

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANE PAGNO DE SOUZA BUENO

EXPRESSÃO E ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DEUBIQUITINASE
USP2A RECOMBINANTE

CURITIBA

2024

MARIANE PAGNO DE SOUZA BUENO

EXPRESSÃO E ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DEUBIQUITINASE
USP2A RECOMBINANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, no Setor de Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Bueno, Mariane Pagno de Souza

Expressão e análise de atividade enzimática da deubiquitinase
USP2A recombinante / Mariane Pagno de Souza Bueno. –
Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata.

1. Enzimas desubiquitinantes. 2. Proteínas recombinantes. 3.
USP2a. 4. UBA52. I. Zanata, Silvio Marques, 1974-. II.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIANE PAGNO DE SOUZA BUENO** intitulada: **EXPRESSÃO E ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DEUBIQUITINASE USP2A RECOMBINANTE**, sob orientação do Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

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

CURITIBA, 02 de Fevereiro de 2024.

Assinatura Eletrônica

14/02/2024 14:36:33.0

SILVIO MARQUES ZANATA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

15/02/2024 14:55:47.0

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/02/2024 07:22:26.0

LUIZA HELENA GREMSKI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 336236

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 336236

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a CAPES e CAPES-PROEX por permitirem a realização desse trabalho através da concessão de bolsa de mestrado e taxa de bancada, assim como outras agências de fomento como CNPq e Fundação Araucária, também responsáveis por garantirem os recursos necessários para a execução desse estudo. Gostaria também de deixar meu agradecimento ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, por todo auxílio administrativo e de ensino, qual estendo para todos os docentes que fizeram parte dessa minha etapa de formação.

Agradeço ao Prof. Dr. Silvio Marques Zanata por abrir as portas do seu grupo de pesquisa para mim e todo conhecimento que adquiri durante os dois anos que fiz parte do Laboratório de Neurobiologia.

Gostaria de agradecer também os meus colegas de laboratório, tanto os do meu grupo, o Laboratório de Neurobiologia, quanto do Laboratório Redoxoma e Laboratório de Imunologia Comparada, em especial à Soraia, Leonardo e Lucía, que constantemente tiraram um tempo seu tanto para me auxiliar nos meus experimentos quanto para conversas e conselhos. Agradeço também aos alunos de PVA e iniciação científica, principalmente as minhas pupilas Carol e Lalita, por toda ajuda durante a execução desse trabalho.

Agora gostaria de fazer um agradecimento muito mais que especial à minha parceira, minha subunidade, minha amiga Julia. Entrar nessa jornada contigo nos rendeu muito choro juntas, mas também muita risada. Obrigada por todos os dias que ficou até bem mais tarde comigo para não me deixar sozinha, por cada abraço e apoio, e principalmente por vibrar tanto quanto eu quando nossos experimentos davam certo. Você foi muito essencial para que eu hoje pudesse finalizar essa etapa, seja por tudo que me ensinou quando cheguei sabendo absolutamente nada de cultura de bactéria, ou por me escutar e me ajudar a solucionar meus problemas durante esses dois anos. Eu vou sentir muita, mas muita falta de trabalhar contigo!

Gostaria de agradecer à minha família, que durante esse período entendeu cada reunião de família que não pude estar, cada feriado ou final de semana que precisei me dedicar ao meu trabalho. Mas também a todo incentivo, apoio e conselho, desde o momento que pude deixar meu trabalho para me dedicar à prova de seleção de mestrado, quanto durante esses dois últimos anos. Vocês e todo o apoio que recebi nesses anos foi essencial para que eu conseguisse permanecer centrada nos meus objetivos, foi difícil, porém conseguimos.

Agradeço também aos meus amigos, que atuaram me dando apoio, conselhos e carinho, vocês também foram de extrema importância para que eu executasse esse trabalho. Gostaria de agradecer também à minha namorada Alexia, mesmo antes de namorarmos sua companhia alegre e divertida deixou toda minha rotina mais fácil e leve, e agora, todo seu amor, carinho e suporte nesses últimos meses foram essenciais para a finalização do meu trabalho. Eu amo todos vocês demais e essa é uma conquista que compartilhamos.

Por fim, gostaria de agradecer à banca examinadora, Prof. Dr. Marcelo Muller, Prof^a Dr^a Luiza Gremski, e Prof^a Dr^a Edileusa Gerhardt, por prontamente se disponibilizarem em ler e compartilhar suas considerações sobre meu trabalho.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Neste estudo foi realizada a expressão da forma completa e ativa da proteína USP2a e avaliado sua atividade enzimática perante diferentes substratos. A enzima deubiquitinase USP2a está envolvida com diversos processos celulares, e defeitos em sua expressão estão presentes em diversas patologias, como o hepatocarcinoma e câncer de próstata, sendo vista como um possível alvo terapêutico. Entretanto, até o momento, nenhum inibidor seletivo dessa proteína é conhecido. Uma das alternativas para a busca de inibidores está na possibilidade em realizar a varredura de biblioteca de compostos através de ensaios em larga escala, onde diversos compostos podem ser testados simultaneamente. Para a realização desses testes de inibição, torna-se imperativa a obtenção da USP2a purificada e com retenção da sua atividade enzimática. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a expressão da proteína USP2a recombinante em sistema heterólogo bacteriano e análise de sua atividade. Assim, purificou-se a USP2a e o seu substrato UBA52 após cultura e expressão na cepa BL21(DE3) de *E. coli*, sendo realizados ensaios de deubiquitinação para testar a atividade da deubiquitinase. Foi visto que a USP2a expressa é enzimaticamente ativa, potencialmente capaz de degradar seu substrato conhecido, o precursor de ubiquitina UBA52. Ademais, ensaios preliminares mostraram a ação dessa enzima em outros dois precursores, UBA80 e HsUBB. Concomitantemente, foi validado o uso da USP2a recombinante no ensaio de clivagem da Ub-Rhod110-G, um substrato fluorescente de deubiquitinases que emite fluorescência quando clivado. Essa metodologia pode ser utilizada em microplacas para a varredura de bibliotecas de compostos. Com a realização desse trabalho, foi possível obter a USP2a recombinante enzimaticamente ativa, bem como a validação de seu uso em um ensaio para varredura em larga escala, possibilitando, a partir dele, a busca de inibidores seletivos da USP2a.

Palavras-chave: Deubiquitinases; USP2a; UBA52.

ABSTRACT

In this study, the active full length form of the USP2a protein was expressed and its enzymatic activity against different substrates was evaluated. The deubiquitinase enzyme USP2a is involved in several cellular processes, and defects in its expression is present in a variety of pathologies, such as hepatocellular carcinoma and prostate cancer, being seen as a possible therapeutic target. However, to date, no selective inhibitor of this protein is known. One of the alternatives for searching for inhibitors is the possibility of screening the compound library through high-throughput assays, where several compounds can be tested simultaneously. To carry out these inhibition tests, it's imperative to obtain purified USP2a and retain its enzymatic activity. Therefore, the objective of this work was the expression of the recombinant USP2a protein in a heterologous bacterial system and analysis of its activity. Thus, USP2a and its substrate UBA52 were purified after culture and expression in the BL21(DE3) strain of *E. coli*, and deubiquitination assays were performed to test the deubiquitinase activity. USP2a was found to enzymatically active, potentially capable of degrading its known substrate, the ubiquitin precursor UBA52. Furthermore, preliminary tests demonstrated the action of this enzyme on two other precursors, UBA80 and HsUBB. Concomitantly, the use of recombinant USP2a was validated in the Ub-Rhod110-G cleavage assay, a fluorescent substrate of deubiquitinases that emits fluorescence when cleaved. This methodology can be used on microplates to scan compound libraries. With this work, it was possible to obtain enzymatically active recombinant USP2a, as well as validating its use in a high-throughput screening assay, enabling the search for selective USP2a inhibitors.

Keywords: Deubiquitinases; USP2a; UBA52.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cascata da ubiquitinação mediada pelas enzimas E1, E2 e E3.	18
Figura 2 - Efeitos promotores e supressores tumorais de DUBs.....	22
Figura 3 - USP2a recombinante é expressa em sistema heterólogo de <i>E. coli</i>	37
Figura 4 - USP2a encontra-se majoritariamente na fração insolúvel.	38
Figura 5 – Diminuição da formação de corpos de inclusão na expressão de USP2a em temperaturas baixas.	39
Figura 6 - A proteína UBA52 é expressa em sistema heterólogo de <i>E. coli</i>	44
Figura 7 - UBA52 recombinante em condições nativas não é purificada satisfatoriamente em sistema Ni-NTA.	45
Figura 8 - UBA52 recombinante não é purificada de maneira satisfatória por coluna de Ni-NTA.....	48
Figura 9 - UBA52 é purificada com alta concentração de proteínas contaminantes.	49
Figura 10 - USP2a recombinante tem atividade enzimática.....	50
Figura 11 - USP2a tem atividade em diferentes precursores de ubiquitina.....	51
Figura 12 – Deubiquitinação de precursores de ubiquitina por extratos de 293T.....	53
Figura 13 – Clivagem de Ub-Rhod110-G pela USP2a.	55
Figura 14 - Clivagem de Ub-Rhod110-G ao longo de 60 minutos pela USP2a.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Volumes utilizados no preparo de inóculos para amplificação de plasmídeo.....	28
Tabela 2: Concentração de proteína purificada obtida após expressão em larga escala.....	42
Tabela 3: Concentração de proteína obtida após purificação em Ni-NTA em condições nativas e desnaturantes.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Via lisossomo-autofágica
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina soro bovina
D.O.	Densidade Óptica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DUBs	Enzimas deubiquitinases
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Enzima ativadora de ubiquitina E1
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina E2
E3	Enzima E3-ligase
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FASN	Enzima ácido-graxo sintase
HSR	Resposta ao choque térmico
IMAC	Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
IPTG	Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo
JAMM	Família de proteases Jab1/Mov34/MPN ⁺ com metaloenzimas
MDM2	Murine double minute 2
Meio LB	Meio Luria Bertani
MINDY	Família DUB com motivo de interação com ubiquitina
MJDs	Família de proteases da doença Machado-Joseph
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator nuclear kappa B

Ni-NTA	Níquel agarose
OTUs	Proteases de tumor ovariano
PBS	Tampão salino-fosfato
PEI	Polietilenonimina
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
PQC	Controle de qualidade proteica
PTM	Modificações pós-traducionais
RIPA-CoIP	Tampão de coimunoprecipitação
SDS-PAGE desnaturantes	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições
TBST	Tampão tris salino com Tween 20
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
UB-Rhod110-G	Ubiquitina-rodamina110-glicina
UCHs	Hidrolases C-terminal de ubiquitinas
UPR ^{ER}	Resposta do retículo endoplasmático a proteínas mal dobradas
UPR ^{mt}	Resposta mitocondrial a proteínas mal dobradas
UPS	Sistema ubiquitina proteassomo
USPs	Proteases específicas de ubiquitina
UV	Luz ultravioleta
ZUP1	Peptidases de ubiquitina com dedo de zinco

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	14
1.2	JUSTIFICATIVA.....	15
1.3	OBJETIVOS.....	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	PROTEOSTASE CELULAR.....	16
2.2	UBIQUITINAÇÃO.....	17
2.2.1	Enzimas Deubiquitinases (DUBs).....	20
2.2.2	Proteases Específicas De Ubiquitina 2 (USP2).....	22
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS.....	26
3.2	MEIOS BACTERIANOS.....	26
3.3	GERAÇÃO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES.....	27
3.4	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	27
3.5	AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	28
3.6	EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	28
3.6.1	pET28a-USP2a.....	29
3.6.2	pET23a-UBA52.....	29
3.7	LISE BACTERIANA.....	30
3.7.1	Separação de Frações Solúveis e Insolúveis.....	30
3.8	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	31
3.9	DIÁLISE.....	31
3.10	CULTURA CELULAR.....	32
3.11	TRANSFEÇÃO.....	32
3.12	LISE CELULAR.....	33
3.13	DEUBIQUITINAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	33
3.14	DEUBIQUITINAÇÃO EM PLACA.....	34
3.15	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	34
3.16	IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS.....	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	EXPRESSÃO DA DEUBIQUITINASE USP2a RECOMBINANTE.....	36
4.1.1	Expressão da proteína USP2a em pequena escala.....	36
4.1.2	Diferenciação de Frações Solúveis e Insolúveis.....	37
4.1.3	Purificação de USP2a Recombinante.....	40
4.2	EXPRESSÃO DE UBA52 RECOMBINANTE.....	42

4.2.1	Otimização da expressão da proteína UBA52.....	43
4.2.2	Purificação de UBA52 Recombinante	45
4.3	CLIVAGEM DE UBA52 PELA USP2A RECOMBINANTE.....	49
4.4	ATIVIDADE DE USP2A SOBRE OUTROS PRECURSORES DE UBIQUITINA.....	51
4.5	ATIVIDADE DEUBIQUITINASE DE CÉLULAS SUPEREXPRESSANDO USP2	52
4.6	VERIFICAÇÃO DA POTENCIALIDADE DE USO DA USP2A RECOMBINANTE EM ENSAIO DE CLIVAGEM DA UB-RHOD110-G.....	54
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) desempenha nas células a função de degradar proteínas que não são mais necessárias ou que apresentam um enovelamento incorreto, sendo um processo essencial na manutenção da proteostase celular (WILSON et al., 2023). Para essa degradação ocorrer, primeiramente a proteína a ser degradada precisa passar pelo processo de ubiquitinação, onde uma ou mais ubiquitinas são ligadas a cadeia polipeptídica dessa proteína, para então ser reconhecida pelo proteassomo e degradada (KOMANDER, 2009). Desordens nesse processo estão relacionadas com diversas patologias, tendo uma grande importância principalmente na patogênese de doenças neurodegenerativas devido ao acúmulo de proteínas mal enoveladas e agregados tóxicos (THOMPSON; DE-SOUZA, 2023).

A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional onde ubiquitinas são ligadas a resíduos de lisina de outras proteínas (KOMANDER, 2009). Essa ligação ocorre através da reação em cadeia das enzimas E1, E2 e E3, resultando em diferentes padrões de ligação, onde as proteínas alvo podem ser monoubiquitinadas, multiubiquitinadas ou poliubiquitinadas. Essa disposição é a responsável por garantir diferentes “códigos de ubiquitina” o que sinaliza para diferentes processos celulares (GAO et al., 2023). Entretanto, para ocorrer, essa modificação necessita da disponibilidade de ubiquitinas monoméricas, o que é garantido por outro grupo de enzimas, as deubiquitinases (LI; LI; WU, 2022).

As deubiquitinases são enzimas que realizam a hidrólise da ligação entre ubiquitinas a outras ubiquitinas ou a proteínas marcadas, liberando a partir desta catálise a proteína ubiquitina monomérica. Essas proteínas então são responsáveis pela edição da ubiquitinação, reciclagem de monômeros de ubiquitinas de proteínas que serão degradadas pelo proteassomo, clivagem de precursores para liberação de ubiquitinas nas células, além de retirar proteínas da via de degradação (FANG et al., 2023; LI; LI; WU, 2022).

As proteases específicas de ubiquitina (USPs) são a maior família de deubiquitinases descritas e estão relacionadas com funções biológicas como o

controle do ciclo celular, reparo de DNA e resposta imune, e sua expressão aberrante está descrita em diversas patologias (GAO et al., 2023; GUO et al., 2023; KITAMURA, 2023; SHEN et al., 2023). Pertencente a esta família de deubiquitinases, a USP2a, uma isoforma da USP2, está associada a diversas neoplasias, onde sua expressão aumentada leva a um aumento da proliferação, agressividade e invasão (GUO et al., 2023; ZHANG et al., 2023).

