



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

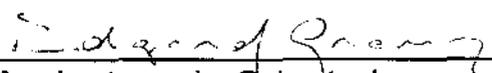


CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluna: Fabiana Seguin
Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Ano de Conclusão do Curso: 2007


Assinatura do Orientador

TCC 323



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Fabiana Seguin

ESTUDO DA EXPRESSÃO DA ISOPEPTIDASE Ubp- 69 (USP2a)
EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE MELANOMA

Monografia apresentada ao Curso de
Odontologia da Faculdade de Odontologia de
Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do
Diploma de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Piracicaba
(2006)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Carlos e Mara, ao Felipe, ao Greison e à Luísa minha filha.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Edgard Graner, pela paciência, dedicação e profissionalismo com que orientou nosso trabalho.

Aos alunos de pós-graduação Juliana, Michelle, Ana Lúcia e Marco Antonio pela colaboração e apoio.

Aos meus queridos amigos Ana Claudia, Ana Paula, Débora C. Bastos, Débora Suzigan e Luís Henrique pelo companherismo e carinho.

Aos meus familiares por todo amor e carinho depositados.

Aos meus pais por tornar tudo possível.

SUMÁRIO

1. Resumo	1
2. Introdução	2
3. Objetivo	4
3.1. Objetivos específicos	4
4. Material e Métodos	4
4.1. Cultura de células	4
4.2. Purificação de RNA e RT-PCR	5
4.3. Preparação dos extratos protéicos das células de melanoma	6
4.4. Separação eletroforética de proteínas e western blotting	7
4.5. Imunofluorescência	8
5. Resultados	9
5.1. Células	9
5.2. Padronização dos “primers”	10
5.3. Análise da expressão de USP2a e USP2b.	11
5.4. Detecção de USP2a através de imunofluorescência	15
5.5. Expressão gênica de FAS nas células de melanoma	16
5.6. Detecção de FAS através de imunofluorescência	20
6. Discussão	20
7. Conclusões	23
8. Bibliografia	23

1. Resumo

Isopeptidases ou enzimas desubiquitinantes são responsáveis pela remoção das moléculas de ubiquitina (Ub) de outras proteínas, protegendo-as desta forma da destruição pelo sistema proteossomo. As isopeptidases Ubp-69 e Ubp-45 foram recentemente clonadas em testículo e próstata de ratos e seus homólogos humanos identificados e denominados, respectivamente, USP2a e USP2b. Em trabalho recente (GRANER *et al.*, 2004) foi demonstrado que a USP2a tem como substrato específico a enzima anabólica ácido graxo sintase (FAS), a qual tem sido relacionada com a patogênese e agressividade de várias neoplasias malignas de origem epitelial. Como não existem informações na literatura sobre a expressão de USP2a e USP2b em melanomas, o objetivo deste trabalho foi estudar através de RT-PCR, Western Blot e Imunofluorescência, a produção destas isopeptidases em linhagens celulares derivadas de melanoma.

2. Introdução

Melanoma é uma neoplasia maligna que se origina dos melanócitos encontrados na camada basal da epiderme e das membranas mucosas. Para o ano de 2006, a previsão da incidência deste tumor no Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foi de 2.710 casos novos em homens e 3.050 casos novos em mulheres. Apesar da incidência ser baixa, a letalidade deste câncer de pele é elevada devido ao seu alto potencial metastático. Em mucosa oral, o melanoma é mais raro, representando aproximadamente 1 a 2% de todos os casos, no entanto, é um tumor mais agressivo e o prognóstico é pior de que o dos melanomas cutâneos (BARABAS *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, vários estudos têm mostrado que altos níveis da enzima FAS ("fatty acid synthase"), responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa (KUHAJDA *et al.*, 2000; PIZER *et al.*, 2000; BARON *et al.*, 2003), são encontrados em diversos tipos de neoplasias malignas, dentre as quais o melanoma (INNOCENZI *et al.*, 2003). Estes autores mostraram que os pacientes portadores desta neoplasia que expressavam grande quantidade de FAS tinham um risco significativamente maior de desenvolver metástases e recorrências do que aqueles portadores de tumores com baixa produção desta enzima. Outro achado que sugere a participação da FAS na patogênese de neoplasias malignas é o fato dos inibidores específicos de sua atividade (cerulenina ou C-75) apresentarem importante efeito anti-tumoral (KUHAJDA *et al.*, 2000; KUHAJDA 2000; PIZER *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001, THUPARI *et al.*, 2001), sendo que a inibição da atividade FAS com cerulenina provoca a inibição da síntese de DNA, e ao mesmo tempo provoca a morte celular por apoptose (PIZER *et al.*, 1998).

Em trabalho recentemente realizado, Graner *et al.* (2004) clonaram uma nova proteína pertencente à classe das enzimas desubiquitinantes (DUBs), chamada USP2a (número de acesso no Genbank: NM_004205), a qual se liga especificamente em FAS, que foi identificada pela primeira vez neste mesmo trabalho como um substrato para os proteossomos. USP2a evita a destruição proteolítica de FAS e prolonga sua meia vida dentro de células humanas derivadas de câncer de próstata, sem alterar a expressão de seus mensageiros. Priolo *et al.*, (2006) demonstraram que células epiteliais de

próstata que super expressavam USP2a eram resistentes à apoptose induzida quimicamente, enquanto que a inativação de USP2a resultava em apoptose dessas células.

As proteínas Ubp-69 e Ubp-45 foram primeiramente identificadas em testículos de rato (LIN *et al.*, 2000) e seus respectivos homólogos humanos USP2a e USP2b (GRANER *et al.*, 2004). Análises do genoma humano em computador mostraram que as seqüências nucleotídicas de USP2a e USP2b são localizadas no braço longo do cromossomo humano 11 (11q23), sendo seus produtos protéicos sintetizados por "splicing" alternativo a partir de um único gene. A porção específica da USP2b (dois exons) localiza-se entre a porção específica da USP2a (dois exons) e os onze exons que compõe o domínio catalítico. As porções amino-terminais específicas destas duas DUBs parecem ser importantes tanto para a determinação da localização intracelular como para a especificidade destas enzimas à diferentes substratos *in vitro* (LIN *et al.*, 2000; 2001). Segundo estes autores, a presença de Ubp-45 no núcleo e de Ubp-69 no citoplasma de espermátides de rato, fato confirmado pela transfecção destas regiões específicas ligadas à "green fluorescent protein" em células COS-7, é determinada pelas extensões amino-terminais. Além do mais, Ubp -45 e -69 clivam tri-Ub ramificada mais rapidamente que di-Ub e a adição da porção específica da Ubp-69 à região catalítica aumentou a capacidade desta última de quebrar tri-Ub ramificada (LIN *et al.*, 2001). Através de experimentos de "real-time PCR", foi também demonstrado, em tecido prostático de rato, que a expressão de Ubp -69 pode ser estimulada por testosterona (GRANER *et al.*, 2004), sendo este o primeiro exemplo da literatura de uma enzima desubiquitinante cuja expressão está sob regulação hormonal. Considerando-se que FAS é importante para a proliferação de células neoplásicas, USP2a pode ser importante no controle do crescimento tumoral e um alvo em potencial terapêutico.

Neste trabalho descrevemos a expressão de USP2a, através de reações de RT-PCR, de western blotting e de imunofluorescência em linhagens celulares derivadas de melanomas humanos e murino (A2058, SKMe1 e B16F10).

3. Objetivo

Estudar a expressão de USP2a em linhagens celulares de melanoma humano e murino.

