**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

**GENE SUPRESSOR DE TUMOR *RECK*:
CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO
PROMOTOR E REGULAÇÃO DE SUA
EXPRESSÃO**

REGINA MAKI SASAHARA

**Orientadora: Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
Co- orientador: Prof. Dr. MAKOTO NODA**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica**

**SÃO PAULO
2000**

“Gene Supressor de Tumor *Reck*: Clonagem e Caracterização do Promotor e Regulação de sua Expressão”.

REGINA MAKI SASAHARA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. SUELY LOPES GOMES
IQ - USP

Profa. Dra. VILMA REGINA MARTINS
ILPC

Prof. Dr. LUIS FERNANDO LIMA REIS
ILPC

Profa. Dra. EUGENIA COSTANZI
ICB - USP

SÃO PAULO
10 DE JANEIRO DE 2000.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

L. 18 932

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**GENE SUPRESSOR DE TUMOR *RECK*:
CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO
PROMOTOR E REGULAÇÃO DE SUA
EXPRESSÃO**

REGINA MAKI SASAHARA

**Orientadora: Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
Co- orientador: Prof. Dr. MAKOTO NODA**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica**

**SÃO PAULO
2000**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002715

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sasahara, Regina Maki

S252g Gene supressor de tumor *reck* : clonagem e caracterização
do promotor e regulação de sua expressão / Regina Maki
Sasahara -- São Paulo. 2000.
148p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química. Departamento
de Bioquímica.

Orientador: Sogayar, Mari Cleide

Co-orientador: Noda, Makoto

1. Biologia molecular 2. Expressão gênica I. T. II. Sogayar,
Mari Cleide, orientador III. Noda, Makoto, co-orientador.

574.88 CDD

Aos meus pais,
por tudo que são...

Ao Marcos,
pela "presença" em cada momento

AGRADECIMENTOS

À professora Mari Sogayar, que durante todos estes anos sempre me incentivou, compartilhou a sua rica experiência profissional e pessoal, orientando-me como professora e amiga.

Ao professor Makoto Noda, por ter possibilitado a minha estada (2 anos e 4 meses) em seu laboratório, na Universidade de Kyoto, por seu constante apoio, compreensão, por seu ideal científico.

Ao professor Chiaki Takahashi, pelos ensinamentos, discussões e "happy hours" regadas a cerveja. A minha gratidão se estende à sua adorável família.

À professora Helena Ferraz e seu laboratório, que me ensinaram os primeiros passos no mundo científico.

À professora Iolanda Cuccovia, por ter me aberto várias portas rumo à Ciência.

Aos professores Bayardo Torres, Seizi Oga, Sunao Sato e Tetsuo Yamane, meus mestres-conselheiros.

À Dra. Ruth Sager (*in memorian*) por ter possibilitado o meu estágio em seu laboratório no Dana Farber Cancer Institute, nos tempos de Mestrado.

Ao professor Sandro Valentini, pelo apoio e amizade.

A todos os colegas e amigos do laboratório da professora Mari, pelo carinho, pela amizade, pela convivência agradável, discussões estimulantes e momentos de descontração.

A todos os colegas e amigos do laboratório do professor Makoto Noda, por terem tornado a minha estada no Japão uma experiência rica e gratificante.

Aos professores, colegas e funcionários do Instituto de Química, pelo apoio, atenção e amizade.

Aos amigos, cada um tão especial à sua maneira, pelo apoio e carinho.

Sou grata a tudo e a todos que de alguma forma me ajudaram nesta caminhada.

Muito obrigada!

APOIO FINANCEIRO

FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

CNPq- Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico.

PADCT-SBIO II- Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e
Tecnológico- Subprograma de Biotecnologia.

ICGEB- International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology.

CABBIO- Centro Argentino- Brasileiro de Biotecnologia.

FBB- Fundação Banco do Brasil.

PRP- USP- Pró- Reitoria de Pesquisa- USP.

Japanese Foundation for Cancer Research.

The Ministry of Education of Japan.

The Ministry of Science, Sports and Culture of Japan.

The Science and Technology Agency of Japanese Government.

