

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Potenciais mecanismos de regulação da fosfatase PTEN pelas proteínas
SET e PP2A e seu envolvimento na predisposição ao carcinoma bucal**

Camila Sayuri Matsumoto

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Potenciais mecanismos de regulação da fosfatase PTEN pelas proteínas
SET e PP2A e seu envolvimento na predisposição ao carcinoma bucal**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Camila Sayuri Matsumoto

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino

Co-Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Helena Squarize

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 25/04/2016 (Data da Defesa). A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Matsumoto, Camila Sayuri.

Potenciais mecanismos de regulação da fosfatase PTEN pelas proteínas SET e PP2A e seu envolvimento na predisposição ao carcinoma bucal. Ribeirão Preto, 2016.

115 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Leopoldino, Andréia Machado.

1. PTEN. 2. PP2A. 3. I₂PP2A. 4. Câncer. 5. Sinalização Celular. 6. Fosforilação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Camila Sayuri Matsumoto

Título do trabalho: Potenciais mecanismos de regulação da fosfatase PTEN pelas proteínas SET e PP2A e seu envolvimento na predisposição ao carcinoma bucal.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha família que sempre apoiou e
torceu pelo sucesso desse projeto.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos da vida. Em especial ao meu irmão, que me recebeu e apoiou para que a finalização dessa tese fosse possível.

À Prof^a. Dra. Andréia Machado Leopoldino, por me receber no Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer (MSCC), pela dedicação que sempre ofereceu como orientadora de doutorado e acima de tudo pelo exemplo e ensinamentos de vida.

Aos colegas do Laboratório MSCC e aos técnicos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho, dentre eles, Cristiana, Lucas, Emerson, Ana Cristina e Adriana. Assim como às pós-doutorandas Valéria, Luciana e Lays que sempre ofereceram sua ajuda e experiência, auxiliando meu desenvolvimento profissional.

Ao Prof. Dr. Carlos Curti, que ajudou no desenvolvimento desse trabalho, por todas as correções e sugestões.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira, pela amizade e sabedoria sempre oferecidas nos momentos mais difíceis, e por me receber em seu laboratório durante os primeiros anos de trabalho sob orientação da Prof^a. Andreia.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, primeiro a me apresentar à ciência e ao pensamento científico. Os seus incentivos me permitiram perseverar para superar minhas dificuldades e tornaram possível a conclusão da Graduação em Farmácia e em seguida minha incursão à pós-graduação.

À Prof. Dra. Cristiane Squarize pela co-orientação e por todo auxílio no meu desenvolvimento profissional, também ao Prof. Dr. Rogerio Castilho pelo apoio e por me receberem no *Epithelial Biology Laboratory* na *University of Michigan*.

Às amigas, Ana Paula, Fernanda, Franciele, Letícia, Maryna, Manuela Natália e Patrícia, que possuem o poder de transformar grandes dificuldades, em pequenas e sempre deixam minha vida mais alegre.

Aos amigos de pós-graduação, André, Aline, Amanda, Fernando, Hamilton, Jonas, Leandro, Leonardo, Lucas Benício, Lucas Oliveira, Neto e Silveli, que tornaram transponíveis, os muitos obstáculos que acompanham os anos da pós-graduação.

Às irmãs, Natália, Patricia e Manuela, que com seu companheirismo e amizade me ofereceram o apoio de uma família

Aos amigos, Gleyce, Priscila, Marcelo, Vinícius, Luciana, Marcio, Douglas, Carol, Gerson e Déa, que com seu carinho e apoio me ofereceram um lar longe de casa durante o período do estágio nos Estados Unidos.

A todos os funcionários da pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, em especial ao Henrique, pela grande ajuda durante essa caminhada.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro para a pesquisa e pelas bolsas de doutorado-direto (processo 2010/17985-1) e de estágio em pesquisa no exterior (processo 2013/00352-4).

Aos Professores integrantes da banca examinadora, por disponibilizarem parte de seu tempo para a análise desse trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho, meu sincero agradecimento.

A utopia está lá no horizonte.
Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos.
Caminho dez passos, e o horizonte corre dez passos.
Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei.
Para que serve a utopia?
Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.

Eduardo Galeano

RESUMO

MATSUMOTO, C.S. Potenciais mecanismos de regulação da fosfatase PTEN pelas proteínas SET e PP2A e seu envolvimento na predisposição ao carcinoma bucal. 2016. 115f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O câncer é a segunda doença com maior índice de mortalidade no Brasil e ainda é responsável por um elevado número de óbitos em todo o mundo. Durante a tumorigênese ocorrem diversas alterações no genoma, transcriptoma, proteoma, e interatoma que permitem o desenvolvimento da célula maligna. Alterações descritas na via de sinalização PI3K-Akt, tais como ganho de função da quinase PI3K ou perda de função da fosfatase PTEN, levam ao aumento de PIP3 com ativação constitutiva dos alvos *downstream*, como da quinase Akt. A regulação negativa da Akt pode ser realizada pela fosfatase PP2A, que é inibida pela proteína SET (ou inibidor 2 da PP2A). Existem diversos mecanismos que podem contribuir para a desregulação da sinalização celular e o aumento na quantidade de uma única proteína pode levar ao desequilíbrio no processo. Recentemente, nosso grupo identificou o aumento da proteína SET em diversas amostras de pacientes com carcinoma bucal, que foi associado à ativação da Akt. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar os potenciais mecanismos de regulação da fosfatase PTEN pelas proteínas SET e PP2A e o papel de PTEN na predisposição ao carcinoma bucal. Para isso, através de vetores de expressão foi identificada dentre outras, a subunidade B56Δ da PP2A capaz de reduzir os níveis de PTEN fosforilado no resíduo de S380; a interação das proteínas PTEN e PP2A foi confirmada por co-immunoprecipitação (co-IP) e imunofluorescência; a atividade de PP2A e PTEN foram avaliadas frente a expressão de SET e regiões da SET na presença ou não de mutações sítio-específicas; e os níveis de expressão de PTEN foram relacionados ao acúmulo ou silenciamento (siRNA e shRNA) de SET em CECPs e no tratamento com agente hiperacetilante (TSA) e desmetilante (5aza-deoxicidina). Também foi avaliado o papel de PTEN na expressão de BMAL1 *in vitro* e *in vivo*, utilizando animais geneticamente modificados com deleção de PTEN tecido-condicional ao epitélio. Os resultados obtidos sugerem a participação da SET em mecanismos de controle da expressão gênica de PTEN e a participação de PTEN no controle da expressão de BMAL.

Palavras-chave: 1. PTEN. 2. PP2A. 3. I₂PP2A. 4. Câncer. 5. Sinalização Celular. 6. Fosforilação.

ABSTRACT

MATSUMOTO, C.S. Potential regulation of PTEN phosphatase by PP2A and SET proteins and its role in oral cancer predisposition. 2016. 115f. Thesis (Doctorate Degree) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Cancer is the second cause of death in Brazil and the oral cancer is among the most predominant cancers worldwide. During tumorigenesis several changes occur in the genome, transcriptome, proteome and interatoma leading to malignant cells development. Some of the more important modifications occur in the PI3K-Akt pathway, such as the loss of PTEN phosphatase function, which increase PIP3 and results in the constitutive activation of downstream targets, including the kinase Akt. PP2A is responsible for the negative regulation of Akt and is inhibited by SET (or Inhibitor 2 of PP2A). Many mechanisms can lead to deregulation of these signaling pathways and the increase in one protein can result in pathway loss of balance. Recently Leopoldino et.al. (2009) identified SET levels increased in oral cancer tissue samples, associate to Akt activation. The main objective of this project is evaluating how PP2A and SET regulate PTEN and its relation to cancer predisposition. For this, expression vectors were used to identify, among others, B56 Δ subunit of PP2A reducing levels of p-PTEN S380; the interaction between PP2A and PTEN was confirmed by co-immunoprecipitation (co-IP) and immunofluorescence; PP2A and PTEN activity were evaluated against expression of SET and SET regions in the presence or not of site-specific mutations; and PTEN expression levels were related to the accumulation or silencing (siRNA and shRNA) of SET in CECs and the treatment with agents for hyperacetylation (TSA) and demethylation (5-aza-deoxycytidine). The role of PTEN on BMAL1 expression was evaluated *in vitro* and *in vivo*, using transgenic animals with tissue-specific deletion of PTEN for epithelium. The results suggest the involvement of SET in control of PTEN gene expression and participation of PTEN in the control of BMAL expression.

Keywords: 1. PTEN. 2. PP2A. 3. I₂PP2A. 4. Cancer. 5. Cellular Signaling. 6. Phosphorylation.

RESUMEM

MATSUMOTO, C.S. Potenciales mecanismos de regulación de la fosfatasa PTEN por las proteínas SET y PP2A: Sus implicaciones en la predisposición al carcinoma bucal. 2016. 115f. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto-Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

El cáncer constituye en la actualidad un problema de salud mundial por su elevada tasa de morbi/mortalidad. Basado en estos criterios en Brasil ocupa el segundo lugar basado en estos criterios. Durante la tumorigénesis ocurren diversas alteraciones a nivel del genoma, transcriptoma, proteoma e interactoma que desencadenan en la aparición de células malignas. Alteraciones descritas en la vía de señalización PI3K-Akt, tales como el incremento en la actividad de la quinasa PI3K o la pérdida de la función de la fosfatasa PTEN, conllevan al aumento de PIP3 asociada a la activación constitutiva de receptores (downstream) y de la quinasa Akt. La regulación negativa de la Akt puede ser realizada por la fosfatasa PP2A, la cual es inhibida por la proteína SET (2do inhibidor de PP2A). Existen diversos mecanismos que favorecen la disregulación de la señalización celular y el aumento de los niveles de una única proteína pueden conducir a un desequilibrio del proceso. Recientemente nuestro grupo identificó el incremento en los niveles de SET asociado a la inducción de actividad Akt en varias muestras de pacientes con carcinoma oral. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue caracterizar los posibles mecanismos de regulación de la fosfatasa PTEN por las proteínas SET y PP2A, así como el rol de PTEN en la predisposición al carcinoma oral.

Para este fin, através de vectores de expresión ha sido identificado, la subunidad de PP2A B56 Δ puede reducir los niveles de p-PTEN S380; la interacción de PP2A y PTEN fue confirmada por co-inmunoprecipitación (co-IP) e inmunofluorescencia; la actividad de PP2A y PTEN se evaluaron contra la expresión de SET y regiones del SET con o sin mutaciones sitio-específicas; y los niveles de expresión de PTEN se relacionaron con la acumulación o el silenciamiento del SET (siRNA y shRNA) en CECPs y de tratamiento hiperacetilante (TSA) y desmetilante (5-aza-desoxicidina). También se evaluó el papel de PTEN en la expresión de BMAL1 *in vitro* e *in vivo*, usando animal transgénico con delección sitio-específica de PTEN en epitelio.

Palabras clave: 1. PTEN. 2. PP2A. 3. I2PP2A. 4. Cáncer. 5. Señalización Celular. 6. Fosforilación.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caminho de proliferação do câncer em CECPs	3
Figura 2. Esquema de sinalização de PIP3.	5
Figura 3. Mecanismo de Inativação de PTEN pelo estresse oxidativo	7
Figura 4. Representação esquemática da regulação bioquímica de PTEN através de modificações pós-transcricionais.....	8
Figura 5. Representação esquemática para a formação da holoenzima de PP2A	9
Figura 6. Esquema de inibição da via de PP2A pela SET.....	11
Figura 7. Esquema representativo do loop autoregulatório de CLOCK/BMAL1 e PER/CRY 12	
Figura 8. Construções para SET, suas regiões e mutações escolhidas para determinar o sítio de ligação da SET a PP2A.....	32
Figura 9. Construção do vetor de expressão com sequência da SET	33
Figura 10. Construção do vetor de expressão com sequência da região NAP K209D.....	33
Figura 11. Construção dos vetores de expressão com sequências NAPAc Short (A), NAPAc 1 a 119 L107Q/K119D	34
Figura 12. Sequência da região da NAPAc Short K209D do DNA recombinante obtido	35
Figura 13. Digestão dos vetores obtidos da plataforma Addgene contendo cDNA para as subunidades regulatórias B da proteína PP2A.....	36
Figura 14. Análise da expressão das proteínas de interesse utilizando os vetores obtidos da Addgene em células HEK293.....	37
Figura 15. Análise da expressão dos vetores construídos para a SET e SET com mutações...38	
Figura 16. Identificação do sítio de ligação da SET à PP2A através de suas regiões e mutações sítio específicas.....	39
Figura 17. A subunidade B56Δ de PP2A promove desfosforilação de PTEN em S380.....	40
Figura 18. Interação molecular entre PTEN e PP2A B56Δ	40
Figura 19. O aumento de PP2A B56Δ promove redução de PTEN S380.....	41
Figura 20. Curva de calibração de fosfato pelo kit de verde de malaquita.....	42
Figura 21. Efeito da proteína SET e suas regiões e PP2A B56delta sobre a atividade da fosfatase PTEN	43
Figura 22. Modulação da via de PI3K/Akt pela SET, PP2A e PTEN.....	44
Figura 23. Efeito da SET e suas regiões sobre os níveis e distribuição de PTEN e PP2A B em células HEK293.....	45
Figura 24. Efeito das subunidades B da PP2A e de PTEN na viabilidade celular.	46

Figura 25. Efeito do <i>t</i> -BHP e peróxido de hidrogênio sobre a fosforilação de PTEN em células HEK293 e HN12.	47
Figura 26. Efeito do estresse oxidativo induzido por <i>t</i> -BHP e H ₂ O ₂ na oxidação de PTEN em células HN12 e HEK293.	48
Figura 27. Fosforilação de PTEN em S380 determinada por ELISA em HEK293.....	50
Figura 28. Efeito do estresse oxidativo sobre a fosforilação de PTEN na presença de acúmulo da SET	51
Figura 29. Análise de PTEN em células HEK293 co-transfectadas com vetores para expressão da proteína PTEN, SET e PP2A B56Δ.....	51
Figura 30. Acúmulo de PTEN nuclear em células tratadas com <i>t</i> -BHP e redução de PTEN nuclear e citoplasmático em células tratadas com peróxido de hidrogênio.....	53
Figura 31. Painel de células para análise do perfil de expressão de SET, PTEN e PP2A B56Δ.	54
Figura 32. Teste de <i>sh</i> RNAs para silenciamento de PTEN em HN13 e NOK-SI.....	55
Figura 33. Efeito do silenciamento de PTEN sobre proteínas da via de PI3K-Akt, SET e PP2A B56Δ.....	56
Figura 34. Efeito do silenciamento de SET sobre a via de PI3K-Akt, PTEN e PP2A B56Δ...57	
Figura 35. Seleção de <i>sh</i> RNA para <i>knockdown</i> da subunidade B56Δ da PP2A em células HN13 (A) e NOK-SI (B).....	57
Figura 36. Efeito do <i>knockdown</i> de PP2A B56Δ sobre a fosforilação de PTEN e Akt nas células HN13	58
Figura 37. RT-PCR para transcritos de PTEN	59
Figura 38. Quantificação de transcritos de PTEN em linfócito humano.....	60
Figura 39. Efeito da SET sobre a expressão de PTEN e p16	61
Figura 40. Efeito da redução de SET sobre a expressão de PTEN e p16.....	62
Figura 41. Efeito da acetilação e metilação sobre a expressão de PTEN e p16	63
Figura 42. Apresentação dos níveis de PTEN e BMAL1 em painel de células CECP	65
Figura 43. Status de Oxidação de PTEN em células HN6 e HN13 tratadas com peróxido de hidrogênio.....	66
Figura 44. Status de oxidação de PTEN em células HN6 e HN13 tratadas com rapamicina e peróxido de hidrogênio.....	66
Figura 45. Perfil de oxidação de PTEN em função do tempo pelo tratamento com peróxido de hidrogênio.....	67
Figura 46. Determinação da concentração de oligo para silenciamento de PTEN por <i>si</i> RNA	67

Figura 47. Efeito da rapamicina em tumores epiteliais de animais com deleção de PTEN	68
Figura 48. Modulação de BMAL1 e pS6 pela deleção de Pten e tratamento com rapamicina	69
Figura 49. Determinação da concentração de oligos para silenciamento de Raptor e Rictor por siRNA	70
Figura 50. Modulação de BMAL1 e pS6 pela deleção de PER2 e reversão pelo tratamento com rapamicina	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos oligos e respectivas temperaturas usadas na PCR.	19
Tabela 2 - Tamanho das regiões amplificadas.....	19
Tabela 3 - Produto da Reação de Digestão do DNA plasmidial.	21
Tabela 4- Plasmídeos contendo <i>shRNA</i> para RNA de interferência contra PTEN.....	25
Tabela 5- Plasmídeos contendo <i>shRNA</i> para RNA de interferência contra PP2A B56Δ.	26
Tabela 6 – Oligos utilizados para RT-PCR para transcritos do gene PTEN humano.	29
Tabela 7 – Oligos para PCR em tempo real usando <i>EVA Green</i>	29

ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMAL1	<i>Brain and muscle Arnt-like protein-1</i>
CECPs	Carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço
D	Ácido Aspártico
DAPI	<i>4'-6-diamidino-2-fenilindol</i>
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Media
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
GSK3 β	Glicogênio Sintase 3 Beta
I2PP2A	Inibidor 2 da proteína fosfatase 2A/ <i>inhibitor 2 of PP2A</i>
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K	Lisina
L	Leucina
mTOR	Proteína Alvo da Rapamicina
n	número amostral
NIH	National Institutes of <i>Health</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PER	Periodo
PI3K	Fosfatidilinositol 3'-quinase
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-Trifosfato
PKB ou AKT	Proteína quinase B
PP2A	Proteína fosfatase 2A
PTEN	Phosphatase Homóloga a Tensina Deletada no Cromossomo 10
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
Real Time PCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase usando a transcriptase reversa

SBF	Soro bovino fetal
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
S	Serina
<i>shRNA</i>	<i>Short hairpin RNA</i>
<i>siRNA</i>	<i>Small interfering RNA</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TAF-I β	Fator ativador da transcrição I β / <i>Template-activating fator Iβ</i>
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TBS/T	Solução salina tamponada de Tris
T	Treonina
WB	<i>Western blot</i>

SÍMBOLOS

%	porcentagem
cm	centímetro
g	grama
Gy	gray
kDa	quilo Daltons
kV	quiloVolt
kVp	quiloVolt pico
L	litro
mA	miliAmpere
mL	mililitro
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
pb	pares de base
U	units
x g	aceleração da gravidade
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro

SUMÁRIO

1. Introdução.....	2
1.1. Carcinoma Bucal	2
1.2. PTEN-PI3K	4
1.3. Proteína PP2A	8
1.4. Proteína SET.....	10
1.5. PTEN e BMAL.....	11
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos:.....	15
3. Materiais e métodos.....	17
3.1. Linhagens celulares e cultura	17
3.2. Reagentes de transfecção.....	17
3.3. Tratamentos	17
3.4. Construções dos vetores de expressão.....	18
3.5. Sequenciamento de DNA	20
3.6. Digestão dos vetores.....	20
3.7. <i>Western blot</i> (WB).....	21
3.8. Anticorpos	22
3.9. co-Imunoprecipitação (co-IP).....	22
3.10. Imunofluorescência.....	23
3.11. Ensaio de atividade de PP2A pelo método de molibdato	23
3.12. Ensaio de atividade de PTEN pelo método de verde de malaquita	24
3.13. Ensaio de viabilidade celular com rezasurina.....	24
3.14. Quantificação por ELISA de PTEN fosforilado em S380	24
3.15. Fracionamento de proteínas citoplasmáticas e nucleares	25
3.16. Plasmídeos para <i>short hairpin</i> RNA (<i>shRNA</i>)	25

3.17.	Análise de Expressão de RNA.....	26
3.17.1.	Extração RNA total.....	26
3.17.2.	Gel de agarose de qualidade para RNA.....	27
3.17.3.	Síntese de DNA complementar (cDNA) total.....	27
3.17.4.	Eletroforese em gel de agarose.....	27
3.17.5.	One Step Superscript.....	28
3.17.6.	PCR em tempo real.....	28
3.17.7.	Oligonucleotídeos.....	28
3.18.	Bioanalyser.....	29
4.	Resultados – Parte 1.....	32
4.1.	Construções para a SET, regiões da SET e mutantes da SET.....	32
4.2.	Verificação e análise dos DNAs recombinantes contendo os cDNAs das subunidades regulatórias das proteínas PP2A e PTEN-GFP.....	36
4.3.	Análise do efeito da SET total e mutada na atividade da fosfatase PP2A e PTEN.....	37
4.4.	Análise da interação PTEN-PP2A.....	39
4.5.	Atividade de PTEN.....	41
4.6.	Efeito das subunidades B de PP2A e de PTEN sobre a viabilidade celular.....	45
4.7.	Estudo do Efeito do Estresse Oxidativo sobre PTEN.....	46
4.7.1.	Regulação da fosforilação de PTEN por estresse oxidativo induzido por <i>tert</i> -butil-hidroperóxido (<i>t</i> -BHP) e peróxido de hidrogênio.....	46
4.7.2.	Proteção contra oxidação de PTEN pela SET.....	48
4.7.3.	Fracionamento de núcleo e citoplasma em condição estresse oxidativo induzido por <i>tert</i> -butil-hidroperóxido (<i>t</i> -BHP) e peróxido de hidrogênio.....	52
4.8.	Alteração dos níveis de PTEN, SET e PP2A B56Δ utilizando RNA de interferência..	54
4.8.1.	Análise do efeito da redução da SET, PTEN e PP2A B56Δ em diferentes linhagens celulares	54
4.9.	Análise da expressão do gene PTEN e dos transcritos PTEN B e PTEN Δ.....	59
4.10.	Tratamento com agentes desmetilante e hiperacetilante.....	62

5.	Resultados – Parte 2	65
5.1.	Relação entre a perda de função de PTEN e a expressão de BMAL.....	65
6.	Discussão	73
7.	Conclusão	78
8.	Referências	80
9.	Apêndices	93
9.1.	Apêndice I.....	93
9.2.	Apêndice II	94

Introdução

1. Introdução

1.1. Carcinoma Bucal

Segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC/OMS), o câncer é a maior causa de morte no mundo. No ano de 2012, foram estimados 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes em decorrência ao câncer (World Cancer Report 2014, 2014). No Brasil, o câncer é a segunda doença com maior índice de mortalidade, sendo superada apenas pelas doenças arteriais e cardíacas. As estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA/Ministério da Saúde) para o ano de 2016 foram de 596.000 casos novos, sendo 295.200 em homens e 300.800 em mulheres (Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil, 2016).

Os carcinomas de cabeça e pescoço relacionam-se a tumores de cavidade oral, seios paranasais, faringe e laringe. Anualmente, ocorrem aproximadamente 686.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço no mundo (World Cancer Report 2014, 2014). O carcinoma de cabeça e pescoço se origina no epitélio também conhecido como epitélio estratificado, o qual apresenta alta expressão de proteínas chamadas citoqueratinas que fazem parte dos filamentos intermediários. Embora o consumo de álcool e tabaco seja apontada como principal causa desse tipo de câncer, responsável pelo desenvolvimento de 88% dos casos de câncer de cabeça e pescoço no mundo, nas últimas décadas o HPV vem se destacando com crescente participação entre os fatores de predisposição ao desenvolvimento de cânceres de orofaringe e base de língua (World Cancer Report 2014, 2014).

Os diferentes Carcinomas Espinocelulares de Cabeça e Pescoço (CECPs) apresentam em comum o caminho de progressão de células hiperplásicas para células displásicas que podem progredir para o desenvolvimento do carcinoma *in situ* e, caso haja aumento de seu potencial metastático, se tornar um carcinoma invasivo (Figura 1). Esse caminho de progressão é caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenética em oncogenes, proto-oncogenes e supressores tumorais responsáveis por alterações de vias de sinalização relacionadas a maior malignidade da doença (World Cancer Report 2014, 2014).

Os tumores de CECPs podem ser classificados também como HPV positivos ou negativos. Nos tumores positivos para HPV a perda de supressores tumorais (p53) resulta do efeito das proteínas E6 e E7 do vírus. Os tumores negativos para HPV se caracterizam pelo aumento da instabilidade cromossômica e consequente acúmulo de alterações genéticas e mutações em supressores tumorais e oncogenes. A perda dos supressores tumorais e o acúmulo de oncogenes determina o surgimento de uma célula transformada com maior potencial

proliferativo e, conforme se acumulam as alterações, crescimento anormal dessa célula alterada até que esta tenha tomado todo um campo do tecido e o desenvolvimento do tumor (Leemans *et al.*, 2011). Desse modo, o acúmulo de alterações cromossômicas e mutações resulta em perda de controle de crescimento e/ou ganho de fatores de crescimento (Figura 1).

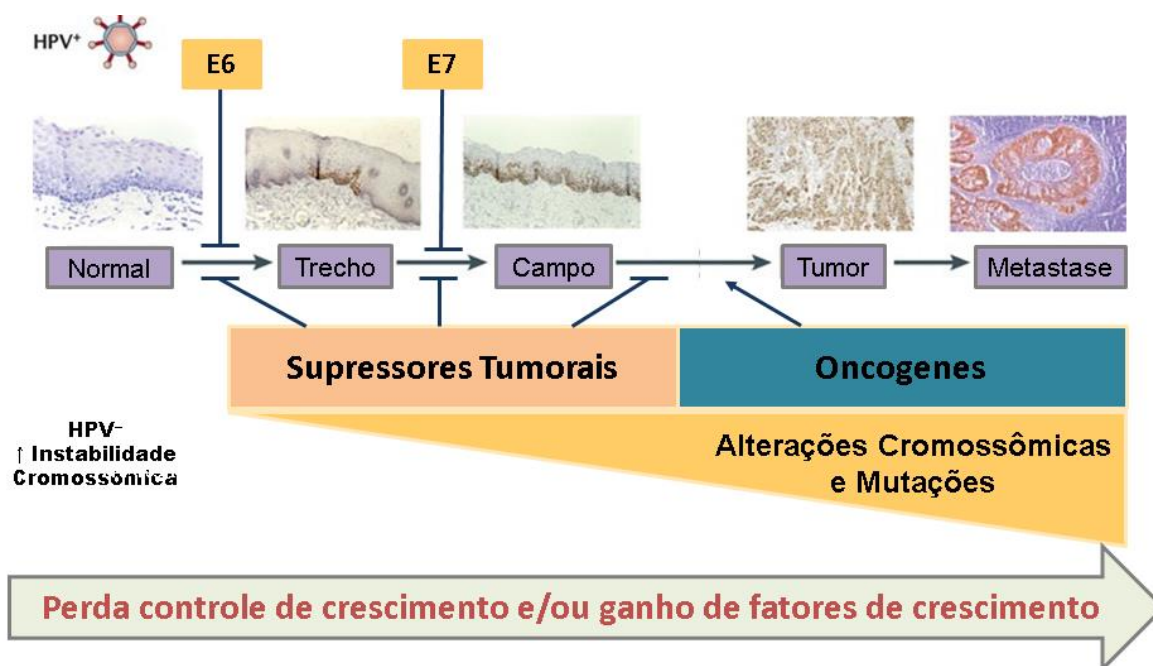


Figura 1. Caminho de proliferação do câncer em CECPs. Os cânceres de CECP podem ser classificados como HPV positivo (HPV⁺), onde as proteínas E6 e E7 são as principais efetoras da perda de genes supressores tumorais e que resultaram no desenvolvimento do tumor, ou HPV negativo (HPV⁻), caracterizados por um aumento na instabilidade cromossômica. O acúmulo de alterações cromossômicas e mutações com perda de supressores tumorais e aumento de oncogenes resulta em perda de controle de crescimento e/ou ganho de fatores de crescimento, e determina o surgimento de uma célula alterada com capacidade proliferativa maior que das células normais até o surgimento do tumor (modificado de Leemans *et al.*, 2011).

Trabalhos recentes empregando técnicas de sequenciamento em larga escala para mapear o genoma de CECPs, identificaram os genes *TP53*, *NOTCH*, *PTEN* e *PIK3CA* alterados na maioria dos tumores analisados (Stransky *et al.*, 2011), reforçando dados anteriores que relacionavam alterações nesses genes ao desenvolvimento de CECPs (Cully *et al.*, 2006; Klein e Grandis, 2010).

Os avanços na compreensão da biologia molecular do câncer de cabeça e pescoço têm aberto novas direções na ciência. O aumento das pesquisas foi direcionado para o desenvolvimento de terapias contra alvos moleculares específicos ou a predição de tratamentos baseadas nas características dos tumores após análise de marcadores moleculares e seleção de pacientes para terapias moleculares específicas (Ang *et al.*, 2002). Ainda, a maioria das

alterações genéticas que ocorrem durante este processo ainda não é conhecida ou não estão totalmente compreendidas (Awada e Lalami, 2005).

Estes dados evidenciam a alta incidência de câncer na população e fortalece a necessidade de pesquisas direcionadas para o melhor entendimento da tumorigênese, bem como do estabelecimento de diagnósticos para escolha de tratamentos, prognósticos, e acompanhamento dos pacientes. Nosso grupo de pesquisa identificou e validou o aumento da proteína I2PP2A/SET (Inhibitor 2 of PP2A) em amostras de CECP (Leopoldino, Squarize, Garcia, Almeida, Pestana, Sobral, *et al.*, 2012).

1.2. PTEN-PI3K

O sistema fosfoinosítídeo de sinalização celular é uma rede de enzimas e mensageiros fosfolípidos, responsável pela regulação da maioria dos processos celulares.

As proteínas PI3K (*Phosphoinositide Kinase-3*) e PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10*) são responsáveis pela regulação dos níveis de Fosfatidilinositol 3,4,5-Trifosfato (PtdIns(3,4,5)P ou PIP3), e frequentemente estas proteínas são encontradas mutadas no câncer (Eng, 2003; Pedrero *et al.*, 2005; Cully *et al.*, 2006; Jiang e Liu, 2009; Ohgaki e Kleihues, 2009; Bunney e Katan, 2010; Morris *et al.*, 2010).

O Fosfatidilinositol é um fosfolípido de membrana que pode ter as posições 3, 4 e 5 do anel inositol alternadamente fosforiladas, resultando em sete diferentes fosfoinosítídeos. Estes fosfoinosítídeos podem ser usados como substrato para a formação de vários segundos mensageiros e seu anel inositol fosforilado pode se ligar e regular a atividade de várias proteínas. Alterações no metabolismo de PIP3 estão relacionadas a processos inflamatórios, diabetes e câncer (Jiang e Liu, 2009; Bunney e Katan, 2010).

Como o PIP3 participa ativamente dos processos regulatórios de sobrevivência, proliferação e crescimento celular, a perda de controle na sinalização de PIP3 e sua consequente exacerbação podem levar ao desenvolvimento de câncer (Bunney e Katan, 2010).

O gene *PTEN* foi identificado como supressor tumoral em 1997 por Li *et al.* e, em trabalho independente, por Steck *et al.* (1997) e, desde então, tem sido relacionado a diversos tipos de cânceres, inclusive os de cabeça e pescoço (Squarize *et al.*, 2002; Pedrero *et al.*, 2005). O gene *PTEN* se localiza no cromossomo 10q23.3 e codifica uma proteína de 403 resíduos com atividade fosfatase, também conhecida como MMAC (*Mutated in Multiple Advanced Cancers*) ou TEP1 (*Transforming growth factor- β -regulated and Epithelial-cell Enriched Phosphatase*

1), capaz de hidrolisar o grupamento fosfato da posição 3 em PIP3, para formação de PIP2, e regular negativamente a via de sinalização PIP3 (Maehama e Dixon, 1998).

O principal alvo de PIP3 para regulação da viabilidade, proliferação e crescimento celular é a proteína Akt (Stambolic *et al.*, 1998) (Figura 2). O produto da quinase PI3K, PIP3, ao se ligar a Akt provoca o seu recrutamento para a membrana e ao mesmo tempo sua ligação a PDK1, que é responsável pela fosforilação de Akt em seu domínio quinase (T308).

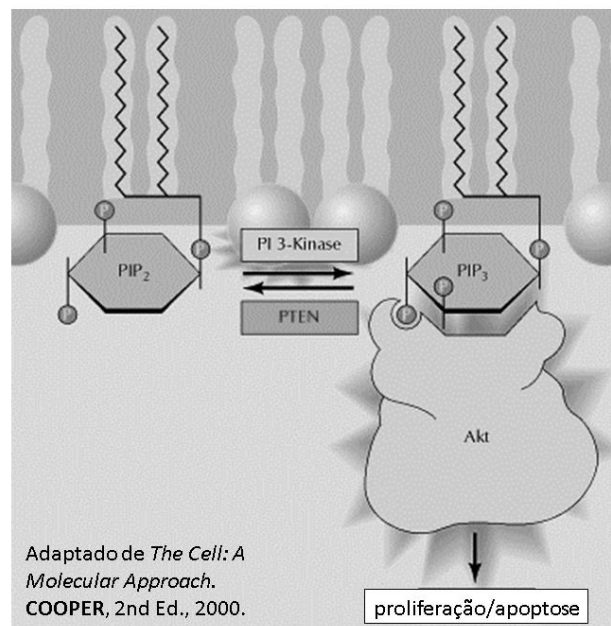


Figura 2. Esquema de sinalização de PIP3. PTEN é responsável pela desfosforilação de PIP3 em PIP2, enquanto, PI3K realiza a fosforilação de PIP2 em PIP3. Quando fosforilado, PIP3 ativa a proteína Akt que controla a proliferação e apoptose celular (adaptado de *The Cell: A molecular Approach*, COOPER, 2nd Ed., 2000).

Diversos estudos frequentemente mostraram PTEN mutado ou perdido em diversos tipos de cânceres, principalmente, gliomas, de próstata, endometrial, pulmonar, de cólon e de mama (Li *et al.*, 1997; Eng, 2003; Ohgaki e Kleihues, 2009). Atualmente, mutações no gene *PTEN* são consideradas o segundo tipo de mutação mais frequente em genes supressores tumorais, sendo ultrapassadas apenas pelas mutações em *TP53* (Keniry e Parsons, 2008). A perda de PTEN leva ao acúmulo de PIP3 promovendo o recrutamento de PDK1 e Akt (Bononi *et al.*, 2011).

A metilação do promotor de PTEN tem sido descrita em vários tipos de tumores (Baeza *et al.*, 2003), inclusive em carcinoma epidermóide oral (Kurasawa *et al.*, 2008). Existem claras evidências genéticas do papel de PI3K e PTEN na tumorigênese: mutações somáticas em câncer

que alteram PTEN (Eng, 2003) e a subunidade catalítica alpha de PI3K (PIK3CA) (Ligresti *et al.*, 2009) provocam o aumento da atividade da via de sinalização PIP3. O aumento da atividade das proteínas PI3K mutantes resulta em atividade oncogênica. A redução na atividade de PTEN leva ao acúmulo de PIP3 nas células e ativação irrestrita dos seus alvos secundários (*downstream*). Além disso, a perda de função de PTEN tem sido associada às Síndromes de Predisposição ao Câncer Hereditário como a Síndrome de Cowden, a Doença de Lhermitte-Duclos assim como a ocorrência de cânceres esporádicos (Eng, 2003; Cully *et al.*, 2006).