3.1. Objetivos específicos

3.1.1. Estudar, através de RT-PCR, a expressão de USP2a nas linhagens celulares B16F10, SkMel e A2058;

3.1.2. Analisar, através de ensaios de Western blotting e reações de imunofluorescência a produção da proteína USP2a nessas mesmas linhagens.

4. Material e Métodos

4.1. Cultura de células

As linhagens celulares de melanomas humanos, SkMel e A2058 (ATCC), e de camundongo, B16F10, foram gentilmente cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (S.P.) e estão estocadas no banco de células do laboratório de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP. Estas linhagens foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75 cm² (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura RPMI (B16F10 e SKMel) e DMEM (A2058) (Invitrogen, E.U.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/ml de gamicina (sulfato de gentamicina 120 mg - Schering-Plough, Brasil) e 100 µg/ml de kanamicina (kanamycin sulfate, Gibco, E.U.A.) a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. As células foram subcultivadas até atingirem uma confluência de aproximadamente 60-70%, quando foram tratadas com tripsina por um período de 2 minutos, ficando separadas do assoalho do frasco de cultura (o que era determinado por observação em microscópio de contraste de fase). A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 5 ml (frasco de 25 cm²) ou 10 ml (frasco de 75 cm²) de meio de cultura DMEM (Invitrogen) com 10% de FBS. A suspensão de células era transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml estéreis (Corning, E.U.A.) e estes centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante era removido e descartado e o "pellet" de células ressuspenso em 5 ml de meio de cultura DMEM ou RPMI com 10% de FBS, sendo as células re-plaqueadas em novos frascos de 25 cm² ou 75 cm² (1x 10³

células em 5 ml de meio para frascos de 25 cm² e 1x10⁵ células em 10 ml de meio para frascos de 75 cm²). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, dependendo do metabolismo celular.

Visando manter o estoque congelado em nitrogênio líquido e trabalhar sempre com as células em passagens semelhantes, congelamos várias amostras de cada linhagem celular antes da realização dos experimentos. Para isto, as células foram suspensas em solução 1/1 de RPMI ou DMEM contendo 20% de di-metil sulfoxido (DMSO, Sigma, E.U.A.) e RPMI ou DMEM com 50% de FBS e congeladas em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os criotubos (Nunc) foram colocados em banho de água a 37°C, as células transferidas para tubos de 15 ml contendo 10 ml de RPMI ou DMEM e centrifugadas. Os "pellets" também foram então ressuspensos em 5 ml de meio de cultura e as células plaqueadas (1x 10³ células em frascos de 25 cm² e 1x10⁵ células em frascos de 75 cm²) para realização dos experimentos. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as linhagens subcultivadas no máximo por quinze passagens e então descartadas.

4.2. Purificação de RNA e RT-PCR

RNA total foi extraído de "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, 2µg de RNA total foram reversamente transcritos em uma reação com volume final de 21 µl, contendo 0,5 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de RNase, 50 U da enzima Superscrit II RT (Invitrogen), 0,5 µg de "primers" oligo-dT (Invitrogen) e tampão 1 X (contendo 1,5 mM 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 a amplificação específica dos cDNAs através de PCR, "primers" específicos para amplificar cada RNA mensageiro estudado foram delineados usando o programa "Amplify 1.2" (Universidade de Wiscosin, Madison, E.U.A.). "Primers" para amplificar

GAPDH e β -actina foram usados para a normalização dos resultados. As sequência dos "primers" específicos para FAS humana (sense: AACTCCTTGGCGGAAGAGA; anti-sense: TAGGACCCCGTGGAATGTCA), FAS de camundongo (sense: ATGATGCAGGGCCATCCTGA; anti-sense: TCACGTGCAGTTTAATTGTG), USP2a (sense: GCCGCTACACACTGTGGGA; antisense: AGCATCCTGCTGATTATAGC), USP2b (sense: AAGGAGCTGCGGCCGCGCTC; antisense: AGCATCCTGCTGATTATAGC), GAPDH (sense: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC; anti-sense: GAAGATGGTGAATGGGATTTTC) e β -actina (sense: CATCCTCACCTGAAGTACC; antisense: GGTGAGGATCTTCATGAGGT) foram provenientes do "GenBank" (NCBI - "National Center for Biotechnology Information" - NIH, E.U.A.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os transcritos para USP2a, USP2b, FAS, GAPDH e β -actina foram amplificados em reações de 50 μ l contendo 2 μ l de cada cDNA, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 0,2 mM de cada "primer". As condições do PCR foram: 95 °C por 5 minutos, 45 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 4 minutos. Dezesesseis microlitros de cada produto de PCR foram separados em géis de agarose a 1,8% e corados com brometo de etídeo. As bandas correspondentes aos produtos amplificados foram analisadas por densitometria, sendo os resultados normalizados pela divisão dos valores obtidos para os genes de referência (β -actina e GAPDH).

4.3. Preparação dos extratos protéicos das células de melanoma

Os "pellets" de células utilizados para a extração protéica foram obtidos por raspagem dos frascos de cultura com um "scraper" (Disposable Cell Scraper, Costar, E.U.A.) quando as células estavam aproximadamente 70% confluentes. As proteínas foram extraídas em um tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton-X100, 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 proteinases PMSF (1mM), aprotinina (1ug/ml), leupeptina (1ug/ml) e inibidor de tripsina ("soybean trypsin inhibitor") (10ug/ml) foram adicionados ao tampão de lise

imediatamente antes do uso. De acordo com cada experimento, um volume entre 100 a 150ul deste tampão foi colocado nos tubos contendo os "pellets" celulares, os quais foram mantidos no gelo por 30 minutos e agitados em vórtex a cada 10 minutos. Depois deste período foi realizada uma centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados, sendo uma alíquota de 2,5 µl separada para quantificação protéica. Todas as alíquotas dos extratos protéicos foram imediatamente congeladas em gelo seco e transferidas para o freezer -80°C, no qual foram mantidas 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) e um espectrofotômetro (Spectronic Genesys 2) ajustado para 595 nm.

4.4. Separação eletroforética de proteínas e western blotting

Quantidades iguais 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 eletroforéticamente em géis de poliacrilamida-SDS a 6% em tampão de corrida (2,5 mM de Tris-HCl pH 8,0, 19 mM de glicina e 0,3 mM de SDS). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher & Scuell, E.U.A.) em tampão contendo 1,2 mM de Tris-HCl pH 8,0, 9,6 mM de glicina e 20% metanol por um período que variou de três horas e meia a quatro horas. Logo após, todas as membranas foram coradas com o corante "Ponceau S" (Sigma) para verificar a eficácia da transferência. As membranas foram então bloqueadas por 16 horas a 4° C em uma solução contendo 5% leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 7,6, 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20 (TBST). Posteriormente as membranas foram incubadas por 2h a temperatura ambiente com os anticorpos primários diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado nas seguintes diluições: anti-FAS (Transduction Laboratories, E.U.A.) (1:5.000), anti-USP2a, gentilmente cedido pelo Dr. Massimo Loda, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, U.S.A.) (1:400)

e anti- β -actina (clone AC-15, Sigma) (1:40.000). Foram então realizadas quatro lavagens de 15 minutos cada 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 e β -actina e anti-IgG de coelho para as reações contra USP2a), por 1h a temperatura ambiente, sendo então realizadas quatro lavagens de 15 minutos cada com TBST. As reações foram reveladas através de quimioluminescência, utilizando o kit de detecção ECL - Western Blotting Analysis System (Amershan Pharmacia Biotech, E.U.A.) e expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co., E.U.A.). Os resultados foram quantificados por análise densitométrica, realizada com o auxílio de um densitômetro modelo GS-700 (Bio Rad, E.U.A.) e do programa Molecular Analyst (Bio Rad).