1.2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a relação da USP2a com diversas patologias, sua potencialidade como alvo terapêutico, e a falta de inibidores seletivos a essa proteína, mostra-se relevante a busca de compostos capazes de inibir esta deubiquitinase. Uma possível abordagem para realizar essa busca de forma rápida e prática é através da varredura de biblioteca de compostos, por meio de ensaios de varredura em larga escala, onde diversos compostos podem ser testados simultaneamente. Entretanto, para isso, é necessário que se tenha a proteína enzimaticamente ativa, permitindo a avaliação da inibição de sua atividade.

1.3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a expressão da proteína USP2a recombinante e a avaliação da sua atividade enzimática. Os objetivos específicos foram: (1) expressão e purificação da deubiquitinase USP2a em *Escherichia coli*; (2) expressão e purificação do precursor de ubiquitina UBA52; (3) avaliação da atividade da USP2a recombinante a partir da clivagem de UBA52; e (4) verificação da potencialidade de uso da USP2a recombinante em ensaio de clivagem da Ub-Rhod110-G em microplacas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROTEOSTASE CELULAR

Para garantir que os organismos tenham as adaptações necessárias de acordo com diferentes ambientes ou situações de estresse celular, é essencial o correto funcionamento do sistema de homeostase proteica, também chamado de proteostase. A proteostase é o nome de uma série de eventos celulares que garantem a síntese de proteínas, seu correto enovelamento e modificações pós-traducionais (PTM), além de seu endereçamento e degradação (TSENG et al., 2023). O equilíbrio desses processos, garantindo um balanço entre os processos anabólicos e catabólicos, é necessário para garantir o correto funcionamento das células, onde distúrbios nas diferentes etapas da proteostase podem afetar a integridade de diferentes tecidos (PAEZ; PITZER; ALWAY, 2023).

A capacidade das células em degradarem proteínas não mais necessárias, que tiveram problemas em sua síntese ou enovelamento é essencial para manter o seu funcionamento íntegro, evitando a disfunção de organelas e a degeneração celular. Além disso, manter a síntese proteica em taxas que permitam o correto enovelamento e garanta a substituição de proteínas degradadas viabiliza a homeostase dessa célula (PAEZ; PITZER; ALWAY, 2023). Defeitos nesses processos de proteostase são fortemente relacionados com diversas patologias, com um papel essencial na patogenia de doenças neurodegenerativas devido ao acúmulo de proteínas mal enoveladas e agregados tóxicos (THOMPSON; DE-SOUZA, 2023).

As células utilizam de diversos processos para garantir que a proteostase seja mantida, a presença de mecanismos relacionados ao controle de qualidade proteico é essencial para monitorar as células e garantir o redirecionamento de proteínas mal dobradas. Dentre as formas de garantir esse controle de qualidade, a resposta ao choque térmico (HSR), resposta mitocondrial a proteínas mal dobradas (UPR^{mt}), e resposta do retículo endoplasmático a proteínas mal dobradas (UPR^{ER}) são mecanismos descritos na literatura. Ao ser detectado o acúmulo de proteínas mal dobradas, esses processos de resposta ao estresse celular são ativados, garantindo

a expressão de chaperonas específicas que atuam melhorando a eficácia de dobramento dessas proteínas (THOMPSON; DE-SOUZA, 2023).

Proteínas mal dobradas devem ser encaminhadas para sua degradação, qual pode acontecer com auxílio de chaperonas ou não, através da via lisossomo-autofágica (ALP) ou do sistema ubiquitina-proteassomo (UPS), falhas nesses mecanismos levam a um acúmulo dessas proteínas, quais podem formar agregados tóxicos para a célula (LIM; NAHM; KIM, 2023; TSENG et al., 2023). No sistema UPS proteínas marcadas por ubiquitinas são degradadas através do seu encaminhamento ao proteassomo, já o ALP é responsável por eliminar agregados proteicos e organelas defeituosas através de seu englobamento pelo autofagossomo (WILSON et al., 2023).

Wilson e colaboradores (2023) publicaram um trabalho intitulado “*Hallmarks of neurodegenerative diseases*” onde trouxeram a discussão de oito eventos essenciais para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, em referência ao aclamado trabalho de Hanahan & Weinberg que revolucionou o estudo do câncer com a definição dos seis principais marcadores do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; WILSON et al., 2023). Segundo este trabalho, dois dos principais responsáveis pelo desenvolvimento dessas doenças são a agregação patológica de proteínas e a proteostase aberrante, mostrando a importância de processos de renovação proteica no contexto dessas patologias, afetando milhões de pessoas ao redor do mundo (WILSON et al., 2023).

2.2 UBIQUITINAÇÃO

No início dos anos 80 o processo de ubiquitinação foi caracterizado como uma modificação pós-traducional onde proteínas eucarióticas tinham alguns de seus resíduos de lisina formando uma ligação isopeptídica com uma pequena proteína, a ubiquitina (KOMANDER, 2009). Hoje o entendimento sobre esse processo cresceu significativamente, sabe-se que não apenas resíduos de lisina são ubiquitinados, apesar desses representarem a maioria dos casos, podendo ocorrer também no primeiro aminoácido N-terminal de uma proteína (Met¹), assim como cadeias laterais de cisteína, serina e treonina (CARROLL; MARQUSEE, 2022).

A ubiquitina é uma pequena proteína regulatória conservada formada por 76 resíduos de aminoácidos e aproximadamente 8,6 kDa (CARROLL; MARQUSEE, 2022; LIANG; ZHANG; WANG, 2023). Sua regulação está associada à sua anexação, através de uma ligação isopeptídica reversível, às proteínas que necessitam passar por algum tipo de modificação ou regulação pós-traducional (GAO et al., 2023). Para que esse processo aconteça, é necessário a participação de três diferentes grupos de proteínas: as enzimas ativadoras de ubiquitina E1, as enzimas conjugadoras de ubiquitina E2, e as E3-ligases. As reações em cadeia para ubiquitinar resíduos de proteínas são iniciadas pela ligação do grupo carboxila de um resíduo de glicina da ubiquitina monomérica ao grupo sulfidril de uma cisteína da enzima E1, com gasto de ATP. A enzima E2 realiza uma transesterificação da ubiquitina ligada à E1 para um resíduo seu de cisteína, podendo então ser transferida à proteína com auxílio da ligase E3 (Figura 1) (GAO et al., 2023).

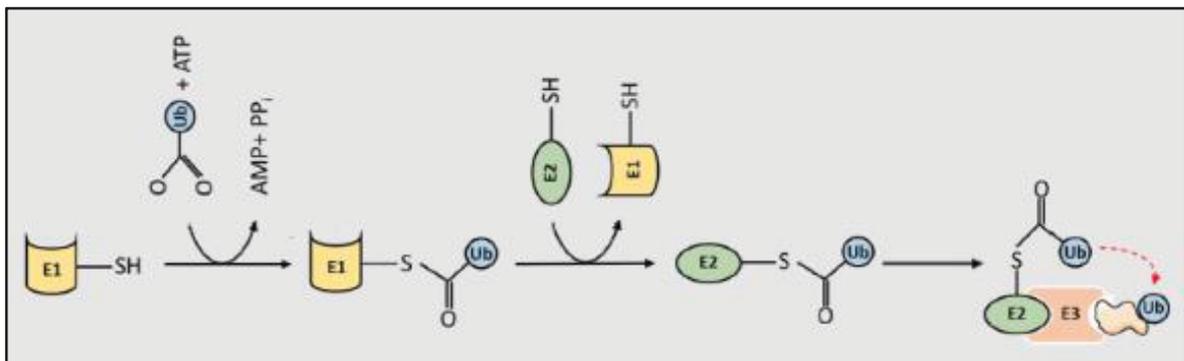


Figura 1 - Cascata da ubiquitinação mediada pelas enzimas E1, E2 e E3. A ubiquitina ligada a E1 através do consumo de ATP é transferida por uma reação de transesterificação para a enzima E2, e posteriormente com ajuda da enzima E3 a ubiquitina é ligada a proteína alvo. Fonte: GAO et al., 2023.

As proteínas podem ser monoubiquitinadas, com apenas uma ubiquitina ligada a um resíduo de lisina, multiubiquitinadas, com diversos resíduos de lisina ubiquitinados, ou poliubiquitinada, onde são formadas cadeias com diversas ubiquitinas ligadas umas as outras através de um dos sete resíduos de lisina presentes na ubiquitina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63) ou da sua metionina N-terminal (Met¹) (GAO et al., 2023; LIANG; ZHANG; WANG, 2023). A disposição das cadeias de ubiquitinas são responsáveis pelo “código da ubiquitina”, determinando qual será o destino do substrato proteico (GAO et al., 2023).

Cadeias de poliubiquitinas K48 e K63 são as mais comuns nas células, atuando em diferentes funções (LIANG; ZHANG; WANG, 2023). As cadeias ligadas por Lys⁴⁸ (K48) são as responsáveis por direcionar as proteínas à degradação proteossomal, onde são necessários minimamente tetrâmeros de ubiquitinas para que haja o reconhecimento pelo proteassoma 26S. Em questão de minutos da anexação das ubiquitinas, o substrato proteico é degradado e as ubiquitinas recicladas por enzimas deubiquitinases presentes no proteassoma 26S. Cadeias de ubiquitinas ligadas por Lys¹¹ (K11) também mostraram estar relacionadas com a via de degradação, porém esse mecanismo é menos descrito na literatura (KOMANDER, 2009). Já os polímeros Lys⁶³ (K63) tem, cada vez mais, seus papéis não relacionados à degradação descritos, atuando na endocitose, resposta a danos no DNA e na sinalização celular (KOMANDER, 2009). Os polímeros K63 são essenciais na ativação de NF- κ B após a sinalização de citosinas celulares, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), participando assim das respostas inflamatórias (KOMANDER, 2009; LIANG; ZHANG; WANG, 2023).

Tanto o sistema ubiquitina-proteassomo quanto a autofagia, processo responsável pela eliminação de proteínas danificadas, patógenos e agregados dentro das células, são considerados sistemas de controle de qualidade proteica (PQC), existindo diversas evidências na literatura da conexão entre esses dois processos (LI; LI; WU, 2022). A forma como esses dois sistemas interagem ainda são investigados, existindo tanto a hipótese desse processo ser inativado pelo UPS, quanto desses mecanismos se complementarem, tendo como resultado a degradação proteica (JEE; CHEONG, 2023). Essa ambiguidade da ubiquitinação no processo autofágico pode ser explicada pela forma diferencial que os monômeros de ubiquitina são ligados nas proteínas envolvidas na autofagia, onde estudos indicam que polímeros de ubiquitina K48 leva à degradação dessas proteínas, enquanto polímeros K63 resultam na ativação de genes relacionados a autofagia (ATG) (CEN; LI; CHEN, 2023).

Além da sua importância nos processos autofágicos, as E3-ligases regulam a estabilidade de oncogenes e supressores tumorais, podendo afetar o ciclo celular, e como consequência, favorecer a formação e manutenção tumores, o que está relacionado a um pior prognóstico para pacientes acometidos por neoplasias (POPOVIC; VUCIC; DIKIC, 2014). Ainda, diversos estudos trazem a desregulação da ubiquitinação linear, quando os monômeros de ubiquitina fazem ligação Met¹, como

responsável pelo desenvolvimento e progressão de tumores, através do suporte da sinalização aberrante por oncogenes (LI; LIU; LI, 2023). No contexto de doenças neurodegenerativas, a perda estrutural e funcional de neurônios muitas vezes está acompanhada de acúmulo de agregados proteicos e formação de corpos de inclusão ubiquitina-positivos. Devido seus efeitos na proteostase celular, falhas no UPS resultam no acúmulo de proteínas mal dobradas, levando a um aumento de agregados tóxicos e progressão dessas doenças (SATO et al., 2023).

Para ocorrer, a ubiquitinação depende da disponibilidade de ubiquitina monomérica, qual pode ser garantida principalmente através de enzimas deubiquitinases (DUBs) que podem reciclar ubiquitinas de proteínas que foram encaminhadas para a degradação pelo proteassoma, ou também clivar essas proteínas após a sua síntese pelos genes *UbC*, *UbB*, *UbA52* e *UbA80* (LI; LI; WU, 2022). A ubiquitina é muito estável e não sofre mudanças estruturais em situações de estresse celular e pode ser sintetizada em cadeias poliubiquitinas ligadas uma à outra por Met¹ (*UbC* e *UbB*), ou através dos genes *UbA52* e *UbA80* que codificam para proteínas ribossomais, respectivamente a L40 e S27A, fusionadas a extremidade C-terminal de um monômero de ubiquitina (GROU et al., 2015; LI; LI; WU, 2022). Os quatro genes codificam para precursores de ubiquitina e necessitam de processamento por DUBs, e só assim tornam-se disponíveis para serem utilizados na ubiquitinação de outras proteínas. Apesar da vastidão de deubiquitinases atualmente identificadas, ainda há poucos registros de quais podem realizar o processamento desses precursores, sendo objeto de investigação de diversos pesquisadores ao redor do mundo (GROU et al., 2015).

2.2.1 Enzimas Deubiquitinases (DUBs)

A marcação de proteínas com ubiquitina pode ser revertida ou editada através da ação de enzimas deubiquitinases, que são capazes de clivar a ligação peptídica ou isopeptídica entre ubiquitinas ou até mesmo entre ubiquitina e proteína, podendo tirá-la do encaminhamento à degradação proteassomal (FANG et al., 2023). As DUBs apresentam função oposta às E3-ligases, onde o equilíbrio entre esses dois tipos de enzimas garante a proteostase celular (LI; REVERTER, 2021). O genoma humano

tem aproximadamente 700 genes que codificam para E3-ligases, com uma maior especificidade entre enzima e substrato, enquanto as DUBs, que têm cerca de 100 genes relacionados a sua expressão, parecem ter 10 vezes mais substratos quando comparadas com as E3-ligases (FANG et al., 2023; LI; REVERTER, 2021).

As deubiquitinases são responsáveis por reciclar monômeros de ubiquitina ligados à proteínas direcionadas para a degradação, manter a estabilidade das proteínas, realizar o processamento de precursores de ubiquitina aumentando a concentração de ubiquitina monomérica intracelular, editar o código da ubiquitina e removê-las em sinais não degradativos (LI; LI; WU, 2022). As DUBs são subdivididas em sete famílias, que diferem uma das outras em sequência e estrutura, sendo elas as proteases específicas de ubiquitina (USPs), hidrolases C-terminal de ubiquitinas (UCHs), proteases de tumor ovariano (OTUs), família de proteases da doença Machado-Joseph (MJDs), peptidases de ubiquitina com dedo de zinco (ZUP1), família DUB com motivo de interação com ubiquitina (MINDY), e família de proteases Jab1/Mov34/MPN⁺ com metaloenzimas (JAMM) (LI; REVERTER, 2021; LIANG et al., 2023).

Desbalanços funcionais entre deubiquitinases e E3-ligases podem levar a indução de diversos distúrbios celulares, resultando no desenvolvimento de diferentes patologias (ZHANG; SHAO; GU, 2023). Processos presentes em doenças neurodegenerativas como a agregação proteica, regulação defeituosa da proteostase, defeitos na autofagia e mitofagia, que estão relacionadas com a função de DUBs, as colocam como possíveis alvos terapêuticos para essas patologias (NIELSEN; OKARMUS; MEYER, 2023). Diversos estudos mostram a importância de diversas deubiquitinases também na promoção ou supressão tumoral através de seus efeitos na degradação proteossomal, reparo do DNA, apoptose e metástase, estando essas fortemente relacionadas a diferentes neoplasias (Figura 2) (REN et al., 2023).

