

Michelle Agostini

Cirurgiã-Dentista

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA DESUBIQUITINANTE
USP2a E DE SUA INTERAÇÃO COM A PROTEÍNA CLATRINA EM
CÉLULAS DERIVADAS DE CARCINOMAS ESPINOCELULARES
BUCAIS E DE PRÓSTATA HUMANOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Estomatopatologia na área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

PIRACICABA

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Ag75e	Agostini, Michelle. Estudo da expressão da enzima desubiquitinante USP2a e de sua interação com a proteína clatrina em células derivadas de carcinomas espinocelulares bucais e de próstata humanos. / Michelle Agostini. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007. Orientador: Edgard Graner. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Boca – Câncer. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Enzimas. 4. Ácidos graxos. 5. Clatrina. 6. Patologia bucal. 7. Biologia molecular. I. Graner, Edgard. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: Expression of USP2a and study of its interaction with clathrin in human oral squamous carcinoma and prostate cancer cells

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Mouth – Cancer. 2. Carcinoma, squamous cell. 3. Enzymes. 4. Fatty acids. 5. Clathrin. 6. Oral pathology. 7. Molecular biology

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Edgard Graner, Fábio Daumas Nunes, Karina Gottardello Zecchin, Pablo Agustin Vargas, Ricardo Della Coletta

Data da Defesa: 28-09-2007

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 28 de Setembro de 2007, considerou a candidata MICHELLE AGOSTINI aprovada.

PROF. DR. EDGARD GRANER

PROF. DR. FÁBIO DAUMAS NUNES

PROFª. DRA. KARINA GOTARDELLO ZECCHIN

PROF. DR. PABLO AGUSTIN VARGAS

PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

*Aos meus pais, **Luiz Antonio** e **Terezinha**, meus exemplos de caráter, lealdade, ética e de respeito às pessoas, por todo amor e dedicação e pelo apoio incondicional em todos os momentos.*

*Ao meu irmão **Luís Fernando** e a minha cunhada **Roberta**, grandes amigos e colegas de profissão, por todo o incentivo.*

*Ao **Mario**, com muito carinho, por ser tão especial em minha vida, por compartilhar todos os momentos e sonhos, que estão sempre presentes, sempre vivos. Estes, com certeza, se realizarão.*

Ao **Professor Edgard Graner**, grande exemplo de pessoa, pesquisador e professor, que com toda sua paciência e tranquilidade soube me conduzir de forma segura neste caminho. Agradeço pela oportunidade de ter sido sua orientada e pela confiança em mim depositada. Meu eterno respeito, gratidão e admiração.

AGRADECIMENTOS

Esta tese foi construída e realizada com o apoio infinito de muitas pessoas e instituições, dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**;

Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos Profs. **Drs. Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Jacks Jorge Júnior e Oswaldo Di Hipólito Júnior**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por todos os ensinamentos transmitidos;

À **Universidade do Planalto Catarinense – UNIPLAC**, pelo apoio contínuo e pela preocupação no investimento e na qualificação de seu corpo docente, possibilitando meu afastamento para a realização do Mestrado e Doutorado;

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de doutorado (processo nº 04/06397-0);

Ao **Dr. Massimo Loda**, do *Dana-Farber Cancer Institute*, por possibilitar a realização do estágio em seu laboratório e pelo suporte financeiro concedido durante todo o período. Uma oportunidade única e de grande aprendizado para minha vida profissional e pessoal;

Aos colegas de turma do Doutorado **Dawton, Eduardo e Sabrina** pelos bons momentos vividos durante o curso. Em especial ao **Jorge**, exemplo de dedicação,

pelos valiosos momentos de estudo desde o início do mestrado e por sua disposição e entusiasmo em transmitir seus conhecimentos aos colegas;

À **Ana Lúcia**, pela grande amizade construída no decorrer destes últimos anos e pela valiosa contribuição durante os experimentos no laboratório de biologia molecular;

Aos amigos e companheiros do laboratório **Carol, Débora, Fabiana, Laís, Livia, Marco, Maria Fernanda e Michele**, por toda a colaboração e companhia, pelos momentos de estudo e também pelos muitos momentos de “descontração” que compartilhamos;

Aos demais alunos da pós-graduação em Estomatopatologia, amigos e colegas, pela amizade e agradável convivência;

Aos amigos **Raffaella Zamponi** do laboratório do Dr. Massimo Loda, **Dolores Di Vizio** do laboratório do Dr. Michael Freeman, **Venkata Sabbiseti** do laboratório da Dra. Sabina Signoretti e **Adriana Tron** do laboratório do Dr. James DeCaprio, pessoas de muito boa vontade, pela paciência e ajuda na realização dos experimentos e por todos os conhecimentos transmitidos durante o estágio no *Dana-Farber Cancer Institute*;

Aos demais amigos e colegas do laboratório do Dr. Massimo Loda, por terem me recebido de forma tão gentil e pelos agradáveis momentos de convivência;

À **Ana Cristina do Amaral Godoy**, técnica do laboratório de Patologia e à funcionária **Selma Domingos do Nascimento**, grandes amigas com quem pude contar em todos os momentos de alegria e aflição;

Aos demais funcionários do laboratório de Patologia, **Valéria Alessandra Prado Defávri Franco, Adriano Luís Martins, João Carlos Gomes da Silva Júnior,**

Rosa Maria Fornasier e a funcionária do Orocentro **Sra. Aparecida Conceição** **Campion**, pelo auxílio, colaboração e generosidade;

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e compartilharam desta caminhada, que será para sempre um marco em minha vida pessoal e profissional.

“Experiência de vida, algumas vitórias e decepções vão mostrando qual é o caminho. E o caminho é este: compartilhar, ser solidário, competir sadiamente uns com os outros para que possamos crescer”.

(Bernardo Rocha de Rezende)

“O que existe é só uma pequena parte do que é possível”.

(Pere Alberch)

AGOSTINI, M. **Estudo da expressão da enzima desubiquitinante usp2a e de sua interação com a proteína clatrina em células derivadas de carcinomas espinocelulares bucais e de próstata humanos.** Piracicaba, 2007. [Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP].

O sistema ubiquitina-proteossomo degrada proteínas marcadas com etiquetas de Ub. A ubiquitinação é um processo reversível e moléculas de Ub podem ser desconjugadas pelas enzimas desubiquitinantes (DUBs), que evitam a degradação e aumentam a meia vida de seus substratos. A DUB USP2a foi identificada na próstata humana, é regulada por andrógenos e tem sua expressão aumentada em adenocarcinomas. USP2a protege a enzima ácido graxo sintase (FAS) da degradação, a qual é superexpressa em vários tipos de tumores, inclusive nos carcinomas espinocelulares (CECs) bucais. O objetivo deste trabalho foi estudar a expressão desta DUB e seu papel biológico em células derivadas de CECs bucais humanos. Foram detectados RNAs mensageiros para USP2a nas quatro linhagens celulares estudadas, principalmente nas linhagens SCC-4 e -15. Os níveis protéicos de USP2a foram semelhantes nas quatro linhagens, sendo ligeiramente maiores na SCC-9 e -25. Portanto, não foi encontrada uma correlação entre a quantidade de RNAs mensageiros e dos produtos protéicos de USP2a. Através de experimentos de imunofluorescência, demonstramos USP2a no citoplasma das células SCC-9, havendo uma concentração na região perinuclear em algumas células. A expressão forçada de USP2a nas células SCC-9 não conferiu vantagem proliferativa, no entanto, a superexpressão de um duplo-mutante parece ter diminuído a proliferação. Ao contrário do que ocorre nas células LNCaP, a inibição da expressão de USP2a através de RNAi nas células SCC-9 causou discreta indução de apoptose. O tratamento das células SCC-9 com diferentes concentrações do fator de crescimento epidérmico (EGF) foi capaz de modular a expressão de USP2a, interferindo na quantidade de formas ubiquitinadas de FAS. Também foi investigada neste trabalho a possível interação entre USP2a e a proteína clatrina. De acordo com resultados prévios de experimentos realizados no laboratório do Dr. Massimo Loda, no *Dana-Farber*

Cancer Institute, a cadeia pesada de clatrina é também substrato de USP2a. Clatrina é uma proteína que participa do processo de internalização e endocitose de proteínas localizadas na membrana plasmática. Demonstramos que USP2a e a cadeia pesada de clatrina estão co-localizadas no citoplasma de células AR-iPrEC e SCC-9 e que a produção de clatrina é regulada por andrógenos em células LNCaP. Houve uma maior produção de clatrina em células que superexpressam de forma estável USP2a. Um achado interessante foi que USP2a, além de presente no citoplasma, foi também encontrada na membrana plasmática de células LNCaP e o tratamento com EGF interferiu na localização sub-celular desta DUB, como ocorre com clatrina durante a endocitose. Estes resultados sugerem que USP2a participe do processo de endocitose mediada por clatrina.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular bucal, ácido graxo sintase, FAS, isopeptidase, enzima desubiquitinante, USP2a, USP2b, clatrina, cadeia pesada de clatrina

AGOSTINI, M. **Expression of USP2a and study of its interaction with clathrin in human oral squamous carcinoma and prostate cancer cells.** Piracicaba, 2007. [Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP].

The ubiquitin (Ub)-proteasome pathway controls cellular protein turnover by degrading targeted intracellular proteins tagged with poly-Ub chains. Ubiquitination is a reversible process and the deubiquitinating enzymes (DUBs) are proteases that specifically cleave off Ub from Ub-protein conjugates. They can act in a preproteasomal level removing the poly-Ub tag from specific substrates and preventing and modulating their degradation. The DUBs USP2a and USP2b were recently identified in the prostate of men and rats. USP2a is androgen-regulated, overexpressed in prostate cancer, and interacts with and stabilizes fatty acid synthase (FAS) and the protein murine double minute (Mdm2). FAS is overexpressed in several human malignancies, including oral squamous cell carcinoma, and is correlated with a poor prognosis for some tumors. Mdm2 is an Ub-protein ligase responsible for its own ubiquitination and ubiquitination of p53, that is degraded by the proteasome. When overexpressed in nontransformed cells USP2a exhibits oncogenic behavior both in vitro and in vivo and prevents apoptosis induced by chemotherapeutic agents. Considering that USP2a stabilizes FAS and Mdm2 and then protects tumoral cells from apoptosis, the purpose of the present study was to investigate the USP2a expression and its biological role in human oral squamous carcinoma cells. mRNAs for USP2a were detected in the four studied cell lines, mainly in SCC-4 and -15. The USP2a protein levels were similar in all cell lines, being slightly higher in SCC-9 and -25. By using immunofluorescence we showed that USP2a is located in the cytoplasm of SCC-9 cells and eventually concentrated around the nuclei. No significant differences were found in the proliferative rates of USP2a overexpressing SCC-9 cells, however, cells overexpressing mutant USP2a had lower proliferative potential. In contrast with LNCaP cells, USP2a silencing by siRNA slightly induced apoptosis.

The treatment with different concentrations of EGF was able to modulate the USP2a expression in SCC-9 cells and change the amount of ubiquitinated forms of FAS. We also show in the present study experiments performed in the laboratory of Dr. Massimo Loda at the Dana-Farber Cancer Institute, in which the possible interaction between USP2a and clathrin was analyzed. Clathrin is involved in the internalization and endocytosis of proteins located in at the plasma membrane. Here we show that USP2a and clathrin heavy chain colocalize in the cytoplasm of AR-iPrEC and SCC-9 cells and that clathrin protein expression is regulated by androgens in LNCaP cells. We found higher amounts of clathrin in cells that stably express USP2a than in the controls. USP2a was found at the plasma membrane in LNCaP cells and after EGF stimulation a granular positivity for USP2a was observed in the cytoplasm. These results suggest that USP2a may have a role in the clathrin mediated endocytosis.

Key words: Squamous cell carcinoma, fatty acid synthase, FAS, isopeptidase, deubiquitinating enzymes, USP2a, USP2b, clathrin, clathrin heavy chain.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMSH	<i>do inglês associated molecule with the SH3 domain of STAM</i>
AMSH-LP	<i>do inglês AMSH-like protein</i>
AR-iPrEC	<i>do inglês immortalized AR-expressing prostate epithelial cells</i>
ATCC	<i>do inglês american type culture collection</i>
ATP	<i>do inglês adenosine 5'-triphosphate</i>
c-Cbl	<i>do inglês casitas B-lineage lymphoma</i>
cDNA	<i>do inglês complementary DNA</i>
CEC	carcinoma espinocelular
CHIP	<i>do inglês carboxyl terminus Hsc70-interacting protein</i>
c-PARP	<i>do inglês clivada Poly ADP-ribose polymerase</i>
CT	<i>do inglês cycle threshold</i>
C-terminal	carboxi terminal/ COOH-terminal
D-MEM	<i>do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
D-MEM/F-12	<i>do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Ham's Nutrient Mixture F-12, 1:1</i>
DMSO	<i>do inglês dimethylsulfoxide</i>
DNA	<i>do inglês deoxyribonucleic acid</i>
DNAse	<i>do inglês deoxyribonuclease</i>
dNTP	<i>do inglês deoxynucleoside 5' triphosphate</i>
DEPC	<i>do inglês diethylpyrocarbonate</i>
DHT	dihidrotestosterona
DTT	<i>do inglês 1,4-dithiothreitol</i>
DUBs	<i>do inglês deubiquitinating enzymes</i>
EDTA	<i>do inglês ethylenediamine tetraacetate</i>
EEA1	<i>do inglês early endosome antigen 1</i>
EGF	<i>do inglês epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>do inglês enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>do inglês epidermal growth factor receptor</i>
Eps15	<i>do inglês epidermal growth factor pathway substrate 15</i>
ESCRT	<i>do inglês endosomal sorting complex required for transport</i>
FAS	<i>do inglês fatty acid synthase</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBS	<i>do inglês fetal bovine serum</i>
FITC	<i>do inglês fluorescein isothiocyanate</i>
FOP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba
GAPDH	<i>do inglês glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GSEA	<i>do inglês gene set enrichment analysis</i>
Hrs	<i>do inglês hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate</i>
JAMM/MPN	<i>do inglês JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme</i>
kDa	<i>do inglês kilodalton</i>

M	molar
MAPK	do inglês <i>mitogen activated protein kinase</i>
Mdm2	do inglês <i>murine double minute</i>
MJD	do inglês <i>Machado-Joseph Domain</i>
MgCl ₂	do inglês <i>magnesium chloride</i>
MEM-α	do inglês <i>mimum essential médium-α medium</i>
NEM	N-etilmaleimida
N-terminal	amino-terminal/NH ₂ -terminal
OTU	do inglês <i>Ovarian Tumor Related</i>
PBS	do inglês <i>phosphate bufferes saline</i>
pb	pares de bases
PCR	do inglês <i>polimerase chain reaction</i>
PI3K	do inglês <i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>
PMSF	do inglês <i>phenylmethysulfonyl fluoride</i>
PrEBM	do inglês <i>prostate epithelial cell basal medium</i>
RA	receptor de andrógeno
RNA	do inglês <i>acid ribonucleic</i>
RNAi	do inglês <i>RNA interference</i>
RNAse	do inglês <i>ribonuclease</i>
RPMI	do inglês <i>Park Memorial Institute - Media 1640</i>
RT-PCR	do inglês <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SAP	do inglês <i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SCC	do inglês <i>squamous cell carcinoma</i>
SDS	do ingles <i>sodium Dodecyl Sulphate</i>
SREBP	do inglês <i>sterol regulatory element binding protein</i>
STAM	do inglês <i>signal transducing adaptor molecule</i>
U	Unidade
Ub	Ubiquitina
UBC	do inglês <i>ubiquitin conjugating</i>
UBP	do inglês <i>ubiquitin processing proteases</i>
UBPY	do inglês <i>Ub-specific protease Y</i>
UCH	do inglês <i>ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases</i>
USP	do inglês <i>ubiquitin specific proteases</i>
USP2a	do inglês <i>ubiquitin-specific protease 2a</i>
USP2b	do inglês <i>ubiquitin-specific protease 2b</i>
USP8	do inglês <i>ubiquitin-specific protease 8</i>
USPV	do inglês <i>ubiquitin-specific protease variant</i>
Vps	do inglês <i>vacuolar protein sorting</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 USP2a, FAS e CECs bucais	1
1.2 USP2a e clatrina	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 O sistema Ub-proteossomo	6
2.2 Enzimas Desubiquitinantes (DUBs) ou isopeptidases	10
2.3 USP2a e USP2b	12
2.4 Os substratos de USP2a e seus papéis biológicos em células tumorais	15
2.4.1 Ácido graxo sintase (FAS)	15
2.4.2 <i>Murine double minute</i> (Mdm2)	19
2.5 Endocitose, USP2a e clatrina	20
3. PROPOSIÇÃO	27
3.1 Objetivo original	27
3.1.1 Objetivos específicos	27
3.2 Objetivo adicional	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Cultura de células	28
4.2 Transformação e purificação de plasmídeos	29
4.3 Construção pEGFP-USP2a-HA	30
4.4 Super-expressão de USP2a selvagem e mutante em células SCC-9: clones estáveis	31
4.4.1 Transfecções estáveis	31
4.4.2 Infecções	32
4.5 Transfecções transitórias	34
4.6 RNA de interferência para USP2a	34
4.7 Preparação dos extratos protéicos	35
4.8 Separação eletroforética de proteínas e western-blotting	36

4.9 Purificação de RNA e RT-PCR semi-quantitativo.....	37
4.10 RT-PCR quantitativo.....	38
4.11 Proliferação celular.....	39
4.11.1 Curvas de proliferação.....	40
4.11.2 Avaliação do ciclo celular em citometria de fluxo.....	40
4.12 Determinação das taxas de morte celular.....	41
4.13 Ensaio de degradação proteossômica <i>in vitro</i>	41
4.14 Co-imunoprecipitação <i>in vivo</i> de USP2a e clatrina.....	42
4.15 Reações de imunofluorescência.....	43
4.16 Forma de Análise dos Resultados.....	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Células.....	46
5.2 Expressão de USP2a e USP2b pelas células SCC.....	48
5.3 Distribuição intracelular de USP2a-HA nas células SCC-9.....	53
5.4 Expressão gênica de FAS nas células SCC.....	54
5.5 Produção de FAS, ErbB2 e p-27 pelas células SCC.....	54
5.6 Estudo da proliferação e morte celular na linhagem SCC-9 transfectada com USP2a selvagem ou USP2a mutante (Δ 276, Cis-Ala)	56
5.7 Efeito da expressão forçada de USP2a através de vetores virais sobre proliferação da linhagem SCC-9.....	61
5.8 Efeito da inibição da expressão de USP2a sobre morte celular e proliferação na linhagem SCC-9.....	65
5.9 Efeito da DHT sobre a expressão de USP2a nas células SCC-9.....	69
5.10 Efeito do EGF sobre a expressão de USP2a nas células SCC-9.....	70
5.11 Construção EGFP-USP2a-HA.....	78
5.12 Co-imunoprecipitação <i>in vivo</i> de USP2a e clatrina.....	80
5.13 Co-localização das proteínas USP2a e clatrina através de imunofluorescência.....	84
5. 14 Modulação da produção de clatrina em células AR-iPeRC e NIH3T3 que super-expressam USP2a.....	91

5.15 Regulação de clatrina e EEA1 por andrógeno em células	
LNCaP	92
6. DISCUSSÃO.....	94
7. CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS.....	111

1 – Introdução

1.1 – USP2a, FAS e CECs bucais

A conjugação de moléculas de ubiquitina (Ub) a proteínas intracelulares tem um papel importante na regulação de vários processos biológicos, tais como eliminação de proteínas anormais, progressão do ciclo celular, transdução de sinal, ativação transcricional, apresentação de antígenos, regulação da expressão gênica, modificação de receptores da membrana celular e reparo do DNA (Amerik *et al*, 1997; Hershko & Ciechanover, 1998). O objetivo da ubiquitinação na maioria destes processos é promover a degradação de proteínas específicas. O destino da proteína ubiquitinada dependerá do tipo de ubiquitinação realizada, que pode ser mono ou poliubiquitinação. Quando modificadas pela adição de múltiplas cadeias de Ub, as proteínas são enviadas aos proteossomos para degradação. Já a conjugação de moléculas únicas de Ub em um ou em múltiplos resíduos de lisina não está relacionada com degradação pelos proteossomos, como por exemplo, proteínas localizadas na membrana plasmática quando monoubiquitinadas são internalizadas e têm como destino os lisossomos (Dupre *et al.*, 2001; Hicke, 2001; Pickart, 2001; Pickart & Eddins, 2004).

A ubiquitinação é um processo reversível, moléculas de Ub podem ser desconjugadas das proteínas pelas isopeptidases ou enzimas desubiquitinantes (DUBs). As DUBs podem atuar dentro dos proteossomos, desconjugando a cadeia de poli-Ub da proteína-alvo ou removendo Ub de proteínas insuficientemente ou erroneamente marcadas para a destruição (Schaeffer & Cohen, 1996; Lam *et al.*, 1997; Wing, 2003; Amerik & Hochstrasser, 2004), além de promoverem a “reciclagem” de moléculas de Ub livre a partir de cadeias de poli-Ub liberadas pela própria atividade proteossômica (Chung & Baek, 1999). Além disso, as DUBs funcionam também de maneira pré-proteossômica, protegendo seus substratos da degradação e controlando desta forma sua disponibilidade para a célula (DeSalle *et al.* 2001, Graner *et al.* 2004).

O maior número de DUBs identificadas até o presente momento pertence à família das USPs (*Ubiquitin specific proteases*) (Nijman *et al.*, 2005a). As DUBs USP2a (Ubp-69) e USP2b (Ubp-45) foram identificadas em próstata de ratos e do homem, sendo a enzima anabólica ácido graxo sintase (FAS) caracterizada como um ligante específico de USP2a e ao mesmo tempo substrato para o sistema Ub-proteossomo (Graner *et al.*, 2004). FAS é a principal enzima responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa (Kuhajda *et al.*, 2000; Pizer *et al.*, 2000; Baron *et al.*, 2004). Em células normais, com exceção de tecidos altamente lipogênicos como fígado, tecido adiposo, mama durante a lactação e endométrio na fase proliferativa, a atividade da FAS é mínima, pois a maior parte dos ácidos graxos utilizados são provenientes da dieta (Weiss, 1986; Kuhajda, 2000). FAS é uma enzima altamente expressa em vários tipos de neoplasias malignas humanas (Epstein *et al.*, 1995; Pizer *et al.*, 1996b; Alo *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2000a; Wang *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003; Innocenzi *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2003, Takahiro *et al.*, 2003), inclusive nos carcinomas espinocelulares (CECs) bucais (Krontiras *et al.*, 1999; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004). Sua alta expressão tem sido relacionada com um pior prognóstico para alguns tipos de tumores (Alo *et al.*, 1996; Gansler *et al.*, 1997; Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Innocenzi *et al.*, 2003). A inibição de FAS, tanto farmacológica como através de RNAi resulta em diminuição da proliferação celular e indução de apoptose em células tumorais (Pizer *et al.*, 2000; Menendez *et al.*, 2004).

USP2a é regulada por andrógenos e tem sua expressão aumentada em adenocarcinomas de próstata, o que acontece paralelamente ao acúmulo de FAS. Esta DUB protege FAS da degradação pelos proteossomos, através da remoção das suas “etiquetas” de Ub (Graner *et al.*, 2004). A inibição da produção da enzima USP2a através de RNAi favorece a degradação do excesso de FAS e induz apoptose, o que a torna um alvo promissor para a terapia do câncer de próstata (Graner *et al.*, 2004; Priolo *et al.*, 2006). USP2a apresenta comportamento oncogênico *in vitro* e *in vivo* quando expressa em altas quantidades em células não transformadas e previne a apoptose induzida por

agentes quimioterápicos (Priolo *et al.*, 2006). Muito recentemente foi também descoberto como novo substrato para USP2a a proteína *murine double minute* (Mdm2), uma ligase de Ub responsável por sua própria ubiquitinação e também pela ubiquitinação de p53, os quais são posteriormente degradados pelos proteossomos. USP2a é capaz de desubiquitar diretamente Mdm2, protegendo-a da degradação e contribuindo para a repressão da atividade *in vivo* de p53 (Stevenson *et al.*, 2007).

Considerando-se as evidências recentes da participação de USP2a na biologia tumoral pela interação com seus substratos, dentre estes FAS, a qual é expressa em células derivadas de CECs bucais e essencial para sua proliferação, esta tese teve como objetivo estudar a expressão desta DUB e seu papel biológico em células derivadas de CECs bucais humanos.

1.2 – USP2a e clatrina

Durante o curso de doutorado, foi realizado estágio com duração de um ano no laboratório do Dr. Massimo Loda, no *Dana-Farber Cancer Institute*, em Boston, onde foram feitos experimentos de interesse comum àquele e ao nosso laboratório, os quais objetivam estudar a interação entre a DUB USP2a e a proteína clatrina.

Como mencionado anteriormente, a adição de uma molécula de Ub, ou monoubiquitinação, está associada com funções celulares independentes do proteossomo (Hicke, 2001), como por exemplo, na internalização de proteínas transmembrânicas, como transferrina e receptores tirosino-quinase, para sua degradação nos lisossomos (Katzmann *et al.*, 2002). Os receptores de membrana tirosino-quinase quando ativados pelo ligante são rapidamente internalizados na célula por endocitose e eventualmente transportados aos lisossomos, onde são degradados por hidrolases ácidas. A endocitose funciona como um mecanismo de regulação dos receptores, pois visa atenuar os sinais intracelulares desencadeados por sua ativação (Sorkin, 1998; Haglund *et al.*, 2003; Marmor & Yarden, 2004; Johannessen *et al.*, 2006). Os homodímeros de EGFR ativados

pelo ligante são monoubiquitinados em diferentes resíduos de lisina, internalizados através de vesículas revestidas pela proteína clatrina e transportados aos endossomos, de onde poderão ser direcionados ao lisossomo para degradação ou reciclados a membrana celular (Sorkin, 1998). A ubiquitinação dos receptores é um sinal que deve estar presente para que ocorra sua degradação no lisossomo (Katzmann *et al.*, 2002; Raiborg *et al.*, 2003). Proteínas internalizadas que não se encontram ubiquitinadas não são capazes de se ligar aos complexos protéicos responsáveis pelo direcionamento aos lisossomos. Este processo é conhecido como endocitose mediada por clatrina. Clatrina é uma proteína composta por 3 cadeias pesadas e 3 cadeias leves. Esta proteína forma uma rede poliédrica composta por muitas moléculas (em forma de uma bola de futebol ou barril hexagonal) que reveste a vesícula endocítica à medida que ela se forma (Kirchhausen, 2000).

Trabalhos recentes demonstram a participação das DUBs AMSH (*associated molecule with the SH3 domain of STAM*), AMSH-like protein (AMSH-LP) e UBPY (*Ub-specific protease Y – USP8*) no processo da endocitose mediada por clatrina (McCullough *et al.*, 2004; Mizuno *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2006). AMSH é capaz de regular negativamente a degradação de EGFR através da desubiquitinação direta deste receptor nos endossomos (McCullough *et al.*, 2004), evitando sua incorporação nas vesículas luminais e a conseqüente degradação nos lisossomos.

Dados preliminares, resultados de experimentos de cromatografia de afinidade e de co-imunoprecipitação *in vitro* realizados no laboratório do Dr. Massimo Loda, do *Dana-Farber Cancer Institute*, demonstraram que a cadeia pesada de clatrina é um provável substrato de USP2a. Além disso, Priolo *et al.* (2006) avaliaram através da técnica GSEA (*gene set enrichment analysis*) a expressão de grupos de genes em tumores de próstata com baixa e alta expressão de USP2a e demonstraram que nos tumores que expressam altos níveis de USP2a, foi detectada alta expressão de grupos de genes relacionados à família de receptores tirosino-quinase e outros que controlam a via endocítica. Estes resultados sugerem que USP2a possa também participar do processo de

endocitose mediada por clatrina. Durante o estágio realizado no laboratório do Dr. Massimo Loda foram desenvolvidos experimentos objetivando melhor caracterizar a interação da enzima USP2a com a proteína clatrina no processo de endocitose.

2 – Revisão da literatura

2.1 – O sistema Ub-proteossomo

As células utilizam dois mecanismos para a degradação intracelular de proteínas, o sistema endossomo-lisossomo, responsável principalmente pela degradação das proteínas internalizadas por endocitose, e um sistema não lisossômico que degrada e controla precisamente a quantidade de algumas proteínas nucleares ou citoplasmáticas, denominado de sistema ubiquitina (Ub)-proteossomo, o qual degrada cerca de 80% das proteínas celulares (Strous & Govers, 1999; Mayer, 2000). A adição de cadeias de Ub aos substratos protéicos funciona como uma “etiqueta” que identifica de forma específica proteínas-alvo que terão como destino o proteossomo, onde a proteína será degradada e as moléculas de Ub recicladas (Hershko & Ciechanover, 1998; Burger & Seth, 2004). A degradação de proteínas pelo proteossomo é essencial para a célula, pois controla processos vitais como o ciclo celular, determinando os níveis de seus reguladores (como p53, pRb, ciclinas, p27, p21, etc.), regula a disponibilidade de certas enzimas metabólicas, além de ser responsável pela eliminação de proteínas defeituosas (Strous & Govers, 1999; Mayer, 2000; Pickart, 2001).

A Ub é uma proteína altamente conservada de 8 kDa (76 aminoácidos), encontrada em todos os organismos eucarióticos. O sinal para que ocorra ubiquitinação pode ser geneticamente programado, adquirido por fosforilação, pela ligação a uma proteína adaptadora ou por dano protéico devido à fragmentação, oxidação ou envelhecimento (Hershko & Ciechanover, 1998; Laney & Hochstrasser, 1999; Strous & Govers, 1999). A ubiquitinação não é apenas importante para a degradação protéica. Esta modificação está envolvida em outros processos, como o controle da estabilidade e atividade protéica pela remodelação da superfície dos substratos, interações proteína-proteína e localização sub-celular (Pickart & Eddins, 2004).

Existem três formas de modificação protéicas pela adição de Ub: 1 – monoubiquitinação, que consiste na ligação de uma única molécula de Ub a uma

proteína, 2 – multiubiquitinação, que ocorre quando moléculas únicas de Ub são ligadas a vários resíduos de lisina da proteína alvo e 3 – poliubiquitinação, quando cadeias formadas por várias unidades de Ub são adicionadas ao substrato protéico. As modificações por monoubiquitinação e multiubiquitinação estão principalmente associadas com o processo de internalização de proteínas localizadas na membrana plasmática e endocitose (Hicke, 2001), enquanto que a poliubiquitinação está associada principalmente com degradação pelo proteossomo. A poliubiquitinação de um substrato protéico ocorre pela conjugação de uma cadeia formada por várias moléculas de Ub, as quais são ligadas entre si através da glicina C-terminal com uma lisina da Ub previamente adicionada. Podem existir sete tipos de ligações entre moléculas de Ub, pois existem sete resíduos de lisina na Ub. Ligações que ocorrem na lisina⁴⁸ (Ub^{k48}) e lisina²⁹ (Ub^{k29}) servem principalmente para marcar as proteínas para degradação pelo proteossomo. Ligações na lisina⁶³ (Ub^{k63}) estão relacionadas com reparo do DNA, resposta inflamatória, via endocítica e síntese de proteínas ribossomais (Pickart & Eddins, 2004).

O sistema Ub-proteossomo é bastante complexo e sua atividade pode ser dividida em duas etapas sucessivas e interdependentes: 1 – ligação covalente de múltiplas moléculas de Ub à proteína alvo e 2 – degradação da proteína alvo “ubiquitinada” pelo proteossomo. A ligação de Ub às proteínas alvo é catalizada pela ação das enzimas ativadoras de Ub (E1), conjugadoras de Ub (E2) e ligadoras de Ub (E3). Embora uma única E1 atue neste processo, um grande número de enzimas E2 e E3 já foram identificadas. A enzima ativadora de Ub (E1) ativa o monômero de Ub num processo dependente de ATP, através de ligação covalente entre a glicina terminal da Ub com o grupo tiol de um resíduo de cisteína do sítio ativo da E1, causando uma modificação estrutural na Ub para que esta possa reagir com as cadeias laterais de lisina do substrato protéico. Após esta reação inicial, a molécula de Ub ativada é transferida por transacilação para um grupo tiol da enzima E2, ou conjugadora de Ub (UBC). Os ésteres de tiol formados entre E2 e Ub são os doadores de Ub para a formação da ligação isopeptídica entre a glicina terminal da Ub e um resíduo de lisina ou o grupo NH₂ da cadeia

lateral do resíduo de lisina do substrato (Figura 1A)(Shaeffer & Cohen, 1996; Spataro *et al.*, 1998). A atividade de E2 envolve a transferência da Ub ativada diretamente ao substrato ou à enzima E3, que pode também ubiquitinar diretamente substratos específicos (Figura 1B). A enzima E3 se liga ao substrato protéico a ser degradado, identificando-o através do reconhecimento de uma seqüência específica ou modificação estrutural (um sinal para ubiquitinação), que pode ser fosforilação (especialmente na regulação do ciclo celular), glicosilação, acetilação ou hidroxilação (Pickart & Eddins, 2004). A cadeia de poliubiquitina é formada em múltiplos ciclos desta reação por adição seqüencial de outras moléculas de Ub (Shaeffer & Cohen, 1996; Spataro *et al.*, 1998).

Após a adição da cadeia de poli-ubiquitina, as proteínas são degradadas no proteossomo, que é um complexo enzimático dependente de ATP, de ~2000 kDa, também denominado proteossomo 26S, devido ao seu coeficiente de sedimentação. É formado por três subunidades que atuam como um complexo multicatalítico, que degrada seletivamente proteínas ligadas a moléculas de Ub, consistindo de uma parte cilíndrica central denominada de 20S, composta por quatro anéis com sete subunidades onde se encontram os sítios catalíticos. Na extremidade final de cada porção 20S encontram-se duas estruturas externas denominadas de *cap* 19S ou PA700 (*proteasome activator of 700 kDa*), que contêm ATPases e estão envolvidas no processo de reconhecimento e manutenção da conformação da proteína, além de translocá-la para o interior do proteossomo (Figura 1B)(Rubin & Finley, 1995; Orlowski & Wilk, 2003).

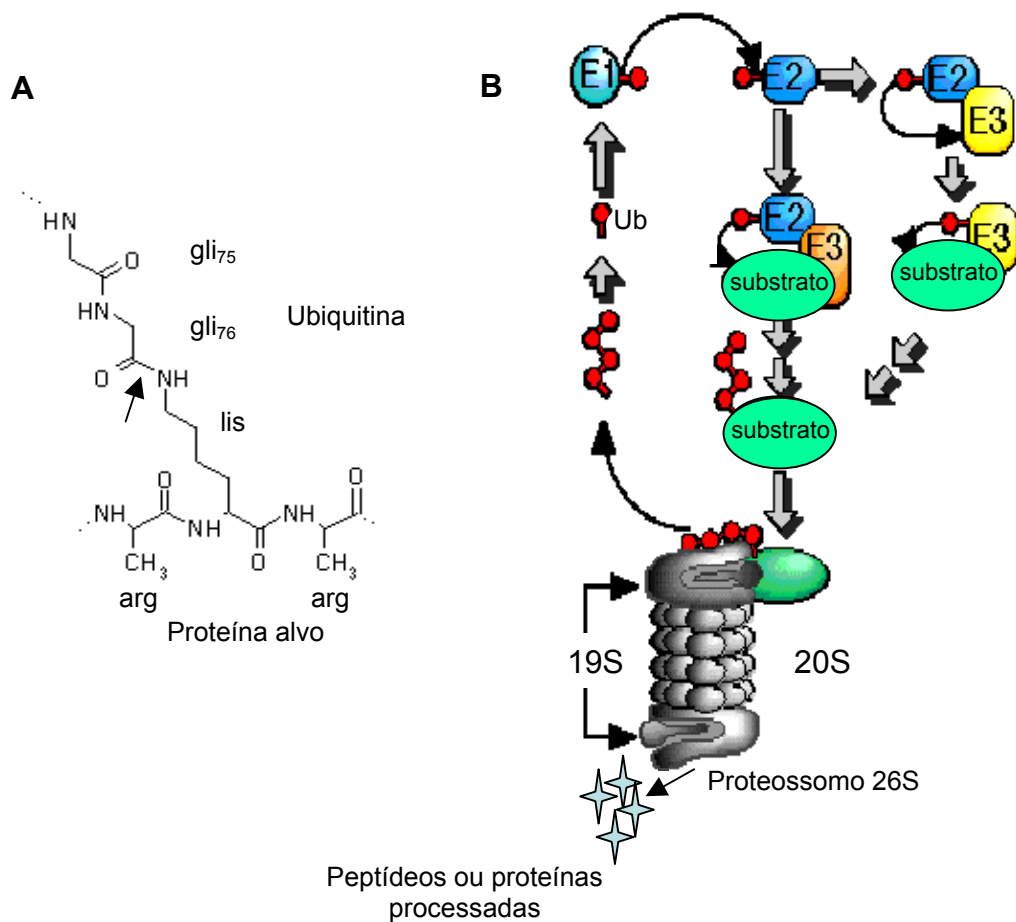


Figura 1 – A – Ligação isopeptídica ($\rightarrow$) entre a glicina terminal (gli_{76}) da molécula de Ub e o grupo NH_2 da cadeia lateral do resíduo de lisina (lis) do substrato protéico. **B –** Representação esquemática do mecanismo de degradação protéica no sistema Ub-proteossomo. Este sistema consiste da enzima ativadora de Ub (E1), da enzima conjugadora (E2) e da ligase de Ub (E3), que reconhece o substrato a ser degradado. As proteínas marcadas são alvos para degradação no proteossomo 26S. O proteossomo quebra seu substrato em pequenos peptídeos. O complexo multicatalítico é formado por um núcleo 20S e dois caps 19S (PA700) nas extremidades.