4.5. Imunofluorescência

Foram realizadas reações de imunofluorescência com os anticorpos anti-FAS (Transduction Laboratories, E.U.A.) e anti-USP2a (N-term, Abgent, E.U.A.). Para isto, lâminas para cultura celular com oito poços (Lab Tek Nunc, Naperville, IL), receberam 2×10^4 células da linhagem B16F10 suspensas em 0,3ml de RPMI com 10% de soro fetal bovino em cada poço. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram fixadas em paraformaldeído a 3,7% contendo 1.2 M de sacarose, a temperatura ambiente, por 15 minutos. As lâminas fixadas foram então lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos primários por 1 hora a temperatura ambiente. Para cada anticorpo foram utilizadas as seguintes diluições: anti-FAS (1:250 e 1:500) e anti-USP2a (1:50 e 1:100). Em seqüência as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Strept ABC Complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, Dako) por 1 hora a temperatura ambiente, diluídos a 1:500. Depois de novamente lavadas com PBS, as lâminas foram montadas em Vectashield (Vector Laboratories, E.U.A.), observadas e fotografadas num microscópio Leica DMLD.

5. Resultados

5.1. Células

Neste trabalho foram realizados experimentos com as linhagens celulares B16F10, SkMel e A2058 (Figura 1) que apresentam características bastante diferentes em cultura. As linhagens B16F10 e SKMel se mostraram semelhantes no aspecto morfológico, ambas com células fusiformes e núcleos evidentes, além de crescimento formando redes. A linhagem B16F10 apresentou um padrão de crescimento muito mais rápido que as outras duas. Uma outra particularidade observada na linhagem B16F10 foi a coloração dos “pellets”, que são escurecidos devido à grande quantidade de melanina.

A linhagem A2058 é composta por células também fusiformes, com núcleos grandes e evidentes, porém com citoplasma escasso e crescimento não reticular. O crescimento destas células foi bem mais lento em comparação com as outras linhagens estudadas.

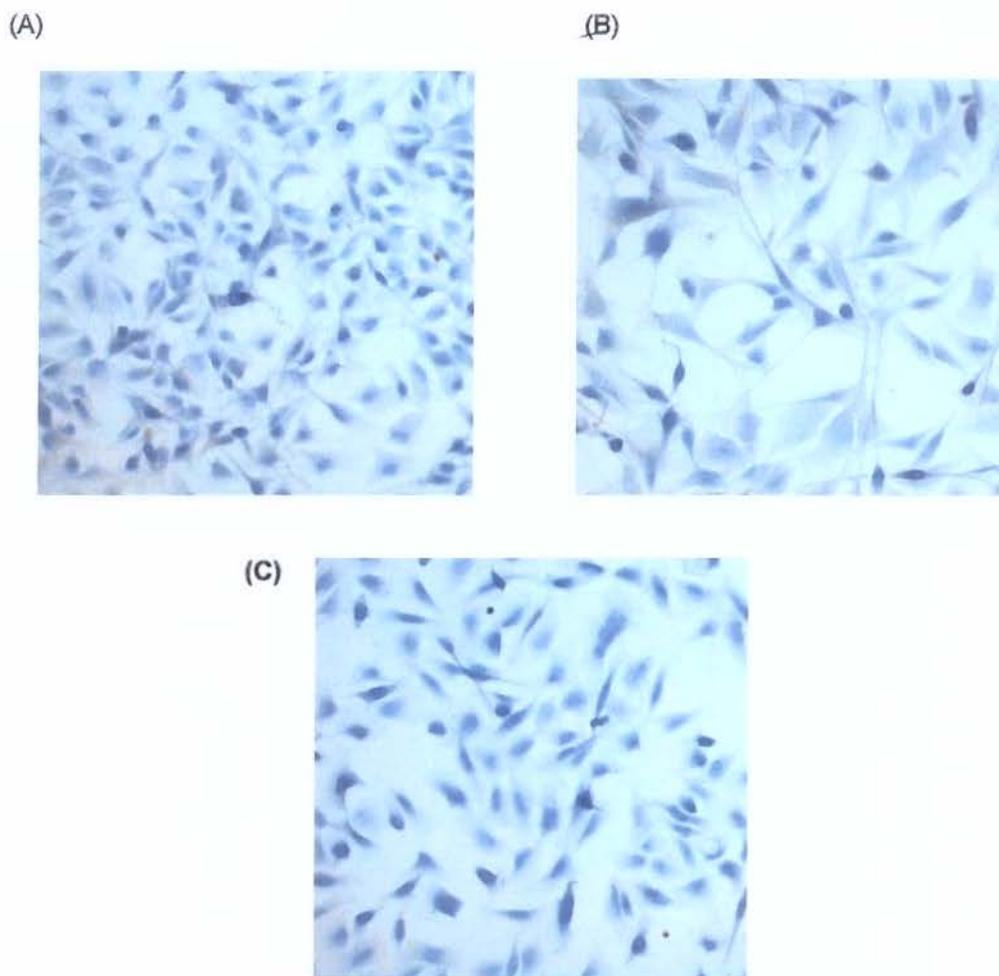


Figura 1 – Aspecto morfológico das linhagens celulares B16F19 (A), SKMel (B) e A2058 (C). Aumento original: 200x, coloração com hematoxilina de Carazzi.

5.2. Padronização dos “primers”

Para se determinar o número de ciclos da reação de PCR ideal para cada par de “primers” utilizado no presente trabalho, várias reações de RT-PCR idênticas (utilizando 1ug de RNA total extraído de células em culturas com 70% de confluência) foram preparadas e paralisadas em intervalos de 5 ciclos. Este procedimento garante que as reações sejam analisadas somente na fase exponencial, evitando as irregularidades dos ciclos finais que caracterizam a fase de platô. Após eletroforese, como pode ser observado na Figura 2, foram determinados os seguintes número de ciclos: USP2a e USP2b – 37 ciclos; β -actina – 30 ciclos; GAPDH – 23 ciclos; FAS humana – 33ciclos; FAS camundongo – 27 ciclos .