Outro mecanismo proposto por Vazquez *et al.* (2000) refere-se a fosforilação dos resíduos S380, T382 e T383, presentes na cauda C-terminal da proteína, resultando numa conformação mais estável, porém menos ativa, por outro lado a desfosforilação desses resíduos resulta numa maior atividade e menor estabilidade da proteína, que é degradada pelo sistema ubiquitina-proteassomo (Trotman, *et al.*, 2007; Wang, *et al.*, 2007; Fouladkou, *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2012).

Recentemente, estudos com Ressonância Magnética Nuclear (RNM) demonstraram que a fosforilação dos resíduos da cauda C-terminal ocorre em dois eventos em cascata independentes. Em um deles, a proteína Caseína Quinase 2 (CK2) fosforila os resíduos de S385, S380, T381 e T382. No segundo *cluster*, a proteína CK2 fosforila o resíduo de S370, em seguida, a quinase Glicogênio Sintase 3 Beta (GSK3 β) fosforila os resíduos de T366 e S362, e ao final, a proteína CK2 fosforila S361 e T363. Outras quinases, como a Polo-like Quinase 3 (Xu *et al.*), Serina/Treonina Quinase 11 (STK11) (Mehenni *et al.*, 2005) e Caseína Quinase 1 (CK1) (Vazquez *et al.*, 2000b), têm sido relacionadas à fosforilação de PTEN, mas ainda não se conhece de que maneira atuam sobre a fosfatase (Cordier *et al.*, 2012).

Diversos estudos relacionaram modificações pós-transcricionais de PTEN com sua sublocalização celular.

Destes, vários estudos têm corroborado a teoria de que a calda N-terminal se liga especificamente à PIP2 presente na membrana celular e determina alterações na conformação de PTEN, resultando na ativação alostérica e, juntamente, com a fosfatidilserina induz alterações na estrutura e a sua ligação ao substrato PIP3 (Leslie *et al.*, 2008).

Apesar de ser uma proteína de membrana, PTEN também é encontrada no núcleo (Liu *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2007; Fouladkou *et al.*, 2008; Planchon *et al.*, 2008; Jacob *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2011; Horita *et al.*, 2016) onde mantém seu potencial de supressor tumoral. Trotman *et al.* (2007) mostraram que o resíduo de Lisina 289 é essencial para a migração de PTEN para o núcleo celular, esse resíduo pode ser monoubiquitinado e direcionar a

internalização de PTEN no núcleo, ou poliubiquitinado, e nesse caso será direcionado para a degradação via proteassomo (Trotman *et al.*, 2007).

Os resíduos de Serina 380 e Treonina 382, 383 determinam, além da atividade de PTEN, sua ligação a membrana plasmática. Das *et al.* (2003), mostraram que quando estes resíduos são desfosforilados, ocorre a ligação de PTEN a membrana e ao serem desfosforilados se tornam disponíveis no citoplasma. Segundo Odriozola *et al.* (2007), a desfosforilação dos resíduos de S380A e S385A determinam maior ligação de PTEN a membrana, mas a fosforilação de S380E mostrou menor ligação de PTEN a membrana quando comparada com a fosforilação do resíduo de S385E.

Na presença de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), ocorre rompimento da ponte de enxofre formada na região catalítica da fosfatase PTEN e perda da estrutura terciária da proteína, essa modificação na estrutura do sítio catalítico leva a inativação da fosfatase (Figura 3).

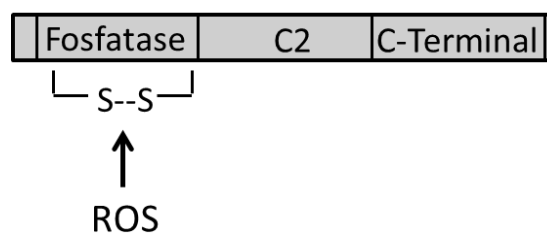


Figura 3. Mecanismo de Inativação de PTEN pelo estresse oxidativo. Na presença de (EROS), a ligação de uma ponte de enxofre presente na região catalítica da fosfatase é rompida e a perda da estrutura terciária leva a perda de atividade.

Além desses mecanismos de controle bioquímico, pode ocorrer, ainda, acetilação do sítio catalítico e da calda C-terminal (Figura 4).

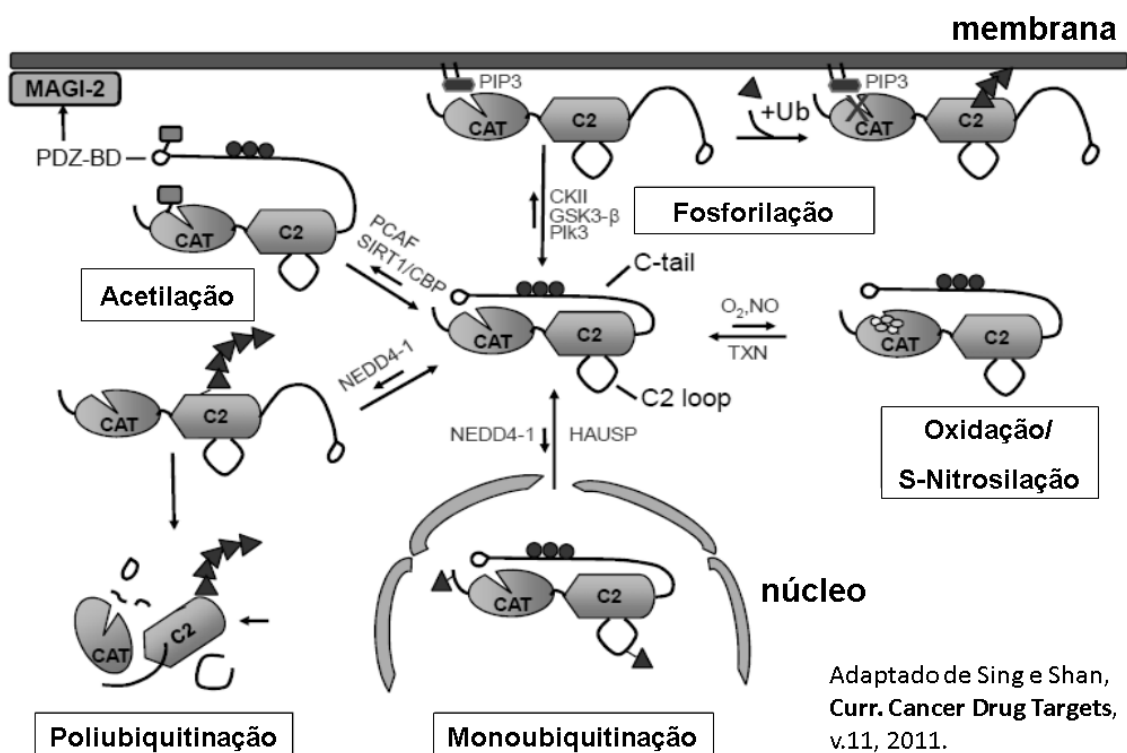


Figura 4. Representação esquemática da regulação bioquímica de PTEN através de modificações pós-transcricionais. A proteína PP2A pode ter sua atividade regulada pela fosforilação da sua calda C-terminal ou por oxidação ou S-nitrosilação de sua região catalítica na presença de estresse oxidativo; ser translocado para o núcleo através de monoubiquitinação ou degradado após poliubiquitinação; e sofrer acetilação em sua região catalítica e/ou calda C-terminal. (modificado de Sing e Chan, 2011).

Embora diversos processos de regulação de expressão gênica, eventos pós-transcricionais e pós-traducionais tenham sido descritos, o completo entendimento da regulação de PTEN ainda não foi elucidado.

1.3. Proteína PP2A

A proteína fosfatase 2A (PP2A), uma serina/treonina fosfatase, foi descoberta por Chernoff *et al.* (1983). Posteriormente, a PP2A foi identificada como uma holoenzima formada por diversas subunidades regulatórias (Figura 5), as quais determinam diferentes especificidades pelos substratos e diferentes atividades (Janssens e Goris, 2001). A holoenzima é constituída por uma subunidade catalítica (subunidade C, 36 kDa) comum a todas as fosfatases desse grupo, uma subunidade regulatória (subunidade B, de 50 a 130 kDa) e uma terceira subunidade estrutural variável (subunidade A α ou A β) que permite a formação da holoenzima heterotrimérica devido a sua capacidade de ligação às diferentes subunidades regulatórias (Mumby, 2007). As

diferentes subunidades B são expressas diferencialmente de acordo com o tipo de tecido e em determinado estágio durante a diferenciação e o desenvolvimento celular (Bononi *et al.*, 2011).

Até o momento, foram descritas 3 famílias para as subunidades regulatórias (B, PR72 e B56) e a família B56 possui 8 isoformas descritas (Mumby, *et. al.*, 2007) (Figura 5).

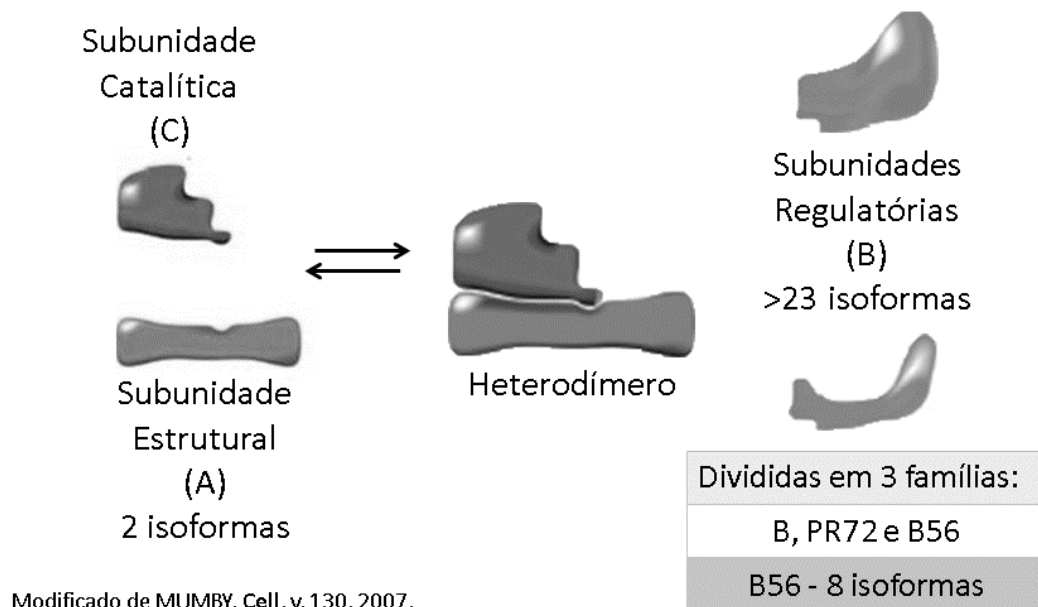


Figura 5. Representação esquemática para a formação da holoenzima de PP2A. O heterodímero formado pela interação entre as subunidades catalítica (C) e estrutural (A) irá determinar qual subunidade regulatória se ligará para a formação da holoenzima (modificado de Mumby *et.al.*, 2007).

Devido à variedade de substratos que a PP2A pode desfosforilar, um grande número de fosfoproteínas e vias de sinalização podem ser afetadas pela PP2A (tais como Akt, c-Myc, RalA). Algumas subunidades regulatórias de PP2A tiveram sua atividade relacionada a uma determinada via de sinalização: a subunidade B56 α foi associada à Bcl2 (Ruvolo *et al.*, 2002) e à regulação de c-Myc e β -catenina (Arnold e Sears, 2008); B56 β parece participar da degradação de Pim-1 (Ma *et al.*, 2007); B56 γ parece atuar na regulação de p53, paxilina, mdm2/Hdm2 e p300; B56 Δ teve sua atividade descrita na regulação de Cdc25C, HAND1 e DARP-32 (Arnold e Sears, 2008). A PP2A formada pela subunidade B55 α teve sua atividade relacionada à desfosforilação dos resíduos T308 e S473 de Akt (Kuo *et al.*, 2008b). A subunidade B56 Δ teve sua atividade relacionada ao controle do ciclo celular através da inibição de Cdc25C (Forester *et al.*, 2007), assim como à ativação de GSK3 β (Yu *et al.*, 2014). Apesar desses dados, existem diversas funções da proteína PP2A que ainda não foram relacionadas a uma subunidade regulatória.

Alguns estudos têm relacionado a atividade de PTEN e PP2A (Mistafa *et al.*, 2010; Nho e Kahm, 2010; Bononi *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011), em estudo de proteômica desenvolvido por Crockett *et al.* (2005) os únicos grupos de fosfatases identificadas como ligantes a PTEN foram as Fosfatases Transmembrana com Homologia a Tensina (TPTE) e a família B56 da subunidade regulatória de PP2A. Contudo, o mecanismo de interação destas permanece desconhecido.

1.4. Proteína SET

O gene humano SET foi originalmente identificado a partir de estudos em Leucemia Indiferenciada Aguda por Von Lindern *et al.* (1992). A proteína SET (TAF-I beta ou I2PP2A), um potente e altamente seletivo inibidor de PP2A (Li *et al.*, 1996), foi identificada em altos níveis no câncer de cabeça e pescoço (Leopoldino, Squarize, Garcia, Almeida, Pestana, Sobral, *et al.*, 2012), câncer de próstata (Hu *et al.*, 2015), de mama (Janghorban *et al.*, 2014), pancreático (Farrell *et al.*, 2014) e em tumor de Wilm's (Carlson *et al.*, 1998).

Recentemente, alguns trabalhos apresentaram a regulação negativa de SET como alternativa terapêutica para diversos tipos de cânceres através do aumento de atividade de PP2A e indução de degradação de c-MYC (Mukhopadhyay *et al.*, 2013; Farrell *et al.*, 2014; Janghorban *et al.*, 2014).

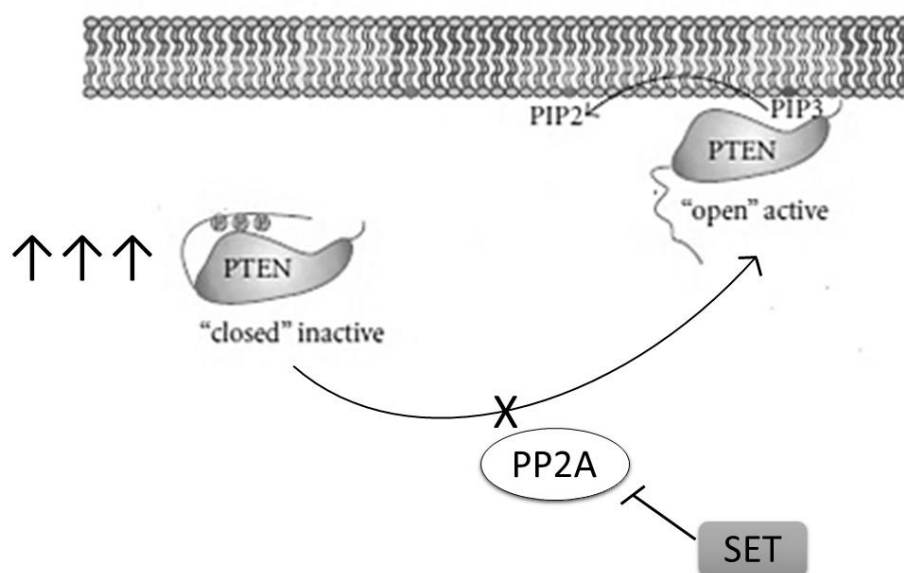
Segundo os estudos desenvolvidos, a SET aumenta a atividade de p53 através da fosforilação do resíduo S46 via p38 MAPK (Liu *et al.*, 2012). Como Akt apresenta função oposta a p53 (promove aumento da sobrevivência celular) a ativação simultânea da Akt pela SET pode conter a apoptose induzida por p53 hiperativado. Este mecanismo de regulação pode explicar a neurodegeneração crônica observada nos neurônios afetados pela Doença de Alzheimer (Liu *et al.*, 2012).

Tanimukai *et al.* (2005) mostraram que a proteína SET que apresenta peso molecular aparente de 39 kDa, pode ser clivada em um fragmento de 20 kDa (NAP) e é translocada do núcleo para o citosol de células cerebrais de pacientes com Alzheimer. O fragmento identificado nesse trabalho apresentou perda da calda C-terminal (Ácida). Uma vez no citoplasma, ambos os fragmentos NAP e Ácido interagem com PP2A e inibem sua atividade (Arnaud *et al.*, 2011).

De acordo com Ten Klooster *et al.* (2007), quando a SET está localizada na membrana plasmática ela estimula a migração celular de maneira dependente de Rac1, pois Rho GTPase Rac1 controla a adesão e a mobilidade celular, e a região C-terminal de Rac1 liga ao oncogene nuclear SET/I2PP2A translocando-o para membrana plasmática e assim induzindo a metástase

celular. Nesse trabalho foram descritos 2 importantes domínios para a proteína SET, domínio NAP, que apresenta homologia com a família NAP (Nucleosome Assembly Protein) e o domínio C-terminal ácido (Ácido). O domínio NAP se mostrou essencial para a interação com Rac1.

Nosso grupo de pesquisa encontrou a fosforilação da proteína PTEN aumentada em células superexpressando a proteína SET (Leopoldino *et al.*, 2011). Tendo em vista esse dado e as informações previamente descritas sobre os mecanismos de regulação das proteínas PTEN e SET, o estudo e a caracterização da possível interação entre as proteínas PTEN e PP2A com participação da SET pode ser um novo caminho para o entendimento dos processos de tumorigênese com alteração na via de sinalização PI3K/Akt (Figura 6).



Modificado de BONONI, *et.al.*, *Enzyme Res*, V2011, 2011.

Figura 6. Esquema de inibição da via de PP2A pela SET. De acordo com dados previamente, desenvolvemos a hipótese de que ao inibir a atividade de fosfatase de PP2A, a proteína SET promove aumento nos níveis de PTEN fosforilado (modificado de Bononi, *et.al.*, 2011).

1.5. PTEN e BMAL

A IARC qualifica distúrbios no ciclo circadiano como carcinógeno de Grupo 2A e vários estudos epidemiológicos demonstraram que distúrbios no ciclo circadiano podem estar relacionados ao aumento na predisposição a câncer de mama, cólon, próstata, pulmão, ovários e câncer hepático (Hansen, 2001; Schernhammer *et al.*, 2001; Conlon *et al.*, 2007; Baan *et al.*, 2009).

As oscilações características do ciclo circadiano são oriundas de loops transcricionais e pós-transcricionais autorregulatórios. O loop positivo é formado pelos fatores de transcrição BMAL1 (*Brain and muscle Arnt-like protein-1*), CLOCK e NPAS2. Os complexos BMAL1-CLOCK ou BMAL1-NPAS2 formam heterodímeros com genes membros do loop negativo, tais como os genes *Cryptochromo* (CRY) e *Period* (PER), aumentando os níveis de expressão desses genes. O acúmulo de CRY e PER permite a formação dos complexos responsáveis pela regulação negativa de BMAL1-CLOCK ou BMAL1/NPAS2 e portando autorregulando negativamente os níveis de CRY e PER. Quando os níveis de CRY e PER reduzem o suficiente, um novo ciclo de CRY e PER se inicia (Lee *et al.*, 2001) (Figura 7).

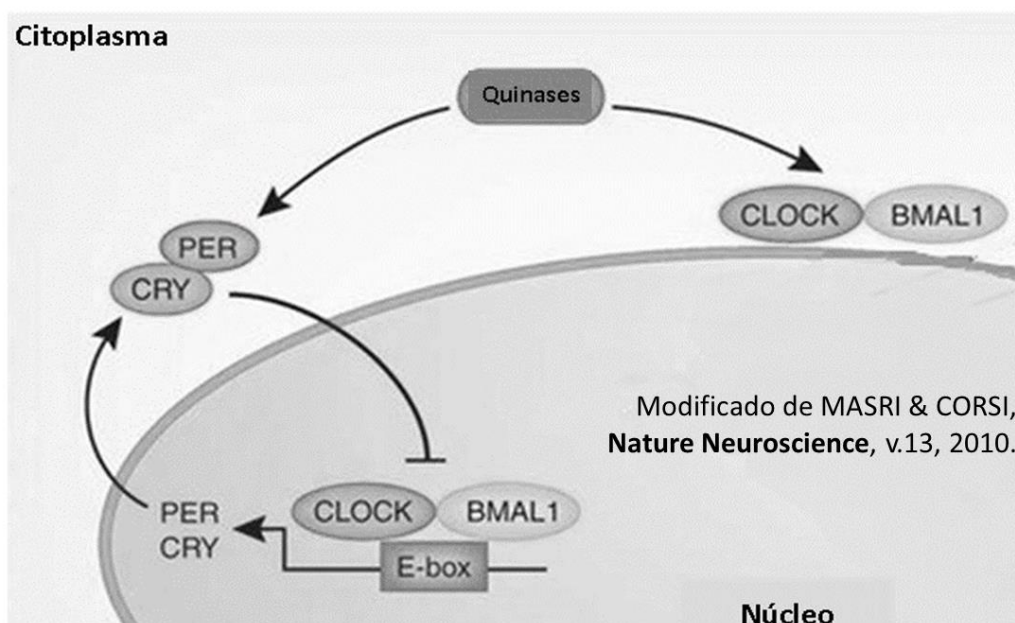


Figura 7. Esquema representativo do loop autoregulatório de CLOCK/BMAL1 e PER/CRY. No núcleo, o complexo CLOCK/BMAL1 induz a transcrição de PER e CRY que ao atingirem níveis elevados no citoplasmas podem inibir a atividade de BMAL e CLOCK no núcleo celular. Os complexos PER/CRY e CLOCK/BMAL1 podem ser regulados também por quinases que ainda não são completamente conhecidas (modificado de Masri e Sassone-Corsi, 2010).

PER2 foi proposto como supressor tumoral por Fu *et al.*, 2002) e teve sua diminuição relacionada a diversos cânceres (Chen *et al.*, 2005; Gery *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2010). Perturbações no funcionamento do ciclo circadiano podem ser provocadas por fatores ambientais (como o transtorno do ciclo vigília-sono) ou por mutações genéticas. Por exemplo, a inativação de Per2 induz a tumorigênese em camundongos (Fu *et al.*, 2002).

Camundongos com deleção de BMAL1 apresentam envelhecimento acelerado e redução do tempo de vida desses animais, assim como aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio produzidas (Kondratov *et al.*, 2006). Entretanto, ao serem tratados com rapamicina, um inibidor do complexo mTOR (Proteína Alvo da Rapamicina), apresentaram aumento da expectativa de vida, uma vez que a deleção de BMAL1 induz a ativação de mTOR e aumento no metabolismo que acelera o envelhecimento desses animais (Khapre *et al.*, 2014).

mTOR é um complexo de 6 (mTORC1) ou sete (mTORC2) proteínas que formam uma Serina/Treonina Quinase que pode ser ativada por vários componentes da via PI3K, entre elas por Akt (Laplante e Sabatini, 2012), na redução dos níveis de PTEN mTOR é altamente ativado (Xu *et al.*, 2014).

Camundongos com deleção de PTEN no tecido epitelial apresentam inúmeras lesões e o desenvolvimento de tumores na derme (K14Cre Pten^{F/F}) assim como tumores nas mamas e tireóide, os quais regredem com o controle da ativação de mTOR pelo tratamento com rapamicina (Squarize *et al.*, 2008).

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar potenciais mecanismos de regulação da proteína PTEN pela fosfatase PP2A e pela SET e avaliar se BMAL pode ser regulada pela PTEN

2.2. Objetivos específicos:

- 1- Estudar o efeito de diferentes subunidades B da PP2A e da SET na fosforilação da proteína PTEN;
- 2- Caracterizar os perfis de expressão de PTEN em condições de estresse oxidativo assim como sua distribuição celular usando linhagens celulares de CECP, HEK293.
- 3- Avaliar se a expressão de PTEN pode ser modulada pelo acúmulo e *knockdown* da SET na célula bem como pelos agentes hiperacetilante de DNA tricostatin A (TSA) e desmetilante de DNA (5-aza-deoxicitidina);
- 4- Explorar e avaliar a potencial relação entre a perda de função de PTEN e a expressão de BMAL *in vitro* e *in vivo*.

3. Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Linhagens celulares e cultura

Foram utilizadas as linhagens celulares HEK293, derivada de células embrionárias de rim humano e transformada com adenovírus 5 (Graham *et al.*, 1977), HeLa, derivada de carcinoma cervical (Scherer *et al.*, 1953) (obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro), as linhagens NOK-SI (Castilho *et al.*, 2010) (queratinócitos normais espontaneamente imortalizadas), HaCat (queratinócitos imortalizado) (Boukamp *et al.*, 1988) e Cal 27 (Gioanni *et al.*, 1988), HN6 (Yeudall *et al.*, 1994), HN12 (Cardinali *et al.*, 1995) e HN13 (Yeudall *et al.*, 1994), derivadas de carcinomas de cabeça epidermóide de cabeça e pescoço (doadas pelo Dr. Silvio Gutkind, NIH, USA). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma) e suplementado com soro bovino fetal (SFB) 10% (Gibco); penicilina e estreptomicina 1% (Sigma), mantidas em incubadora umidificada (37 °C) em presença de 5 % CO₂.

3.2. Reagentes de transfecção

A superexpressão das proteínas estudadas em célula HEK293 foi obtida por meio de transfecção com o reagente PolyFect (Qiagen) de acordo as instruções do fabricante, e as condições pré-estabelecidas no laboratório. Após 48 horas de transfecção as células foram avaliadas por microscopia ou o extrato total proteico foi obtido para os estudos subsequentes.

Para obtenção de células contendo os vetores de expressão por período superior, máximo de 30 dias, 200.000 células HEK293 foram submetidas a transfecção, conforme a indicações do fabricante, foram resuspendidas em solução de transfecção SF e submetidas ao ciclo de pulsos elétricos CM-130 no equipamento 4D-Nucleofector (Lonza). Após 40 horas da transfecção, o meio de cultura foi trocado por DMEM completo acrescido de antibióticos para seleção das células transfectadas durante 15 dias. Para seleção das células contendo vetor de expressão pcDNA 3.1 foi utilizada geneticina 750 µg/mL e para seleção das células contendo vetor pCEP foi utilizada higromicina 400 µg/mL

3.3. Tratamentos

Para análise de fosforilação de PTEN em condição de estresse oxidativo as células foram incubadas em presença de *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP), um agente pró-oxidante, nas

concentrações de 50 e 250 μM e em presença de peróxido de hidrogênio nas concentrações de 50, 250, 500 μM . As células HEK293 foram incubadas com os agentes pró-oxidantes por 1 hora e as células HN12 por 2 horas.

A tricostatina A (TSA) é um composto pertencente à classe dos Inibidores de Histonas Desacetilases, e age inibindo as Histonas Deacetilases de classe I e II, resultando na hiperacetilação de Histonas e, em consequência ao maior relaxamento do DNA, eleva os níveis de expressão gênica. As células HEK293, com acúmulo ou não da proteína SET foram tratadas com 10 μM de TSA (Sigma) por 24 horas.

A incubação com peróxido de hidrogênio (1,5 mM) ou o inibidor de mTOR, rapamicina (50 nM) foi mantida em meio com 1% de SBF para os experimentos com células HN6 e HN13.

3.4. Construções dos vetores de expressão

Os plasmídeos para superexpressão das regiões regulatórias da PP2A (B55 α ; B56 α ; B56 β ; B56 δ), Akt e PTEN em fusão com GFP, foram doados gentilmente por William Hahn - plasmídeo 13804: pMIG FLAG B55 alpha (Chen *et al.*, 2004); David Virshup - plasmídeo 14532: V245 pCEP-4HA B56alpha, plasmídeo 14533: V246 pCEP 4HA B56beta, plasmídeo 14536: pCEP-4HA B56delta (Seeling *et al.*, 1999); Alonzo Ross - plasmídeo 13039: GFP-PTEN (Liu *et al.*, 2005b); William Sellers - plasmídeo 9003: 896 pcDNA3 T7 Akt1 (Vazquez *et al.*, 2000), e obtidos por meio do banco de plasmídeos Addgene (disponível no endereço: <http://www.addgene.org/pgvec1>).

O vetor contendo a sequência para expressão da SET foi construído a partir do cDNA total da linhagem HaCat e oligos específicos para o gene da variante 2 da SET, descritos na Tabela 1. Os vetores para expressão das regiões da SET com mutações nos sítios K209D, L107Q e K119D, foram obtidos por amplificação a partir do vetor de expressão pCMV Sport6+SET total (Invitrogen) com os oligos (contendo mutações sítio dirigidas) descritos na Tabela 1.

A reação de PCR foi desenvolvida conforme descrito previamente por (Saiki *et al.*, 1985), utilizando-se um termociclador automático (Mastercycler Eppendorf). Foi realizada uma reação de volume final de 12,5 μL , o cDNA humano (60 ng) foi incubado em tampão (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,4) contendo MgSO_4 2mM mais: oligos NAP *foward* 0,2 μM e Ac *reverse* 0,2 μM para a SET; oligos NAP *foward* 0,2 μM e NAP K209D *reverse* 0,2 μM para a região NAP mutada; NAPAc *foward* 0,2 μM e NAP *reverse* 0,2 μM para a região NAPAc Short; NAPAc *foward* 0,2 μM e NAP K209D *reverse* 0,2 μM para a região NAPAc Short com

mutação e os oligos NAP *foward* 0,2 µM e 1a119 K119D_L107Q *reverse* 0,2 µM para a região 1 a 119 mutada, além de dNTPs 0,2 mM, 0,5 U de Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e quantidade suficiente de água milliQ autoclavada para o volume final. A desnaturação foi realizada a 94 °C por 2 minutos, seguida de amplificação por 34 ciclos de 94 °C, 30 s; 60 °C, 45 s; e 68 °C, 1 min e 30 s; extensão final a 68 °C por 20 min. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1%), visualizado com brometo de etídio sob luz UV. O produto da amplificação foi inserido no vetor pDONR/Zeo e posteriormente transferido para o vetor de expressão pcDNA3.1, usando-se o sistema Gateway da Invitrogen. Os plasmídeos foram transformados em bactérias DH10β e os clones foram selecionados inicialmente por PCR de colônia e confirmados por reação de sequenciamento de DNA.

Tabela 1 - Sequências dos oligos e respectivas temperaturas usadas na PCR.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' -- 3')	Tm
Sense attB1_NAP (NAP Fw)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTGTCGGCGCAGGCGCCAAAG	55 °C
Sense attB1_NAPAc (NAPAc Fw)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTGACGAAACGTTTCGAGTCAAACG	55 °C
Antisense attB2_NAP (NAP Rv)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCTTAGTAGTACTGTAATGGGTTTGGC	55 °C
Antisense attB2_SET_K209 (NAP K209D Rv)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCTTAGTAGTACTGTAATGGGTTTGGCC AAATATCATCATCGATGACCTCTCCTAA CTC	55 °C
Antisense attB2_1a119_K119D/L107Q (1 a 119 K119D/L107Q Rv)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCTTAATCAATATCTTCAAATTCTGTAC TTCAACTCTGGTTTGATAATGC	55 °C
Antisense attB2_Ac (Ac Rv)	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA GTC ATC TTC TCC TTC ATC	55 °C

Tabela 2 - Tamanho das regiões amplificadas.

Região	Tamanho em pb
SET (1-277aa)	831
NAP K209D (1-220aa)	660

NAPAc Short (165-220aa)	165
NAPAc Short K209D (165-220aa)	165
1 a 119 K119Q_L107Q (1-119aa)	357

3.5. Sequenciamento de DNA

Os clones positivos pDONRTM/ZEO/NAP K209D, pDONRTM/ZEO /NAPAc Short, pDONRTM/ZEO/NAPAc Short K209D e pDONRTM/ZEO/ 1a119 K119D_L107Q selecionados por PCR de colônia foram submetidos à extração de DNA plasmidial utilizando-se o Kit QIAprep[®] Miniprep (QIAGEN). As amostras foram então preparadas para a reação de sequenciamento utilizando o kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Cerca de 150 – 300 ng do DNA plasmidial, 1 µL do reagente BigDye contendo os dideoxiribonucleotídeos marcados, 3,2 pmoles de oligonucleotídeo (*promoter* M13 Fw e *promoter* M13 Rv) e água deionizada estéril (q.s.p. 20 µL) foram submetidos a reação de amplificação com a seguinte condição de ciclagem: 96°C por 1 minuto, 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, repetidos 25 ciclos. O produto da reação foi precipitado pela adição de 2 µL de tampão acetato de sódio 3,0 M pH 5,2 e 50 µL de etanol absoluto, seguido de incubação por 20 minutos, a 0°C. A mistura foi centrifugada a 20.400 x g por 20 minutos a 4°C e após lavagem do precipitado com etanol 70% (v/v) a amostra foi seca e resuspensa em tampão de carregamento (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada conforme descrito previamente (Sanger *et al.*, 1977), em sequenciador automático Applied Biosystems mod. 3100 no Laboratório do Prof. Maurício Lacerda Nogueira, de Virologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

3.6. Digestão dos vetores

Os vetores de expressão foram isolados e seus insertos confirmados por digestão com enzimas de restrição, conforme indicado pelo banco de plasmídeos. Para tanto, as culturas enviadas pelo banco de plasmídeos foram crescidas em LB sólido na presença de ampicilina 100 mg/mL por 16 horas. Uma colônia isolada foi selecionada para extração plasmidial com o Kit QIAprep[®] Miniprep (QIAGEN).

Aproximadamente 1 µg de DNA plasmidial foi empregado na reação de digestão. Para digestão dos vetores foram adicionadas as seguintes reações ao DNA plasmidial: para pMIG

FLAG B55 α foram empregadas 10 U de enzima *EcoRI* (Invitrogen), 2 μ L de tampão Buffer React 3[®] 10X (Invitrogen) e 13,5 μ L de água deionizada estéril (q.s.p. 20 μ L); para pCEP-4HA B56 α foram utilizados 5 U de enzima *Not I* (Fermentas), 10 U de enzima *Xho I* (Fermentas) 2 μ L de tampão Buffer O[®] 10X (Fermentas) e 9 μ L de água deionizada estéril (q.s.p. 20 μ L); para o vetor pCEP 4HA B56 β foram utilizados 5 U de enzima *Not I* (Fermentas), 10 U de enzima *Xho I* (Fermentas) 2 μ L de tampão Buffer O[®] 10X (Fermentas) e 11,5 μ L de água deionizada estéril (q.s.p. 20 μ L); pCEP-4HA B56 δ foram utilizados 5 U de enzima *Not I* (Fermentas), 2 μ L de tampão Buffer O[®] 10X (Fermentas) e 12 μ L de água deionizada estéril (q.s.p. 20 μ L); para PTEN-GFP foram utilizadas 10 U de enzima *Hind III* (Invitrogen), 10 U de enzima *EcoRI* (Invitrogen), 2 μ L de tampão Buffer React 2[®] 10X (Invitrogen) e 7 μ L de água deionizada estéril (q.s.p. 20 μ L), para o vetor de Akt1 foram utilizadas 10 U de enzima *BamHI* (Fermentas), 10 U de enzima *EcoRI* (Invitrogen), 2 μ L de tampão Buffer *BamHI* 10X (Fermentas) e 12,5 μ L de água deionizada estéril (q.s.p. 20 μ L). Todas as reações foram incubadas à 37 °C por 16 horas e as digestões foram confirmadas pela visualização do tamanho dos inserto e vetores em gel de agarose 1% (Tabela 3).