Fonte: modificado de www.uni-stuttgart.de/ibc/hilt/ubisysteme.gif

2.2 – Enzimas Desubiquitinantes (DUBs) ou isopeptidases

A ubiquitinação de proteínas é um processo reversível e a remoção de moléculas de Ub desempenha um papel importante na regulação da atividade proteossômica (Wilkinson, 1997; Chung & Baek, 1999). As enzimas desubiquitinantes (*deubiquitinating enzymes* – DUBs), ou isopeptidases, são capazes de clivar a ligação isopeptídica que existe entre o substrato protéico e o resíduo de Ub. As DUBs apresentam diversas funções, podendo atuar dentro do proteossomo, no processamento e reciclagem de moléculas de Ub (importante para a produção de Ub livre pela “desmontagem” dos polímeros de poli-Ub liberados pela atividade proteossômica) ou protegendo proteínas-alvo insuficientemente ou erroneamente marcadas para destruição (Shaeffer & Cohen, 1996; Lam *et al.*, 1997, Chung & Baek, 1999, Wing, 2003). As DUBs também funcionam de maneira pré-proteossômica, protegendo seus substratos da degradação e controlando desta forma sua disponibilidade para a célula (DeSalle *et al.*, 2001). A função desempenhada pelas DUBs as caracteriza como reguladores celulares, participando de vários processos biológicos importantes como o crescimento e diferenciação celular, desenvolvimento, oncogênese, doenças neurológicas, estrutura cromossômica e regulação transcricional (Kim *et al.* 2003).

As DUBs compreendem uma das maiores famílias de proteínas envolvidas no sistema ub-proteossomo. O grande número de membros indica a existência de uma diversidade e especificidade da atividade das DUBs, embora relativamente pouco seja conhecido sobre os substratos fisiológicos de cada um dos membros (Nijman *et al.*, 2005a). As DUBs são divididas em cinco subfamílias, quatro das quais pertencem à classe das cisteína proteases: UBPs/USPs (*ubiquitin-specific proteases*), UCHs (*ubiquitin-C-terminal hydrolases*), MJD (*Machado-Joseph Domain*) e OTU (*Ovarian Tumor Related*). O quinto grupo, formado pelas DUBs que contém o motivo JAMM (*JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme*) são metaloproteases (*Zn²⁺ containing metalloproteases*). Experimentos diretos ou estudos de bioinformática identificaram aproximadamente

90 DUBs, das quais acredita-se que 79 sejam funcionais, sendo que algumas apresentam várias isoformas (Amerik & Hochstrasser, 2004; Nijman *et al.*, 2005a).

A classe das USPs compreende o maior número de DUBs codificadas pelo genoma humano, aproximadamente 58 (Nijman *et al.*, 2005a). O domínio catalítico das USPs contém dois motivos curtos e bem conservados, chamados Cys e His *boxes*, os quais contém os resíduos críticos para a atividade catalítica. No entanto, Nijman *et al.* (2005a) demonstraram que algumas USPs não apresentam este domínio catalítico e foram denominadas de USPV (*ubiquitin-specific protease variant*), pois provavelmente utilizam outros resíduos para estabilizar o sítio ativo de histidina. Embora a maior parte das USPs apresente homologia na seqüência e estrutura dos sítios catalíticos, diferenças notáveis são encontradas nas suas partes amino e carboxi terminal. Este fato, somado ao grande número de membros identificados da família das USPs, sugere a existência de especificidade na interação com seus substratos. No entanto, poucas USPs com ação pré-proteossômica e substrato definido são conhecidas. Por exemplo, a ubiquitinação e subsequente proteólise de p53 é mediada pela enzima ligadora de Ub (E3) Mdm2, cujo efeito é contraposto pela DUB USP7 ou HAUSP (*herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*), a qual retira Ub de p53, estabilizando-a e promovendo uma redução na proliferação celular (Li *et al.* 2002). CYLD modula a atividade do fator nuclear NF- κ B através de um mecanismo similar (Brummelkamp *et al.*, 2003; Kovalenko *et al.*, 2003). USP1 é capaz de desubiquitinar a proteína FANCD2 (*Fanconia anemia protein*) (Nijman *et al.*, 2005b). USP2a se liga a enzima FAS, evitando sua destruição proteolítica e conseqüentemente prolongando sua meia vida dentro de células humanas derivadas de câncer de próstata (Graner *et al.*, 2004).

A ubiquitinação de proteínas é uma modificação pós-traducional utilizada pela célula para regular vários processos e vias celulares. Alterações no processo de ubiquitinação/desubiquitinação podem estar diretamente implicadas na tumorigênese. A degradação aumentada de proteínas que funcionam como supressores tumorais ou a diminuição da degradação de proteínas oncogênicas é

a base da transformação tumoral em vários tipos de câncer (Ciechanover & Schwartz, 2004; Mukhopadhyay & Reizman, 2007).

Seis DUBs já foram relativamente bem estudadas e representam alvos em potencial para a terapia anti-câncer. Cinco delas, USP7, USP2a, AMSH, USP20 e USP33, são consideradas oncoproteínas, e inibidores destas DUBs poderiam atuar como agentes terapêuticos. A sexta DUB bem caracterizada é produto do gene CYLD (*cylindromatosis gene*) e funciona como um supressor tumoral (Nicholson *et al.*, 2007).

2.3 – USP2a e USP2b

De acordo com Gousseva & Baker (2003), a proteína USP2 foi primeiramente descrita como uma proteína de 41-kDa em galinhas, sendo posteriormente clonadas as seqüências de camundongos e de humanos. Após identificarem o gene USP2 em camundongos, o qual dá origem às proteínas Usp2-45 e Usp2-69 (ou Ubp-45 e Ubp-69) através de *splicing alternativo*, estes autores sugeriram que a proteína de 41-kDa anteriormente identificada correspondia ao sítio catalítico comum destas enzimas, não sendo encontrada *in vivo*. Em ratos, estas isopeptidases foram originalmente descritas como proteínas específicas dos testículos e foram denominadas Ubp-t1 e Ubp-t2 (Lin *et al.*, 2000). Com o objetivo de identificar DUBs expressas em próstata reguladas por andrógenos, Graner *et al.* (2004), utilizando a linhagem derivada de câncer de próstata LNCaP, encontraram os genes homólogos humanos localizados no cromossomo 11q23.3 que foram então denominados de USP2a (homólogo de Ubp-69, Genbank # NM004205) e USP2b (homólogo de Ubp-45, Genbank # AF440755). Na extremidade 5' do gene encontram-se os exons que dão origem às porções específicas das proteínas USP2a ou USP2b, os quais são precedidos por elementos responsivos a andrógenos (*androgen-responsive elements* – AREs) na sua região promotora (Figura 2). A porção 3' do gene é compartilhada por USP2a e USP2b, pois contêm os domínios Cys e His *boxes* responsáveis por sua atividade catalítica. No mesmo trabalho, Graner *et al.* demonstraram que a enzima

FAS é um substrato específico para a USP2a e que a expressão de USP2a é controlada por andrógenos no tecido prostático de ratos, sendo este o primeiro exemplo da literatura de uma DUB cuja expressão está sob regulação hormonal.

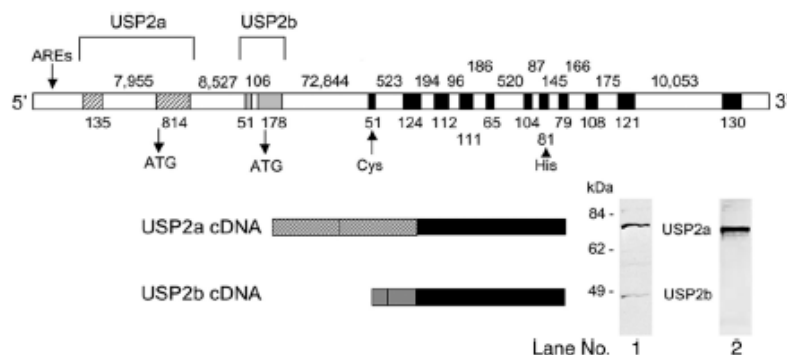


Figura 2 – Organização do gene humano que codifica tanto USP2a como USP2b, através de *splicing* alternativo no cromossomo 11 (11q23). ARE = *androgen responsive elements*; os números acima do esquema mostram os tamanhos de cada intron e os números abaixo o tamanho dos exons. Os westerns-blot no canto inferior direito da figura foram feitos com proteínas de células LNCaP e anticorpos contra o sítio catalítico comum de USP2a e b (1) ou específicos contra USP2a (2).

Fonte: Graner *et al.*, 2004.

Além dos trabalhos de Graner *et al.* (2004) e Priolo *et al.* (2006), que estudaram USP2a em células derivadas de câncer de próstata, até o presente momento, não há estudos sobre a expressão de USP2a e USP2b em tecidos humanos normais. O gene homólogo de USP2 em camundongos e os respectivos produtos protéicos, Ubp-69 e Ubp-45, foram estudados por Gousseva & Baker (2003). Estes autores descreveram a estrutura do gene, os sítios de *splicing alternativo*, a distribuição tecidual dos RNAs mensageiros e seus respectivos produtos protéicos, a localização sub-celular e o padrão de expressão durante o desenvolvimento embrionário. De acordo com os resultados deste estudo, Ubp-69 apresenta pelo menos três variantes, devido a *splicing alternativo* de exons na região 5', o que pode representar um mecanismo regulatório. Também foi demonstrado que Ubp-69 pode interagir com Ubp-45 e que moléculas de Ubp-69 podem interagir entre si. A expressão de Ubp-69 e Ubp-45 foi descrita em vários tecidos embrionários e adultos de camundongo, através de northern-blotting,

western-blotting e imunohistoquímica. Foram detectados RNAs mensageiros para Ubp-45 em quase todos os tecidos estudados, com exceção do baço e pulmão. Já os RNAs mensageiros de Ubp-69 foram detectados principalmente no coração, cérebro, fígado, músculo esquelético e testículos. Maior quantidade de RNAs mensageiros de Ubp-45 e Ubp-69 foram encontradas nos testículos. Nos experimentos de western-blotting realizados com extratos protéicos dos mesmos tecidos, os autores observaram bandas para Ubp-69 em todos os tecidos estudados, havendo uma discrepância entre a quantidade de RNAs mensageiros e dos respectivos produtos protéicos. Apesar de terem sido encontrados RNAs mensageiros para Ubp-45 em quase todos os tecidos estudados, não foi possível detectar Ubp-45 por western-blotting em nenhum tecido, sugerindo que ela seja produzida em pequena quantidade.

Através de reações imunohistoquímicas em tecidos embrionários e adultos de camundongos, com anticorpos que reconhecem o sítio catalítico comum de Ubp-45 e Ubp-69 ou específicos para Ubp-69, os mesmos autores observaram padrão idêntico de marcação e concluíram que a proteína detectada nestas reações foi Ubp-69. Foi observada positividade em todos os estágios do desenvolvimento embrionário e em vários tipos de tecidos diferenciados. Um padrão interessante foi observado no tecido ósseo em formação de embriões com 16,5 dias, onde foi encontrada positividade apenas em células em proliferação. Forte marcação foi detectada nos músculos cardíaco e esquelético, testículos e também em células epiteliais da pele, principalmente na camada supra-basal. O padrão de marcação foi citoplasmático, com algumas células apresentando positividade mais intensa na região perinuclear.

Já foi descrito que os produtos do gene USP2 podem desempenhar papéis importantes em diferentes processos biológicos como, por exemplo, na diferenciação celular no testículo de rato (Lin *et al.*, 2000), diferenciação de osteoblastos durante a embriogênese (Gousseva & Baker, 2003) e regulação da diferenciação de células musculares de rato (Park *et al.*, 2002). Park *et al.* (2002) relataram uma regulação antagônica entre as enzimas Ubp-69 e Ubp-45 durante a diferenciação de células musculares embrionárias de rato, as quais estão

envolvidas no controle da fusão de membranas e no acúmulo de proteínas músculo-específicas. Segundo Gousseva & Baker (2003), os produtos do gene USP2 não definem o tipo de tecido a ser formado em células de embriões de camundongo, mas podem estar envolvidos na saída do ciclo celular ou em eventos precoces do início da diferenciação. A presença de Ubp-69 tanto nas células em divisão como nos tecidos totalmente diferenciados, sugere que ela possa estar envolvida em eventos apoptóticos, os quais são parte essencial do processo de diferenciação dos tecidos.

Oishi *et al.* (2005) estudaram genes expressos no fígado de camundongos, cuja expressão varia de acordo com o ciclo circadiano. USP2 foi um dos genes identificados dentro do grupo de genes que tem a expressão regulada por fatores de transcrição componentes do relógio circadiano, como CLOCK e BMAL1. Os mesmos autores demonstraram que USP2 não é um gene regulado por glicocorticóides endógenos, como ocorre com outros genes circadianos expressos no fígado.

2.4 – Os substratos de USP2a e seus papéis biológicos em células tumorais

2.4.1 – Ácido graxo sintase (FAS)

O primeiro substrato específico de USP2a identificado foi a enzima ácido graxo sintase (FAS). A interação entre USP2a e FAS foi encontrada em experimentos de espectrometria de massa e confirmada através de co-imunoprecipitação, sendo estas proteínas co-localizadas no citoplasma das células LNCaP (Graner *et al.*, 2004). Foi também demonstrado pela primeira vez neste trabalho que FAS sofre ubiquitinação e é um substrato para os proteossomos. USP2a se liga especificamente a FAS evitando sua destruição proteolítica e conseqüentemente prolongando sua meia vida dentro de células humanas derivadas de câncer de próstata. O tratamento das células LNCaP com dihidrotestosterona (DHT) aumentou a expressão de USP2a, evidenciando que, assim como a expressão de FAS (Swinenn *et al.*, 1997a), a produção de USP2a é

regulada por andrógenos (Graner *et al.*, 2004). Foi também demonstrado por estes autores que USP2a tem sua expressão aumentada em adenocarcinomas de próstata, o que acontece paralelamente ao acúmulo de FAS.

Do ponto de vista estrutural, FAS é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas longas, com massa molecular de ~250 kDa. Em cada cadeia existem sete sítios catalíticos distintos e um sítio para a proteína carregadora de acil (Wakil 1989; Brink *et al.*, 2002). Estes estão distribuídos a partir da extremidade amino terminal em direção a carboxil terminal na seguinte ordem: β -cetoacil sintetase, acetil-CoA e malonil-CoA transacilases, desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase, proteína carregadora de acil e tioesterase (Wakil, 1989). FAS é responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA (Chirala *et al.*, 2001; Kuhajda, 2000; Brink *et al.*, 2002, Baron *et al.*, 2004). Os ácidos graxos e seus derivados participam da composição das membranas celulares (Chirala *et al.*, 2003) e atuam como hormônios e mensageiros intracelulares, além de serem uma das principais formas de armazenamento de energia no organismo (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). FAS é pouco expressa ou mesmo não expressa na maioria dos tecidos humanos normais, pois nestes a maior parte dos ácidos graxos utilizados pelas células é proveniente da dieta (Weiss, 1986; Kuhajda, 2000; Baron *et al.*, 2004). Entretanto, a síntese endógena de ácidos graxos é importante para inúmeros processos biológicos, como armazenamento de energia no fígado e tecido adiposo e síntese dos lipídios que compõe o leite, na mama durante os períodos de lactação (Kuhajda, 2000; Brink *et al.*, 2002; Chirala *et al.*, 2001).

A enzima FAS também é denominada antígeno oncogênico-519 (AO-519), estando presente em quantidades elevadas em diversos tipos de neoplasias malignas humanas e lesões pré-neoplásicas (Milgraum *et al.*, 1997; Alo *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2002; Pizer *et al.*, 1998a; Vlad *et al.*, 1999; Piyathilake *et al.*, 2000; Visca *et al.*, 1999; Nemoto *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002; Innocenzi *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2003), dentre estas o carcinoma espinocelular (CEC) bucal (Krontiras *et al.*, 1999; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004). Em alguns destes

tumores, a alta expressão de FAS está relacionada com pior prognóstico para o paciente (Alo *et al.*, 2000; Vlad *et al.*, 1999; Visca *et al.*, 1999; Innocenzi *et al.*, 2003; Epstein *et al.*, 1995; Gansler *et al.*, 1997), provavelmente porque a alta expressão e atividade desta enzima geram vantagens seletivas para o crescimento celular (Baron *et al.*, 2004).

Sabe-se que a atividade de FAS está ligada à progressão do ciclo celular das células tumorais, pois uma síntese adicional de ácidos graxos é necessária para a biogênese das membranas das células em rápida divisão mitótica (Hannun & Obeid, 2002). Segundo Swinnen *et al.* (2003), o aumento da expressão e da atividade enzimática de FAS são necessários para a produção de fosfolípidios da membrana em células LNCaP. Diversos trabalhos mostram que inibidores específicos de FAS bloqueiam a síntese de DNA e causam apoptose em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata, mama, cólon e carcinomas espinocelulares de boca, além de provocarem diminuição do tamanho de tumores em modelos animais (Pizer *et al.*, 1996a; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998b; Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; De Schrijver *et al.*, 2003; Agostini *et al.*, 2004). No entanto, a inibição de FAS *in vivo* pode causar efeitos colaterais como anorexia e perda de peso (Clegg *et al.*, 2002), além de apresentar um alto potencial teratogênico (Chirala *et al.*, 2003).

Em tumores sensíveis a hormônios, estrógeno, progesterona e andrógenos desempenham um papel claro na regulação da FAS (Kuhajda, 2000). Está demonstrado que progesterona estimula a expressão desta enzima em linhagens celulares de câncer de mama (Lacasa *et al.*, 2001), enquanto andrógenos e EGF aumentam a expressão e a atividade de FAS em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata (LNCaP) (Swinnen *et al.*, 1997a; Swinnen *et al.*, 2000b; Myers *et al.*, 2001; Heemers *et al.*, 2001; Van De Sande *et al.*, 2002). Tanto a testosterona como o EGF são capazes de estimular a expressão gênica de FAS nestas células através das proteínas SREBPs (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*) (Swinnen *et al.*, 1997b; Swinnen *et al.*, 2000b; Heemers *et al.*, 2001). Kumar-Sinha *et al.* (2003) observaram que FAS é regulada por Erb-B2 em células derivadas da glândula mamária e a seguir

Menendez *et al.* (2004) mostraram, em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário, que a inibição (farmacológica ou via RNAi) de FAS suprime a expressão de Erb-B2 e causa super-regulação de PEA3, um repressor da transcrição de Erb-B2. Portanto, FAS parece ter uma participação ativa na patogênese do câncer, pois regula proteínas oncogênicas relacionadas com transformação maligna. Além do mais, Knowles *et al.* (2004) mostraram que, em linhagens celulares de câncer de mama, tanto o bloqueio farmacológico de FAS como o seu silenciamento através de RNAi, diminuem a proliferação celular, reduzem a fosforilação de pRb, aumentam os níveis de p27^{Kip1} e diminuem a quantidade de Skp2. Este trabalho mostra claramente uma ligação entre FAS e o controle da proteólise dependente de Ub de proteínas que regulam o ciclo celular. A inibição de FAS em células de câncer de mama e endométrio positivas para receptor de estrógeno (RE) foi capaz de modular a expressão deste receptor, bem como a transcrição de genes dele dependentes e de causar morte celular por apoptose (Lupu & Menendez, 2006).

Graner *et al.* em 2004 e Priolo *et al.* em 2006 demonstraram que a inibição da expressão da enzima USP2a através de RNAi em células LNCaP (as quais expressam altos níveis de FAS) favoreceu a degradação do excesso de FAS e provocou apoptose. Priolo *et al.* (2006) também mostraram que a inibição da expressão de USP2a através de RNAi resultou em apoptose em diversas linhagens celulares derivadas de tumores malignos humanos, além daquelas derivadas de câncer de próstata. De acordo com os mesmos autores, USP2a apresentou comportamento oncogênico *in vitro* quando expressa em grandes quantidades em células epiteliais de próstata não transformadas (AR-iPERC), prevenindo a apoptose induzida por agentes quimioterápicos. USP2a também apresentou propriedades oncogênicas *in vivo* quando teve sua expressão aumentada em fibroblastos de camundongos não transformados (NIH3T3). No mesmo trabalho, Priolo *et al.* avaliaram através da técnica GSEA (*gene set enrichment analysis*) a expressão de grupos de genes em tumores de próstata com baixa e alta expressão de USP2a. Naqueles que expressavam altos níveis de USP2a foi detectada uma alta expressão de um grupo de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos. Por outro lado, nos tumores com baixos níveis de

USP2a, os grupos de genes com maior expressão foram associados com morte celular e genes alvo de p53. De acordo com os autores, tais eventos contribuem para conferir resistência a apoptose em células derivadas de câncer de próstata que super-expressam USP2a.

2.4.2 – *Murine double minute* (Mdm2)

Muito recentemente foi descoberto um novo substrato para USP2a, a proteína *murine double minute* (Mdm2), que funciona como uma E3-ligase (ligadora de Ub) responsável por sua própria ubiquitinação e também pela ubiquitinação de p53, as quais são posteriormente degradados pelos proteossomos. Stevenson *et al.* (2007) demonstraram que USP2a é capaz de desubiquitinar diretamente Mdm2, protegendo-a da degradação. A expressão forçada de USP2a em células derivadas de tumores humanos causou aumento nos níveis de Mdm2 e promoveu a degradação de p53. Além disso, a inibição da expressão de USP2a através de RNAi resultou no aumento da expressão de p53 bem como dos seus genes alvo. Portanto, quando em excesso, USP2a regula a via Mdm2/p53 contribuindo para a repressão da atividade de p53 *in vivo*.

Priolo *et al.* (2006) acreditam que o potencial oncogênico de USP2a está relacionado com sua atividade anti-apoptótica. O perfil de expressão gênica de tumores de próstata humanos confirmou que o papel antiapoptótico de USP2a é mediado por sua atividade enzimática em FAS e Mdm2 (Figura 3). Tumores com grandes quantidades de USP2a apresentaram expressão aumentada dos genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos, já nos tumores com baixas quantidades de USP2a os grupos de genes associados à morte celular e genes alvo de p53 encontravam-se super-expressos. Este fato realça a importância de USP2a como alvo terapêutico objetivando a redução dos níveis de FAS e a reativação de p53 selvagem em células tumorais.

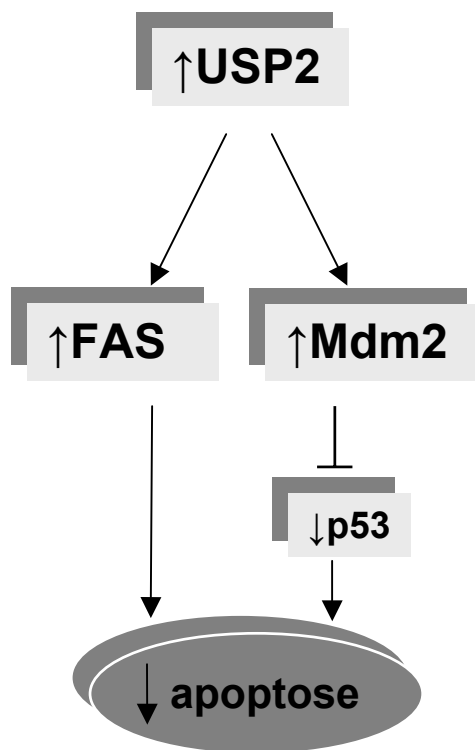


Figura 3 – Esquema representativo da ação enzimática de USP2a sobre FAS e Mdm2 e a sua conseqüente atividade anti-apoptótica.

2.5 – Endocitose, USP2a e clatrina

As modificações pós-traducionais que ocorrem nas proteínas através de mono ou poliubiquitinação representam um mecanismo central na modulação de uma ampla variedade de funções celulares, tais como estabilidade protéica, transporte intracelular, interação entre proteínas e atividade transcricional. A adição de cadeias de Ub às proteínas, ou seja, poliubiquitinação, como descrito anteriormente, serve como sinal para a degradação protéica pelo proteossomo (Pickart, 2000). Já a adição de moléculas únicas de Ub, ou monoubiquitinação, está associada com funções celulares independentes do proteossomo, como endocitose e degradação protéica pelo lisossomo (Hicke, 2001).

Receptores de membrana com atividade de tirosino-quinase, quando ativados pelo ligante, são rapidamente internalizados por endocitose e

eventualmente transportados aos lisossomos, onde são degradados por hidrolases ácidas. A ativação destes receptores desencadeia sinais que controlam vários processos celulares, como mitose, sobrevivência, diferenciação e migração, os quais devem ser rigorosamente controlados para evitar a formação de tumores. As células atenuam os sinais desencadeados por alguns dos receptores ativados através da internalização por endocitose e subsequente degradação do complexo ligante-receptor nos lisossomos, processo conhecido como “sub-regulação” dos receptores (Sorkin, 1998; Haglund *et al.*, 2003; Marmor & Yarden, 2004; Johannessen *et al.*, 2006). Quando EGF se liga ao EGFR e induz a formação de dímeros, os resíduos de tirosina fosforilados na parte C-terminal funcionam como sítios de ancoragem para proteínas que contêm domínios de ligação SH2 ou fosfotirosina. A E3 ligase de Ub c-Cbl se associa à tirosina fosforilada 1045 do EGFR através do seu domínio SH2 (Levkowitz *et al.*, 1998). Os homodímeros de EGFR ativados são então monoubiquitinados em diferentes resíduos de lisina, internalizados através de vesículas revestidas pela proteína clatrina e transportados aos endossomos precoces, de onde poderão ser direcionados ao lisossomo para degradação ou reciclados para a membrana celular (Sorkin, 1998).

A via endocítica é formada pelas vesículas endocíticas, pelos endossomos precoces, endossomos tardios e lisossomos. A internalização dos receptores ativados pelo ligante é iniciada por sua incorporação em invaginações que se formam na membrana plasmática, as quais são revestidas na sua porção externa por várias moléculas de clatrina. Estas invaginações contendo os receptores se desprendem da membrana através da ação de proteínas adaptadoras e dão origem as vesículas endocíticas, as quais permanecem revestidas por clatrina (Kirchhausen, 2000, Brodsky *et al.*, 2001). A presença da proteína clatrina nestas vesículas caracteriza o processo denominado de endocitose mediada por clatrina. Clatrina é uma proteína composta por 6 subunidades (3 cadeias pesadas de ~190 kDa e 3 cadeias leves de ~25 kDa). Esta proteína forma uma rede poliédrica composta por muitas moléculas (em forma de uma bola de futebol ou barril hexagonal) que reveste a vesícula endocítica à medida que ela se forma. Como pode ser observado na Figura 4, a

molécula de clatrina possui a forma de um *trisquélion*, uma estrutura semelhante à suástica, só que com três pernas curvadas, ao invés de quatro, que estão unidas em um domínio central de trimerização (Crowther *et al.*, 1976; Kirchhausen & Harrison, 1981; Ungewickell & Branton, 1981). Além da participação no processo de endocitose, a proteína clatrina está envolvida no transporte de proteínas e lipídeos do complexo de Golgi para os endossomos (Pley & Parham, 1993; Robinson, 1994; Brodsky *et al.*, 2001), na formação de vesículas sinápticas (Hannah *et al.*, 1999; Brodin *et al.*, 2000) e na formação do fuso mitótico (Okamoto *et al.*, 2000; Royle *et al.*, 2005).

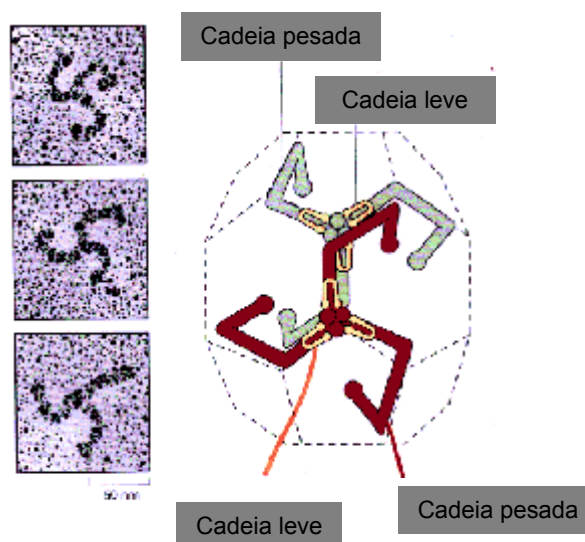


Figura 4 – Representação esquemática da proteína clatrina.

Fonte: Modificado do *website* de imagens da Universidade do Colorado, E.U.A.

Na microscopia eletrônica, os endossomos aparecem como vacúolos contendo vesículas intraluminais de 50 a 100 nm. O número de vesículas aumenta durante a maturação dos endossomos precoces em endossomos tardios, também chamados de endossomos multivesiculares ou corpos multivesiculares (Katzmann *et al.*, 2002). Para serem degradados pelos lisossomos, os receptores devem ser direcionados para as vesículas internas dos endossomos tardios, as quais subsequentemente se fundem com lisossomos pré-existentes (Katzmann *et al.*,

2002). A formação dos corpos multivesiculares é dependente das proteínas vacuolares de classe E (*vacuolar protein sorting – Vps*), incluindo Hrs (*hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate*) e STAM (*signal transducing adaptor molecule*) as quais são proteínas que possuem domínios de ligação a Ub. Estas duas proteínas formam um complexo estável na membrana dos endossomos precoces (Komada & Kitamura, 2005). Nos endossomos precoces, o direcionamento dos receptores ubiquitinados é iniciado pelo reconhecimento das moléculas de Ub pelo complexo Hrs-STAM (Bishop *et al.*, 2002). Outra proteína que possui um domínio ligante de Ub, a Eps15 (*epidermal growth factor pathway substrate 15*), também está envolvida no reconhecimento, pois se liga ao complexo Hrs-STAM e está co-localizada com proteínas ubiquitinadas (Loshi *et al.*, 1998; Bache *et al.*, 2003), nos quais este complexo está concentrado em regiões recobertas com uma dupla camada plana de clatrina, através da interação direta com a molécula de cadeia pesada da clatrina (Raiborg *et al.*, 2001; Sachse *et al.*, 2002), onde tem a função de concentrar receptores ubiquitinados antes que sejam incorporados às vesículas lúminais do endossomo (Urbé *et al.*, 2003). Os receptores ubiquitinados são então transferidos para o complexo ESCRT-I (*endosomal sorting complex required for transport*), um complexo formado por três proteínas Vps as quais são recrutadas ao endossomo pelo complexo Hrs-STAM (Katzmann *et al.*, 2002; Bache *et al.*, 2003). Outros dois complexos de proteínas Vps, ESCRT-II e ESCRT-III são posteriormente recrutados a membrana endossomal (Katzmann *et al.*, 2002). Embora a função molecular destes complexos seja desconhecida, acredita-se que ESCRT-II e ESCRT-III são requeridos para a formação dos corpos multivesiculares e para concentração de receptores ubiquitinados no lúmen das vesículas. Um resumo do processo de internalização do EGFR pode ser observado na Figura 5.

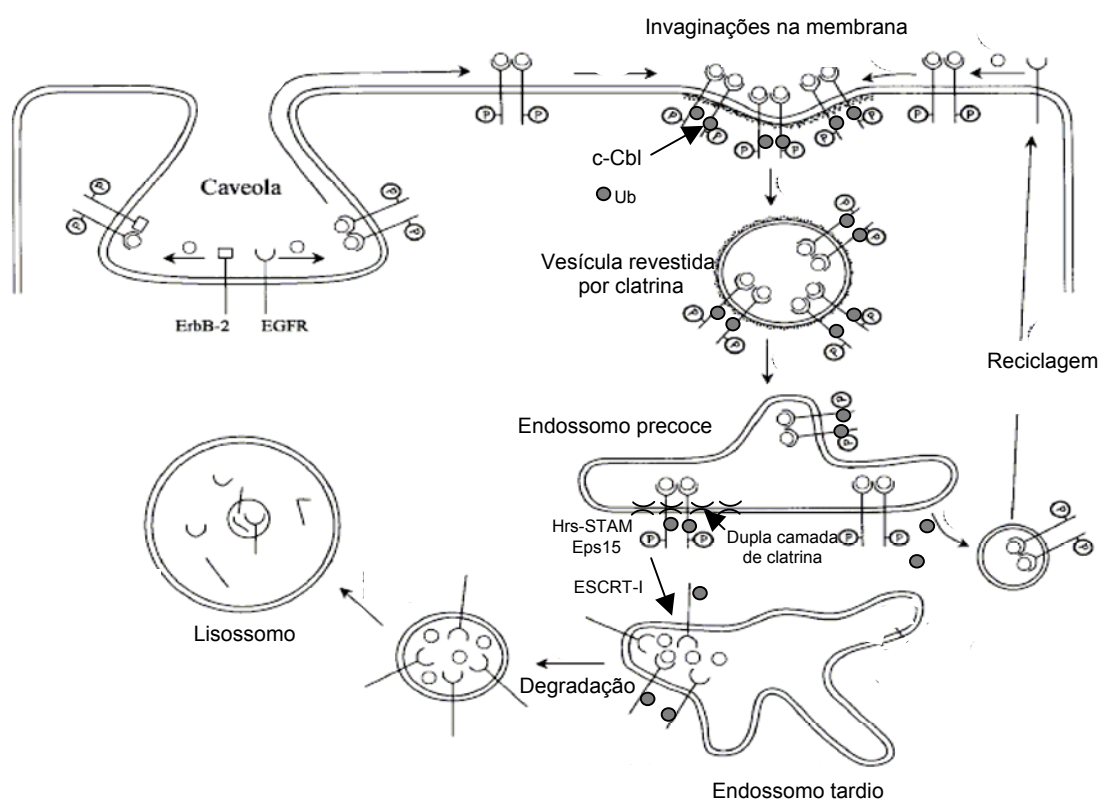


Figura 5 – Representação esquemática da internalização dos homodímeros de EGFR. Os receptores ativados pelo ligante são ubiquitinados pela ligase de Ub c-Cbl, internalizados através de vesículas revestidas pela proteína clatrina e transportados aos endossomos precoces, onde os receptores ubiquitinados são reconhecidos pelo complexo Hrs-STAM, transferidos ao complexo ESCRT-I e posteriormente direcionados aos lisossomos para degradação. Se as moléculas de Ub forem removidas dos receptores nos endossomos precoces, estes são reciclados à membrana celular.

Fonte: Modificado de Carpenter, 2000.