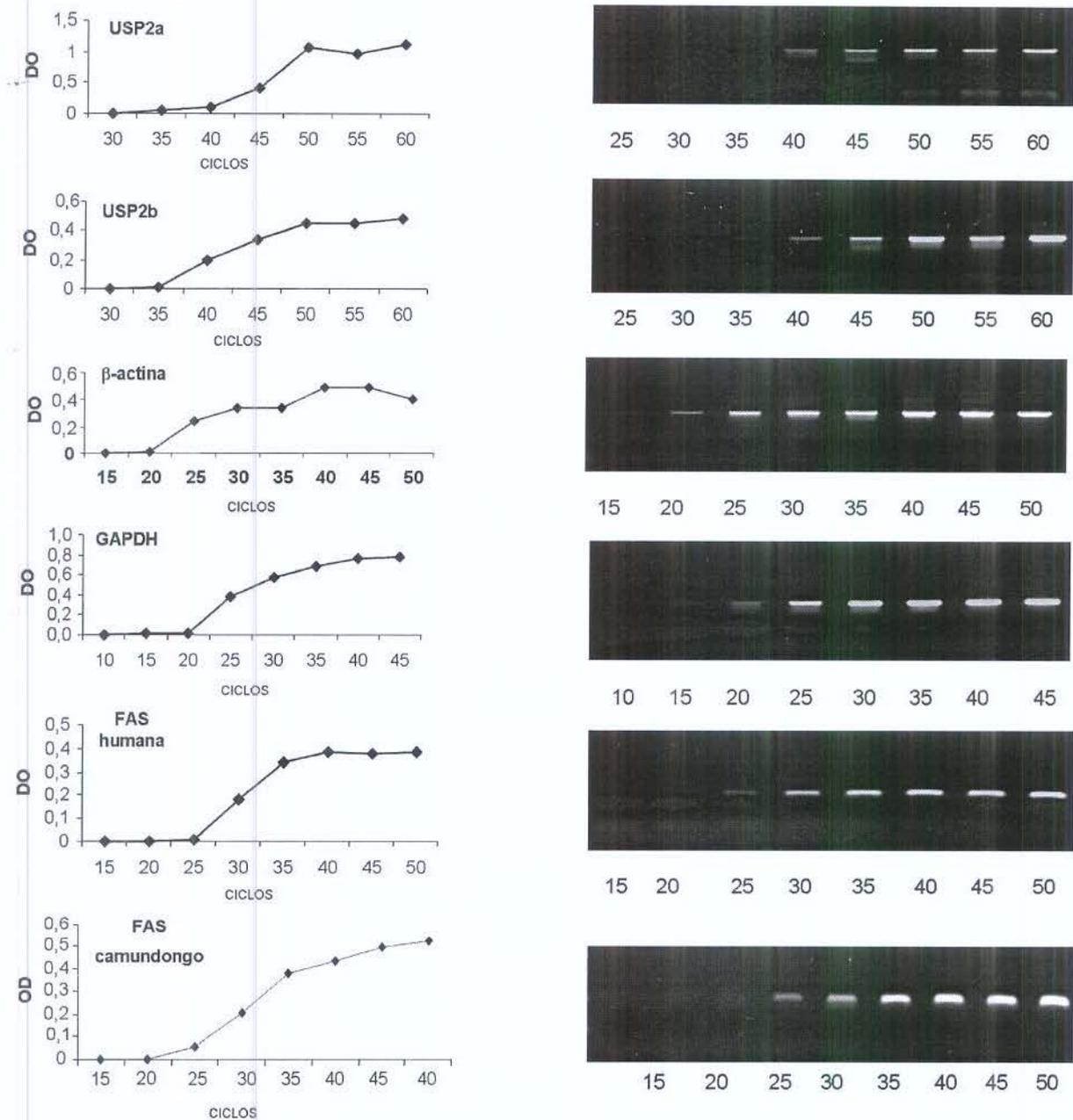


Figura 2 - Reações de RT-PCR com "primers" para USP2a, USP2b, β -actina, GAPDH, FAS humana e FAS de camundongo. Os gráficos (à esquerda) mostram os resultados da análise densitométrica das bandas obtidas nos géis de agarose corados com brometo de etídeo (à direita).

5.3. Análise da expressão de USP2a e USP2b

A expressão de USP2a pelas linhagens celulares B16F10, SkMel e A2058 foi a seguir estudada em experimentos de RT-PCR semi-quantitativo, western-blotting e reações de imunofluorescência. A Figura 4A mostra géis

desnaturantes de formaldeído-agarose a 1,2% corados com brometo de etídeo, nos quais foram aplicadas amostras de duas extrações independentes de RNA total das células de melanoma (1ug de RNA), demonstrando a integridade das respectivas amostras. Nas Figuras 3 e 4B observamos géis de agarose a 1,8% corados com brometo de etídeo, nos quais 16 microlitros de cada produto de RT-PCR foram aplicados (reações paralisadas nos ciclos indicados pelos experimentos da Figura 2). Nestes dois experimentos independentes, constatou-se que a linhagem B16F10 foi a que apresentou a maior expressão de RNAs mensageiros para USP2a. Quantidades menores destes mensageiros foram detectadas nas linhagens SkMel e A2058. Já para USP2b, as linhagens apresentaram quantidades semelhantes de RNAs mensageiros. Estes achados foram confirmados por outros dois experimentos semelhantes.



Figura 3- Gel de agarose a 1,8% onde foram aplicados 16ul de produtos de RT-PCR realizado com 1ug das amostras de cada RNA. Observa-se que a linhagem que apresentou a maior quantidade de RNAs mensageiros para USP2a foi a B16F10, sendo observada menor quantidade na A2058. Em relação à expressão de USP2b, foram encontradas quantidades semelhantes de RNAs mensageiros para as linhagens B16F10, SkMel e A2058. Não houve variação na intensidade das bandas do gene referência GAPDH, os quais foram analisados somente para as linhagens humanas SkMel e A2058.

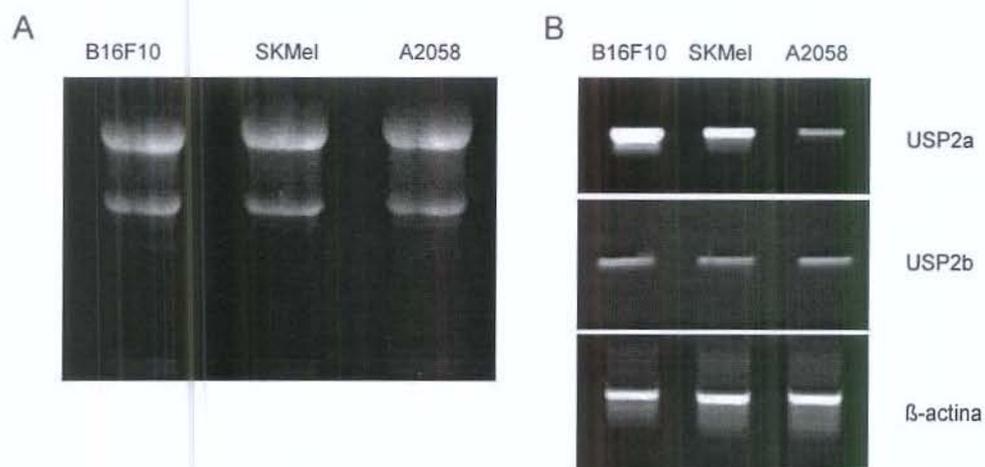


Figura 4 - A – Gel de formaldeído-agarose a 1,2% onde foram aplicados 1 μ g de RNA de cada amostra, mostrando a integridade das mesmas. B – Gel a 1,8% agarose onde foram aplicados 16 μ l de produtos de RT-PCR realizado com 1 μ g das amostras de RNA demonstradas em (A). Observa-se que a linhagem que apresentou a maior quantidade de RNAs mensageiros para USP2a foi a B16F10, sendo observada menor quantidade na A2058. Em relação à expressão de USP2b, foram encontradas quantidades semelhantes de RNAs mensageiros para as linhagens B16F10, SkMel e A2058. Não houve variação na intensidade das bandas do gene referência β -actina.

Para verificar a quantidade das proteínas USP2a nos extratos protéicos de células de melanoma, cinquenta e trinta microgramas de cada extrato foram separados eletroforéticamente em géis de poliacrilamida-SDS a 8% e transferidos para membranas de nitrocelulose. As Figuras 5A e 6A mostram que todas as linhagens celulares produzem a proteína USP2a, sendo as bandas mais intensas nas linhagens SkMel e A2058. No painel inferior da figura 6A observamos que a quantidade de proteínas em cada canaleta do gel foi equivalente, através da reação com anticorpos contra a proteína de citoesqueleto β -actina. Nas Figuras 5B e 6B podemos observar a análise densitométrica das bandas correspondentes à USP2a.

