. M., CURCIO-MORELLI, C., DENTICE, M., HARNEY, J. W., LARSEN, P. R., BIANCO, A. C., (2003) Endoplasmic reticulum-associated degradation of the human type 2-iodothyronine deiodinase (D2) is mediated via an association between mammalian UBC7 and the carboxyl region of D2. Mol Endocrinol. 17(12): 2603-12.
- LIU, Q., SHANG, F., GUO, W., HOBBS, M., VALVERDE, P., REDDY, V., TAYLOR, A., (2004) Regulation of the ubiquitin proteasome pathway in human lens epithelial cells during the cell cycle. Exp Eye Res. 78(2): 197-205.

- MATUSCHEWSKI, K., HAUSER, H. P., TREIER, M.; JENTSCH, S. (1996). Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions. J. Biol. Chem. 271: 2789-2794.
- MIURA, T., KLAUS, W., ROSS, A., GÜNTERT, P. & SENN, H. (2002). The NMR structure of the class I human ubiquitin-conjugating enzyme 2b. J. Biomol. NMR, 22, 89–92.
- OSBORNE M., DALTON S. KOCHAN J.P .1995 the yeast two hybrid system: genetic detection. Biotechnology 13: 1474-1478.
- PELHAM HRB, JACKSON RJ An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur J Biochem. 1976 Aug 1; 67(1):247-56.
- PICKART, C. M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. Annu Rev Biochem. -70, 503-33.
- ROSE, S. A., LEEK J. P., MOYNIHAN, T. P., ARDLEY H. C., MARKHAM AF, ROBINSON P. A. (1998) Assignment of the ubiquitin conjugating enzyme gene, UBE2G2, to human chromosome band 21q22.3 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet. ; 83(1-2): 98-9.
- SAMBROOK, J. AND RUSSELL, D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Edition. Chapter 18: Protein Interaction Technologies, Protocol #3: Detection of Protein-Protein Interactions using the GST Fusion Protein Pull-Down Technique.
- SAMBROOK, J. AND RUSSELL, D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press: Plainview, NY.

- SIEPMANN, T. J., BOHNSACK, R. N., TOKGO, Z., BABOSHINA, O. V., HAAS, A. L. (2003) Protein Interactions within the N-end Rule Ubiquitin Ligation Pathway, J Biol Chem, Vol. 278,14, pp. 9448–9457.
- SOUTOGLOU, E., KATRAKILI, N. AND TALIANIDIS, I. (2000). Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. Mol. Cell 5, 745-751.
- SPENCE J, GALI RR, DITTMAR G, SHERMAN F, (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. Cell 102:67–76.
- SREERAMA, N., WOODY, R.W, (1993). A self-consistent method for the analysis of proteins secondary structure form circular dichroism, Anal. Biochem. 209 32–44.
- TIWARI, S., AND WEISSMAN, M,. (2001) Endoplasmic Reticulumun (ER)-associated Degradation of T Cell Receptor Subunits, Involvement of ER-associated Ubiquitin-conjugating Enzymes (E2s). J Biol Chem 276, 16913-16200.
- TONG H, HATEBOER G, PERRAKIS A, BERNARDS R, SIXMA TK. (1997) Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system. J Biol Chem 272 (34): 21381-7.
- TONG, H., HATEBOER, G., PERRAKIS, A., BERNARDS, R. & SIXMA, T. K. (1997). Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system. J. Biol. Chem. 272, 21381–21387.
- WARD, C.L., OMURA, S., AND KOPITO, R.R. (1995) Degradation of CFTR by the-COOK,W. J., MARTIN, P. D., EDWARDS, B. F. P., YAMAZAKI,R. K. & CHAU, V. (1997). Crystal structure of a class I ubiquitin conjugating enzyme

(Ubc7) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.9 angstroms resolution. Biochemistry, 36, 1621–1627.

- WEBSTER, J. M., TIWARI, S., WEISSMAN, A. M., WOJCIKIEWICZ R.J. H. (2003) Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Ubiquitination Is Mediated by Mammalian UBC7, a component of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway, and is Inhibited by Chelation of Intracellular Zn²⁺ J. Biol. Chem. 278: 38238 - 38246.
- WEISSMAN, A. M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol. 3,169-78.
- WORTHYLAKE, D. K., PRAKASH, S., PRAKASH, L. & HILL, C. P.(1998). Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 at 2.6 Å resolution.J. Biol. Chem. 13;273(11):6271-6.
- WU, P. Y, HANLON, M., EDDINS, M., TSUI, C., ROGERSM, R. S, JENSEN, J. P., MATUNIS M. J., WEISMAN, A. M., WOLBERGER, C. P, PICKART, C. M. (2004) A conserved catalytic residue in the ubiquitin-conjugating enzyme family. EMBO J.; 23(24): 4876.
- YAMAZAKY, R. K., CHAU, V (1996) Bacterial Expression of the *Saccharomyces cereviae* Ubiquitin-Conjugating Enzyme UBC7. Protein Express Purif. 7, 122-127.