Acredita-se que no processo de internalização do EGFR, a conjugação de moléculas de Ub aos receptores está implicada em dois momentos distintos. Primeiramente, a ubiquitinação dos receptores tirosino-quinase serve como um sinal para a endocitose, dirigindo a internalização a partir da membrana plasmática (Hicke, 2001), embora alguns estudos demonstrem que a ubiquitinação é um evento dispensável para endocitose (Duan *et al.*, 2003). Em segundo lugar, a ubiquitinação é um sinal que deve estar presente nos receptores para que ocorra a interação com os complexos ESCRTs, os quais irão determinar a seleção de proteínas ubiquitinadas para a degradação e a produção de vesículas no interior

do endossomos. Este processo leva a formação dos corpos multivesiculares, os quais irão se fundir aos lisossomos (Katzmann *et al.*, 2002; Raiborg *et al.*, 2003). Proteínas internalizadas que não se encontram ubiquitinadas, como lipoproteínas de baixa densidade e transferrina, não se ligam aos complexos e não são direcionadas aos lisossomos.

Trabalhos recentes demonstram a participação das enzimas desubiquitinantes AMSH (*associated molecule with the SH3 domain of STAM*), AMSH-like protein (AMSH-LP) e UBPY (*Ub-specific protease Y – USP8*) no processo da endocitose mediada por clatrina (McCullough *et al.*, 2004; Mizuno *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2006). AMSH e UBPY são DUBs que compartilham um sítio comum de ligação ao domínio SH3 de STAM, no entanto pertencem a diferentes famílias de DUBs, JAMM/MPN e USPs respectivamente (Tanaka *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 2000). McCullough *et al.* (2004) demonstraram que a DUB AMSH está presente nos endossomos precoces de células Hela, onde se encontra co-localizada com a proteína EEA1 (*early endosome antigen 1*) e com os receptores transferrina e EGFR internalizados. UBPY está localizada nos endossomos em regiões positivas para Hrs (Mizuno *et al.*, 2005). AMSH e AMSH-LP interagem diretamente com a cadeia pesada de clatrina, e esta interação é necessária para a localização endossomal destas proteínas. Acredita-se que moléculas de clatrina têm a função de “ancorar” estas enzimas desubiquitinantes na membrana dos endossomos precoces (McCullough *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2006).

O papel das enzimas AMSH e UBPY na endocitose de receptores transmembrânicos como EGFR ainda é controverso (Alwan & van Leeuwen, 2007). A inibição da expressão de AMSH e UBPY através de RNA de interferência ocasionou efeitos distintos. A inibição da enzima AMSH resultou no aumento da degradação de EGFR, sugerindo que AMSH é capaz de regular negativamente a degradação deste receptor através de desubiquitinação direta nos endossomos precoces (McCullough *et al.*, 2004), evitando sua incorporação nas vesículas luminais e a conseqüente degradação nos lisossomos. Embora a inibição de UBPY também tenha levado ao aumento da degradação de EGFR no trabalho realizado por Mizuno *et al.* (2005), experimentos realizados por Row *et al.* (2006),

Bowers *et al.* (2006) e Alwan & van Leeuwen (2007) demonstraram o contrário, ou seja, que a inibição de UBPY levou a uma diminuição da degradação do receptor. Há evidências de que UBPY está envolvida na manutenção e morfologia normal do endossomo, parecendo regular os níveis de ubiquitinação de proteínas endossomais, pois a sua inibição causou alterações na distribuição e no tamanho dos endossomos e também a acumulação de Hrs e Ub em sua superfície (Mizuno *et al.*, 2006; Row *et al.*, 2006).

Dados preliminares, resultados de experimentos de cromatografia de afinidade e co-imunoprecipitação *in vitro* realizados no laboratório do Dr. Massimo Loda, do *Dana-Farber Cancer Institute*, demonstraram que a cadeia pesada de clatrina é um provável substrato de USP2a, sendo possível que esta DUB também participe do processo de endocitose mediada por clatrina. Além disso, os resultados de Priolo *et al.* (2006), que avaliaram através da técnica GSEA (*gene set enrichment analysis*) a expressão de grupos de genes em tumores de próstata com baixa e alta expressão de USP2a, demonstram que tumores que expressam altos níveis de USP2a também têm alta expressão de genes associados com EEA1 (*early endosome antigen 1*). EEA1 codifica uma proteína envolvida no processo de endocitose, na reciclagem de EGFR para a membrana e na translocação nuclear de ErbB2. Outros grupos de genes relacionados à família de receptores tirosino-quinase e ou controladores da via endocítica, como ErbB3 e Rab respectivamente, estavam super-expressos nos tumores com altos níveis de USP2a.

3 – Proposição

3.1 – Objetivo original

Estudar o papel da interação específica entre a DUB USP2a e FAS no controle da proliferação celular das linhagens celulares derivadas de CECs bucais SCC-4, -9, -15 e -25.

3.1.1 – Objetivos específicos:

1. Analisar a produção da proteína USP2a nas linhagens celulares SCC-4, -9, -15 e -25;
2. Comparar a expressão dos RNAs mensageiros das enzimas desubiquitinantes USP2a e USP2b nas mesmas linhagens celulares;
3. Avaliar o efeito de EGF e de testosterona na expressão de USP2a nas células SCC-9 e os efeitos no grau de ubiquitinação de FAS;
4. Estudar o efeito do bloqueio da expressão de USP2a sobre FAS, apoptose e proliferação das células SCC-9;
5. Estudar o efeito da super-expressão de USP2a sobre a proliferação das células SCC-9.

3.2 – Objetivo adicional

Investigar a interação entre a DUB USP2a e a cadeia pesada de clatrina em células derivadas de câncer de próstata e de CECs bucais.

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Cultura de células

As linhagens celulares SCC-4 (CRL-1624), SCC-9 (CRL-1629), SCC-15 (CRL-1623) e SCC-25 (CRL-1628) provenientes de CECs bucais humanos e adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, E.U.A.) estão estocadas no laboratório de Patologia da FOP-UNICAMP. Para a realização do presente trabalho, elas foram cultivadas em frascos plásticos de 21,5, 25, 56,7, 80 ou 150 cm² (NUNC, Naperville, IL, E.U.A.) em meio de cultura DMEM/F-12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 400 ng/ml de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona – Eurofarma, São Paulo, SP, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen) na diluição de 1:100 a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. O metabólito ativo da testosterona dihidrotestosterona (DHT – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) foi dissolvido em etanol e adicionado ao meio de cultura em concentrações entre 0,1 nM e 1 µM, sendo usado como controle meio de cultura com quantidades equivalentes de etanol. EGF (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em H₂O deionizada e utilizado em concentrações entre 0,001 e 100 ng/ml.

A linhagem celular LNCaP (ATCC), derivada de carcinoma metastático de próstata, Hela, proveniente de carcinoma de colo uterino, e HeLa transfectada com uma construção contendo o cDNA da enzima USP2a associado à etiqueta FLAG (HeLa-USP2a-FLAG) ou com o plasmídeo vazio (HeLa-pDEST), células AR-iPrEC (*immortalized AR-expressing prostate epithelial cells*) infectadas com construções contendo o cDNA da enzima USP2a associado à etiqueta HA (AR-iPrEC-USP2a-HA e Ar-iPrEC-USP2a-HA-M) ou com o plasmídeo vazio (AR-iPrEC-pBABE), células NIH3T3 (*immortalized murine fibroblasts*) infectadas com construções contendo o cDNA de USP2a associado à etiqueta FLAG (NIH3T3-USP2a-FLAG) ou o plasmídeo vazio (NIH3T3-pHE482) e células *Phoenix* (*Hek 293P cells*, ATCC), todas estocadas no laboratório do Dr. Massimo Loda no *Dana-*

Farber Cancer Institute, Boston, E.U.A., foram utilizadas para o estudo da interação entre a enzima desubiquitinante USP2a e a cadeia pesada de clatrina. Para a realização dos experimentos, elas foram cultivadas em frascos plásticos de 21,5, 56,7, 80 ou 150 cm² (NUNC) nos meios de cultura apropriados: RPMI 1640 desprovido de fenol *red* (Invitrogen) para as células LNCaP, DMEM (Invitrogen) para as células HeLa e Phoenix, MEM- α (Invitrogen) para as células NIH3T3 e PrEBM (Cambrex, East Rutherford, NJ, E.U.A.) para as células AR-iPrEC. Os meios de cultura RPMI 1640 desprovido de fenol *red*, MEM- α e DMEM foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Hyclone, Logan, UT, E.U.A.) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen) na diluição de 1:100. O cultivo foi a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.2 – Transformação e purificação de plasmídeos

Os plasmídeos de expressão eucariótica utilizados neste trabalho estão relacionados na tabela 1. O cDNA de USP2a do tipo selvagem (WT) ou mutante (M) clonados nos vetores descritos abaixo tem aproximadamente 2 kb.

Tabela 1 – Relação dos plasmídeos de expressão eucariótica.

Vetor	Fabricante	USP2a WT	USP2a M	Sítios de restrição
pcDNA3.1 His C***	Invitrogen	pcDNA 3.1 A-USP2a*	pcDNA3.1 A-USP2a M* (Δ 276, Cys-Ala)	<i>Nhe</i> I / <i>Hind</i> III
pBABE-puro (Morgenstern JP, Land H, 1990)	Addgene	pBABE-USP2a-HA*	pBABE-USP2a-HA-M* (Δ 276, Cys-Ala, Δ 549, His-Arg)	<i>Bst</i> XI / <i>Hind</i> III
pDEST-His	Addgene	pDEST-USP2aHisFLAG**	pDEST-USP2aHis FLAG-M**	<i>Sfu</i> I / <i>Bam</i> HI
pEGFP-C3	BD Biosciences Clontech	pEGFP-USP2a-HA		<i>Xho</i> I / <i>Sma</i> I

* Construídos e doados pelo laboratório do Dr. Massimo Loda (*Dana-Farber Cancer Institute, Department of Medical Oncology, Harvard Medical School, Boston, MA, U.S.A.*).

**Construídos e doados pelo Dr. Johann Zimmermann (*Novartis Pharma, Suíça*).

***Doado pela Dra. Heide Ford (*Health Science Center, School of Medicine, University of Colorado, Denver, E.U.A.*).

A transformação de 50 µl de bactérias *E. coli* competentes DH5-α (Invitrogen) foi feita através de choque térmico (45 seg a 42 °C, 2 min no gelo), seguida pela adição de 450 µl de meio SOC e incubação por 1 h em *shaker* a 37 °C. Após esse período foi feita a semeadura em placas de Petri contendo meio LB-ágar-ampicilina ou LB-ágar-kanamicina e incubação em estufa a 37 °C por cerca de 16 h. As colônias isoladas foram expandidas em 2 ml de meio LB contendo ampicilina ou kanamicina por cerca de 16 horas a 37 °C sob intensa agitação. As bactérias foram então centrifugadas e utilizadas para extração de DNA plasmidial, utilizando-se o *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) ou o *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração dos DNAs plasmidiais foi estimada em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, para se obter a concentração e pureza respectivamente. A seguir foram realizadas eletroforeses em géis de agarose a 0,8% -1,2%, os quais foram corados com brometo de etídio para visualização da integridade do DNA.

4.3 – Construção pEGFP-USP2a-HA

Com o intuito de se obter uma seqüência selvagem de USP2a contendo uma etiqueta fluorescente em sua parte N-terminal, o inserto correspondente ao cDNA da USP2a foi clonado no plasmídeo de expressão eucariótica pEGFP-C3. Dez microgramas do plasmídeo pWZL-USP2a-HA (com cDNA de USP2a clonado entre os sítios de restrição *XhoI* e *SnaBI*, previamente construído no laboratório do Dr. Massimo Loda), foram digeridos com 30 U das enzimas de restrição *XhoI* e *SnaBI* (New England Biolabs, Ipswich, MA) em tampão apropriado, por 1 hora a 37 °C. Cinco microgramas do plasmídeo pEGFP-C3 foram digeridos com 30 U das enzimas *XhoI* e *SmaI* (New England Biolabs) em tampão específico por 1 hora a 37 °C e posteriormente submetidos a reação de desfosforilação com 1 µl da enzima SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*) em tampão específico por 1 hora a 37 °C. Os produtos das duas digestões foram aplicados em gel de agarose a 1 %. A seqüência correspondente ao inserto de USP2a digerida do plasmídeo pWZL e

o plasmídeo pEGFP-C3 digerido e linearizado foram purificados do gel com o *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen) e 2 µl de cada foram novamente aplicados em gel de agarose a 1 % para verificação da integridade do DNA. Foi realizada então a reação de ligação do inserto ao vetor utilizando-se diferentes quantidades de inserto (2 ou 5 µl para cada microlitro do vetor) e dois controles negativos, um deles desprovido do inserto e o outro desprovido do inserto e da enzima ligase. Bactérias *E. coli* competentes DH5-α (Invitrogen) foram então transformadas com os produtos das 4 reações de ligação e semeadas em placas de Petri (como descrito no item 4.2.). Foi possível observar um número muito maior de colônias para os grupos de bactérias transformadas com os produtos onde estavam presentes inserto e vetor do que nos controles negativos. Dezoito colônias foram isoladas e expandidas em 2 ml de meio LB contendo kanamicina por cerca de 16 horas a 37 °C sob intensa agitação. As bactérias foram então centrifugadas e utilizadas para extração de DNA plasmidial com o *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen). Dez microlitos de cada uma das 18 amostras de DNA plasmidial foram digeridos com 30 U das enzimas XhoI e BamI em tampão específico por 1 hora a 37 °C. Os produtos foram aplicados em gel de agarose a 1,2 % para a visualização do tamanho do inserto e do vetor e integridade do DNA. Dezesesseis das 18 amostras apresentaram fragmentos de DNA compatíveis com o tamanho do inserto e do vetor. Duas amostras foram escolhidas e enviadas para sequenciamento que foi realizado pelo *Molecular Biology Core Facility* (*Dana-Farber Cancer Institute*) com a utilização de *primers* específicos para o plasmídeo (EGFPC1FOR e EGFPC1REV) ou para o inserto (5' ACCTCAGATAGCTACCGGA 3' e 5' GAAGAGTTTGCAAACTAA 3'). O sequenciamento confirmou que a seqüência de USP2a selvagem foi corretamente clonada no plasmídeo pEGFP-C3.

4.4 – Super-expressão de USP2a selvagem ou mutante em células SCC-9: clones estáveis

4.4.1 – Transfecções estáveis

As células SCC-9 foram semeadas em placas de cultura de 56,7 cm² (Nunc) em meio de cultura apropriado contendo 10 % de FBS e incubadas até a confluência de 60-70 %. Neste momento, foram então transfectadas com 2 µg/ml dos vetores plasmidiais pcDNA3.1 A-USP2a, pcDNA3.1 A-USP2aM e pcDNA3.1 His C anteriormente descritos com o reagente lipofectina (Invitrogen) na concentração de 5 µg/ml, de acordo com as instruções do fabricante. Após 7 horas, o meio de transfecção foi substituído por meio de cultura convencional acrescido de 10 % de FBS por aproximadamente 48 horas. Após esse período, procedeu-se a tripsinização, centrifugação e a ressuspensão do *pellet* em meio contendo o antibiótico Geneticina na concentração 400 µg/ml (G-418, Invitrogen). Foram plaqueadas cerca de 240.000 células em cada placa de 56,7 cm² e completado o volume até 7 ml com meio contendo Geneticina, o qual foi trocado a cada 48 horas até que fossem visualizadas colônias individualizadas. Os clones sobreviventes foram selecionados, expandidos e congelados em nitrogênio líquido. As linhagens transfectadas foram a seguir crescidas para a preparação de extratos protéicos e realização de reações de western-blotting com anticorpos específicos anti-USP2a, assim como para extração de RNA e realização de RT-PCR. Os transfectantes que apresentaram a mais alta produção das proteínas estudadas foram utilizados nos próximos experimentos.

4.4.2 – Infecções

Meio milhão de células *Phoenix* foram semeadas em placas de cultura de 21,5 cm² em 5 ml de DMEM contendo 10% de FBS. No dia seguinte, quando estavam numa confluência de aproximadamente 40%, foram transfectadas com 2 µg dos plasmídeos retrovirais pBABE-USP2a-HA, pBABE-USP2a-HA-M ou pBABE, juntamente com vetores retrovirais Gagpol e *helper vector* (vsvg) (2 µg) com 6 µl de Fugene (Roche, Indianapolis, IN, E.U.A.). A mistura dos DNAs plasmidiais e Fugene foi feita em OptiMEM (Invitrogen), com volume final de 100 µl. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, os complexos DNA/Fugene foram adicionados as placas de cultura, nas quais o meio de cultura

havia sido previamente substituído por 5 ml de meio DMEM 10% FBS fresco. Para a verificação da eficiência da transfecção em microscópio de fluorescência, uma placa de cada grupo foi também transfectada com o plasmídeo pEGFP-C3 (1 µg). Dezesesseis horas após a transfecção o meio de cultura foi trocado por DMEM 10% FBS novo. Neste mesmo dia, $0,5 \times 10^6$ células SCC-9 foram semeadas em placas de cultura de 21,5 cm² contendo 5 ml de DMEM/F-12 10% FBS para posterior infecção. Após cerca de 36 horas de transfecção, as placas com células *Phoenix* transfectadas com o plasmídeo pEGFP-C3 foram observadas em microscópio de contraste de fase com sistema de fluorescência para a avaliação da eficiência de transfecção, a qual foi de aproximadamente 80%. Os sobrenadantes das células *Phoenix* de duas placas pertencentes ao mesmo grupo foram então coletados em um único tubo de 50 ml (Nunc), e 5 ml de meio novo foram adicionados a estas mesmas placas. Os sobrenadantes (aproximadamente 10 ml para cada grupo) foram filtrados em filtros de 0,45 µm (Nalgene, Rochester, NY, E.U.A.) em seringas de 10ml e a seguir misturados 2,5 µg/ml de *polybrene* (Sigma-Aldrich). Para infectar as células SCC-9, o meio de cultura foi removido e em seguida adicionados 4,5 ml dos sobrenadantes das células *Phoenix* (isto foi feito em duas placas de cada grupo: USP2a selvagem, mutante e plasmídeo vazio). No dia seguinte, foi realizada uma segunda infecção com o mesmo protocolo descrito acima. Após a segunda infecção, as células SCC-9 foram mantidas em cultura por mais 48 horas, tripsinizadas e então semeadas (10.000 a 200.000 células) em placas de 56,7 cm². Depois de aderidas às placas de cultura, foram adicionados 7 ml de meio contendo 2 µg/ml de puomicina (A.G. Scientific, San Diego, CA, U.S.A.), o qual foi trocado a cada 48 horas até que houvesse a formação de colônias. Os clones sobreviventes foram expandidos, congelados em nitrogênio líquido e a seguir utilizados para a preparação de extratos protéicos e realização de reações de western-blotting com anticorpos anti-HA ou anti-USP2a. Os transfectantes que apresentaram produção mais alta das proteínas em questão foram selecionados para os próximos experimentos.

4.5 – Transfecções transitórias

Células LNCaP ou HeLa foram semeadas em placas de cultura de 150 cm² e quando em confluência de aproximadamente 90%, transfectadas transitoriamente com 2 µg/ml dos plasmídeos pDEST-USP2aHisFLAG, pDEST-USP2aHisFLAGM ou pEGFP-C3 anteriormente descritos, com 4 µg/ml do reagente lipofectamina 2000 (Invitrogen). A mistura DNA/lipofectamina foi feita em OptiMEM (Invitrogen) e após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente os complexos foram adicionados às placas de cultura contendo meio de cultura próprio para cada tipo de célula, desprovido de solução antibiótica/antimicótica e FBS. Após 4 horas de transfecção, o meio de cultura foi substituído por meio contendo 10% FBS e as células mantidas por mais doze horas em cultura, quando foram então coletadas para extração protéica como descrito no item 4.7. As células transfectadas com o plasmídeo pEGFP-C3 foram observadas em microscópio de fluorescência para a avaliação da eficiência de transfecção, que variou de 50-70%.

4.6 – RNA de interferência para USP2a

Duzentas mil células SCC-9 foram semeadas em placas de cultura de 21,5 cm² ou quinhentas mil semeadas em placas de 56,7 cm² em DMEM/F-12 suplementado com 10% de FBS e 400 ng/ml de hidrocortisona e sem solução antibiótica/antimicótica. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram transfectadas com 100 nM de anti-USP2a *small interfering RNA* (siRNA) [r(UGCUUGUGCCCGGUUCGAC)d(TT)] ou 100 nM da sequência controle *siControl nontargeting siRNA* n° 2 (Dharmacon, Lafayette, CO, E.U.A.) com 5 µg/ml de Oligofectamina (Invitrogen). As soluções contendo as sequências de siRNA e oligofectamina foram preparadas em OptiMEM conforme recomendações do fabricante e depois de misturadas mantidas por 20 minutos a temperatura ambiente. As células SCC-9 foram lavadas com PBS e então adicionado meio de cultura DMEM/F-12 sem FBS e sem solução antibiótica/antimicótica, sendo em

seguida adicionados os complexos siRNA/oligofectamina. Após 4 horas de transfecção, foi adicionada quantidade equivalente à metade do volume de meio de cultura de cada placa de meio com 30% de FBS, para que a concentração final de FBS ficasse em 10%. Quarenta e oito e 72 horas após a transfecção as células foram coletadas para a verificação da inibição da expressão de USP2a através de RT-PCR quantitativo e western-blotting. As células também foram coletadas nos períodos de 72, 96 e 120 horas após a transfecção para a verificação das taxas de morte celular.

4.7 – Preparação dos extratos protéicos

Os *pellets* de células para a extração protéica foram obtidos através da raspagem dos frascos de cultura com *scrapers* ou *cell lifters* descartáveis (Corning Costar, New York, NY, E.U.A.) quando as células estavam com confluência de aproximadamente 70%. As proteínas foram extraídas em um tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton-X, 20 mM de Tris pH 8,0, 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA e 1 mM de NaF. Os inibidores de proteinase PMSF (1 mM), inibidor de tripsina (*soybean trypsin inhibitor*, 10 µg/ml), aprotinina (1 µg/ml) e leupeptina (1 µg/ml) foram adicionados ao tampão de lise imediatamente antes do uso. Cem microlitros deste tampão foram colocados sobre os *pellets* celulares, os quais foram dissociados por pipetagem e mantidos no gelo por 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Depois deste período foi realizada centrifugação a 12.000 xg por 15 minutos a 4 °C e os sobrenadantes coletados, sendo alíquotas de 1,25 µl de cada extrato separadas para quantificação protéica. Todos os extratos protéicos foram imediatamente congelados em gelo seco e transferidos para *freezer* -80 °C, no qual foram mantidos até o momento do uso. A quantidade de proteína total dos extratos protéicos foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando-se o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) em espectrofotômetro ajustado para 595 nm.

4.8 – Separação eletroforética de proteínas e western-blotting

Quantidades equivalentes de proteínas de cada extrato celular foram misturadas com um tampão de amostra redutor 4x concentrado (2% de SDS, 125 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,001 % de azul de bromofenol, 2% de β -mercaptoetanol), fervidas por 5 minutos e separadas eletroforeticamente em géis de poliacrilamida-SDS a 6%, 8%, 10% ou em géis com gradientes de poliacrilamida de 4-12% (Invitrogen). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Invitrogen) em tampão contendo 1,2 mM de Tris-HCl pH 8,0, 9,6 mM de glicina e 20% de metanol por um período de cinco horas e trinta minutos a 50 V. Logo após, todas as membranas foram coradas com o corante *Ponceau S* (Sigma-Aldrich) para verificar a eficácia da transferência e bloqueadas por 16 horas a 4 °C em uma solução contendo 5% leite em pó desnatado dissolvido em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 7,6, 150 mM de NaCl e 0,1 % de Tween 20 (TBST). As membranas foram a seguir incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com os anticorpos primários relacionados na Tabela 2, os quais foram diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado.

Tabela 2 – Relação dos anticorpos primários utilizados nas reações de western-blotting.

Anticorpos	Clone	Fabricante	Diluição
FAS	23	BD Transduction Laboratories	1:3000
Core	policlonal	Não comercial*	1:100
USP2a N-terminal	policlonal	Abgent	1:200
USP2a C-terminal	policlonal	Abgent	1:400
HA	HA.11	Covance	1:1000
FLAG	monoclonal	Sigma-Aldrich	1:1000
PARP-clivada	policlonal	Cell Signaling	1:1000
EGFR	policlonal	Cell Signaling	1:1000
ErbB2	policlonal	DAKO	1:1000
p-27	G173-524	BD Transduction Laboratories	1:1000

Cadeia pesada de clatrina	23	BD Transduction Laboratories	1:1000
EEA1	policlonal	Abcam	1:1000
Rab-5	15	Abcam	1:500
GFP	monoclonal	Sigma-Aldrich	1:500
Receptor de andrógeno	policlonal	Upstate Biotechnology	1,5 µg/ml
Ub	policlonal	Sigma-Aldrich	1:500
β-actina	AC-15	Sigma-Aldrich	1:40000

* Anticorpo não comercial, doado pelo Dr. Simon Wing, McGill University, Toronto, Canadá.

Após a incubação com o anticorpo primário, foram então realizadas quatro lavagens de 15 minutos com TBST, seguidas de incubação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase na diluição de 1:1000 (anti-IgG de camundongo para as reações contra FAS, HA, FLAG, p27, cadeia pesada de clatrina, GFP e β-actina e anti-IgG de coelho para as reações contra USP2a, c-PARP, EGFR, ErbB2, EEA1, RA e Ub) por 1 hora a temperatura ambiente. Depois de mais quatro lavagens de 15 minutos com o mesmo tampão, as reações foram reveladas através de quimioluminescência, utilizando-se o kit de detecção ECL – Amersham ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, E.U.A.).

4.9 – Purificação de RNA e RT-PCR semi-quantitativo

RNA total foi purificado dos *pellets* celulares usando o reagente Trizol (Invitrogen). Antes das reações de RT, todas as amostras de RNA total foram tratadas com 1 U de DNase I (Amplification Grade, Invitrogen) por 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante. Para a síntese de cDNA, 1µg de RNA total foi reversamente transcrito em uma reação com volume final de 21µl, contendo 0,5mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de RNase, 50 U da enzima Superscrit II RT (Invitrogen), 0,5µg de *primers* oligo-dT (Invitrogen) e tampão 1 X

(contendo 1,5mM MgCl₂). As reações foram realizadas a 42 °C por 50 minutos, seguidas de incubação a 70°C por 15 minutos. Reações sem a enzima RT foram usadas como controles negativos. Para garantir que a análise da amplificação nas reações de PCR fosse feita na fase exponencial, várias reações de PCR idênticas foram preparadas e paralisadas após diferentes números de ciclos, a partir das quais foi determinado o ciclo que melhor representa a fase exponencial da reação. Para a amplificação específica dos cDNAs através de PCR, *primers* específicos para USP2a (sense: GCCGCTACACACTGTGGGA; antisense: AGCATCCTGCTGATTATAGC), GAPDH (sense: GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC; anti-sense: GAAGATGGTGATGGGATTTC), FAS (sense: AACTCCTTGGCGGAAGAGA; anti-sense: TAGGACCCCGTGGAATGTCA) e β -actina (sense: CATCCTCACCTGAAGTACC; antisense: GGTGAGGATCTTCATGAGGT) foram delineados usando o programa *Amplify 1.2* (Universidade de Wiscosin, Madison, WI, E.U.A.) e seqüências dos respectivos RNAs mensageiros provenientes do *GenBank* (NCBI - *National Center for Biotechnology Information* - NIH, E.U.A.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os transcritos USP2a e GAPDH foram amplificados em reações de 50 μ l contendo 2 μ l de cDNA, 1 U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen) e 0,2mM de cada *primer*. As condições do PCR foram: 94 °C por 5 minutos, 45 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 4 minutos. Os produtos foram separados em géis de agarose a 1,8% corados com brometo de etídeo.

4.10 – RT-PCR quantitativo

RNA total foi purificado dos *pellets* celulares das células SCC-9 transfectadas com anti-USP2a siRNA ou tratadas com diferentes concentrações de EGF usando o reagente Trizol (Invitrogen). Antes das reações de RT, todas as amostras de RNA total foram tratadas com 1 U de DNase I (Amplification Grade, Invitrogen) por 10 minutos a temperatura ambiente, para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante. Para a síntese de cDNA, 1 μ g de RNA total foi

reversamente transcrito em uma reação com volume final de 21 µl, contendo 0,5 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de RNase, 200 U da enzima Superscript III RT (Invitrogen), 0,5 µg de *primers* oligo-dT (Invitrogen) e tampão 1 X (contendo 1,5 mM MgCl₂). As reações foram realizadas a 50 °C por 50 minutos, seguidas de incubação a 85 °C por 5 minutos. Reações sem a enzima RT foram usadas como controles negativos. O RT-PCR quantitativo foi feito no equipamento *ABI Prism 7300 PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.) utilizando-se *SYBR green master mix* (Applied Biosystems). A quantidade de RNA mensageiro para cada gene foi calculada através do método das curvas padrão (4 diluições logarítmicas em triplicata) e os dados foram analisados no programa SDS 2.2 (Applied Biosystems). Os seguintes primers foram utilizados para quantificar os níveis de RNA mensageiro de USP2a: sense 5'-TGCTGAGACCCGACATCACT-3'; antisense 5'-TGGGGTCTATCCGGTAGCTA-3'. Os transcritos para USP2a e GAPDH foram amplificados em reações de 25 µl contendo 1 µl de cada cDNA, 12,5 µl do *SYBR green PCR master mix*, 0,4 µM de cada primer e 9,5 µl de H₂O DNase, RNase free (Invitrogen). As condições do PCR foram: 1 ciclo de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 20 segundos e 60 °C por 1 minuto e 1 ciclo de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos. A quantidade relativa de USP2a foi normalizada pelos níveis de GAPDH (*forward* 5'-GCCTGTGAGTGAGTGCAGAA-3', *reverse* 5'-ATCTCTGTGTCGTCGTCCTCGT-3' utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

4.11 – Proliferação celular

Para comparar o potencial proliferativo dos transfectantes estáveis das células SCC-9 com expressão forçada de USP2a selvagem ou mutante foram realizadas curvas de proliferação e experimentos para avaliar o ciclo celular, através da marcação por iodeto de propídio em citometria de fluxo.

4.11.1 - Curvas de proliferação

Para cada linhagem foi feito o plaqueamento de 5×10^3 células em 1 ml de meio DMEM/F-12 contendo 10% de FBS em cada poço de placas para cultura celular de 24 poços (Nunc). Após 16 horas, os poços foram lavados com PBS, o meio trocado por DMEM/F-12 livre de FBS e as células incubadas por mais 48 horas. Para estimular o crescimento celular, ao término deste período foi novamente colocado o meio DMEM/F-12 contendo 10% de FBS. Nos períodos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a adição do meio com FBS, as células de 3 poços de cada placa foram lavadas com PBS e incubadas com 0,3ml de tripsina a 2%, ambos a 37 °C, até todas que estivessem completamente separadas do fundo da placa. A tripsina foi inativada com 2 ml de meio DMEM/F-12 com 10% de FBS, alíquotas de 100 µl diluídas em 10 ml de isoton (Coulter Balanced Eletrolytic Solution, Beckman, E.U.A.) e contadas em contador automático de partículas (Coulter Counter Z-1, Beckman Coulter, Fullerton, CA, E.U.A.). Todas as contagens foram feitas em triplicata e os experimentos repetidos três vezes. Após obtenção dos valores médios de cada período, foram construídas curvas de proliferação utilizando-se o programa Excel (Microsoft, E.U.A.).

4.11.2 – Avaliação do ciclo celular em citometria de fluxo

A avaliação do ciclo celular dos clones das células SCC-9 foi feita através da marcação por iodeto de propídio em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ E.U.A.). De cada linhagem, 5×10^5 células foram semeadas em meio DMEM/F-12 contendo 10% de FBS em placas de cultura celular de 56,7 cm² (Nunc). Após 16 horas, foi feita lavagem com PBS e sincronização do ciclo celular através de incubação por 24 horas em meio DMEM/F-12 desprovido de soro. Para estimular o crescimento celular, ao término do período da sincronização foi novamente colocado o meio DMEM/F-12 contendo 10% de FBS. Depois de 24 horas, as células de cada placa foram tripsinizadas, centrifugadas a 3500 rpm por 3 minutos, lavadas com PBS, novamente

centrifugadas e fixadas por 16 horas a 4 °C em etanol a 70% gelado. Após este período, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e os pellets ressuspensos em 500 µl de uma solução contendo RNase A a 0,2 mg/ml e 50 µg/ml de iodeto de propídio em PBS e incubados a temperatura ambiente sob abrigo da luz por 1 hora. Em seguida, efetuou-se a leitura de todas as amostras no citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, Elmhurst, IL, U.S.A.), com auxílio do programa CellQuest (Becton Dickinson). Dez mil eventos foram analisados para cada amostra.

4.12 – Determinação das taxas de morte celular

A análise da porcentagem de células em sub-G1 (Riccardi & Nicoletti, 2006) em citômetro de fluxo foi utilizada para se estimar a quantidade de células em morte celular (os procedimentos são os mesmos descritos em 4.11.2). Extratos protéicos foram obtidos como descrito no item 4.7 e separação eletroforética e reações de western-blotting para PARP clivada (*c-PARP* – (*poly ADP-ribose*) *polymerase*) foram realizadas conforme descrito no item 4.8. PARP é uma proteína de 116 kDa envolvida no reparo do DNA e formação da cromatina. Durante a apoptose esta proteína é clivada pela caspase 3, e possivelmente por outras caspases, em um fragmente de 89 kDa, o qual pode ser identificado com a utilização de anticorpo específico.

4.13 – Ensaio de degradação proteossômica *in vitro*

As células SCC-9 foram cultivadas como descrito no item 4.1 e dependendo do experimento, tratadas ou não com 100 pg/ml ou 100 ng/ml de EGF, coletadas após 24 ou 36 horas e usadas para preparação dos extratos protéicos com o mesmo tampão de lise descrito em 4.7. Entre 60 a 200 µg de proteína total foram utilizados para os ensaios de degradação proteossômica (Waltregny *et al.*, 2001), dependendo do experimento. Reações de 60,4 µl foram montadas para cada amostra, contendo 6 µl do tampão de degradação (500mM

Tris HCl pH 8,0, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina), 30 µl do tampão de incubação (20 mM fosfocreatina – Sigma-Aldrich, 120 µg/ml de creatina fosfoquinase –Sigma-Aldrich, 10 µM de Ub – Sigma-Aldrich e 4 mM de ATP – Invitrogen). O restante do volume (24,4 µl) foi completado com o extrato protéico e a normalização de volume entre as amostras foi realizada pela adição de tampão de lise acrescido dos inibidores de protease utilizados para o preparo dos extratos protéicos. Reações controle contendo o inibidor do proteossomo MG-132 (500 µM ou 250 µM) ou o veículo DMSO foram preparadas. Quatorze microlitros do volume final da reação de cada amostra foram transferidos para 4 tubos independentes, que foram mantidos a 37°C por 0, 20, 30 ou 45 horas. A reação foi paralisada pela adição de 3,5 µl de tampão de amostra 4x contendo 20% DTT e as amostras fervidas e aplicadas em géis de poliacrilamida-SDS a 6%. Posteriormente, foram realizadas reações de western-blotting utilizando-se anticorpos contra FAS , Ub ou β-actina.