Fundo Bunka de Pesquisa-Banco Sumitomo

BIOBRÁS Bioquímica do Brasil S.A.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ABREVIATURAS.....	III
RESUMO.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Proteína Ras e a transdução de sinal.....	1
1.2. Controle da expressão gênica.....	5
1.3. Gene supressor de tumor <i>RECK</i>	10
1.4. A reversão do fenótipo transformado e a linhagem C6/ST1 de glioma de rato.....	12
1.5. Objetivos do trabalho.....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1. MATERIAIS.....	16
2.1.1. Plasmídeos.....	16
2.1.2. Linhagens celulares.....	18
2.1.3. Soluções para cultura de células.....	19
2.1.4. Meio de cultura para bactérias.....	20
2.1.5. Isótopos radioativos.....	20
2.1.6. Reagentes.....	21
2.1.7. Antisoros.....	21
2.1.8. Soluções.....	21
2.2. MÉTODOS.....	21
2.2.1. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares.....	21
2.2.2. Preparo de bactérias competentes utilizando CaCl_2 para transformação de <i>Escherichia coli</i> com DNA plasmideal.....	22
2.2.3. Preparo de bactérias para a transformação de <i>Escherichia coli</i> com DNA plasmideal através de eletroporação.....	23
2.2.4. Preparação de DNA plasmideal em pequena escala.....	24
2.2.5. Preparação de DNA plasmideal em média escala.....	25
2.2.6. Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose.....	27
2.2.7. Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de acrilamida.....	28
2.2.8. Clonagem do DNA genômico.....	28
2.2.8.1. Plaqueamento para titular a biblioteca de DNA genômico.....	28
2.2.8.2. Rastreamento da biblioteca de DNA genômico.....	29
2.2.8.2.1. Plaqueamento da biblioteca de DNA genômico.....	29
2.2.8.2.2. Preparo e tratamento dos filtros.....	29
2.2.8.2.3. Preparo da sonda de cDNA, hibridização e lavagem dos filtros.....	30
2.2.8.2.4. Seleção e isolamento dos clones positivos.....	31
2.2.8.3. Preparação do estoque de fagos Lambda isolados.....	32
2.2.8.4. Preparação de DNA de bacteriófagos Lambda.....	32
2.2.9. Análise dos clones de DNA genômico.....	33
2.2.9.1. Southern blot.....	33
2.2.9.1.1. Preparação da membrana.....	33
2.2.9.1.2. Preparação das sondas radioativas.....	34
2.2.9.1.3. Hibridização e lavagem dos filtros.....	34

2.2.9.2. Subclonagem do DNA genômico no vetor pBluescript SK(+)	35
2.2.9.3. Construção do mapa de restrição do DNA genômico	36
2.2.9.4. Sequenciamento do DNA genômico	36
2.2.9.4.1. Oligonucleotídeos	36
2.2.9.4.2. Sequenciamento manual	37
2.2.9.4.3. Sequenciamento automático	38
2.2.10. "Primer Extension"	39
2.2.10.1. Marcação radioativa do oligonucleotídeo ("primer")	39
2.2.10.2. Marcação radioativa do marcador de peso molecular	40
2.2.10.3. Reação de "Primer Extension"	40
2.2.11. Análise da expressão do gene repórter luciferase	41
2.2.11.1. Subclonagem da região promotora do gene <i>RECK</i> no vetor de expressão do gene repórter luciferase e geração dos mutantes de deleção	41
2.2.11.2. Mutagênese sítio- dirigida do plasmídeo pGL3-52 e pGL3-4110	42
2.2.11.2.1. Preparação de DNA simples fita	43
2.2.11.2.2. Mutagênese sítio- específica	44
2.2.11.2.2.1. Oligonucleotídeos	44
2.2.11.2.2.2. Fosforilação do oligonucleotídeo	44
2.2.11.2.2.3. Obtenção do plasmídeo dupla fita	45
2.2.11.3. Transfecção transitória	46
2.2.11.4. Medida da atividade do gene repórter luciferase	46
2.2.12. Extração de proteínas nucleares	47
2.2.13. Ensaio de mobilidade eletroforética retardada em gel de poliacrilamida (EMSA)	48
2.2.13.1. Oligonucleotídeos	48
2.2.13.2. Preparação dos oligonucleotídeos dupla fita e marcação radioativa	48
2.2.13.3. Reação de ligação DNA-proteína e análise do complexo por eletroforese em gel de poliacrilamida	49
2.2.14. Ensaio de "Western blot"	50
2.2.15. Preparação de mRNA	51
2.2.16. Ensaio de Northern blot	53
2.2.16.1. Fracionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído e transferência para membrana de nylon	53
2.2.16.2. Preparação da sonda de DNA radioativa	53
2.2.16.3. Hibridização e lavagem dos filtros	54
2.2.17. Ensaio de Southern blot para análise da metilação da região promotora	54
2.2.17.1. Preparação do DNA genômico	55
2.2.17.2. Preparação da membrana	55
2.2.17.3. Preparação da sonda radioativa	56
2.2.17.4. Hibridização e lavagem dos filtros	56
2.2.18. Transfecção estável de células de mamíferos com DNA plasmídeo	57
2.2.19. Curvas de crescimento	58
2.2.20. Crescimento em suspensão de agarose	58
2.2.21. Eficiência de plaqueamento em substrato sólido	59