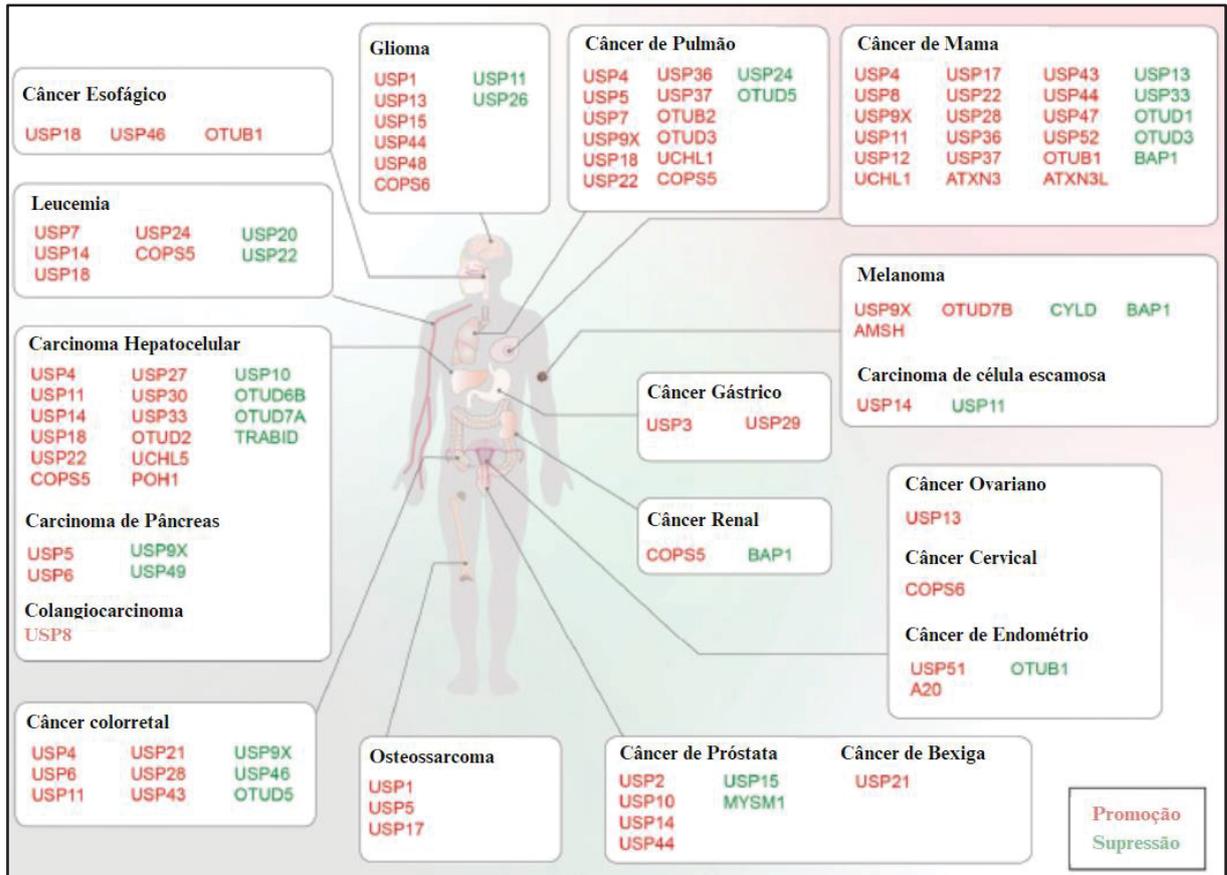


Figura 2 - Efeitos promotores e supressores tumorais de DUBs. As deubiquitinases estão fortemente relacionadas à patologia do câncer e podem ter funções contrastantes no contexto tumoral, onde em diversas neoplasias existe a descrição de diferentes DUBs atuando tanto na promoção (vermelho) quanto supressão (verde) tumoral. Fonte: REN et al., 2023.

2.2.2 Proteases Específicas De Ubiquitina 2 (USP2)

Cerca de 60% das DUBs são compostas por enzimas da família das proteases específicas de ubiquitina (USPs), grupo formado por diversos membros sendo a maior e mais variada família de deubiquitinases descritas (GAO et al., 2023; SHEN et al., 2023). As USPs são cisteíno-proteases que apresentam três domínios chamados de dedo, polegar e palma conservados entre seus membros, e sua atividade catalítica é proveniente do grupamento tiol da cisteína central (KITAMURA, 2023; SHEN et al., 2023). O sítio catalítico das enzimas pertencentes a essa família fica alocado entre os domínios palma e polegar, sendo o domínio dedo responsável pela interação com as ubiquitinas (SHEN et al., 2023).

A maioria das USPs descritas são formadas por um mesmo sítio catalítico, se diferindo nos sítios C-terminal, N-terminal, e em seus domínios, características responsáveis por garantir diversidade de função para esse grupo, e atuam através da hidrólise de cadeias poliubiquitinas K48, K63 e M1 (SHEN et al., 2023). As USPs estão relacionadas com diversos processos celulares como o controle do ciclo celular, reparo de DNA danificado, migração celular, tumorigênese, distúrbios metabólicos, e em respostas imunes e inflamatórias, onde a sua expressão aberrante ou danificada está descrita na patogênese de diversas doenças (GAO et al., 2023; GUO et al., 2023; KITAMURA, 2023; SHEN et al., 2023).

A USP2 foi a segunda da família de DUB a ser descrita, em 1970, e seu precursor mRNA está relacionado a geração de quatro isoformas dessa proteína: a USP2-1 (USP2a) de 68 kDa, USP2-2 (USP2b) com 40 kDa, USP2-3 (USP2c) com 41 kDa e a USP2-4 de 45 kDa. Todas as isoformas são compostas pelo mesmo sítio catalítico C-terminal, se diferindo em sua porção N-terminal, e o padrão de *splicing* é definido por alterações no organismo como o ritmo circadiano, o estado nutricional e seus níveis de andrógenos (ZHANG et al., 2023). A atividade da USP2 está relacionada com processos de desordem metabólica e tumorigênese, tendo seus efeitos sobre a proteína ciclina D, enzima ácido-graxo sintase (FASN) e MDM2 (murine double minute 2) descritos na literatura (GUO et al., 2023; KITAMURA, 2023; ZHANG et al., 2023).

Os níveis de expressão da USP2a, tanto em mRNA quanto proteico, mostram estar aumentados no fígado, em casos de hepatocarcinoma e no câncer de próstata, podendo aumentar a proliferação, agressividade, migração e invasão dessas neoplasias (GUO et al., 2023; ZHANG et al., 2023). A USP2a está descrita como promotor tumoral no hepatocarcinoma, glioma, câncer de próstata e bexiga, porém no carcinoma de células renais, a sua expressão está diminuída e relacionada à supressão tumoral, se tornando um alvo importante para a terapêutica dessas doenças (ZHANG et al., 2023).

2.3 INIBIÇÃO DA PROTEÍNA USP2A

2.3.1 Expressão da proteína recombinante USP2a

Visando o estudo da isoforma USP2a, trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa buscaram produzir, de forma recombinante, a proteína USP2a a partir de sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli* (RIBEIRO, 2016). Neste trabalho, foi realizado a clonagem de USP2a em vetor pET28a(+) (Novagen), seguido da padronização da expressão e purificação da proteína recombinante USP2a. Apesar do êxito em expressar e purificar a proteína, neste e em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, a USP2a recombinante não foi encontrada na fração solúvel dos lisados bacterianos, onde sua expressão foi vista apenas a partir da solubilização de corpos de inclusão desses lisados (RIBEIRO, 2016; ROCHA, 2016).

A expressão em corpos de inclusão é um processo comum quando utilizado de sistemas heterólogos de expressão, onde a menor complexidade do organismo de expressão quando comparado com o organismo de origem da proteína de interesse, leva a altas taxas de dobramento errôneo das proteínas sintetizadas. Tais erros no enovelamento proteico podem resultar na exposição de sítios hidrofóbicos da proteína, quais comumente são internalizados a partir de interações hidrofóbicas, levando a um desarranjo da configuração nativa da proteína, formação de precipitados proteicos em corpos de inclusão. Uma vez que a forma ativa das proteínas é obtida através da sua estrutura tridimensional correta, para que a proteína possa ter sua atividade mensurada, é necessário que seu correto enovelamento seja garantido (BHATWA et al., 2021). Até o momento, não há descrito na literatura a expressão da proteína recombinante USP2a cataliticamente ativa.

2.3.2 Ensaio para a busca de inibidores da proteína USP2

Mesmo tendo grande importância fisiológica, até o momento, poucos inibidores de USP2 estão descritos na literatura, e estes ainda são marcados por falta de especificidade, perdendo sua eficácia no uso terapêutico (SCHAUER et al., 2020). Para tentar preencher essa lacuna, Wang e colaboradores descreveram um ensaio baseado em SDS-PAGE e coloração por coomassie para a busca de inibidores de USP2 (WANG et al., 2017). Neste estudo, a capacidade de inibição de USP2 pode ser quantificada a partir da atividade catalítica desta proteína sobre o precursor de ubiquitina UBA52, qual pode ser ao final avaliado a partir da separação das proteínas

por SDS-PAGE, seguido da coloração deste gel por azul de coomassie (WANG et al., 2017). Entretanto, os autores utilizaram de uma construção referente à fração catalítica da proteína USP2, excluindo os éxons aminoterminais responsáveis pela diferenciação das isoformas de USP2, resultando em uma menor especificidade e eficácia para as diferentes formas da proteína encontradas no organismo (ZHANG et al., 2023). Além disso, apesar da alta reprodutibilidade e eficácia do ensaio, a metodologia a partir de eletroforese e coloração proposta pelos autores trata-se de uma técnica limitada para a análise de grande quantidade de moléculas de forma rápida, prática e padronizada (WANG et al., 2017).

Ensaio de varredura em larga escala são responsáveis por testar de forma otimizada diversos compostos quanto à determinada função, tendo uma importância significativa na busca de novas drogas, ao analisar uma grande janela de compostos de forma padronizada e rápida (BLAY et al., 2020; SARNAIK et al., 2020). Cho e colaboradores listaram diferentes métodos *in vitro* de análise da deubiquitinação através de ensaios que permitem a varredura em alta escala, possibilitando assim avaliar compostos que interagem com deubiquitinases (DUBs) (CHO et al., 2020).

Dentre as opções discutidas neste artigo, já é descrito na literatura as vantagens do uso de ubiquitina-rhodamina110-glicina (Ub-Rho110-G) em ensaios bioquímicos *in vitro* com o intuito de avaliar DUBs e seus possíveis inibidores através de intensidade de fluorescência (CHO et al., 2020; HASSIEPEN et al., 2007). Neste ensaio, a quebra da ligação de ubiquitina à rodamina por deubiquitinases resulta em fluorescência intensa pela exposição do sítio da rodamina antes ocupado pela ubiquitina. Essa metodologia apresenta alta sensibilidade, e por permitir sua realização em placas de múltiplos poços, é ideal para a varredura de bibliotecas de compostos para a busca de inibidores através de bibliotecas de compostos. O uso de Ub-Rho110-G para a avaliação da atividade da USP2 já foi comprovado a partir do uso isolado do sítio catalítico desta proteína (HASSIEPEN et al., 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS

Os materiais necessários para o cultivo de bactérias foram esterilizados através de lavagem com água corrente e deionizada, autoclavagem em 1 kgf/cm² à 120°C por 20 minutos, mantidos em estufa de 60°C até sua secagem completa, e posterior armazenamento mantendo as condições estéreis. A cultura bacteriana foi mantida estéril através do uso de lamparinas para a manipulação das bactérias e/ou meios de cultura.

Para a cultura de células de mamíferos o mesmo procedimento de higienização dos materiais foi adotado, porém as autoclavagens foram realizadas por 40 minutos. Todos os procedimentos de cultura celular foram realizados com uso de materiais e reagentes estéreis, dentro de fluxo laminar bidirecional, qual foi higienizado com etanol 70% e mantido em luz ultravioleta (UV) por 15 minutos anteriormente e após cada uso.

3.2 MEIOS BACTERIANOS

Para o cultivo bacteriano foi utilizado o meio para crescimento de bactérias Luria Bertani (LB), composto por 1% (v/m) NaCl, 1% (v/m) peptona bacteriológica (Sigma), 0,5% (v/m) extrato de levedura. Para a sua esterilização foi realizada autoclavagem em 1 kgf/cm² à 120°C por 20 minutos. Quando necessário realizar o plaqueamento em meio sólido, foi utilizado o meio LB com adição de 1,5% (v/m) de ágar para a solidificação. Todos os reagentes foram pesados e homogeneizados em água deionizada, tendo seu volume ajustado posteriormente.

Como uma alternativa, foi utilizado o meio de autoindução Zym-5052, composto por 1% (v/m) peptona (Sigma), 0,5% (v/m) extrato de levedura, 1,25 M Na₂HPO₄, 1,25 M KH₂PO₄, 2,5 M NH₄Cl, 0,25 M Na₂SO₄, 25% (v/m) glicerol, 2,5% (v/m) glucose, 10%

(v/m) α -lactose e 1 M MgSO_4 . As mesmas condições de esterilidade foram aplicadas em sua confecção.

3.3 GERAÇÃO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES

Para a geração de bactérias aptas a receberem um plasmídeo exógeno, é necessário induzir a sua “competência” através de processos que criam poros na membrana celular procariótica. Com este fim foram realizados pré-inóculos a partir do crescimento de uma colônia isolada em 2 mL em meio LB. Estes permaneceram 16 horas em agitador à 37°C em 180 rpm para crescimento bacteriano. Posteriormente, 25% do pré-inóculo foi utilizado para o preparo de um inóculo de 25 mL em LB, qual permaneceu nas mesmas condições de agitação até a densidade óptica (D.O.) de 0,50 em 600 nm, mensurada por espectrofotômetro. Após, o inóculo bacteriano foi centrifugado a 17000 x g à 4°C por 10 minutos. O sedimento bacteriano foi ressuspenso gentilmente em 2,5 mL de tampão TSS (10% polietileno glicol 8000, 5% dimetilsulfóxido, 25 mM MgCl_2 , 25 mM MgSO_4 , meio LB), incubado em gelo por 10 minutos, e então dividido em alíquotas de 100 μL , que permaneceram resfriadas e armazenadas a -80°C até seu uso.

3.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Para a inserção dos plasmídeos de interesse foi realizada a transformação bacteriana por choque térmico. Para a inserção em sistema pET28a, foi utilizando 10 ng de plasmídeo do plasmídeo de interesse, enquanto para em sistema pET23a, 10x mais plasmídeo foi adicionado por transformação (100 ng). Foi adicionado o plasmídeo nas condições necessárias à cepa de *E. coli* quimiocompetente e mantido 30 minutos em gelo. A reação foi então transferida para um banho-maria à 42°C por 90 segundos, incubada novamente em gelo por 5 minutos, e então, foi adicionado 400 μL de meio SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM glucose) aquecido à 37°C, sendo mantida essa temperatura por 1 hora para recuperação das bactérias. Posteriormente foi realizada

a centrifugação em 3000 x g por 5 minutos, para a obtenção de um precipitado composto por sedimento bacteriano, qual foi ressuspensionado em 200 µL de LB. Então, a suspensão foi espalhada em placa de petri recoberta por LB-ágar e o antibiótico de seleção do plasmídeo e da cepa de *E. coli* utilizada. As placas foram mantidas em 37°C por 16 horas e então fechadas com parafilme e armazenadas em 4°C para uso em até 1 mês.

3.5 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Para a amplificação de plasmídeos foi utilizado a cepa Top10 de *E. coli*, através do preparo de inóculo de LB a partir de uma colônia de bactéria já transformada e selecionada com o plasmídeo de interesse. O volume dos inóculos foi definido a partir da característica de amplificação do plasmídeo e a concentração final aproximada necessária (Tabela 1). Os inóculos foram mantidos em agitador em 37°C a 180 rpm por 16 horas para o crescimento bacteriano e amplificação dos plasmídeos.

Tabela 1: Volumes utilizados no preparo de inóculos para amplificação de plasmídeo.