4.14 – Co-imunoprecipitação *in vivo* de USP2a e clatrina

Células LNCaP foram transfectadas transitoriamente com os plasmídeos pDEST-USP2aHisFLAG, pDEST-USP2aHisFLAGM, pEGFP-USP2a-HA ou pEGFP-C3 por 12 horas, de acordo com o protocolo descrito no item 4.5. Após este período elas foram lavadas e incubadas por 1 hora e trinta minutos em meio RPMI livre de metionina e cisteína (Invitrogen). A seguir, novo meio RPMI livre de metionina e cisteína agora contendo 25 µCi/ml de metionina 35S (Perkin Elmer Life Science, Boston, MA, E.U.A.) e 20 µM de MG-132 foi adicionado sobre as células, que foram incubadas por mais 4 horas. As células foram coletadas em PBS gelado e os extratos protéicos preparados em tampão de lise contendo 25 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM NaCl, 0,5% NP40, 50 mM NaF, 10 mM N-etilmaleimida (NEM) e 100 µM MG-132 suplementados com um coquetel de inibidores de protease (Roche) e fosfatases (*Phosphatase Inhibitor Cocktail 2*, Sigma-Aldrich). Os *pellets* celulares foram dissociados por pipetagem e mantidos no gelo por 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Depois deste período

foi realizada centrifugação a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados, sendo amostras de 1,25 µl de cada extrato separadas para quantificação protéica. A quantidade de proteína total dos extratos protéicos foi determinada pelo método de Bradford e quinhentos microgramas ou 1 mg de cada extrato foram imunoprecipitados por 2 horas a 4 °C com 4-8 µg de anticorpos anti-cadeia pesada de clatrina (clone X22, BD Transduction Laboratories), anti-USP2a-N-terminal (Abgent), anti-FAS (BD transduction laboratories), anti-HA clone HA.11 (Covance), anti-GFP (Sigma-Aldrich) e incubados com 30 µl proteína A/G agarose (Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora a 4 °C. Quando construções contendo a etiqueta Flag foram utilizadas nas transfecções, as imunoprecipitações foram realizadas com *anti-FLAG M2 affinity gel* (Sigma-Aldrich) por 1 hora a 4 °C. Após 3 lavagens dos *beads* de proteína A/G agarose ou *anti-FLAG M2 affinity gel* com tampão de lavagem contendo 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl e inibidores de fosfatase e uma lavagem com 10 mM Tris pH 7,5, as proteínas foram eluídas e separadas em gel gradiente de poliacrilamida 4-12% (Invitrogen). Estes foram secos e expostos a filmes radiográficos (Eastman Kodak) por 24 – 72 horas a – 80 °C.

4.15 – Reações de imunofluorescência

Foram realizadas reações de dupla marcação através de imunofluorescência com os anticorpos anti-HA (HA.11, Covance) e anti-cadeia pesada de clatrina (*Rabbit polyclonal*, Abcam). Para isto, lâminas para cultura celular com oito poços (Lab Tek, Nunc) receberam 2×10^4 células SCC9-USP2a-HA ou AR-iPrEC-USP2a-HA suspensas em 0,4 ml de meio apropriado com 10% de soro fetal bovino em cada poço. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% a temperatura ambiente por 15 minutos. As lâminas foram então lavadas três vezes com PBS (5 minutos cada), as células permeabilizadas com 0,5% Triton em PBS por 15 minutos, lavadas novamente com PBS (5 minutos) e bloqueadas com a solução *Protein block* (Dako) por 10 minutos. A incubação com o anticorpo primário foi então realizada, primeiramente

com anti-HA (1:100) diluído em PBS por 2 horas a temperatura ambiente, seguida da incubação com o anticorpo secundário *mouse link* (1:200) diluído em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, após lavagem em PBS, foi realizada a incubação com FITC (1:25) diluído em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi realizado outro bloqueio com a solução *protein block* (Dako) por 10 minutos e seguiu-se a incubação com o anticorpo primário anti-clatrina (1:100) diluído em PBS por 2 horas a temperatura ambiente, seguida de lavagem e incubação com o anticorpo secundário *rabbit link* (1:200) diluído em PBS por 1 hora a temperatura ambiente e incubação com *Texas Red* (1:200) diluído em PBS por 15 minutos. Foram também realizadas reações de imunofluorescência para a avaliação da distribuição intracelular de USP2a-HA nas células SCC-9 que expressavam de forma estável USP2a associada à etiqueta HA. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito anteriormente para as marcações duplas de HA e clatrina, sendo FITC utilizado como corante fluorescente. Depois de novamente lavadas com PBS, as células foram contra-coradas com *Hoechst* (10 μ M) (Invitrogen) por 5 minutos e montadas em meio de montagem (VECTASHIELD® Mounting Medium, Vector Laboratories, Burlingame, CA, E.U.A.). As lâminas foram observadas no microscópio *Axioplan 2-Apotome epifluorescence* (Carl Zeiss, Alemanha) com lente objetiva *Plan-Apochromat* com aumento de 63X sob imersão e fotografadas utilizando-se o software Axiovision 4.4.

Para a avaliação da distribuição intracelular de EGFP-USP2a-HA nas células LNCaP na presença ou ausência de EGF, estas foram diretamente plaqueadas (2×10^5) em lamínulas de vidro colocadas em placas de cultura de 21,5 cm² e após 24 horas, transfectadas transitoriamente com a construção pEGFP-USP2a-HA por 12 horas. Quando necessário, foi realizado o tratamento das células com 100 ng/ml de EGF por 10 minutos. Antes da fixação com paraformaldeído a 4%, as placas foram colocadas no gelo e as membranas celulares foram marcadas com a toxina B da cólera (CLTxB *Alexa Fluor 594 cholera toxin subunit B conjugate*, Invitrogen) na diluição de 1:10.000 (em meio de cultura RPMI 1640) por 5 minutos ao abrigo da luz. Os núcleos foram contra-corados com *Hoechst* e as lâminas observadas como descrito anteriormente.

4.16 - Forma de Análise dos Resultados

Os resultados obtidos nos ensaios de western-blotting e RT-PCR foram quantificados por análise densitométrica, que foi realizada com o auxílio de um densitômetro modelo GS-700 (Bio Rad, E.U.A.) e do programa *Molecular Analyst* (Bio Rad). Após obtenção dos valores médios de cada período de contagem das curvas de proliferação, foram construídos gráficos utilizando-se o programa Excel (Microsoft, E.U.A.).

5 – Resultados

5.1 – Células

As linhagens SCC-4 e -15 se mostraram semelhantes no aspecto morfológico, ambas com células grandes, arredondadas e com nucléolos evidentes, células multinucleadas e crescimento formando redes (Figuras 6A e 6C). O tempo de incubação com tripsina necessário para soltar as células dos frascos ou placas de cultura foi de 6 minutos para a SCC-15 e 7 minutos para a SCC-4. Uma particularidade observada na linhagem SCC-15 foi o fato das células formarem agregados de difícil separação, os quais eram dissociados mecanicamente através de pipetagem, antes das quantificações no contador automático de células.

A linhagem SCC-9 é composta por células também arredondadas, porém menores do que as células SCC-4 e -15. Os núcleos são grandes com nucléolos bastante evidentes e, ao contrário das linhagens SCC-4 e -15, apresenta poucas células multinucleadas. Esta linhagem também apresentou um padrão de crescimento em rede (Figura 6B), sendo necessário um tempo mais longo de tripsinização (8 minutos) para soltá-las dos frascos de cultura.

Células pequenas, com citoplasma escasso, núcleo grande e nucléolos evidentes, com aspecto variando de arredondado a fusiforme (Figura 6 D) caracterizam a linhagem SCC-25. O padrão de crescimento desta linhagem foi diferente, sendo observada a formação de pequenos grumos. Esta linhagem necessitou o menor tempo de tripsinização (cerca de 5 minutos) e, quando observadas ainda em suspensão ao microscópio de contraste de fase, sempre se apresentaram mais soltas e dispersas do que as outras três linhagens estudadas.

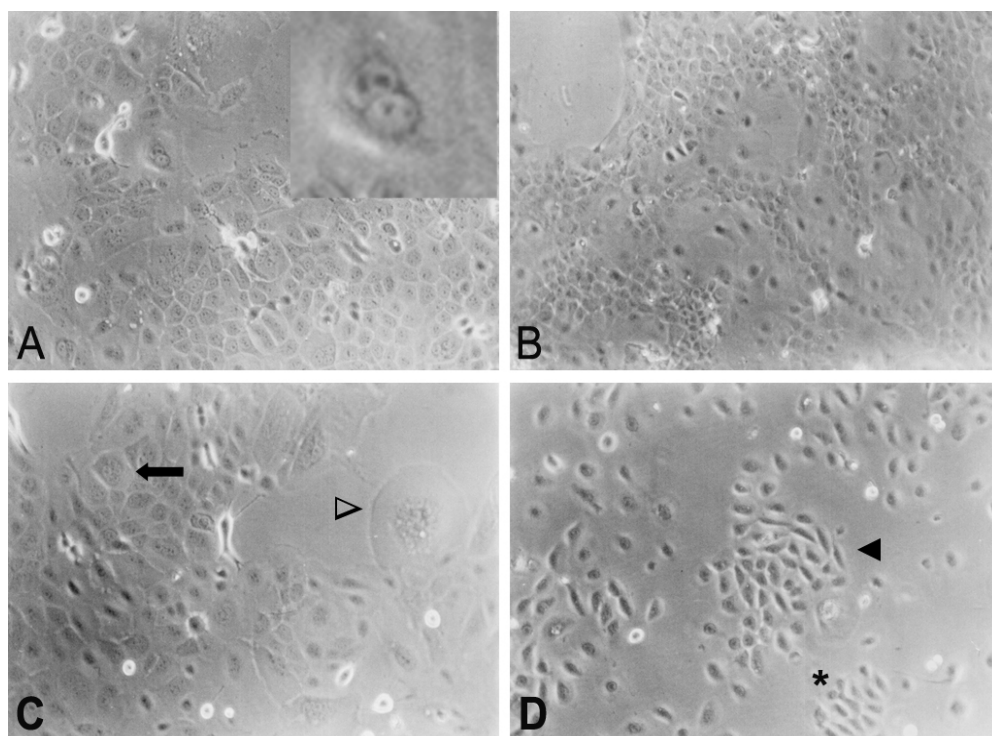


Figura 6– Aspecto morfológico das linhagens celulares SCC-4 (**A**), -9 (**B**), -15 (**C**) e -25 (**D**) em culturas subconfluentes, observadas em microscopia de contraste de fase. Em **A** observa-se a presença de nucléolos evidentes (detalhe em maior aumento), em **B** a formação de redes de células característica da linhagem SCC-9, em **C** a presença de célula grande ($\triangleright$) e células multinucleadas ($\blackleftarrow$) e em **D** células fusiformes presentes na linhagem -25 ($\blacktriangleleft$) com seu típico crescimento em grumos (*). (Aumento original: 100x).

5.2 – Expressão de USP2a e USP2b pelas células SCC

A produção de USP2a e USP2b pelas linhagens celulares SCC-4, -9, -15 e -25 foi avaliada através de experimentos de RT-PCR semi-quantitativo e de western-blotting. A Figura 7A mostra gel desnaturante de formaldeído-agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo, no qual foram aplicadas amostras de RNA total das células SCC, demonstrando a integridade das mesmas. Na Figura 7B observamos gel de agarose a 1,8% corado com brometo de etídeo, no qual 16µl de cada produto de RT-PCR foram aplicados. Neste experimento, constatou-se que as linhagens SCC-4 e -15 foram as que apresentaram a maior expressão de RNAs mensageiros para USP2a. Quantidades menores destes mensageiros foram detectadas nas linhagens SCC-9 e -25. Já para USP2b, as linhagens que apresentaram as maiores quantidades de RNAs mensageiros foram a SCC-9 e -25, sendo observadas menores quantidades nas SCC-4 e -15. Estes achados foram confirmados por outros dois experimentos semelhantes.

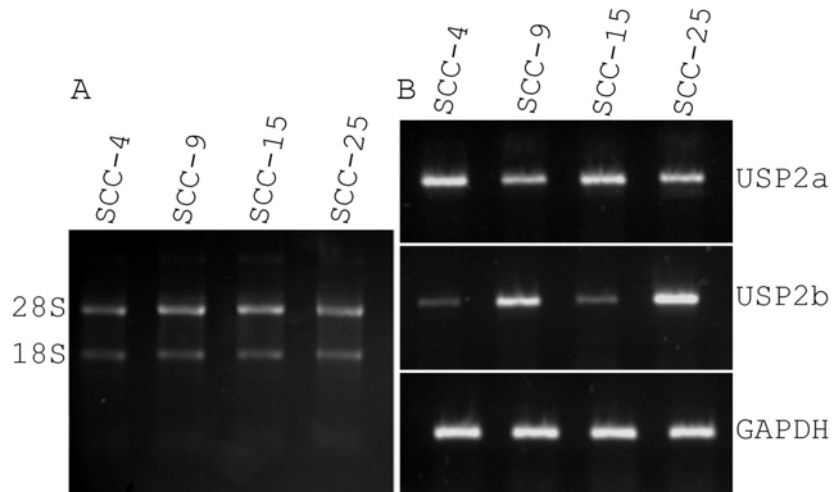


Figura 7 – A – Gel de formaldeído-agarose a 1,2% onde foi aplicado 1µg de RNA de cada amostra, constatando a integridade das mesmas pela presença das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S. **B** – Gel de agarose a 1,8% onde foram aplicados 16µl de produtos de RT-PCR realizado com 1µg das amostras de RNA demonstradas em A. Observa-se que as linhagens que apresentaram as maiores quantidades de RNAs mensageiros para USP2a foram a SCC-4 e -15, sendo observadas menores quantidades na SCC-9 e -25. Em relação à expressão de USP2b, foram encontradas maiores quantidades de RNAs mensageiros nas linhagens SCC-9 e -25 e menores quantidades nas linhagens SCC-4 e -15. A amplificação do gene referência GAPDH foi utilizada como controle interno das reações.

No primeiro experimento de western-blotting para detecção das proteínas USP2a e USP2b, foi utilizado o anticorpo *anti-core*, produzido e doado pelo Dr. Simon Wing (McGill University, Toronto, Canadá), que reconhece o sítio catalítico comum destas duas isopeptidases. A Figura 8A mostra que todas as linhagens celulares produzem quantidades semelhantes da enzima USP2a. No painel inferior desta mesma figura observamos que a quantidade de proteínas presente em cada canaleta do gel foi equivalente, através da reação com anticorpos contra a proteína de citoesqueleto β -actina. Na Figura 8B podemos observar a análise densitométrica das bandas correspondentes à USP2a. Como os anticorpos utilizados neste experimento reconhecem o sítio catalítico comum a USP2a e USP2b, na reação de western-blotting mostrada na Figura 8A podem ser observadas bandas protéicas de menor massa molecular (~ 45 kDa) que correspondem a USP2b.

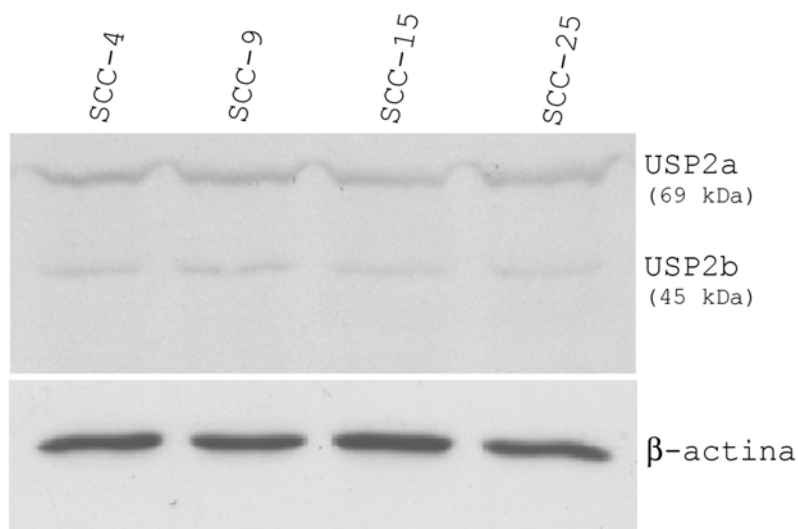


Figura 8A – Western-blotting utilizando proteínas extraídas das células SCC e anticorpos *anti-core* (capaz de reconhecer USP2a e USP2b) ou anti- β -actina. Quantidades semelhantes das proteínas USP2a e USP2b foram detectadas em todas as linhagens. Observa-se maior quantidade de USP2a do que de USP2b em todos os extratos protéicos.

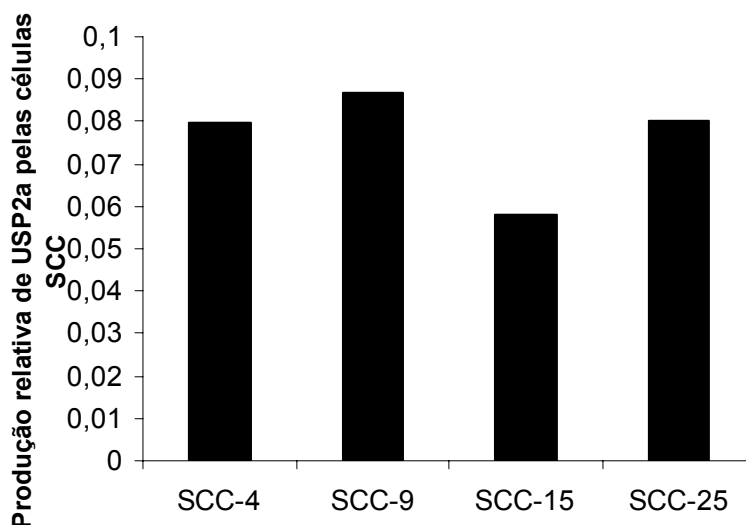


Figura 8B – Representação gráfica da produção da enzima USP2a pelas linhagens celulares SCC-4, -9, -15 e -25, feita a partir da análise densitométrica das bandas do experimento mostrado na Figura 8A, normalizadas por β -actina.

A quantidade de USP2a nos extratos protéicos de células SCC foi também verificada com anticorpos comerciais (Abgent, E.U.A.). Um dos anticorpos reconhece a sua parte N-terminal, específica para USP2a, e o outro a C-terminal, região de sítio catalítico comum para USP2a e USP2b. Na Figura 9A observa-se o resultado obtido com anticorpos contra a parte C-terminal de USP2a, mostrando quantidades semelhantes da enzima nas quatro linhagens, sendo a banda ligeiramente mais intensa na linhagem SCC-9. Na Figura 9C pode-se observar o resultado do western-blotting com anticorpos dirigidos contra a porção N-terminal, revelando maiores quantidades nas células SCC-9 e -25, seguidas por SCC-4 e -15. Nos painéis inferiores das Figuras 9A e 9C verificamos que a quantidade de proteínas presente em cada canaleta dos géis foi equivalente, através da reação com anticorpos contra β -actina. Na Figura 9B podemos observar a análise densitométrica das bandas correspondentes à USP2a apresentadas na Figura 9A e na Figura 9D a análise densitométrica das bandas da Figura 9C.

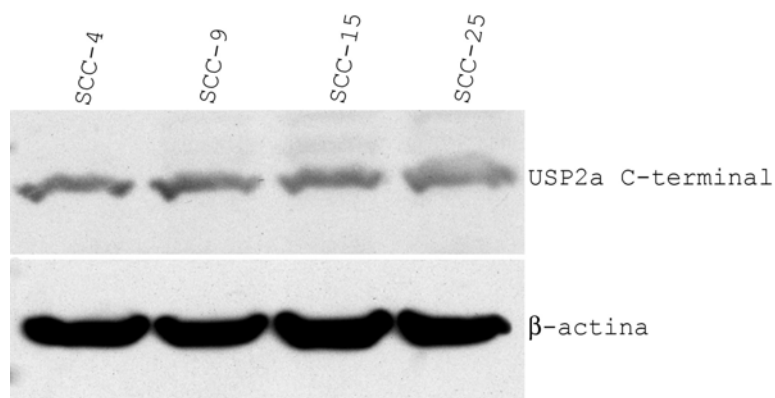


Figura 9A – Western-blotting realizado com proteínas extraídas das células SCC e anticorpos que reconhecem a parte C-terminal de USP2a ou anti- β -actina. Quantidades semelhantes da enzima USP2a foram encontradas em todas as linhagens.

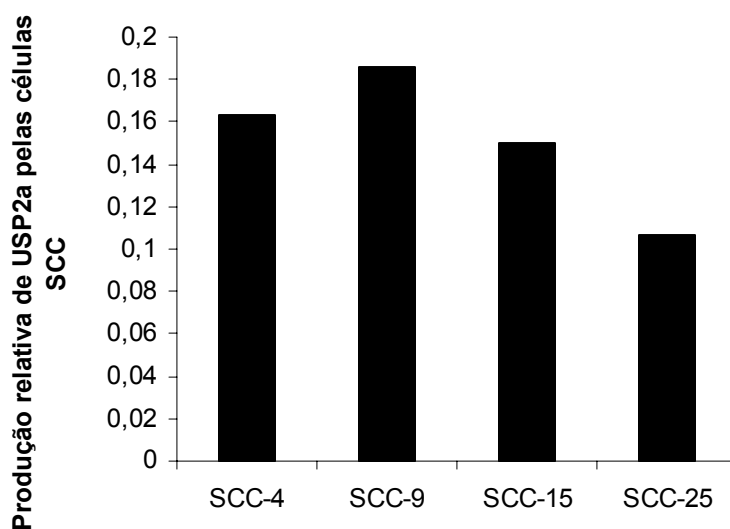


Figura 9B – Representação gráfica da produção da enzima USP2a pelas linhagens celulares SCC-4, -9, -15 e -25, feita a partir da análise densitométrica das bandas do experimento mostrado na Figura 9A, normalizadas por β -actina.

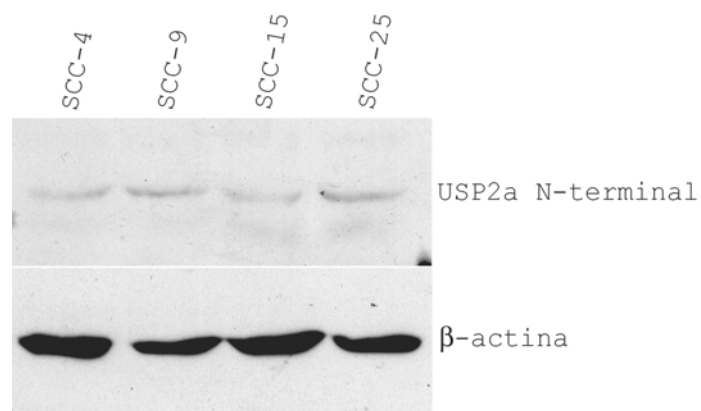


Figura 9C – Western-blotting realizado com proteínas extraídas das células SCC e anticorpos que reconhecem a parte N-terminal de USP2a ou anti-β-actina. Bandas mais intensas de USP2a foram detectadas nas linhagens SCC-9 e -25, seguidas das linhagens SCC-4 e -15.

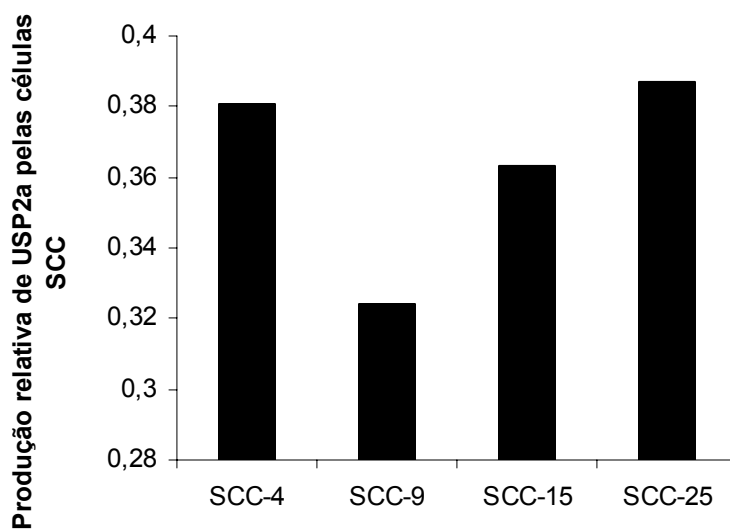


Figura 9D – Representação gráfica da produção da enzima USP2a pelas linhagens celulares SCC-4, -9, -15 e -25, feita a partir da análise densitométrica das bandas do experimento mostrado na Figura 9C, após normalização por β-actina.

5.3 – Distribuição intracelular de USP2a-HA nas células SCC-9

Como não foi possível a realização de reações de imunocitoquímica com anticorpos anti-USP2a nas células SCC, pois estes não funcionam neste tipo de experimento, foram realizadas reações de imunofluorescência em clone da linhagem SCC-9 que expressava de forma estável USP2a selvagem associada à etiqueta HA (SCC-9-USP2a-HA), com o objetivo de verificar a distribuição intracelular desta proteína. Houve positividade na maioria das células, as quais exibiram marcação citoplasmática que variou de fraca a intensa, sendo algumas vezes mais forte na região perinuclear (Figura 10A). A Figura 10B mostra a contra-coloração nuclear com *Hoechst* e na Figura 10C pode-se observar a sobreposição das imagens apresentadas em A e B.

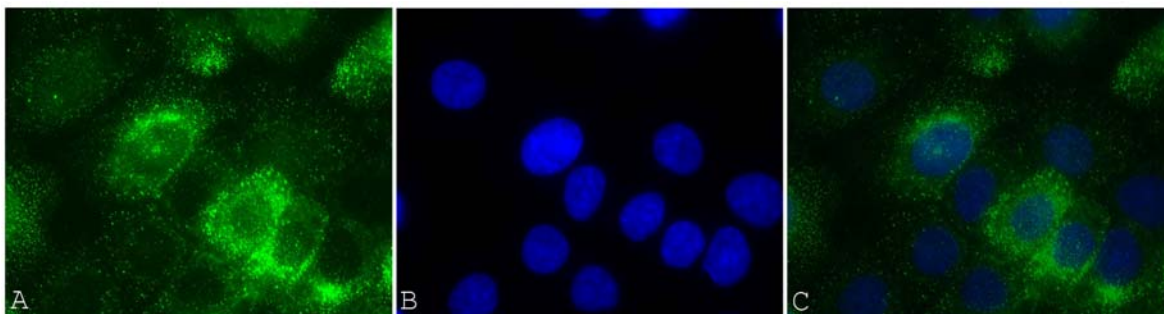


Figura 10 – Expressão de USP2a-HA em células SCC-9. **A** – Observa-se um padrão de marcação citoplasmático com intensidade maior na região perinuclear em algumas células. **B** – Imagem dos núcleos celulares contra-corados com *Hoechst*. **C** – Sobreposição das imagens A e B (aumento original: 630x).

5.4 – Expressão gênica de FAS nas células SCC

A expressão gênica de FAS nas células SCC foi avaliada através de experimentos de RT-PCR semi-quantitativo. Após extração de RNA total das células SCC a partir de duas amostras independentes para cada linhagem (Figura 11A), estes foram reversamente transcritos e utilizados em reações de PCR com *primers* específicos para FAS. A Figura 11B mostra um gel de agarose a 1,8% corado com brometo de etídeo, no qual dezesseis microlitros de cada produto de PCR foram aplicados. Observa-se que as linhagens SCC-4 e -9 foram as que apresentaram as maiores quantidades de RNAs mensageiros para a enzima FAS, sendo detectadas quantidades menores nas linhagens -15 e -25.

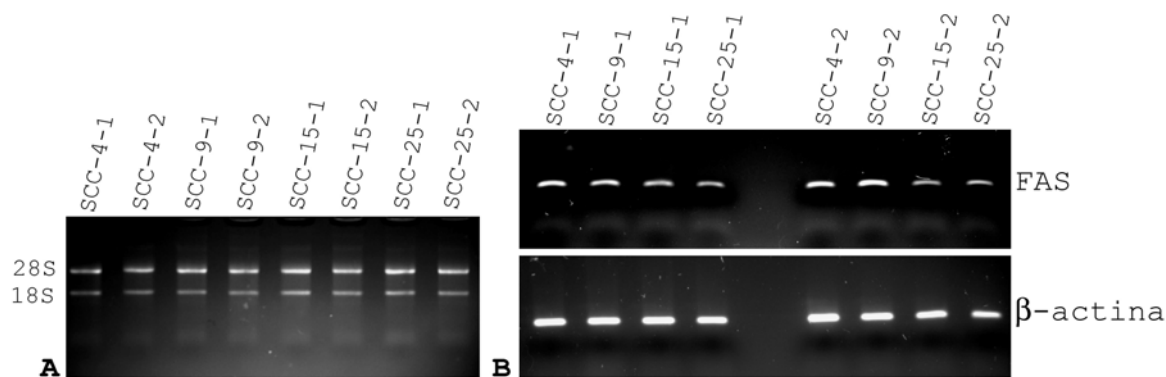


Figura 11 – A – Gel desnaturante de formaldeído-agarose a 1,2% mostrando a integridade do RNA total utilizado no experimento de RT-PCR demonstrado em B. **B** – Reação de RT-PCR semi-quantitativo para verificar a expressão de RNAs mensageiros para FAS nas linhagens SCC-4, -9, -15 e -25 em duas amostras independentes para cada linhagem (1 e 2). Dezesseis microlitros de cada produto de PCR foram separados eletroforéticamente em gel de agarose a 1,8% corado com brometo de etídeo. Observa-se maior expressão de FAS nas linhagens SCC-4 e -9, em comparação com as linhagens -15 e -25.

5.5 – Produção de FAS, ErbB2 e p-27 pelas células SCC

A Figura 12 mostra um experimento de western-blotting para a detecção das proteínas FAS, ErbB2 e p-27 nas células SCC. Neste ensaio, foram usados aproximadamente cinquenta microgramas de proteína total de cada

amostra, os quais foram separados em géis de poliacrilamida-SDS a 6 ou 8%. Maiores quantidades da enzima FAS foram detectadas nas linhagens SCC-9 e -25. A linhagem SCC-9 foi a que apresentou maior quantidade de ErbB2, sendo que as células SCC-4, -15 e -25 apresentaram bandas menos intensas para este receptor de superfície. Nas reações para p-27 foram detectadas bandas com intensidades semelhantes nas linhagens SCC-4, -15 e -25 e uma banda bem menos intensa no extrato das células SCC-9. O anticorpo anti- β -actina foi utilizado para comprovar a presença de quantidades semelhantes de proteína em cada canaleta.

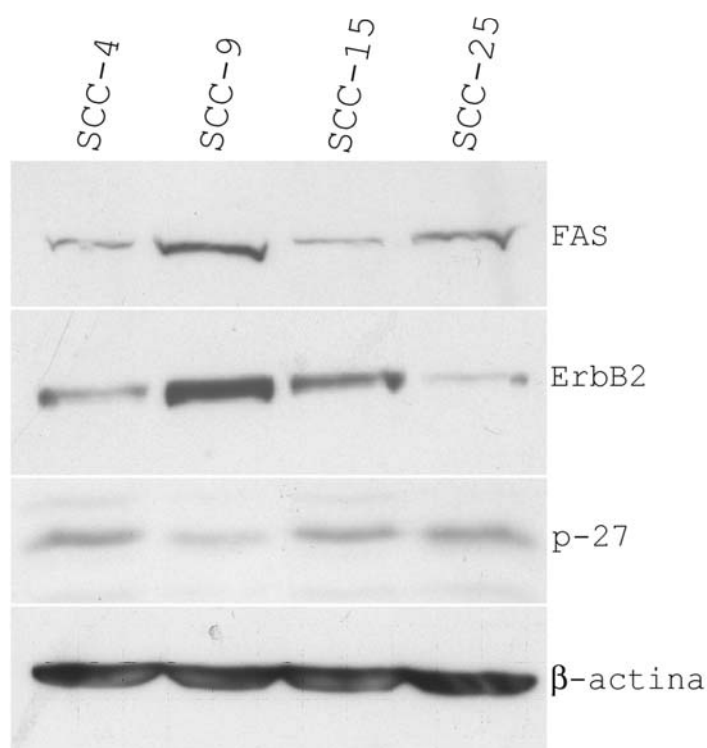


Figura 12 – Reações de western-blotting para detecção de FAS, ErbB2, p-27 e β -actina nas linhagens SCC-4, -9, -15 e -25. Maiores quantidades da enzima FAS foram detectadas nas linhagens SCC-9 e -25. Nas reações para ErbB2, nota-se a presença de banda com maior intensidade na linhagem SCC-9, seguida pela -15, sendo menores quantidades encontradas nas linhagens SCC-4 e -25. Nas reações para p-27, observam-se menores quantidades da proteína na linhagem SCC-9, ao passo que as outras três linhagens apresentaram bandas mais intensas e semelhantes entre si.

5.6 – Estudo da proliferação e morte celular na linhagem SCC-9 transfectada com USP2a selvagem ou USP2a mutante (Δ 276, Cys-Ala)

As células SCC-9 foram escolhidas para a realização dos experimentos de super-expressão ou inibição de USP2a, pois são as que mais produzem FAS e ErbB2. Estas foram transfectadas com as construções contendo o gene de USP2a selvagem (pcDNA3.1 A-USP2a) ou mutado (pcDNA3.1 A-USP2aM, Δ 276, Cys-Ala) e com o vetor pcDNA3.1 como controle. Após a seleção dos clones, experimentos de western-blotting e RT-PCR foram realizados para a verificação dos níveis de expressão de USP2a. Estes ensaios foram realizados pela pós-doutoranda Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel. A Figura 13A mostra a produção forçada de USP2a, em comparação com as células transfectadas apenas com o vetor controle e com a célula parental. Neste experimento, foram utilizados tanto anticorpos que reconhecem a porção N-terminal como a extremidade C-terminal da enzima. Nas Figuras 13B e 13C podemos visualizar o resultado da análise densitométrica do western-blotting da Figura 13A.

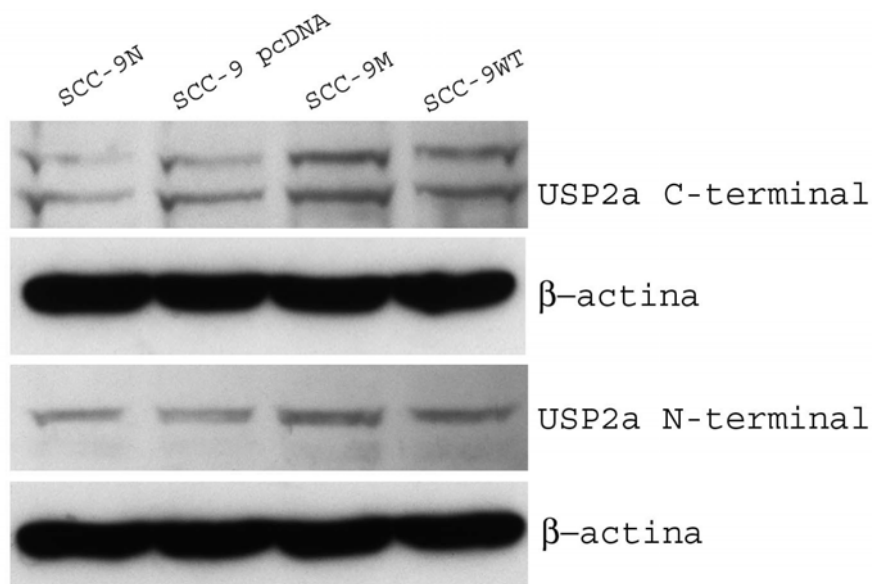


Figura 13A – Reações de western-blotting com anticorpos anti-USP2a que reconhecem as porções C- ou N-terminal da proteína, realizado com extratos protéicos obtidos a partir dos clones selecionados da linhagem SCC-9, transfectada com pcDNA3.1 A-USP2a (WT) ou pcDNA3.1 A-USP2aM (M) e pcDNA 3.1 His C (pcDNA) como controle. Trinta microgramas de proteína foram aplicados em cada canaleta do gel. Foi evidenciada maior produção de USP2a nos clones WT e M do que na linhagem transfectada com o vetor controle, bem como na linhagem não transfectada. Anticorpos contra β -actina foram usados como controle da quantidade de proteína por canaleta do gel.

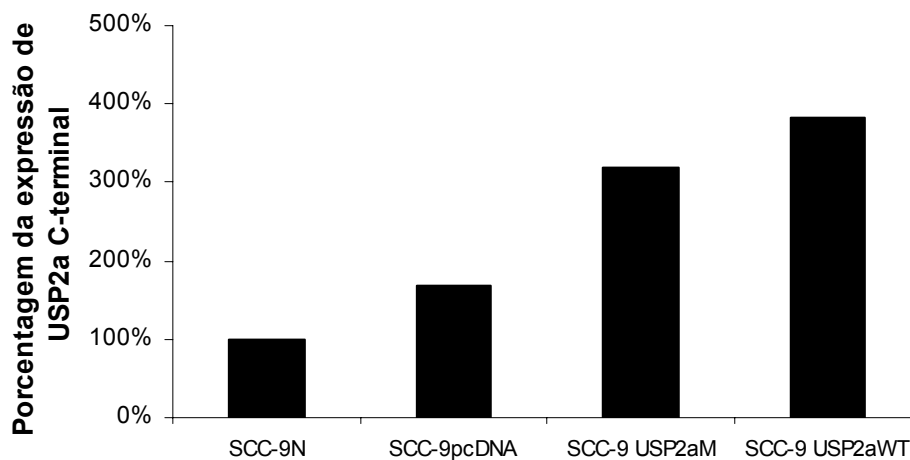


Figura 13B – Representação gráfica da produção relativa da enzima USP2a (anticorpos que reconhecem a porção C-terminal) nos clones da linhagem SCC-9 obtidos da transfecção com as construções USP2aWT, USP2aM e pcDNA (controle) e na linhagem parental, feita a partir da análise densitométrica das bandas do experimento mostrado na Figura 13A, normalizadas por β -actina.