3. RESULTADOS.....	60
3.1. Clonagem e caracterização da região promotora do gene <i>mRECK</i>	60
3.1.1. Clonagem do promotor do gene <i>mRECK</i> e mapeamento da extremidade 5' do mRNA.....	60
3.1.2. Atividade promotora da região 5' flanqueadora do gene de <i>mRECK</i>	66
3.1.3. Análise da ligação de fatores de transcrição ao promotor mínimo de <i>mRECK</i>	68
3.1.4. Identificação dos fatores de transcrição que se ligam aos sítios Sp1A e Sp1B do promotor mínimo de <i>mRECK</i>	70
3.1.5. Efeitos da mutação nos sítios Sp1A e/ou Sp1B sobre a atividade do promotor mínimo de <i>mRECK</i>	74
3.2. Regulação da expressão do gene <i>mRECK</i> pelo produto do oncogene <i>Ha-ras</i> (V12).....	77
3.2.1. Regulação dos níveis de transcrito de <i>mRECK</i> pelo produto do oncogene <i>Ha-ras</i> (V12).....	78
3.2.2. Regulação da atividade do promotor de <i>mRECK</i> pelo produto do oncogene <i>Ha-ras</i> (V12).....	80
3.2.3. Identificação de elementos cis regulatórios responsáveis pela repressão da atividade do promotor mínimo do gene <i>mRECK</i> mediada pelo produto do oncogene <i>Ha-ras</i> (V12).....	84
3.2.4. Efeitos do produto do oncogene <i>Ha-ras</i> ativado sobre a ligação dos fatores de transcrição Sp1/Sp3 ao sítio Sp1B do promotor mínimo do gene <i>mRECK</i>	87
3.3. Regulação da expressão do gene <i>RECK</i> pelo produto do oncogene <i>fos</i> do vírus FBR causador de osteosarcoma murino.....	89
3.3.1. Regulação dos níveis de transcrito de <i>mRECK</i> pelo produto do oncogene <i>v-fos</i>	89
3.4. Análise do envolvimento do mecanismo de metilação do DNA na regulação transcricional do gene <i>RECK</i>	91
3.4.1. Análise do padrão de metilação da região promotora do gene <i>mRECK</i>	91
3.4.2. Análise do envolvimento de mecanismo de metilação na regulação transcricional do gene <i>RECK</i> através da utilização do agente desmetilante 5-azacitidina.....	94
3.5. Análise do envolvimento de RECK em diversos sistemas celulares de invasão, proliferação e reversão.....	96
3.5.1. Análise da expressão de <i>RECK</i> na resposta ao tratamento com TNF- α ("tumor necrosis factor") em células ST1.....	96
3.5.2. Análise da expressão de <i>RECK</i> na resposta ao tratamento com genisteína em células ST1.....	97
3.5.3. Análise da expressão de <i>RECK</i> no ciclo celular em fibroblastos A31 e células ST1.....	100
3.5.4. Análise do envolvimento de <i>RECK</i> na reversão fenotípica de células C6/ST1 induzida por hormônios glucocorticóides.....	103