	Minipreparação (até 30µg de DNA)	2 ml de inóculo
Plasmídeos de alta cópia	Maxipreparação (até 1000µg de DNA)	100 ml de inóculo
	Minipreparação (até 30µg de DNA)	10 ml de inóculo
Plasmídeos de baixa cópia	Minipreparação (até 1000µg de DNA)	300 ml de inóculo

Fonte: Manual PureLink™ Invitrogen, 2021.

Os plasmídeos foram purificados através dos kits PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification (Invitrogen) para minipreparação e maxipreparação, seguindo o manual de procedimentos listados juntamente com cada kit. Posteriormente, a solução final obtida foi quantificada no nano-espectrofotômetro Nanodrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific) para obtenção da concentração do plasmídeo purificado.

3.6 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para a expressão de proteínas recombinantes foi utilizado o plasmídeo pET28a-USP2a, produzido e caracterizado por Carolina F. Ribeiro em sua tese de doutorado (RIBEIRO, 2016), e o plasmídeo pET23a-UbA52 (Addgene nº #69560), cortesmente cedido pelo Organelle Biogenesis and Function Group do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) da Universidade do Porto. (GROU et al., 2015).

Os precursores de ubiquitina UBA80, HsUBB e MmUBB foram produzidos pelas alunas de iniciação científica Carolina Sarmiento e Lalita Leone, e gentilmente doados para a execução de alguns ensaios deste projeto.

3.6.1 pET28a-USP2a

Para a expressão da proteína recombinante USP2a, o plasmídeo pET28a-USP2a foi utilizado para transformar a cepa BL21(DE3) de *E.coli*, utilizando de 50 µg/mL de canamicina como antibiótico para seleção de bactérias que tiveram a correta inserção do plasmídeo. Os pré-inóculos, em 2 mL de LB 50 µg/mL de canamicina, foram incubados em agitador à 37°C em 180 rpm por 16 horas, e então todo o volume foi transferido para 1 L de LB 50 µg/mL de canamicina. Os inóculos foram mantidos em agitador sob as mesmas condições até que a D.O. de 0,70 em 600 nm fosse obtida. Então a expressão de proteínas foi induzida através da adição de 0,5 mM de isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), mantendo em incubação por 20 horas à 18°C em 180 rpm. Após, o inóculo induzido foi centrifugado a 17000 x g por 10 minutos e o precipitado armazenado em -20°C por até duas semanas. Visando padronizar a forma mais eficaz em expressar USP2a em quantidades satisfatórias de proteína, foi realizada também a expressão proteica a partir da indução com 0,5 mM IPTG a 37°C por 3 horas e a partir do uso de meio auto induzível, Zym-5052, por 20 horas a 37°C.

3.6.2 pET23a-UBA52

A proteína recombinante UBA52 foi expressa utilizando a cepa BL21(DE3) de *E.coli* transformada com o plasmídeo pET23a-UBA52. Para isso, foram realizados quatro pré-inóculos de 5 mL de LB 100 µg/mL de ampicilina, quais foram mantidos em agitador à 37°C em 180 rpm por 16 horas. Após, todos os pré-inóculos foram combinados em 1 L de inóculo em LB 100 µg/mL de ampicilina, qual foi mantido em agitação, nas mesmas condições, até a D.O. de 0,60 em 600nm. O inóculo foi então induzido através da adição de 0,5 mM de IPTG, por 3 horas, em agitação à 37°C, centrifugado por 17000 x g por 10 minutos, e o sedimento bacteriano armazenado à -20°C por até duas semanas.

3.7 LISE BACTERIANA

Para realizar o rompimento da membrana celular da bactéria e consequente liberação das proteínas expressas, o sedimento bacteriano já induzido foi ressuspendido em 50 mL de tampão nativo (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl) gelado, e então adicionado o inibidor de serinoprotease fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), na concentração final de 1 mM PMSF. Para a indução da ruptura celular, foi utilizado Processador Ultrassônico Sonicador® (Heat Systems), em 20 ciclos (10 segundos/ciclo, 50-60 Hz, amplitude de 30%).

3.7.1 Separação de Frações Solúveis e Insolúveis

Após a lise, 1 mL de amostra foi coletado e centrifugado a 3000 x g, em 4°C, por 10 minutos. Esta centrifugação é responsável por diferenciar a fração proteica solúvel, da fração proteica insolúvel do lisado, presentes respectivamente no sobrenadante e precipitado. Para quantificar, e assim, caracterizar o padrão de expressão obtido, 100 µL do sobrenadante foi adicionado em 100 µL de tampão de amostra redutor 5 x concentrado (312 mM tris(hidroximetil)-aminometano (tris-base), 10% SDS, 50% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 10% β-mercaptoetanol). O precipitado foi lavado duas vezes com tampão nativo e ressuspendido em 1 mL de SDS 1%, sendo agitado em vórtex e aquecido até solubilização do precipitado. Então, foi realizada uma nova

centrifugação, a 3000 x g, 4°C, e 10 minutos, e 100 µL desse sobrenadante foi adicionado em 100 µL de tampão de amostra redutor 5 x concentrado, mantendo as proporções da fração solúvel. As amostras foram aquecidas a 95°C por 15 minutos, e então foi realizada a técnica de imunodeteção, ou *western blotting*, para avaliar a proporção das proteínas de interesse em cada fração.

3.8 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para a purificação das proteínas de interesse foi utilizada a cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC), através da cauda de seis histidinas presente em ambas as proteínas trabalhadas, em coluna de níquel-agarose (Ni-NTA). As amostras lisadas foram clarificadas através de centrifugação em 40000 x g por 30 minutos, e então o sobrenadante, foi mantido em uma exigência de 20 mM de imidazol pH 7,5. A coluna foi montada com 500 µL de Ni-NTA (Invitrogen), equilibrada nas mesmas condições da amostra (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl; 20 mM imidazol), e então a amostra percolada através da matriz cromatográfica. Após três lavagens com tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl; 50 mM imidazol) em dobro do volume cromatografado, a proteína foi eluída em cinco frações de 500 µL, com o tampão de eluição (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,5 M Imidazol). Para purificação em condições desnaturantes o mesmo procedimento foi adotado, porém tanto a amostra quanto os tampões utilizados continham 8 M de ureia.

3.9 DIÁLISE

Com a finalidade de retirar possíveis interferentes como imidazol, NaCl e ureia da amostra, foi realizado o procedimento de diálise. Devido ao baixo volume das amostras, o procedimento de diálise foi realizado em tubo de vidro, com volume máximo 2 mL, e tampa vazada, que foi recoberta por uma membrana de diálise. Este tubo com as amostras a serem dialisadas foi invertido e mantido parcialmente submerso em tampão fosfato-salino (PBS) 10% glicerol, permitindo o contato do líquido interno e externo com a membrana. Duas trocas do tampão de diálise foram

realizadas, após 6 horas do início da diálise, e então, após 16 horas da primeira troca. A diálise foi realizada com auxílio de agitador magnético à 4°C. Após, a amostra foi analisada quanto sua concentração proteica pelo método de Bradford (STUDIER, 2005). O grau de pureza das amostras foi avaliado através da metodologia de coloração de proteínas em SDS-PAGE com solução 0,2% azul de coomassie, 50% metanol e 10% ácido acético.

Para amostras ressuspendidas em tampão desnaturante, a diálise foi realizada com etapas adicionais, onde as amostras foram dialisadas contra PBS 10% glicerol contendo ureia em concentrações de 6M a 0M, sendo realizado ao todo 4 trocas dos tampões.

3.10 CULTURA CELULAR

Foi cultivada a linhagem celular 293T, de células epiteliais derivadas do rim, em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) baixa glucose (Gibco), 10% Soro Bovino Fetal (Gibco) e 1% penicilina e estreptomicina. A cultura foi realizada em monocamada, sendo mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO₂. Na confluência de 80%, foi realizado o subcultivo das células, que após a retirada do meio, foram desaderidas com jatos de PBS, passadas para um tubo falcon e centrifugadas por 1000 x g por 3 minutos. O precipitado foi então ressuspendido em meio completo e realizado o plaqueamento das células nas condições necessárias para cada finalidade.

3.11 TRANSFEÇÃO

Para induzir a superexpressão de genes de interesse em sistema eucariótico, foram realizadas transfeções das células 293T, que estão relacionadas com uma alta eficiência de transfeção. Foram utilizados os plasmídeos pcDNA3.1(-)-Vetor Vazio (EV), pDEST-USP2a, pDEST-USP2a^{C276A} (mutada) e pcDNA3.1(-)-USP2b, purificados através de maxipreparação. Os plasmídeos foram introduzidos nas células

através do polímero catiônico polietilenonimina (PEI), que ao se ligar ao DNA gera um complexo com carga líquida catiônica capaz de se anexar a superfícies celulares aniônicas, permitindo assim a endocitose desse complexo e liberação do DNA no citoplasma celular (LONGO et al., 2013). Para cada condição, placas de cultivo celular de 10cm com confluência de 70% de 293T aderidas foram transfectadas com 20 µg de plasmídeo, 60 µg de PEI e 1 mL do meio de transfecção Opti-MEM™ (Gibco). A solução contendo esses três elementos foi agitada em vórtex por 15 segundos e permaneceu em repouso por 15 minutos, antes que fossem adicionadas ao meio de cultura de cada placa. Após, a placa retornou para a incubadora à 37°C e 5% CO₂ por 24 horas para permitir a expressão significativa das proteínas de interesse.

3.12 LISE CELULAR

Para obter as proteínas citosólicas das células cultivadas, foi realizado a metodologia de lise celular através do uso de tampão de coimunoprecipitação (RIPA-CoIP: 30 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% NP-40). Após 24 horas da transfecção, as placas de 293T tiveram seu meio desprezado, e as células foram desaderidas primeiramente com jatos de PBS gelado, e então com o auxílio de um rodo para cultivo celular. A suspensão de células foi então transferida para um tubo falcon onde foram lavadas três vezes com PBS gelado, com centrifugação à 2000 x g por 3 minutos e descarte do sobrenadante entre as lavagens. Após a última lavagem as células foram ressuspensas em RIPA-CoIP 1 mM PMSF e transferidas para um tubo de 1,5 mL. A suspensão foi mantida em gelo por 15 minutos, sendo realizada a passagem de todo o volume por uma seringa com agulha (13 mm x 0,45 mm) a cada 5 minutos para melhor ruptura da membrana celular. Após, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a 4°C, sendo desprezado o precipitado, e quantificado o sobrenadante com as proteínas pelo método de Bradford (STUDIER, 2005).

3.13 DEUBIQUITINAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A USP2a recombinante foi incubada na concentração de 0 a 5 μM em tampão deubiquitinase (tampão DUB-A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM NaCl; 2 mM DTT; 2 mM CaCl_2) por 30 minutos a 37°C (WANG et al., 2017). Para os ensaios a partir de extratos celulares, foi incubado 50 μg de proteína em DUB-A, nas mesmas condições. Após o tempo de incubação, foi adicionado 1 μg de cada substrato e incubado por mais 90 minutos a 37°C. A reação foi então parada com a adição de tampão de amostra, e fervida por 20 minutos a 95°C. A análise foi realizada através da técnica de *western blotting*.

3.14 DEUBIQUITINAÇÃO EM PLACA

O ensaio de deubiquitinação em placa foi realizado através do substrato ubiquitina-rodamina110-glicina (Ub-Rhod110-G) (R&D Systems). Para isso, 0,1 μM de substrato e USP2a recombinante (1-5 μM) incubados em tampão de ensaio deubiquitinase (tampão DUB-B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 100 mM NaCl; 0,5% CHAPS), em placa de 96 poços preta e fundo transparente, no volume final de 100 μL . A intensidade de fluorescência foi mensurada através do leitor de placas Tecan® Infinite M200, com excitação de 485 nm e emissão de 535 nm (HASSIEPEN et al., 2007).

3.15 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para a separação de proteínas foi utilizado de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) com a concentração de poliacrilamida variando de acordo com o tamanho das proteínas de interesse. As amostras foram preparadas em tampão de amostra (312 mM Tris-Base, 10% SDS, 50% glicerol, 0,05% Azul de Bromofenol) em alguns casos redutor, com adição de 10% de β -mercaptoetanol. As corridas foram realizadas em 80 V até a formação da frente de migração, e 160 V após. Como padrão molecular foi utilizado PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Para géis onde o objetivo era identificar as proteínas através da coloração com azul de coomassie, após a corrida o gel foi incubado em solução 0,2% azul de coomassie, 50% metanol e 10% ácido acético por 30 minutos. Após os géis foram descorados com solução 40% metanol e 7% ácido acético, sendo realizadas trocas desta solução até apenas as bandas de proteínas permanecessem coradas em azul.

3.16 IMUNODETECCÃO DE PROTEÍNAS

Para a imunodeteccão de proteínas, foi primeiramente realizada a separação de proteínas em SDS-PAGE seguido da transferência dessas para membrana de nitrocelulose 45µm, através de sistema semi-seco, a 10V por 1 hora. Após, a membrana foi incubada com solução Ponceau 0,2% para visualização da transferência e divisão da membrana quando necessário. A membrana foi então lavada com tampão tris salino com Tween 20 (TBST) para retirada do excesso de Ponceau e bloqueada em TBST 5% (w/v) de albumina soro bovina (BSA) (BioRad), por 1 hora em orbital. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBST para retirar o excesso da solução de bloqueio, e então incubada com o anticorpo primário nas concentrações de interesse em TBST 0,5% BSA, por 16 horas em agitador à 4°C. Então, a solução com os anticorpos foi retirada, a membrana lavada cinco vezes de 5 minutos com TBST, e incubada com o anticorpo secundário de camundongo (Promega) na proporção 1:3000 em TBST 0,5% BSA, em agitador orbital por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada, cinco vezes de 5 minutos com TBST, para ser então incubada por 3 minutos com o substrato ECL Start ou ECL Prime (Amersham) e revelado no equipamento Fotodocumentador Amersham Imager 600 GE®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPRESSÃO DA DEUBIQUITINASE USP2a RECOMBINANTE

Ainda não há na literatura registros da expressão de USP2a recombinante inteira para ensaios de atividade deubiquitinase, sendo utilizado comumente apenas o sítio catalítico dessa proteína como uma forma de evitar sua precipitação e perda de atividade (HASSIEPEN et al., 2007; WANG et al., 2017). O domínio catalítico é comum para todas as isoformas da USP2, e desta forma, seu uso em ensaios de atividade resulta em uma menor especificidade entre as formas de USP2 (ZHANG et al., 2023). Para melhor entender a atividade enzimática da deubiquitinase USP2a e seus possíveis alvos, foi necessário realizar a expressão de sua forma inteira.

4.1.1 Expressão da proteína USP2a em pequena escala

Para padronizar as condições de expressão da proteína recombinante USP2a em *Escherichia coli* (*E. coli*), foi primeiramente realizada uma expressão em pequena escala, em 20 mL, de quatro colônias diferentes da cepa BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET28-USP2a e selecionadas em canamicina. Como controle negativo da expressão, os inóculos tiveram metade de seu volume separados, permanecendo esses sem a indução da expressão por IPTG. Como pode ser observado na Figura 3 (asteriscos), o aparecimento de bandas mais proeminentes de aproximadamente 70 kDa nas frações induzidas com IPTG, indicam a maior expressão proteica nas condições de indução, e considerando a massa molecular de 68 kDa esperada para a proteína USP2a, esse sistema teve êxito em expressar a proteína recombinante (Figura 3).