Tabela 3 - Produto da Reação de Digestão do DNA plasmidial.

Vetor Digerido	Tamanho em pb (vetor / inserto)
GFP-PTEN	5400 / 1900
Akt1	5446 / 1500
pCEP-4HA B56alpha	10186 / 2900
pCEP-4HA B56beta	10186 / 2500
pCEP-4HA B56delta	10186 / 2100
pMIG FLAG B55alpha	6500 / 1368

3.7. Western blot (WB)

As células foram incubadas com tampão de lise e extração de proteínas (Cellytic, Sigma) contendo coquetel de inibidores para proteases e fosfatases (SIGMA). A concentração de proteínas foi determinada por meio do Pierce BCA[™] Protein Assay Kit (Pierce). Cerca de 30 μ g de proteína total foram separadas por SDS-PAGE. As proteínas resolvidas por eletroforese foram transferidas para membrana Hybond-P (polyvinylidene fluoride – PVDF; GE Healthcare

UK Limited Amersham Place) utilizando o equipamento semi-dry da Bio-Rad por 90 minutos a 325 mA. O bloqueio da membrana foi realizado com uma solução Tris 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,9% e Tween-20 0,1% (TBS/T) com *nonfat dry Milk* 5%, e a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Após bloqueio, a membrana foi incubada em solução TBS/T adicionada de BSA 2% (a concentração de albumina pode variar dependendo do anticorpo), e o anticorpo primário na diluição de 1:1000, por 16 horas a 4°C, sob agitação suave. Após incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TBS/T e incubada por 1 hora em solução TBS/T adicionada de 5% *nonfat dry milk* e anticorpo secundário marcado com peroxidase, na diluição de 1:3000. A membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TBS/T, incubada com o reagente ECL™ *Western Blot Detection Systems* (Ge Healthcare UK Limited Amersham Place) por 90 seg. A marcação dos anticorpos primários foi visualizada por quimioluminescência detectada em filme para Raio-X Ortho CP-G Plus (AGFA), com auxílio de um cassete para exposição da membrana ao filme.

3.8. Anticorpos

Os anticorpos e as diluições utilizados foram: mAb anti-GAPDH (Cell Signaling, #2118) 1: 50.000; pAb anti-PTEN (Santa Cruz, sc-9145) 1:50; mAb anti-PTEN (Cell Signaling #9559) 1:1.000; pAb anti-SET (Santa Cruz, sc-5655) 1:2.500; mAb anti-HA (Sigma-Aldrich, H6908) 1:1.000; mAb anti-PP2A C (Cell Signaling, #2038) 1:1.000; pAb anti-PP2A B; (Millipore, #05-592) 1:500; mAb anti-p-S6 Ser235/236 (Cell Signaling #4857); mAb anti-Rictor (Cell Signaling #2114), mAb anti-Raptor (Cell Signaling #2280) and mAb anti-BMAL1 (Novus Biologicals NB100-2288); anti-PP2A B56delta (Sigma) 1:1.000; p-GSK3β S9 (Cell Signaling) 1:1.000; Akt (Cell Signaling) 1:1.000; p-Akt S473 (Cell Signaling) 1:1.000; phospho-Akt S308 (Cell Signaling) 1:1.000; p-PTEN S380 (Cell Signaling) 1:1.000; p-PTEN S380/T382/T383 (CellSignaling) 1:1.000; beta-Actina (Sigma) 1:5.000.

Para visualização por quimioluminescência, os anticorpos foram ligados aos seguintes anticorpos secundário ligados a peroxidase: anti-goat (KPL, 14-13-06) e anti-rabbit (Sigma-Aldrich, A9169), e anti-mouse (KPL, 40-18-06).

3.9. co-Imunoprecipitação (co-IP)

O lisado de proteínas para co-imunoprecipitação foi obtido de células superexpressando GFP-PTEN e 4HA-B56Δ lisadas com tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 2 mM, NP-40 0,1%, glicerol 10%, PMSF 1 mM, DTT 1 mM e coquetel de inibidor de

proteases (SIGMA). Foi utilizada resina de agarose revestida de Proteína G (GE HealthCare) ligada a anticorpos contra a proteína de interesse para identificação de possíveis domínios ligantes. O produto eluído da resina foi analisado por *Western blot*.

3.10. Imunofluorescência

Células HEK293 superexpressando PTEN e B56Δ foram fixadas com metanol 100% à -20°C por 5 minutos. As lâminas de IF foram incubadas com anticorpo primário overnight e lavadas com PBS seguida de incubação com anticorpo secundário conjugado com fluoresceína e rodamina (Jackson ImmunoResearch Labs 1:100) e montadas com meio contendo DAPI (Vector laboratories). A quantidade de proteína PP2A B foi avaliada espectrofluorimetricamente utilizando a Rodamina 123 nos comprimentos de onda de 505 e 535 nm, excitação e emissão respectivamente. A proteína PTEN foi avaliada espectrofluorimetricamente utilizando a Fluoresceína nos comprimentos de onda de 494 e 521 nm, excitação e emissão respectivamente. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-PTEN total (Santa Cruz), e anti-PP2A B (Cell Signaling).

3.11. Ensaio de atividade de PP2A pelo método de molibdato

O ensaio quantifica o fosfato liberado na reação proveniente de um peptídeo sintético desenvolvido com a finalidade de ser substrato para Serina/Treonina Fosfatases (PPAs).

Após 48 horas da transfecção dos vetores de interesse nas células HEK293, estas foram lisadas, em placa de 30 mm, com tampão Tris-HCl 250 mM pH 7,5, EDTA 2 mM, β-mercaptoetanol 20%, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 μM e coquetel de inibidor de proteases (SIGMA). Os lisados passaram por processo de purificação em coluna de cromatografia, conforme indicações do fabricante, antes da quantificação de proteínas pelo método de BCA. A reação foi desenvolvida conforme especificações do fabricante com 2,5 μg de proteína (na ausência e na presença de ácido okadáico 12 nM) e incubada a 30°C por 10 min antes da adição do reagente de molibdato, após incubação de outros 15 min a temperatura ambiente, as absorbâncias de cada posse foram obtidas com leitor de placa. Os resultados foram determinados a partir de curva de calibração de fosfato inorgânico. Para determinação de atividade de PP2A específica os valores obtidos nas reações com ácido okadáico foram subtraídos dos valores para as reações na ausência do inibidor de PP2A.

3.12. Ensaio de atividade de PTEN pelo método de verde de malaquita

Após 48 horas da transfecção dos vetores de interesse nas células HEK293, estas foram lisadas com tampão Hepes-NaOH 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 2 mM, NP-40 0,1%, glicerol 10%, PMSF 1 mM, DTT 1 mM e coquetel de inibidor de proteases (SIGMA). Na co-imunoprecipitação (co-IP) foram usadas 500 µg de proteínas. O extrato proteico foi incubado com anti-PTEN conforme o protocolo descrito no relatório anterior, para co-imunoprecipitação da PTEN. O produto da co-IP foi incubado por 3 horas com 3 µL de uma solução 1 mM PIP3 (Echelon Biosciences). O fosfato liberado na reação foi medido com o kit *Malachite Green Phosphatase Assay* (Echelon Bioscience), conforme as indicações do fabricante. Neste ensaio foi realizada uma curva padrão com Pi (nas concentrações de 200 a 2000 pmol/poço) para determinação da concentração molar do fosfato liberado na reação de desfosforilação pela PTEN.

3.13. Ensaio de viabilidade celular com rezasurina

Células HEK293 superexpressando as proteínas de interesse foram incubadas com Alamar Blue/Rezasurina (Fisher Scientifics) 0,01 mg/ml durante 4 horas ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram analisadas para viabilidade em 3 poços para cada grupo com o método colorimétrico (600nm). O Alamar Blue é um indicador fluorescente/colorimétrico com a propriedade redox. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). Após o período de incubação o meio foi transferido para placa de ELISA e a absorbância avaliada a 600 nm utilizando o espectrofotômetro de fluorescência F-4500 (Hitachi).

3.14. Quantificação por ELISA de PTEN fosforilado em S380

Para análise quantitativa de PTEN fosforilado foi utilizado o kit *PathScan Phospho-PTEN (S380) Sandwich ELISA* (Cell Signaling). O ensaio foi realizado de acordo com as indicações do fabricante com células HEK293 superexpressando a subunidade B56Δ a SET e tratadas com 50 e 250 µM de t-BHP e 250 e 500 µM de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi avaliada a 450 nm utilizando um leitor automático de microplaca (50 MPR, Varian).

3.15. Fracionamento de proteínas citoplasmáticas e nucleares

O fracionamento foi desenvolvido com o *kit ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction* (Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante.

3.16. Plasmídeos para *short hairpin RNA* (*shRNA*)

Os plasmídeos para silenciamento do RNAm de PTEN foram obtidos da Sigma-Aldrich em dois vetores diferentes: pLKO.1-puro (TCR1) e TCR2-pLKO-puro (TCR2) (Tabela 4).

Tabela 4- Plasmídeos contendo *shRNA* para RNA de interferência contra PTEN.

Identificação	Número TCR	Sequência do <i>shRNA</i>
<i>shCN</i> TCR1 (Non-Mammalian Target)	SHC002	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACT C
<i>shCN</i> TCR2 (Non-Mammalian Target)	SHC202	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACT C
<i>sh2745</i> TCR1	TRCN0000002745	CCGGAGGCGCTATGTGTATTATTATCTC GAGATAATAATACACATAGCGCCTTTTT T
<i>sh2747</i> TCR1	TRCN0000002747	CCGGCTAGAACTTATCAAACCCTTTCTC GAGAAAGGGTTTGATAAGTTCTAGTTTT T
<i>sh2748</i> TCR1	TRCN0000002748	CCGGCGTGCAGATAATGACAAGGAACT CGAGTTCCTTGTCATTATCTGCACGTTTT T
<i>sh219043</i> TCR2	TRCN0000219043	GTACCGGGGGCTTTAACTGTAGTATTTG CTCGAGCAAATACTACAGTTAAAGCCCT TTTTTG
<i>sh230370</i> TCR2	TRCN0000230370	CCGGCCACAAATGAAGGGATATAAACT CGAGTTTATATCCCTTCATTTGTGGTTTT TG

Os plasmídeos para silenciamento do RNAm da subunidade B56 Δ da PP2A foram obtidos da Sigma-Aldrich em dois vetores diferentes: pLKO.1-puro (TCR1) e TCR2-pLKO-puro (TCR2) (Tabela 5).

Tabela 5- Plasmídeos contendo *sh*RNA para RNA de interferência contra PP2A B56Δ.

Identificação	Número TCR	Sequência do <i>sh</i> RNA
<i>sh</i> CN TCR1 (Non-Mammalian Target)	SHC002	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAAC TC
<i>sh</i> CN TCR2 (Non-Mammalian Target)	SHC202	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAAC TC
<i>sh</i> 367676 TCR2	TRCN0000367676	CCGGAGTCTGACTGAGCCGGTAATTCT CGAGAATTACCGGCTCAGTCAGACTTT TTTG
<i>sh</i> 2552 TCR1	TRCN0000002552	CCGGGAGTTCTTCTTACGTTTCCTTCT CGAGAAGGAAACGTAAGAAGAACTCT TTTT
<i>sh</i> 2555 TCR1	TRCN0000002555	CCGGGTGGACAATAACTGATGAATAC TCGAGTATTCATCAGTTATTGTCCACT TTTT
<i>sh</i> 10715 TCR1	TRCN0000010715	CCGGCCAGCCAAACATAGCCAAGAAC TCGAGTTCTTGGCTATGTTTGGCTGGT TTTT
<i>sh</i> 356029 TCR2	TRCN0000356029	CCGGCAATCCATGGACTGATCTATACT CGAGTATAGATCAGTCCATGGATTGTT TTTTG

3.17. Análise de Expressão de RNA

3.17.1. Extração RNA total

As células foram lisadas diretamente na placa de cultura pela adição de 1mL de Trizol para cada 3,5cm de placa. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 200µL de clorofórmio, e as amostras, centrifugadas a 12000xg por 15 minutos a 4°C. Ao sobrenadante foram adicionados 500µL de isopropanol, e após 10 minutos a temperatura ambiente e realizada nova centrifugação. O pellet foi, então, lavado com 1mL de etanol 75% (com água livre de DNase e RNase). Depois de serem vortexadas, as amostras foram centrifugadas a 7500xg por 5 minutos a 4°C. As amostras foram resuspendidas em 20µL de H₂O livre de RNases e incubadas por 10 minutos a 60°C. A quantificação do RNA total foi realizada aplicando-se 2µL das amostras no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Science - USA) em comprimento de onda de 230nm, além de considerar a relação entre os comprimentos de ondas 260/280nm e 260/230nm para avaliação da qualidade das amostras e a integridade das

bandas 30S e 50S em gel de agarose com MOPS e formaldeído. 20µg do RNA foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega) conforme as especificações do fabricante. Em seguida, o RNA tratado foi purificado com 100µL de fenol:clorofórmio:álcool (25:24:1) para cada 50µL de amostra e precipitado com acetato de sódio 0,3M pH 5.3 e etanol 70% (v/v). O pellet foi resuspendido em 12µL de água RNase Free.

As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento do uso.

3.17.2. Gel de agarose de qualidade para RNA

Para verificar a integridade do RNA extraído, as bandas correspondentes às subunidades 30S e 50S foram avaliadas em gel de agarose. No gel preparado com 1,2% de agarose em tampão FA (MOPS 20mM pH 7.0, NaOAc 5mM, EDTA 10 mM) e formaldeído 2% (v/v) em água livre de RNase foi aplicado 1µg de RNA para cada amostra, após a adição de *loading buffer* contendo azul de bromofenol 0,25%, EDTA 4mM, formaldeído 0,9M e glicerol 20% (v/v), formamida 30,1%, tampão FA 1X em água livre de RNase. A eletroforese foi realizada a 100 volts e o RNA corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) visualizado sob UV. Para análise foram utilizados os marcadores de peso molecular 1 Kb DNA *Ladder* (Invitrogen e Fermentas).

3.17.3. Síntese de DNA complementar (cDNA) total

Cerca de 5µg do RNA total extraído de linhagens celulares foi aplicado na produção do cDNA utilizando oligos *oligo dT* e *Randon Primer* com o kit *Go Script Reverse Transcriptase* (Promega) conforme as especificações do fabricante. O produto amplificado foi quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Science - USA). Para o RT-PCR foi desenvolvida uma curva de 50, 100 e 200 ng de cDNA para determinar qual a quantidade apropriada para a amplificação do gene PTEN, com os oligos para PTEN total (NM_000314.4). Também foi realizada PCR gradiente (43°C a 60°C) para determinar a temperatura de anelamento ideal para os oligos PTEN total, PTEN B e PTEN Δ. Como controles foram utilizados os oligos para amplificação do GAPDH e RNA extraído de leucócitos do sangue periférico.

3.17.4. Eletroforese em gel de agarose

No gel preparado com 1% de agarose em tampão TAE (tris-base 40mM pH 7.2, NaOAc 20mM, EDTA 1 mM) foram aplicadas as amostras, após a adição de *loading buffer* contendo

xilenocianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%. A eletroforese foi realizada a 100 volts, o DNA corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado sob UV. Para análise foram utilizados os marcadores de peso molecular 1 Kb DNA *Ladder* (Invitrogen ou Fermentas).

3.17.5. One Step Superscript

Como alternativa ao método de síntese de cDNA total, foi realizada a amplificação direta do RNA alvo utilizando a enzima SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados oligos específicos para a subunidade catalítica alpha da PP2A (PP2A Cα) (NM_002715.2).

3.17.6. PCR em tempo real

A amplificação e a quantificação dos transcritos alvo foram realizadas por PCR em tempo real usando *EVA Green* (Uniscience). A reação foi montada para um volume final de 10µL, contendo 5µL de master mix (*Fast EvaGreen*, Uniscience), 0,3µM de cada primer e 100ng de cDNA. A ciclagem utilizadas foi 96°C – 2min e 45 repetições de 96°C – 15seg, 59-65°C – 10seg e 72°C – 25seg. Em cada análise de PCR em tempo real foram amplificados ao menos dois genes constitutivamente expressos (*beta-globina*, *GAPDH*) para normalização. O cálculo da expressão diferencial dos genes foi feito pela quantificação relativa pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O equipamento utilizado foi o Eppendorf Mastercycler Realplex 4 S (Eppendorf). Os iniciadores utilizados para detecção dos transcritos alternativos de PTEN total, PTEN B e PTEN Δ, descritos por Sharrard e Maitland (2000). Os PCRs para células tratadas com TSA e 5-azadeoxicitidina e HN12 *shCN* e HN12 *shSET* foram desenvolvidos com sonda específica PrimeTime Mini qPCR Assay para PTEN (IDT).

3.17.7. Oligonucleotídeos

Os oligos utilizados para a amplificação dos transcritos do gene PTEN (PTEN total, B e Δ) por RT-PCR foram os mesmos descritos por Sharrard e Maitland (2000) e estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Oligos utilizados para RT-PCR para transcritos do gene PTEN humano.

Identificação	Primer	Sequência (5'—3')	Amplicon (pb)
PP2A C α (NM_002715.2)	<i>Foward</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTG GACGAGAAGGTGTTCCACC	930
	<i>Reverse</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCTTACAGGAAGTAGTCTGGGGT	
PTEN total (NM_000314.4)	<i>Foward</i>	ATGACAGCCATCATCAAAGA	1212
	<i>Reverse</i>	GGATCCTCAGACTTTTGTAAATTTG	
PTEN B	<i>Foward</i>	PTEN total Foward	721
	<i>Reverse</i>	GGATCCTGCCTCAGCATCCTGAGTAG	
PTEN Δ	<i>Foward</i>	PTEN total Foward	1096
	<i>Reverse</i>	TGATCGGATCCAAACACACATCACATACATAC	

Os oligos usados para PCR em tempo real para os transcritos foram desenhados seguindo a descrição de Sharrard e Maitland (2000) e estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Oligos para PCR em tempo real usando *EVA Green*.

Identificação	Primer	Sequência (5'—3')	Extensão (pb)
PTEN total	<i>Foward</i>	GTGAAGCTGTACTTCACAAAA	186
	<i>Reverse</i>	TCAGACTTTTGTAAATTTGTGT	
PTEN B	<i>Foward</i>	GCAAATTTTAAAGGCACAAG	174
	<i>Reverse</i>	ATCTCTTGACCTTGTGATCCG	
PTEN Δ	<i>Foward</i>	GCAGATAATGACAAGGAATAT	161
	<i>Reverse</i>	AAACACACATCACATACATAC	

3.18. Bioanalyser

A amostra de RNA extraída da linhagem celular HeLa foi selecionada para análise no bioanalyser. Para tanto, a amostra, os padrões e o marcador foram aplicados no chip *RNA Pico*

LabChip (Agilent Technologies) e analisados no aparelho 2100 Bioanalyser (Agilent), conforme as indicações do fabricante.

4. Resultados 1

4. Resultados – Parte 1

4.1. Construções para a SET, regiões da SET e mutantes da SET

Dados anteriores do nosso grupo, mostraram que a superexpressão da proteína SET altera o *status* de fosforilação da proteína PTEN (Leopoldino *et al.*, 2011). Assim, para entendermos melhor a interação das proteínas PTEN e PP2A foram construídas regiões da proteína SET (inibidor de PP2A) com mutações em sítios considerados importantes para sua regulação e ligação em PP2A. A escolha das mutações foi determinada com base no estudo de conformação das proteínas SET e PP2A (Apêndice I) e dados publicados por Mukhopadhyay *et al.* (2009) mostrando que a mutação no resíduo de Lis209 (K209) resulta na inibição da interação entre SET e PP2A e estão apresentadas abaixo (Figura 8). As construções de DNA foram obtidas, sequenciadas e utilizadas para os estudos de fosforilação envolvendo PTEN-PP2A-SET.

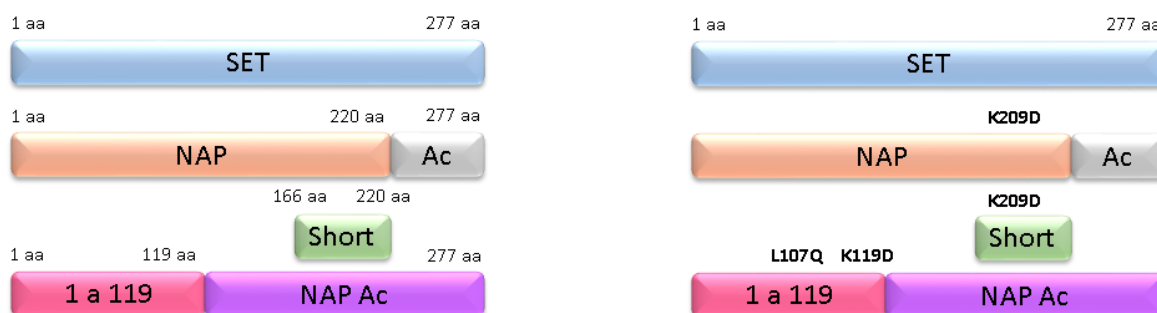


Figura 8. Construções para SET, suas regiões e mutações escolhidas para determinar o sítio de ligação da SET a PP2A. Ilustração esquemática das construções de DNA obtidas para SET (esquerda) e as mutações estão identificadas na figura à direita. A proteína SET apresenta no total 277 aminoácidos (aa) e peso molecular aparente de 39 kDa, quando clivada, libera dois domínios: NAP que possui homologia a família de proteínas NAP (Nucleosome Assembly Protein) e o domínio Ácido, que contém a calda C-terminal. A partir desses domínios foram construídos também a região 1 a 119 contendo a calda N-terminal até o resíduo 119 da proteína SET; região NAP Ac contendo parte da região NAP e o domínio Ácido (a partir do resíduo 119 até 277); e a região NAP Short construída com os resíduos de 166 a 220. Além dessas regiões, foram inseridas mutações nos resíduos de Leu107 (L107), Lis119 (K119) e Lis209 (K209).

Conforme descrito em métodos, os clones contendo as regiões de interesse (SET, NAP K209, NAPAc Short, NAPAc Short K209D e 1 a 119 K119D_L107Q) foram selecionados por PCR. Na Figura 9, os fragmentos entre 1000 e 1650 pb (canaletas 3, 5, 7 e 13) representam os clones com inserto para SET total, cuja extensão deve conter os 833 nucleotídeos da SET

acrescidos em torno de 100 nucleotídeos das regiões flanqueadoras do vetor (indicação pela seta).

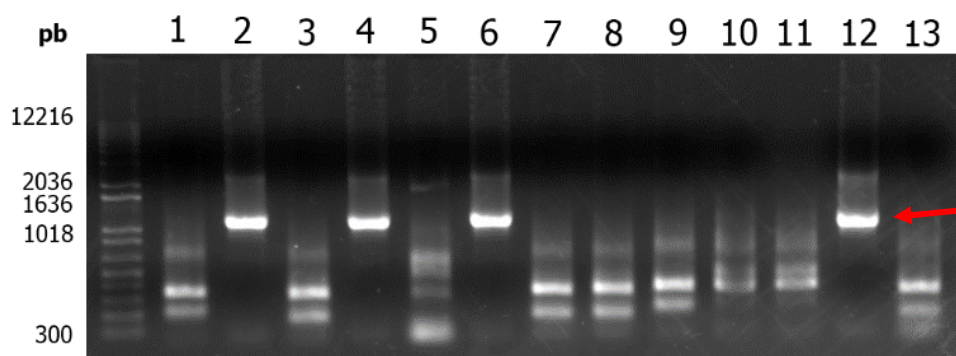


Figura 9. Construção do vetor de expressão com sequência da SET. Seleção por PCR dos plasmídeos contendo os fragmentos de interesse. Gel de agarose 1% corado com *Gel Red* (Biotium). Canaletas 1: padrão de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); nas canaletas de 2 a 14: produto da PCR de colônia para vetor pDONR com inserto para SET.

Os clones do vetor de expressão para a região NAP K209D confirmados por PCR de colônia foram os clones 6, 7, 11 e 13, os quais apresentaram uma banda bem definida entre 700 e 800 pb (Figura 10).

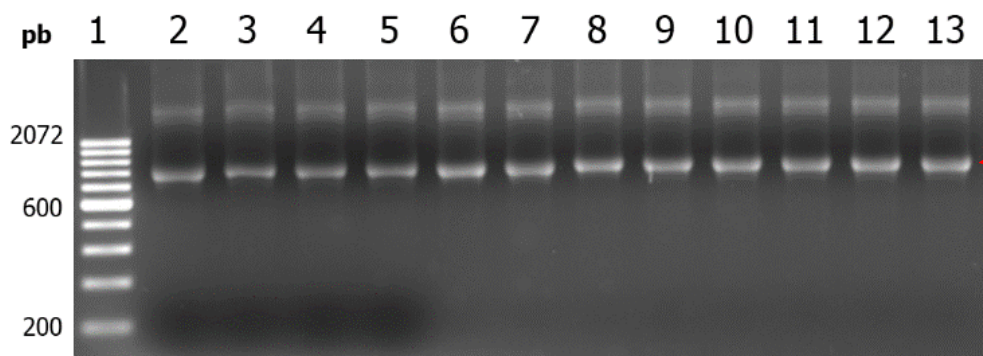


Figura 10. Construção do vetor de expressão com sequência da região NAP K209D. Identificação por PCR dos plasmídeos contendo os fragmentos de interesse. Gel de agarose 1% corado com *Gel Red* (Biotium). Canaletas 1: padrão de peso molecular de 1 Kb (Fermentas); nas canaletas de 2 a 13: produto da PCR de colônia para vetor pDONRTM/ZEO com oligos M13 forward e reverse para os clones de 1 a 12. Tamanho do amplicon esperado ~800 pb (seta).

A identificação dos fragmentos entre 400 e 500 pb nas canaletas 7, 8 (Figura 11 A), indica a recombinação correta do DNA da região NAPAc Short e da região NAPAc Short K209D na canaleta 10 (Figura 11 B); a presença de uma banda próxima a 600 pb indica que o vetor de entrada deve conter a região 1a119 K119D_L107Q nas canaletas 2 e 5 (Figura 11 B).

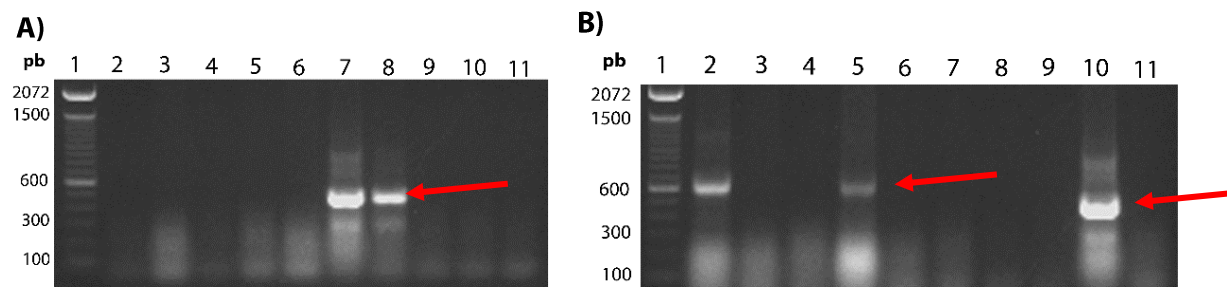


Figura 11. Construção dos vetores de expressão com seqüências NAPAc Short (A), NAPAc 1 a 119 L107Q/K119D. Identificação por PCR dos plasmídeos contendo os fragmentos de interesse. Gel de agarose 1% corado com *Gel Red* (Biotium) com produto da PCR de colônia. Em A) canaleta 1: marcador de peso molecular 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen); canaletas de 2 a 11: vetor pDONRTM/ZEO com oligos M13 *forward* e *reverse* para clones obtidos com NAPAc Short. Em B) canaleta 1: marcador de peso molecular 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen); nas canaletas de 2 a 6: 1a119 L107Q/K119D com tamanho de amplicon esperado ~600pb (seta) clones 1, 2, 3, 4 e 5; nas canaletas de 7 a 11: NAPAc Short K209D de tamanho de amplicon esperado ~400 pb (seta) clones 1, 2, 3, 4 e 5.

Os clones selecionados foram sequenciados e as seqüências de DNA obtidas foram alinhadas com a seqüência do transcrito 2 do gene SET disponível no GenBank (NM_003011.3). As seqüências foram deduzidas a aminoácidos utilizando a ferramenta online ExPASy server (<http://www.expasy.org/>) (Gasteiger *et al.*, 2003) e alinhadas com a seqüência de aminoácidos da proteína SET por meio do programa MULTIALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988). Apenas após essa confirmação os clones obtidos foram utilizados nos ensaios de expressão em células HEK293. A Figura 12 mostra os alinhamentos de um dos clones selecionados para **NAPAc Short K209D**, as seqüências obtidas para os outros clones selecionados para este estudo foram incluídas no Anexo II desse documento.

A seqüência analisada apresentou 99% de identidade e pareamento exclusivo com a seqüência da variante 2 da SET disponível no GenBank (NM_003011.3) (Figura 12 A). A mutação sítio-específica para o resíduo de lisina (K) 209 foi confirmada pela substituição pelo resíduo de ácido aspártico (D) indicados em azul (Figura 12 B).

A)

NAPAc Short K209D pcDNA3.1 – T7 (Fw) – 05-01-14

Homo sapiens SET nuclear oncogene (SET), transcript variant 2, mRNA
 Sequence ID: [ref|NM_003011.3|](#) Length: 2936 Number of Matches: 1
 Range 1: 849 to 1014 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
296 bits(160)	5e-77	164/166(99%)	0/166(0%)	Plus/Plus
Query 136	TTGACGAAACGTTTCGAGTCAAACGCAGAATAAAGCCAGCAGGAAGAGGCCAGCATGAGGAA	195		
Sbjct 849	TTGACGAAACGTTTCGAGTCAAACGCAGAATAAAGCCAGCAGGAAGAGGCCAGCATGAGGAA	908		
Query 196	CCAGAGAGCTTCTTTACCTGGTTTACTGACCATCTCTGATGCAGGTGCTGATGAGTTAGGA	255		
Sbjct 909	CCAGAGAGCTTCTTTACCTGGTTTACTGACCATCTCTGATGCAGGTGCTGATGAGTTAGGA	968		
Query 256	GAGGTCATC GAT GATGATATTTGGCCAAACCCATTACAGTACTACT	301		
Sbjct 969	GAGGTCATC AAA GATGATATTTGGCCAAACCCATTACAGTACTACT	1014		

B)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
SET, var2	MSAPAAKYSKKELNSNHGADETSEKEQERIEIHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQPFQKRSELIIAKIPNFHYVTFVNH									
NAPAcShortK209D									
Consensus									
	91	100	110	120	130	140	150	160	170	180
SET, var2	QVSALLGEEDEEALHYLTRVEVTEFEDIKSGYRIDFYDENPYFENKVLSEKFLNESGDPSSKSTEIKKSGKDLTKRSSQTQNKASRK									
NAPAcShortK209DLTKRSSQTQNKASRK									
ConsensusLTKRSSQTQNKASRK									
	181	190	200	210	220	230	240	250	260	270
SET, var2	RQHEEPESFFTFTHSDAGADELGEVIKDDIWPNLQYYLVPDMDDEEGEGEEDDDDDDEEGLDIDEEGDEDEGEEDDDDEGEEGE									
NAPAcShortK209D	RQHEEPESFFTFTHSDAGADELGEVIDDDIWPNLQYY									
Consensus	RQHEEPESFFTFTHSDAGADELGEVIDDDIWPNLQYY.....									
	271	277								
SET, var2	EDEGEDD									
NAPAcShortK209D									
Consensus									

Figura 12. Sequência da região da NAPAc Short K209D do DNA recombinante obtido. (A) Análise da sequência obtido do clone selecionado para a região NAPAc Short K209D usando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Morgulis et al., 2008) e (B) alinhamento da sequência de aminoácidos usando MULTIALIN. A mutação inserida está destacada em azul.

4.2. Verificação e análise dos DNAs recombinantes contendo os cDNAs das subunidades regulatórias das proteínas PP2A e PTEN-GFP

Os clones obtidos pela *Addgene* para expressão das subunidades regulatórias B da proteína PP2A foram amplificados em *E. coli* e digeridos com enzimas de restrição (Figura 13).

Na Figura 13, canaleta 2, a banda próxima a 2 kb mostra o inserto cDNA PTEN (Liu *et al.*, 2005) e a banda acima de 5 kb refere-se ao vetor com GFP; na canaleta 4, a banda próxima a 8 kb refere-se ao vetor pMIG FLAG B55alpha (PP2A B55 α), a banda próxima a 3 kb (canaleta 5) refere-se ao inserto pCEP-4HA B56alpha (PP2A B56 α), a banda acima de 2 kb (canaleta 6) refere-se ao inserto pCEP-4HA B56beta (PP2A B56 β) e a banda acima de 12 kb (canaleta 7) refere-se ao vetor pCEP-4HA B56delta (PP2A B56 Δ). A canaleta 3 apresenta o produto da digestão do vetor contendo Akt1, utilizado como controle em alguns experimentos.

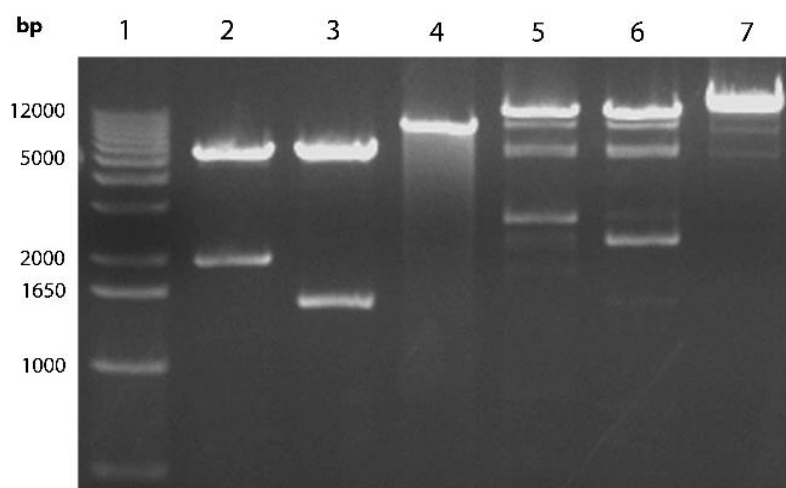


Figura 13. Digestão dos vetores obtidos da plataforma Addgene contendo cDNA para as subunidades regulatórias B da proteína PP2A. Gel de agarose 1% corado com *Gel Red* (Biotium). Na canaleta 1: marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), canaleta 2: produto da digestão do vetor GFP-PTEN com as enzimas de restrição *Hind III* e *EcoRI*, canaleta 3: produto da digestão do vetor de Akt1 com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*, canaleta 4: produto da digestão com a enzima *EcoRI* do vetor pMIG FLAG B55alpha, canaleta 5: produto da digestão com as enzimas *Not I* e *Xho I* para o vetor pCEP-4HA B56alpha, canaleta 6: produto da digestão do vetor pCEP-4HA B56beta com as enzimas *Not I* e *Xho I*, e canaleta 7: produto da digestão do vetor pCEP-4HA B56delta com a enzima *Not I*.