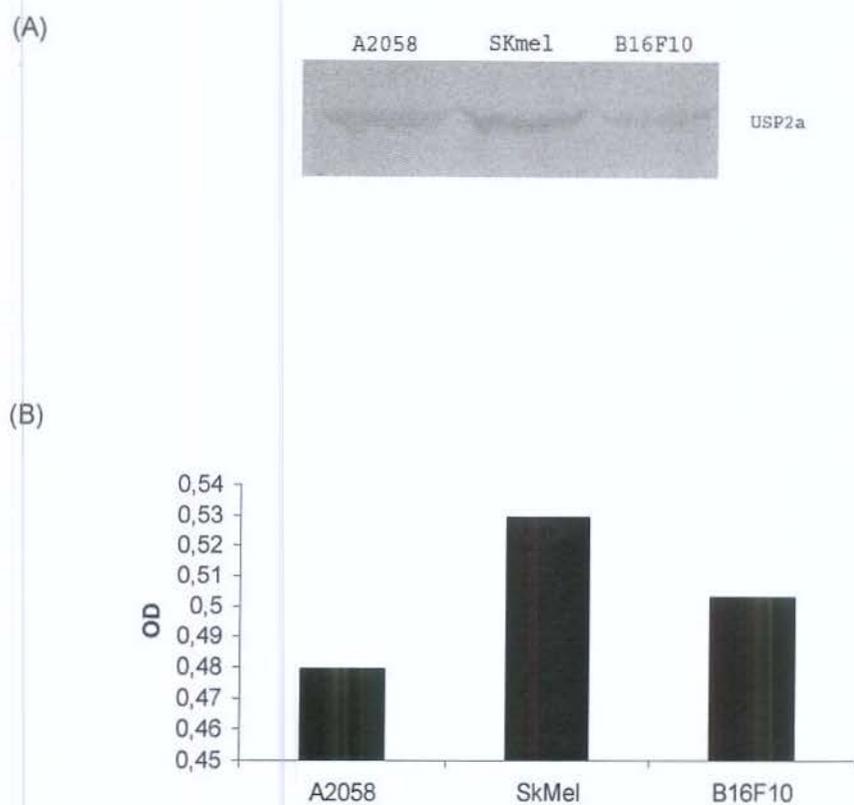


Figura 5- Western blotting com anticorpos anti-USP2a em extratos protéicos de linhagens celulares derivadas de melanoma. Aproximadamente 50 ug de proteína foram aplicados em cada canaleta do gel. Quantidades semelhantes de USP2a foram detectadas em todas as linhagens (a linhagem SKMe1 demonstrou expressão discretamente maior, seguida da A2058). (B) Análise densitométrica das bandas USP2a, mostradas em (A).

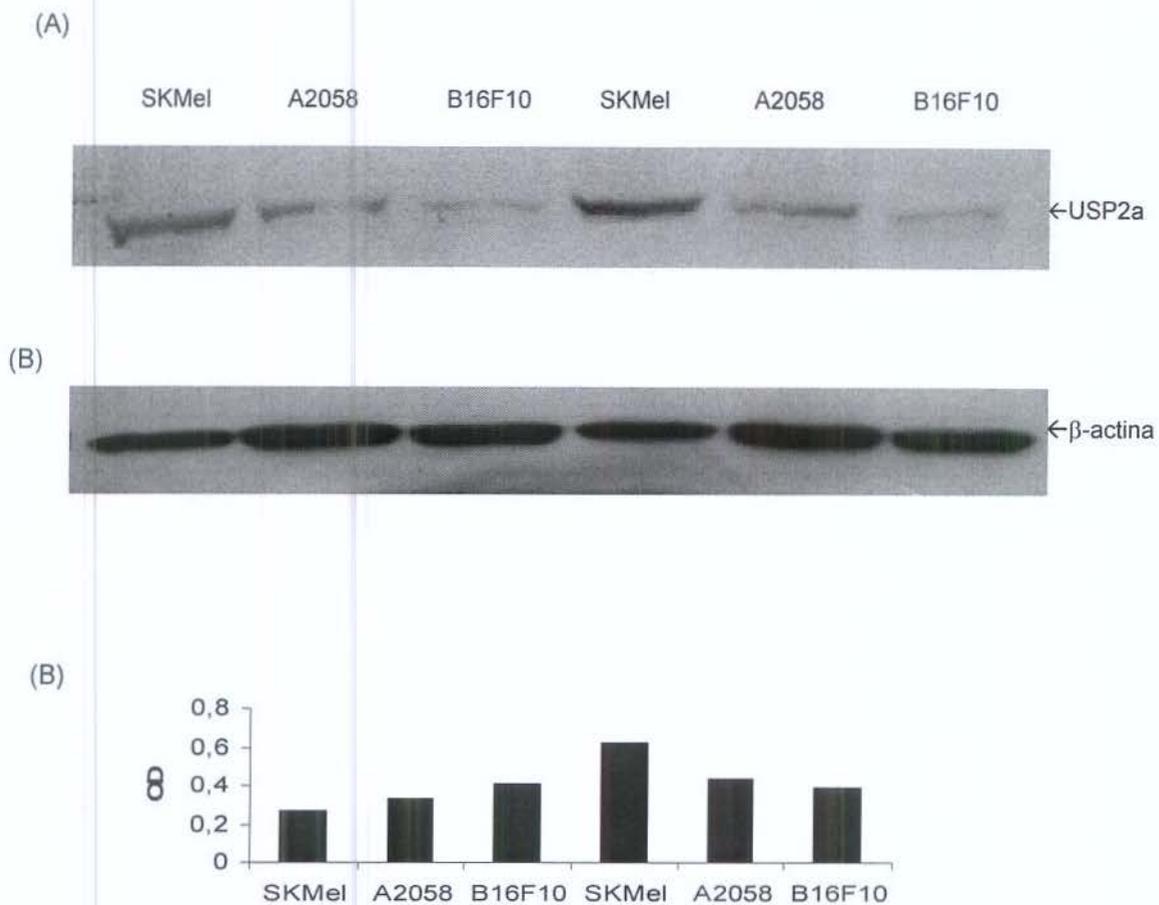


Figura 6- (A) Western blotting utilizando proteínas extraídas das células derivadas de melanoma e anticorpos anti-USP2a (N-terminal, Abgent, E.U.A.) ou anti-β-actina. Aproximadamente 30 ug de proteína foram aplicados em cada canaleta do gel. A proteína USP2a foi detectada em todas as linhagens, sendo as bandas mais intensas nas células SkMel. O painel inferior mostra quantidades semelhantes de β-actina em cada canaleta, comprovando a qualidade da eletroforese e da transferência. Em (B), observa-se a representação gráfica da produção da enzima USP2a pelas linhagens celulares B16F10, SKMel e A2058, feita a partir da análise densitométrica das bandas do experimento mostrado em A.

5.4. Detecção de USP2a através de imunofluorescência

Para estudar a localização intracelular de USP2a, foram realizadas reações de imunofluorescência com anticorpos anti-USP2a (1:100, N-term, Abgent, E.U.A.) na linhagem B16F10, as quais marcaram positivamente quase todo citoplasma (Figura 7A). Uma discreta positividade nuclear para USP2a também pôde ser observada nestas células (Figura 7A).