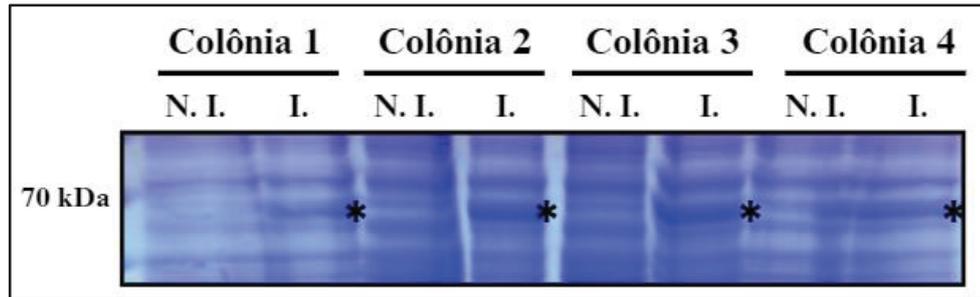


Figura 3 - USP2a recombinante é expressa em sistema heterólogo de *E. coli*. SDS-PAGE 10% corado em 0,2% azul de coomassie. Lisado total de inóculos das colônias 1, 2, 3 e 4 da cepa BL21(DE3) transformadas com plasmídeo pET28-USP2a, com a expressão induzida (I.) ou não induzida (N.I.) com 0,5 mM IPTG. Asteriscos sinalizam as bandas da proteína USP2a expressa.

4.1.2 Diferenciação de Frações Solúveis e Insolúveis

Na produção de proteínas recombinantes, um problema recorrente é a formação de corpos de inclusão devido ao mal dobramento das proteínas sintetizadas. Essas estruturas são caracterizadas pela formação de um precipitado insolúvel, resultado da exposição de cadeias hidrofóbicas, que comumente se localizam no interior da proteína. As proteínas necessitam de sua estrutura tridimensional correta para terem atividade biológica, e para obter uma proteína recombinante com atividade enzimática, a sua expressão na fração solúvel aumenta a possibilidade desse enovelamento correto, não necessitando passar por processos de solubilização por ureia e re-enovelamento (BHATWA et al., 2021). Sendo assim, foram separadas as frações proteicas solúvel e insolúvel a partir da lise bacteriana em tampão nativo (Figura 4).

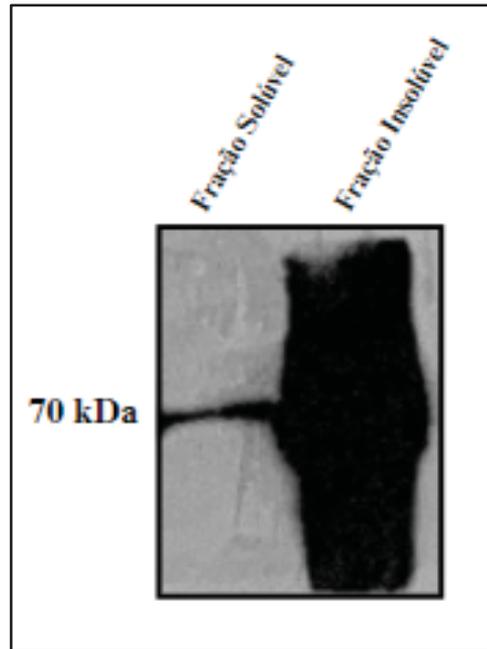


Figura 4 - USP2a encontra-se majoritariamente na fração insolúvel. SDS-PAGE 10% transferido para membrana de nitrocelulose e incubado com anticorpo anti-USP2a. Autoradiograma da membrana após a reação de imunodeteção.

Foi possível perceber que a proteína USP2a encontra-se majoritariamente na fração insolúvel, em corpos de inclusão, processo comum em sistemas heterólogos de expressão, porém que dificulta a obtenção da proteína ativa (Figura 4) (BHATWA et al., 2021). Na tentativa de aumentar a expressão em condições solúveis, algumas mudanças nas condições de expressão foram empregadas, com a finalidade de diminuir a velocidade de síntese proteica, e assim, favorecer o correto dobramento e a maior solubilidade das proteínas (BHATWA et al., 2021). Simultaneamente com a indução por IPTG por 3 horas à 37°C, outras duas condições de expressão proteica foram testadas: o aumento no tempo de indução com IPTG por 20 horas a 18°C e o uso do meio de autoindução Zym-5052, a 37°C por 20 horas (Figura 5).

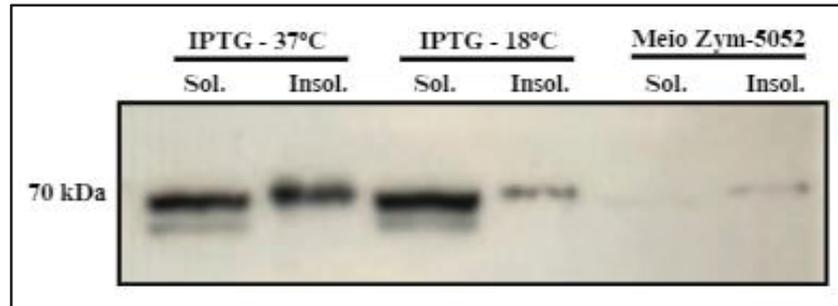


Figura 5 – Diminuição da formação de corpos de inclusão na expressão de USP2a em temperaturas baixas. Expressão de USP2a induzida por IPTG à 37°C (3 horas), IPTG à 18°C (20 horas), ou meio Zym-5052 a 37°C (20 horas). Comparação da expressão de USP2a na fração solúvel (Sol.) e fração insolúvel (Insol.). SDS-PAGE 10% transferido para membrana de nitrocelulose e incubado com anticorpo primário anti-USP2a.

Há um aumento de USP2a na fração solúvel quando a expressão é induzida por 20 horas à 18°C, quando comparado à indução por 3 horas à 37°C, e diminuição da fração insolúvel considerando a mesma comparação. Importante ressaltar que 4x mais de amostra referente as frações solúveis foram aplicadas no gel, entretanto, ainda é possível observar que houve diferenças comparando as diferentes formas de indução da expressão (Figura 5).

A diminuição da temperatura de indução da expressão diminui a capacidade de agregação das proteínas recombinantes em agregados insolúveis após a expressão, uma vez que esse fenômeno é favorecido por temperaturas mais altas que facilitam a interação hidrofóbica desses compostos (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Ao comparar a expressão induzida por IPTG a 37°C e 18°C, onde apesar do aumento discreto dos níveis de proteínas na fração solúvel, é visível que a indução a 18°C diminuiu de forma considerável a fração insolúvel, provavelmente devido a esse efeito da temperatura na agregação (Figura 5). A partir desses resultados, a melhor condição de expressão de USP2a foi considerada a indução por IPTG, em agitação por 20 horas à 18°C, sendo a metodologia empregada para expressar essa proteína durante todas as etapas seguintes.

O meio Zym-5052 trata-se de uma alternativa ao uso do IPTG para a indução da expressão de proteínas, a sua composição apresenta a lactose que após o consumo da fonte primária de carbono para a bactéria, a glucose, é internalizada por esses organismos, e processada em alolactose, um indutor natural do *operon lac* (TAHARA et al., 2021). Essa metodologia proporciona uma indução de forma mais lenta e

gradual, sendo uma boa alternativa para a expressão de produtos tóxicos para bactérias, levando a um melhor rendimento proteico final. Mesmo para a expressão de proteínas inócuas ao organismo de expressão, altas taxas de indução estão relacionadas com a morte dessas células, devido a eliminação do plasmídeo de expressão (STUDIER, 2005).

O uso do meio Zym-5052 foi eficaz em expressar a isoforma USP2b recombinante em experimentos anteriores de nosso grupo de pesquisa (dados não publicados), porém quando empregado para a expressão da proteína USP2a mostrou um baixo rendimento quando comparado a culturas induzidas com IPTG. Dessa forma, seu uso na expressão de USP2a foi descartado neste trabalho.

4.1.3 Purificação de USP2a Recombinante

Após serem definidas as melhores condições de expressão da proteínas USP2a, foi realizada a sua expressão em larga escala, a partir da cultura de BL21(DE3)USP2a, seguida da lise bacteriana e purificação em sistema IMAC. A USP2a tem em sua construção uma cauda poli-histidina, aminoácido com afinidade por determinados íons metálicos que permite que essa proteína, ao ser percolada em uma coluna Ni-NTA, se ligue ao níquel, permitindo assim sua separação de outras proteínas com menor afinidade por essa coluna. Após essa metodologia ser empregada, os eluatos foram quantificados com a finalidade de determinar em quais frações uma maior concentração de proteína era obtido.

Entretanto, nas primeiras tentativas de expressar a USP2a, foi possível perceber que o rendimento proteico sofria queda após o congelamento/descongelamento dos eluatos, relacionado a um aumento de precipitados nessa solução. A precipitação dessa proteína recombinante já era um problema visto em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, e por conta disso, foi investigado formas de estabilizar essa proteína para que ela não precipitasse. As etapas de lise e purificação passaram a ser realizadas no mesmo dia, de forma que não fosse necessário o congelamento das amostras, e foi adicionado aos eluatos da purificação o glicerol, composto crioprotetor

que pode atuar como estabilizante dessas proteínas, mantendo todas as amostras em 10% glicerol a partir desta etapa.

Após essas adequações serem empregadas no processo de expressão e purificação, as amostras foram dialisadas e foi obtido um rendimento de 1,4 mg/L, separados em cinco frações de 500 μ L concentração média de 0,56 μ g/ μ L (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração de proteína purificada obtida após expressão em larga escala.

Eluato	Concentração de Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	0,60
2	0,62
3	0,54
4	0,53
5	0,50

Valores referentes a quantificação de proteínas totais por método de Bradford.

4.2 EXPRESSÃO DE UBA52 RECOMBINANTE

O gene humano *Uba52* codifica para a proteína ribossomal L40 fusionada a uma ubiquitina, atuando como uma proteína precursora de ubiquitina, por fornecer ubiquitina monomérica utilizada em diversos processos de PTM por ubiquitinação (LI; LI; WU, 2022). A ubiquitina é liberada da L40 após a hidrólise da ligação entre as duas proteínas por enzimas deubiquitinases, estando a USP2a já descrita na literatura como uma enzima capaz de clivar a UBA52, liberando a ubiquitina monomérica (WANG et al., 2017).

A sua expressão foi realizada em condições similares empregadas a USP2a, o que a princípio apresentou diversos problemas. Várias tentativas de transformação da cepa BL21(DE3) para expressão de proteínas foram realizadas, porém poucas e pequenas colônias eram obtidas, e não era possível observar seu crescimento em meio líquido (dado não mostrado).

Por não apresentar o gene *lacI* no vetor utilizado, primeiramente foi hipotetizado a possibilidade de o vazamento da expressão resultar na morte das bactérias, devido a uma possível toxicidade da UBA52, e por conta disso, foi suplementado o meio LB com glucose, buscando atenuar a expressão da proteína e assim levar ao crescimento das bactérias em meio líquido. Mesmo com glucose, não foi possível observar um crescimento satisfatório da BL21(DE3)UBA52. Foi alterado também o organismo de expressão, utilizando da cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3), que é capaz de aprimorar a expressão de proteínas eucarióticas com códons raramente encontrados em bactérias. Para essa cepa foi possível observar o crescimento bacteriano em cultura

líquida, porém isso não refletiu na expressão de UBA52, que permaneceu indetectável.

Paralelamente, outras expressões passaram a sofrer problemas, incluindo da USP2a que já tinha um protocolo de expressão bem definido. Desta forma, diferentes condições começaram a ser testadas isoladamente até que o problema foi solucionado. Empregou-se a expressão da USP2a recombinante como controle positivo de expressão e as diferentes variáveis testadas resultou na expressão adequada de UBA52, quando a composição do meio LB para cultura das bactérias foi alterada, isto é, a triptona (Kasvi) utilizada nos experimentos com baixa eficiência foi substituída por peptona (Sigma). De fato, outro lote de peptona (Merck) mostrou-se tão adequada quanto ao lote de peptona da fabricante Sigma na formação de colônias em número e tamanho satisfatório, sugerindo que algum componente da triptona Kasvi estava impedindo o crescimento bacteriano, bem como a expressão adequada da proteína. Todas as etapas subsequentes tiveram êxito após essa substituição do componente do meio LB.

4.2.1 Otimização da expressão da proteína UBA52

Primeiro foi definida a condição de indução da UBA52 através de um ensaio de expressão em pequena escala, onde metade do volume foi induzido com 0,5 mM de IPTG, por 3 horas a 37°C, e o restante mantido sob as mesmas condições, porém sem a adição do IPTG. A expressão de UBA52 foi avaliada então por SDS-PAGE seguido de coloração por azul de coomassie.

A UBA52 é uma proteína de fusão formada pela proteína ribossômica L40 ligada a uma ubiquitina, tendo aproximadamente peso molecular de 15 kDa (GROU et al., 2015). Na figura 6A é possível perceber um leve aumento de uma banda na altura esperada para a UBA52 (asterisco) quando comparada com a condição não induzida, indicando que a condição utilizada foi capaz de aumentar a expressão dessa proteína. Para confirmar que de fato esse aumento era referente a expressão de UBA52, foi realizada uma reação de imunodeteção utilizando como anticorpo primário o anticorpo anti-histidina, buscando identificar a etiqueta de histidina presente na proteína de fusão. Como pode ser visto na Figura 6B, a UBA52 recombinante foi expressa em sistema recombinante de *E. coli* (comparar linha I com NI). Um pequeno

vazamento de expressão também pode ser detectado na condição não induzida, possivelmente devido a falta do gene *lacI* para realizar a repressão do operon *lac*, mesmo sem adição de indutores como IPTG ou lactose (Fig. 6B, linha NI).

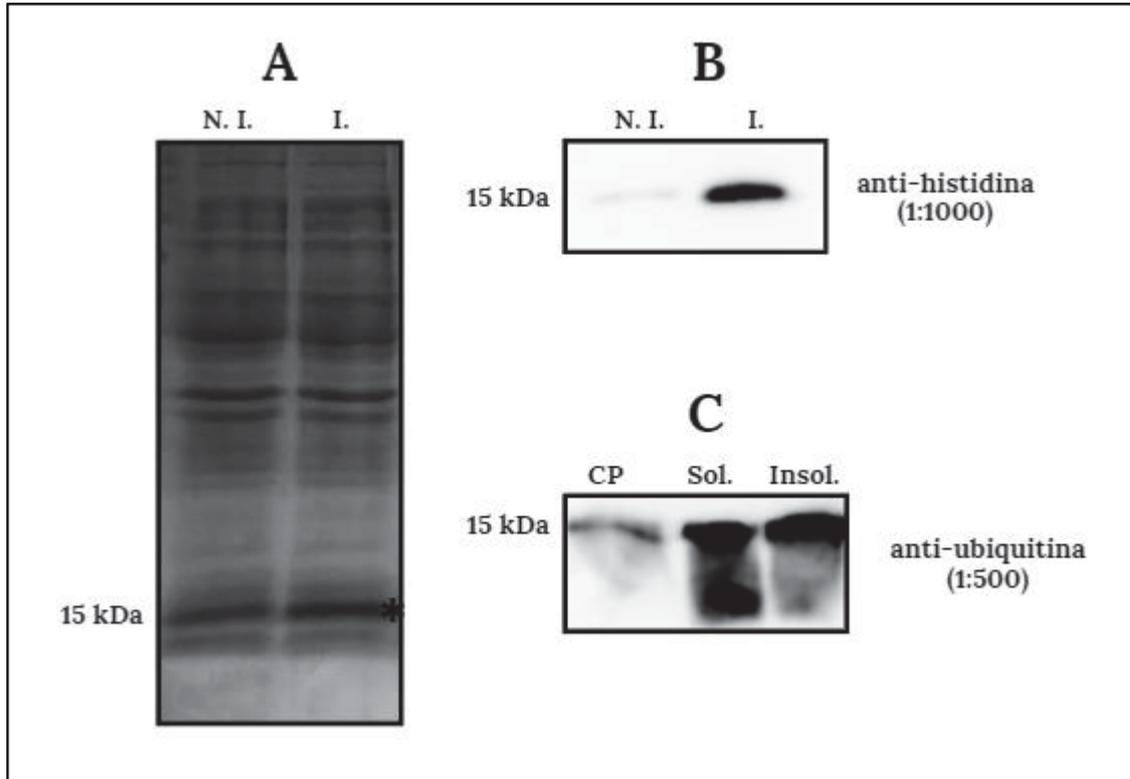


Figura 6 - A proteína UBA52 é expressa em sistema heterólogo de *E. coli*. (A) SDS-PAGE 15% corado com 0,2% azul de coomassie. Asterisco indicando a banda da proteína UBA52 recombinante. (B) SDS-PAGE 15% transferido para membrana de nitrocelulose e incubado como anticorpo primário anti-histidina e revelado em fotodocumentador. Amostras referentes a cultura de pET23aUBA52 induzida (I.) ou não induzida (N.I.) com 0,5 mM IPTG. (C) Diferenciação das frações solúveis (Sol.) e insolúveis (Insol.) da UBA52 recombinante. SDS-PAGE 15% transferido para membrana de nitrocelulose e incubado com anti-ubiquitina. Controle positivo (CP) referente ao lisado total de BL21(DE3)UBA52 com expressão induzida (amostras I. dos itens A e B).