Para confirmar a expressão das proteínas estudadas, células HEK293 foram transfectadas com diferentes vetores e as células lisadas foram analisadas por *Western blot* (Figura 14). A figura mostra a expressão de SET, T7-Akt (Figura 14 A); GFP-PTEN (Figura 14 B); PP2A B56 α , PP2A B56 β , PP2A B56 Δ e PP2A B55 α (Figura 14 C).

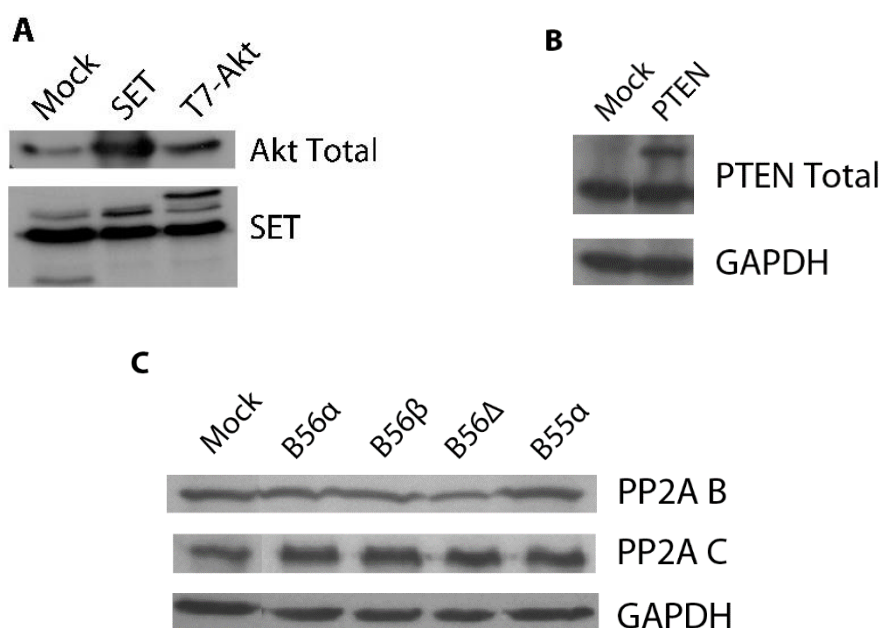


Figura 14. Análise da expressão das proteínas de interesse utilizando os vetores obtidos da Addgene em células HEK293. *Western blot* dos extratos proteicos obtidos de células HEK293 após 48h de transfecção com os vetores para as proteínas SET, T7-Akt, PTEN-GFP, e subunidades B da PP2A. Em A) Análise da proteína T7-Akt e SET em comparação ao controle (não transfectado; Mock. Em B) Proteína GFP-PTEN identificada usando anti-PTEN por WB. Em C) As proteínas PP2A sub B foram identificadas usando anti-PP2A B.

4.3. Análise do efeito da SET total e mutada na atividade da fosfatase PP2A e PTEN

Os vetores contendo SET e suas regiões foram transfectados em células HEK293 para análise de expressão das proteínas recombinantes por *Western blot*. Como controles foram utilizadas as células HEK293 tanto tratadas com o reagente de transfecção na ausência de DNA plasmidial (Mock); além dos vetores de expressão de PTEN (controle positivo) e PP2A B56Δ (Figura 15).

Observamos um aumento nos níveis de PTEN total quando a proteína SET é superexpressa, assim como para algumas regiões da SET. As mutações nos resíduos K209D e L107Q/K119D aumentaram os níveis de PTEN fosforilado, quando comparadas com seus controles sem mutação (NAP, 1 a 119, e NAP short). Desse modo essas regiões demonstraram maior potencial para regulação de PTEN (Figura 15).

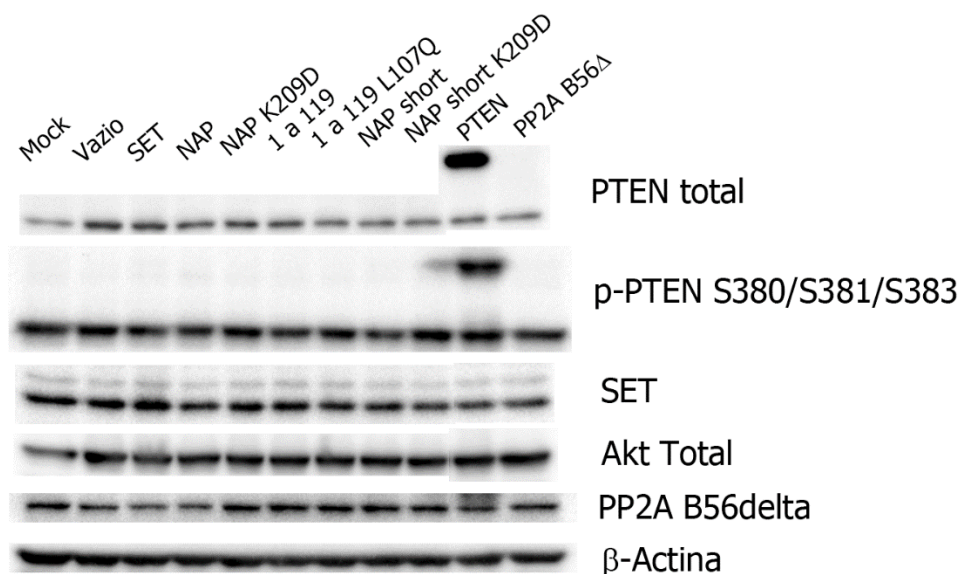


Figura 15. Análise da expressão dos vetores construídos para a SET e SET com mutações. *Western blot* (WB) usando os lisados proteicos (10 μ g) de células HEK293 transfectadas com vetores para expressão das proteínas SET e suas regiões bem como PTEN e PP2A B56 Δ utilizando os anticorpos específicos para as proteínas de interesse. Anti-beta-actina foi usado como controle endógeno.

Afim de relacionar essa modulação de fosforilação de PTEN sobre a atividade de PP2A, foi determinada a atividade de PP2A em células HEK293 com superexpressão da SET e suas regiões, assim como para o vetor vazio e o vetor para PTEN, foram quantificadas utilizando o *Kit Ser/Thr Phosphatase Activity Assay* (Promega) (Figura 16). A análise da atividade de PP2A em células com superexpressão de SET e das regiões da SET, revelou que as regiões 1 a 119 e Ac da SET possuem maior capacidade inibitória de PP2A, aproximando-se mais da inibição observada na presença da SET total. O papel principal da região ácida na inibição da PP2A (Figura 16) está de acordo com os dados sobre essa região encontrados na literatura (Arnaud *et al.*, 2011). Contudo o resultado obtido para a mutação L107Q/K119D da região 1 a 119 sugere que esta região é fundamental para a inibição de PP2A pela SET, pois foi capaz de reverter a inibição. A região NAP mostrou menor efeito inibitório na PP2A do que a região ácida, sendo assim escolhida para os estudos seguintes.

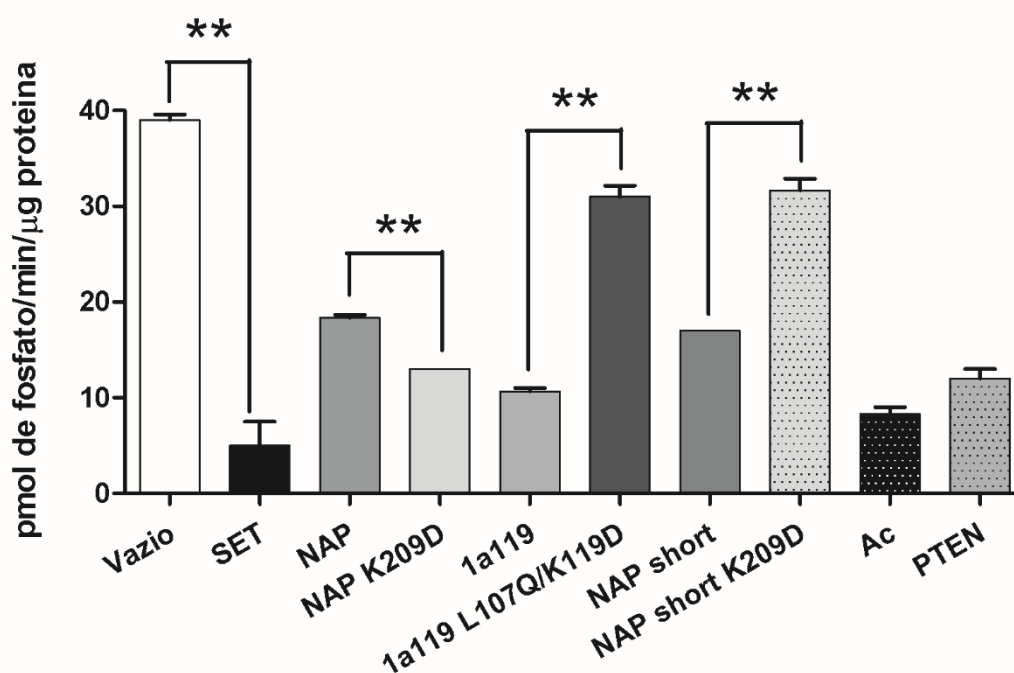


Figura 16. Identificação do sítio de ligação da SET à PP2A através de suas regiões e mutações sítio específicas. Gráfico representativo para atividade de PP2A medida em pmol de fosfatos em relação ao tempo de reação e a quantidade em µg de proteínas totais presentes nos lisados celulares analisados após normalização com reações na presença de ácido ocadáico (inibidor específico de PP2A). O acúmulo da SET resultou em inibição completa de PP2A, a qual foi revertida apenas pelas mutações L107Q/L119D presente na região 1 a 119. A região NAP e NAP short mostraram menor potencial inibitório de PP2A e a região ácida (Ac) a maior capacidade inibitória quando comparado a SET total. A superexpressão de PTEN mostrou efeito negativo na atividade de PP2A, quando comparado ao controle. Foram realizados três testes independentes. As colunas representam a média ± erro padrão da média. ** $p < 0,005$ comparado ao controle (Mock) (Teste *t' student* pareado).

4.4. Análise da interação PTEN-PP2A

A análise por *Western blot* das células HEK293 contendo superexpressão da SET e das subunidades B de PP2A mostrou que a superexpressão da subunidade B56Δ tem maior participação na desfosforilação da proteína PTEN em relação aos controles e às demais subunidades (Figura 17). Nota-se também aumento de PP2A C quando há aumento de SET e das subunidades B de PP2A.

A)

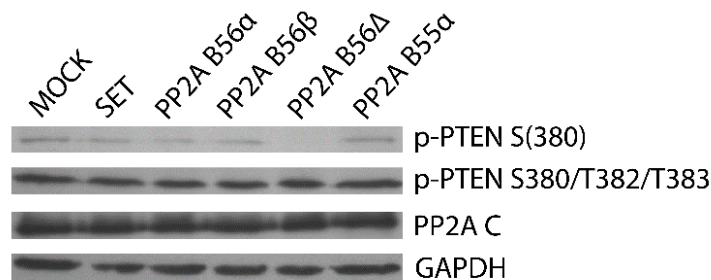


Figura 17. A subunidade B56 Δ de PP2A promove desfosforilação de PTEN em S380. Células HEK293 não transfectadas (Mock) ou transfectadas com vetores para superexpressão da proteína SET e subunidade B da PP2A, utilizando os anticorpos anti-PTEN (FL-403) (Santa Cruz), anti-p-PTEN S380 (Santa Cruz), anti-PP2A Subunidade C (Cell Signaling) e anti-GAPDH. A fosforilação do resíduo S380 foi negativamente regulado pela superexpressão da subunidade B56 Δ , contudo não pode ser observada alteração nos níveis na análise dos três resíduos de fosforilação (S380, T383, T383). As outras subunidades não mostraram potencial de regular nenhum dos resíduos de fosforilação de PTEN. PTEN e PP2A C foram analisados para avaliar os níveis totais e GAPDH foi usado como controle endógeno.

Para determinar se há interação entre as proteínas PTEN e a subunidade B56 Δ da PP2A foi realizado ensaio de co-imunoprecipitação (co-IP) com células HEK293 transfectadas com o vetor GFP-PTEN e com células superexpressando HA-PP2A B56 Δ (Figura 18). A presença da proteína PTEN nos produtos de co-IP com anticorpos anti-PP2A Subunit B e anti-HA (HA-PP2A B56delta) demonstra a interação da proteína PP2A com PTEN e de modo complementar, a presença de PP2A nos imunoprecipitados com anticorpos anti-PTEN, confirma a interação da proteína PTEN com a subunidade B da PP2A.

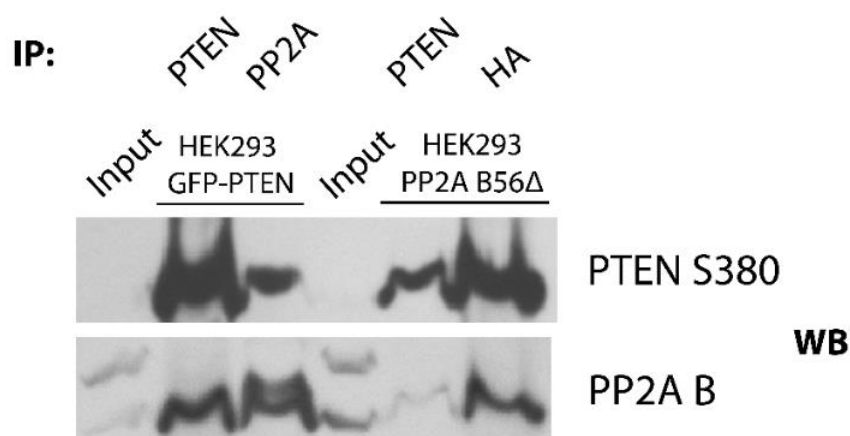


Figura 18. Interação molecular entre PTEN e PP2A B56 Δ . Para a co-IP das proteínas PTEN (IP: GFP-PTEN) e subunidade B56 Δ da PP2A (IP: PP2A-B56 Δ) foi utilizado extrato proteico obtido das células HEK293 com superexpressão de GFP-PTEN (Input) e HA-PP2A B56 Δ (Input). O Western blot foi realizado com anti-PTEN S380, anti-PP2A Subunit B.

A partir da confirmação da interação entre PTEN e PP2A B56 Δ , foi analisada a distribuição celular destas proteínas em células HEK293 transfectadas com GFP-PTEN e PP2A B56 Δ por imunofluorescência (Figura 19).

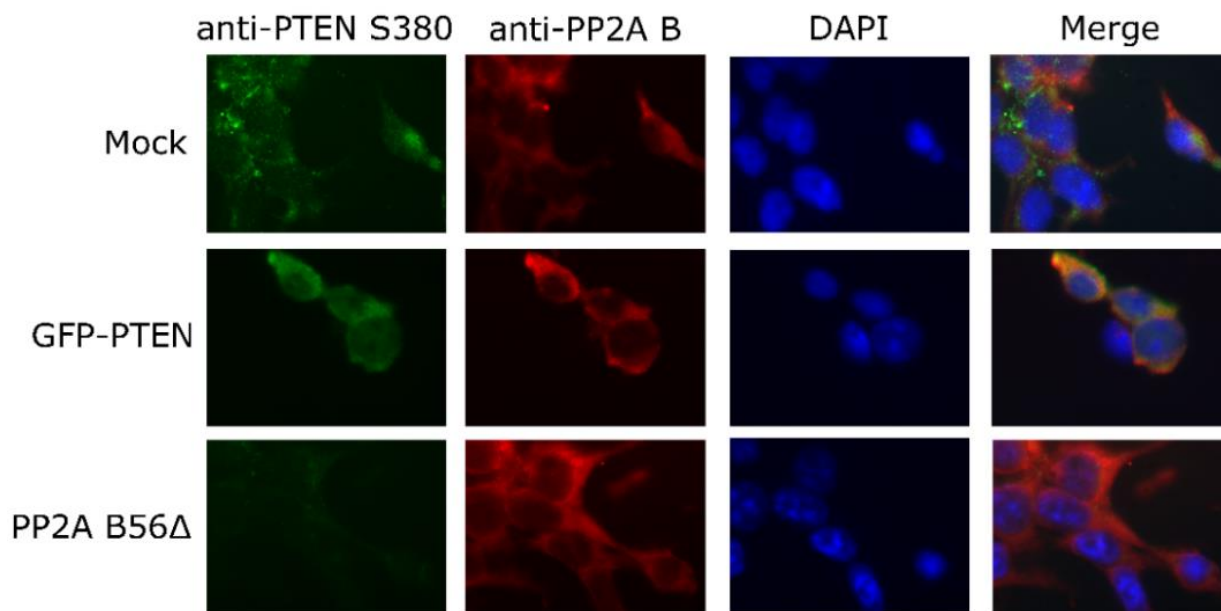


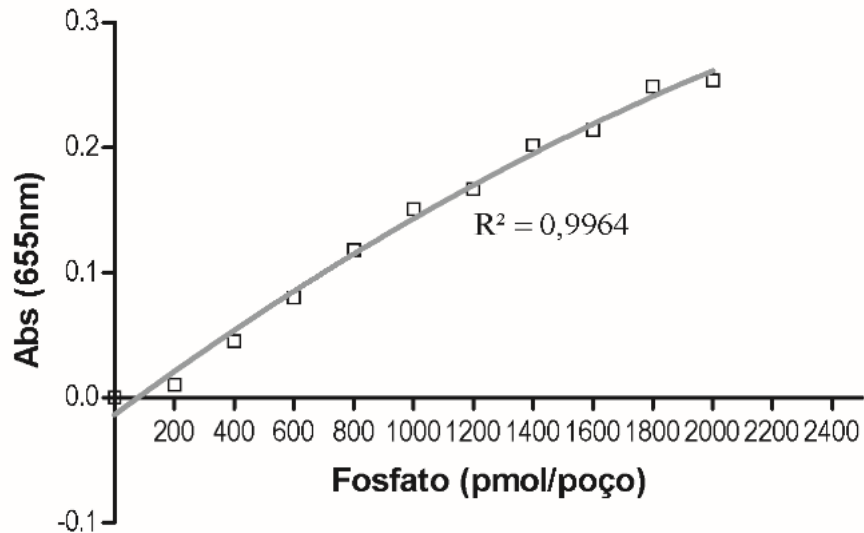
Figura 19. O aumento de PP2A B56 Δ promove redução de PTEN S380. Imunofluorescência das células HEK293 transfectadas com GFP-PTEN (verde), PP2A B56 Δ ou controle (Mock) marcadas com anti-PTEN S380 (verde), anti-PP2A subunidade B (vermelho) e DAPI. Aumento de 1000x usando Zeiss Axiovert 40 Fluorescence Microscope e Zeiss Axiovision 4.8.2 Software.

No acúmulo de PTEN e mesmo no controle (Mock) pode-se visualizar sobreposição das proteínas PTEN e PP2A (Figura 19, merge). Em contrapartida, a superexpressão de PP2A B56 Δ regulou negativamente os níveis de PTEN S380 nas células analisadas (Figura 19). Uma vez que a redução dos níveis de fosforilação de PTEN está relacionada à degradação de PTEN via proteassomo (Vazquez *et al.*, 2000), a superexpressão dessa subunidade, sugere que ao desfosforilar seus resíduos, resulta na redução também dos níveis de PTEN (Figura 19).

4.5. Atividade de PTEN

De modo a analisar se a variação nos níveis de fosforilação de PTEN tem efeito em sua atividade, foi realizado o ensaio de atividade de fosfatase baseado na detecção de fosfato liberado pela conversão de PIP3 em PIP2 por PTEN. A partir da equação quadrática obtida pela curva de calibração (Figura 20), foi determinada a atividade de PTEN em células HEK293

(Mock) e HEK293 transfectadas com vetores contendo SET, 1 a 119, 1 a 119 L107Q/K119D, PTEN e PP2A B56Δ, os resultados estão apresentados na Figura 21.



$$-1,92 \cdot 10^{-8} \cdot x^2 + 1,76 \cdot 10^{-4} - 1,34 \cdot 10^{-2} \text{ (Equação Quadrática)}$$

Figura 20. Curva de calibração de fosfato pelo kit de verde de malaquita. Os valores foram plotados em uma curva não-linear quadrada e a equação quadrática da reta foi utilizada para determinar os valores da reação amostral.

Como esperado, as células transfectadas com GFP-PTEN apresentaram maior atividade de fosfatase quando comparadas com o mock ($p = 0,0047$). As células com superexpressão de SET apresentaram aumento significativo ($p = 0,0104$, Figura 21) da atividade de fosfatase concordando o aumento nos níveis de PTEN total (Figura 15). A região 1 a 119 não apresentou aumento significativo na atividade de PTEN quando comparada ao controle (Mock), de outro modo, a região 1 a 199 L107Q/K119D apresentou aumento significativo ($p = 0,0262$, Figura 21) na atividade de PTEN quando comparada a seu próprio controle ao Mock. Os resultados observados para as regiões 1 a 119 e 1 a 119 L107Q/K119D confirmam a importância da atividade de PP2A na regulação de PTEN e que essa região da SET é importante no controle desse mecanismo. Os resultados apresentados nas Figuras 16 e 21 evidenciam que a região 1 a 119 mantém as características necessárias para que a SET possa interagir com PP2A e inibir sua atividade, embora essa inibição não seja suficiente para afetar PTEN, o seu mutante, 1 a 119 L107Q/K119D, ao perder o potencial de inibição de PP2A também resulta no aumento de atividade de PTEN, confirmando a hipótese de que na ausência da SET a proteína PP2A mais

ativa participa da desfosforilação de PTEN e regula positivamente sua atividade. As células transfectadas com PP2A B56 Δ não apresentaram alteração significativa na atividade PTEN, contrariando o esperado com base nos dados de fosforilação de PTEN S380.

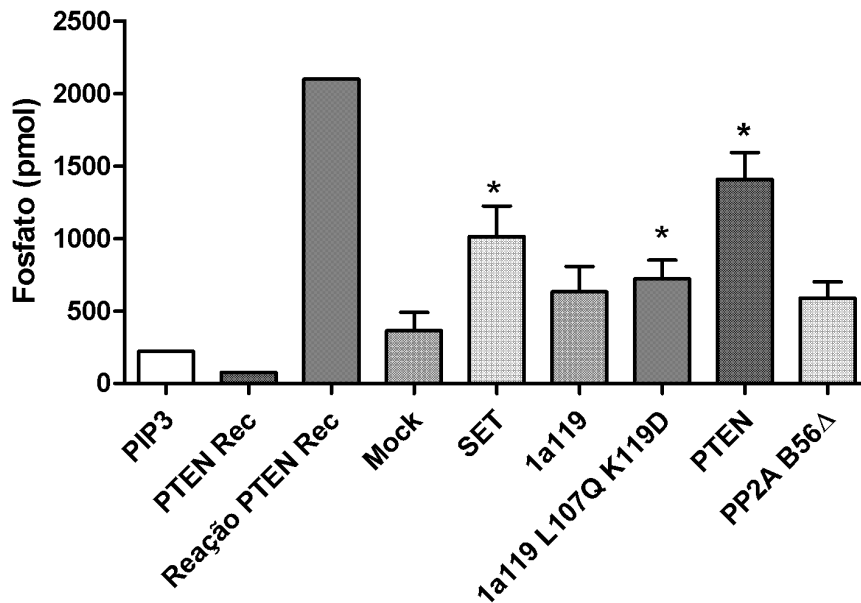


Figura 21. Efeito da proteína SET e suas regiões e PP2A B56delta sobre a atividade da fosfatase PTEN. Gráfico representativo da liberação de fosfato pela desfosforilação de PIP3 pela fosfatase PTEN, medida pelo método de verde de malaquita. Para determinar a atividade específica de PTEN o extrato proteico de células HEK293 (Mock) e HEK293 transfectadas com vetores contendo SET, 1 a 119, 1 a 119 L107Q/K119D, PTEN e PP2A B56 Δ foram utilizados no ensaio de co-IP com anti-PTEN. Foram usados como controles da reação o substrato PIP3 e 2,5 μ g da proteína PTEN recombinante purificada. A reação de PTEN recombinante foi utilizada como controle positivo. Foram realizados três testes independentes em duplicata. As colunas representam a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado ao controle (Mock) (Teste *t' student* não pareado).

Afim de entender melhor os efeitos dessas alterações em atividade de PP2A e PTEN observados no presente estudo, outras proteínas da via de sinalização de PI3K foram analisadas. Para relacionar os resultados obtidos no ensaio de atividade de PTEN com os efeitos na via de PI3K, os mesmos lisados foram utilizados nos ensaios de *Western blot* a seguir (Figura 22).

A transfecção com vetor para a SET induziu aumento nos níveis de PTEN total e fosforilado, assim como nos níveis de PP2A B56 Δ e Akt fosforilado. A região 1 a 119 L107Q/K119D quando comparada a região 1 a 119 sem mutação apresenta aumento nos níveis de p-PTEN S380, mas não nos níveis de p-PTEN S380/T381/383. A superexpressão de PP2A B56 Δ resultou em aumento dos níveis de PTEN total, p-PTEN S380/T381/383, p-Akt S473, reduzindo apenas os níveis de p-PTEN S380, o que pode explicar o baixo rendimento do lisado

no ensaio de atividade, uma vez que os três resíduos precisam estar desfosforilados para que a proteína esteja ativa (Vazquez *et al.*, 2000a; Rahdar *et al.*, 2009).

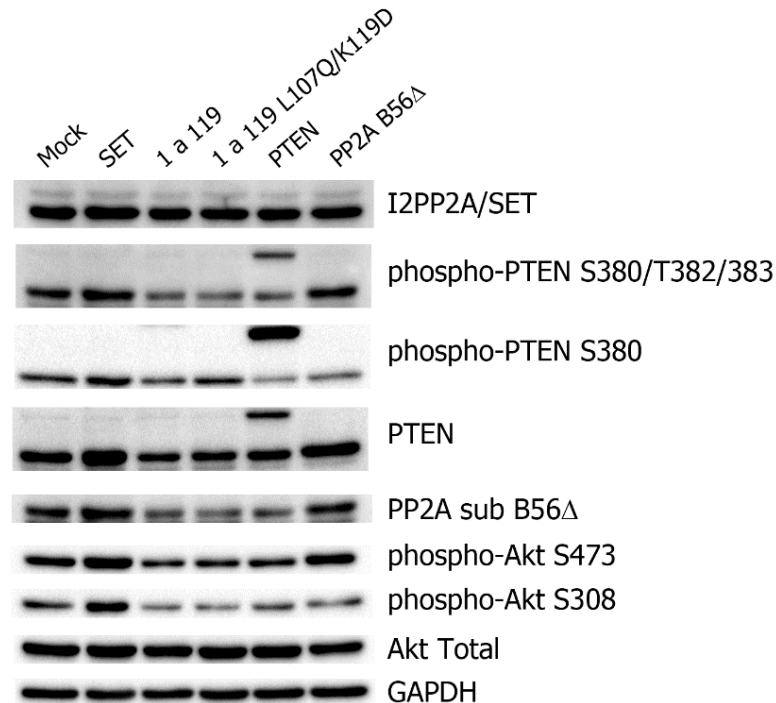


Figura 22. Modulação da via de PI3K/Akt pela SET, PP2A e PTEN. *Western blot* com os lisados de HEK293 não transfectada (Mock) e transfectadas com vetores para SET e suas regiões, PTEN e PP2A B56 Δ . Os anticorpos usados foram para SET, p-PTEN S380/T383/T383, p-PTEN S380, PTEN total, PP2A B56 Δ , p-Akt S473, p-Akt S308, Akt total e GAPDH.

Para confirmar essa hipótese as células foram marcadas com fluoróforos e analisadas por microscopia confocal (Figura 23). Apesar do aumento de expressão de PTEN induzido pela superexpressão de SET, não há um aumento na colocalização de PTEN e subunidade B de PP2A na presença de SET e 1 a 119, a colocalização dessas proteínas foi mais evidente no acúmulo de 1 a 119 mutada e da própria proteína PTEN, indicando que a perda de inibição de PP2A pela SET favorece a interação de PTEN e PP2A.

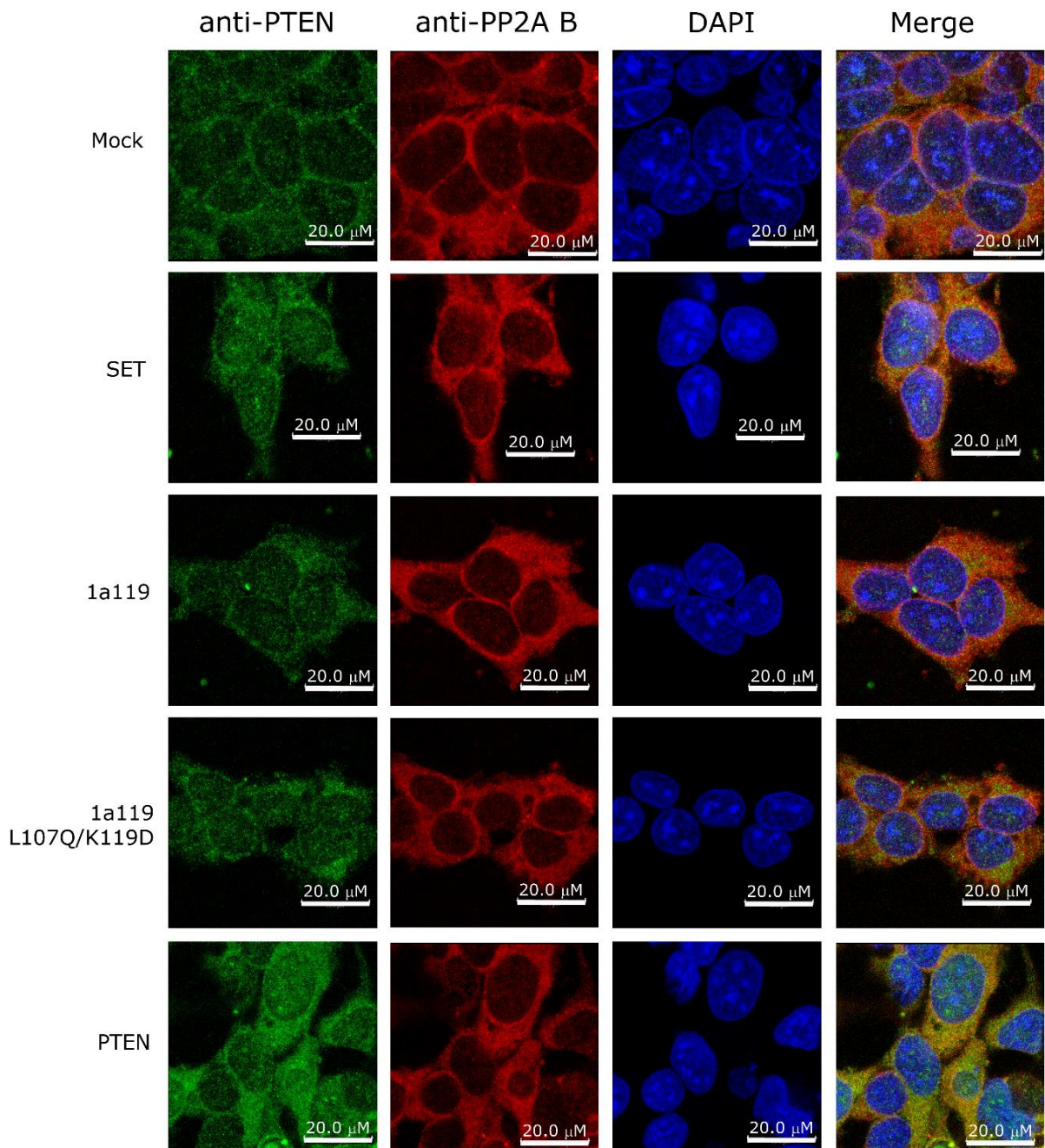


Figura 23. Efeito da SET e suas regiões sobre os níveis e distribuição de PTEN e PP2A B em células HEK293. As células imunomarcadas com anti-PTEN e anti-PP2A B foram fotografadas com microscópio Confocal de escaneamento laser Leica TCS SP8 (*Leica Microsystem*, Alemanha) utilizando objetiva de 63x com zoom digital de 3x. O fluoróforo *Alexa Fluor®* 488 (PTEN) e 550 (PP2A B) foram excitados com laser de 488 nm e 552nm laser, respectivamente, enquanto o DAPI foi excitado a 405nm. Foram adquiridas imagens de pelo menos 3 campos diferentes para cada condição.

4.6. Efeito das subunidades B de PP2A e de PTEN sobre a viabilidade celular

As células HEK293 transfectadas com os vetores utilizados para induzir superexpressão das proteínas estudadas tiveram sua viabilidade avaliada em comparação ao controle não

transfectado (Mock) (Figura 24). A indução da expressão das subunidades B56 α , B56 β de PP2A e de PTEN resultaram em aumento da viabilidade celular, contudo os outros vetores não foram capazes de alterar significativamente a viabilidade das células transfectadas.

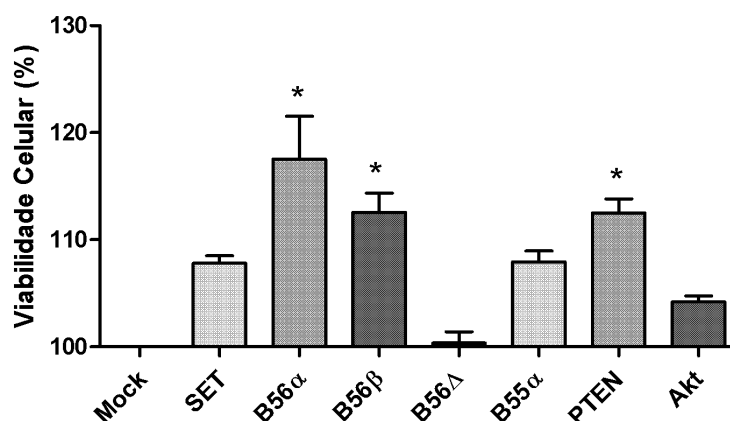


Figura 24. Efeito das subunidades B da PP2A e de PTEN na viabilidade celular. O gráfico mostra a viabilidade das células HEK293 não transfectada (Mock), e transfectadas com subunidade B56 α (B56alpha), B56 β (B56beta), B56 Δ (B56delta), B55 α (B55alpha) e PTEN, após normalização com células controle tratadas apenas com o reagente de transfecção (Mock). As amostras foram analisadas em triplicatas por ensaio de Resazurina. As colunas representam a média \pm erro padrão da média, * $p < 0,0001$. Como se tratam de amostras independentes, foi utilizada a análise estatística *One-way ANOVA*, *Bonferroni post test*.