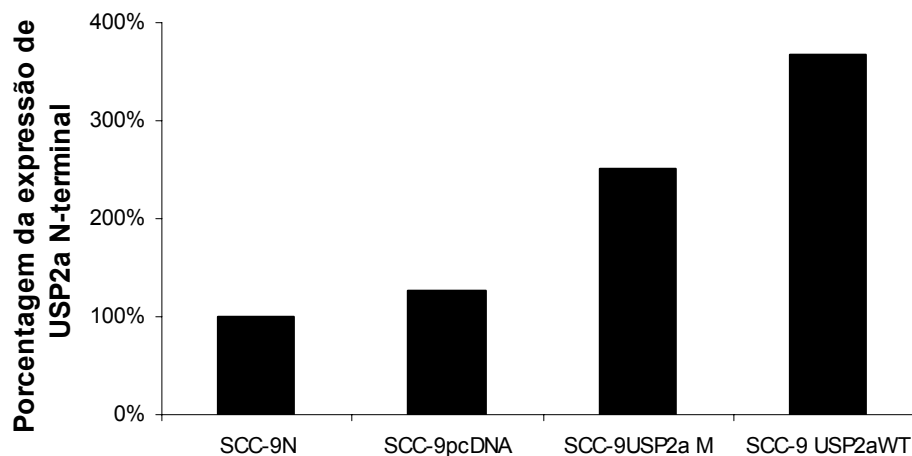


Figura 13C – Representação gráfica da produção relativa da enzima USP2a (anticorpos que reconhecem a porção N-terminal) entre os clones da linhagem SCC-9 obtidos da transfecção com as construções USP2aWT, USP2aM e pcDNA (controle) e a linhagem parental, feita a partir da análise densitométrica das bandas do experimento mostrado na Figura 13A, normalizadas por β -actina.

As quantidades de RNAs mensageiros de USP2a dos clones SCC-9 selecionados foram avaliadas através de RT-PCR semi-quantitativo com *primers* específicos para USP2a (que amplificam tanto os mensageiros normais quanto os mutados). É possível observar que houve concordância entre as quantidades de proteína USP2a e as de seus RNAs mensageiros, que foram maiores nos clones SCC-9WT e SCC-9M (Figura 14).

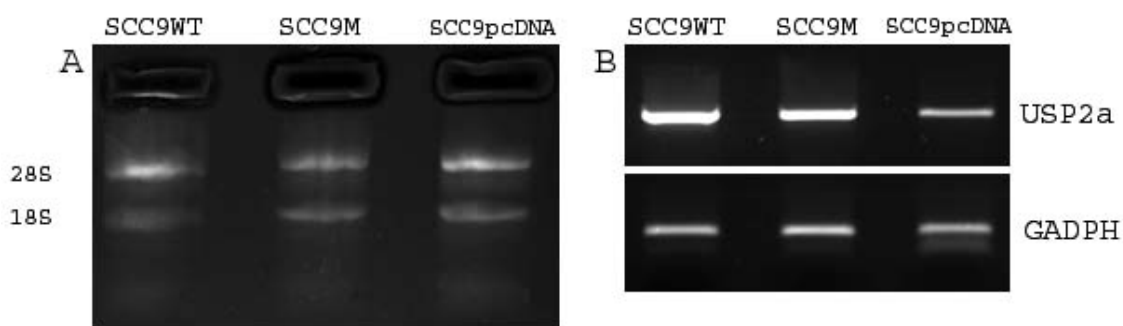


Figura 14 – A – Gel de formaldeído-agarose a 1,2% onde foi aplicado 1 μ g de RNA de cada amostra, demonstrando a integridade das mesmas pela presença das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S. **B** – Gel de agarose a 1,8% onde foram aplicados 15 μ l de produtos de RT-PCR semi-quantitativo realizado com 1 μ g das amostras de RNA demonstradas em A. Observa-se grande aumento na quantidade dos RNAs mensageiros para USP2a nos clones SCC-9WT e M, em comparação com a linhagem transfectada com o vetor controle. A amplificação do gene referência GAPDH foi utilizada como controle interno das reações. SCC9WT: clone obtido da transfecção com pcDNA3.1 A-USP2a; SCC9M: clone obtido da transfecção com pcDNA3.1 A-USP2aM; SCC9 pcDNA: clone obtido da transfecção com pcDNA3.1 His C.

Ao trabalhar com os transfectantes estáveis, reparamos que os clones SCC-9 USP2aWT e SCC-9 USP2aM proliferavam mais rapidamente que a linhagem SCC-9 pcDNA e a linhagem normal não-transfectada (SCC-9N). Isto foi confirmado por cinco curvas de proliferação, nas quais as células foram cultivadas em placas de 24 poços, tripsinizadas e contadas em contador automático em intervalos de 24 horas, num período total de 144 horas. Em todos os experimentos, as linhagens SCC-9 USP2aM e SCC-9 USP2aWT apresentaram potencial proliferativo similar, embora a SCC-9 USP2aM tenha mostrado um crescimento levemente maior em praticamente todos os períodos, em relação à segunda linhagem. As células SCC-9 pcDNA e SCC-9N se comportaram de maneira semelhante, não havendo diferenças entre elas nos intervalos de tempo analisados, como mostra a Figura 15 (resultado da terceira curva de proliferação).

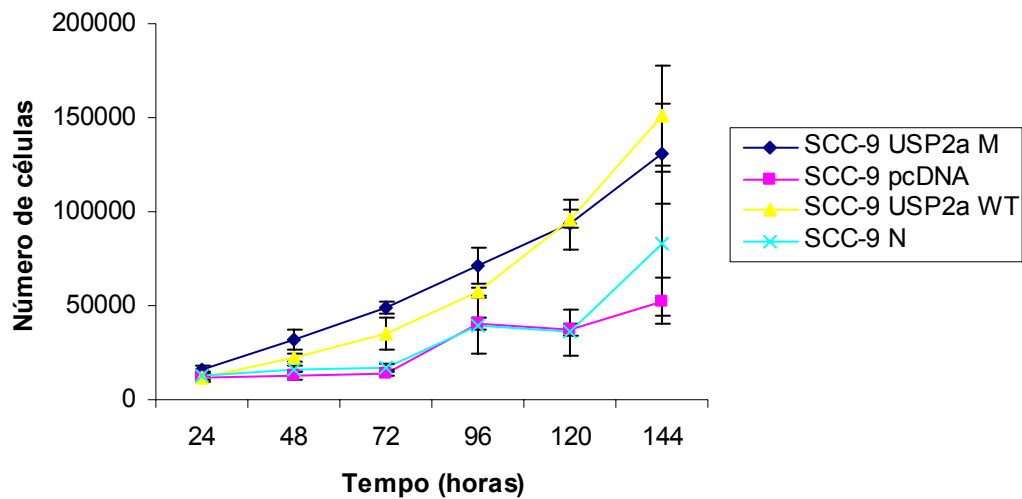


Figura 15 –Resultado da terceira curva de proliferação, mostrando que as linhagens SCC-9 USP2aM e SCC-9 USP2aWT apresentaram potencial proliferativo similar, sendo observado um número de células discretamente maior na SCC-9 USP2aM em praticamente todos os períodos. As células SCC-9 pcDNA e SCC-9N se comportaram de maneira semelhante, proliferando menos que as linhagens SCC-9 USP2aM e SCC-9 USP2aWT.

Foi avaliada também a taxa de apoptose nos transfectantes estáveis SCC-9, em citômetro de fluxo, por meio da técnica da Anexina V/Iodeto de Propídio, no entanto, não foram observadas diferenças significativas. Foram também realizadas reações de western-blotting com anticorpos anti-FAS nestes mesmos clones da SCC-9. Estas revelaram uma maior quantidade de FAS tanto no clone que super-expressa USP2a selvagem quanto naquele que produz USP2a mutante (Figura 16).

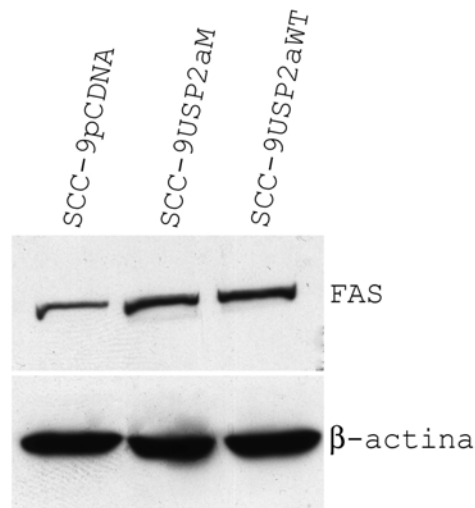


Figura 16 – Reação de western-blotting com anticorpos anti-FAS. É possível observar uma maior quantidade de FAS nos clones da SCC-9 que expressam USP2a selvagem e mutante, em comparação com as células transfectadas com o plasmídeo vazio. Reações contra β -actina foram usadas como controle da quantidade de proteína em cada canaleta.

5.7 – Efeito da expressão forçada de USP2a através de vetores virais sobre proliferação da linhagem SCC-9

As células SCC-9 foram infectadas com o vetor retroviral pBABE contendo o gene de USP2a selvagem (pBABE-USP2a-HA) ou mutante (pBABE-USP2a-HA-M, Δ 276, Cys-Ala e Δ 549, His-Arg) ou ainda apenas com o vetor controle (pBABE). A construção mutante utilizada neste experimento apresenta duas mutações dentro da região que codifica o sítio catalítico. Após a infecção, foram realizados experimentos de western-blotting para a verificação dos níveis de expressão de USP2a e de USP2a-HA, tanto no *pool* de células infectadas como nos clones selecionados para cada grupo. As Figuras 17A e 17B representam reações de western-blotting realizadas com as amostras dos *pools* de células infectadas tipo selvagem (WT), mutante (M) e controle. A Figura 17A mostra um western-blotting com anticorpos contra a parte N-terminal de USP2, no qual quantidades semelhantes da enzima foram detectadas nas três canaletas. Na Figura 17B observa-se a expressão de USP2a-HA, que foi maior nas células com o gene mutante do que naqueles que receberam o gene selvagem, sendo a

reação negativa no controle. Alguns dos clones selecionados (6 para WT e 5 para M) foram testados para a expressão de USP2a através de western-blotting com anticorpos que reconhecem a parte N-terminal da enzima. Não foi possível verificar diferença significativa na produção desta enzima entre os clones (resultado não mostrado). Entretanto, quando os níveis de USP2a-HA foram verificados com anticorpos anti-HA, foi possível observar diferenças na produção de USP2a-HA entre os clones (Figura 18).

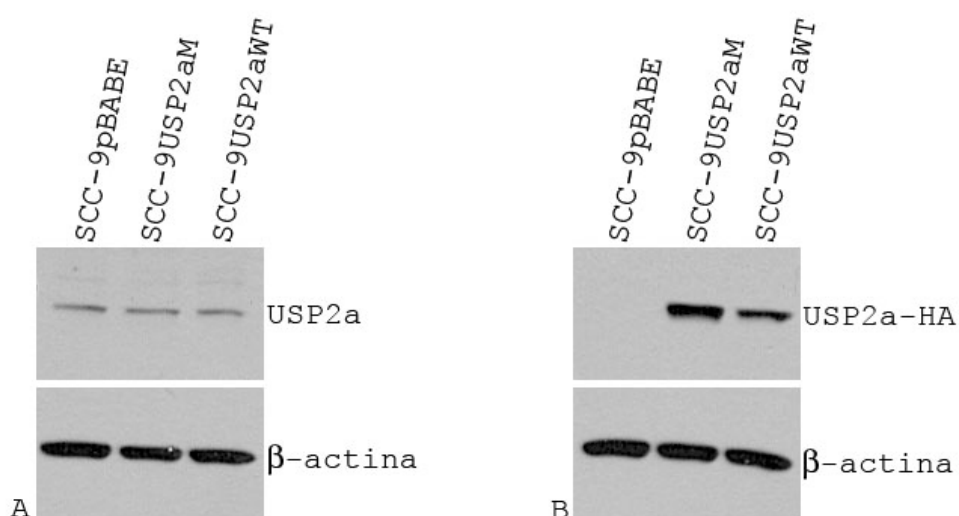


Figura 17 – A – Western-blotting com anticorpos anti-USP2a que reconhecem a parte N-terminal da enzima, realizado em extratos protéicos obtidos a partir dos *pools* celulares selecionados da linhagem SCC-9 infectada com pBABE-USP2a-HA-WT ou pBABE-USP2a-HA-M e pBABE. Note que quantidades muito semelhantes da enzima são observadas em todas as amostras. **B** – Detecção de USP2a-HA nos mesmos extratos protéicos. Pode-se observar uma maior quantidade da proteína no *pool* de células infectadas com o vetor contendo USP2a mutada em comparação com o grupo infectado com o vetor selvagem. USP2a-HA não foi detectada no grupo infectado apenas com o vetor vazio. Em **A** e **B**, trinta microgramas de proteína foram aplicados em cada canaleta do gel. Anticorpos contra β -actina foram usados como controle da quantidade de proteína por canaleta.

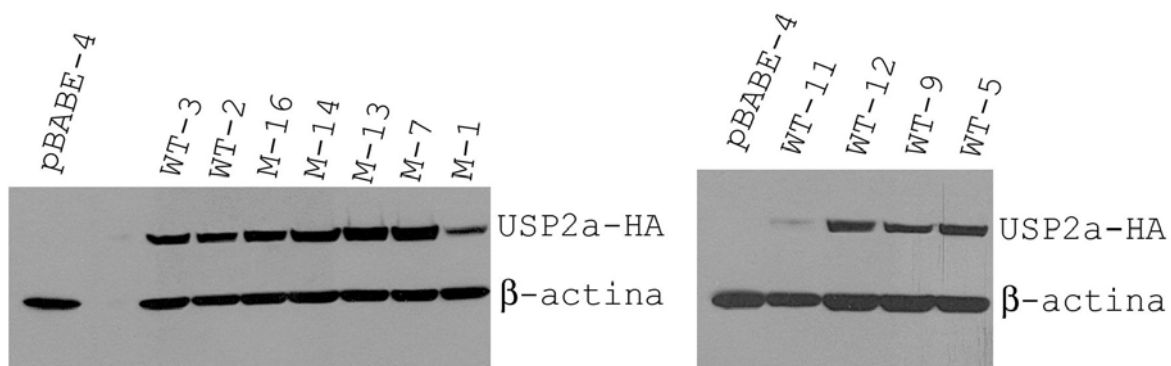


Figura 18 – Detecção de USP2a-HA em clones de SCC-9 infectados com o vetor retroviral pBABE contendo a forma selvagem (WT) ou mutante (M) de USP2a. Foram realizadas reações de western-blotting com anticorpos anti-HA, com trinta microgramas de proteína em cada canaleta dos géis. Anticorpos contra β -actina foram usados como controle da quantidade de proteína por canaleta. Observa-se que a expressão de USP2a-HA variou entre os clones testados. A amostra do clone pBABE-4, presente em ambos os painéis, foi usada como controle negativo da reação, representando as células SCC-9 infectadas apenas com o plasmídeo vazio e que, portanto, não expressam USP2a-HA.

Durante o cultivo celular, foi possível observar uma maior proliferação de alguns clones infectados com o vetor contendo USP2a (WT) em comparação com células infectadas apenas com o vetor vazio e com a linhagem normal não-transfectada (SCC-9N). Além disso, notamos que alguns clones infectados com o vetor contendo USP2a (M) proliferaram menos do que a linhagem SCC-9 infectada apenas com o vetor vazio e que a linhagem normal não-transfectada (SCC-9N).

A curva representada na Figura 19 foi realizada para comparar o crescimento destes clones e evidencia um potencial proliferativo similar nos clones SCC-9WT e SCC-9pBABE, embora o primeiro tenha mostrado o número de células maior em alguns períodos. O clone SCC-9M proliferou menos a partir do período de 72 horas, quando comparado aos clones WT e controle. Estes resultados demonstraram que a linhagem SCC-9WT possui potencial proliferativo semelhante ao da linhagem infectada apenas com o vetor vazio e que a linhagem SCC-9M proliferou mais lentamente do que SCC-9WT ou SCC-9pBABE.

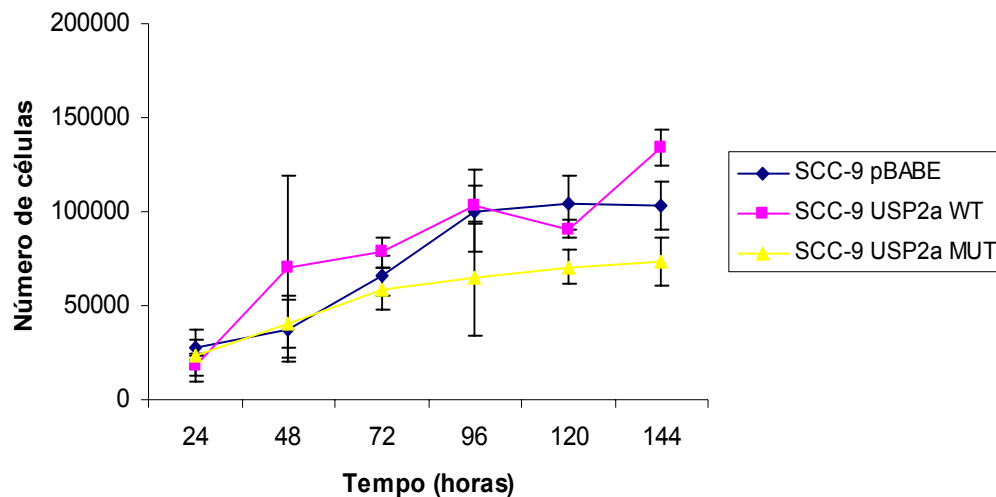


Figura 19 – Curva de proliferação comparando os clones SCC-9 USP2aWT, SCC-9 USP2aM e SCC-9 pBABE, mostrando que o clone SCC-9M proliferou menos a partir do período de 72 horas, quando comparado aos clones WT e controle (pBABE).

Foi também realizada análise do ciclo celular dos clones das células SCC-9 infectadas com o vetor retroviral pBABE contendo USP2a selvagem ou mutante ou o vetor vazio. Como ilustrado na Figura 20, uma menor porcentagem de células nas fases S e G2/M ocorreu após a infecção com a versão mutante de USP2a, em comparação com as células infectadas com USP2a selvagem ou com o plasmídeo vazio.

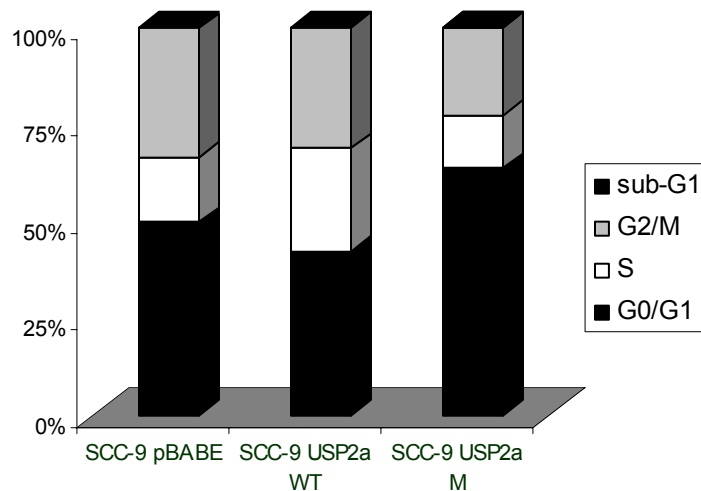


Figura 20 – Este gráfico mostra a distribuição das células SCC-9 infectadas nas fases do ciclo celular, após sincronização em meio livre de soro e posterior crescimento em meio 10% FBS por 24 horas. É possível observar uma menor porcentagem de células expressando USP2a mutante em S e G2/M, em comparação com os dois outros grupos.

5.8 – Efeito da inibição da expressão de USP2a sobre morte celular e proliferação na linhagem SCC-9

Com o intuito de verificar o efeito da inibição da expressão de USP2a sobre a apoptose e proliferação nas células SCC-9, foram realizados experimentos de RNAi. As células foram transfectadas com uma sequência de RNAi específica para o gene que codifica USP2a ou com a sequência controle, que não possui alvo específico, não interferindo na expressão gênica da célula. Células tratadas apenas com oligofectamina, também foram utilizadas como controle (*mock*). Para a obtenção da eficiência máxima na inibição da expressão de USP2a, primeiramente foram padronizadas as concentrações de oligofectamina, dos oligonucleotídeos e também o tempo de transfecção. Os maiores níveis de inibição dos RNAs mensageiros de USP2a foram alcançados com 100 nM de oligonucleotídeos, 48 horas após o início da transfecção. A Figura 21 representa um dos resultados de PCR quantitativo realizado para a verificação

dos níveis de RNAm de USP2a nas células SCC-9 após transfecção com RNAi por 48 horas, mostrando inibição de aproximadamente 60%. Os níveis protéicos de USP2a foram checados através de western-blotting após 48 e 72 horas de transfecção. Na Figura 22 pode ser observado o resultado de um experimento representativo de western-blotting, no qual foi detectada uma discreta redução na produção de USP2a no grupo tratado com o RNAi após 72 horas. Houve também uma discreta inibição na produção de FAS nas células SCC-9 tratadas com o RNAi para USP2a, o que foi observado tanto no período de 48 quanto no de 72 horas (Figura 22). Durante a transfecção observamos que as células tratadas com RNAi para USP2a ficaram mais alongadas em relação ao controle (Figura 23). Foi também possível observar um grande número de células mortas no meio de cultura, como pode ser visto na Figura 23C.

As taxas de morte celular das células SCC-9 tratadas com RNAi para USP2a foram avaliadas 48 e 72 horas após a transfecção através de western-blotting anti-PARP clivada (*c-PARP*) e 72, 96 e 120 horas após a transfecção através da marcação das células com iodeto de propídio e avaliação da porcentagem de células na fase sub-G1, em citômetro de fluxo. Como mostra a Figura 22, foi possível observar bandas para *c-PARP* nas células tratadas com RNAi para USP2a tanto 48 quanto 72 horas após o início da transfecção, as quais não foram observadas nos grupos controle. A análise da porcentagem de células em sub-G1 revelou discreta indução de morte celular nas células SCC-9 tratadas com RNAi para USP2a, pois 120 horas após a transfecção apenas 6% das células encontravam-se em sub-G1 (Figura 24).

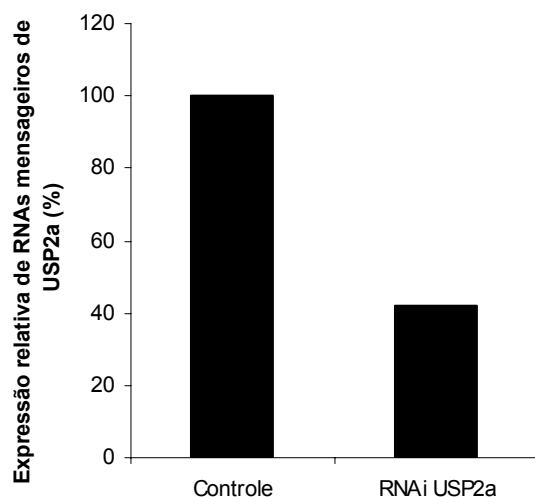


Figura 21 – Resultado de reação de PCR quantitativo realizado para a verificação dos níveis de RNAs mensageiros para USP2a nas células SCC-9 após transfecção com RNAi específico para USP2a por um período de 48 horas. A quantidade relativa dos transcritos de USP2a foi normalizada pelos níveis do gene referência GAPDH.

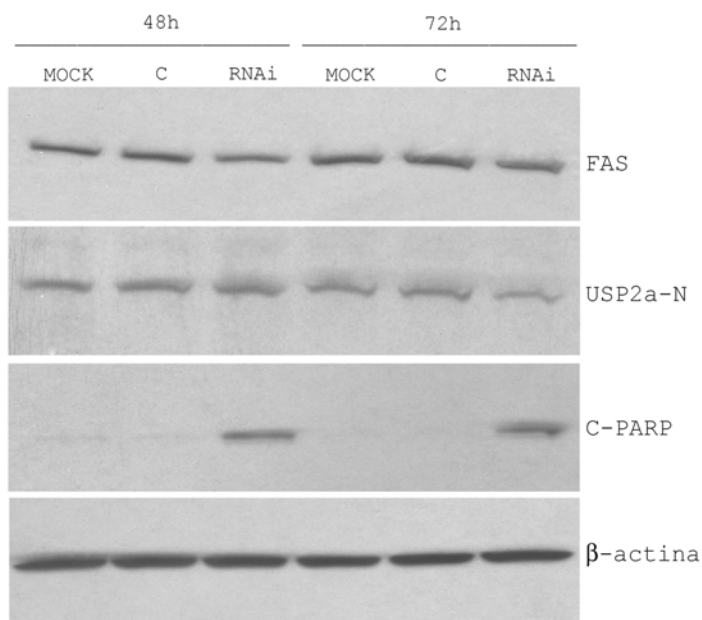


Figura 22 – Reações de western-blotting para detecção de FAS, USP2a, PARP clivada (C-PARP) e β-actina nas células SCC-9 transfectadas com oligofectamina (*mock*), sequência controle de RNAi (C) ou RNAi específico para USP2a (RNAi). Para a detecção de USP2a, foram utilizados os anticorpos que reconhecem a parte N-terminal da enzima. Observa-se uma discreta redução nas quantidades da proteína FAS no grupo tratado com RNAi para USP2a, tanto em 48 como em 72 horas de transfecção. Uma diminuição dos níveis de USP2a foi observada 72 horas após o início da transfecção. Bandas para C-PARP foram detectadas nas células tratadas com RNAi para USP2a após 48 e 72 horas. Anticorpos contra β-actina foram usados como controle da quantidade de proteína por canaleta dos géis.

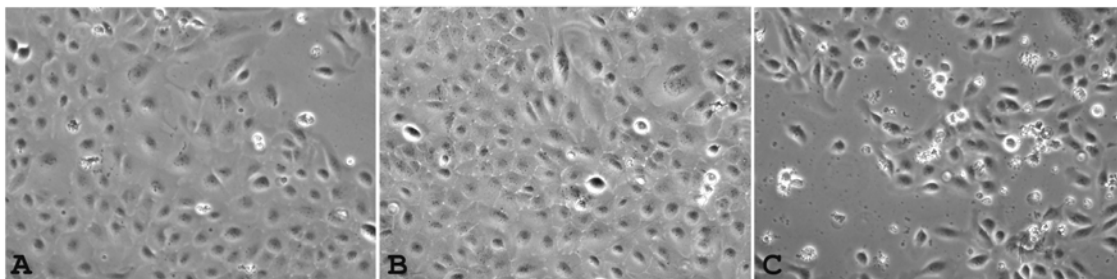


Figura 23 – Aspecto morfológico das células SCC-9 transfectadas com 5 µg/ml de oligofectamina (*mock*) (**A**), sequência de RNAi controle (**B**) ou sequência de RNAi específica para USP2a (**C**), por um período de 72 horas. **A e B** – Observam-se células com aspecto morfológico normal em cultura semi-confluentes. **C** – As células transfectadas com a sequência de RNAi específica para USP2a apresentam-se mais alongadas e em menor quantidade do que nos controles apresentados em A e B (Aumento original: 100x).

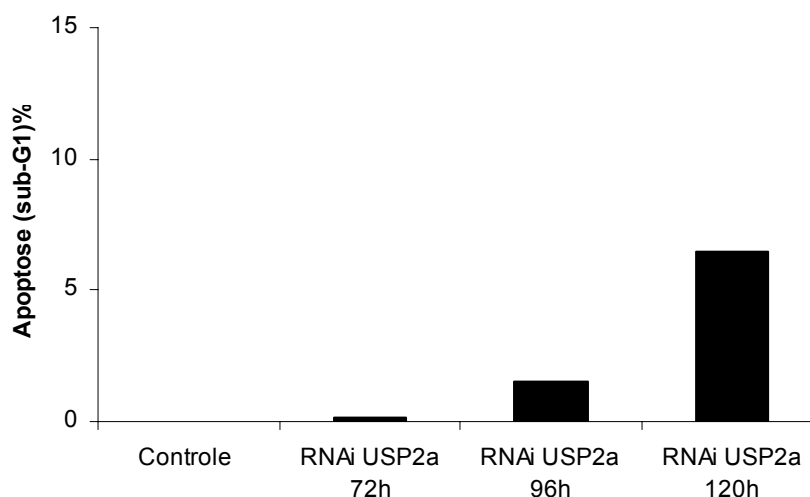


Figura 24 – Porcentagem de células SCC-9 em apoptose (sub-G1) após tratamento com RNAi para USP2a por 72, 96 e 120 horas. O grupo controle, transfectado com sequência inespecífica de RNAi por 120 horas, não apresentou células em apoptose. A inibição da expressão de USP2a nas células SCC-9 causou leve indução de apoptose, pois menos de 10% das células estavam em apoptose após 120 horas de transfecção.

5.9 – Efeito da DHT sobre a expressão de USP2a nas células SCC-9

Sabe-se que a expressão de USP2a é regulada por andrógenos em células de câncer de próstata. Entretanto, não existem estudos na literatura sobre a regulação da expressão desta enzima em células derivadas de CECs bucais, o que nos levou a realizar o tratamento das células SCC-9 com diferentes concentrações de DHT para verificar esta possibilidade. Como demonstrado na Figura 25, após tratamento com DHT, extração de RNA e realização de RT-PCR quantitativo com *primers* específicos para USP2a, não foi possível observar diferenças significativas na expressão dos RNAs mensageiros de USP2a nas células SCC-9.

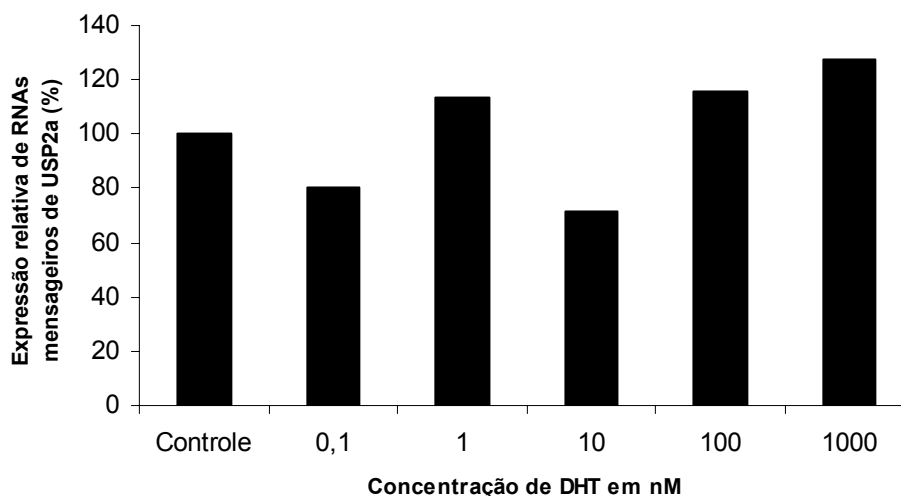


Figura 25 – Representação gráfica dos resultados de RT-PCR quantitativo para verificar os níveis de RNAs mensageiros para USP2a após tratamento das células SCC-9 com diferentes concentrações de DHT. Não houve diferenças significativas na expressão de USP2a em comparação com o grupo controle (tratado com etanol).

5.10 – Efeito do EGF sobre a expressão de USP2a nas células SCC-9

A expressão de FAS é estimulada por EGF em células LNCaP (Swinnen *et al.*, 1997b; Swinnen *et al.*, 2000b; Myers *et al.*, 2001; Heemers *et al.*, 2001; Van De Sande *et al.*, 2002). Como nós demonstramos em trabalho prévio (Agostini *et al.*, 2004) que isto também acontece nas células SCC, decidimos verificar aqui o efeito do EGF sobre a expressão de USP2a nas células SCC-9 tratadas com diferentes concentrações deste fator. Estas foram semeadas em placas de 56,7 ou 150 cm², dependendo do experimento, e quando em confluência de 60-70% carenciadas por 24 horas, tratadas com EGF e coletadas 24 ou 36 horas depois. Os níveis de RNAs mensageiros de USP2a foram verificados através de RT-PCR quantitativo ou semi-quantitativo com *primers* específicos para USP2a. A Figura 26A mostra imagem de gel de formaldeído-agarose a 1,2% onde foram aplicadas as amostras de RNA extraídas e a Figura 26B representa graficamente o resultado de dois experimentos de RT-PCR quantitativo independentes. É nítida a redução de aproximadamente 50% na expressão de USP2a nas células tratadas com 1 ng/ml de EGF, assim como de aproximadamente 80% nas tratadas com 10, 50 e 100 ng/ml deste fator, em comparação com o controle. A significativa redução da expressão dos RNAs mensageiros de USP2a após o tratamento com 100 ng/ml de EGF também pode ser vista na Figura 27, num experimento de RT-PCR semi-quantitativo.

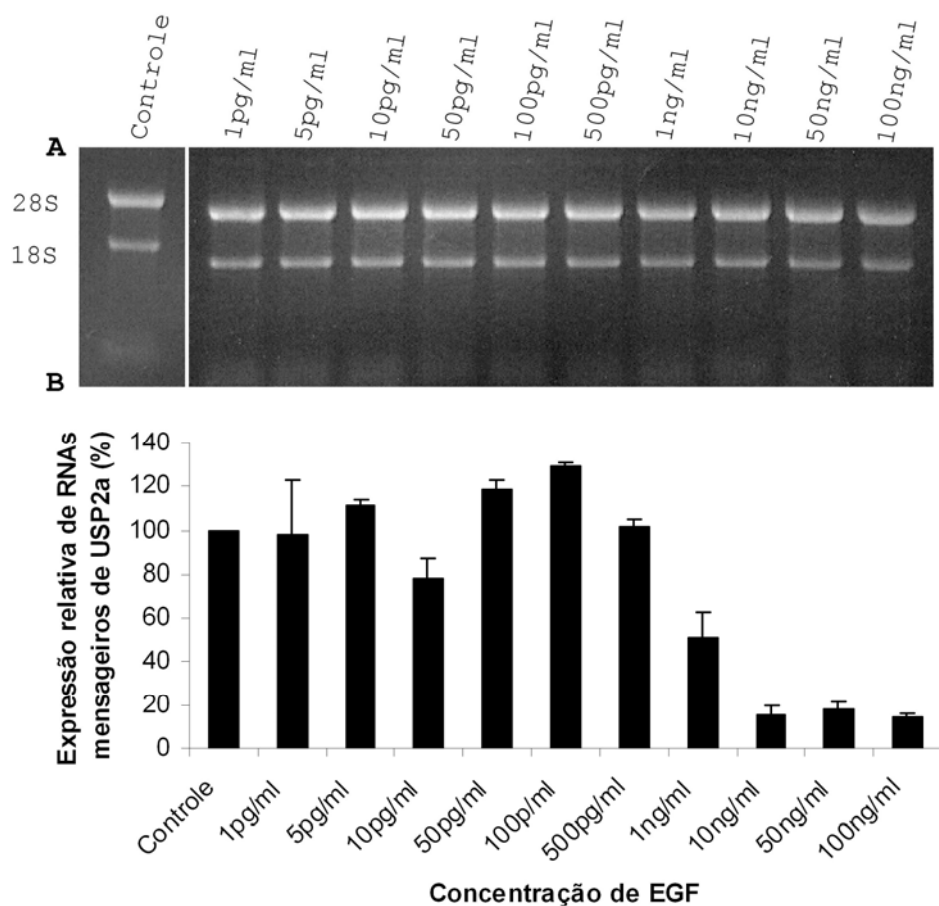


Figura 26 – A – Gel de formaldeído-agarose a 1,2% onde foi aplicado 1µg de RNA de cada amostra, constatando a integridade das mesmas pela presença das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S. **B** – Gráfico que representa os resultados de dois experimentos de RT-PCR quantitativo onde foram verificados os níveis de RNAs mensageiros para USP2a após tratamento das células SCC-9 com diferentes concentrações de EGF. Nota-se uma redução de aproximadamente 50% na expressão dos RNAs mensageiros de USP2a nas células tratadas com 1ng/ml de EGF e de aproximadamente 80% nas células tratadas com 10, 50 e 100ng/ml deste fator de crescimento.