Após constatar a eficácia destas condições de expressão da proteína UBA52 recombinante, foi testado em qual fração essa proteína se encontrava após a expressão. Como, mais uma vez, foi utilizado o sistema de expressão heteróloga em bactéria, é comum a formação de corpos de inclusão, já que esses organismos não apresentam maquinaria para realizar as mudanças pós-traducionais que as proteínas eucarióticas necessitam (BHATWA et al., 2021).

O sedimento celular resultante de 1 mL de cultura de BL21(DE3)UBA52 foi lisada em condições nativas (ou seja, sem agente caotrópico) e centrifugada, de forma a

separar a fração solúvel (sobrenadante) da fração insolúvel (precipitado). Para a análise em SDS-PAGE, o precipitado foi ressuspendido em 1% SDS, sendo utilizado porções de fração solúvel e insolúvel referentes à mesma porcentagem da cultura de BL21(DE3)UBA52. A partir dos métodos empregados neste trabalho, a proteína UBA52 expressa foi encontrada tanto na fração solúvel quanto insolúvel, estando ligeiramente em maior quantidade na forma solúvel (Figura 6C).

4.2.2 Purificação de UBA52 Recombinante

Após padronizado a metodologia para expressão de proteína do vetor pET23a-UBA52, foi realizada a expressão em larga escala de UBA52. A partir do lisado, após a indução, foi realizada a purificação da UBA52 a partir da etiqueta de histidina presente no vetor, em coluna de Ni-NTA. Foi analisado pelo método de *western blotting* o volume eluido da coluna referente às proteínas que não se ligaram à resina Ni-NTA, chamado de volume-morto ou *void*, e os cinco eluatos obtidos após a adição de 500 mM de imidazol, para desligar as proteínas da coluna (Figura 7).

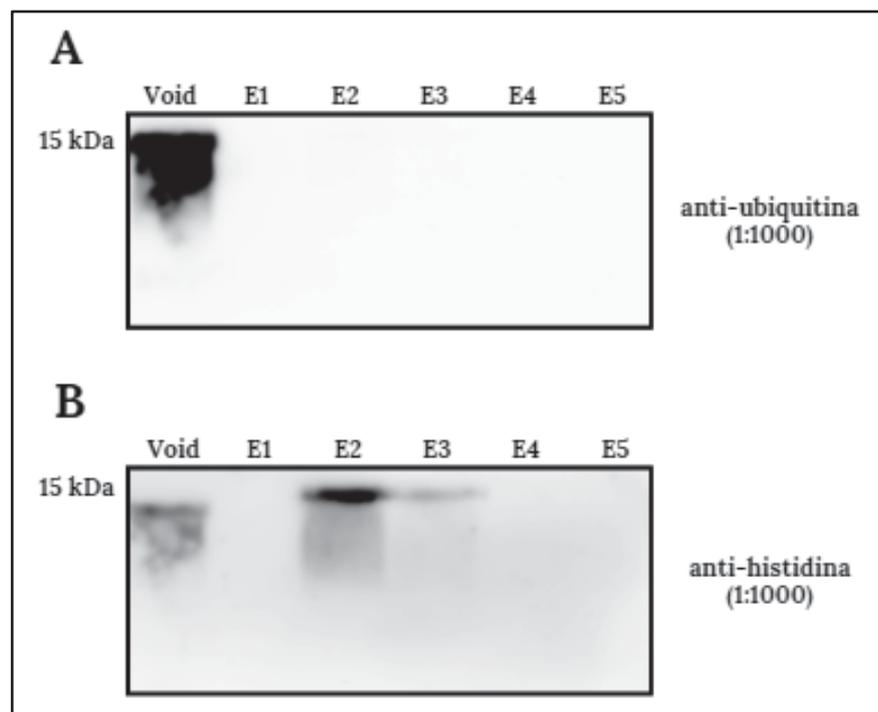


Figura 7 - UBA52 recombinante em condições nativas não é purificada satisfatoriamente em sistema Ni-NTA. Void e eluatos (E 1-5) de purificação em condições nativas, em coluna de Ni-NTA. SDS-

PAGE 15% transferido para membrana de nitrocelulose e incubado com os anticorpos primários anti-ubiquitina (A) e anti-histidina (B).

Quando feito o ensaio de imunodeteção utilizando o anticorpo primário anti-ubiquitina, foi possível perceber que todo sinal proveniente da presença de UBA52 estava restrito ao *void*, indicando que a proteína não se ligou a coluna (Figura 7A). Foi então realizado o processo de *stripping* e a membrana foi então reincubada com o anticorpo anti-histidina. Como pode ser visto na Figura 7B, com o anticorpo anti-histidina foi possível identificar bandas nos eluatos 2 e 3 (E2 e E3), em contrapartida, no *void* não foi possível observar uma marcação expressiva como ocorreu quando incubado com anti-ubiquitina (Figura 7).

A baixa eficiência encontrada na purificação a partir da cauda de histidina pode ser explicada pela realização desse método em condições nativas e em coluna. Realizar a purificação em condições desnaturantes, ressuspendendo as amostras em ureia, leva a desnaturação da proteína e consequente maior exposição da cauda de histidina, que mais facilmente se liga à resina de níquel. Ainda, a purificação pode ser realizada em método de *batch*, onde a resina Ni-NTA e a amostra são suspensas juntas e mantidas em homogeneização por um tempo determinado, aumentando a eficiência de ligação da histidina à resina (SPRIESTERSBACH et al., 2015). É possível que a alta concentração de UBA52 no *void* seja explicada pela ocultação da etiqueta de histidina em regiões estruturais internas da molécula e, desta forma, não acessíveis para a ligação de coordenação aos íons Ni^{2+} na matriz cromatográfica de Ni-NTA.

Considerando isso, uma nova purificação foi realizada, utilizando tanto o *void* da purificação em condições nativas quanto a fração insolúvel obtida após a lise. Para isso, as amostras em tampão nativo tiveram a adição de 8 M ureia, e foram purificadas em Ni-NTA em condições desnaturantes. Então, foi realizada a diálise, separadamente, dos eluatos em condições nativas e desnaturantes, e posteriormente os eluatos foram quantificados pelo método de Bradford (Tabela 3). Considerando 500 μ L para cada eluato, para uma cultura de 2 L foi obtido o rendimento de 1,87 mg/L.

Tabela 3: Concentração de proteína obtida após purificação em Ni-NTA em condições nativas e desnaturantes.

Eluato	Condições Nativas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Condições Desnaturantes ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	0,61	0,51
2	1,70	0,47
3	1,21	0,60
4	0,71	0,56
5	0,55	0,56

Valores referentes a quantificação de proteínas totais por método de Bradford.

Entretanto, ao analisar 10 μL de cada um dos eluatos da tabela 3 por meio de SDS-PAGE e coloração com azul de coomassie, foi constatada a presença de proteínas contaminantes, que foram co-purificadas (Figura 8). A UBA52 foi detectada apenas nos eluatos E2 e E3 (asteriscos) da purificação em condições nativas, devido sua maior concentração, e em consequência, maior massa aplicada no gel. Isso indica que o método de Bradford quantificou principalmente as proteínas co-purificadas, e dessa forma, a verdadeira concentração de UBA52 em cada eluato foi superestimada.

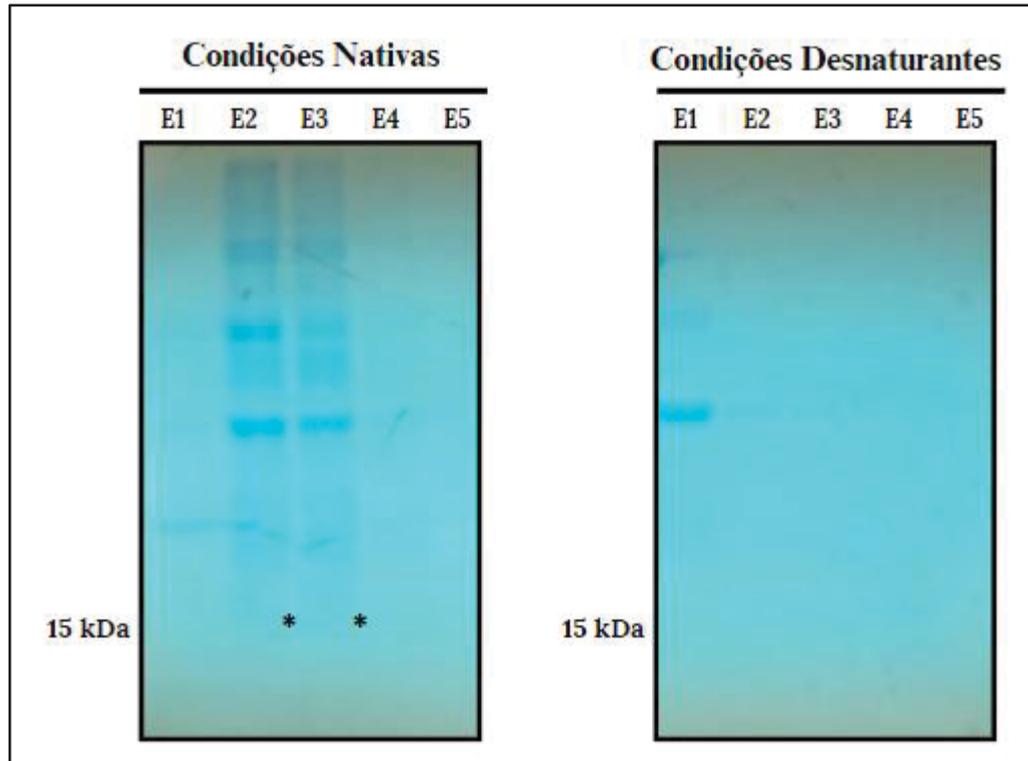


Figura 8 - UBA52 recombinante não é purificada de maneira satisfatória por coluna de Ni-NTA. Foram aplicados 10 μ L de cada eluato (1-5) das purificações em condições nativas e desnaturantes (concentração de cada disponível na Tabela 3). SDS-PAGE 15% corado com 0,2% azul de coomassie. Asteriscos indicam bandas na altura esperada para a proteína UBA52 recombinante.

Como o objetivo era conseguir detectar a clivagem da UBA52 pela USP2a através de SDS-PAGE corado com azul de coomassie, foi então analisada quantidades crescentes (1 a 10 μ g) de proteínas totais presentes da fração de eluição E2 nativo, para identificar em qual massa seria possível visualizar de maneira satisfatória a proteína UBA52 recombinante (Figura 9). Com o aumento progressivo da massa total de proteínas, é possível perceber a intensificação das bandas referentes a proteínas co-purificadas, e a partir de 2 μ g é possível visualizar bandas na altura de 15 kDa, e que corresponderiam ao da massa molecular esperada da proteína UBA52 recombinante (Figura 9). Devido à alta concentração de proteínas contaminantes, não é possível identificar qual das duas bandas realmente é referente à UBA52. Para obter uma solução de UBA52 com maior pureza seria interessante associar o método em Ni-NTA com outra técnica cromatográfica.

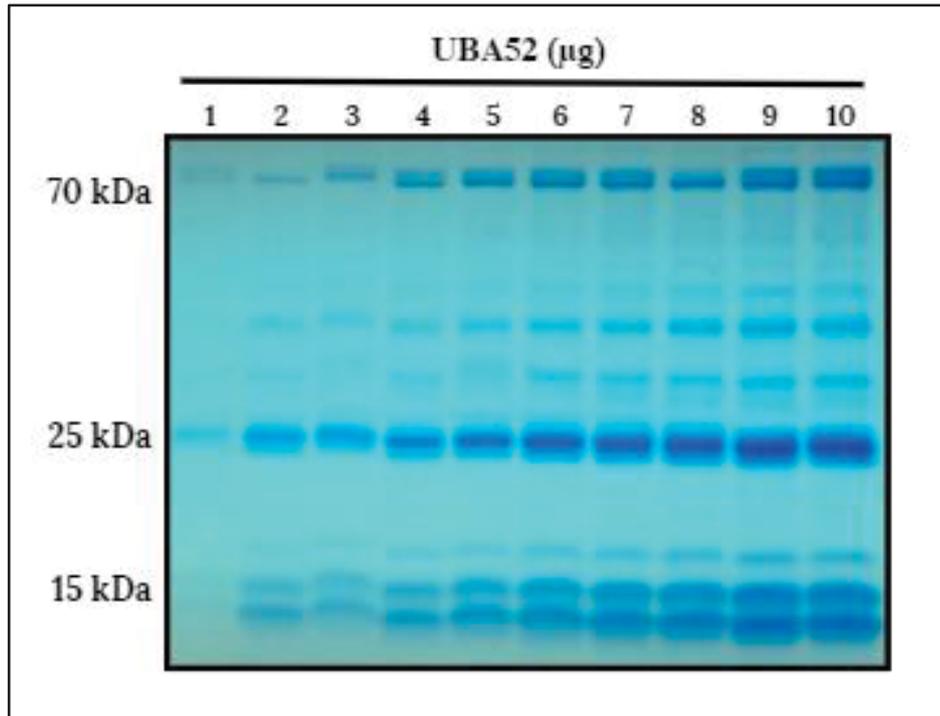


Figura 9 - UBA52 é purificada com alta concentração de proteínas contaminantes. Gradiente de proteínas (1-10 µg) do eluato 2 (E2) nativo. SDS-PAGE gradiente descontinuo 10-15% corado com 0,2% azul de coomassie.

4.3 CLIVAGEM DE UBA52 PELA USP2A RECOMBINANTE

Como todos os trabalhos que avaliaram a atividade da USP2 utilizaram apenas o seu sítio catalítico, foi necessário avaliar a capacidade da USP2a recombinante em sua forma inteira de clivar UBA52 (HASSIEPEN et al., 2007; WANG et al., 2017). Ainda, como pela primeira vez foi utilizado dessa metodologia para expressar USP2a recombinante, foi essencial garantir que a proteína obtida apresenta atividade catalítica e testar em quais condições isso ocorre. Para isso, foi realizado o ensaio de clivagem da UBA52, um substrato de USP2a já descrito na literatura, em diferentes concentrações de USP2a (Figura 10) (WANG et al., 2017).