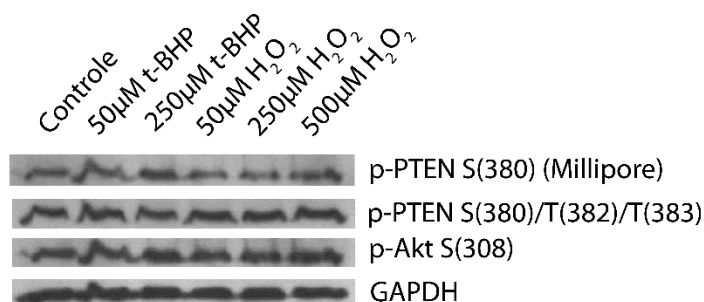
4.7. Estudo do Efeito do Estresse Oxidativo sobre PTEN

4.7.1. Regulação da fosforilação de PTEN por estresse oxidativo induzido por *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP) e peróxido de hidrogênio

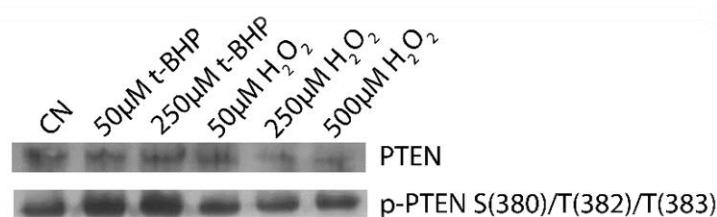
O *t*-BHP e peróxido de hidrogênio, frequentemente são utilizados para mimetizar a condição de estresse oxidativo encontrada nos tumores, e vários trabalhos relacionam o estresse oxidativo com a perda de função de PTEN (Lee *et al.*, 2002) e aumento de atividade de PP2A (Xu *et al.*, 2011a). Para avaliar o efeito do estresse oxidativo sobre a fosforilação de PTEN em nosso modelo, células HEK293 e a linhagem tumoral HN12 foram tratadas com *t*-BHP e peróxido de hidrogênio. As células HN12 e HEK293 foram incubadas com *t*-BHP 50 e 250 μ M e peróxido de hidrogênio 50, 250 e 500 μ M. As células HN12 foram incubadas nessas condições por 1 hora, enquanto as células HEK293 foram incubadas por 2 horas. Os lisados foram analisadas por *Western blot* para determinar o *status* de fosforilação de PTEN (Figura 25).

A Figura 25 mostra que, de maneira geral, os tratamentos com *t*-BHP não alteraram os níveis de PTEN para a linhagem HN12 (Figura 25 A), enquanto a linhagem HEK293 mostrou resposta dependente da presença ou ausência de soro bovino fetal. O tratamento na presença de SFB resultou em aumento dos níveis de PTEN fosforilado (S380/T383/T383) após incubação com *t*-BHP e redução nos níveis de PTEN após incubação com peróxido de hidrogênio (Figura 25 B). A retirada do SBF resultou na perda dessa modulação em células HEK293 (Figura 25 C).

A)



B)



C)

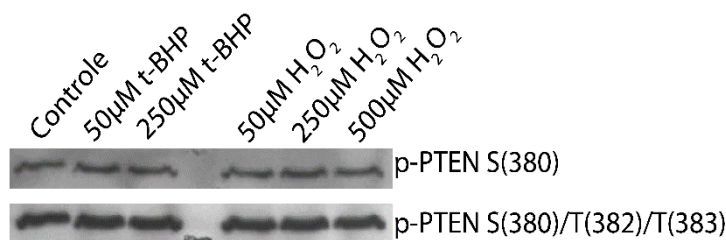


Figura 25. Efeito do *t*-BHP e peróxido de hidrogênio sobre a fosforilação de PTEN em células HEK293 e HN12. Em A) *Western blot* para análise do *status* de PTEN em células HN12 após tratamento com *t*-BHP e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 1 h; B) *Western blot* com lisado celular de HEK293 tratadas com agentes oxidantes por 2 horas cultivadas com meio DMEM completo; C) *Western blot* para células HEK293 tratadas com agentes oxidantes por 2 horas em meio DEMESM sem SBF.

Para verificar se os tratamentos foram capazes de induzir também a oxidação de PTEN, foi realizada a eletroforese em condição não redutora e imunomarcação com anti-PTEN. A

banda que aparece abaixo da banda normalmente marcada para PTEN (forma reduzida da proteína) refere-se a forma oxidada da proteína PTEN.

Como esperado (Leopoldino, Squarize, Garcia, Almeida, Pestana, Polizello, *et al.*, 2012), a concentração de 0,25 mM de peróxido de hidrogênio induziu a oxidação de PTEN e 1 mM foi suficiente para causar 100% de oxidação de PTEN em ambas as linhagens cultivadas na presença de SBF (Figura 26). Todavia o *t*-BHP possa induzir uma condição de estresse oxidativo no ambiente celular, não foi suficiente para oxidar a proteína PTEN na mesma proporção que o H₂O₂. A célula HN12 mostrou a presença da banda de PTEN oxidado na ausência do tratamento, enquanto a HEK293 somente mostrou PTEN na forma reduzida, indicando a presença de estresse oxidativo em condição de homeostase na linhagem HNSCC.

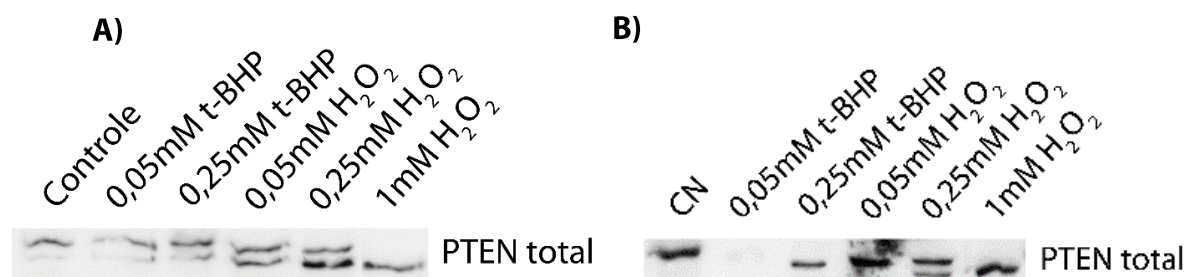


Figura 26. Efeito do estresse oxidativo induzido por *t*-BHP e H₂O₂ na oxidação de PTEN em células HN12 e HEK293. Western blot em condições não redutoras para identificação de PTEN oxidado em células HN12 (A) e HEK293 (B) após 2 horas de tratamento com as concentrações indicadas de *t*-BHP e H₂O₂ (0,05mM a 1,0 mM). Anticorpo utilizado para PTEN total.

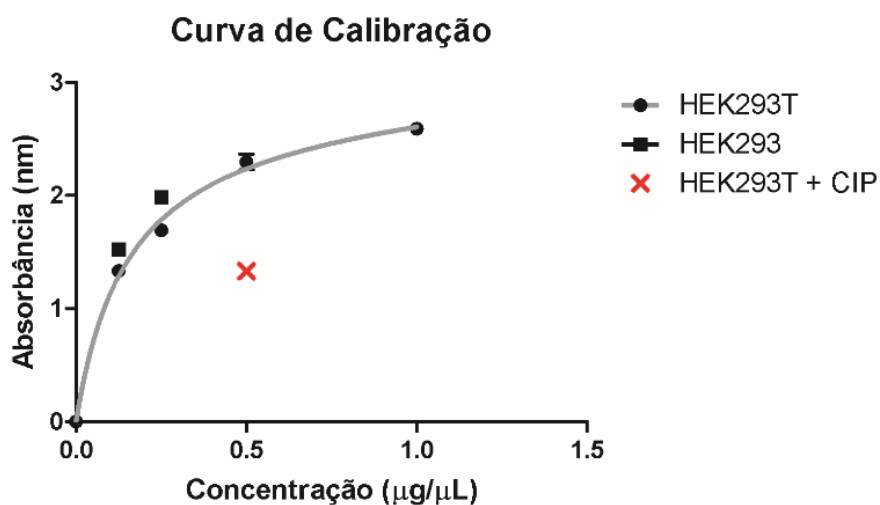
Desse modo, para modular PTEN na linhagem de HN12 é necessário a administração de altas concentrações de peróxido de hidrogênio. Para a célula HEK293, o tratamento com peróxido de hidrogênio regula negativamente a atividade de PTEN, uma vez que reduz os níveis de PTEN total, enquanto, o tratamento com *t*-BHP, pode ser utilizado para modular negativamente sua atividade devido ao acúmulo de PTEN fosforilado (inativo). Estes dados confirmam a relação de estresse oxidativo com função e atividade de PTEN, potencialmente como um sensor de estresse oxidativo como tem sido proposto na literatura (Kitagishi e Matsuda, 2013).

4.7.2. Proteção contra oxidação de PTEN pela SET

Antes das análises das amostras de interesse foi obtida a curva de calibração com concentrações variáveis de proteínas de HEK293T, HEK293 e de HEK293T (0,5 µg/µL) após tratamento com 10U de *Calf-intestinal alkaline phosphatase* (CIAP/CIP), que foi utilizado

como controle negativo (Figura 27 A). A proteína SET consegue manter o nível de PTEN fosforilado na co-expressão de SET e da subunidade B56 Δ da PP2A ($p = 0,0137$) (Figura 27 B), e quando a célula é exposta a peróxido de hidrogênio ($p = 0,0419$) (Figura 27 C), em comparação com o controle (Mock). No ensaio de ELISA para detecção do nível de fosforilação de PTEN em S380 foi confirmado resultado observado pelo método de *Western blot*, os tratamentos com *t*-BHP não alteraram os níveis de PTEN fosforilado (Figura 27 C). Isto confirma o papel de PP2A B56 Δ na desfosforilação desse resíduo e que a presença da SET não é suficiente para suprimir o processo, também sugere que a proteína SET está envolvida no controle de fosforilação deste resíduo no estresse oxidativo. Além disso, ao comparar com o controle (Mock) o efeito do estresse induzido por 250 μ M de H₂O₂ é maior ($p = 0,0226$) do que o observado quando a célula foi submetida a condição de 50 μ M com *t*-BHP, a proteção da desfosforilação pela presença da SET superexpressa também foi observada com *t*-BHP (Figura 27 C), embora não haja diferença estatística entre elas. Podemos propor que a SET previne a desfosforilação de PTEN na condição de estresse oxidativo.

A)



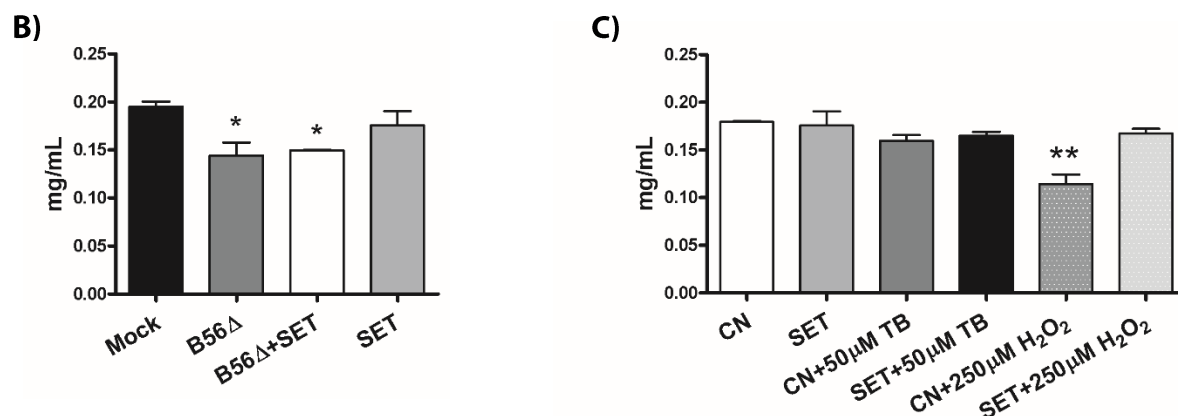


Figura 27. Fosforilação de PTEN em S380 determinada por ELISA em HEK293. Em A) Curva de calibração para o ensaio de ELISA com lisados celulares de HEK293, HEK293T e o mesmo lisado tratado com CIP (controle). As concentrações analisadas foram: 0,125, 0,250, 0,500 e 1,000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para HEK293T e 0,250, 0,500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para HEK293T. Em B e C) O gráfico representa a medida de absorbância diretamente proporcional a PTEN S380 fosforilado. As amostras foram analisadas em triplicatas. As colunas representam a média \pm erro padrão da média dessas triplicatas, * $p < 0,05$. Teste t pareado (95%).

4.5.3. Efeito do estresse oxidativo sobre a interação da SET com a PP2A

Para investigar o efeito das proteínas SET e PP2A B56 Δ sobre a atividade de PTEN foi analisado o *status* de fosforilação do resíduo S380 da proteína PTEN. Além disto, a fosforilação da proteína Akt, uma quinase negativamente regulada pela fosfatase PTEN, foi analisada (Figura 28). Neste ensaio foram utilizadas células HEK293 transfectadas ou não com vetor de expressão para SET, PP2A B56 Δ e tratadas ou não com peróxido de hidrogênio (250 μM) por 1 hora, bem como controles, que foram células expostas ao reagente de transfecção sem o vetor de expressão (Mock); o vetor de expressão pcDNA contendo cDNA LacZ (galactosidase); vetor para expressão de GFP-PTEN e Akt1 (Figura 28).

Como observado nas Figuras 10 e 15, pode-se observar na Figura 28, a presença da subunidade B56 Δ da PP2A reduz os níveis de fosforilação do resíduo S380 de PTEN em relação a seu controle (Mock). Uma vez desfosforilada, segundo a literatura, PTEN se torna mais ativa e ocorre uma redução na atividade de Akt em consequência a menor fosforilação do resíduo de T308, via ativação de PI3K. Apesar, de observarmos os efeitos de PP2A B56 Δ sobre a fosforilação de PTEN, o mesmo não pode ser observado para a proteína Akt. Entretanto, o aumento da fosforilação de Akt pode ser explicado pelo sequestro da subunidade catalítica de PP2A pela subunidade B56 Δ mais disponível, limitando a interação entre a subunidade catalítica e a subunidade B55 α responsável pela regulação da fosforilação de Akt (Kuo *et al.*, 2008), levando a perda desse equilíbrio. A superexpressão da SET eleva os níveis de PTEN fosforilado no resíduo de S380, o que pode indicar uma inibição na atividade da fosfatase, essa

teoria é corroborada pela elevação de nos níveis de Akt fosforilado (Leopoldino, Squarize, Garcia, Almeida, Pestana, Polizello, *et al.*, 2012).

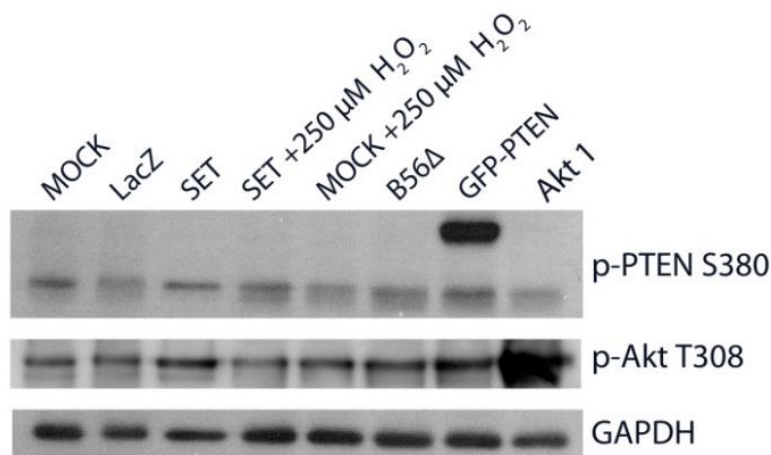


Figura 28. Efeito do estresse oxidativo sobre a fosforilação de PTEN na presença de acúmulo da SET. *Western blot* com extrato proteico obtido de células HEK293 incubadas apenas com reagente de transfecção (Mock), transfectadas com vetor pcDNA LacZ, pcDNA SET, incubadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na presença da superexpressão de SET ou Mock, transfectadas com vetor PCEP para expressão da subunidade B56Δ da PP2A, pcDNA para expressão de GFP-PTEN e pcDNA para produção de Akt1. Os anticorpos usados foram para p-PTEN S380, p-Akt T308, GAPDH.

Foram feitos ensaios de co-transfecção de células HEK293 com vetores para PTEN e para a PP2A subunidade B56Δ, do vetor para PTEN e para SET assim como dos três vetores PTEN, SET e PP2A B56Δ. Os níveis de PTEN fosforilado e total foram analisados por *Western blot* (Figura 29).

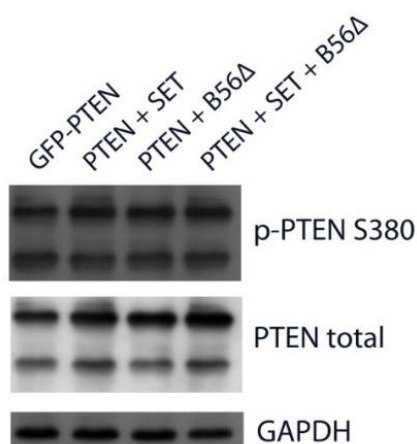


Figura 29. Análise de PTEN em células HEK293 co-transfectadas com vetores para expressão da proteína PTEN, SET e PP2A B56Δ. Os lisados de células com superexpressão de PTEN foram utilizados como controle das co-transfecções para superexpressão de PTEN + SET; PTEN + PP2A

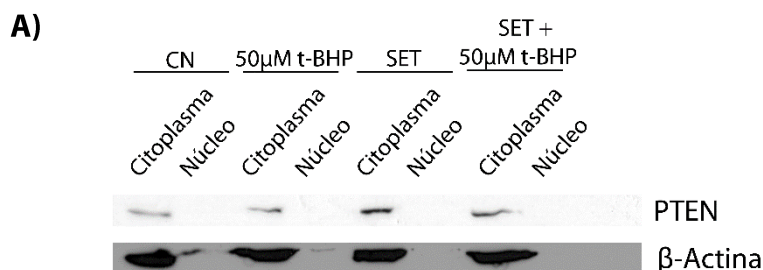
B56Δ; PTEN + SET + PP2A B56Δ. O *Western blot* foi realizado com anti-p-PTEN S380, anti-PTEN total e anti-GAPDH.

A proteína SET aumenta os níveis de PTEN recombinante fosforilado no resíduo de S380 e a manutenção da fosforilação desse resíduo resulta no acúmulo de PTEN total, uma vez que não é acionada a via de degradação de PTEN (Vazquez *et al.*, 2000). A superexpressão da subunidade B56Δ de PP2A não alterou significativamente a marcação para PTEN fosforilado, mas houve aumento para PTEN total, conforme esperado, pois a forma fosforilada é mais estável (Vazquez *et al.*, 2000).

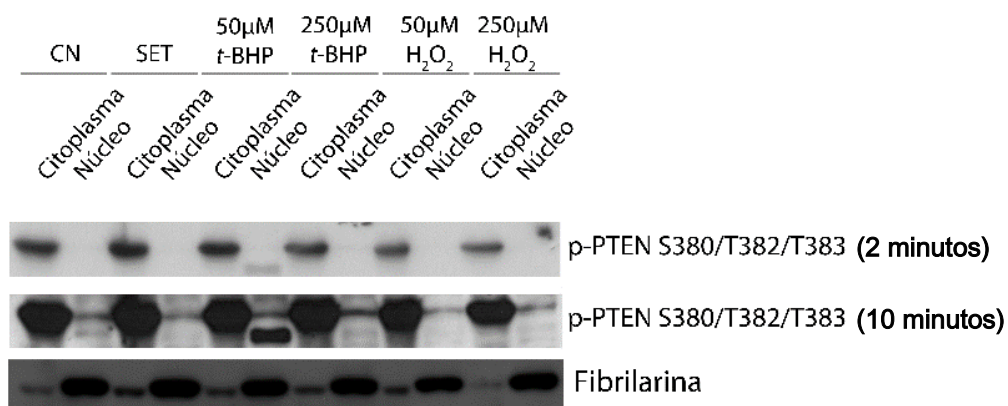
4.7.3. Fracionamento de núcleo e citoplasma em condição estresse oxidativo induzido por *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP) e peróxido de hidrogênio

O estudo das proteínas fracionadas no núcleo e citoplasma foi realizado para avaliar o efeito do estresse oxidativo e da SET na distribuição e estabilidade de PTEN. A Figura 23 mostra que a SET aumentou PTEN total no citoplasma da célula na presença e ausência de estresse oxidativo induzido por *t*-BHP (Figura 30 A). Este aumento é associado à maior estabilidade da proteína na célula, que acontece quando a proteína não é desfosforilada.

Para a análise do efeito do estresse oxidativo sobre a atividade e localização de PTEN, foram avaliadas quanto a fosforilação de PTEN células HEK293 com expressão normal ou elevada de SET foram tratadas com *t*-BHP e peróxido de hidrogênio nas concentrações de 50 e 250 μM e peróxido de hidrogênio 50, 250 μM por 30 minutos (Figura 30 B). Também foram analisadas as células HN12, tratadas com *t*-BHP e peróxido de hidrogênio nas mesmas condições. Como as células HN12 apresentaram nos experimentos anteriores oxidação de PTEN antes mesmo do tratamento com agentes oxidantes, foi incluído um controle negativo ao experimento com agente antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) (Figura 30 C).



B)



C)

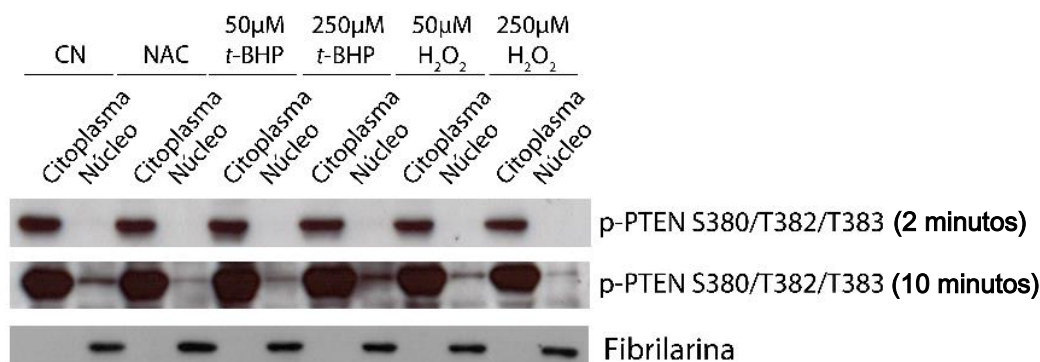


Figura 30. Acumulo de PTEN nuclear em células tratadas com t-BHP e redução de PTEN nuclear e citoplasmático em células tratadas com peróxido de hidrogênio. Em A) *Western blot* com fracionamento de proteína PTEN citoplasmática e nuclear de células HEK293 tratadas com *t*-BHP e transfectadas com SET. Em B) *Western blot* usando anticorpo para PTEN fosforilado (S380/T383/T383) e frações proteicas subcelulares de núcleo e citosol obtidas de células HEK293 com superexpressão de SET e tratamento com *t*-BHP e peróxido de hidrogênio. Em C) *Western blot* usando anticorpo para p-PTEN S380/T383/T383 e frações proteicas subcelulares de núcleo e citosol obtidas de células HN12 tratadas com agente antioxidante (NAC; 1 mM por 24h), *t*-BHP e peróxido de hidrogênio por 30 minutos. O anticorpo anti-β-Actina foi usado como marcador da fração citoplasmática e anti-fibrilarina foi usado como marcador de fração nuclear e controle de fracionamento celular. Foram mostrados dois tempos de exposição do filme radiográfico (2 min e 10 min) para visualização da PTEN fosforilada na fração nuclear (10 min).

A superexpressão de SET aumentou os níveis de PTEN fosforilado no citoplasma das células HEK293. O tratamento com peróxido de hidrogênio reduziu os níveis de PTEN fosforilado no citoplasma e no núcleo, tanto nas células HEK293 quanto nas células HN12. O agente pró-oxidante *t*-BHP 250 µM induziu aumento de PTEN na fração nuclear. Estes dados sugerem a existência de mecanismos diferentes de ação e resposta aos dois agentes oxidantes: *t*-BHP e peróxido de hidrogênio. Como mostrado anteriormente (Figura 19) a HN12 possui um maior nível de PTEN oxidado do que a linhagem HEK293 e sob estresse oxidativo houve

aumento de oxidação do PTEN, sugerindo ser a oxidação o mecanismo principal de resposta ao peróxido de hidrogênio e potencial inativação de PTEN.

4.8. Alteração dos níveis de PTEN, SET e PP2A B56 Δ utilizando RNA de interferência

4.8.1. Análise do efeito da redução da SET, PTEN e PP2A B56 Δ em diferentes linhagens celulares

O *knockdown* dos genes para SET, PTEN e PPP2R5D (proteína PP2A subunidade B56 Δ) com partículas lentivirais foi escolhido para confirmar os resultados observados pela superexpressão das proteínas. Para isso, primeiro foram analisadas várias linhagens celulares de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) para comparar o padrão de expressão das proteínas alvos e de outras proteínas das vias de sinalização envolvidas e escolher àquelas com maior nível das proteínas alvos (Figura 31).

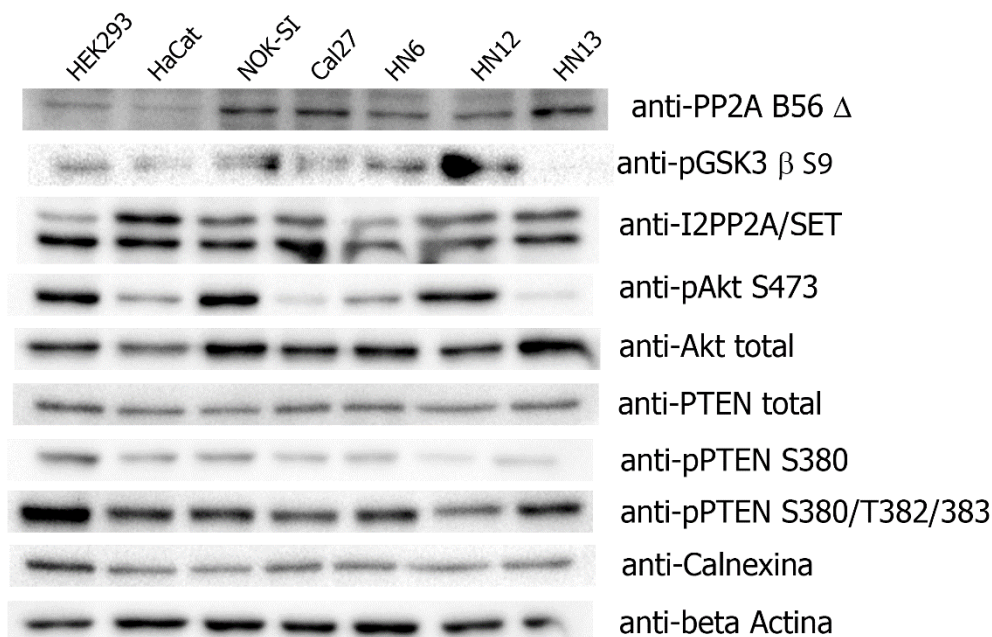


Figura 31. Painel de células para análise do perfil de expressão de SET, PTEN e PP2A B56 Δ . Para montagem do painel foram lisadas 4 linhagens de CECP (Cal27, HN6, HN12 e HN13), HaCat, NOK-SI e HEK293 para análise do perfil das proteínas SET, PTEN e PP2A subunidade B56 Δ , além de alvos *downstream*. As células foram mantidas em meio DMEM sem soro por 24 horas antes da extração das proteínas. Foram analisadas proteínas *downstream* às vias de sinalização de PP2A B56 Δ (p-GSK3 β) e PTEN (p-Akt).

Uma vez que os níveis de SET, PTEN e PP2A B56 Δ por WB mostraram-se elevados nas células NOK-SI e HN13, estas foram selecionadas para o ensaio de *shRNA* para SET,

PTEN e PP2A. Para os *shRNAs* de PTEN e PP2A B56 Δ foram utilizadas as 5 sequencias diferentes de *shRNA* para seleção daquele com maior eficiência para redução da proteína alvo (Figura 32). Dessas sequencias analisadas, *shPTEN* 2745 e *shPTEN* 2748 apresentaram maior redução nos níveis de PTEN tanto nas células HN13 quanto NOK-SI quando comparadas a seu controle *shCN* TCR1.

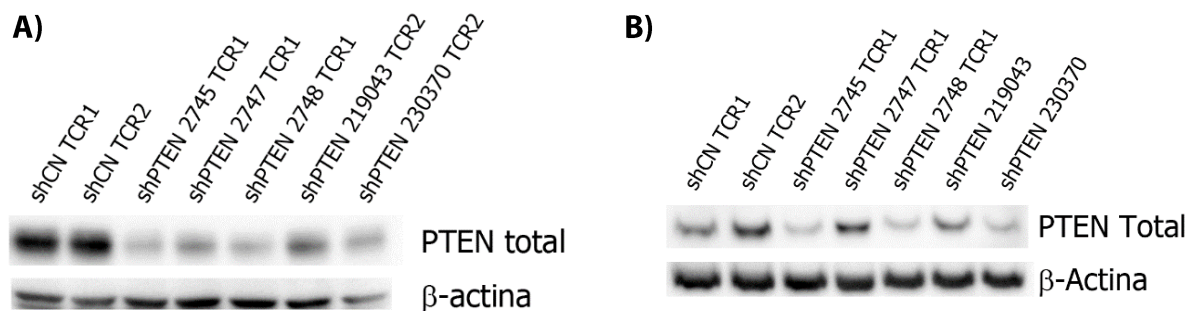


Figura 32. Teste de *shRNAs* para silenciamento de PTEN em HN13 e NOK-SI. Western blot (30 μ g) para seleção das sequencias de *shRNA* para PTEN. Células HN13 (A) e NOK-SI (B) após 48 horas da incubação com partículas virais para sequencias de *shRNA* de PTEN e respectivos controles (TCR1 e TCR2).

As células contendo a sequência *shPTEN* 2745 foram selecionadas para as análises com *knockdown* de PTEN. Após seleção por 15 dias com puromicina, as células foram mantidas em meio sem soro por 24 horas e as proteínas extraídas para análise das proteínas SET, PTEN, e do efeito destas nas vias de sinalização *downstream* (Figura 33). Os dados mostram que ambas as células apresentaram um aumento dos níveis de p-Akt (S308 e S473) quando há redução de PTEN. A redução de PTEN não resultou em alteração de SET ou PP2A B56 Δ , apenas como esperado, já que na ausência de PTEN ocorre um acúmulo do ativador de Akt (PIP3), houve aumento na fosforilação de Akt.

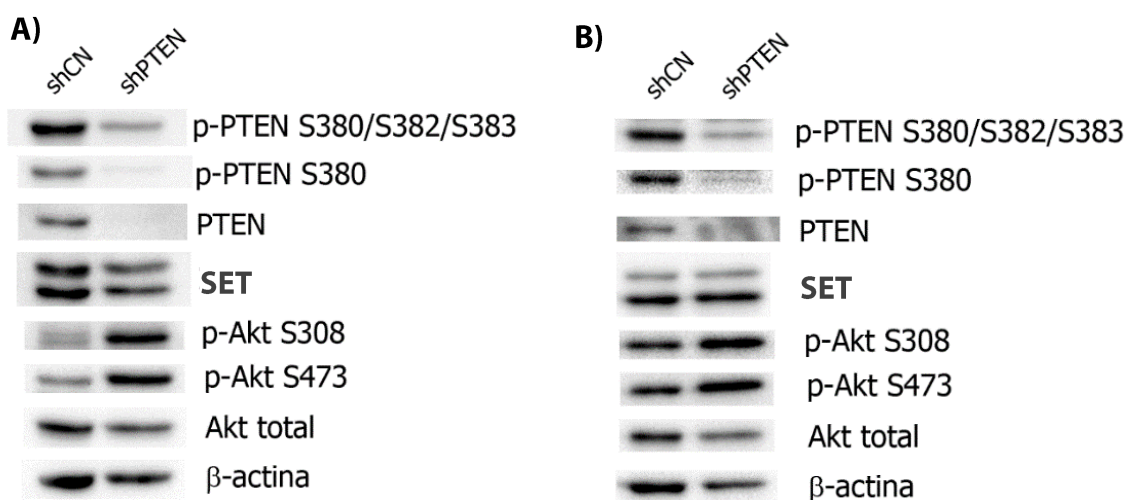


Figura 33. Efeito do silenciamento de PTEN sobre proteínas da via de PI3K-Akt, SET e PP2A B56A. *Western blot* para proteínas PTEN, SET e Akt com lisados proteicos das células HN13 (A) e NOK-SI (B) após transdução com partículas virais para *shRNA* de PTEN e seleção com puomicina por 15 dias. As células foram mantidas em *starving* (sem soro) por 24 horas antes da extração de proteínas.

O mesmo procedimento foi realizado para células HN13 e NOK-SI selecionadas após transdução com *shRNA* de SET (Figura 34). A redução dos níveis de SET acarretou redução de PTEN e p-PTEN, assim como acúmulo de Akt fosforilado na linhagem HN13. Uma vez que ao superexpressar SET regulamos positivamente a expressão de PTEN, contrariamente, ao silenciar SET verificamos a redução conjunta na expressão de PTEN e, do mesmo modo que no silenciamento de PTEN, aumento dos níveis de p-Akt (Figura 34 A). Contudo, a linhagem NOK-SI (queratinócito normal imortalizado espontaneamente), não mostrou alteração nos níveis de PTEN ou PP2A B56A após silenciamento de SET (Figura 34 B), o que sugere ser um efeito linhagem-específico para redução da SET e reforça seu papel em CECP.

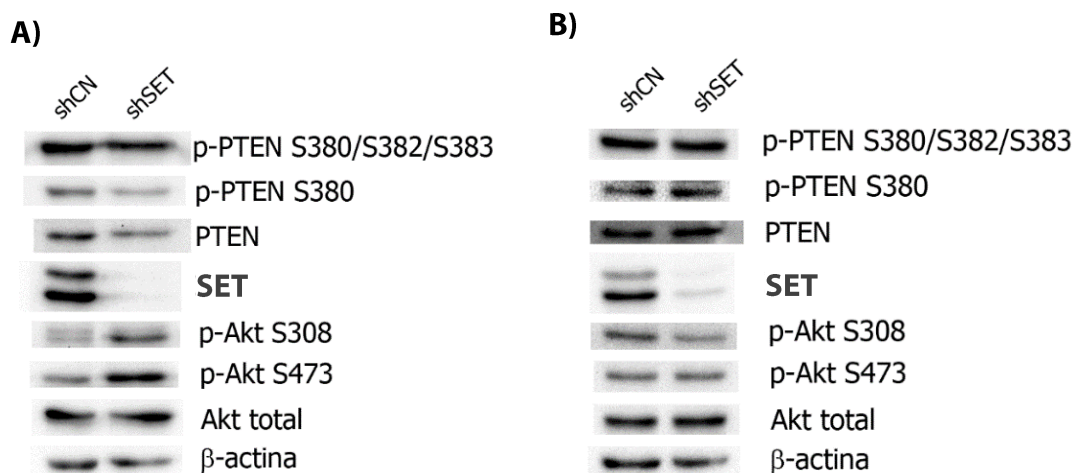


Figura 34. Efeito do silenciamento de SET sobre a via de PI3K-Akt, PTEN e PP2A B56Δ. *Western blot* para proteínas PTEN, SET e Akt com lisados proteicos (30 μg) de células HN13 (A) e NOK-SI (B) com *shRNA* CN (TCR1) e *shRNA* para SET mantidas em *starving* (sem soro) por 24 horas antes da lise.