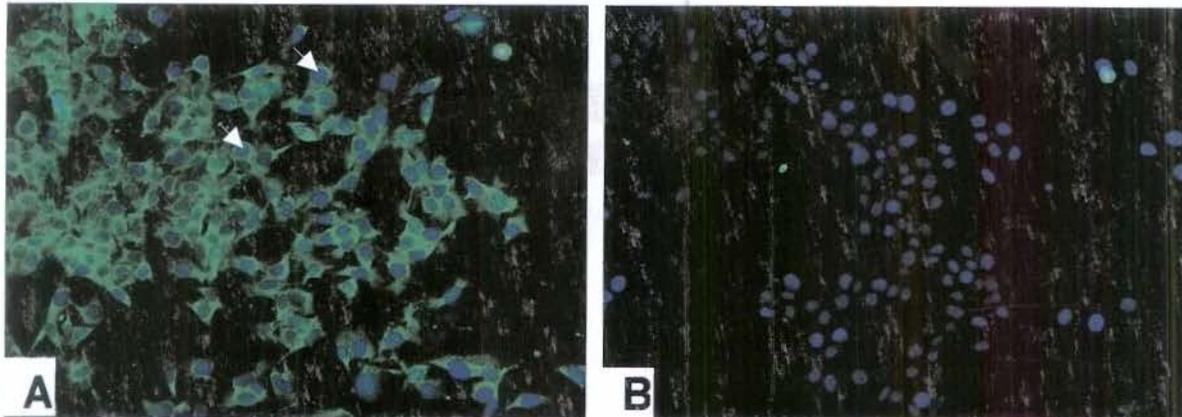


Figura 7- Reação de imunofluorescência para enzima USP2a na linhagem celular B16F10. Em (A) observa-se marcação citoplasmática intensa, sendo algumas células aparentemente positivas também no núcleo (setas). Em (B) está o controle negativo da reação, onde apenas o núcleo é marcado em azul pelo corante DAPI (Aumento original 400x).

5.5. Expressão gênica de FAS nas células de melanoma

A expressão gênica de FAS foi também avaliada através de experimentos de RT-PCR semi-quantitativo, western-blotting e imunofluorescência. Após extração de RNA total das células de melanoma a partir de duas amostras independentes para cada linhagem, estes foram reversamente transcritos (1ug) e utilizados em reações de PCR com “primers” para FAS. A Figura 8 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 a linhagem B16F10 foi a que apresentou as maiores quantidades de RNAs mensageiros para a enzima FAS, sendo detectadas quantidades menores, porém semelhantes nas linhagens SKMel e A2058.

B16F10 SKMel A2058

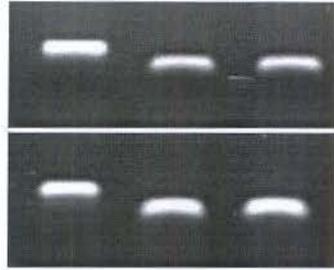


Figura 8- Reação de RT-PCR para verificar a expressão de RNAs mensageiros para FAS nas linhagens B16F10, SkMel e A2058 em duas amostras independentes para cada linhagem. Dezesesseis microlitros de cada produto de PCR foram separados eletroforéticamente em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídeo. Observa-se maior expressão de FAS na linhagem B16F10, em comparação com as linhagens SkMel e A2058.

As Figuras 9 e 10 mostram experimentos de western blotting para a detecção da proteína FAS nas células derivadas de melanoma. Neste ensaio, aproximadamente cinquenta microgramas de proteína total de cada amostra foram separados em géis de poliacrilamida-SDS a 6% (as amostras A2058/a, SkMel/a e B16F10/a foram extraídas em momento diferente das A2058/b, SkMel/b e B16F10/b), transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com anticorpos primários específicos contra FAS. Maiores quantidades da enzima FAS foram detectadas na linhagem A2058. Anticorpos anti- β -actina foram utilizados para comprovar a presença de quantidades semelhantes de proteína em cada canaleta.

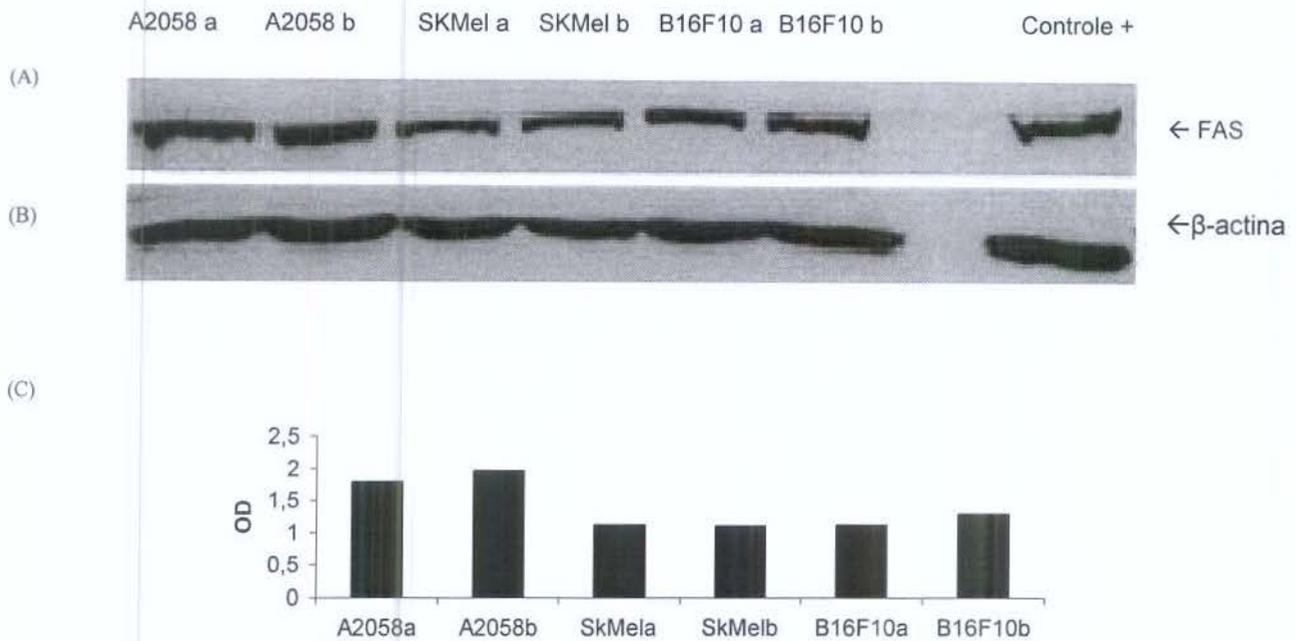


Figura 9 – Reações de western blotting para detecção de FAS e β -actina nas linhagens B16F10, SKMel e A2058. (A) As bandas de FAS foram mais intensas na linhagem A2058. (B) Anticorpos contra β -actina foram utilizados para comprovar a presença de quantidades semelhantes de proteína total em cada canaleta. (C) Análise densitométrica das bandas de FAS mostradas em A.