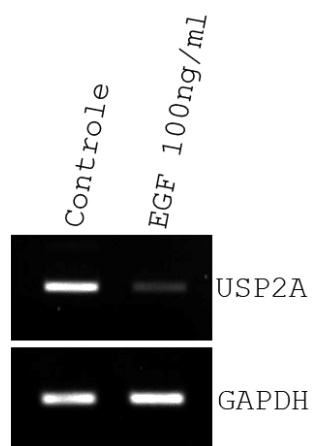


Figura 27 – Gel de agarose a 1,8% onde foram aplicados 16µl dos produtos de RT-PCR semi-quantitativo realizado com 1µg de RNA. Observa-se grande redução na expressão de USP2a nas células tratadas com 100ng/ml de EGF em comparação com o controle. A amplificação do gene referência GAPDH foi utilizada como controle interno das reações.

Após a obtenção dos resultados da expressão dos RNAs mensageiros de USP2a frente ao tratamento com EGF, as concentrações de 1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml e 100 ng/ml foram escolhidas para a avaliação dos níveis protéicos de USP2a, FAS e EGFR das células tratadas. As células foram tratadas como descrito anteriormente e coletadas 24 horas após o tratamento com EGF. No experimento mostrado na Figura 28, os níveis de USP2a foram detectados através dos anticorpos que reconhecem a parte C-terminal da enzima, bem como anticorpos que reconhecem a parte N-terminal. Houve um discreto aumento na produção de USP2a nos grupos tratados com 10 pg/ml, 100 pg/ml e 1 ng/ml de EGF em comparação com o grupo controle, sendo observada uma ligeira redução dos níveis de USP2a no grupo tratado com 100 ng/ml do fator de crescimento. Pode-se observar também que houve um aumento na produção de FAS nas células tratadas com EGF, o qual foi dose dependente. Os níveis de EGFR se mantiveram semelhantes nas células tratadas com 1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml e 1 ng/ml de EGF, ocorrendo uma drástica redução no grupo tratado com 100 ng/ml. A Figura 29 representa a análise densitométrica das bandas representadas na Figura 28, normalizadas por β -actina.

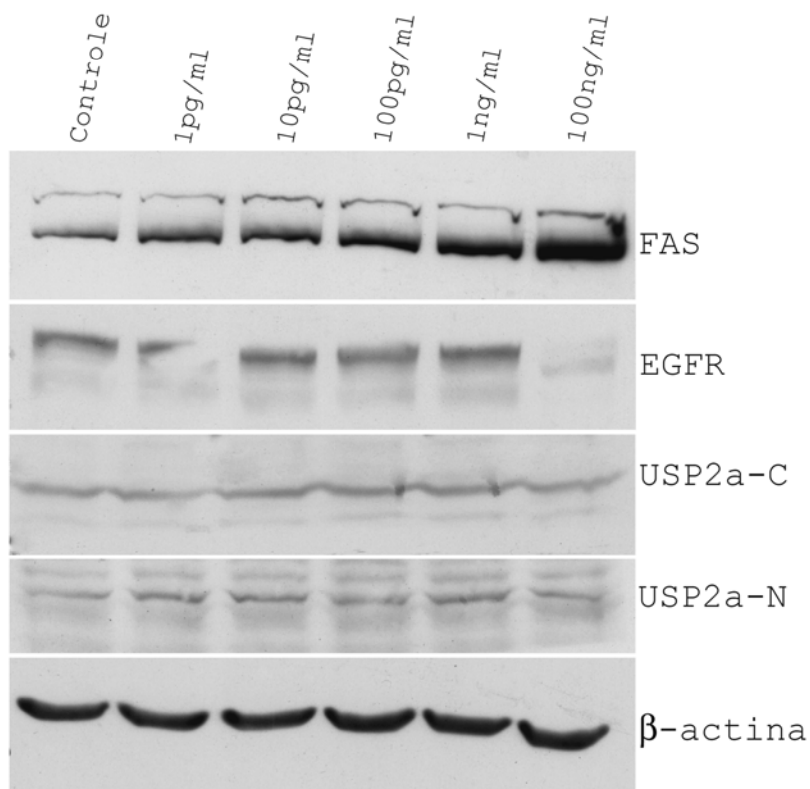


Figura 28 – Reações de western-blotting para detecção de FAS, EGFR, USP2a e β -actina nas células SCC-9 tratadas com diferentes concentrações de EGF. Anticorpos que reconhecem a parte C-terminal e N-terminal de USP2a foram utilizados. Houve um aumento dose-dependente na produção de FAS. Os níveis de EGFR se mantiveram estáveis nos grupos tratados com 1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml e 1 ng/ml em comparação com o grupo controle, havendo uma drástica redução nas células tratadas com 100 ng/ml de EGF. É possível observar um discreto aumento na produção de USP2a nas células tratadas com 1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml e 1 ng/ml de EGF, assim como uma ligeira redução das tratadas com 100 ng/ml, o que foi verificado com os dois anticorpos utilizados. Anticorpos contra β -actina foram usados como controle da quantidade de proteína por canaleta do gel.

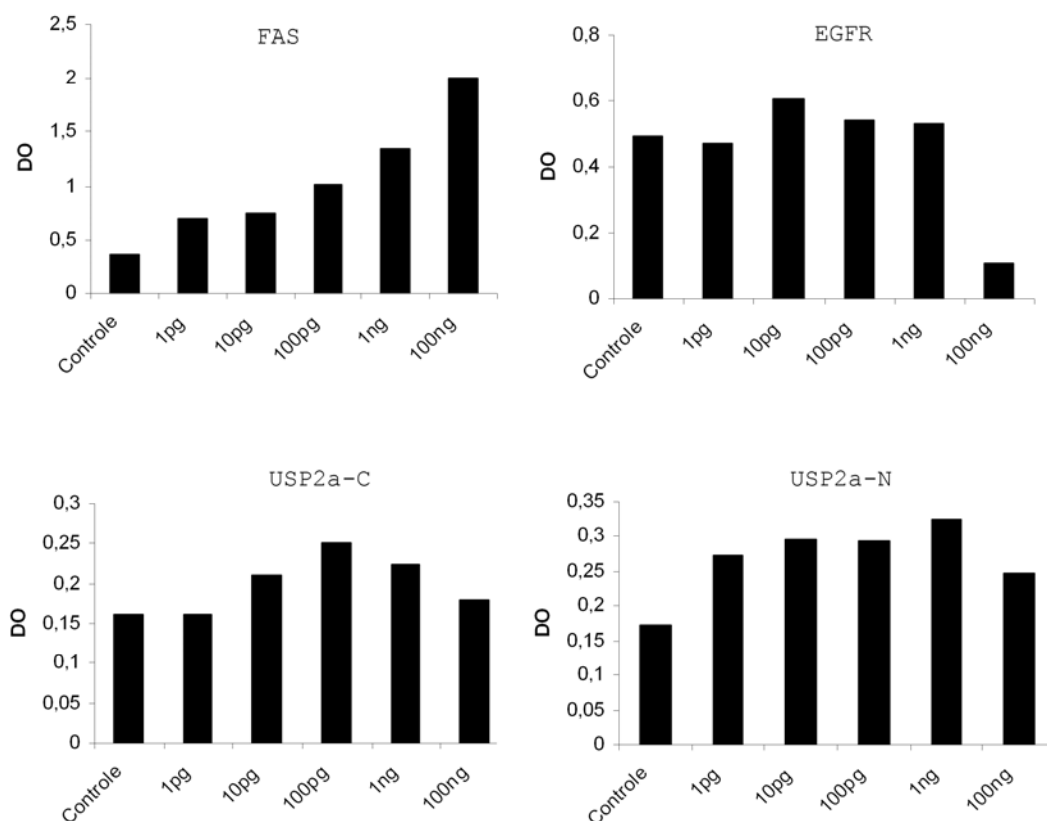


Figura 29 – Representação gráfica da produção de FAS, EGFR e USP2a pelas células SCC-9 tratadas com diferentes concentrações de EGF, feita a partir da análise densitométrica das bandas do experimento mostrado na Figura 28, normalizadas pelos valores de β -actina. (DO: densidade óptica).

Foram também realizados experimentos nos quais as células foram tratadas com 100 pg/ml ou 100 ng/ml de EGF (que estimulam ou inibem a expressão de USP2a) por um período de 36 horas. Estes foram realizados com o intuito de manter as células mais tempo em tratamento, para melhor avaliar seu efeito sobre a quantidade das proteínas estudadas (no experimento anterior as células foram coletadas após o mesmo período de tempo utilizado para estudo dos RNAs mensageiros). No experimento mostrado na Figura 30 pode-se observar novamente que houve um discreto aumento na produção de USP2a no grupo tratado com 100 pg/ml de EGF e uma ligeira redução dos níveis de USP2a

nas células tratadas com 100 ng/ml deste fator. Pode-se observar que houve um aumento na quantidade de EGFR nas células tratadas com 100 pg/ml de EGF e uma drástica redução com 100 ng/ml. Quantidades semelhantes de ErbB2 foram observadas no grupo controle e no grupo tratado com 100 pg/ml de EGF, ao passo que nas células tratadas com 100 ng/ml houve redução significativa nos níveis deste receptor.

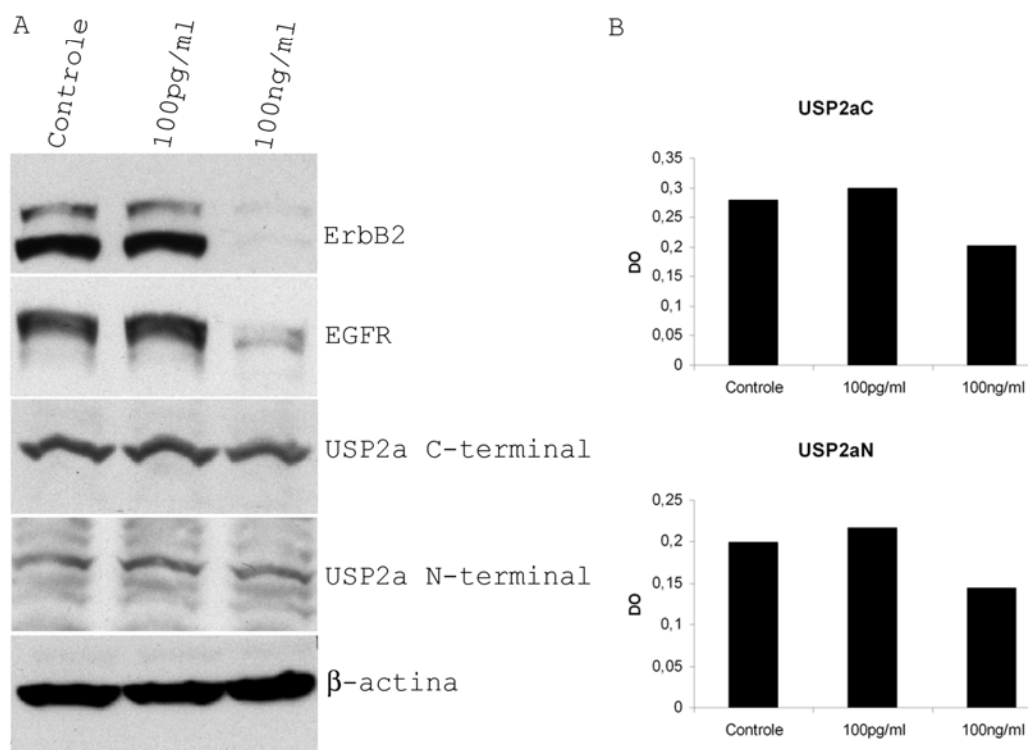


Figura 30 – A – Reações de western-blotting para detecção de USP2a, EGFR, ErbB2 e β -actina nas células SCC-9 tratadas com 100 pg/ml ou 100 ng/ml de EGF. Houve um discreto aumento dos níveis de EGFR no grupo tratado com 100 pg/ml, em comparação com o grupo controle, e uma drástica redução nas células tratadas com 100 ng/ml de EGF. Os níveis de ErbB2 mantiveram-se semelhantes no grupo controle e no grupo tratado com 100 pg/ml de EGF, enquanto que nas células tratadas com 100 ng/ml houve uma redução significativa da quantidade deste receptor. É possível observar um discreto aumento na produção de USP2a nas células tratadas com 100 pg/ml de EGF e uma ligeira redução dos níveis de USP2a nas células tratadas com 100 ng/ml, o que foi demonstrado tanto quando foram utilizados anticorpos dirigidos à parte C-terminal da enzima quanto com os dirigidos contra a parte N-terminal. Anticorpos contra β -actina foram usados como controle da quantidade de proteína por canaleta do gel. **B –** Análise densitométrica das bandas correspondentes a USP2a, normalizadas por β -actina.

Finalmente, para verificar o efeito do tratamento com EGF nas células SCC-9 sobre o grau de ubiquitinação da enzima FAS, foram realizados ensaios de degradação proteossômica *in vitro* com extratos protéicos de células tratadas com 100 pg ou 100 ng/ml de EGF (concentrações que provocam grandes diferenças na expressão dos RNAs mensageiros de USP2a). Este ensaio fornece as condições experimentais que favorecem a ubiquitinação e degradação proteossômica ao mesmo tempo que inibem proteólise através de outros sistemas enzimáticos celulares. Na Figura 31A observamos o resultado de um destes ensaios, onde é possível notar a presença de formas ubiquitinadas de FAS (FAS –Ub), o que foi confirmado por reações de western-blotting com anticorpos anti-Ub (Figura 31B). Houve maior quantidade de formas ubiquitinadas de FAS nas células tratadas com 100 ng/ml de EGF (que apresentam quantidades reduzidas de USP2a). Neste grupo foi também possível observar degradação de FAS nos períodos de 30 e 45 horas de incubação, o que não foi observado nos grupos controle ou tratado com 100 pg/ml de EGF. Além do mais, menor quantidade de formas ubiquitinadas de FAS foram vistas no grupo tratado com 100 pg/ml de EGF, em comparação com o controle, sugerindo maior atividade de USP2a neste extrato. Este resultado é representativo de três experimentos independentes, sendo que os resultados dos ensaios realizados com células tratadas por 24 ou 36 horas foram semelhantes.

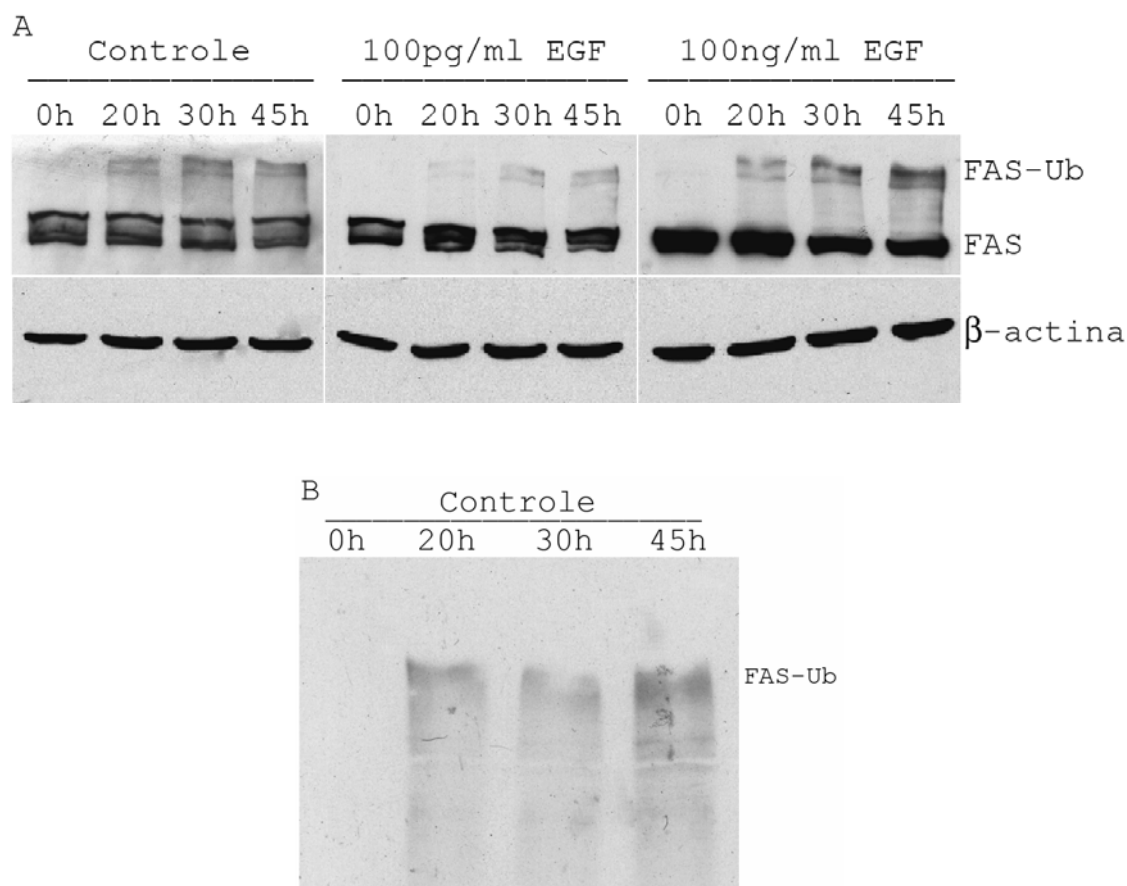


Figura 31 – A – Ensaio de degradação proteossômica *in vitro* no qual foram utilizados extratos protéicos das células SCC-9 tratadas com 100 pg/ml ou 100 ng/ml de EGF, assim como células controle não tratadas. As amostras foram incubadas a 37°C por 20, 30 ou 45 horas, os produtos aplicados em géis de poliacrilamida-SDS a 6%. Além da banda que representa FAS (~ 250kDa), é possível observar bandas em posição mais alta, as quais representam formas ubiquitinadas de FAS (FAS-Ub). O grupo tratado com 100 ng/ml de EGF apresentou uma maior quantidade de formas ubiquitinadas de FAS. Também no mesmo grupo, foi possível observar que houve degradação de FAS nos períodos de 30 e 45 horas, o que não foi verificado nos grupos controle e no tratado com 100 pg/ml de EGF. Anticorpos contra β -actina foram usados como controle da quantidade de proteína por canaleta do gel. **B** – Reação de western-blotting com anticorpos anti-Ub em membrana contendo as amostras do grupo controle, a qual passou por um processo de *stripping* após a reação de western-blotting para FAS.

5.11 – Construção EGFP-USP2a-HA

Com o intuito de se obter uma construção com a forma selvagem de USP2a associada a uma etiqueta fluorescente, para estudos de localização intracelular desta enzima, o gene que codifica USP2a associado à etiqueta HA foi clonado no plasmídeo pEGFP-C3. Como resultado, foi obtida uma construção na qual o gene de USP2a apresenta a etiqueta fluorescente EGFP na sua parte N-terminal e a etiqueta HA na sua parte C-terminal. Na Figura 32 observamos o DNA plasmidial purificado de 18 colônias bacterianas transformadas com a construção, que foram digeridos com as enzimas de restrição XhoI e BamI. As amostras correspondentes as canaletas 2 e 16 foram sequenciadas, o que confirmou a presença do inserto correto. A Figura 33 mostra células LNCaP em cultura, transfectadas de maneira transitória por 12 horas com a construção pEGFP-USP2a-HA. É possível observar nas Figuras 33B e 33C a expressão da proteína EGFP-USP2a-HA pelas células transfectadas. Esta proteína foi também detectada através de western-blotting com anticorpos anti-HA ou anti-GFP (Figura 34). As bandas reconhecidas por ambos os anticorpos apresentam a mesma massa molecular (~90kDa), que corresponde a soma das massas moleculares de USP2a com HA e EGFP. Os anticorpos anti-HA revelaram bandas com massa molecular menor, provavelmente correspondentes às formas de USP2a clivadas (Figura 34), onde a parte C-terminal da proteína foi reconhecida.

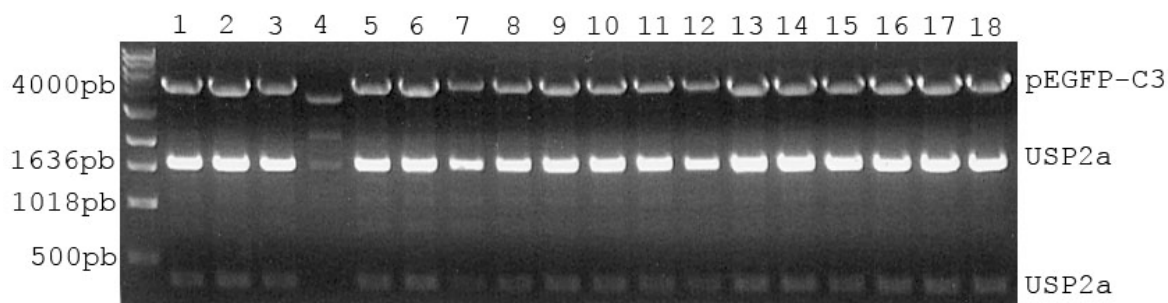


Figura 32 – Gel de agarose a 1,2% onde foram aplicadas amostras de DNA plasmidial purificadas de 18 colônias bacterianas, as quais foram digeridas com as enzimas de restrição XhoI e BamI. Observa-se que a maioria das amostras apresenta os fragmentos correspondentes ao vetor pEGFP-C3 (~ 4000pb) e a dois fragmentos de USP2a (~ 1700pb e ~ 500pb) digeridos.

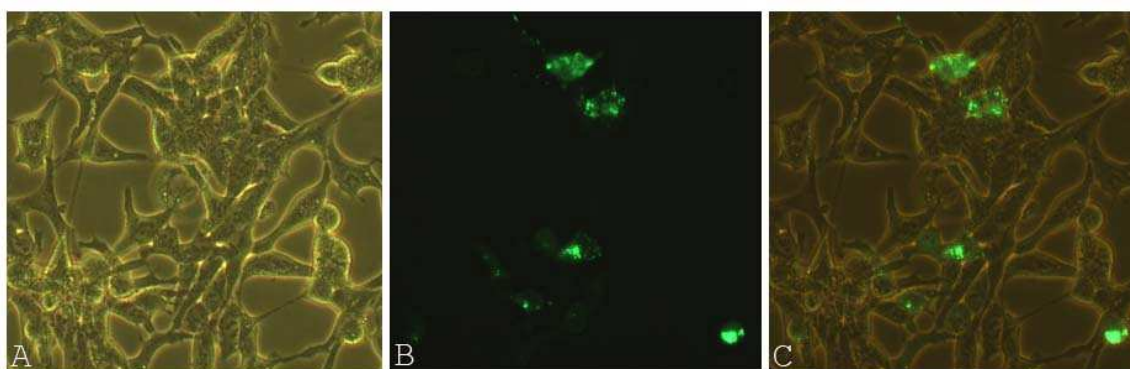


Figura 33 – **A** – Células LNCaP transfectadas de forma transitória com a construção pEGFP-USP2a-HA. **B** – Imagem da proteína EGFP associada a parte N-terminal da enzima USP2a expressa pelas células LNCaP. **C** – Sobreposição das imagens A e B (Aumento original: 200x)

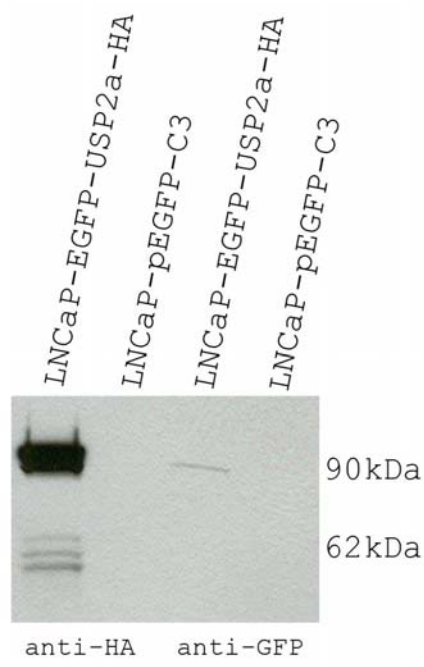


Figura 34 – Reação de western-blotting para detecção de EGFP-USP2a-HA em células LNCaP transfectadas por 12 horas com a construção pEGFP-USP2a-HA ou com o plasmídeo vazio (pEGFP-C3). Observa-se que as bandas detectadas com os anticorpos anti-HA e anti-GFP apresentam massa molecular semelhante (~90kDa), correspondente ao peso molecular de USP2a acrescido das etiquetas EGFP e HA. As mesmas bandas não foram detectadas nas células transfectadas com o plasmídeo vazio. É possível observar bandas de peso molecular menor na canaleta incubada com anti-HA, que provavelmente correspondem a USP2a clivada, contendo apenas a parte C-terminal.

5.12 – Co-imunoprecipitação de USP2a e clatrina *in vivo*

Experimentos prévios de cromatografia de afinidade e co-imunoprecipitação *in vitro*, realizados no laboratório do Dr. Massimo Loda, no Dana-Farber Cancer Institute, sugerem que a proteína clatrina se ligue a USP2a. Na tentativa de co-imunoprecipitar *in vivo* USP2a e clatrina endógenas, foram realizadas reações de imunoprecipitação com extrato protéico de células LNCaP, as quais foram mantidas em meio de cultura livre de metionina e posteriormente marcadas com 25 $\mu\text{Ci/ml}$ de metionina ^{35}S por quatro horas em meio de cultura contendo 20 μM de MG-132 ou quantidade equivalente de DMSO, para que fosse realizado o bloqueio do proteossomo. Imunoprecipitação de FAS foi utilizada como controle positivo, pois já estava padronizada e funcionando de maneira adequada. Como pode ser observado na Figura 35, que representa um dos experimentos realizados, o anticorpo anti-USP2a N-terminal não funciona em reações de imunoprecipitação. Entretanto, a proteína clatrina foi imunoprecipitada (banda com ~ 190 kDa), mas não houve co-imunoprecipitação de USP2a ou mesmo de outra proteína.

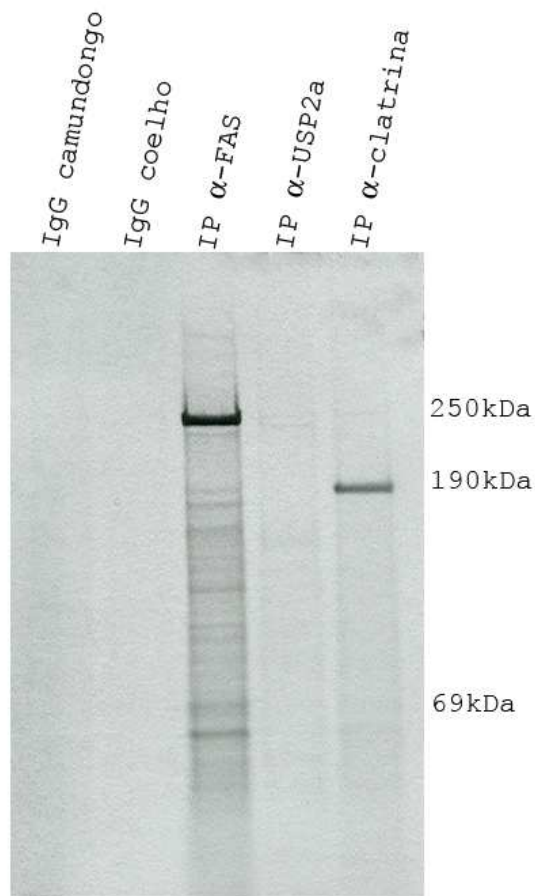


Figura 35 – Reações de imunoprecipitação realizadas com extratos de células LNCaP (500 µg de proteína) marcadas com 25 µCi/ml de metionina ^{35}S e anticorpos anti-FAS, anti-USP2a-N-terminal e anti-clatrina. A incubação dos extratos com IgG de camundongo e de coelho foi utilizada como controle negativo das reações. As proteínas imunoprecipitadas foram eluídas e aplicadas em gel gradiente de poliacrilamida-SDS (4-12%), que foi seco e exposto a filme radiográfico por 48 horas. O anticorpo anti-USP2a não foi capaz de imunoprecipitar esta enzima. Observa-se a presença de banda na altura de 250 kDa, que corresponde a FAS em reação utilizada como controle positivo do experimento. A proteína clatrina foi imunoprecipitada (banda na altura de 190 kDa), no entanto, não houve co-imunoprecipitação de USP2a ou de outra proteína.

Como não foi possível a co-imunoprecipitação de USP2a e clatrina endógenas, foi realizada a transfecção das células LNCaP com a construção pDEST-USP2a-FLAG (contendo tanto a forma selvagem como a mutante de USP2a) ou com o plasmídeo vazio. Extratos protéicos destas células foram incubados com *anti-FLAG M2 affinity gel* e as proteínas imunoprecipitadas aplicadas em gel gradiente de poliacrilamida-SDS, que foi seco e exposto a filmes radiográficos. A Figura 36 representa o resultado de um dos experimentos realizados onde pode-se observar que a proteína USP2a-FLAG foi imunoprecipitada, tanto na forma selvagem como mutada. É possível identificar uma banda na altura de 190 kDa, tanto no extrato das células transfectadas com USP2a selvagem como mutante, no entanto, uma banda na mesma altura na canaleta com o extrato protéico das células transfectadas com o plasmídeo vazio também está presente. Não foi possível, portanto, co-imunoprecipitar *in vivo* USP2a e clatrina. Além dos resultados mostrados aqui, foram realizadas várias outras tentativas de co-imunoprecipitação, também em outras células como AR-iPrEC e SCC-9 que expressam estavelmente USP2a-HA, utilizando anticorpos anti-HA, bem como através de transfecções transitórias em células LNCaP com a construção pEGFP-USP2a-HA e imunoprecipitação com anticorpos anti-HA e anti-GFP, porém, nenhum resultado positivo foi obtido.

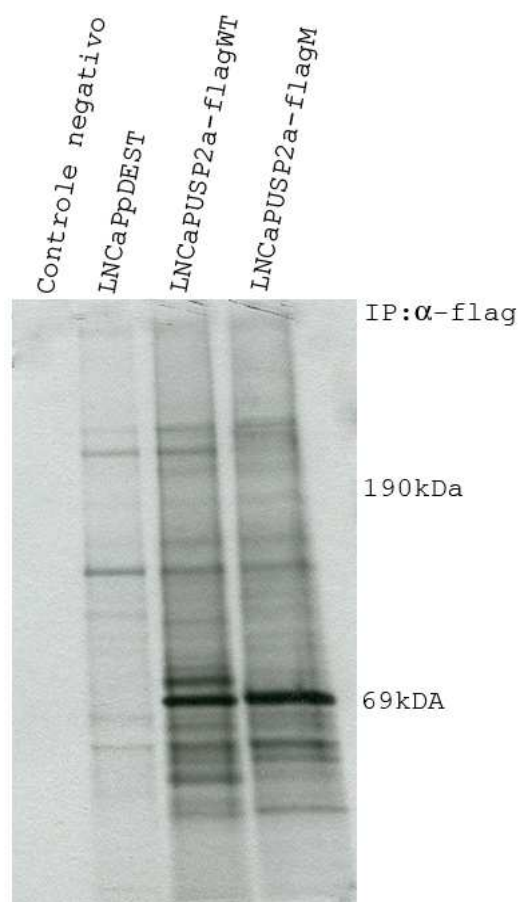


Figura 36 – Reações de imunoprecipitação realizadas com extratos de células LNCaP (500 µg de proteína) transfectadas com as construções contendo as formas selvagem e mutada de USP2a associadas à etiqueta FLAG ou com o plasmídeo vazio. Após transfecção transitória por 12 horas, as células foram marcadas com 25µCi/ml de metionina ³⁵S. Os extratos foram incubados com *anti-FLAG M2 affinity gel*. Uma reação onde não foi adicionado extrato protéico foi utilizada como controle negativo. As proteínas imunoprecipitadas foram eluídas e aplicadas em gel gradiente de poliacrilamida-SDS (4-12%), que foi seco e exposto a filme radiográfico por 48 horas. Observa-se que as formas selvagem e mutada de USP2a associadas à etiqueta FLAG foram imunoprecipitadas (bandas na altura de 69kDa), no entanto não houve co-imunoprecipitação da proteína clatrina. É possível observar bandas na altura do peso molecular de 190kDa (peso molecular da clatrina), mas a mesma banda está presente no controle negativo.

5.13 – Co-localização das proteínas USP2a e clatrina através de imunofluorescência

Na tentativa de co-localizar USP2a e clatrina, foram realizadas duplas marcações com reações de imunofluorescência usando os anticorpos anti-HA e anti-clatrina. Na Figura 37 pode ser observado o resultado da imunofluorescência realizada nas células AR-iPrEC-USP2a-HA. Um padrão de marcação citoplasmático, com alguns grânulos de intensa positividade foi observado para USP2a-HA (Figura 37A). A Figura 37B representa a marcação da proteína clatrina, que também apresenta um padrão de marcação citoplasmático em grânulos. Quando as imagens foram sobrepostas (Figura 37D), foi possível observar a presença de pontos amarelos sugerindo a co-localização de USP2a e clatrina. A Figura 38 representa a mesma reação de imunofluorescência descrita anteriormente para as células AR-iPrEC-USP2a-HA, agora realizada em células SCC-9-USP2a-HA. O mesmo padrão de marcação foi observado (Figuras 38A e B), com uma marcação intensa para USP2a-HA na região perinuclear de algumas células. Também houve co-localização de USP2a e clatrina (Figura 38D). A Figura 39 mostra o resultado de reação de imunofluorescência na qual as células SCC-9-USP2a-HA foram tratadas com 100ng/ml de EGF por 10 minutos, para estimular o processo de endocitose mediado por clatrina. Após o tratamento com EGF, é possível observar uma distribuição mais homogênea de USP2a-HA no citoplasma da célula (Figura 39A), não havendo forte intensidade da marcação na região perinuclear como observado na Figura 38A. Observam-se grânulos mais evidentes na marcação para clatrina em comparação com a Figura 38B. Quando as imagens das reações feitas para USP2a-HA e clatrina foram sobrepostas, foi possível observar novamente a co-localização das mesmas, evidenciada pelos pontos amarelos (Figura 39D).

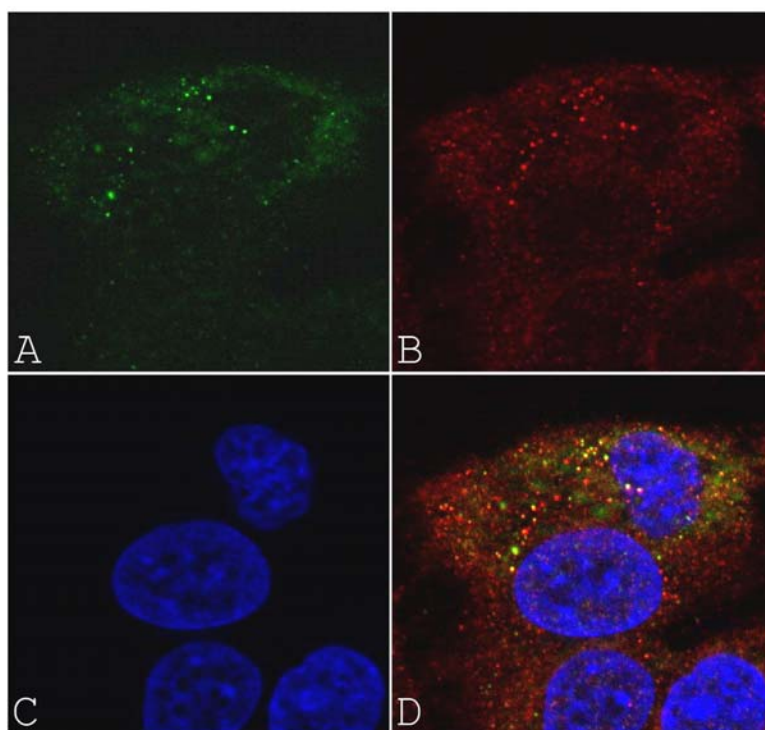


Figura 37 – Reações de imunofluorescência dupla realizadas nas células AR-iPreC-USP2a-HA. Em **A** observa-se a marcação citoplasmática da proteína USP2a-HA com anticorpos anti-HA e anticorpos secundários conjugados com FITC. O mesmo padrão de marcação foi observado para a proteína clatrina (**B**), onde foram utilizados anticorpos anti-clatrina e anticorpos secundários conjugados com Texas Red. Em **C** podem ser vistos os núcleos contra-corados com *Hoechst*. Em **D**, na sobreposição das imagens **A** e **B**, podem ser observados pontos amarelados que demonstram a co-localização de USP2a e clatrina. (Aumento original: 630x).