O mesmo procedimento foi aplicado para a escolha da sequência de *shRNA* para PPP2R5D (PP2A B56Δ). A Figura 35 A mostra que das cinco sequências utilizadas para silenciamento na linhagem HN13, duas não puderam ser analisadas por *Western blot* (*sh367676* e *sh2555*), pois as células não foram capazes de sobreviver após a redução da subunidade B da PP2A. Para as células NOK-SI (Figura 35 B) foi possível analisar apenas a eficiência dos *shRNAs* *sh2552* e *sh10715* (Figura 35).

O *sh2552* TCR1 foi escolhido para o silenciamento de PP2A B56Δ porque além de reduzir os níveis de PP2A B56Δ, também se mostrou capaz de elevar os níveis de p-GSK3 β nas células HN13 e NOK-SI (Figura 35).

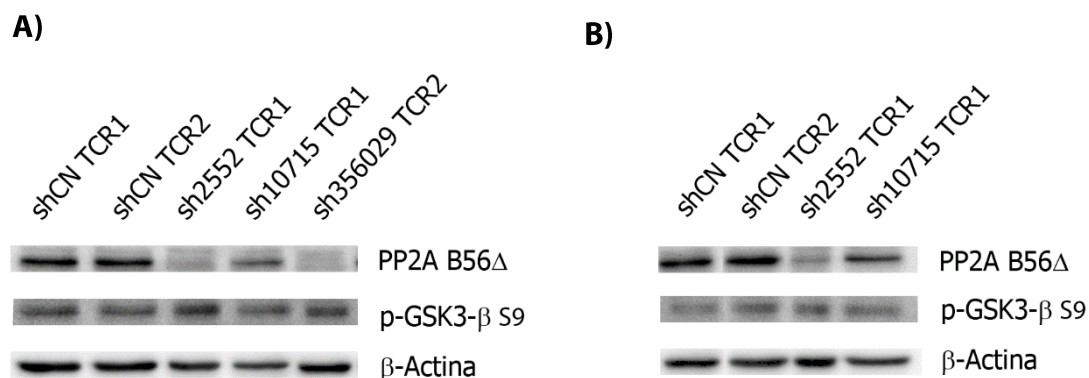


Figura 35. Seleção de *shRNA* para *knockdown* da subunidade B56Δ da PP2A em células HN13 (A) e NOK-SI (B). *Western blot* com extrato proteico das células após 48 horas da incubação com partículas virais testadas para silenciamento de PP2A B56Δ e seus controles (*shCN* TCR1 e *shCN* TCR2). Foram analisadas as proteínas PP2A B56Δ, p-GSK3-β S9 (alvo *downstream* da via PI3K-Akt) e β-actina.

Com base nos resultados anteriores, os próximos experimentos foram conduzidos somente na linhagem de CECF (HN13). Para seleção das células com *knockdown* estável de PP2A B56 Δ , as células foram mantidas com puromicina por 15 dias, e o nível da proteína alvo bem como de proteínas envolvidas na via de sinalização foram analisadas por *Western blot* (Figura 36).

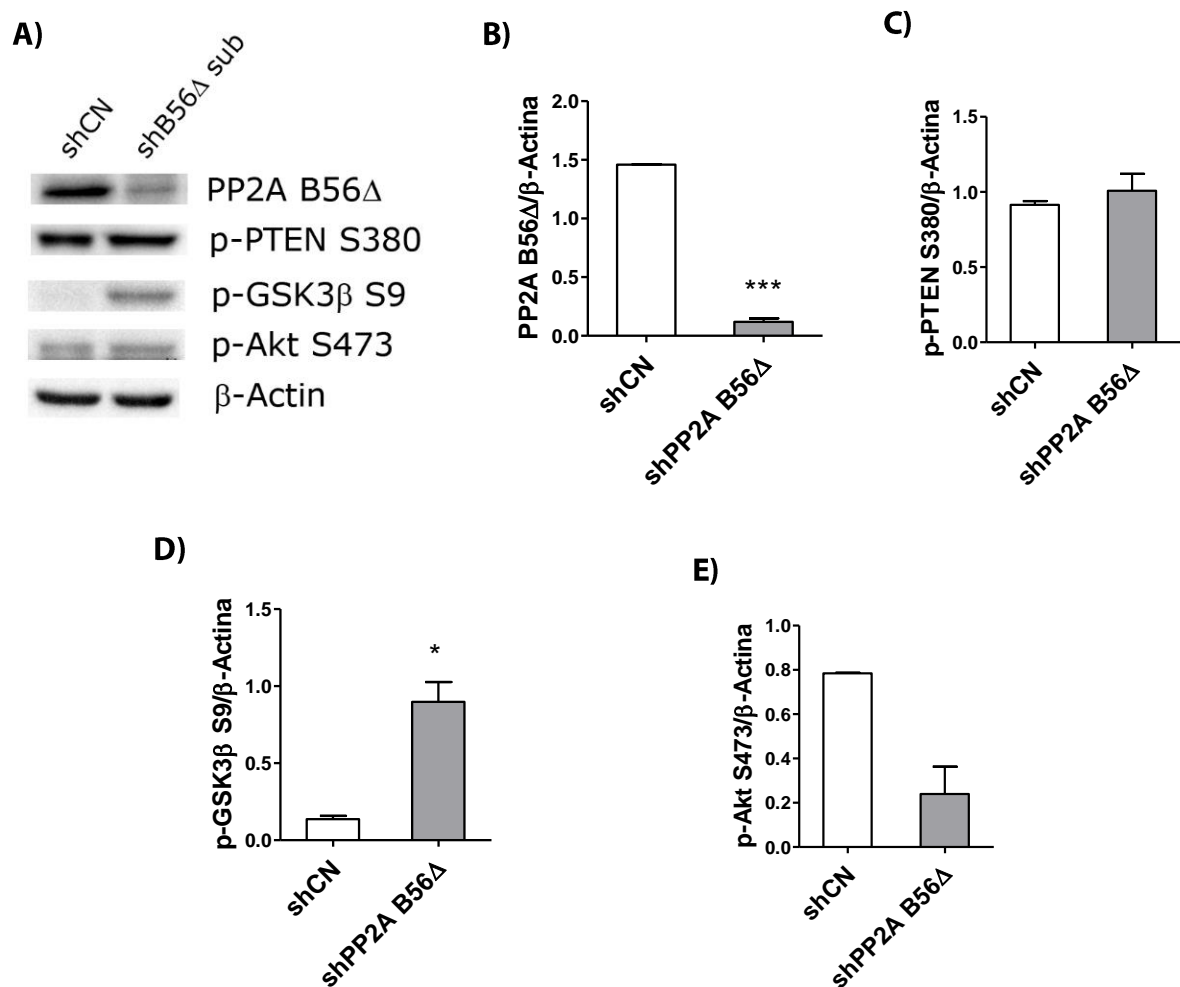


Figura 36. Efeito do *knockdown* de PP2A B56 Δ sobre a fosforilação de PTEN e Akt nas células HN13. Perfil das principais proteínas envolvidas na via proposta como regulada pela PP2A B56 Δ . Células HN13 com *shRNA* controle e PP2A B56 Δ após seleção com puromicina por 10 dias. Antes da extração de proteínas as células foram mantidas sem soro bovino fetal por 24 horas. Os gráficos de quantificação relativa foram analisados para 3 experimentos independentes. Teste t'paread, $p < 0,005$. *** $p = 0,0002$ e * $p = 0,0459$.

A Figura 29 mostra que o silenciamento de PP2A B56 Δ mostrou efeito Apenas no seu alvo *downstream* p-GSK3 β S9, (Yu *et al.*, 2014).

4.9. Análise da expressão do gene PTEN e dos transcritos PTEN B e PTEN Δ

Para a análise da expressão do gene PTEN, foi realizado PCR com temperaturas de anelamento crescentes (gradiente de 43°C a 60°C) e com concentrações crescentes de cDNA (50, 100 e 200 ng), a fim de determinar a melhor condição de PCR para cada transcrito (PTEN total, B e Δ) (Figura 37). Entretanto, em nenhuma condição foi observada amplificação de PTEN total ou de algum de seus transcritos. Foram utilizados cDNA total de célula diferentes: HEK293, HN12, HN13, Hacat, linfócito; diferentes enzimas (Taq polimerase pht (Phoneutria), Taq HiFi (Invitrogen), Taq Platinum (Invitrogen), KAPA Robust (KAPA Biosciences) também foram usadas, mas não houve amplificação do cDNA de interesse. A PCR foi realizada com a adição de DMSO 3% como aditivo, mas não houve amplicon. Como controles positivos da reação de PCR foram utilizados oligos para amplificação de GAPDH e cDNA obtido de linfócito humano. Os oligos para PTEN total foram testados com vetor pcDNA contendo o inserto GFP-PTEN e houve amplificação eficiente (dado não mostrado). Devido a este resultado, que poderia indicar baixo nível de RNAm de PTEN, decidimos realizar a PCR em tempo real.

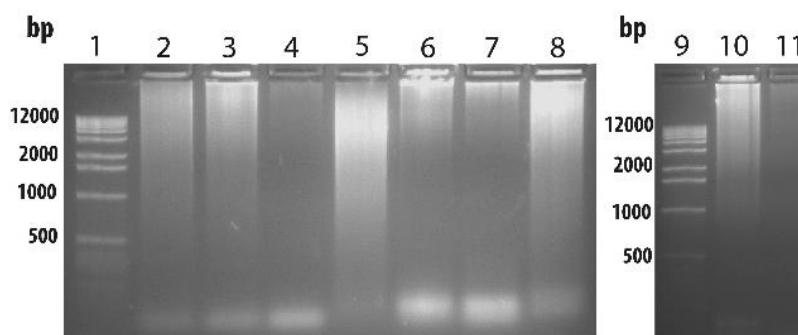


Figura 37. RT-PCR para transcritos de PTEN. Gel de agarose 1% produto do RT-PCR de PTEN e transcritos. Em A: 1) *ladder* 1kb Fermentas; 2) HEK293 - PTEN total; 3) HEK293 - PTEN B; 4) HEK 293 - PTEN Δ ; 5) HN12 - PTEN total; 6) HN12 - PTEN B; 7) HN12 - PTEN Δ ; 8) HN13 - PTEN total; 9) *ladder* 1kb Fermentas; 10) HN13 - PTEN B; 11) HN13 PTEN Δ .

As análises por PCR em tempo real foram realizadas com oligos específicos e o dye *EVA Green* (Uniscience). A quantificação relativa foi realizada utilizando a amplificação de GAPDH como controle (Figura 38). O gráfico confirma a presença do transcrito de PTEN total, PTEN B e PTEN Δ em linfócito humano conforme descrito por Sharrard e Maitland (2000). Foi possível identificar os dois transcritos alternativos de PTEN utilizando essa metodologia.

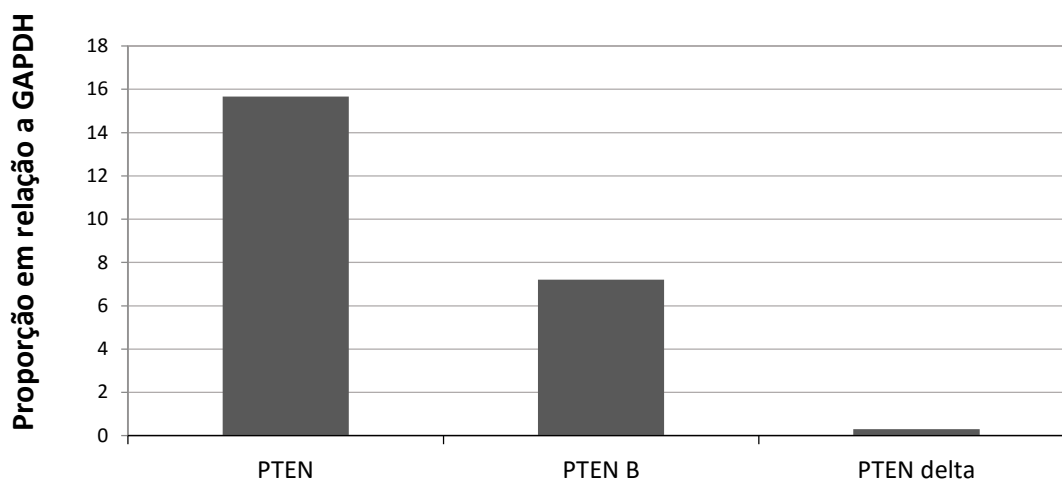


Figura 38. Quantificação de transcritos de PTEN em linfócito humano. Estão representadas as quantidades relativas de RNAm para PTEN, PTEN B e PTEN Δ em relação à GAPDH.

As análises de expressão de PTEN nas linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) HN12, HN13 e Cal27, que possuem níveis elevados de SET, e na HEK293 superexpressando a SET foram realizadas usando PCR em tempo real com sondas específicas para PTEN (PrimeTime Mini qPCR Assay, IDT) (Figura 39). O nível de RNAm do gene p16 (gene regulado por metilação de DNA) foi incluído nos ensaios de PCR como controle devido a ação proposta da SET em controle epigenético (Figura 39).

O efeito nos níveis de RNAm de *PTEN* e de *p16* com o aumento da proteína SET em células HEK293 pode ser comparado ao perfil de expressão nas células de CECP em que a SET é constitutivamente aumentada. Tanto a expressão de p16 quanto de PTEN mostraram-se reduzidas nas células analisadas. Esse efeito pode ser ocasionado pela participação da proteína SET no complexo inibidor de acetilação de histonas, uma vez elevados os níveis de SET, as histonas são hipoacetiladas e a expressão gênica deveria ser reprimida. Ao mesmo tempo, sugerem que o mecanismo de regulação da expressão de PTEN se assemelha ao de p16.

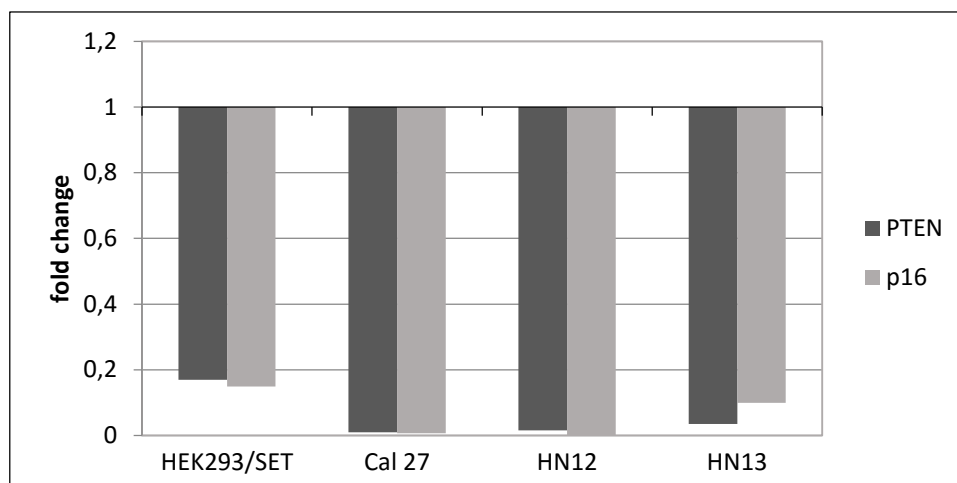
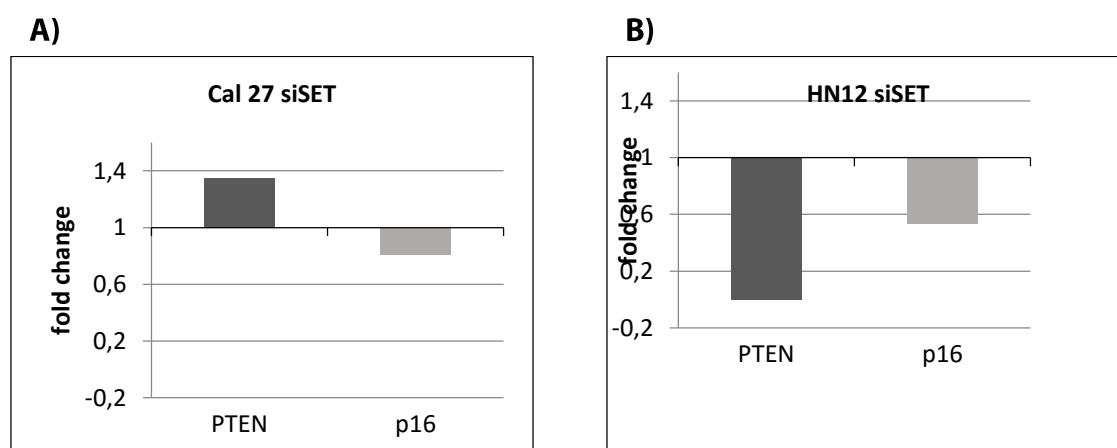


Figura 39. Efeito da SET sobre a expressão de PTEN e p16. Comparação dos níveis de RNAm de PTEN e p16 entre HEK293 superexpressando a SET e linhagens de CECP que possuem níveis elevados de SET. Todos os cálculos de *fold change* foram desenvolvidos utilizando as células HEK293 como controle.

Para verificar o efeito da SET na expressão de PTEN, as células de CECP foram silenciadas com *siRNA* para a SET e os níveis de RNAm de PTEN e p16 foram analisados com sondas específicas por PCR em tempo real (Figura 40). O silenciamento de SET nas linhagens Cal 27 e HN13 resultou num aumento da expressão de PTEN, mas não de p16. Em contrapartida, na linhagem HN12 não foi observado o mesmo efeito, onde houve diminuição nos níveis de PTEN quando houve redução da proteína SET por *siRNA*. Em todas as linhagens, o *knockdown* da SET resultou em menor nível de p16.



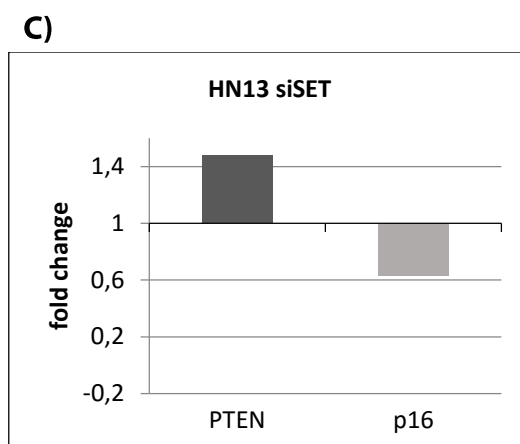


Figura 40. Efeito da redução de SET sobre a expressão de PTEN e p16. Em A: células Cal27 com *siSET*, em B: células HN12 com *siSET* e em C: células HN13 com *siSET*. Todos os cálculos de *fold change* foram desenvolvidos utilizando as células com *siCN* como controle.

Os dados obtidos até o momento sugerem que PTEN pode ser regulado por modificação epigenética e pela ação direta da proteína SET, entretanto há uma diversidade entre as linhagens tumorais, o que é esperado, pois devem existir outros mecanismos de modulação de RNA de PTEN independente da SET. Entretanto, cabe ressaltar que na HEK293 quando houve aumento de SET houve diminuição de RNAm PTEN e duas das 3 linhagens responderam ao *siRNA* para SET modificando o nível de PTEN.

4.10. Tratamento com agentes desmetilante e hiperacetilante

Uma vez que a metilação do promotor de PTEN foi relacionada a diversos tumores (Baeza *et al.*, 2003), e o efeito da SET na regulação da expressão gênica têm sido relacionada à acetilação de histonas (Seo *et al.*, 2001), células HEK293 foram tratadas com TSA e 5-aza-deoxicitina afim de melhor delinear o efeito da acetilação de histonas e da metilação sobre a expressão de PTEN. Na figura 41 estão os resultados para os níveis de PTEN e p16 após tratamento das células HEK293 com TSA e 5-aza-deoxicitidina.

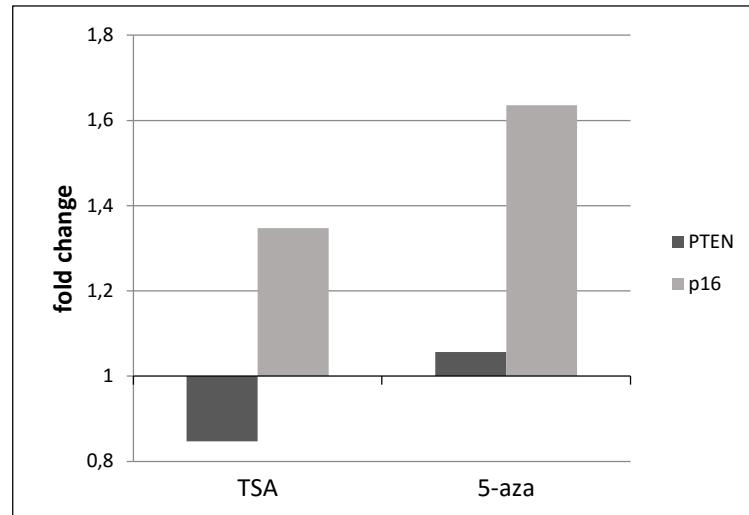


Figura 41. Efeito da acetilação e metilação sobre a expressão de PTEN e p16 Gráfico representativo do efeito de TSA e 5-aza-deoxicitidina sobre a expressão de PTEN e p16. Todos os cálculos de *fold change* foram desenvolvidos utilizando as células HEK293 como controle.

Os níveis de RNAm de PTEN foram pouco alterados quando houve tratamento das células com o agente acetilante (TSA) e com 5-aza-deoxicitidina, mas o efeito foi oposto na hiperacetilação de histonas houve diminuição e na desmetilação de DNA aumento. Para o gene p16, como era esperado, houve aumento tanto na condição com TSA quanto 5-aza-deoxicitidina, reforçando que o controle de expressão é estritamente por mecanismo epigenético. Estes resultados sugerem que o controle de expressão do gene PTEN deve acontecer por metilação de DNA (Kurasawa *et al.*, 2008) e também por outros mecanismos que podem sobrepor-se a acetilação e a metilação.

5. Resultados 2

5. Resultados – Parte 2

5.1. Relação entre a perda de função de PTEN e a expressão de BMAL

Os resultados descritos neste capítulo tiveram como objetivo central identificar se existe relação entre as proteínas PTEN e BMAL. Previamente, foi observado pelo grupo da Profa. Dra. Cristiane Squarize que em células CECP após *knockdown* de PTEN ocorria aumento nos níveis de expressão de BMAL1. Para explorar este achado, foi realizada a análise de PTEN e BMAL1 bem como PER1 (alvo downstream de BMAL1) num painel de seis linhagens de CECP (HN6, HN12, HN13, HN30, Cal27, HEP2) (Figura 42), e a partir dos resultados foram escolhidas as linhagens HN6 e HN13 para os estudos de sinalização molecular. Ambas linhagens apresentaram constitutivamente níveis ‘normais’ de expressão de PTEN (Figura 42 A) e níveis diferentes de BMAL1 (Figura 42 B). Para esta análise, as culturas foram previamente tratadas com forskolin, que promove a sincronização do ciclo circadiano (Bieler *et al.*, 2014).

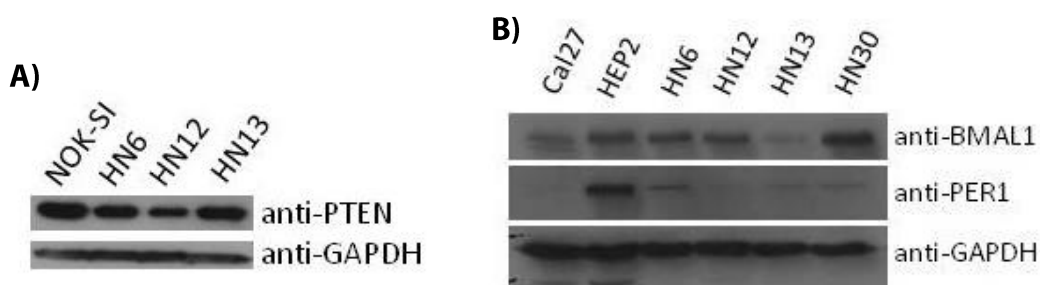


Figura 42. Apresentação dos níveis de PTEN e BMAL1 em painel de células CECP. Em A) painel de células de CECP e queratinócitos oral normalmente espontaneamente imortalizados (NOK-SI) para comparação dos níveis da proteína PTEN; em B) avaliação dos níveis de BMAL1 e PER1 a partir de lisados proteicos de CECPs. As células de CECP não mostram alteração significativa nos níveis de PTEN. Contudo, os níveis de BMAL1 e PER1 diferiram dramaticamente entre as linhagens analisadas.

Afim de entender se a perda de função de PTEN causada por estresse oxidativo poderia levar ao aumento nos níveis de BMAL1, células HN6 e HN13 (Figura 43) foram tratadas com 1,5 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em diferentes tempos para determinar qual a condição capaz de oxidar PTEN, caracterizada pela formação de pontes de dissulfeto nos resíduos de Cys-124 e Cys-71 da região do sítio catalítico (Lee *et al.*, 2002). Também foram investigados os níveis de p-S6 como marcador molecular de atividade de PI3K/mTOR de modo a medir os efeitos do acúmulo de espécies reativas de oxigênio sobre a sinalização de mTOR (Figura 43). Com o tratamento foi possível observar após 4 minutos a banda de PTEN oxidado,

e a ativação de S6 (fosforilação) teve relação tempo-dependente ao tratamento com peróxido de hidrogênio.

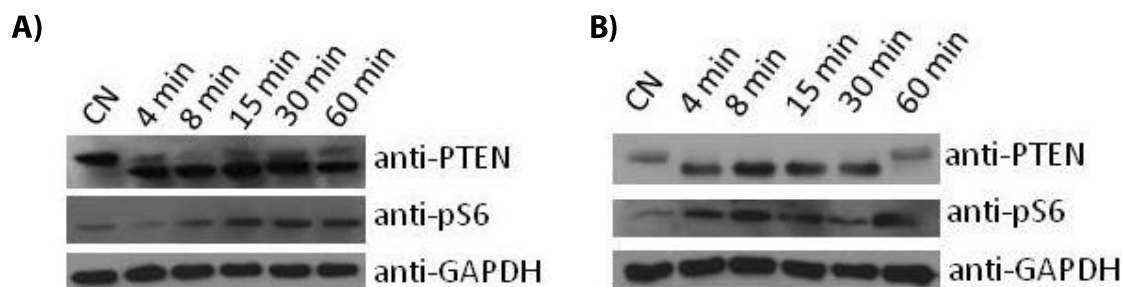


Figura 43. Status de Oxidação de PTEN em células HN6 e HN13 tratadas com peróxido de hidrogênio. Células HN6 (A) e HN13 (B) foram mantidas em *starving* por 18 horas antes do tratamento com 1,5 mM de peróxido de hidrogênio nos tempos indicados acima. O peróxido de hidrogênio provocou oxidação de PTEN após 4 minutos de tratamento, mas nesse tempo, não alterou a fosforilação de S6.

O tratamento de 4 minutos foi escolhido para os experimentos subsequentes. Na busca de um controle negativo, as células foram também tratadas com rapamicina e peróxido de hidrogênio para verificar se a rapamicina era capaz de influenciar a oxidação de PTEN (Figura 44). Não foi observado redução na oxidação de PTEN nas células tratadas com rapamicina e peróxido de hidrogênio. Contudo, a rapamicina foi capaz de interferir na regulação de p-S6 quando na presença de peróxido de hidrogênio.

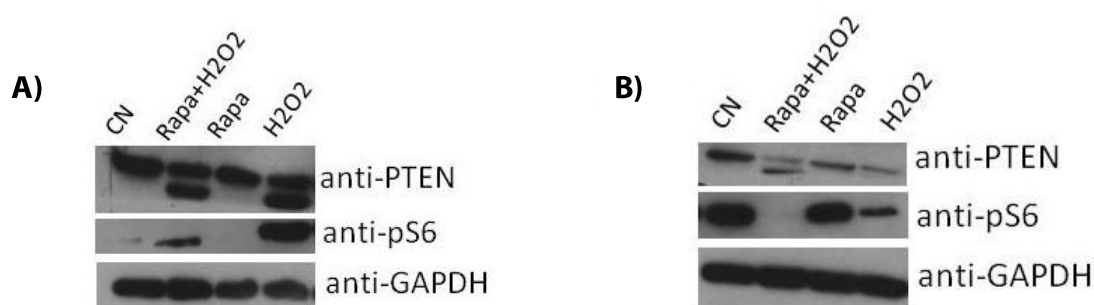


Figura 44. Status de oxidação de PTEN em células HN6 e HN13 tratadas com rapamicina e peróxido de hidrogênio. Células HN6 (A) e HN13 (B) foram mantidas em *starving* por 18 horas antes do tratamento com rapamicina (Rapa) 50 nM por 24 horas seguido de tratamento com peroxide de hidrogênio (H₂O₂) por 5 minutos. A rapamicina não foi eficiente para reverter o efeito do peroxide de hidrogênio sobre a oxidação de PTEN na linhagem HN6, mas reduziu a fosforilação de S6.

As células foram então tratadas com peroxide de hidrogênio por diferentes tempos e os níveis de BMAL1 foram analisados por *Western blot* (Figura 45). O tratamento mostrou um

aumento discreto nos níveis de expressão de BMAL1 após 15 minutos de tratamento em ambas as linhagens analisadas (anti-BMAL1).

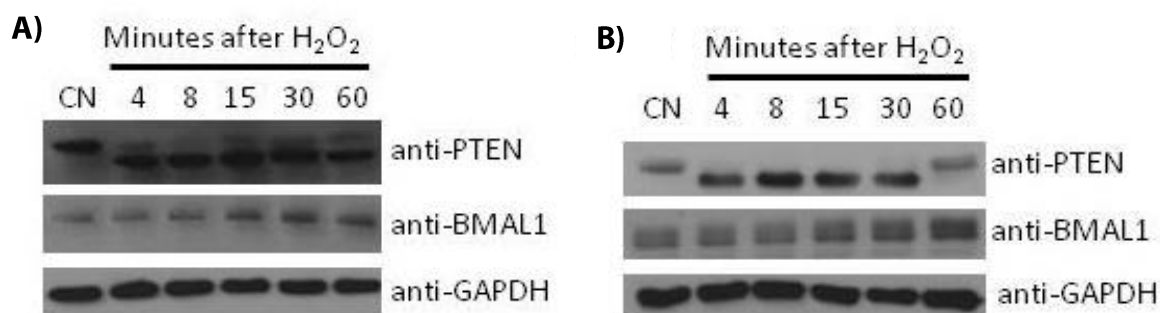


Figura 45. Perfil de oxidação de PTEN em função do tempo pelo tratamento com peróxido de hidrogênio. Células HN6 (A) e HN13 (B) foram cultivadas em *starving* por 18 horas antes do tratamento com peróxido de hidrogênio nos tempos indicados acima. A oxidação de PTEN resultou em aumento discreto nos níveis de BMAL1 para HN6 e HN13.

Para confirmar os resultados obtidos após os tratamentos com peróxido de hidrogênio, foi utilizada tecnologia de *siRNA* para o *knockdown* de PTEN seguido de análises de BMAL1 e p-S6 por *Western blot* (Figura 46). Ambas as linhagens apresentaram redução de PTEN a partir da concentração de *siRNA* Pten 50 nM, contudo houve inibição completa dos níveis de PTEN na linhagem HN13 (Figura 46 B). Os níveis de BMAL1 apresentaram aumento dose-dependente ao o *knockdown* de PTEN, para as duas linhagens analisadas, assim como o acúmulo de p-S6 para a linhagem HN6 (Figura 46 A).

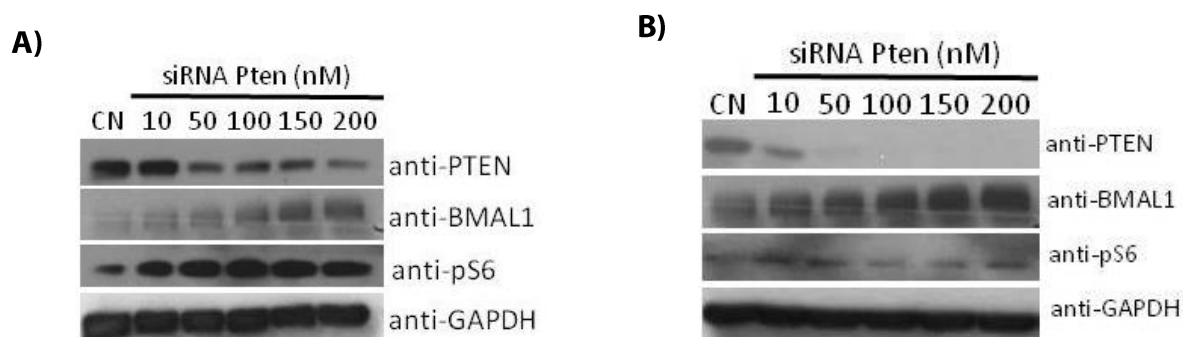


Figura 46. Determinação da concentração de oligo para silenciamento de PTEN por *siRNA*. Células HN6 (A) e HN13 (B) transfectadas com as concentrações indicadas acima de *siRNA* para PTEN foram cultivadas em *starving* por 24 horas. A redução transitória de PTEN apresentou visível elevação de BMAL1 e p-S6 (pS6).

Animais *Pten* foram então tratados com o inibidor de mTOR, rapamicina, e mostraram significativa melhora após 15 dias de tratamento (Figura 47). Devido ao estágio avançado dos tumores desses animais, também foram tratados durante 15 dias antes da eutanásia, animais com *knockout* de *Pten* tratados apenas com veículo.