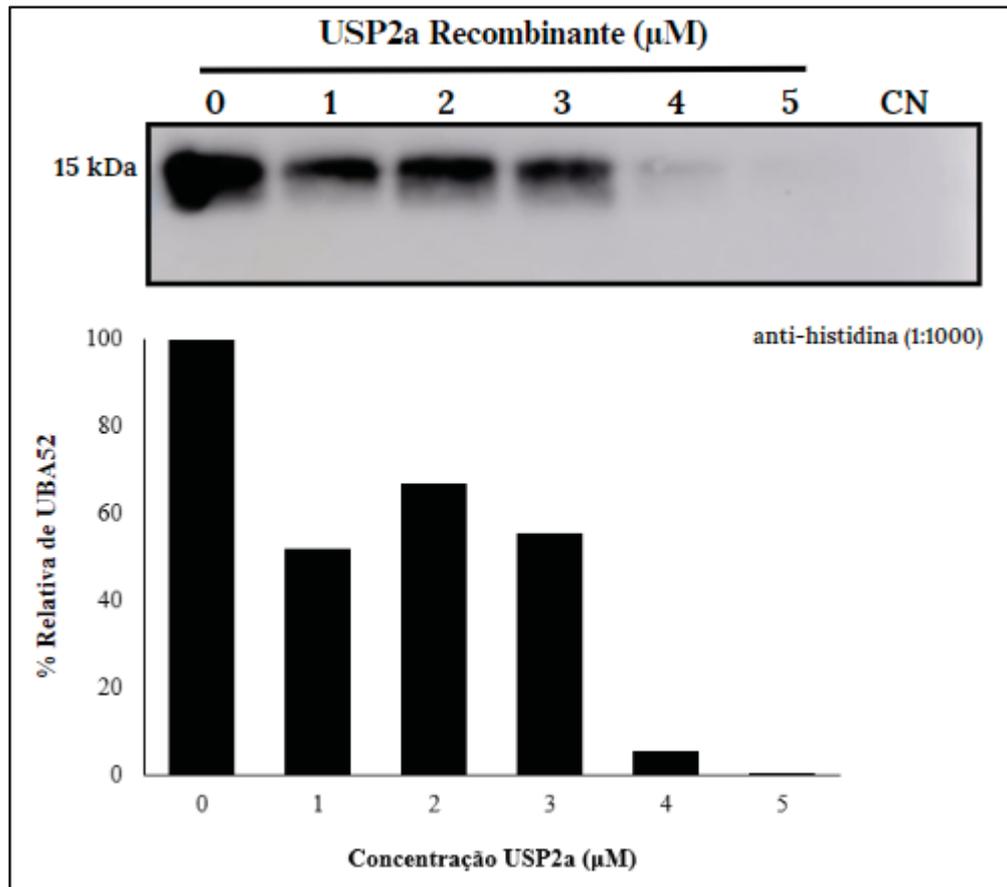


Figura 10 - USP2a recombinante tem atividade enzimática. Ensaio de deubiquitinação para avaliar a capacidade da USP2a (1 – 5 μM) de clivar UBA52 (1 μg do E2 nativo). Controle negativo (CN) não teve a adição de substrato durante a reação. SDS-PAGE 15% transferido para membrana de nitrocelulose, incubado com o anticorpo primário anti-histidina. (B) Representação gráfica dos valores relativos de densitometria obtidos das bandas da imagem superior. Densitometria realizada pelo software ImageJ a partir da intensidade de sinal emitido em cada condição.

Desde a primeira concentração de USP2a testada (1 μM) já é possível perceber queda no sinal da UBA52, indicando que esse substrato sofreu clivagem, e essa queda é acompanhada pelo aumento da concentração de USP2a, onde a partir de 4 μM de USP2a menos de 10% do sinal do precursor foi visto. A UBA52 foi quase completamente clivada em 5 μM de USP2a, indicando que a proteína produzida tem atividade enzimática (Figura 10). Quando clonado apenas o sítio catalítico da USP2 (USP2cc), menores concentrações de enzima foram necessárias para consumir totalmente mais que o dobro do substrato, em um estudo de Wang e colaboradores, com 50 nM USP2cc não foi mais possível detectar a UBA52, apenas um dos seus produtos de clivagem, a ubiquitina (WANG et al., 2017). Mesmo em SDS-PAGE 15% (razão bisacrilamida/acrilamida 1:19) não foi possível detectar ubiquitina e a proteína

L40, produtos da clivagem da UBA52, devido sua baixa massa molecular (aproximadamente 7 kDa).

4.4 ATIVIDADE DE USP2A SOBRE OUTROS PRECURSORES DE UBIQUITINA

Sabendo que a USP2a recombinante estava enzimaticamente ativa, foi testado sua capacidade de clivar outros precursores de ubiquitina presentes em mamíferos. Para isso foi utilizado as proteínas recombinantes UBA80, HsUBB e MmUBB, produzidas por outros membros do grupo.

O gene *Uba80* codifica uma proteína ribossomal, a S27A, fusionada a uma ubiquitina, enquanto os genes *UBB* formam cadeias de poliubiquitinas, sendo que as HsUBB e MmUBB são provenientes dos genes humano e camundongo, respectivamente (GROU et al., 2015). Foi realizado um ensaio de deubiquitinação desses precursores a partir de 1 µg das proteínas purificadas e 5 µM de USP2a recombinante (Figura 11).

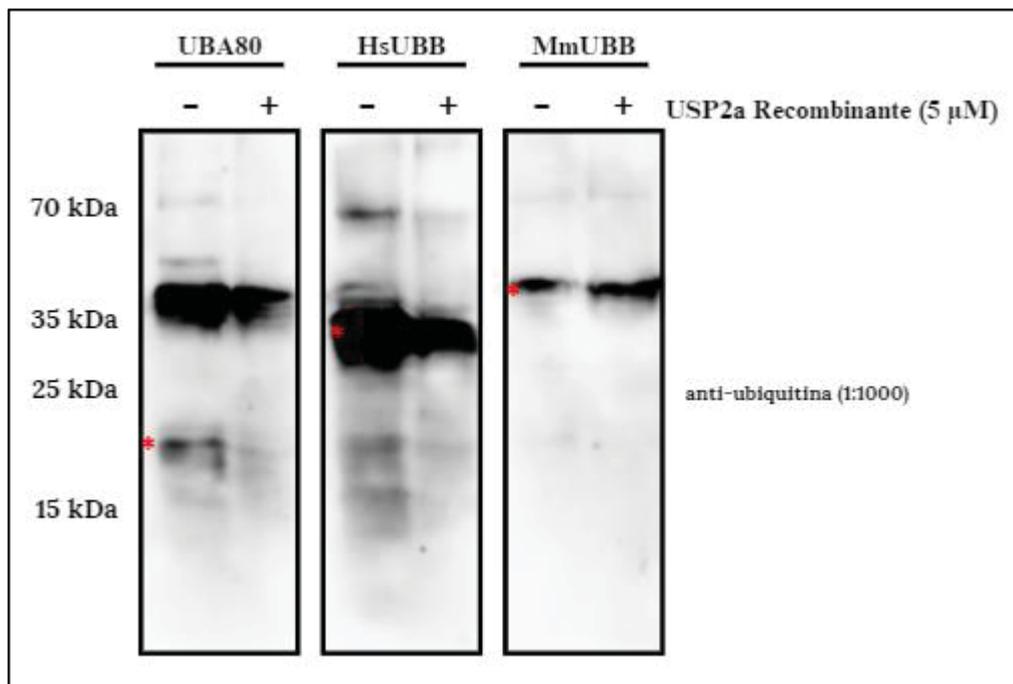


Figura 11 - USP2a tem atividade em diferentes precursores de ubiquitina. Ensaio de deubiquitinação dos precursores de ubiquitina UBA80, HsUBB e MmUBB. Para cada reação foi utilizado 1 µg do precursor e 5 µM USP2a. SDS-PAGE 15% transferido para membrana de nitrocelulose, incubado

com o anticorpo primário anti-histidina. Asteriscos vermelhos indicam o peso molecular esperado para cada um dos precursores de ubiquitina.

A deubiquitinase USP2a foi capaz de clivar parcialmente os precursores UBA80 e HsUBB, conseguindo diminuir o sinal nas condições com a enzima quando comparado com os precursores isoladamente (Figura 11). O papel da USP2a na clivagem desses precursores não está descrito na literatura, e um melhor entendimento desse processo pode ser interessante visto a importância da UBA80 em alguns contextos fisiológicos como o reparo de DNA e em patologias, como o câncer (LEE et al., 2023; LI et al., 2023). Para a UBB⁺¹, uma forma mutada da HsUBB com importância em doenças neurodegenerativas, a USP2 teve atividade catalítica, porém, neste estudo, não houve diferenciação entre as isoformas da USP2 (CHOJNACKI et al., 2016). A USP2a não teve atividade catalítica visível no precursor MmUBB, sendo necessário mais repetições para melhores conclusões sobre esse efeito.

4.5 ATIVIDADE DEUBIQUITINASE DE CÉLULAS SUPEREXPRESSANDO USP2

Foi avaliado também o padrão de clivagem dos precursores ao serem incubados com extratos celulares contendo as isoformas USP2a e USP2b superexpressas. Para isso, a linhagem 293T foi transfectada em quatro diferentes condições: 293T^{EV+}, 293T^{USP2a+}, 293T^{USP2a mt+} (mutante catalítico C276A) e 293T^{USP2b+}, sendo também feita uma condição não transfectada, para controle. As células foram lisadas 24h após a transfecção, seu extrato foi quantificado, e 50 µg de proteínas totais foram utilizados para o ensaio de deubiquitinação *in vitro* (Figura 12).

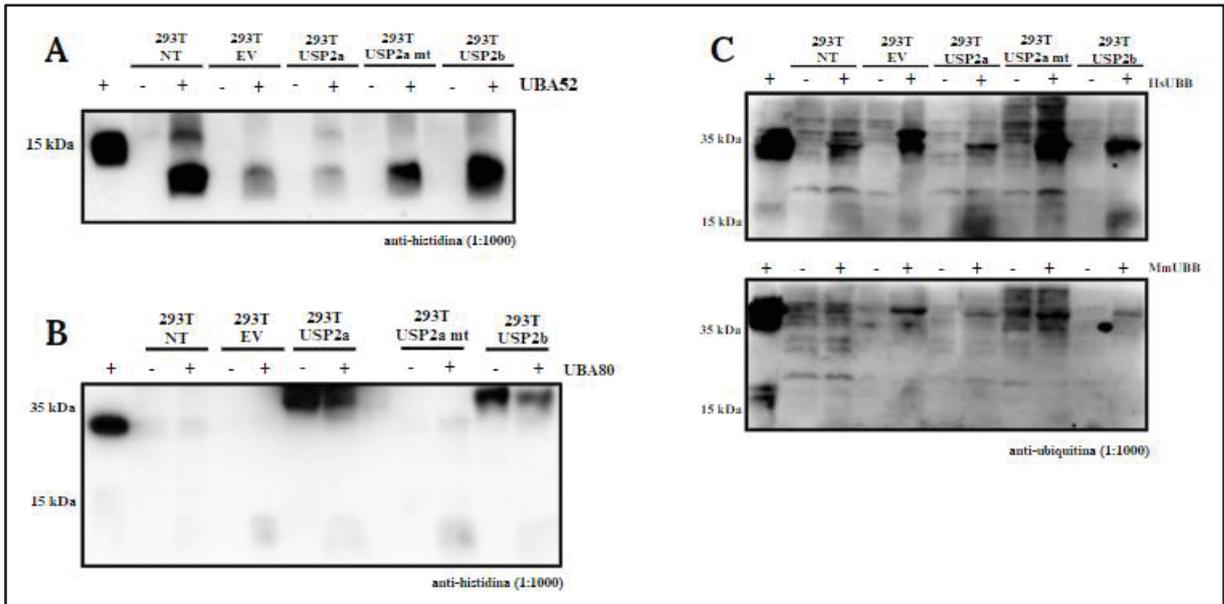


Figura 12 – Deubiquitinação de precursores de ubiquitina por extratos de 293T. Ensaio de deubiquitinação utilizando 50 µg dos extratos celulares nas condições: não transfectada (NT), vetor vazio (EV), USP2a, USP2a C276A (USP2a mt) e USP2b, e 1 µg dos precursores de ubiquitina: (A) UBA52, (B) UBA80 e (C) HsUBB e MmUBB. SDS-PAGE 15% transferido para membrana de nitrocelulose, incubado com o anticorpo primário anti-histidina (A-B) e anti-ubiquitina (C).

Na figura 12 pode ser observado que para todos os precursores testados, todas as condições de extratos de células 293T apresentaram alguma atividade deubiquitinase, mesmo em extratos de células que não foram transfectadas (NT) ou que receberam o vetor vazio (EV). As células não transfectadas provavelmente expressam endogenamente diferentes deubiquitinases que poderiam, nas condições experimentais aqui empregadas, também clivar os precursores purificados. De fato, já foi demonstrado experimentalmente que o lisado total de fígados de camundongo tem atividade deubiquitinante sobre estes mesmos precursores (GROU et al., 2015), indicando que o mesmo pode estar acontecendo com os lisados de células 293T. Ainda, a abundância de DUBs pode variar de centenas a centenas de milhares dentro de uma única célula, dependendo do tipo celular e das suas condições metabólicas, garantindo às células uma alta atividade de deubiquinases endógenas (CLAGUE; URBÉ; KOMANDER, 2019).

A reação de fundo visível nas reações que utilizaram anti-ubiquitina (Figura 12C) pode ser resultado da presença de outras proteínas ubiquitinadas em 50 µg de extrato que foram utilizados. Entretanto, é possível visualizar a presença das poliubiquitinas devido seu sinal mais intenso devido sua maior expressão quando

comparadas a essas outras proteínas. O uso do anticorpo primário anti-ubiquitina permite a visualização das bandas referentes a clivagem da cadeia poliubiquitina.

As células 293T^{USP2a mt+} superexpressam a USP2a mutada, a USP2a^{C276A} que não apresentam atividade catalítica. De forma interessante, as poliubiquitinas HsUBB e MmUBB tiveram uma menor clivagem quando expostas ao extrato 293T^{USP2amt+}, sugerindo que este mutante possa competir com as DUBs endógenas pelo acesso ao substrato (Figura 12C). Essa possível atividade dominante negativa da USP2a^{C276A}, sobre a forma selvagem da USP2a, já foi observada anteriormente pelo nosso grupo em ensaios de estabilização do EGFR, um dos alvos da USP2a. Em células HeLa, a superexpressão da USP2a cataliticamente nula resultava em uma maior taxa de degradação do EGFR quando comparada às células transfectadas com vetor vazio (LIU et al., 2013). Na figura 12C, aparentemente o mutante se liga ao precursor, impedindo a ação deubiquitinante das DUB endógenas. Para entender melhor este efeito mais investigações utilizando a isoforma mutada precisam ser realizadas.

4.6 VERIFICAÇÃO DA POTENCIALIDADE DE USO DA USP2A RECOMBINANTE EM ENSAIO DE CLIVAGEM DA UB-RHOD110-G

Por último, foi testado o uso da USP2a recombinante em ensaio de deubiquitinação, em placa de 96 poços, a partir da clivagem do substrato Ub-Rhod110-G. Essa metodologia é uma boa alternativa para ensaios de varredura em larga escala, por permitir sua execução em placas de múltiplos poços, o que permite a investigação simultânea de diferentes condições experimentais (e.g. concentração, pH, tampão, diversidade de amostras e compostos, etc) e ter uma baixa demanda de tempo para sua realização (CHO et al., 2020). A atividade deubiquitinase é medida através da clivagem da ubiquitina do substrato, tendo como produto a rodamina monossubstituída (Rho110-G) que quando excitada a 485 nm emite fluorescência, podendo ser captada por leitor fluorescente de placas (HASSIEPEN et al., 2007).