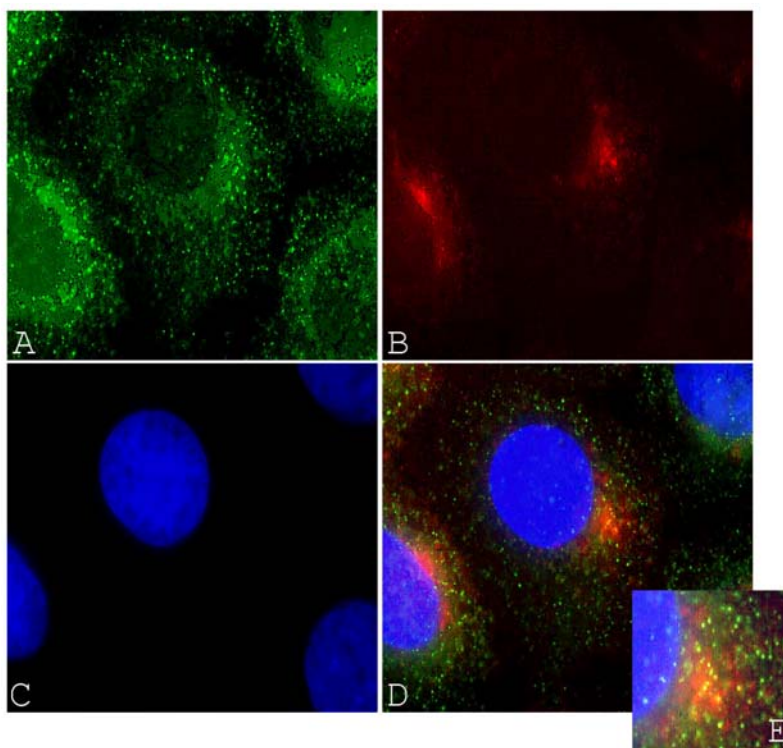


Figura 38 – Reações de imunofluorescência dupla realizadas nas células SCC-9-USP2a-HA. Em **A** observa-se a marcação citoplasmática da proteína USP2a-HA com anticorpos anti-HA e anticorpos secundários conjugados com FITC, principalmente na região perinuclear. O mesmo padrão de marcação foi observado para a proteína clatrina (**B**), onde foram utilizados anticorpos anti-clatrina e anticorpos secundários conjugados com Texas Red. Em **C** podem ser vistos os núcleos contra-corados com *Hoechst*. Em **D**, na sobreposição das imagens **A** e **B**, podem ser observados pontos amarelados que demonstram a co-localização de USP2a e clatrina, os quais podem ser melhor observados em **E** (Aumento original: 630x).

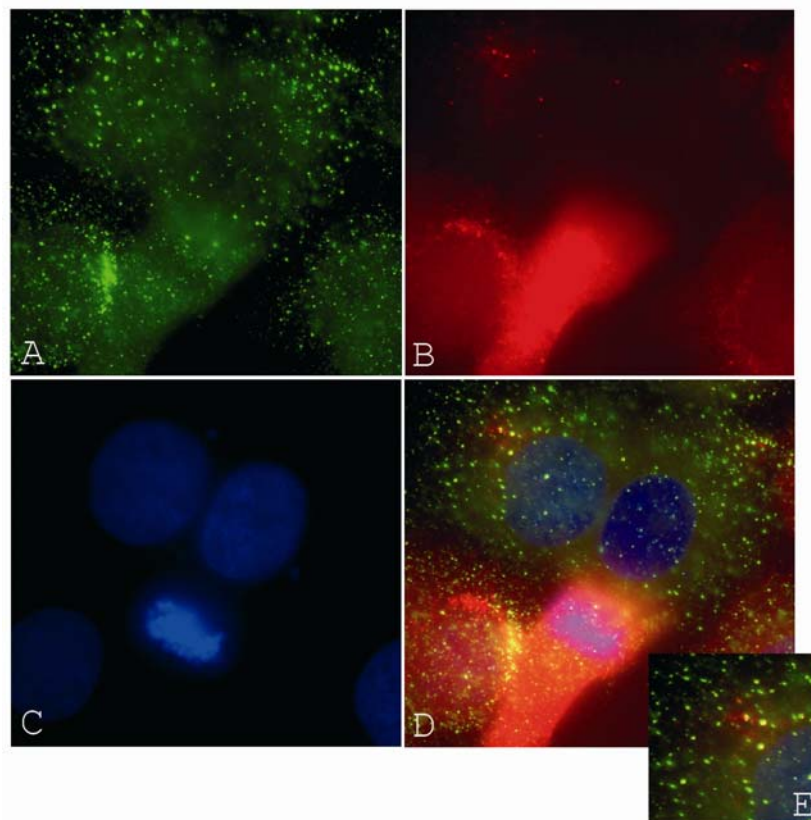


Figura 39 – Reações de imunofluorescência dupla realizadas nas células SCC-9-USP2a-HA tratadas com 100 ng/ml de EGF por 10 minutos. Em **A** observa-se a marcação citoplasmática da proteína USP2a-HA com anticorpos anti-HA e anticorpos secundários conjugados com FITC. O mesmo padrão de marcação foi observado para a proteína clatrina, onde foram utilizados anticorpos anti-clatrina e anticorpos secundários conjugados com Texas Red, com forte marcação na célula em mitose (**B**). Em **C** podem ser vistos os núcleos contra-corados com *Hoechst*. Em **D**, na sobreposição das imagens **A** e **B** podem ser observados pontos amarelados que demonstram a co-localização de USP2a e clatrina, os quais podem ser melhor observados em **E** (Aumento original: 630x).

Com o objetivo de verificar a distribuição intracelular de USP2a na ausência ou presença de altas concentrações de EGF, células LNCaP foram diretamente plaqueadas em lamínulas de vidro colocadas em placas de cultura e após 24 horas transitoriamente transfectadas com a construção pEGFP-USP2a-HA, sendo tratadas ou não com 100ng/ml de EGF por 10 minutos. Antes da fixação com paraformaldeído a 4%, realizou-se a marcação das membranas celulares com a toxina B da cólera marcada com corante fluorescente vermelho (CLTxB). A Figura 40 mostra a expressão de EGFP-USP2a-HA nas células LNCaP, mostrando fluorescência em todo o citoplasma (Figura 40A). Quando esta imagem foi sobreposta a imagem das células com as membranas celulares marcadas com CLTxB (Figura 40D), observamos que USP2a pode estar localizada na membrana celular. Em consequência do tratamento com 100ng/ml de EGF, a expressão de EGFP-USP2a-HA foi em forma de estruturas granulares maiores, observadas em toda a extensão do citoplasma (Figura 41A), diferente do que foi observado nas células não tratadas com EGF.

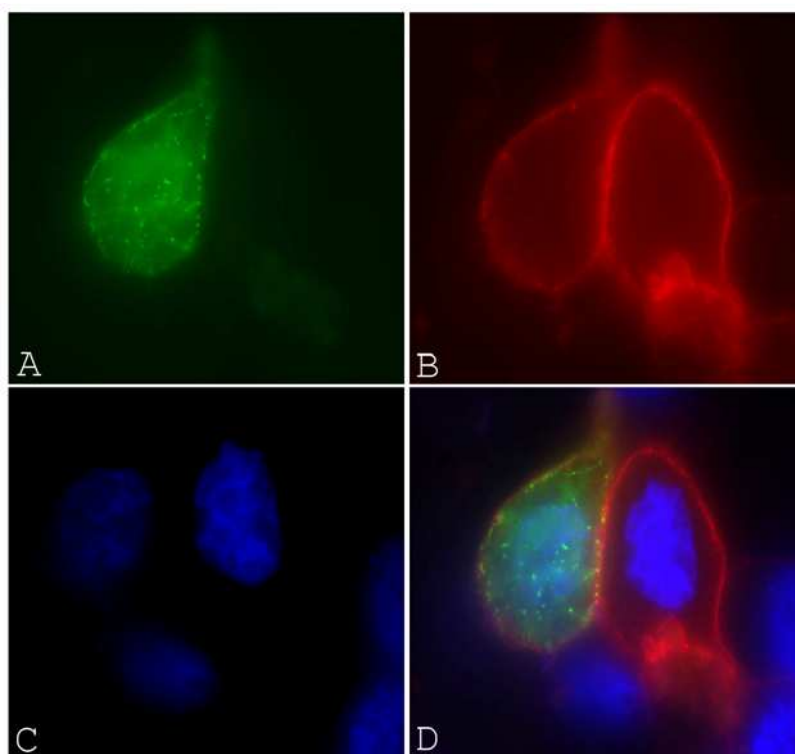


Figura 40 – Expressão de EGFP-USP2a-HA em células LNCaP transfectadas transitoriamente com a construção pEGFP-USP2a-HA. Observa-se presença de EGFP-USP2a-HA em toda a extensão do citoplasma (**A**). Evidenciação das membranas celulares com CLTB marcada com corante fluorescente vermelho (**B**). Em **C** podem ser vistos os núcleos contra-corados com Hoechst. Quando as imagens **A** e **B** são sobrepostas, é possível observar que EGFP-USP2a-HA também está presente na membrana celular (**D**) (Aumento original: 630x).

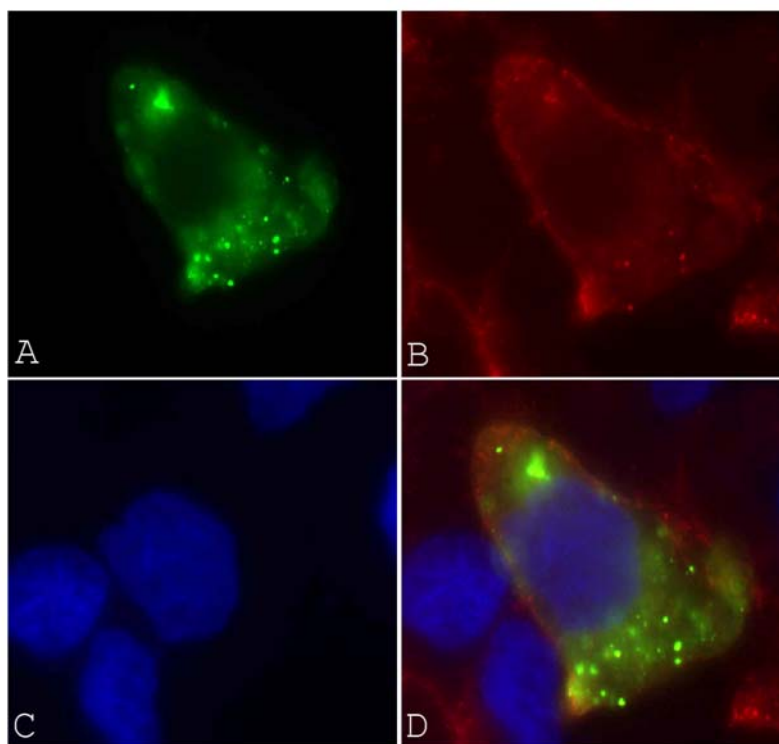


Figura 41 – Expressão de EGFP-USP2a-HA em células LNCaP transfectadas transitoriamente com a construção pEGFP-USP2a-HA e tratadas com 100 ng/ml de EGF por 10 minutos. EGFP-USP2a-HA é expressa em grânulos presentes em toda a extensão do citoplasma (**A**). Evidenciação das membranas celulares com CLTxB marcada com corante fluorescente vermelho (**B**). Em **C** podem ser vistos os núcleos contra-corados com Hoechst. Em **D**, sobreposição das imagens **A** e **B** (Aumento original: 630x).

5.14 – Modulação da produção de clatrina em células AR-iPrEC e NIH3T3 que super-expressam USP2a

Com o intuito de verificar se a super-expressão de USP2a é capaz de induzir aumento na expressão de clatrina, a produção desta proteína foi verificada através de reações de western-blotting nas linhagens celulares AR-iPrEC, NIH3T3, HeLa e SCC-9 que expressam estavelmente a enzima USP2a selvagem. Um aumento na expressão de clatrina foi observado nas linhagens AR-iPrEC e NIH3T3 que super-expressam USP2a, em comparação com as mesmas linhagens transfectadas apenas com o plasmídeo vazio (Figura 42). Não foram observadas alterações na produção de clatrina nas outras linhagens testadas.

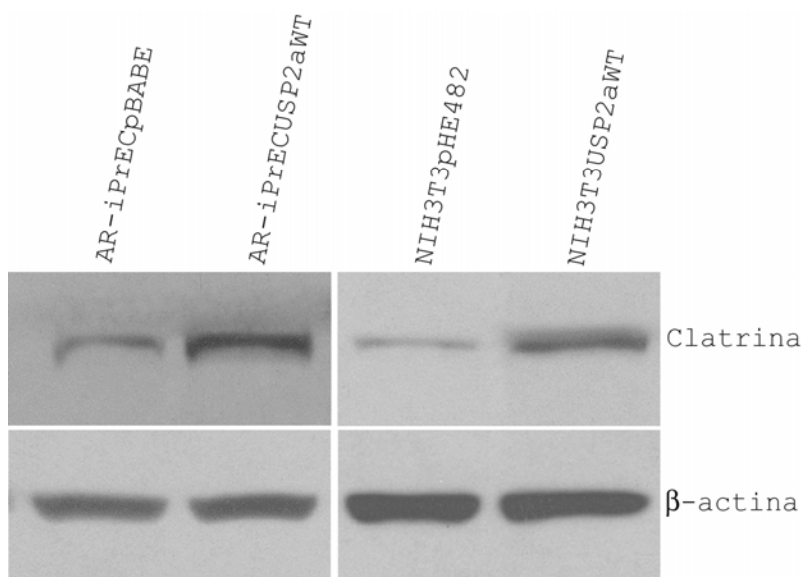


Figura 42 – Reações de western-blotting para detecção de clatrina e β -actina em extratos protéicos das células AR-iPrEC-USP2a-HA, AR-iPrECpBABE, NIH3T3-USP2a-FLAG ou NIH3T3pHE482. Anticorpos contra β -actina foram usados como controle da quantidade de proteína por canaleta do gel. Observa-se um aumento na produção de clatrina nas células que super-expressam USP2a, em comparação com as células transfectadas apenas com o plasmídeo vazio.

5.15 – Regulação de clatrina e EEA1 por andrógenos em células LNCaP

Sabe-se que a expressão de FAS e USP2a é regulada por andrógenos em células derivadas de câncer de próstata (Graner *et al.*, 2004). Existe um trabalho na literatura mostrando que a expressão dos RNAs mensageiros de clatrina também pode ser regulada por andrógenos (Prescott & Tindall, 1998). Para verificar se os níveis protéicos de clatrina, do *early endosome antigen 1* (EEA1) e de Rab5 (envolvidos na endocitose mediada por clatrina e utilizados como marcadores para o estudo deste processo) também são regulados por andrógeno, foram realizadas reações de western-blotting com extratos protéicos de células LNCaP tratadas com a concentração 10 nM de DHT por 24, 48 ou 72 horas. O resultado destes experimentos pode ser observado na Figura 43, onde é possível verificar um aumento na produção de FAS, clatrina, EEA1 e USP2a decorrente do tratamento com DHT. Não foi observada modulação nas bandas de Rab5 após o tratamento com DHT. Estes resultados demonstram que as proteínas clatrina e EEA1 também são reguladas por andrógeno nas células LNCaP.

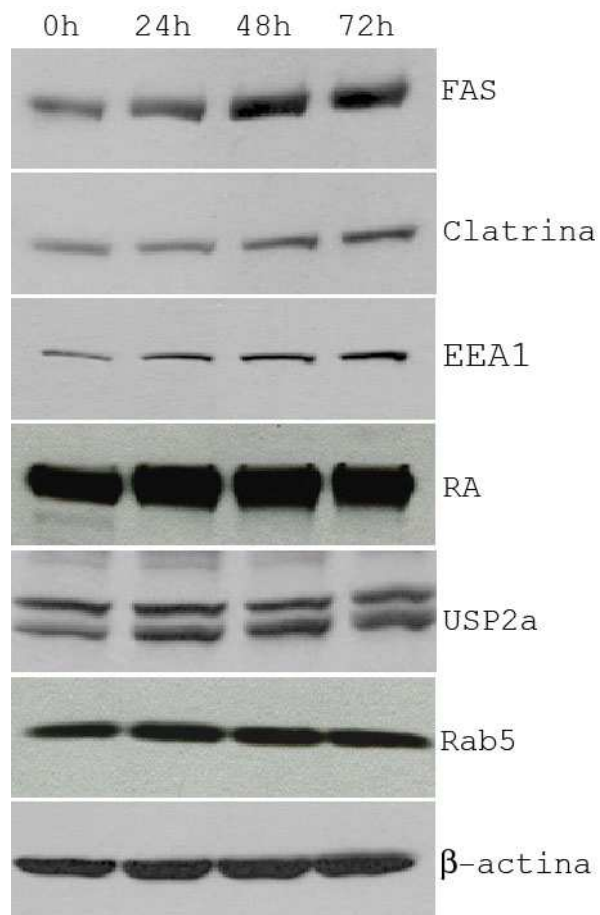


Figura 43 – Reações de western-blotting para detecção de FAS, clatrina, EEA1, RA, USP2a, Rab5 e β-actina em extratos protéicos das células LNCaP tratadas com 10 nM de DHT por 24, 48 ou 72 horas. Anticorpos contra β-actina foram usados como controle da quantidade de proteína por canaleta do gel. Observa-se um aumento na produção de FAS, clatrina, EEA1, RA e USP2a após o tratamento com DHT. Não houve diferença na produção de Rab5.

6 – Discussão

A conjugação de Ub a proteínas intracelulares representa um mecanismo importante na regulação de vários processos celulares. Dentre estes a progressão do ciclo celular e transdução de sinal, transporte de proteínas da membrana plasmática para o interior da célula, controle de qualidade das proteínas no retículo endoplasmático, regulação da transcrição e crescimento celular. O papel da ubiquitinação na maioria destes processos é promover a degradação de proteínas específicas. Um complexo enzimático é responsável por adicionar ou remover moléculas de Ub dos substratos protéicos (Hershko & Ciechanover, 1998; Pickart, 2001). A conjugação de Ub aos substratos é catalizada pela ação das enzimas ativadoras de Ub (E1), conjugadoras de Ub (E2) e ligadoras de Ub (E3). As proteínas podem ser modificadas em um único ou em múltiplos resíduos de lisina pela adição de uma única molécula ou cadeias de Ub. O destino de uma proteína marcada pela conjugação de Ub depende em parte do tamanho do oligômero(s) de Ub e da configuração da ligação Ub-Ub nas cadeias adicionadas. A adição de quatro ou mais ubiquitinas, ou seja, poliubiquitinação, na qual a porção C-terminal de uma Ub está ligada à lisina⁴⁸ da Ub seguinte, promove uma eficiente ligação da proteína modificada ao proteossomo 26S, onde irá ocorrer a degradação do substrato em pequenos peptídeos e a reciclagem das moléculas de Ub (Pickart, 2001). No entanto, a adição de uma única molécula de Ub (monoubiquitinação) ou a adição de cadeias curtas de Ub, onde a ligação Ub-Ub está na lisina⁶³, pode ter uma variedade de conseqüências que não incluem a degradação pelo proteossomo. A monoubiquitinação de proteínas localizadas na membrana plasmática resulta em sua internalização por endocitose e degradação pelo lisossomo (Hicke, 2001; Dupre *et al.*, 2001).

Apesar de estar ligada a proteínas celulares que são rapidamente degradadas, a molécula de Ub apresenta meia-vida longa *in vivo* (Haas & Bright, 1987). Este fato se deve a eficiente remoção de Ub dos substratos realizada pelas enzimas desubiquitinantes (DUBs), que removem as etiquetas de Ub das proteínas condenadas à degradação. Quando ocorre antes da degradação do

substrato nos proteossomos ou lisossomos, a remoção de moléculas de Ub pelas DUBs regula negativamente a degradação protéica. Grande parte das DUBs pertence a família das USPs, que apresenta mais de 50 membros descritos até o momento. Embora essas proteases apresentem similaridades tanto seqüenciais como estruturais em seus sítios catalíticos, divergências notáveis são encontradas tanto em seus domínios N como C-terminal, as quais provavelmente são responsáveis pela especificidade de seus substratos (Nijman *et al.*, 2005a). No entanto, até o momento são poucas as interações DUBs-proteína alvo conhecidas. A enzima desubiquitinante HAUSP (USP7) é reguladora de p53 e Mdm2 (Cummins & Vogelstein, 2004; Li *et al.*, 2004). O produto protéico do gene supressor de tumor da cilindromatose familiar (CYLD), uma DUB que pertence à classe das USPs, modula a atividade do fator nuclear κ B (Kovalenko *et al.*, 2003). USP2a está associada com a remoção de Ub da enzima FAS, estabilizando-a em células de câncer de próstata, funcionando em nível pré-proteossômico, prevenindo sua degradação (Graner *et al.*, 2004). Stevenson *et al.* (2007), em trabalho recente, mostraram que Mdm2 é também alvo da ação desubiquitinante de USP2a, inclusive promovendo uma maior estabilização desta proteína do que a própria USP7, resultando em um aumento na degradação de p53.

Graner *et al.* em 2004, com o intuito de identificar enzimas desubiquitinantes com função pré-proteossômica reguladas por andrógenos na próstata, clonaram os homólogos humanos das DUBs Ubp69 e Ubp45, previamente identificadas em testículos de ratos (Lin *et al.*, 2000). Os genes homólogos humanos estão localizados no cromossomo 11q23.3 e foram denominados USP2a (homólogo de Ubp-69, Genbank # NM004205) e USP2b (homólogo de Ubp-45, Genbank # AF440755). Estas duas variantes são formadas a partir de *splicing* alternativo, a partir de um gene formado por 15 éxons contendo 29125 pb. Graner *et al.* (2004) demonstraram que USP2a se liga especificamente em FAS (que foi identificada pela primeira vez, neste mesmo trabalho, como um substrato para os proteossomos), evitando sua destruição proteolítica e conseqüentemente prolongando sua meia vida dentro de células

humanas derivadas de câncer de próstata. A super-expressão de FAS é descrita em um grande número de tumores, incluindo carcinomas espinocelulares (CECs) de boca (Krontiras *et al.*, 1999; Agostini *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2004), sendo considerada como um marcador para o prognóstico do câncer de próstata (Epstein *et al.*, 1995), de mama (Alo *et al.*, 1996), de ovário (Gansler *et al.*, 1997; Alo *et al.*, 2000), de cólon (Visca *et al.*, 1999), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003) e também sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003). De acordo com Baron *et al.* (2004), tumores que expressam grandes quantidades de FAS apresentam um comportamento biológico mais agressivo, pois a atividade desta enzima proporciona vantagens seletivas para o crescimento celular. Diversos estudos mostram que inibidores específicos da atividade de FAS são capazes de inibir a proliferação celular, através do bloqueio da síntese de DNA durante a fase S, o que leva posteriormente as células à morte por apoptose (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2001). Apesar da inibição da atividade de FAS resultar na morte de células tumorais e na diminuição do tamanho de tumores em modelos animais (Pizer *et al.*, 1996a; Furuya *et al.*, 1997), sua aplicação *in vivo* talvez possa resultar em efeitos indesejáveis como anorexia e perda de peso (Clegg *et al.*, 2002), além de apresentar sério potencial teratogênico (Chirala *et al.*, 2003). Graner *et al.* (2004) sugerem que USP2a poderia ser um alvo terapêutico alternativo, interferindo indiretamente na função de FAS. Stevenson *et al.* (2007) também acreditam que USP2a represente um alvo em potencial para intervenções terapêuticas, pois a inibição de USP2a levaria à degradação de Mdm-2 e a reativação de p53 nas células que apresentam o tipo selvagem desta proteína.

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens celulares derivadas de CECs bucais SCC-4, -9, -15 e -25 para investigar a expressão da enzima desubiquitinante USP2a e melhor entender o seu papel biológico, pois em nossa pesquisa anterior (Agostini *et al.*, 2004) demonstramos que FAS é expressa por estas mesmas células e essencial para a proliferação. As linhagens que apresentaram as maiores quantidades de RNAs mensageiros para USP2a foram a SCC-4 e -15. É interessante observar que, apesar das quatro linhagens estudadas

produzirem quantidades semelhantes do produto protéico de USP2a, quando se utilizou os anticorpos *anti-core* ou anti-USP2a N-terminal, foram detectadas quantidades um pouco maiores nas linhagens SCC-9 e -25, as quais também apresentam as maiores quantidades de FAS (Agostini *et al.*, 2004). Esta observação sugere que USP2a também possa estabilizar FAS em células de câncer bucal, como ocorre nas células LNCaP (Graner *et al.*, 2004). Quanto à expressão de USP2b, foram observadas quantidades muito maiores de RNAs mensageiros nas linhagens SCC-9 e -25 do que nas linhagens -4 e -15, entretanto, pouca proteína foi detectada. A partir dos resultados obtidos em nossos experimentos, é possível concluir que não existe uma relação direta entre a quantidade dos RNAs mensageiros e das proteínas USP2a e USP2b nas células SCC. Gousseva & Baker (2003) realizaram estudo da expressão de Ubp-45 (USP2b em humanos) e Ubp-69 (USP2a em humanos) em diferentes tecidos de camundongo e também observaram discrepâncias entre os níveis de RNAs mensageiros de Ubp-69 e da proteína correspondente. Os autores detectaram esta proteína na maioria dos tecidos analisados, enquanto que os RNAs mensageiros estavam presentes em grandes quantidades apenas nos testículos e no músculo esquelético e cardíaco. Por outro lado, os RNAs mensageiros de Ubp-45 foram encontrados em todos os tecidos estudados, exceto no pulmão e no baço, entretanto, não conseguiram detectar a proteína. Nossos resultados também sugerem um padrão antagônico de expressão de USP2a e USP2b nas células SCC. Uma regulação antagônica entre as enzimas Ubp69 e Ubp45 já foi descrita por Lin *et al.* (2000) durante a espermatogênese em ratos e por Park *et al.* (2002) na diferenciação miogênica de células embrionárias de rato, onde controla a fusão de membranas e a produção de proteínas músculo-específicas.

Até o presente momento, não há dados sobre a expressão de USP2a e USP2b em células epiteliais humanas. Gousseva & Baker (2003) descreveram uma expressão muito alta da proteína Ubp-69 em células epiteliais da pele de camundongos. Os estudos imunohistoquímicos realizados por estes autores mostraram que tanto Ubp-69 e Ubp-45 estão localizadas no citoplasma, o que foi

confirmado através de microscopia confocal em células COS-7 que super-expressavam as duas isoformas. Na presente pesquisa, a localização intracelular de USP2a foi estudada nas células SCC-9 que super-expressam de forma estável USP2a selvagem ligada à etiqueta HA (os anticorpos comerciais disponíveis para USP2a não funcionam em reações de imunohistoquímica/imunocitoquímica). Após análise em microscópio confocal, foi possível observar USP2a no citoplasma, sendo que algumas células apresentaram forte marcação na região perinuclear. Este resultado está em concordância com os achados de Gousseva & Baker (2003), que descreveram um padrão de marcação citoplasmática para Ubp-69 nos diferentes tecidos de camundongo estudados e uma positividade intensa na região perinuclear de células musculares.

Graner *et al.* (2004) demonstraram que a transfecção transitória de células LNCaP com um vetor plasmidial contendo a forma selvagem de USP2a (USP2aWT) ocasionou aumento da quantidade da proteína FAS, ao passo que as células transfectadas com o vetor contendo USP2a mutante (USP2aM) apresentaram diminuição na quantidade desta proteína. Estes resultados sugerem um efeito protetor de USP2a sobre FAS, aumentando a meia vida desta última. A construção mutante utilizada no experimento realizado por estes autores apresenta o cDNA de USP2a mutado, com a troca da cisteína por alanina no sítio catalítico ($\Delta 276$, Cys-Ala). Sabe-se que mutações no Cys *box* têm sido utilizadas para obter isopeptidases cataliticamente inativas, as quais freqüentemente atuam como dominantes negativos (DeSalle & Pagano 2001, Li *et al.* 2002, Naviglio *et al.* 1998). Assim, a proteína exógena inativa, competiria com a endógena, levando a uma menor desubiquitinação e, conseqüentemente, maior degradação de FAS. Neste trabalho, a linhagem SCC-9 foi transfectada de forma estável com as mesmas construções utilizadas no trabalho de Graner *et al.* (2004), as quais foram criadas no vetor pcDNA 3.1. Os níveis da proteína USP2a e dos seus RNAs mensageiros nestes transfectantes estáveis foram maiores nos clones SCC-9WT e SCC-9M do que no clone SCC-9 pcDNA (transfectado com o vetor vazio) e na linhagem normal parental (SCC-9N). Ao contrário do que esperávamos, tanto os

clones obtidos das transfecções com USP2a selvagem como mutante apresentaram maior proliferação do que as linhagens SCC-9N e SCC-9pcDNA. Considerando a ação de USP2a sobre FAS (Graner *et al.*, 2004) e sobre Mdm2 (Stevenson *et al.*, 2007), sua super-expressão deveria causar um aumento na proliferação celular. Entretanto, em recente artigo, Priolo *et al.* (2006) demonstraram que a super-expressão de USP2a em células epiteliais de próstata não transformadas (AR-iPrEC) não aumentou a taxa de proliferação, apesar de favorecer o aparecimento de propriedades oncogênicas *in vitro*, tais como crescimento em *soft agar* e formação de colônias. As colônias das células com a expressão forçada de USP2a selvagem apareceram em maior número e foram maiores do que aquelas produzidas pelas células que super-expressavam o mutante ou as células parentais. Foi também possível observar em nossos resultados que, em comparação com o grupo controle, transfectado apenas com o plasmídeo vazio, houve um aumento na quantidade de FAS nas células transfectadas com USP2a selvagem ou mutante, fato que não conseguimos explicar.

Durante o estágio no laboratório do Dr. Massimo Loda no *Dana-Farber Cancer Institute*, células SCC-9 foram infectadas com o vetor retroviral pBABE contendo os cDNAs de USP2a selvagem ou mutante associados a etiqueta HA. O mutante tem a cisteína do sítio catalítico na região do Cys *Box* trocada por alanina ($\Delta 276$, Cys-Ala), assim como a histidina trocada por arginina no His *Box* ($\Delta 549$, His-Arg). Estas mesmas construções foram utilizadas no trabalho de Priolo *et al.* (2006) para a infecção das células AR-iPrEC. No presente trabalho, baseados nas reações de western-blotting anti-HA e no fato de que alguns clones infectados com USP2a mutante pareciam proliferar menos, foram realizadas curvas de proliferação e análise do ciclo celular. Não houve vantagem na proliferação celular das células infectadas com USP2a selvagem em relação às células infectadas com o plasmídeo vazio, de maneira semelhante ao observado nos clones de SCC-9 transfectados com as construções no vetor pcDNA. Priolo *et al.* (2006), utilizando as mesmas construções, também não detectaram vantagem proliferativa

nas células AR-iPrEC infectadas com USP2a selvagem. Na verdade, o que ocorreu foi uma redução na taxa de proliferação das células SCC-9 infectadas com USP2a mutante, o que não aconteceu nos clones de SCC-9 transfectados com o mutante de USP2a clonado no vetor pcDNA 3.1 (com apenas uma mutação em *Cys Box*). A análise do ciclo celular em citômetro de fluxo demonstrou que a linhagem infectada com USP2a mutante tem uma menor porcentagem de células nas fases S e G2/M do que os controles. Já as células infectadas com USP2a selvagem apresentaram um discreto aumento do número de células na fase S, em comparação com os controles. Em conjunto, estes resultados sugerem que a infecção das células SCC-9 com USP2a mutante reduz a proliferação, provavelmente pelo efeito dominante negativo que ocasionou uma menor desubiquitinação e, conseqüentemente, maior degradação de FAS.

Utilizando oligonucleotídeos anti-sense e RNAi para USP2a, Graner *et al.* (2004) demonstraram que a inibição da expressão de USP2a em células LNCaP leva a uma diminuição dos níveis protéicos de FAS e induz apoptose. Em nossos experimentos de RNAi com as células SCC-9, a maior inibição dos RNAs mensageiros de USP2a ficou em torno de 60%, alcançada 48 horas após a transfecção. Priolo *et al.* (2006) utilizaram a mesma seqüência de RNAi para inibir a expressão de USP2a em três linhagens derivadas de câncer de próstata e obtiveram resultados semelhantes. Como conseqüência, os níveis protéicos de USP2a foram reduzidos, assim como houve discreta diminuição na quantidade de FAS. Curiosamente, a inibição de USP2a nas células SCC-9 através de RNAi não resultou em significativa indução de apoptose, como ocorreu nas células LNCaP nos experimentos realizados por Graner *et al.* (2004) e por Priolo *et al.* (2006). A inibição de USP2a nas células de câncer de próstata LNCaP, DU145 e PC-3 provocou apoptose em diferentes intensidades: as células LNCaP foram as que apresentaram as taxas de apoptose mais altas, chegando a aproximadamente 50% após 120 horas de tratamento, ao passo que nas células DU145 e PC-3, estas foram mais baixas (Priolo *et al.*, 2006). Estes autores sugeriram que estas diferenças podem estar relacionadas aos diferentes níveis protéicos de FAS

encontrados nestas linhagens ou a funcionalidade de p53, pois a apoptose ocasionada pelo silenciamento de USP2a pode ser consequência da desestabilização de FAS (Graner *et al.*, 2004) e Mdm2 (Stevenson *et al.*, 2007). Priolo *et al.* (2006) também avaliaram, através da técnica GSEA (*gene set enrichment analysis*), a expressão de grupos de genes em tumores de próstata com baixa e alta expressão de USP2a. Nos tumores com altos níveis de USP2a, foi detectada alta expressão de genes anti-apoptóticos. Por outro lado, nos tumores com baixos níveis de USP2a, os genes que apresentaram maior expressão foram os envolvidos na apoptose mediada por p53. Estes dados sugerem que USP2a atua na proteção a apoptose nas células epiteliais tumorais, muito provavelmente por seus efeitos em FAS e Mdm2. De fato, a inibição de FAS com inibidores farmacológicos ou RNAi resulta em apoptose de células tumorais (Kuhajda, 2000) e diminuição do tamanho de tumores em modelos animais (Pizer *et al.*, 2001). Em nosso trabalho de mestrado, demonstramos que o tratamento das células SCC-9 com o inibidor farmacológico de FAS cerulenina ocasiona uma redução significativa da proliferação (Agostini *et al.*, 2004). Graner *et al.* (2004) demonstraram que a super-expressão de FAS é capaz de proteger as células da apoptose induzida pela inibição da expressão de USP2a. Dentre os mecanismos possivelmente envolvidos está o acúmulo de malonil-CoA (Pizer *et al.*, 2000; DeSchrijver *et al.*, 2003) e inibição da oxidação de ácidos graxos (Thupari *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que a inibição de FAS resulta na liberação do citocromo c, pois a apoptose induzida por cerulenina é caracterizada por sua rápida liberação em linhagens celulares com p53 selvagem ou mutado (Heiligttag *et al.*, 2002). A atividade pró-apoptótica decorrente da inibição de USP2a pode também ser atribuída ao acúmulo de p53, resultado da desestabilização de Mdm2 (Stevenson *et al.*, 2007). A proteína p53 produzida por células tumorais pode estar mutada, nas formas *non-null* ou *null* (Greenblatt *et al.*, 1994). A proteína p53 mutante proveniente de uma alteração do tipo *non-null* tem estabilidade aumentada e se acumula no núcleo de células neoplásicas, podendo ser detectada por imunohistoquímica. As mutações do tipo *null* levam a codificação de

uma proteína p53 truncada e instável, a qual não é detectada por imunohistoquímica (Greenblatt *et al.*, 1994). Células LNCaP têm a proteína p53 selvagem, enquanto que a linhagem DU145 apresenta mutação tipo *non-null* e as células PC-3 a mutação do tipo *null*. Priolo *et al.* (2006) sugerem que a apoptose induzida nas células LNCaP é um bom exemplo da ação de USP2a sobre suas duas proteínas alvo, já que apresentam altos níveis de FAS e p53 funcional.