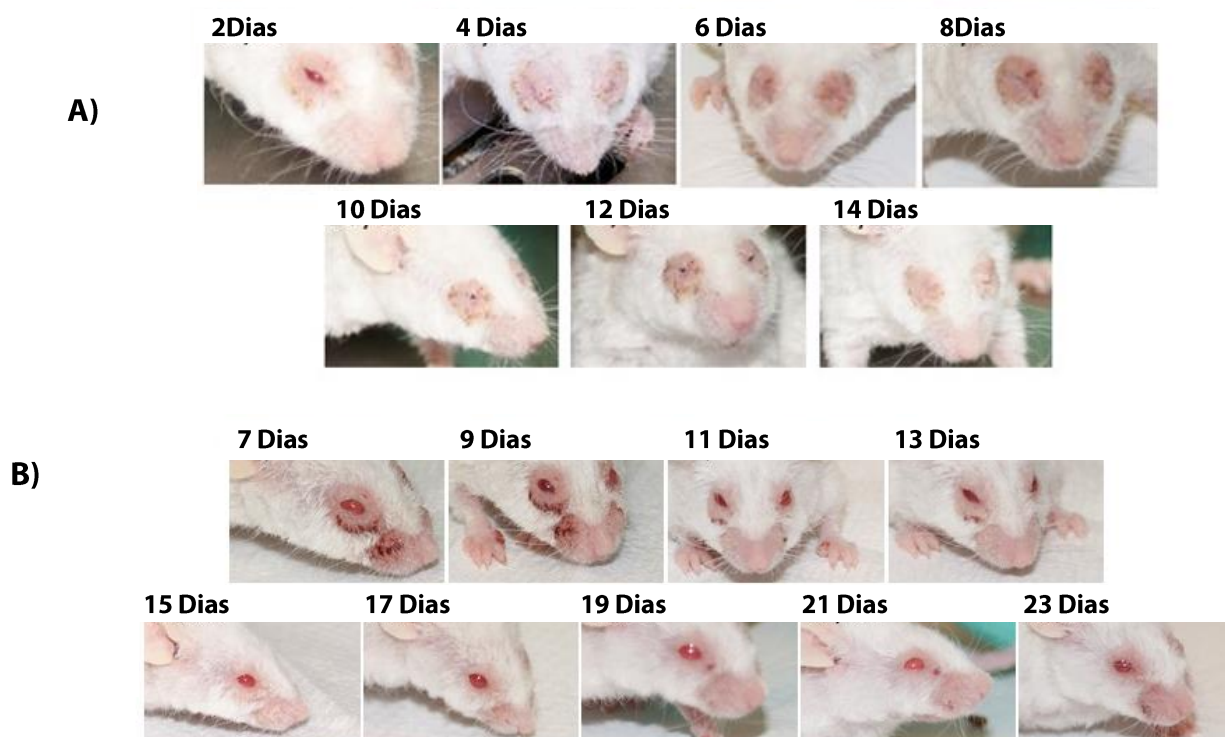


Figura 47. Efeito da rapamicina em tumores epiteliais de animais com deleção de PTEN. Animais com *knockout* para *Pten* tratados com veículo e rapamicina a cada 48 horas. Após 15 dias de tratamento, os camundongos tratados com rapamicina apresentaram redução dos tumores epiteliais; e após 21 dias de tratamento, a condição desses camundongos foi completamente revertida.

O tratamento com rapamicina se mostrou efetivo terapeuticamente nos animais com *knockout* de *Pten* e resultou na redução dos tamanhos dos tumores. Uma vez, que o aumento de BMAL1 apresentou relação com a ativação de mTOR, pela fosforilação de S6, foi avaliado em cortes histológicos de animais com deleção de *Pten* e tratados com rapamicina por 15 dias, após marcação imunológica com anti-BMAL1 e anti-p-S6 (Figura 48), se a regressão observada nos tumores também tem efeito na expressão de BMAL1.

Conforme mencionado anteriormente, animais com deleção de *Pten* (K14Cre *Pten*^{F/F}, veículo) mostraram aumento nos níveis de expressão de BMAL1 nas células epiteliais em relação aos animais controle (K14Cre *Pten*^{+/+}, veículo). Contudo, o tratamento com rapamicina reduziu os níveis de BMAL1 nessas condições (K14Cre *Pten*^{F/F}, rapamicina, em relação a K14Cre *Pten*^{F/F}, veículo). Além disso, a mesma resposta foi observada para os níveis de S6

fosforilado, os animais com deleção de *Pten* apresentaram aumento de p-S6, mas após o tratamento com rapamicina houve a normalização dessa alteração, apresentando níveis de p-S6 comparáveis ao controle (*K14Cre Pten^{+/+}*, veículo).

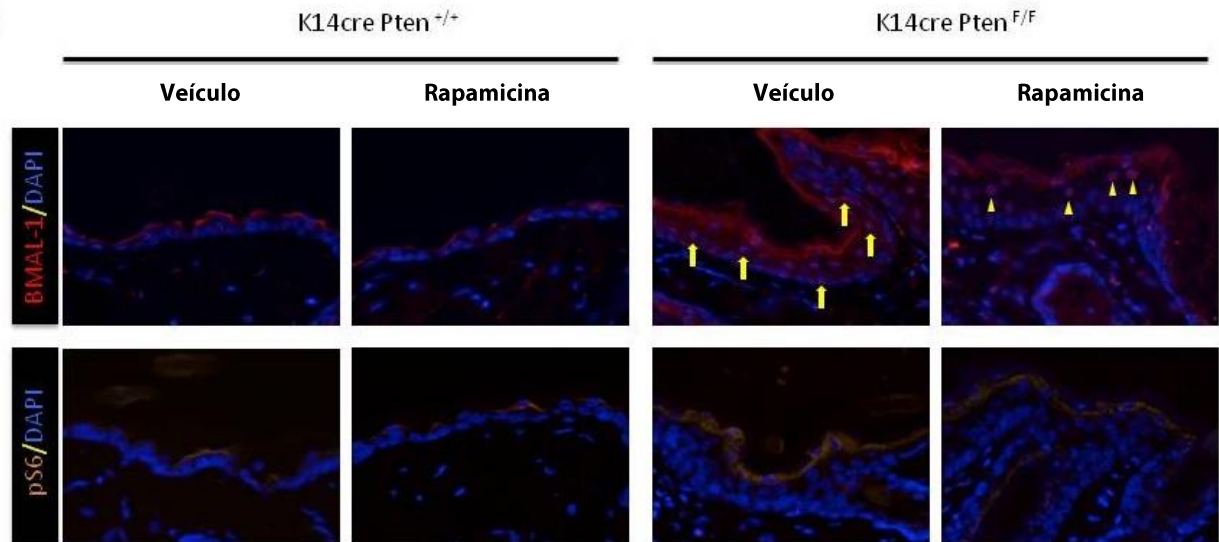


Figura 48. Modulação de BMAL1 e pS6 pela deleção de *Pten* e tratamento com rapamicina. Imunofluorescência para BMAL1 e p-S6 de tecido epitelial de animais controle (*K14CrePten^{+/+}*) e animais com *knockout* de *Pten* (*K14Cre Pten^{F/F}*) tratados com veículo e rapamicina durante 15 dias. Os animais com deleção de *Pten* mostraram aumento nos níveis de BMAL1 e p-S6 mas esse aumento foi revertido após o tratamento com rapamicina.

Para determinar se a expressão de BMAL1 nessas condições é regulada *upstream* ou *downstream* ao complexo de mTOR, células de CECP foram transfectadas com *siRNA* para Raptor e Rictor, que codificam proteínas componentes do complexo de mTOR (Figura 49).

A transfecção *in vitro* de pequenos RNAs de interferência para Raptor e Rictor (responsáveis pela atividade de mTOR) mostraram redução nos níveis de BMAL1 (Figura 49). Estes resultados sugerem que o complexo mTOR participa na regulação de BMAL1 via PTEN/PI3K.

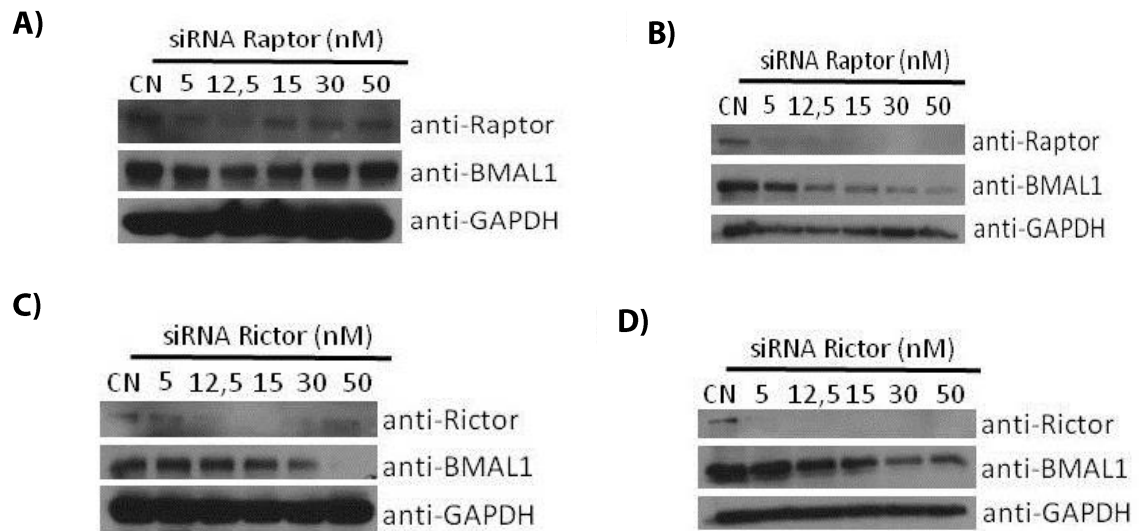


Figura 49. Determinação da concentração de oligos para silenciamento de Raptor e Rictor por siRNA. Células HN16 e HN13 transfetadas com as concentrações acima descritas de siRNA para Raptor e Rictor foram cultivadas em *starving* por 24 horas. O *knockout* de ambas as proteínas resultou na inibição da expressão de BMAL1, sugerindo que o controle da expressão de BMAL1 ocorre *downstream* a PTEN e mTOR.

Animais com deleção de Per2 apresentam aumento constitutivo nos níveis de BMAL1 no núcleo de células epiteliais, o tratamento com rapamicina foi replicado nesses animais para confirmar o efeito de mTOR sobre a regulação da expressão de BMAL1 (Figura 50).

A rapamicina foi capaz de reverter a regulação positiva de BMAL1 nesses animais com deleção de PER2 e ao mesmo tempo houve a redução da proteína S6 fosforilada, que ta'mbém apresentou aumento nos animais com deleção de PER2, que mTOR desempenha papel significativo na regulação da expressão de BMAL1.

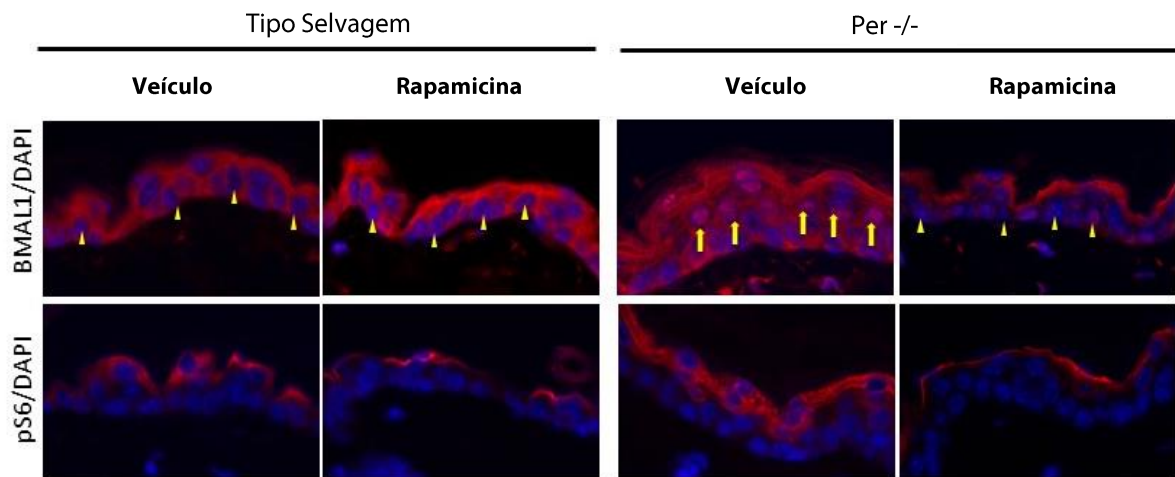


Figura 50. Modulação de BMAL1 e pS6 pela deleção de PER2 e reversão pelo tratamento com rapamicina. Imunofluorescência para BMAL1 e p-S6 de tecido epitelial de animais controle (Wild Type) e com deleção de PER2 (PER2^{-/-}) tratados com veículo e rapamicina por 15 dias. Os resultados confirmam que a expressão de BMAL1 é regulada pela via de PI3K uma vez que a regulação positiva de BMAL1 nos animais com knockout de PER2 tiveram os níveis de BMAL1 normalizados após o tratamento com rapamicina.

6. Discussão

6. Discussão

A subunidade regulatória B56Δ de PP2A foi identificada como responsável pela desfosforilação do resíduo S380 de PTEN (Figuras 14, 17 e 19), principal resíduo relacionado a sua atividade. Contudo, não foi possível modular a desfosforilação dos resíduos subsequentes T383 e T383, uma vez que para haver modulação de atividade de PTEN através desses resíduos, é necessário que os três estejam desfosforilados (Vazquez *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2003; Maccario *et al.*, 2007). Embora Cordier *et al.* (2012) tenham mostrado que o resíduo de S380 é o primeiro resíduo que deve ser fosforilado para que ocorra a fosforilação de T383 e T383, a desfosforilação desse resíduo não foi suficiente desencadear alteração no *status* de fosforilação dos outros dois. Além disso, a subunidade de PP2A B56Δ foi mostrada como fosfatase reguladora de p-GSK3β S9 (Yu *et al.*, 2014), resíduo que quando desfosforilado torna GSK3 β ativada (McCubrey *et al.*, 2014). A quinase GSK3 β, juntamente de CK2, permeia a fosforilação de PTEN nos sítios de T366 e S362, também relacionados a inibição de PTEN.

O aumento da expressão da proteína SET resultou em aumento nos níveis de PTEN (Figuras 15, 22 e 23) e quando co-transfectados os vetores de SET e PTEN houve aumento nos níveis de p-PTEN S380 da proteína PTEN recombinante (Figura 29). Além disso foi observado aumento da atividade de PTEN nas células superexpressando SET (Figura 21), diferente do esperado, uma vez que aparentemente a proteína PP2A participa do mecanismo de ativação de PTEN, contudo, esse mecanismo parece estar relacionado ao controle da expressão gênica de PTEN e não a inibição enzimática de PP2A uma vez que essas células apresentaram aumento de PTEN total no *Western blot* (Figuras 15 e 22). Os resultados observados para a atividade de PP2A (Figura 16) e atividade de PTEN (Figura 21) nas células HEK293 transfectadas com a região 1 a 119 e seu mutante 1a 119 L107Q/K119D, mostraram que a região 1 a 119 e os resíduos de L170 e K119 são importantes para que a SET mantenha as características necessárias para a inibição de PP2A. Embora a região 1 a 119 não tenha sido capaz de alterar a atividade de PTEN, a perda de inibição de PP2A pela região mutante 1 a 119 L107Q/K119D resultou em aumento de atividade de PTEN sugerindo que a liberação de PP2A pela SET permite que essa fosfatase regule positivamente a atividade de PTEN, provavelmente através da desfosforilação de um ou mais resíduos de PTEN. Ainda, no ensaio de colocalização as mutações da região 1 a 119 L107Q/K119D mostraram modular a colocalização de PP2A B e PTEN (Figura 23), a região com mutação apesar de possuir menor efeito inibitório de PP2A, resultou em aumentos dos níveis de p-PTEN S380 no *Western blot* (Figura 23). Como se tratam

de resultados nunca antes mostrados na literatura, não podemos ainda determinar os mecanismos envolvidos nesse processo.

Ao serem tratadas com os agentes mimetizadores de estresse oxidativo, *t*-BHP e H₂O₂, na ausência de SBF as células HN12 (Figura 25 A) e HEK293 (Figura 25 C) não sofreram modulação de PTEN por esses compostos, apenas na presença de SBF 10% houve aumento de PTEN fosforilado e redução de PTEN total e fosforilado em células HEK293 (Figura 25 B), esses resultados concordam com a observação de Lim e Clément, *et. al.* (2007) que ao retirar o soro da cultura celular de MEFs por 24 horas, deixa de ser observada oxidação constitutiva de PTEN em consequência à redução nos níveis de íon superóxido intracelular. Os tratamentos com 250 µM e 1000 µM de H₂O₂ resultaram em oxidação da proteína PTEN (Figura 26), concordando com resultados publicados anteriormente (Leopoldino *et al.*, 2011). Os testes com ELISA para p-PTEN S380, confirmaram os resultados observados por *Western blot* (Figura 27), entretanto, concordando com resultados anteriores, o acúmulo da SET atua na manutenção dos níveis de PTEN fosforilado após indução do estresse oxidativo, no caso H₂O₂, (Figura 27 C). Além disso, o resultado apresentado em Figura 27 B, confirma a desfosforilação de PTEN S380 pela subunidade B56Δ de PTEN assim como o pouco efeito da proteína SET em inibir essa desfosforilação.

Com relação a p-Akt foi verificado no trabalho que a SET induz elevação nos níveis de p-Akt S473 e S308 (Figuras 22 e 28) confirmando a hipótese de SET regula positivamente a via de PI3K-Akt, provavelmente pela indução da expressão de PTEN. Contudo, apesar de regular a fosforilação de PTEN S380, a subunidade B56Δ de PP2A não se mostrou capaz de regular a fosforilação de Akt no resíduo de S308 (Figuras 22 e 28), induzindo o acúmulo apenas de p-Akt S473 (Figuras 22). Geralmente, o aumento nos níveis de Akt S473 é utilizado para confirmar a deleção de PTEN (Reddy *et al.*, 2008; Squarize *et al.*, 2010) e nos resultados apresentados ocorre redução nos níveis de p-PTEN S380, mas essa redução não pode ser relacionada a degradação de PTEN induzida por sua desfosforilação, uma vez que concluímos que ocorre a desfosforilação apenas do resíduo de S380, e para que a proteína seja levada a degradação é necessária a desfosforilação de toda a calda C-terminal (Vazquez *et al.*, 2000). De outro modo, o aumento de p-Akt S473 foi relacionado por Benesh *et al.* (2013) ao aumento nos níveis de p-PTEN S380, quando PTEN total tem seus níveis inalterados. Podemos, portanto, propor que a desfosforilação de PTEN exclusivamente no resíduo de S380 regula a via PKB/Akt.

O fracionamento de núcleo e citoplasma para células HEK293 evidenciou o aumento de PTEN no citoplasma dessas células, assim como a redução após tratamento com H₂O₂. Por

outro lado, o tratamento com 250 M de t-BHP resultou em aumento de PTEN nuclear, sugerindo mecanismos independentes para esses agentes (Figura 30).

O silenciamento de PTEN em células HN13 e NOK-SI (Figura 33) resultou em aumento nos níveis de PTEN, conforme esperado (Reddy *et al.*, 2008; Squarize *et al.*, 2010), contudo não afetou a outras proteínas estudadas. O silenciamento de SET evidenciou seu papel na expressão de PTEN e o resultado dessa modulação sobre a via de PI3K-Akt, em células HN13 (Figura 34). Contrariamente aos resultados obtidos com a superexpressão da subunidade B56Δ da PP2A, o *shRNA* para essa proteína não mostrou alteração nos níveis de PTEN fosforilado (Figura 36).

A redução na expressão de *PTEN* após o acúmulo da SET foi confirmada pelo ensaio de PCR Real Time, enquanto, o silenciamento da SET mostrou respostas diferentes para o *siRNA* e o *shRNA* e também entre as linhagens avaliadas. A linhagem Cal27 após *siRNA* apresentou redução significativa nos níveis de RNAm de PTEN mas essa redução não foi traduzida aos níveis de proteína, enquanto o *shRNA* para SET, apresentou aumento nos níveis de RNAm e proteína PTEN nessa linhagem. Para a linhagem HN12, o *siRNA* e o *shRNA* tiveram mesma respostas com aumento mais evidente nos níveis de PTEN proteína e RNAm após o *siRNA*. A resposta da linhagem HN13 ao *siRNA* e ao *shRNA* foram muito próximas, com redução na expressão de *PTEN*. Além de atuar como inibidor da fosfatase PP2A a SET participa da regulação de acetilação de histonas, sendo uma subunidade do complexo inibidor de acetiltransferases - INHAT (Seo *et al.*, 2001). O complexo SET/INHAT inibe a acetilação de histonas por se ligar e mascarar as lisinas das histonas alvos de acetiltransferases, ao manter as histonas na forma hipoacetilada, ela atua na repressão transcricional de regiões específicas do DNA (Kim *et al.*, 2010). O papel da SET no controle epigenético pode ser relacionado ao aumento da expressão de *PTEN* em células de CECP com *knockdown* de SET, contudo, o aumento nos níveis de mRNA e proteína de PTEN em células HEK293 superexpressando SET e a redução dos mesmos em HN13 após silenciamento de SET sugerem a participação da SET no controle da expressão gênica por outro mecanismo além do complexo INHAT.

Ao comparar a expressão de *PTEN* e *p16* no acúmulo da SET (HEK293 superexpressando SET e linhagens de CECPs) foi identificada resposta semelhante entre a expressão de *PTEN* e *p16*. A expressão de *p16* é positivamente regulada por um complexo formado pela histona acetiltransferase p300, CREB-binding protein (CBP) e pelo fator de transcrição de DNA HBP1 (Wang *et al.*, 2012), a expressão de *p16* também pode ser controlada por HDAC3 e HDAC4 (Wang *et al.*, 2008) quando apresenta inibição de sua expressão por consequência a hipoacetilação gerada (Coombes *et al.*, 2003), ainda, a expressão de *p16* pode

ser regulada positivamente regulada por TSA e 5-aza-deoxicitida (Coombes *et al.*, 2003). A observação de respostas semelhantes para expressão de *p16* e *PTEN* no aumento da SET sugere que a expressão *PTEN* seja regulada por mecanismo comparável ao de *p16*. Contudo, os níveis de expressão de *PTEN* e *p16* responderam diferencialmente ao silenciamento de SET nas linhagens de CECPs, e ao tratamento com TSA e 5-aza-deoxicitina, e indica que estes genes são regulados por mecanismos diferentes de controle da expressão gênica.

Embora tenha seja descrito que alterações no ritmo circadiano afetam a tumorigênese (Hansen, 2001; Schernhammer *et al.*, 2001; Conlon *et al.*, 2007), pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares envolvidos nessa resposta. O aumento de BMAL1 observado nos animais com perda de função de PTEN por oxidação ou deleção de *Pten* pode ser relacionado a esse mecanismo. A ativação de mTOR e seu papel no controle da expressão de BMAL1 observado nesse trabalho corrobora ao aumento de mTOR observado por (Khapre *et al.*, 2014) em animais com deleção de BMAL, assim como a redução do metabolismo e aumento da expectativa de vida desses animais após tratamento com rapamicina.

7. Conclusão

7. Conclusão

Os mecanismos de regulação de PTEN estudados neste trabalho sugerem que a proteína SET e a PP2A estão envolvidas na regulação de PTEN, mas para determinar os mecanismos moleculares mais estudados precisam ser realizados.

Os resultados obtidos sugerem que a perda de função de PTEN (oxidação) assim como a sua deleção (*siRNA* e camundongos com deleção de PTEN) resulta no aumento de expressão de BMAL1 e que este efeito pôde ser revertido pelo tratamento com rapamicina em animais com knockout para PTEN e PER2. Além disso, a redução dos complexos mTOR-Raptor e mTOR-Rictor resultou na redução de BMAL1. Esses resultados sugerem que a regulação de BMAL1 pela via de PI3K/mTOR ocorre *downstream* às proteínas PTEN e mTOR.

8. Referências

8. Referências

ANG, K. et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. **Cancer Res**, v. 62, n. 24, p. 7350-6, Dec 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12499279 >.

ARNAUD, L. et al. Mechanism of inhibition of PP2A activity and abnormal hyperphosphorylation of tau by I2(PP2A)/SET. **FEBS Lett**, v. 585, n. 17, p. 2653-9, Sep 2011. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21806989> >.

ARNOLD, H.; SEARS, R. A tumor suppressor role for PP2A-B56alpha through negative regulation of c-Myc and other key oncoproteins. **Cancer Metastasis Rev**, v. 27, n. 2, p. 147-58, Jun 2008. ISSN 0167-7659. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18246411 >.

AWADA, A.; LALAMI, Y. Molecular markers, molecular-targeted therapies and taxanes: how to integrate the progress into clinical research and practice for the management of head and neck cancers. **Curr Opin Oncol**, v. 17, n. 3, p. 209-11, May 2005. ISSN 1040-8746 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15818162 >.

BAAN, R. et al. A review of human carcinogens--Part F: chemical agents and related occupations. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 12, p. 1143-4, Dec 2009. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19998521> >.

BAEZA, N. et al. PTEN methylation and expression in glioblastomas. **Acta Neuropathol**, v. 106, n. 5, p. 479-85, Nov 2003. ISSN 0001-6322. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12904991 >.

BENESH, E. C. et al. Maternal high-fat diet induces hyperproliferation and alters Pten/Akt signaling in prostates of offspring. **Sci Rep**, v. 3, p. 3466, 2013. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24322661> >.

BIELER, J. et al. Robust synchronization of coupled circadian and cell cycle oscillators in single mammalian cells. **Mol Syst Biol**, v. 10, p. 739, 2014. ISSN 1744-4292. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25028488> >.

BONONI, A. et al. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. **Enzyme Res**, v. 2011, p. 329098, 2011. ISSN 2090-0414. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904669> >.

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **J Cell Biol**, v. 106, n. 3, p. 761-71, Mar 1988. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450098> >.

BUNNEY, T.; KATAN, M. Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 5, p. 342-52, May 2010. ISSN 1474-1768. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20414202 >.

CARDINALI, M. et al. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. **Int J Cancer**, v. 61, n. 1, p. 98-103, Mar 1995. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705939> >.

CARLSON, S. et al. Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. **J Am Soc Nephrol**, v. 9, n. 10, p. 1873-80, Oct 1998. ISSN 1046-6673. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9773788 >.

CASTILHO, R. M. et al. Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10503, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463891> >.

CHEN, S. T. et al. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 7, p. 1241-6, Jul 2005. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790588> >.

CHEN, W. et al. Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. **Cancer Cell**, v. 5, n. 2, p. 127-36, Feb 2004. ISSN 1535-6108. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14998489 >.

CHERNOFF, J. et al. Characterization of a phosphotyrosyl protein phosphatase activity associated with a phosphoserine protein phosphatase of Mr = 95,000 from bovine heart. **J Biol Chem**, v. 258, n. 12, p. 7852-7, Jun 1983. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6305959 >.

CONLON, M.; LIGHTFOOT, N.; KREIGER, N. Rotating shift work and risk of prostate cancer. **Epidemiology**, v. 18, n. 1, p. 182-3, Jan 2007. ISSN 1044-3983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179764> >.

COOMBES, M. M. et al. Resetting the histone code at CDKN2A in HNSCC by inhibition of DNA methylation. **Oncogene**, v. 22, n. 55, p. 8902-11, Dec 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14654786> >.

CORDIER, F. et al. Ordered Phosphorylation Events in Two Independent Cascades of the PTEN C-tail Revealed by NMR. **J Am Chem Soc**, v. 134, n. 50, p. 20533-43, Dec 2012. ISSN 1520-5126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23171049> >.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 22, p. 10881-90, Nov 1988. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2849754> >.

CROCKETT, D. K. et al. Analysis of phosphatase and tensin homolog tumor suppressor interacting proteins by in vitro and in silico proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 5, p. 1250-62, Apr 2005. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15717329> >.

CULLY, M. et al. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 3, p. 184-92, Mar 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16453012 >.

DAS, S.; DIXON, J. E.; CHO, W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 13, p. 7491-6, Jun 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808147> >.

ENG, C. PTEN: one gene, many syndromes. **Hum Mutat**, v. 22, n. 3, p. 183-98, Sep 2003a. ISSN 1098-1004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12938083 >.

_____. PTEN: one gene, many syndromes. **Hum Mutat**, v. 22, n. 3, p. 183-98, Sep 2003b. ISSN 1098-1004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12938083 >.

Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil. INCA/MS 2016.

FARRELL, A. S. et al. Targeting Inhibitors of the Tumor Suppressor PP2A for the Treatment of Pancreatic Cancer. 2014-06-01 2014. Disponível em: < <http://mcr.aacrjournals.org/content/12/6/924> >.

FORESTER, C. et al. Control of mitotic exit by PP2A regulation of Cdc25C and Cdk1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 50, p. 19867-72, Dec 2007. ISSN 1091-6490. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18056802 >.

FOULADKOU, F. et al. The ubiquitin ligase Nedd4-1 is dispensable for the regulation of PTEN stability and localization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 25, p. 8585-90, Jun 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562292> >.

FU, L. et al. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. **Cell**, v. 111, n. 1, p. 41-50, Oct 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372299> >.

GASTEIGER, E. et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 13, p. 3784-8, Jul 2003. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824418> >.

GERY, S. et al. Transcription profiling of C/EBP targets identifies Per2 as a gene implicated in myeloid leukemia. **Blood**, v. 106, n. 8, p. 2827-36, Oct 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15985538> >.

GIOANNI, J. et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. **Eur J Cancer Clin Oncol**, v. 24, n. 9, p. 1445-55, Sep 1988. ISSN 0277-5379. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3181269> >.

GRAHAM, F. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J Gen Virol**, v. 36, n. 1, p. 59-74, Jul 1977. ISSN 0022-1317. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=886304 >.

HANSEN, J. Increased breast cancer risk among women who work predominantly at night. **Epidemiology**, v. 12, n. 1, p. 74-7, Jan 2001. ISSN 1044-3983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138824> >.

HORITA, H. et al. Nuclear PTEN functions as an essential regulator of SRF-dependent transcription to control smooth muscle differentiation. **Nat Commun**, v. 7, p. 10830, 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26940659> >.

HU, X. et al. Inhibition of Pten deficient Castration Resistant Prostate Cancer by Targeting of the SET - PP2A Signaling axis. **Scientific Reports, Published online: 13 November 2015; | doi:10.1038/srep15182**, 2015-09-15 2015. Disponível em: < <http://www.nature.com/articles/srep15182> >.

JACOB, A. I. et al. Nuclear PTEN levels and G2 progression in melanoma cells. **Melanoma Res**, v. 19, n. 4, p. 203-10, Aug 2009. ISSN 1473-5636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478684> >.

JANGHORBAN, M. et al. Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. 2014-06-24 2014. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/111/25/9157> >.

JANSSENS, V.; GORIS, J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. **Biochem J**, v. 353, n. Pt 3, p. 417-39, Feb 2001. ISSN 0264-6021. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11171037 >.

JIANG, B.; LIU, L. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. **Adv Cancer Res**, v. 102, p. 19-65, 2009. ISSN 0065-230X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19595306 >.

KENIRY, M.; PARSONS, R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5477-85, Sep 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794882> >.

KHAPRE, R. V. et al. BMAL1-dependent regulation of the mTOR signaling pathway delays aging. **Aging (Albany NY)**, v. 6, n. 1, p. 48-57, Jan 2014. ISSN 1945-4589. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481314> >.

KIM, D. W. et al. Negative regulation of neuronal cell differentiation by INHAT subunit SET/TAF-I β . **Biochem Biophys Res Commun**, v. 400, n. 3, p. 419-25, Sep 2010. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20800572> >.

KITAGISHI, Y.; MATSUDA, S. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cancer and aging (Review). **Int J Mol Med**, v. 31, n. 3, p. 511-5, Mar 2013. ISSN 1791-244X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313933> >.

KLEIN, J. D.; GRANDIS, J. R. The molecular pathogenesis of head and neck cancer. **Cancer Biol Ther**, v. 9, n. 1, p. 1-7, Jan 2010. ISSN 1538-4047 (Print)1555-8576 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KONDRATOV, R. V. et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. **Genes Dev**, v. 20, n. 14, p. 1868-73, Jul 2006. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847346> >.

KUO, Y. et al. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. **J Biol Chem**, v. 283, n. 4, p. 1882-92, Jan 2008a. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18042541 >.

_____. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. **J Biol Chem**, v. 283, n. 4, p. 1882-92, Jan 2008b. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18042541 >.

KURASAWA, Y. et al. PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 19, n. 6, p. 1429-34, Jun 2008. ISSN 1021-335X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18497947 >.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274-93, Apr 2012. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500797> >.

LEE, C. et al. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. **Cell**, v. 107, n. 7, p. 855-67, Dec 2001. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779462> >.

LEE, S. R. et al. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. **J Biol Chem**, v. 277, n. 23, p. 20336-42, Jun 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11916965> >.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9-22, Jan 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160525> >.

LEOPOLDINO, A. M. et al. Accumulation of the SET protein in HEK293T cells and mild oxidative stress: cell survival or death signaling. **Mol Cell Biochem**, Dec 2011a. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22143534> >.

_____. Accumulation of the SET protein in HEK293T cells and mild oxidative stress: cell survival or death signaling. **Mol Cell Biochem**, Dec 2011b. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22143534> >.

_____. Accumulation of the SET protein in HEK293T cells and mild oxidative stress: cell survival or death signaling. **Mol Cell Biochem**, v. 363, n. 1-2, p. 65-74, Apr 2012. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22143534> >.

_____. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. **Oral Oncol**, v. 48, n. 11, p. 1106-13, Nov 2012. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739068> >.

LESLIE, N. R. et al. Understanding PTEN regulation: PIP₂, polarity and protein stability. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5464-76, Sep 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794881> >.

LI, J. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1943-7, Mar 1997a. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9072974 >.

_____. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1943-7, Mar 1997b. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9072974 >.

LI, M.; MAKKINJE, A.; DAMUNI, Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. **J Biol Chem**, v. 271, n. 19, p. 11059-62, May 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8626647 >.

LIGRESTI, G. et al. PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. **Cell Cycle**, v. 8, n. 9, p. 1352-8, May 2009. ISSN 1551-4005. Disponível em: <

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19305151 >.
- LIM, S.; CLÉMENT, M. V. Phosphorylation of the survival kinase Akt by superoxide is dependent on an ascorbate-reversible oxidation of PTEN. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n. 8, p. 1178-92, Apr 2007. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382199> >.
- LIU, F. et al. PTEN enters the nucleus by diffusion. **J Cell Biochem**, v. 96, n. 2, p. 221-34, Oct 2005a. ISSN 0730-2312. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16088943 >.
- _____. PTEN enters the nucleus by diffusion. **J Cell Biochem**, v. 96, n. 2, p. 221-34, Oct 2005b. ISSN 0730-2312. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16088943 >.
- LIU, G. P. et al. I(2)(PP2A) regulates p53 and Akt correlatively and leads the neurons to abort apoptosis. **Neurobiol Aging**, v. 33, n. 2, p. 254-64, Feb 2012. ISSN 1558-1497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20138402> >.
- MA, J. et al. Negative regulation of Pim-1 protein kinase levels by the B56beta subunit of PP2A. **Oncogene**, v. 26, n. 35, p. 5145-53, Aug 2007. ISSN 0950-9232. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17297438 >.
- MACCARIO, H. et al. PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366. **Biochem J**, v. 405, n. 3, p. 439-44, Aug 2007. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17444818> >.
- MAEHAMA, T.; DIXON, J. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. **J Biol Chem**, v. 273, n. 22, p. 13375-8, May 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9593664 >.
- MASRI, S.; SASSONE-CORSI, P. Plasticity and specificity of the circadian epigenome. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 11, p. 1324-9, Nov 2010. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975756> >.
- MCCUBREY, J. A. et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 10, p. 2881-911, May 2014. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24931005> >.
- MEHENNI, H. et al. LKB1 interacts with and phosphorylates PTEN: a functional link between two proteins involved in cancer predisposing syndromes. **Hum Mol Genet**, v. 14, n. 15, p. 2209-19, Aug 2005. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987703> >.