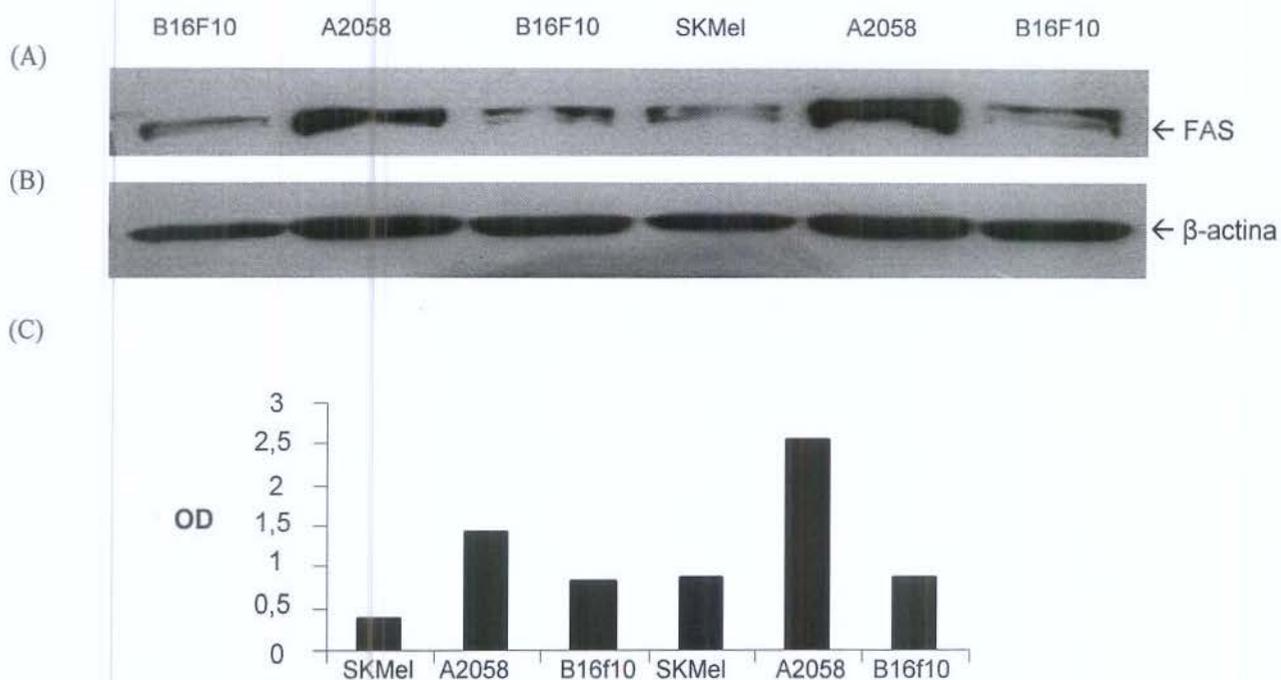


Figura 10 – Reações de western blotting para detecção de FAS (A) e β -actina (B) nas linhagens B16F10, SKMel e A2058. Maior quantidade da enzima FAS foi detectada na linhagem A2058. Anticorpos anti- β -actina foram utilizados para comprovar a presença de quantidades semelhantes de proteína total em cada canaleta. (C) Representação gráfica da produção da enzima FAS pelas linhagens celulares B16F10, SKMel e A2058, feita a partir da análise densitométrica das bandas do experimento mostrado em A.

5.6. Detecção de FAS através de imunofluorescência

Reações de imunofluorescência também foram realizadas para verificar a distribuição de FAS na linhagem celular derivada de melanoma B16F10, com anticorpos anti-FAS diluídos a 1:250. Houve intensa marcação citoplasmática na maioria das células, sendo os núcleos completamente negativos (Figura 11).

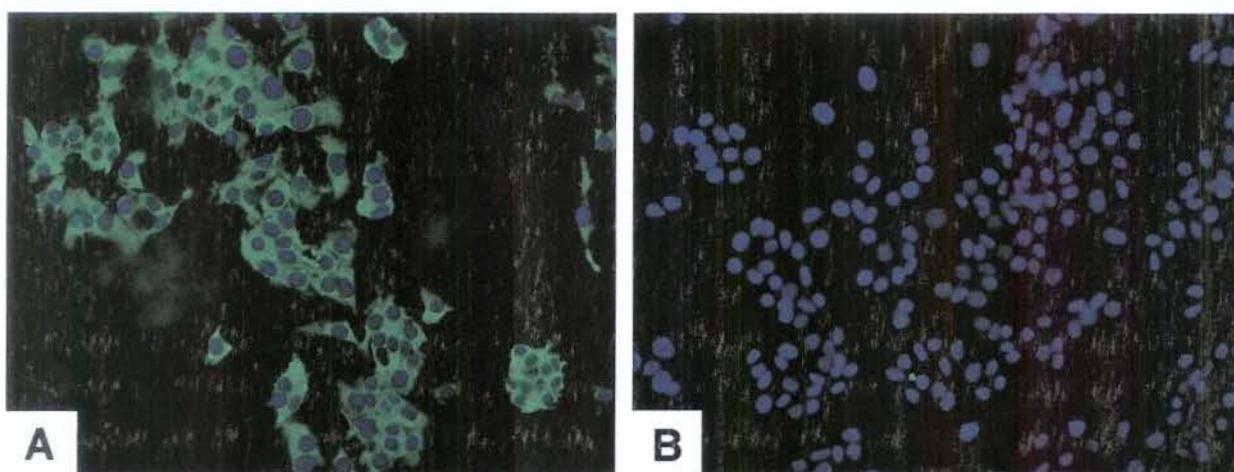


Figura 11- (A) Reação de imunofluorescência para enzima FAS na linhagem celular B16F10, mostrando células intensamente positivas com marcação exclusivamente citoplasmática. Em (B) observa-se o controle negativo da reação, onde apenas o núcleo é marcado em azul (DAPI). Aumento original 400x.

6. Discussão

Ubiquitina (Ub) é uma proteína formada por 76 amino ácidos que atua como uma etiqueta multifuncional para uma grande variedade de proteínas celulares. Quando marcadas pelas moléculas de Ub, as proteínas serão degradadas pelo sistema ubiquitina (Ub)-proteossomo. A velocidade de degradação protéica pelo sistema Ub-proteossomo é controlada por enzimas capazes de remover cadeias de poli-Ub de outras proteínas, denominadas enzimas desubiquitinantes (DUBs) ou isopeptidases, o que leva a um aumento da meia-vida de seus substratos. A ubiquitinação de proteínas é um processo

reversível e a retirada de moléculas de Ub desempenha um papel importante na regulação da atividade proteossômica (Wilkinson, 1997; Chung & Baek 1999). Há evidências de que as DUBs ou isopeptidases também funcionem de maneira pré-proteossômica, protegendo seus substratos da degradação e controlando desta forma sua disponibilidade para a célula (Desalle *et al.*, 2001). Kim *et al.* (2003), em um extenso trabalho de revisão, descreveram o papel de enzimas desubiquitinantes como reguladores celulares, participando de vários processos biológicos importantes como o crescimento e diferenciação celular, desenvolvimento, oncogênese, doenças neurológicas, estrutura cromossômica e regulação transcricional. Graner *et al.* (2004) demonstraram que a enzima desubiquitinante USP2a regula e estabiliza FAS em células de câncer de próstata, funcionando em nível pré-proteossomal prevenindo a degradação de FAS. A super-expressão de FAS é descrita em um grande número de tumores malignos, incluindo o melanoma, no qual a sua expressão foi apontada como um marcador para o prognóstico deste tumor (Innocenzi *et al.*, 2003). De acordo com Baron *et al.* (2003), tumores que expressam grandes quantidades de FAS apresentam um comportamento biológico mais agressivo, em comparação com aqueles que apresentam níveis normais, pois a atividade desta enzima proporciona uma vantagem seletiva 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.*, 1998; 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.*, 1996; 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 alto potencial teratogênico (Chirala *et al.*, 2003). Graner *et al.* (2004) sugerem que USP2a pode ser um melhor alvo terapêutico que a própria FAS, caso FAS seja o único ou o principal substrato para esta enzima desubiquitinante.

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens celulares derivadas de melanoma B16F10, SkMel e A2058 para investigar a expressão da enzima

desubiquitinante USP2a, uma vez que em trabalho recente (Innocenzi *et al.*, 2003), foi demonstrado que a enzima FAS é altamente expressa em melanomas. Através de experimentos de RT-PCR (realizados na primeira etapa desse trabalho), western blotting e imunofluorescência pôde-se observar que USP2a é expressa nas três linhagens. A linhagem que apresentou a maior quantidade de RNAs mensageiros para USP2a foi a B16F10, ao passo que a proteína USP2a foi encontrada em quantidade semelhante nas três linhagens (discretamente maior nas células SkMel). Quanto à expressão de USP2b, foram observadas quantidades muito semelhantes de RNAs mensageiros nas três linhagens. Esta é a primeira demonstração experimental de que as células de melanoma expressam a proteína USP2a. Gousseva & Baker (2003) relataram uma alta expressão da proteína Usp2a em células epiteliais, testículos e músculos esquelético e cardíaco de camundongos.