Para isso, as mesmas concentrações de USP2a utilizados nos ensaios anteriores (1-5 μ M) foram incubadas com 0,1 μ M Ub-Rhod110-G, em tampão de ensaio DUB-B e foi mensurado a intensidade de fluorescência emitida após 1 hora de reação (Figura

13). Como pode ser visto na figura 13, o aumento da intensidade do sinal foi dependente da concentração de USP2a, mostrando uma maior taxa de hidrólise da Ub-Rhod110-G, dose-dependente. Mesmo na menor concentração de enzima, foi mensurado uma alta intensidade de fluorescência, indicando que concentrações ainda menores dessa enzima podem ser utilizadas com a finalidade de visualizar a sua atividade. A atividade da proteína recombinante com apenas o sítio catalítico da USP2 foi avaliada a partir desse método, e após variar a concentração dessa enzima de 0 a 250 pM, os autores escolheram a concentração de 120 pM para utilizar nos ensaios (HASSIEPEN et al., 2007). Dessa forma, concentrações menores da proteína USP2a precisam ser testadas, de forma a demandar uma menor quantidade de proteína purificada para realizar uma maior quantidade de ensaios.

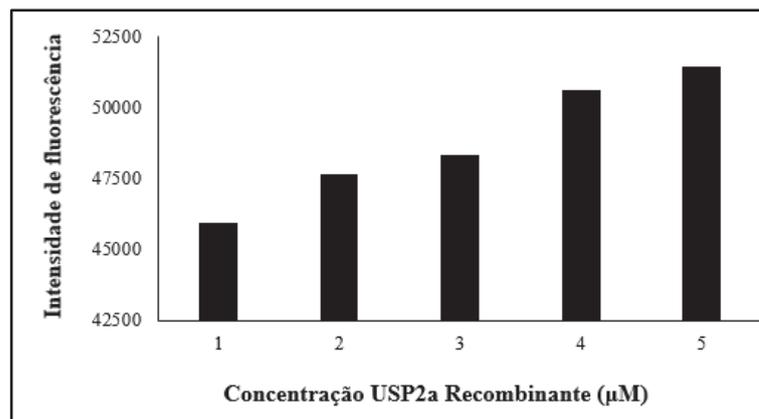


Figura 13 – Clivagem de Ub-Rhod110-G pela USP2a. Ensaio de deubiquitinação de 0,1 μM Ub-Rhod110-G pela enzima USP2a (1-5 μM) em placa de 96 poços. Sinal de fluorescência em unidades arbitrárias (AU). Dados gerados a partir de uma replicata, normalizados a partir do controle sem a presença da enzima USP2a.

A capacidade de hidrólise da Ub-Rhod110-G pela USP2a ao longo de 1 hora também foi mensurada, a partir das mesmas concentrações de enzima e substrato (Figura 14). A partir de 3 μM a atividade da USP2a seguiu o mesmo padrão, entrando em um platô em menos de 30 minutos de reação. Com 1 μM USP2a a intensidade de fluorescência teve uma latência em chegar ao platô, entretanto ainda foi possível avaliar a progressão do sinal de fluorescência ao longo do tempo.

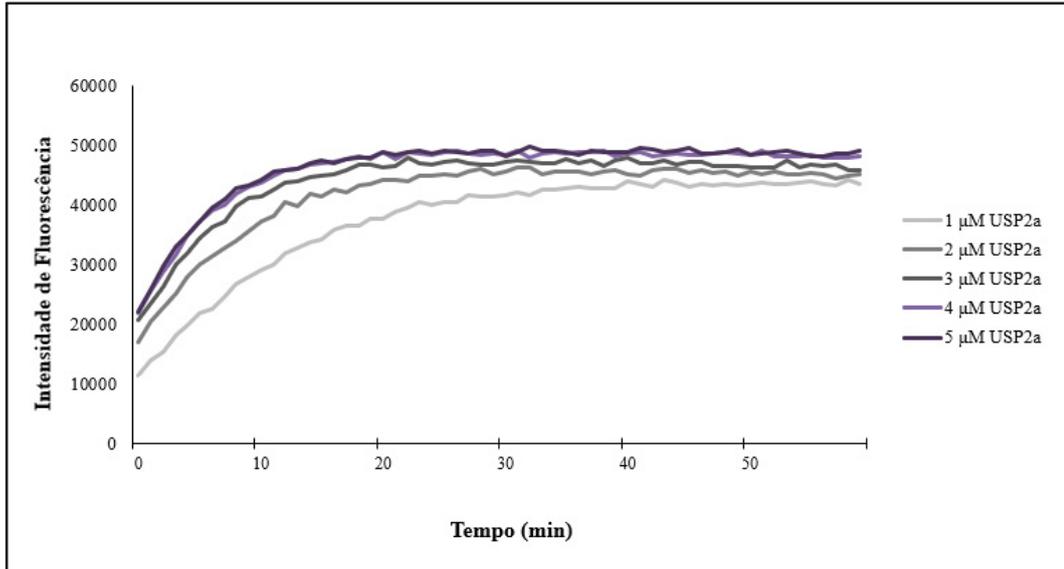


Figura 14 - Clivagem de Ub-Rhod110-G ao longo de 60 minutos pela USP2a. Substrato Ub-Rhod110-G (0,1 µM) e USP2a (1-5 µM) em tampão DUB C foram adicionados em placa de 96 poços e a fluorescência medida (AU) a cada minuto por 1 hora. Dados gerados a partir de uma replicata, normalizados a partir do controle sem a presença da enzima USP2a.

O ensaio em placa a partir da clivagem de Ub-Rhod110-G mostrou aplicabilidade no estudo da atividade da USP2a, entretanto, ensaios adicionais deverão ser realizados para caracterizar melhor a cinética dessa enzima. Por possibilitar a diversidade de condições em um único ensaio, com o uso de placas de múltiplos poços, essa metodologia pode ser utilizada para varredura em bibliotecas de compostos em busca de inibidores específicos da USP2a.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As enzimas deubiquitinases USP2a estão relacionadas com diversas patologias como neoplasias de próstata, fígado, rins e bexiga sendo um importante potencial alvo terapêutico dessas doenças. Entretanto, ainda não há na literatura a descrição de algum composto com capacidade de inibir seletivamente a ação dessa proteína, podendo agir como uma alternativa terapêutica nessas doenças. Uma possibilidade na busca de inibidores da USP2a é através da varredura de biblioteca de compostos, onde de forma rápida, diferentes compostos podem ser testados quando a capacidade de inibir ou não a atividade dessa proteína.

A obtenção da proteína USP2a recombinante, enzimaticamente ativa, neste estudo, possibilita essa busca de inibidores, onde a atividade da USP2a pode ser mensurada através de ensaio em placa, permitindo que uma grande quantidade de compostos seja testada, mas também através a partir da clivagem do seu substrato UBA52. Além disso, esse trabalho contribuiu para a otimização da expressão dessa proteína em frações solúveis, permitindo também o uso dessa proteína para outras finalidades.

A capacidade da USP2a em clivar os precursores de ubiquitina UBA80 e HsUBB não está descrita na literatura, e através do ensaio preliminar realizado neste trabalho, sugere-se a atividade dessa enzima nesses precursores. Para um melhor entendimento desse processo novos ensaios de deubiquitinação devem ser realizados, visando caracterizar melhor a interação entre essas proteínas.

A partir de extratos celulares de 293T expressando a USP2a mutada foram obtidos mais indícios da ação dessa proteína como dominante negativo, impedindo a clivagem do precursor HsUBB, resultando em sua maior concentração quando comparado ao extrato não transfectado. Esse dado reforçou outro dado da literatura mostrando que a mutação de USP2a além de não apresentar a atividade biológica da sua forma canônica, impede a ação de deubiquitinases sobre seus substratos. Apesar de precisar mais repetições para confirmar esse efeito, esse resultado preliminar abre portas para uma outra linha de investigação sobre como essa ação como dominante-negativo pode estar acontecendo.

Por fim, esse trabalho também trouxe verificação do uso da USP2a no ensaio de clivagem de Ub-Rhod110-G, o que será de extrema importância para futuros projetos de nosso grupo de pesquisa visando o uso dessa metodologia para realizar a varredura de bibliotecas de compostos, com o intuito de buscar inibidores da seletivos da USP2a, ou até mesmo como uma técnica de refinamento após a varredura a partir do uso isolado do sítio catalítico da USP2. Empregando a metodologia utilizada neste estudo, em um único dia de trabalho, mais de 465 compostos podem ser avaliados quanto sua atividade inibitória à USP2a.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHATWA, A. et al. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 1–18, 10 fev. 2021.

BLAY, V. et al. High-Throughput Screening: today's biochemical and cell-based approaches. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 10, p. 1807–1821, 1 out. 2020.

CARROLL, E. C.; MARQUSEE, S. Site-specific ubiquitination: Deconstructing the degradation tag. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 73, n. 102345, p. 1–16, 1 abr. 2022.

CEN, X.; LI, Z.; CHEN, X. Ubiquitination in the regulation of autophagy. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 55, n. 9, p. 1348–1357, 16 ago. 2023.

CHO, J. et al. Assay systems for profiling deubiquitinating activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 1–16, 2020.

CHOJNACKI, M. et al. Characterizing polyubiquitinated forms of the neurodegenerative ubiquitin mutant UBB+1. **FEBS Letters**, v. 590, n. 24, p. 4573–4585, 1 dez. 2016.

CLAGUE, M. J.; URBÉ, S.; KOMANDER, D. Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 6, p. 338–352, 1 jun. 2019.

FANG, Y. Z. et al. Deubiquitination complex platform: A plausible mechanism for regulating the substrate specificity of deubiquitinating enzymes. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 13, n. 7, p. 2955–2962, 1 jul. 2023.

GAO, H. et al. Targeting ubiquitin specific proteases (USPs) in cancer immunotherapy: from basic research to preclinical application. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 42, n. 1, 1 dez. 2023.

GAO, L. et al. The mechanism of linear ubiquitination in regulating cell death and correlative diseases. **Cell Death and Disease**, v. 14, n. 10, 1 out. 2023.

GROU, C. P. et al. The de novo synthesis of ubiquitin: Identification of deubiquitinases acting on ubiquitin precursors. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–16, 3 ago. 2015.

GUO, Y. et al. Ubiquitin specific peptidases and prostate cancer. **PeerJ**, v. 11, p. 1–24, 16 fev. 2023.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HASSIEPEN, U. et al. A sensitive fluorescence intensity assay for deubiquitinating proteases using ubiquitin-rhodamine110-glycine as substrate. **Analytical Biochemistry**, v. 371, n. 2, p. 201–207, 2007.

JEE, S. C.; CHEONG, H. Autophagy/Mitophagy Regulated by Ubiquitination: A Promising Pathway in Cancer Therapeutics. **Cancers**, v. 15, n. 4, p. 1–27, 1 fev. 2023.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, 1 jan. 2018.

KITAMURA, H. Ubiquitin-Specific Proteases (USPs) and Metabolic Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 1–37, 1 fev. 2023.

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

LEE, S. O. et al. UBA80 and UBA52 fine-tune RNF168-dependent histone ubiquitination and DNA repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 8, p. 1–15, 1 ago. 2023.

LI, J.; LIU, S.; LI, S. Mechanisms underlying linear ubiquitination and implications in tumorigenesis and drug discovery. **Cell Communication and Signaling**, v. 21, n. 1, p. 1–17, 1 dez. 2023.

LI, Y.; LI, S.; WU, H. Ubiquitination-Proteasome System (UPS) and Autophagy Two Main Protein Degradation Machineries in Response to Cell Stress. **Cells**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 1 mar. 2022.

LI, Y.; LI, S.; WU, H. **Ubiquitination-Proteasome System (UPS) and Autophagy Two Main Protein Degradation Machineries in Response to Cell Stress.** **CellsMDPI**, , 1 mar. 2022.

LI, Y.; REVERTER, D. Molecular mechanisms of dubs regulation in signaling and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1–26, 1 fev. 2021.

LI, Z. et al. Chidamide and Oxaliplatin Synergistically Inhibit Colorectal Cancer Growth by Regulating the RPS27A-MDM2-P53 Axis. **OncoTargets and Therapy**, v. 16, p. 703–721, 2023.

LIANG, P.; ZHANG, J.; WANG, B. Emerging Roles of Ubiquitination in Biomolecular Condensates. **Cells**, v. 12, n. 18, p. 1–14, 1 set. 2023.

LIANG, X. W. et al. A review of deubiquitinases and thier roles in tumorigenesis and development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, p. 1–9, 2023.

LIM, S. M.; NAHM, M.; KIM, S. H. Proteostasis and Ribostasis Impairment as Common Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. **Journal of Clinical Neurology (Korea)**, v. 19, n. 2, p. 101–114, 1 mar. 2023.

LIU, Z. et al. The ubiquitin-specific protease USP2a prevents endocytosis-mediated EGFR degradation. **Oncogene**, v. 32, n. 13, p. 1660–1669, 28 mar. 2013.

LONGO, P. A. et al. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). **Methods in Enzymology**, v. 529, p. 227–240, 2013.

NIELSEN, P. Y. Ø.; OKARMUS, J.; MEYER, M. Role of Deubiquitinases in Parkinson's Disease—Therapeutic Perspectives. **Cells**, v. 12, n. 4, p. 1–30, 1 fev. 2023.

PAEZ, H. G.; PITZER, C. R.; ALWAY, S. E. Age-Related Dysfunction in Proteostasis and Cellular Quality Control in the Development of Sarcopenia. **Cells**, v. 12, n. 249, p. 1–30, 1 jan. 2023.

POPOVIC, D.; VUCIC, D.; DIKIC, I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. **Nature Medicine**, v. 20, n. 11, p. 1242–1253, 1 nov. 2014.

REN, J. et al. Deubiquitylating Enzymes in Cancer and Immunity. **Advanced Science**, v. 10, p. 1–37, 2023.

RIBEIRO, C. F. **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DA DEUBIQUITINASE USP2a**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2016.

ROCHA, R. S. **PRODUÇÃO DE BIOFERRAMENTAS PARA O ESTUDO DA DEUBIQUITINASE USP2**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2016.

SARNAIK, A. et al. High-throughput screening for efficient microbial biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 64, p. 141–150, 1 ago. 2020.

SATO, Y. et al. Involvement of heterologous ubiquitination including linear ubiquitination in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, p. 1–15, 16 jan. 2023.

SCHAUER, N. J. et al. Advances in Discovering Deubiquitinating Enzyme (DUB) Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 2731–2750, 26 mar. 2020.

SHEN, J. et al. Ubiquitin-specific peptidases: Players in bone metabolism. **Cell Proliferation**, v. 56, n. 8, p. 1–13, 1 ago. 2023.

SPRIESTERSBACH, A. et al. Purification of His-Tagged Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 559, p. 1–15, 20 jun. 2015.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein expression and purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.

TAHARA, N. et al. Boosting Auto-Induction of Recombinant Proteins in Escherichia coli with Glucose and Lactose Additives. **Protein & Peptide Letters**, v. 28, n. 10, p. 1180–1190, 6 ago. 2021.

THOMPSON, M. A.; DE-SOUZA, E. A. A Year at the Forefront of Proteostasis and Aging. **Biology Open**, v. 12, n. 2, p. 1–5, 15 fev. 2023.

TSENG, C. S. et al. Dysregulated proteostasis network in neuronal diseases. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1–10, 2023.

WANG, Z. et al. Development of a highly reliable assay for ubiquitin-specific protease 2 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 17, p. 4015–4018, 2017.

WILSON, D. M. et al. Hallmarks of neurodegenerative diseases. **Cell**, v. 186, n. 4, p. 693–714, 16 fev. 2023.

ZHANG, M.; SHAO, Y.; GU, W. The Mechanism of Ubiquitination or Deubiquitination Modifications in Regulating Solid Tumor Radiosensitivity. **Biomedicines**, v. 11, n. 12, p. 24, 1 dez. 2023.

ZHANG, S. et al. Targeting the deubiquitinase USP2 for malignant tumor therapy. **Oncology Reports**, v. 50, n. 4, p. 1–19, 1 out. 2023.

WAZHANG, X. et al. Dysregulation and oncogenic activities of ubiquitin specific peptidase 2a in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. **American Journal of Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 2392–2409, 2023.