O resultado obtido após a inibição de USP2a nas células SCC-9 pode ser compreendido com base nas afirmações acima, pois, apesar desta linhagem apresentar os maiores níveis de FAS dentre as quatro linhagens estudadas no presente trabalho (Agostini *et al.*, 2004), estes níveis são bem menores do que os produzidos pelas células LNCaP, por exemplo. Além disso, o gene p53 encontra-se mutado na SCC-9, o qual apresenta uma deleção de 32 pares de bases entre os códons 274 e 285, caracterizando uma mutação do tipo *null* (Min *et al.*, 1994).

A regulação de FAS nas células SCC parece ser mediada por EGF, através dos receptores ErbB2 ou EGFR, pois altas concentrações deste fator de crescimento (150 ng/ml) reduzem a quantidade da proteína FAS e inibem a proliferação destas células (Agostini *et al.*, 2004). Através de experimentos de western-blotting avaliamos a expressão de FAS, ErbB2 e p-27 nas células SCC e observamos que a SCC-9 foi a que apresentou as maiores quantidades das proteínas FAS e ErbB2, de acordo com nosso trabalho prévio (Agostini *et al.*, 2004). Um achado interessante foi o que a linhagem SCC-9 teve a mais baixa quantidade de p-27. Kudo *et al.* (1998) demonstraram que a expressão reduzida de p-27 pode estar correlacionada com desenvolvimento e progressão do carcinoma espinocelular de boca e pode ser um indicador de comportamento maligno deste neoplasma. Knowles *et al.* (2004) demonstraram que a inibição de FAS com Orlistat ou RNAi leva ao aumento nos níveis protéicos de p-27 em células derivadas de câncer de mama sem afetar sua transcrição, indicando estabilização do mesmo. Neste trabalho, a inibição de FAS também reduziu substancialmente os níveis de Skp2, levando os autores a concluir que a inibição de FAS atua a nível pré-proteossômico, controlando os níveis de p-27 e causando

bloqueio na progressão do ciclo celular. Skp2 é um dos pontos regulatórios importantes na transição G₁/S, pois é necessário para a degradação Ub-dependente de p-27 (Carrano *et al.*, 1999).

Assim como FAS, USP2a é regulada por andrógenos nas células LNCaP (Graner *et al.*, 2004). Com o objetivo de estudar a regulação de USP2a nas células SCC, estas foram tratadas com diferentes concentrações de testosterona ou EGF. Testosterona não alterou a expressão dos RNAs mensageiros de USP2a, ao contrário do que ocorreu nas células LNCaP (Graner *et al.*, 2004), provavelmente porque as células SCC-9 têm quantidades muito baixas de receptor de andrógeno (Agostini *et al.*, 2004). Em contraste, o tratamento com EGF produziu efeitos consideráveis na expressão de USP2a, ocorrendo um discreto aumento na presença de baixas concentrações de EGF e acentuada diminuição (de aproximadamente 80%) nas células tratadas com maiores concentrações deste fator. Resultados até certo ponto semelhantes foram encontrados com relação à proteína USP2a. EGF também induziu um aumento na produção de FAS nas células SCC-9, o qual foi dose dependente. De fato, Swinnen *et al.* (2000b) demonstraram aumento na expressão dos RNAs mensageiros e da proteína FAS em células LNCaP tratadas com 10 ng/ml de EGF por 24 horas e Yeh *et al.* (2003) trataram as células MCF-7 com 100 ng/ml de EGF, também por 24 horas, e observaram um aumento nos níveis protéicos de FAS. Em nosso trabalho, houve um discreto aumento na produção de EGFR nas células tratadas com concentrações entre 10 pg e 1 ng/ml de EGF e uma drástica redução nas células tratadas com 100 ng/ml, o que pode ser explicado pela internalização do receptor que ocorre após a estimulação aguda com EGF (Carpenter & Cohen, 1976; Haigler *et al.*, 1979). O tratamento de células com 100ng/ml de EGF é utilizado em diversos estudos de internalização de EGFR (Mineo *et al.*, 1999; McCullough *et al.*, 2004). Os níveis protéicos de ErbB2 também foram analisados nas células SCC-9 expostas a 100 pg/ml ou 100 ng/ml de EGF, concentrações que estimulam ou inibem a expressão de USP2a, respectivamente. Não houve diferença na quantidade de ErbB2 no grupo tratado com 100 pg/ml, já nas células

tratadas com 100 ng/ml de EGF observamos uma redução acentuada deste receptor (superior a 90%). A diminuição na quantidade da proteína é difícil de ser explicada à luz dos conhecimentos atuais, pois os processos de internalização e degradação deste receptor ainda não estão bem esclarecidos. Um aspecto interessante da família ErbB de receptores é que somente o receptor EGFR parece ser rapidamente internalizado após ativação pelo ligante, sendo sua internalização aumentada em 5 a 10 vezes após a ativação. Entretanto, os níveis de internalização de ErbB2, ErbB3 e ErbB4 são similares na ausência ou presença de ligantes (Worthylake *et al.*, 1999; Waterman *et al.*, 1998). Na ausência de ligantes, estes receptores encontram-se em constante *turnover*, sendo várias vezes internalizados e reciclados para a membrana celular (Citri *et al.*, 2002). A heterodimerização de EGFR com ErbB2 ou ErbB3 inibe sua internalização (Lenferink *et al.*, 1998; Worthylake *et al.*, 1999). Por outro lado, já foi demonstrado que a ativação por heregulina, que estabelece a formação dos heterodímeros de ErbB2 com ErbB3 ou ErbB4, leva à degradação de ErbB2 pelo sistema Ub-proteossomo (Magnifico *et al.*, 1998), o que não acontece na ativação dos receptores por EGF. Trabalhos recentes têm estudado a degradação de ErbB2 induzida por drogas. A terapia com Trastuzumab (Herceptin) induz a interação ErbB2/c-Cbl, que resulta na ubiquitinação de ErbB2 e conseqüente degradação (Klapper *et al.*, 2000; Levkowitz *et al.*, 2000). Zhou *et al.* (2003) mostraram que o tratamento com geldanamicina, um inibidor de HSP-90, causa ubiquitinação e degradação de ErbB2 e que este receptor é substrato para a enzima E3 ligase de Ub CHIP (*carboxyl terminus Hsc70-interacting protein*). Lerdrup *et al.* (2006) demonstraram que vários processos estão envolvidos na diminuição da quantidade de ErbB2 ocasionada pelo tratamento com geldanamicina, tais como degradação pelo lisossomo, clivagem do domínio quinase e atividade proteossômica. A relação entre USP2a, FAS e ErbB2 em carcinomas espinocelulares bucais foi demonstrada na tese de doutorado de S. D. Silva (2007), que avaliou a expressão dos RNAs mensageiros dos genes que codificam estas proteínas através de qRT-PCR em pares de amostras de CECs bucais e tecido

normal. Os resultados indicaram que os transcritos USP2a, FAS e ErbB2 estão diferencialmente expressos entre as amostras de CEC bucal e o tecido morfológicamente normal das margens da lesão, sendo estatisticamente correlacionados entre si.

Uma observação importante do presente trabalho foi que a alteração nos níveis de USP2a pelo tratamento com EGF nas células SCC-9 alterou o padrão de ubiquitinação de FAS. Quando tratadas com 100pg/ml de EGF, ocorreu uma redução na quantidade de formas ubiquitinadas de FAS em comparação com o grupo controle, onde EGF não foi adicionado ao meio de cultura. Por outro lado, quando foi utilizada a concentração de 100ng/ml de EGF, na qual os níveis de USP2a estão reduzidos em mais de 80%, uma quantidade maior de formas ubiquitinadas de FAS foi detectada. É interessante que no grupo tratado com 100ng/ml de EGF houve degradação de FAS após 30 e 45 horas de incubação das amostras a 37°C, o que não ocorreu no grupo controle e no tratado com 100pg/ml de EGF, que apresentava quantidades bem mais elevadas de USP2a. Estes resultados sugerem que USP2 é provavelmente regulada por EGF nas células SCC-9 e confirmam, pelo menos em parte, a interação USP2a/FAS nestas células.

Endocitose, USP2a e Clatrina

Um mecanismo fisiológico crucial para a atenuação dos sinais desencadeados pela ativação dos receptores ErbB é a internalização de receptores ativados. Este processo caracteriza-se pela endocitose dos receptores/ligantes seguida de degradação pelos lisossomos e ocorre principalmente com os homodímeros do receptor EGFR (Sorkin, 1998; Haglund *et al.*, 2003; Marmor & Yarden, 2004; Johannessen *et al.*, 2006). Quando EGF se liga ao EGFR, ocorre a formação de dímeros que são fosforilados, monoubiquitinados em vários resíduos de lisina e internalizados através de invaginações que se formam na membrana, as quais se desprendem e se tornam vesículas revestidas

por clatrina. Posteriormente, os receptores são transportados aos endossomos precoces de onde serão encaminhados aos endossomos tardios e subseqüentemente aos lisossomos para degradação (Sorkin, 1998). Alternativamente, os receptores EGFR poderão ser reciclados e voltar à membrana celular (Sorkin, 1998). Acredita-se que a conjugação de moléculas de Ub aos receptores durante o processo de endocitose tenha duas funções. Além de atuar com um sinal para que ocorra a endocitose, dirigindo a internalização a partir da membrana plasmática, também determina a interação dos receptores ubiquitinados com complexos protéicos dos endossomos, os quais irão direcioná-los para a degradação nos lisossomos (Katzmann *et al.*, 2002; Raiborg *et al.*, 2003).

Trabalhos recentes demonstram a participação das enzimas desubiquitinantes AMSH (*associated molecule with the SH3 domain of STAM*), AMSH-like protein (AMSH-LP) e UBPY (*Ub-specific protease Y* – USP8) no processo da endocitose mediada por clatrina (McCullough *et al.*, 2004; Mizuno *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que estas enzimas estão co-localizadas com proteínas específicas do sistema endossomal (McCullough *et al.*, 2004; Mizuno *et al.*, 2005). AMSH e AMSH-LP interagem diretamente com a cadeia pesada de clatrina, e isto é necessário para a localização endossomal destas proteínas. Acredita-se que moléculas de clatrina têm a função de “ancorar” estas enzimas desubiquitinantes na membrana dos endossomos precoces (McCullough *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2006). A inibição da enzima AMSH resulta no aumento da degradação de EGFR. McCullough *et al.* (2004) demonstraram que AMSH é capaz de desubiquitar os homodímeros de EGFR internalizados que se encontram nos endossomos precoces, impedindo seu direcionamento aos lisossomos e conseqüentemente sua degradação. Os efeitos da inibição de UBPY sobre a degradação de EGFR são controversos (Mizuno *et al.* 2005, Row *et al.* 2006, Bowers *et al.* 2006 e Alwan & van Leeuwen, 2007), mas já foi demonstrado que esta DUB está envolvida na manutenção e morfologia normal do endossomo (Mizuno *et al.*, 2006; Row *et al.*, 2006).

Resultados de experimentos de cromatografia de afinidade e co-imunoprecipitação *in vitro* realizados no laboratório do Dr. Massimo Loda, do *Dana-Farber Cancer Institute*, demonstraram que a cadeia pesada de clatrina é um possível substrato de USP2a. A avaliação da expressão de grupos de genes em tumores de próstata com baixa e alta expressão de USP2a, através da técnica GSEA (*gene set enrichment analysis*), demonstrou que os tumores com altos níveis de USP2a têm também alta expressão do grupo de genes associados com EEA1 (*early endosome antigen 1*) (Priolo *et al.*, 2006). EEA1 codifica uma proteína envolvida no processo de endocitose, na reciclagem de EGFR para a membrana e na translocação nuclear de ErbB2. Outros grupos de genes relacionados à família de receptores tirosino-quinase ou que controlam a via endocítica, como ErbB3 e Rab respectivamente, estavam super-expressos nos tumores com altos níveis de USP2a.

Um dos objetivos do estágio no laboratório do Dr. Massimo Loda foi a realização de experimentos para estudar a possível interação USP2a/cadeia pesada de clatrina. Foram realizadas várias tentativas de co-imunoprecipitação *in vivo* de USP2a e clatrina, em diferentes linhagens celulares, com vários protocolos, no entanto, não obtivemos sucesso nestes experimentos. Nijman *et al.* (2005a) afirmam que, como acontece na maioria das interações enzima/substrato, espera-se que as interações entre DUBs e seus alvos sejam fracas e transitórias, o que torna a identificação *in vivo* de possíveis alvos bastante difícil. A interação entre USP2a e FAS foi claramente demonstrada por Graner *et al.* (2004), que mostraram também que FAS é ubiquitinada e destruída pelos proteossomos. Não se sabe ao certo se a cadeia pesada de clatrina sofre ubiquitinação. Matsumoto *et al.* (2005) sugerem que clatrina é ubiquitinada nas células HEK293T, entretanto Nakamura *et al.* (2006) não conseguiram observar isto nas células HeLa. No experimento de cromatografia de afinidade realizado por Graner *et al.* (2004), no qual foram identificadas as bandas de FAS e de clatrina como possíveis substratos de USP2a, as bandas da primeira foram muito mais intensas do que as bandas da segunda. Pode ser que USP2a não atue desubiquitinando a cadeia

pesada de clatrina, mas que esta última desempenhe um papel semelhante ao demonstrado na interação com AMSH, funcionando como uma “âncora” para que AMSH possa desubiquitinar os receptores EGFR que se encontram nos endossomos precoces (Nakamura *et al.*, 2006).

Nossos resultados de co-localização de USP2a e clatrina através de imunofluorescência e microscopia confocal em células AR-iPrEC e SCC-9 que super-expressam USP2a indicam que elas estão na mesma região do citoplasma. No entanto, outros experimentos devem ser realizados para confirmar a hipótese de que USP2a possa participar do processo de endocitose mediada por clatrina, como por exemplo, a utilização dos marcadores endossomais EEA1 e transferrina.

Com o intuito de avaliar se a estimulação com EGF seria capaz de mudar a localização intracelular de USP2a, como ocorre com clatrina durante a endocitose dos receptores EGFR, as células LNCaP foram transfectadas transitoriamente com uma construção contendo o cDNA de USP2a associado a etiqueta fluorescente EGFP e tratadas com 100ng/ml de EGF por 10 minutos. Na análise em microscópio confocal, foi possível observar que EGFP-USP2a estava localizada principalmente no citoplasma, mas foi também possível detectar EGFP-USP2a na membrana plasmática. A estimulação com EGF levou a formação de pontos maiores e com fluorescência mais intensa no citoplasma, que correspondiam a EGFP-USP2a, além de uma menor quantidade desta proteína na membrana plasmática. Gousseva & Baker (2003) observaram, através de imunohistoquímica, Ubp-69 (USP2a) no citoplasma, na região perinuclear e também na membrana plasmática. Estes autores sugeriram que provavelmente Ubp-69 seja capaz de “transitar” por diferentes compartimentos subcelulares e, no momento da publicação, afirmaram que estavam realizando experimentos para investigar melhor este fato. Esta informação é interessante, pois talvez USP2a possa estar envolvida em processos onde a movimentação no interior da célula seja necessária, como a que ocorre com a proteína clatrina na endocitose.

A expressão da cadeia pesada de clatrina foi verificada em vários clones de células que super-expressavam de forma estável USP2a. Foram

detectadas quantidades elevadas de clatrina nas linhagens AR-iPrEC e NIH3T3, no entanto, não foram observadas diferenças nos clones das células SCC-9 e HeLa. Curiosamente, as células AR-iPrEC e NIH3T3 foram as que apresentaram comportamento oncogênico *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, após a super-expressão de USP2a (Priolo *et al.*, 2006). Nakamura *et al.* (2006) observaram maior positividade para cadeia pesada de clatrina no interior dos endossomos em células que super-expressavam AMSH ou AMSH-LP, em comparação com as células normais, sugerindo que, pelo menos quando super-expressas, estas DUBs estabilizam a arquitetura da camada de clatrina endossomal através da ligação à cadeia pesada de clatrina.

De acordo com o trabalho de Graner *et al.* (2004), USP2a é regulada por andrógenos nas células LNCaP. Prescott & Tindall (1998) já haviam mostrado que nas mesmas células a expressão do gene que codifica clatrina é também regulada por andrógenos. No presente trabalho, demonstramos que a produção das proteínas clatrina e EEA1 é também regulada por andrógenos nestas mesmas células.

Em conjunto, estes resultados sugerem que USP2a pode interagir com a cadeia pesada de clatrina e participar do processo de endocitose, entretanto, mais experimentos devem ser realizados para a confirmação desta hipótese.

7 – Conclusões

- As células SCC-4, -9, -15 e -25 produzem quantidades semelhantes de USP2a e USP2b e não há uma correlação direta entre a quantidade dos produtos protéicos e a expressão dos seus RNAs mensageiros;
- USP2a está localizada no citoplasma das células SCC-9, podendo estar concentrada na região perinuclear;
- A expressão do duplo mutante de USP2a nas células SCC-9 causa diminuição da proliferação celular;
- A inibição da expressão de USP2a através de RNAi nas células SCC-9 provocou discreto aumento na taxa de apoptose;
- A expressão de USP2a não é modulada por testosterona, no entanto, o tratamento com EGF foi capaz de modular sua expressão nas células SCC-9, tendo efeito direto sobre a ubiquitinação e degradação de FAS;
- USP2a e a cadeia pesada de clatrina podem ser encontradas na mesma região do citoplasma das células SCC-9 e AR-iPrEC;
- USP2a também é encontrada na membrana plasmática de células LNCaP e o tratamento com EGF induz diminuição da quantidade desta enzima na membrana plasmática e a formação de grânulos no citoplasma;
- Células NIH3T3 e AR-iPrEC que expressam de forma estável USP2a produzem quantidades maiores de cadeia pesada de clatrina do que as células parentais não transfectadas;
- A produção das proteínas clatrina e EEA1 é regulada por andrógenos nas células LNCaP.

***Referências**

-Agostini M, Silva S, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M *et al.* Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 2004; 40(7): 728-35.

-Alo' PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer.* 1996; 77(3): 474-82.

-Alo' PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani, V *et al.* Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep.* 2000; 7(6): 1383-88.

-Alwan HA, van Leeuwen JE. UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. *J Biol Chem.* 2007; 282(3): 1658-69.

-Amerik AY, Swaminathan S, Krantz BA, Wilkinson KD, Hochstrasser M. In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J.* 1997; 16(16): 4826-38.

-Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1695(1-3): 189-207.

-Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol.* 2003; 162(3): 435-42.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas nas normas do Internacional Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

-Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? J Cell Biochem. 2004; 91(1): 47-53.

-Bishop N, Horman A, Woodman P. Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. J Cell Biol. 2002; 157(1): 91-101.

-Bowers K, Piper SC, Edeling MA, Gray SR, Owen DJ, Lehner PJ *et al.* Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally ubiquitinated major histocompatibility complex class I is independent of mammalian ESCRTII. J Biol Chem. 2006; 281(8): 5094-105.

-Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 448-54.

-Brink J, Ludtke SJ, Yang CY, Gu ZW, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99 (1): 138-43.

-Brodin L, Low P, Shupliakov O. Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. Curr Opin Neurobiol. 2000; 10(3): 312-20.

-Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001; 17: 517-68.

-Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. Loss of the cylindromatosis tumor suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. Nature. 2003; 424(6950): 797-801.

- Burger AM, Seth AK. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur J Cancer*. 2004; 40(15): 2217-29.

- Carpenter G, Cohen S. 125I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. *J Cell Biol*. 1976; (1): 159-71.

- Carpenter G. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioassays*. 2000; 22(8): 697-707.

- Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*. 1999; 1(4): 193-9.

- Chirala SS, Jayakumar A, Gu ZW, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98 (6): 3104-8.

- Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K *et al*. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(11): 6358-63.

- Chung CH, Baek SH. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emergin roles. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 266 (3): 633-40.

- Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1695 (1-3): 3-17.

- Citri A, Alroy I, Lavi S, Rubin C, Xu W, Grammatikakis N *et al*. Drug-induced ubiquitylation and degradation of ErbB receptor tyrosine kinases: implications for cancer therapy. *EMBO J*. 2002; 21(10): 2407-17.

-Clegg DJ, Wortman MD, Benoit SC, Mcosker CC, Seeley RJ. Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. *Diabetes*. 2002; 51(11): 3196-201.

-Crowther RA, Finch JT, Pearse BM. On the structure of coated vesicles. *J Mol Biol*. 1976; 103(4): 785-98.

-Cummins JM, Vogelstein B. HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle*. 2004; 3(6): 689-92.

-DeSalle LM, Latres E, Lin D, Graner E, Montagnoli A, Baker RT *et al*. The de-ubiquitinating enzyme Unp interacts with the retinoblastoma protein. *Oncogene*. 2001; 20(39): 5538-42.

-DeSalle LM, Pagano M. Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett*. 2001; 490(3): 179-89.

-De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2003; 63(13): 3799-804.

-Duan L, Miura Y, Dimir M, Majumder B, Dodge IL, Reddi AL *et al*. Cbl-mediated ubiquitinylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis. *J Biol Chem*. 2003; 278(31): 28950-60.

-Dupre S, Volland R, Haguenaer-Tsapis R. Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting. *Curr. Biol*. 2001; 11(22): R932-34.

-Epstein JI, Carmichael M, Partin AW. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. *Urology*. 1995; 45(1): 81-86.

-Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res*. 1997; 17 (6D): 4589-593.

-Gansler TS, Hardman W3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol*. 1997; 28(6): 686-92.

-Gousseva N, Baker RT. Gene structure, alternate splicing, tissue distribution, cellular localization, and developmental expression pattern of mouse deubiquitinating enzyme isoforms Usp2-45 and Usp2-69. *Gene Expr*. 2003; 11(3-4): 163-79.

-Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein J *et al*. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*. 2004; 5(3): 253-61.

-Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*. 1994; 54(18): 4855-78.

-Haas AL, Bright PM. The dynamics of ubiquitin pools within cultured human lung fibroblasts. *J Biol Chem*. 1987; 262(1): 345-51.

-Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol.* 2003; 5(5): 461-66.

-Haigler HT, McKanna JA, Cohen S. Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J Cell Biol.* 1979; (2): 382-95.

-Hannah MJ, Schmidt AA, Huttner WB. Synaptic vesicle biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999; 15: 733-98.

-Hannun YA, Obeid LM. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem.* 2002; 277(29): 25847-850.

-Heemers H, Maes B, Fougère F, Heyns W, Verhoeve G, Swinnen JV. Androgen stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cell lines by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol Endocrinol.* 2001; 15(10): 1817-28.

-Heiligtag SJ, Bredehorst R, David KA. Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002; 9(9): 1017-25.

-Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 425-79.

-Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(3): 195-201.

- Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G *et al.* Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol.* 2003; 30(1): 23-28.

- Johannessen LE, Pedersen NM, Pedersen KW, Madhus IH, Stang E. Activation of the epidermal growth factor (EGF) receptor induces formation of EGF receptor- and Grb2-containing clathrin-coated pits. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(2): 389-401.

- Kato M, Miyazawa K, Kitamura N. A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I) (D/N)RXXKP. *J Biol Chem.* 2000; 275(48): 37481-7.

- Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(12): 893-905.

- Kim JH, Park KC, Chung SS, Bang O, Chung CH. Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *J Biochem.* 2003; 134 (1): 9-18.

- Kirchhausen T. Clathrin. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69: 699-727.

- Kirchhausen T, Harrison SC. Protein organization in clathrin trimers. *Cell.* 1981; 23(3): 755-61.

- Klapper LN, Waterman H, Sela M, Yarden Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res.* 2000; 60(13): 3384-8.

- Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JS. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulation skp2. *J Biol Chem.* 2004; 279(29): 30540-545.

-Komada M, Kitamura N. The Hrs/STAM complex in the downregulation of receptor tyrosine kinases. *J Biochem (Tokyo)*. 2005; 137(1): 1-8.

-Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G. The tumor suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by deubiquitinating action. *Nature*. 2003; 424(6950): 801-5.

-Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE *et al*. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999; 21(4): 325-29.

-Kudo Y, Takata T, Yasui W, Ogawa I, Miyauchi M, Takekoshi T *et al*. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1998; 83(12):2447-55.

-Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*. 2000; 6(3): 202-208.

-Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(7): 3450-4.

-Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Eisher SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res*. 2003; 63(1): 132-139.

-Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology*. 2002; 40(1): 71-79.

- Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, Dugail I. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression. potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem.* 2001; 276(15): 11512-6.

- Lam YA, Xu W, DeMartino GN, Cohen RE. Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidases in the 26S proteasome. *Nature.* 1997; 385(6618): 737-40.

- Laney JD, Hechstrasser M. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell.* 1999; 97(4): 427-30.

- Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J.* 1998; 17(12): 3385-97.

- Lerdrup M, Hommelgaard AM, Grandal M, van Deurs B, Geldanamycin stimulates internalization of ErbB2 in a proteasome-dependent way. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 1): 85-95.

- Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY *et al.* c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* 1998; 12(23): 3663-74.

- Levkowitz G, Oved S, Klapper LN, Harari D, Lavi S, Sela M *et al.* c-Cbl is a suppressor of the neu oncogene. *J Biol Chem.* 2000; 275(45): 35532-9.

- Li JN, Gorospe M, Cherst FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WH *et al.* Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and citotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res.* 2001; 61(4): 1493-99.

-Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J *et al.* Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*. 2002; 416(6881): 648-53.

-Li M, Brooks CL, Kon N, Gu W. A dynamic role of HAUSP in the p-53-Mdm2 pathway. *Mol Cell*. 2004; 13 (6): 879-86.

-Lin H, Keriell A, Morales CR, Bedard N, Zhao Q, Hingamp P *et al.* Divergent N-terminal sequences target an inducible testis deubiquitinating enzyme to distinct subcellular structures. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(17): 6568-78.

-Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.

-Loshi O, Poussu A, Merilainen J, Kellokumpu S, Wasenius VM, Lehto VP. EAST, an epidermal growth factor receptor- and Eps 15-associated protein with Src homology 3 and tyrosine-based activation motif domains. *J Biol Chem*. 1998; 273(33): 21408-15.

-Lupu R, Menendez JA. Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: An alternative to selective estrogen receptor modulators? *Endocrinology*. 2006; 147(9): 4056-66.

-Magnifico A, Tagliabue E, Ardini E, Casalini P, Colnaghi MI, Menard S. Heregulin beta1 induces the down regulation and the ubiquitin-proteasome degradation pathway of p185HER2 oncoprotein. *FEBS Lett*. 1998; 422(2): 129-31.

-Marmor MD, Yarden Y. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene*. 2004; 23(11): 2057-70.

-Matsumoto M, Hatakeyama S, Oyamada K, Oda Y, Nishimura T, Nakayama KI. Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteasome. *Proteomics*. 2005; 5: 4145-51.

-Mayer RJ. The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000; 1(2): 145-8.

-Menendez JA, Vellon L, Mehimi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R *et al*. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(29): 10715-720.

-McCullough J, Clague MJ, Urbé S. AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol*. 2004; 166(4): 487-92.

-McCullough J, Row PE, Lorenzo O, Doherty M, Beynon R, Clague MJ *et al*. Activation of the Endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol*. 2006; 16(2): 160-65.

-Milgram LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1997; 3(11): 2115-120.

-Min BM, Baek JH, Shin KH, Gujuluva CN, Cherrick HM, Park NH. Inactivation of the p53 gene by either mutation or HPV infection is extremely frequent in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994; 30B(5): 338-45.

-Mineo C, Gill GN, Anderson RGW. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol Chem*. 1999; 274(43): 30636-43.

- Mizuno E, Iura T, Mukai A, Yoshimori T, Kitamura N, Komada M. Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Mol Biol Cell*. 2005; 16(11): 5163-74.

- Morgenstern JP, Land H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18(12): 3587-96.

- Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*. 2007; 315(5809): 201-5.

- Myers RB, Oelschlager DK, Weiss HL, Frost AR, Grizzle WE. Fatty acid synthase: an early molecular marker of progression of prostatic adenocarcinoma to androgen independence. *J Urol*. 2001; 165(3): 1027-32.

- Nakamura M, Tanaka N, Kitamura N, Komada M. Clathrin anchors deubiquitinating enzymes, AMSH and AMSH-like protein, on early endosomes. *Genes cells*. 2006; 11(6): 593-606.

- Naviglio S, Matteucci C, Matoskova B, Nagase T, Nomura N, Di Fiore PP *et al*. UBPY: a growth-regulated human ubiquitin isopeptidase. *EMBO J*. 1998; 17(12): 3241-50.

- Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzul T *et al*. Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology*. 2001; 69(6): 297-303.

- Nicholson B, Marblestone JG, Butt TR, Mattern MR. Deubiquitinating enzymes as novel anticancer targets. *Future Oncol*. 2007; 3(2): 191-99.

- Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK *et al.* A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*. 2005a; 123(5): 773-786.
- Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD *et al.* The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*. 2005b; 17(3): 331-9.
- Oishi K, Amagai N, Shirai H, Kadota K, Ohkura N, Ishida N. Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res*. 2005; 12(3): 191-202.
- Okamoto CT, McKinney J, Jeng YY. Clathrin in mitotic spindles. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 279(2): C369-74.
- Orlowski M, Wilk S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 415(1): 1-5.
- Park KC, Kim JH, Choi EJ, Min SW, Rhee S, Baek SH *et al.* Antagonistic regulation of myogenesis by two deubiquitinating enzymes, UBP45 and UBP69. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(15): 9733-8.
- Pickart CM. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25(11): 544-8.
- Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 2001; 70: 503-33.
- Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochem Biophys Acta*. 2004; 1695(1-3): 55-72.

-Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res.* 1996a; 56(6): 1189-93.

-Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson, NE, Kuhajda F. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1996b; 56(12): 2745-47.

-Pizer ES, Lax SF, Kuhajda FP, Pasternack GR, Kurman RJ. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer* 1998a; 83(3): 528-537.

-Pizer ES, Chrest FJ, Digiuseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res.* 1998b; 58(20): 4611-5.

-Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL *et al.* Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res.* 2000; 60(2): 213-8.

-Pizer ES, Pflug BR, Bova GS, Han WF, Udan MS, Nelson JB. Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *Prostate.* 2001; 47(2): 102-10.

-Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimburger DC *et al.* The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol.* 2000; 31(9): p. 1068-73.

-Pley U, Parham P. Clathrin: its role in receptor-mediated vesicular transport and specialized functions in neurons. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1993; 28(5): 431-64.

-Prescott JL, Tindall DJ. Clathrin gene expression is androgen regulated in the prostate. *Endocrinology*. 1998; 139(4): 2111-9.

-Priolo C, Tang D, Brahamandan M, Benassi B, Sicinska E, Ogino S *et al*. The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis. *Cancer Res*. 2006; 66(17): 8625-32.

-Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H. Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J*. 2001; 20(17): 5008-21.

-Raiborg C, Rusten TE, Stenmark H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15(4): 446-55.

-Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006; 1(3): 1458-61.

-Robinson MS. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*. 1994; 6(4): 538-44.

-Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T *et al*. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2003; 1(10): 707-15.

-Royle SJ, Bright NA, Lagnado L. Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature*. 2005; 434(7037): 1152-7.

- Row PE, Prior IA, McCullough J, Clague MJ, Urbe S. The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J Biol Chem*. 2006; 281(18): 12618-24.

- Rubin DM, Finley D. Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr Biol*. 1995; 5(8): 854-8.

- Sachse M, Urbe S, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J. Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell*. 2002; 13(4): 1313-28.

- Shaeffer JR, Cohen RE. Differential effects of ubiquitin aldehyde on ubiquitina and ATP-dependent protein degradation. *Biochemistry*. 1996; 35(33): 10886-93.

- Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA *et al*. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol*. 2004; 40(7): 688-96.

- Silva SD. Análise da expressão de ErbB2, Ki-67, USP2a e ácido graxo sintase (FAS) em carcinomas espinocelulares de boca. Piracicaba, 2007. [Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP].

- Sorkin A. Endocytosis and intracellular sorting of receptor tyrosine kinases. *Frontiers in bioscience*. 1998; 3: d729-38.

- Spataro V, Norbury C, Harris AL. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *Br J Cancer*. 1998; 77(3): 448-55.

-Stevenson LF, Sparks A, Allende-Vega N, Xirodimas DP, Lane DP, Saville MK. The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. *EMBO J.* 2007; 26(4): 976-86.

-Strous GJ, Govers R. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci.* 1999; 112(Pt 10): 1417-23.

-Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res.* 1997a; 57(6): 1086-90.

-Swinnen JV, Ulrix W, Heyns W, Verhoeven G. Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997b; 94(24): 12975-80.

-Swinnen JV, Vanderhoydonc F, Elgamal AA, Eelen M, Vercaeren, I, Joniau S *et al.* Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer.* 2000a; 88(2): 176-79.

-Swinnen JV, Heemers H, Deboel L, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation Of Tumor-Associated Fatty Acid Synthase Expression By Growth Factor Activation Of The Sterol Regulatory Element-Binding Protein Bpathway. *Oncogene.* 2000b; 19(45): 5173-81.

-Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L *et al.* Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer.* 2002; 98(1): 19-22.

-Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F *et al.* Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 302(4): 898-903.

-Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(6): 2204-12.

-Tanaka N, Kaneko K, Asao H, Kasai H, Endo Y, Fujita T *et al.* Possible involvement of a novel STAM-associated molecule "AMSH" in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J Biol Chem.* 1999; 274(27): 19129-35.

-Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285(2): 217-23.

-Ungewickell E, Branton D. Assembly units of clathrin coats. *Nature.* 1981; 289(5796): 420-2.

-Urbé S, Sachse M, Row PE, Preisinger C, Bar FA, Strous G *et al.* The UIM domain of Hrs couples receptor sorting to vesicle formation. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 20): 4169-79.

-Van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002; 62(3): 642-46.

-Visca P, Alo' PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino, F *et al.* Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-relating genes,

proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas and adjacent nonneoplastic mucosa. Clin Cancer Res. 1999; 5(12): 4111-18.

-Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, Botti C, De Carli P, Filippi S *et al.* Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. Anticancer Res. 2003; 23(1A): 335-39.

-Vlad LD, Axatou CA, Merino MJ. Fatty acid synthase is highly expressed in aggressive thyroid tumors. Mod Pathol. 1999; 12: 70.

-Wakil SJ. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. Biochemistry. 1989; 28(11): 4523-30.

-Waltregny D, Leav I, Signoretti S, Soung P, Lin D, Merk F *et al.* Androgen-driven prostate epithelial cell proliferation and differentiation in vivo involve the regulation of p27. Mol Endocrinol. 2001; 15(5): 765-82.

-Wang Y, Kuhajda FP, Li JN, Pizer ES, Han WF, Sokoll LJ *et al.* Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell cultures supernatants and in breast cancer patients. Cancer Lett. 2001; 167(1): 99-104.

-Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. J Biol Chem. 1998; 273(22): 13819-27.

-Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Korber E *et al.* Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. Biol Chem Hoppe Seyler. 1986; 367(9): 905-12.

-Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent process by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* 1997; 11(14): 1245-56.

-Wing SS. Deubiquitinating enzymes – the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35(5): 590-605.

-Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem.* 1999; 274(13): 8865-74.

-Yeh CW, Chen WJ, Chiang CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of fatty acid synthase in MCF-7 breast cancer cells by tea and tea polyphenols: a possible mechanism for their hypolipidemic effects. *Pharmacogenomics J.* 2003; 3(5): 267-76.

-Zhou P, Fernandes N, Dodge IL, Reddi AL, Rao N, Safran H *et al.* ErbB2 degradation mediated by the co-chaperone protein CHIP. *J Biol Chem.* 2003; 278(16): 13829-37.