A partir dos resultados obtidos em nossos experimentos, é possível concluir que não existe uma relação direta entre a quantidade dos RNAs mensageiros e da proteína USP2a nas células derivadas de melanoma. Gousseva & Baker (2003) realizaram estudo da expressão de Usp2-45 (USP2b em humanos) e Usp2-69 (USP2a em humanos) em diferentes tecidos de camundongo, sendo evidente também uma discrepância entre o nível de RNAs mensageiros de Usp2-69 e da proteína correspondente. Foi detectada a presença desta proteína na maioria dos tecidos estudados, enquanto que os RNAs mensageiros estavam presentes em grandes quantidades apenas no testículo e músculos esquelético e cardíaco.

Através de experimentos de western blotting, avaliamos a expressão de FAS, substrato de USP2a, nas células de melanoma. Observamos que dentre todas as linhagens, a A2058 foi a que apresentou a maior quantidade da proteína FAS. Na primeira etapa desse trabalho foi observado, através de experimentos de RT-PCR, que a expressão de RNAs mensageiros para FAS, assim como USP2a, foi maior na B16F10, do que nas duas outras linhagens estudadas. De acordo com Menendez *et al.* (2005), a super-expressão de FAS nas células tumorais promove o aumento do metabolismo de ácidos graxos e da síntese de membranas celulares das células em proliferação, em resposta a

fatores de crescimento como EGF e heregulina ou a receptores de fatores de crescimento constitutivamente ativados (c-erb-B2 e EGFR).

Em resumo, os resultados obtidos até o momento mostraram que as células derivadas de melanoma produzem RNAs mensageiros para USP2a e USP2b e que não há uma correlação direta entre estes e a presença dos respectivos produtos protéicos. Há mais mensageiros para USP2a nas células B16F10 e quantidade semelhante de mensageiros para USP2b nas três linhagens estudadas. FAS, a molécula alvo de USP2a, é também produzida pelas células de melanoma, nas quais os mensageiros foram encontrados em maior quantidade na linhagem B16F10 e a proteína na linhagem celular A2058.

7. Conclusões

- 7.1. USP2a é expressa em células derivadas de melanoma;
- 7.2. As células B16F10, derivadas de melanoma murino, expressam mais RNAs mensageiros para USP2a de que as células A2058 e SkMel;
- 7.3. A expressão da proteína USP2a foi maior na linhagem SkMel do que nas células A2058 e B16F10;
- 7.4. Não há correlação entre a expressão de RNAs mensageiros para USP2a e da proteína USP2a nas células B16F10;
- 7.5. A expressão de RNAs mensageiros para USP2b foi semelhante nas três linhagens estudadas.

8. Bibliografia

- Barabas, J.; Suba, Z.; Szabo, G.; Ujpal, M. Malignant melanoma metastasis in the oral cavity *Fogorv Sz.* v. 99 p.149-52, 2006 .
- Baron, A.; Migita, T.; Tang, D.; Loda, M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*, v. 91, n.1, p.47-53, 2004.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 448-454, 1976.

-Chirala, S. S.; Chang, H.; Matzuk, M.; Abu-Elheiga, L.; Mao, J.; Mahon, K.; Finegold, M.; Wakil, S. 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*, v. 100, n. 11, p. 6358-6363, 2003.

-Clegg, D.J.; Wortman, M. D.; Benoit, S. C.; Mcosker, C. C.; Seeley, R. J. Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. *Diabetes*, v.51, p. 3196-3201, 2002.

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

-Desalle, L. M.; Latres, E.; Lin, D.; Graner, E.; Montagnoli, A.; Baker, R. T.; Pagano, M.; Loda, M. The deubiquitinating enzyme Unp interacts with the retinoblastoma protein. *Oncogene*, v. 20, p. 5538-542, 2001.

-Glickman, M. H.; Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.*, v. 82, p.373-428, 2002.

-Gousseva, N.; Baker, R. T. Gene structure, alternate splicing, tissue distribution, cellular localization, and developmental expression pattern of mouse deubiquitinating enzyme isoforms Usp2-45 and Usp2-69. *Gene expression*, v.11, p. 163-179, 2003.

-Graner, E.; Tsang, D.; Rossi, S.; Baron, A.; Migita, T.; Weinstein, J.; Lechpammer, M.; Huesken, D.; Zimmermann, J.; Signoretti, S.; Loda, M. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*, v. 5, p. 253-261, 2004.

-Furuya, Y.; Akimoto, S.; Yasuda, K.; Ito, H. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res*, v. 17,n. 6D, p. 4589-4593, 1997.

-Hicke, L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*, v. 2, p. 195-201, 2001.

-Innocenzi, D; Alo, P. L.; Balzani, A.; Sebastiani, V.; Silipo, V.; La Torre, G.; Ricciardi, G.; Bosman, C.; Calvieri, S. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol*, v. 30, n. 1, p. 23-28, 2003.

-Kim, J. H, Park, K. C., Chung, S. S.; Bang, O.; Chung, C. H. Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *J Biochem (Tokyo)*, v. 134, n. 1, p. 9-18, 2003.

- Kuhajda, F. P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*, v. 16, n. 3, p. 202-208, 2000.
- Li, J. N.; Gorospe, M.; Cherst, F. J.; Kumaravel, T. S.; Evans, M. K.; Han, W. H.; Pizer, E. S. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Research*, v. 61, n. 4, p. 1493-1499, 2001.
- Lin, H.; Yin, L.; Reid, J.; Wilkinson, K. D.; Wing, S. S. Divergent N-terminal sequences of a deubiquitinating enzyme modulate substrate specificity. *J Biol Chem.*, v. 276, p. 20357-20363, 2001.
- Mayer, R. J. The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. *Nat Rev*, v. 1, p. 145-148, 2000.
- Menendez, J. A.; Colomer, R.; Lupu, R. Why does tumor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? *Medical Hypotheses*, v. 64, p. 342-349, 2005a.
- Menendez, J. A.; Vellon, L.; Lupu, R. Antitumoral action of the anti-obesity drug orlistat (Xenical TM) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA-3 mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol.*, may 3, 2005b.
- Park, K. C.; Kim, J.H.; Choi, E. J.; Min, S. W.; Rhee, S.; Baek, S. H.; Chung, S. S.; Bang, O.; Park, D.; Chiba, T., et al. Antagonistic regulation of myogenesis by two deubiquitinating enzymes, UBP45 and UBP69. *Proc Natl Acad Sci U SA*, v. 99, p.9733-9738, 2002.
- Pizer, E. S.; Lax, S. F.; Kuhajda, F. P.; Pasternack, G. R.; Kurman, R. J. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer*, v. 83, n. 3, p. 528-537, 1998.
- Pizer, E. S.; Chrest, F. J.; Diguseppe, J. A.; Han, W. F. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Research*, v. 58, p. 4611-4615, 1998.
- Priolo, C.; Tang, D.; Brahamandan, M.; Benassi, B.; Sicinska, E.; Ogino, S.; Farsetti, A.; Porrello A.; Finn, S.; Zimmermann, J.; Febbo, P.; Loda M. The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis. *Cancer Res* v.66, p. 8625-8632, 2006.

-Strous, G. J.; Govers, R. The ubiquitina-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci*, v. 112, p. 1417-1423, 1999.

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

-Wilkinson, K. D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin. Cell Dev. Biol*, v.11, p. 141-148, 2000.