MISTAFA, O. et al. Purinergic receptor-mediated rapid depletion of nuclear phosphorylated Akt depends on pleckstrin homology domain leucine-rich repeat phosphatase, calcineurin, protein phosphatase 2A, and PTEN phosphatases. **J Biol Chem**, v. 285, n. 36, p. 27900-10, Sep 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20605778> >.

MORGULIS, A. et al. Database indexing for production MegaBLAST searches. 2008-08-15 2008. Disponível em: < <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/24/16/1757.long> >.

MORRIS, L.; VEERIAH, S.; CHAN, T. Genetic determinants at the interface of cancer and neurodegenerative disease. **Oncogene**, v. 29, n. 24, p. 3453-64, Jun 2010. ISSN 1476-5594. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20418918 >.

MUKHOPADHYAY, A. et al. Direct interaction between the inhibitor 2 and ceramide via sphingolipid-protein binding is involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity and signaling. **FASEB J**, v. 23, n. 3, p. 751-63, Mar 2009. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028839> >.

_____. Targeting inhibitor 2 of protein phosphatase 2A as a therapeutic strategy for prostate cancer treatment. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.25943>, 2013-08-05 2013. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/cbt.25943> >.

MUMBY, M. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 21-4, Jul 2007a. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17632053 >.

_____. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 21-4, Jul 2007b. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17632053 >.

NHO, R. S.; KAHM, J. beta1-Integrin-collagen interaction suppresses FoxO3a by the coordination of Akt and PP2A. **J Biol Chem**, v. 285, n. 19, p. 14195-209, May 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223831> >.

ODRIOZOLA, L. et al. Regulation of PTEN activity by its carboxyl-terminal autoinhibitory domain. **J Biol Chem**, v. 282, n. 32, p. 23306-15, Aug 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565999> >.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Sci**, v. 100, n. 12, p. 2235-41, Dec 2009. ISSN 1349-7006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19737147 >.

PEDRERO, J. et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 114, n. 2, p. 242-8, Mar 2005. ISSN 0020-7136. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15543611 >.

PLANCHON, S. M.; WAITE, K. A.; ENG, C. The nuclear affairs of PTEN. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 3, p. 249-53, Feb 2008. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216329> >.

RAHDAR, M. et al. A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 2, p. 480-5, Jan 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114656> >.

REDDY, P. et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, n. 5863, p. 611-3, Feb 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239123> >.

RUVOLO, P. et al. A functional role for the B56 alpha-subunit of protein phosphatase 2A in ceramide-mediated regulation of Bcl2 phosphorylation status and function. **J Biol Chem**, v. 277, n. 25, p. 22847-52, Jun 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11929874 >.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-4, Dec 1985. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999980> >.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=271968 >.

SCHERER, W. F.; SYVERTON, J. T.; GEY, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. **J Exp Med**, v. 97, n. 5, p. 695-710, May 1953. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13052828> >.

SCHERNHAMMER, E. S. et al. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, n. 20, p. 1563-8, Oct 2001. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11604480> >.

SEELING, J. et al. Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. **Science**, v. 283, n. 5410, p. 2089-91, Mar 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10092233 >.

SEO, S. B. et al. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. **Cell**, v. 104, n. 1, p. 119-30, Jan 2001a. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163245> >.

_____. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. **Cell**, v. 104, n. 1, p. 119-30, Jan 2001b. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163245> >.

SHARRARD, R.; MAITLAND, N. Alternative splicing of the human PTEN/MMAC1/TEP1 gene. **Biochim Biophys Acta**, v. 1494, n. 3, p. 282-5, Dec 2000. ISSN 0006-3002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11121587 >.

SHEN, W. H. et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. **Cell**, v. 128, n. 1, p. 157-70, Jan 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17218262> >.

SINGH, G.; CHAN, A. M. Post-translational modifications of PTEN and their potential therapeutic implications. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 5, p. 536-47, Jun 2011. ISSN 1873-5576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486223> >.

SONG, M. S. et al. Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. **Cell**, v. 144, n. 2, p. 187-99, Jan 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241890> >.

SQUARIZE, C.; CASTILHO, R.; SANTOS PINTO, D. J. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. **J Oral Pathol Med**, v. 31, n. 7, p. 379-84, Aug 2002. ISSN 0904-2512. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12224530 >.

SQUARIZE, C. H. et al. Accelerated wound healing by mTOR activation in genetically defined mouse models. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10643, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498714> >.

SQUARIZE, C. H.; CASTILHO, R. M.; GUTKIND, J. S. Chemoprevention and treatment of experimental Cowden's disease by mTOR inhibition with rapamycin. **Cancer Res**, v. 68, n. 17, p. 7066-72, Sep 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757421> >.

STAMBOLIC, V. et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. **Cell**, v. 95, n. 1, p. 29-39, Oct 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9778245 >.

STECK, P. et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat Genet**, v. 15, n. 4, p. 356-62, Apr 1997. ISSN 1061-4036. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9090379 >.

STRANSKY, N. et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1157-60, Aug 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798893> >.

TANIMUKAI, H.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, v. 166, n. 6, p. 1761-71, Jun 2005. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15920161> >.

TEN KLOOSTER, J. et al. Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. **EMBO J**, v. 26, n. 2, p. 336-45, Jan 2007. ISSN 0261-4189. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17245428 >.

TROTMAN, L. C. et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. **Cell**, v. 128, n. 1, p. 141-56, Jan 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17218261> >.

VAZQUEZ, F. et al. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 14, p. 5010-8, Jul 2000a. ISSN 0270-7306. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10866658 >.

_____. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 14, p. 5010-8, Jul 2000b. ISSN 0270-7306. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10866658 >.

VON LINDERN, M. et al. Characterization of the translocation breakpoint sequences of two DEK-CAN fusion genes present in t(6;9) acute myeloid leukemia and a SET-CAN fusion gene found in a case of acute undifferentiated leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 5, n. 3, p. 227-34, Oct 1992. ISSN 1045-2257. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1384675 >.

WANG, W. et al. The acetylation of transcription factor HBP1 by p300/CBP enhances p16INK4A expression. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 3, p. 981-95, Feb 2012. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21967847> >.

WANG, X. et al. YY1 restrained cell senescence through repressing the transcription of p16. **Biochim Biophys Acta**, v. 1783, n. 10, p. 1876-83, Oct 2008. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558095> >.

World Cancer Report 2014. STEWART, B. A. W., CP. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2014.

XIA, H. C. et al. Deregulated expression of the Per1 and Per2 in human gliomas. **Can J Neurol Sci**, v. 37, n. 3, p. 365-70, May 2010. ISSN 0317-1671. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20481271> >.

XU, D. et al. Regulation of PTEN stability and activity by Plk3. **J Biol Chem**, v. 285, n. 51, p. 39935-42, Dec 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20940307> >.

XU, J. et al. The molecular mechanism underlying morphine-induced Akt activation: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. **Cell Biochem Biophys**, v. 61, n. 2, p. 303-11, Nov 2011a. ISSN 1559-0283. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626435> >.

_____. The molecular mechanism underlying morphine-induced Akt activation: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. **Cell Biochem Biophys**, v. 61, n. 2, p. 303-11, Nov 2011b. ISSN 1559-0283. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626435> >.

XU, X. et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin with rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-specific knockout of PTEN. **Hypertension**, v. 63, n. 4, p. 729-39, Apr 2014. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24446058> >.

YEUDALL, W. A. et al. MTS1/CDK4I is altered in cell lines derived from primary and metastatic oral squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 12, p. 2683-6, Dec 1994. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001221> >.

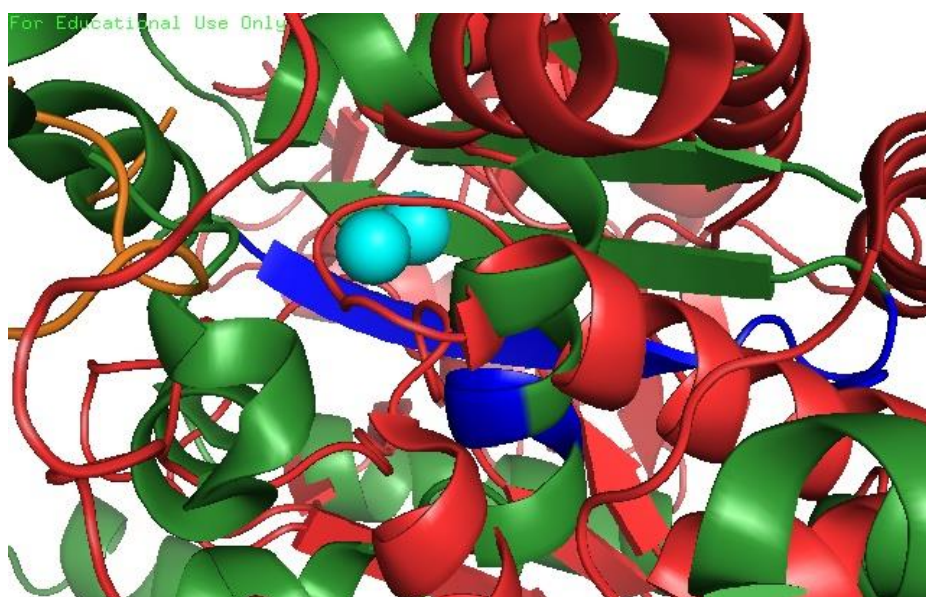
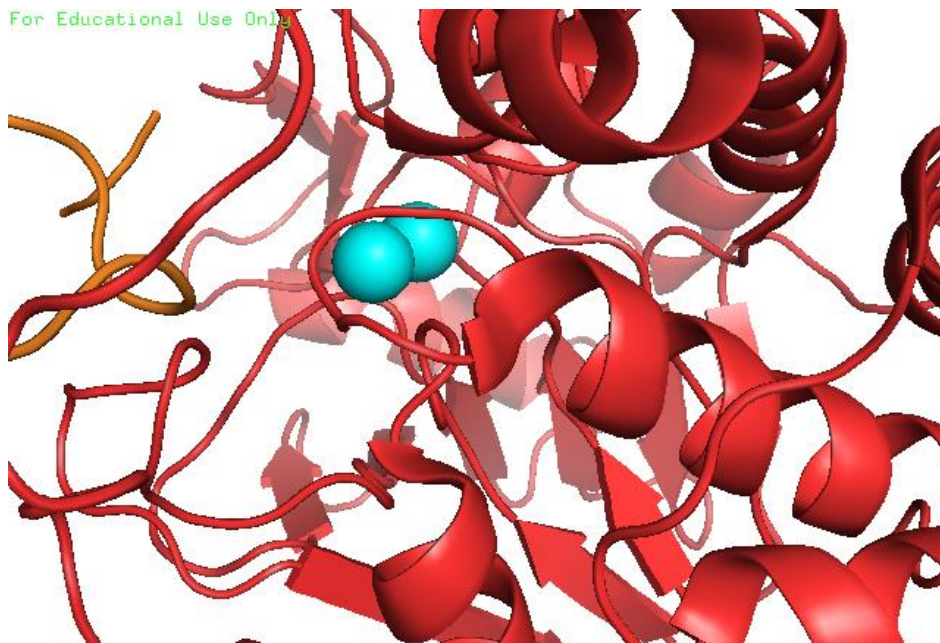
YU, U. Y.; YOO, B. C.; AHN, J. H. Regulatory B Subunits of Protein Phosphatase 2A Are Involved in Site-specific Regulation of Tau Protein Phosphorylation. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, n. 2, p. 155-61, Apr 2014. ISSN 1226-4512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24757378> >.

9. Apêndices

9. Apêndices

9.1. Apêndice I

Estudos de conformação e interação das proteínas PP2A e SET para identificação de sítios para mutação sítio-específica.



9.2. Apêndice II

Resultado de sequenciamentos para construções da SET e suas regiões.

SET cI4 pDONR/Zeo – M13 Rv				
Homo sapiens SET nuclear oncogene (SET), transcript variant 2, mRNA				
Sequence ID: ref NM_003011.3 Length: 2936Number of Matches: 1				
Range 1: 355 to 1187 GenBankGraphics Next MatchPrevious Match				
Alignment statistics for match #1				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1533 bits(830)	0.0	832/833(99%)	0/833(0%)	Plus/Minus
Query 125	TTAGTcatcttctccttcacocctcctcctcctcccttcatcatcatcttcatcttc	184		
Sbjct 1187	TTAGTCATCTTCTCCTTCATCCTCCTCCTCCTCCTCCCTTCATCATCATCTTCACTTC	1128		
Query 185	ttcaccttcatcctcatccccttcttcgtaaatatcttctaatccttccctcctcttcate	244		
Sbjct 1127	TTCACCTTCATCCTCATCCCTTCTTCGTAATATCTTCTAATCCTTCTCCTCTTCATC	1068		
Query 245	atcatcatcatcttcttctccttctccttcttcatcatccatateGGGAACCAAGTAGTA	304		
Sbjct 1067	ATCATCATCATCTTCTTCTCCTTCTCCTTCTTCATCATCCATATCGGAACCAAGTAGTA	1008		
Query 305	CTGTAATGGGTTTGGCCAAATATCATCTTTGATGACCTCTCCTAACTCATCAGCACCTGC	364		
Sbjct 1007	CTGTAATGGGTTTGGCCAAATATCATCTTTGATGACCTCTCCTAACTCATCAGCACCTGC	948		
Query 365	ATCAGAATGGTCAGTAAACCAGGTAAAGAAGCTCTCTGGTTCCTCATGCTGCCTCTTCCT	424		
Sbjct 947	ATCAGAATGGTCAGTAAACCAGGTAAAGAAGCTCTCTGGTTCCTCATGCTGCCTCTTCCT	888		
Query 425	GCTGGCTTTATTCTGCGTTTGACTCGAACGTTTCGTCAAATCCTTCCAGATTCCATTT	484		
Sbjct 887	GCTGGCTTTATTCTGCGTTTGACTCGAACGTTTCGTCAAATCCTTCCAGATTCCATTT	828		
Query 485	GATTTTCGGTGGACTTCGAAGATGGATCACCCTCTCATTAGATGAAATTCCTTGGAGAG	544		
Sbjct 827	GATTTTCGGTGGACTTCGAAGATGGATCACCCTCTCATTAGATGAAATTCCTTGGAGAG	768		
Query 545	AACTTTATTTTCAAAGTAAGGATTTTCATCAAATAAAAAATCTATTCTGTAACTGATTT	604		
Sbjct 767	AACTTTATTTTCAAAGTAAGGATTTTCATCAAATAAAAAATCTATTCTGTAACTGATTT	708		
Query 605	AATATCTTCAAATCTGTCACTTCAACTCTGGTCAAATAATGCAGTGCCTCTTCATCTTC	664		
Sbjct 707	AATATCTTCAAATCTGTCACTTCAACTCTGGTCAAATAATGCAGTGCCTCTTCATCTTC	648		
Query 665	CTCCCAAGCAGTGCAGACACTTGTGGATGGTTGACAAATGTTGTTACCCAAAAATTGG	724		
Sbjct 647	CTCCCAAGCAGTGCAGACACTTGTGGATGGTTGACAAATGTTGTTACCCAAAAATTGG	588		
Query 725	GATTTTGGCGATCAATTCTGACCTCTTCTGAAAAATGGTTGGCGGAGTTGTTATATTT	784		
Sbjct 587	GATTTTGGCGATCAATTCTGACCTCTTCTGAAAAATGGTTGGCGGAGTTGTTATATTT	528		
Query 785	CTGTTCTACTTTCAAATCTCCTCACTGGCTTGTTCATTAAGTCTGTCTATTTCAATTTG	844		
Sbjct 527	CTGTTCTACTTTCAAATCTCCTCACTGGCTTGTTCATTAAGTCTGTCTATTTCAATTTG	468		
Query 845	TACTTCATCAATGTGTTCAATCGCTTCTTGCTGTTCTTTTTCTGAGGTCTCGTCGGCCCC	904		
Sbjct 467	TACTTCATCAATGTGTTCAATCGCTTCTTGCTGTTCTTTTTCTGAGGTCTCGTCGGCCCC	408		
Query 905	GTCGTGGTTGGAGTTGAGCTCCTTTTTACTGACTTTGGCCGCTGCGCCGACA	957		
Sbjct 407	GTCGTGGTTGGAGTTGAGCTCCTTTTTACTGACTTTGGCCGCTGCGCCGACA	355		

```

      1      10      20      30      40      50      60      70      80      90
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
SET,var2  MSAPAAKYSKKELENSNHGADETSEKEQQAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQFFQKRSELIAKIPNFVYVTFVY
SETc14-Rv AGLSAQAAKYSKKELENSNHGADETSEKEQQAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQFFQKRSELIAKIPNFVYVTFVY
SETc14-Fu  LSAQAAKYSKKELENSNHGADETSEKEQQAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQFFQKRSELIAKIPNFVYVTFVY
Consensus ..$SAqAAKYSKKELENSNHGADETSEKEQQAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQFFQKRSELIAKIPNFVYVTFVY

      91     100     110     120     130     140     150     160     170     180
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
SET,var2  HPQVSALLGEEDEEALHLYLTRYEVTEFEDIKSGYRIDFYFDENPYFENKYLKSEFHLNESGDPSSKSTEIKMKSGKDLTKRSSQTQNKAS
SETc14-Rv HPQVSALLGEEDEEALHLYLTRYEVTEFEDIKSGYRIDFYFDENPYFENKYLKSEFHLNESGDPSSKSTEIKMKSGKDLTKRSSQTQNKAS
SETc14-Fu  HPQVSALLGEEDEEALHLYLTRYEVTEFEDIKSGYRIDFYFDENPYFENKYLKSEFHLNESGDPSSKSTEIKMKSGKDLTKRSSQTQNKAS
Consensus HPQVSALLGEEDEEALHLYLTRYEVTEFEDIKSGYRIDFYFDENPYFENKYLKSEFHLNESGDPSSKSTEIKMKSGKDLTKRSSQTQNKAS

      181     190     200     210     220     230     240     250     260     270
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
SET,var2  RKRQHEEPESFFTWFTDHSAGADELGEVIKDDIHPNPLQYYLVPDMDDEEGEGEEDDDDDDEEEGLEIDEEGDEDEGEDEEDDDDEGEE
SETc14-Rv RKRQHEEPESFFTWFTDHSAGADELGEVIKDDIHPNPLQYYLVPDMDDEEGEGEEDDDDDDEEEGLEIDEEGDEDEGEDEEDDDDEGEE
SETc14-Fu  RKRQHEEPESFFTWFTDHSAGADELGEVIKDDIHPNPLQYYLVPDMDDEEGEGEEDDDDDDEEEGLEIDEEGDEDEGEDEEDDDDEGEE
Consensus RKRQHEEPESFFTWFTDHSAGADELGEVIKDDIHPNPLQYYLVPDMDDEEGEGEEDDDDDDEEEGLEIDEEGDEDEGEDEEDDDDEGEE

      271     279
|-----|
SET,var2  GEEDEGEDD
SETc14-Rv GEEDEGEDD
SETc14-Fu GEEDEERRR
Consensus GEEDEgedd

```

Análise da sequência do clone 6 da SET e alinhamento da sequência de aminoácidos. As possíveis trocas de aminoácidos estão destacadas em azul.

NAP K209D pcDNA3.1 – T7 (Fw) – 05-01-14

Homo sapiens SET nuclear oncogene (SET), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [ref\[NM_003011.3\]](#) Length: 2936 Number of Matches: 1

Range 1: 355 to 1014 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1197 bits(648)	0.0	656/660(99%)	0/660(0%)	Plus/Plus
Query 136	TGTCGGCGC	GGCGGCCAAAGTCAGTAAAAAGGAGCTCAACTCCAACCACGACGGGGCCG		195
Sbjct 355	TGTCGGCGC	GGCGGCCAAAGTCAGTAAAAAGGAGCTCAACTCCAACCACGACGGGGCCG		414
Query 196	ACGAGACCTCAGAAAAAGAACAGCAAGAAGCGATTGAACACATTGATGAAGTACAAAATG			255
Sbjct 415	ACGAGACCTCAGAAAAAGAACAGCAAGAAGCGATTGAACACATTGATGAAGTACAAAATG			474
Query 256	AAATAGACAGACTTAATGAACAAGCCAGTGAGGAGATTTTGAAAGTAGAACAGAAATATA			315
Sbjct 475	AAATAGACAGACTTAATGAACAAGCCAGTGAGGAGATTTTGAAAGTAGAACAGAAATATA			534
Query 316	ACAAACTCCGCCAACCATTTTTTCAGAAGAGGTGAGAATTGATCGCCAAAATCCCAAATT			375
Sbjct 535	ACAAACTCCGCCAACCATTTTTTCAGAAGAGGTGAGAATTGATCGCCAAAATCCCAAATT			594
Query 376	TTTGGGTAACAACATTTGTCAACCATCCACAAGTGTCTGCACTGCTTGGGGAGGAAGATG			435
Sbjct 595	TTTGGGTAACAACATTTGTCAACCATCCACAAGTGTCTGCACTGCTTGGGGAGGAAGATG			654
Query 436	AAGAGGCACTGCATTATTTGACCAGAGTTGAAGTGACAGAATTTGAAGATATTAATCAG			495
Sbjct 655	AAGAGGCACTGCATTATTTGACCAGAGTTGAAGTGACAGAATTTGAAGATATTAATCAG			714
Query 496	GTTACAGAATAGATTTTTATTTTGTGAAAATCCTTACTTTGAAAATAAAGTTCTCTCCA			555
Sbjct 715	GTTACAGAATAGATTTTTATTTTGTGAAAATCCTTACTTTGAAAATAAAGTTCTCTCCA			774
Query 556	AAGAATTTTCATC	GAATGAGAGTGGTGATCCATCTTCGAAGTCCACCGAAATCAAATGGA		615
Sbjct 775	AAGAATTTTCATC	GAATGAGAGTGGTGATCCATCTTCGAAGTCCACCGAAATCAAATGGA		834
Query 616	AATCTGGAAAGGATTTGACGAAACGTTTCGAGTCAAACGCAGAATAAAGCCAGCAGGAAGA			675
Sbjct 835	AATCTGGAAAGGATTTGACGAAACGTTTCGAGTCAAACGCAGAATAAAGCCAGCAGGAAGA			894
Query 676	GGCAGCATGAGGAACCAGAGAGCTTCTTTACCTGGTTTACTGACCATTCTGATGCAGGTG			735
Sbjct 895	GGCAGCATGAGGAACCAGAGAGCTTCTTTACCTGGTTTACTGACCATTCTGATGCAGGTG			954
Query 736	CTGATGAGTTAGGAGAGGTCATC	GATGATATTTGGCCAAACCCATTACAGTACTACT		795
Sbjct 955	CTGATGAGTTAGGAGAGGTCATC	AAA GATGATATTTGGCCAAACCCATTACAGTACTACT		1014

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
SET, var2 MSAPAAKYSKKELENSNHGGADETSEKEQQAIEIHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQPFQKRSELI AKIPNFVYTTFFVNH
NAPK209D LSAQAAKYSKKELENSNHGGADETSEKEQQAIEIHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQPFQKRSELI AKIPNFVYTTFFVNH
Consensus $SAQAAKYSKKELENSNHGGADETSEKEQQAIEIHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQPFQKRSELI AKIPNFVYTTFFVNH

91     100     110     120     130     140     150     160     170     180
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
SET, var2 QYSALLGEEDEEALHYLTRYEVTEFEDIKSGYRIDFYDENPYFENKVLKSEFHLNESGDPSSKSTEIKNKSGKDLTKRSSQTQNKASRK
NAPK209D QYSALLGEEDEEALHYLTRYEVTEFEDIKSGYRIDFYDENPYFENKVLKSEFHLNESGDPSSKSTEIKNKSGKDLTKRSSQTQNKASRK
Consensus QYSALLGEEDEEALHYLTRYEVTEFEDIKSGYRIDFYDENPYFENKVLKSEFHLNESGDPSSKSTEIKNKSGKDLTKRSSQTQNKASRK

181    190    200    210    220    230    240    250    260    270
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
SET, var2 RQHEEPESFFTNFTDHS DAGADELGEVIKDDIHPNPLQYYLVPMDDDEEGEGEEDDDDEEEGLEIDEEGDEEGEEDDDDEEGEGE
NAPK209D RQHEEPESFFTNFTDHS DAGADELGEVIKDDIHPNPLQYYLVPMDDDEEGEGEEDDDDEEEGLEIDEEGDEEGEEDDDDEEGEGE
Consensus RQHEEPESFFTNFTDHS DAGADELGEVIKDDIHPNPLQYYLVPMDDDEEGEGEEDDDDEEEGLEIDEEGDEEGEEDDDDEEGEGE

271 277
|-----|
SET, var2 EDEGEDD
NAPK209D
Consensus .....

```

Análise da sequência do clone 7 da região NAP K119D e alinhamento da sequência de aminoácidos. A mutação está destacada em azul.

1a119 L107Q e K209D pcDNA3.1 – T7 (Fw) – 05-01-14

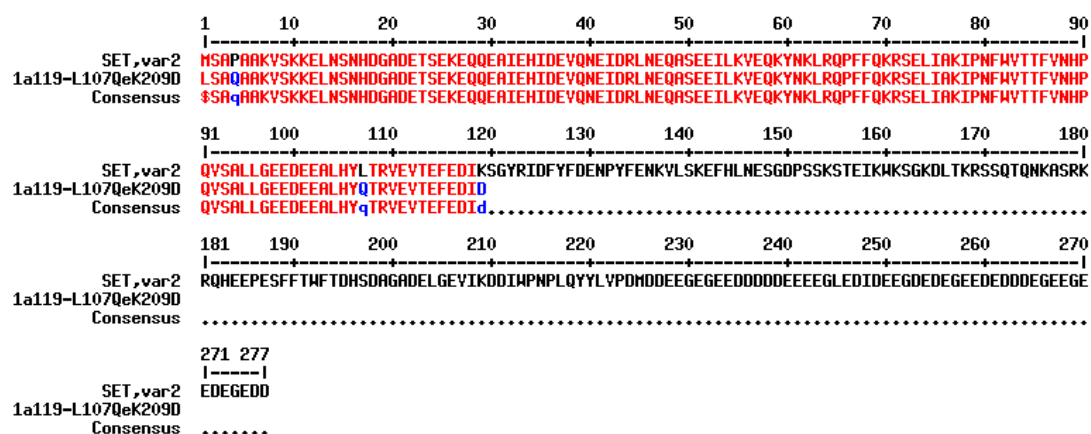
Homo sapiens SET nuclear oncogene (SET), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [ref|NM_003011.3](#) | Length: 2936 | Number of Matches: 1

Range 1: 355 to 707 | [GenBankGraphics](#) | [Next Match](#) | [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
630 bits(341)	1e-177	349/353(99%)	0/353(0%)	Plus/Plus
Query 137	TGTCGGCGCAGGCGGCCAAAGTCAGTAAAAAGGAGCTCAACTCCAACCACGACGGGGCCG	196		
Sbjct 355	TGTCGGCGCAGGCGGCCAAAGTCAGTAAAAAGGAGCTCAACTCCAACCACGACGGGGCCG	414		
Query 197	ACGAGACCTCAGAAAAAGAACAGCAAGAAGCGATTGAACACATTGATGAAGTACAAAATG	256		
Sbjct 415	ACGAGACCTCAGAAAAAGAACAGCAAGAAGCGATTGAACACATTGATGAAGTACAAAATG	474		
Query 257	AAATAGACAGACTTAATGAACAAGCCAGTGAGGAGATTTTGAAAGTAGAACAGAAATATA	316		
Sbjct 475	AAATAGACAGACTTAATGAACAAGCCAGTGAGGAGATTTTGAAAGTAGAACAGAAATATA	534		
Query 317	ACAAACTCCGCCAACCATTTTTTCAGAAGAGGTCAGAATTGATCGCCAAAATCCCAAATT	376		
Sbjct 535	ACAAACTCCGCCAACCATTTTTTCAGAAGAGGTCAGAATTGATCGCCAAAATCCCAAATT	594		
Query 377	TTTGGGTAACAACATTTGTCAACCATCCACAAGTGTCTGCACTGCTTGGGGAGGAAGATG	436		
Sbjct 595	TTTGGGTAACAACATTTGTCAACCATCCACAAGTGTCTGCACTGCTTGGGGAGGAAGATG	654		
Query 437	AAGAGGCACTGCATTATCAAAACCAGAGTTGAAGTGACAGAATTTGAAGATATT	489		
Sbjct 655	AAGAGGCACTGCATTATTTCACCAGAGTTGAAGTGACAGAATTTGAAGATATT	707		



Análise da sequência do clone 11 da região 1a119 K119D_L107Q e alinhamento da sequência de aminoácidos. A mutação está destacada em azul.

NAPAc Short pDONR/Zeo – M13 (Fw) – 05-01-14

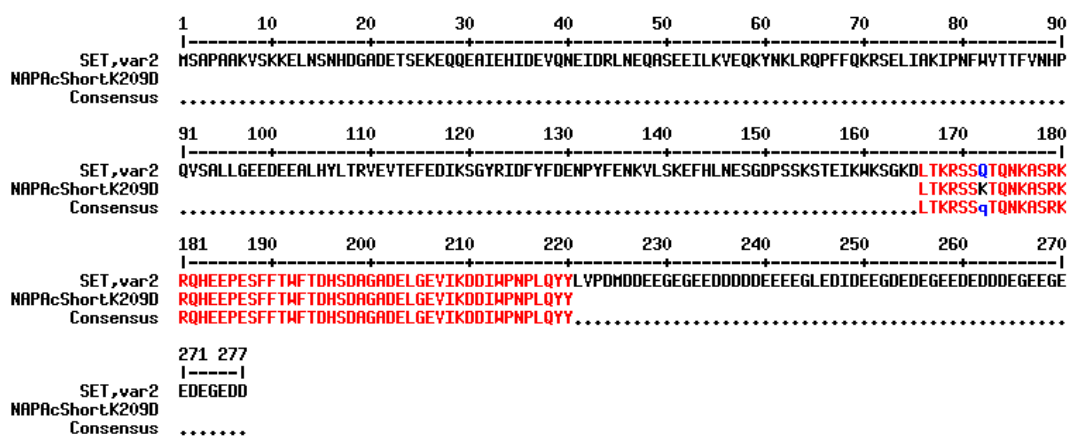
Homo sapiens SET nuclear oncogene (SET), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [ref|NM_003011.3|](#) Length: 2936 Number of Matches: 1

Range 1: 849 to 1014 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	302 bits(163)	1e-78	165/166(99%)	0/166(0%)	Plus/Plus
Query 103	TTGACGAAACGTTTCGAGTAAAACGCAGAATAAAAGCCAGCAGGAAGAGGCAGCATGAGGAA				162
Sbjct 849	TTGACGAAACGTTTCGAGTAAAACGCAGAATAAAAGCCAGCAGGAAGAGGCAGCATGAGGAA				908
Query 163	CCAGAGAGCTTCTTTACCTGGTTTACTGACCATTCTGATGCAGGTGCTGATGAGTTAGGA				222
Sbjct 909	CCAGAGAGCTTCTTTACCTGGTTTACTGACCATTCTGATGCAGGTGCTGATGAGTTAGGA				968
Query 223	GAGGTCATCAAAGATGATATTTGGCCAAACCCATTACAGTACTACT				268
Sbjct 969	GAGGTCATCAAAGATGATATTTGGCCAAACCCATTACAGTACTACT				1014



Análise da sequência do clone 1 da região NAPAc Short e alinhamento da sequência de aminoácidos.

NAPAc Short K209D pcDNA3.1 – T7 (Fw) – 05-01-14

Homo sapiens SET nuclear oncogene (SET), transcript variant 2, mRNA
 Sequence ID: [ref|NM_003011.3|](#) Length: 2936 Number of Matches: 1
 Range 1: 849 to 1014 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

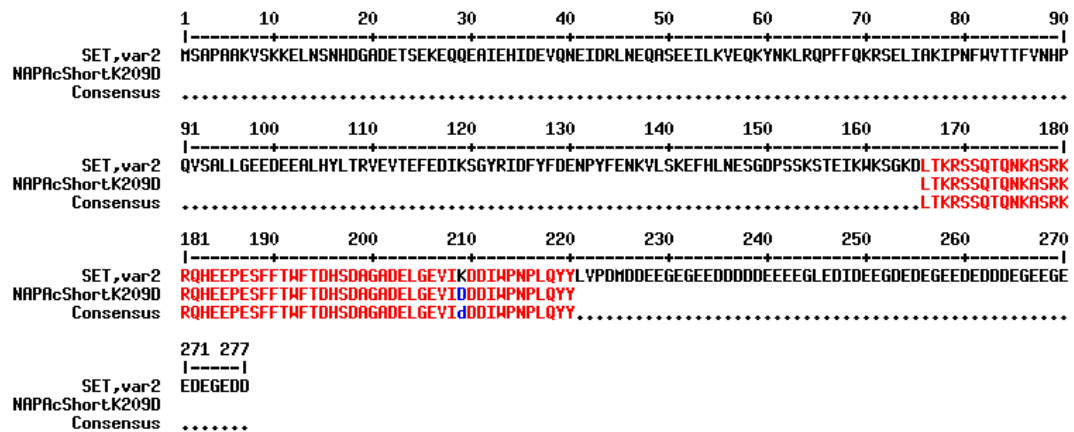
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
296 bits(160)	5e-77	164/166(99%)	0/166(0%)	Plus/Plus

```

Query 136 TTGACGAAACGTTTCGAGTCAAACGCAGAATAAAGCCAGCAGGAAGAGGCAGCATGAGGAA 195
          |||
Sbjct 849 TTGACGAAACGTTTCGAGTCAAACGCAGAATAAAGCCAGCAGGAAGAGGCAGCATGAGGAA 908

Query 196 CCAGAGAGCTTCTTTACCTGGTTTACTGACCATTCTGATGCAGGTGCTGATGAGTTAGGA 255
          |||
Sbjct 909 CCAGAGAGCTTCTTTACCTGGTTTACTGACCATTCTGATGCAGGTGCTGATGAGTTAGGA 968

Query 256 GAGGTCATCGATGATGATATTTGGCCAAACCCATTACAGTACTACT 301
          |||
Sbjct 969 GAGGTCATCAAAGATGATATTTGGCCAAACCCATTACAGTACTACT 1014
    
```



Análise da sequência do clone 4 da região NAPAc Short K209D e alinhamento da sequência de aminoácidos. A mutação inserida está destacada em azul