3.5.4.1. Análise da expressão de <i>RECK</i> na resposta ao tratamento com hormônios glucocorticóides em células ST1.....	103
3.5.4.2. Análise da super- expressão do gene <i>hRECK</i> na proliferação de células ST1.....	105
3.5.4.2.1. Isolamento dos clones celulares e análise dos níveis de expressão de <i>hRECK</i>	105
3.5.4.2.2. Análise morfológica dos clones celulares.....	107
3.5.4.2.3. Análise da curva de crescimento dos clones celulares.....	110
3.5.4.2.4. Análise dos clones celulares quanto à eficiência de formação de colônias em suspensão e em monocamada.....	110
4. DISCUSSÃO.....	112
4.1. Caracterização da região promotora do gene <i>mRECK</i> e inibição da sua expressão pelo produto do oncogene <i>Ha-ras</i>	112
4.2. Influência dos vetores de expressão em ensaios de co- transfecção na análise do promotor de <i>mRECK</i>	122
4.2.1. Efeito do produto do oncogene <i>Ha-ras</i> sobre o promotor de HSV-TK no plasmídeo de referência pRL-TK.....	122
4.2.2. Efeito do vetor de expressão pSR α -neo sobre a atividade do promotor de <i>mRECK</i>	124
4.3. Inibição da expressão do gene <i>mRECK</i> mediada pelo produto do oncogene <i>v-fos</i>	127
4.4. Análise do envolvimento do mecanismo de metilação de DNA na regulação transcricional do gene <i>RECK</i>	127
4.5. Análise do envolvimento de <i>RECK</i> em diversos sistemas celulares.....	129
5. CONCLUSÕES.....	132
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
7. CURRICULUM VITAE.....	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Esquema das sobreposições dos clones genômicos	62
Figura 2A:	Determinação do início da transcrição do gene <i>mRECK</i> por “primer extension”	63
Figura 2B:	Sequência nucleotídica de 600 pb da região 5’flanqueadora e o exon-1 do gene <i>mRECK</i>	64
Figura 3:	Atividade promotora da região 5’ flanqueadora do gene <i>mRECK</i> em células NIH-3T3 e CREF	67
Figura 4:	EMSA de extrato nuclear de células NIH-3T3 utilizando sondas correspondentes a oligonucleotídeos contendo sítios putativos de ligação a fatores de transcrição do promotor mínimo de <i>mRECK</i>	69
Figura 5:	Ensaio de “supershift” com extrato nuclear de células NIH-3T3 utilizando sondas correspondentes a oligonucleotídeos contendo sítios putativos de ligação ao fator de transcrição Sp1 do promotor de <i>mRECK</i> (sítios Sp1A e Sp1B) e antisoros anti-Sp1 (α Sp1Ab) e anti-Sp3 (α Sp3Ab)	71
Figura 6:	Ensaio de Western blot para a análise da expressão das proteínas Sp1 e Sp3 em células NIH-3T3 que não super-expressam e super-expressam <i>Ha-ras</i> (V12)	73
Figura 7:	Análise do efeito das mutações nos sítios de ligação aos fatores de transcrição Sp1/Sp3 do promotor de <i>mRECK</i> por EMSA	75
Figura 8:	Efeitos das mutações dos sítios Sp1 na atividade do promotor mínimo de <i>mRECK</i>	76
Figura 9:	Análise da inibição da expressão do gene <i>mRECK</i> pelo produto do oncogene <i>Ha-ras</i> (V12) por ensaio de Northern blot	79
Figura 10:	Inibição da atividade do promotor de <i>mRECK</i> pelo produto do oncogene <i>Ha-ras</i>	81
Figura 11:	Efeito dose-resposta da inibição da atividade promotora do gene <i>mRECK</i> pelo produto do oncogene <i>Ha-ras</i>	82
Figura 12:	Inibição da atividade promotora do gene <i>mRECK</i> pelo produto do oncogene <i>Ha-ras</i> (V12) utilizando o sistema de expressão de <i>Ha-ras</i> regulável por doxíciclina (dox)	83
Figura 13:	Análise do efeito das mutações nos sítios Sp1 na inibição da atividade do promotor mínimo do gene <i>mRECK</i> mediada pelo produto do oncogene <i>Ha-ras</i>	85
Figura 14:	Análise do efeito da super-expressão de <i>Ha-ras</i> na ligação dos fatores de transcrição Sp1/Sp3 ao sítio Sp1B do promotor de <i>mRECK</i> por EMSA	88
Figura 15:	Ensaio de Northern blot para a verificação da expressão de <i>RECK</i> em fibroblastos A31 transfectados com o oncogene <i>v-fos</i>	90
Figura 16:	Mapa de restrição da região promotora do gene <i>RECK</i> de camundongo	92
Figura 17:	Análise do padrão de metilação dos sítios de restrição da enzima HpaII, presentes na região promotora do gene de <i>RECK</i> de camundongo através de Southern blot	93

Figura 18:	Ensaio de Northern blot para a verificação do envolvimento do mecanismo de metilação na regulação da expressão do gene <i>RECK</i>	95
Figura 19:	Ensaio de Northern blot para a análise da expressão de <i>RECK</i> na resposta ao tratamento com TNF- α em células ST1	98
Figura 20:	Ensaio de Northern blot para a análise da expressão de <i>RECK</i> na resposta ao tratamento com genisteína em células ST1	99
Figura 21:	Ensaio de Northern blot para a análise da expressão de <i>RECK</i> no ciclo celular em fibroblastos A31	101
Figura 22:	Ensaio de Northern blot para a análise da expressão de <i>RECK</i> no ciclo celular em células ST1	102
Figura 23:	Ensaio de Northern blot para a análise da expressão de <i>RECK</i> na reversão fenotípica de células C6/ST1 induzida por hormônios glucocorticóides	104
Figura 24:	Ensaio de Northern blot para a verificação da expressão de <i>RECK</i> nas linhagens celulares obtidas após transfecção de células ST1 com o vetor de expressão de h- <i>RECK</i>	106
Figura 25:	Morfologia celular das linhagens obtidas após transfecção de células ST1 com o vetor vazio (PC) e o vetor de expressão de <i>hRECK</i> (STR7, STR9 e STR10)	108
Figura 26:	Curva de crescimento das linhagens celulares obtidas após transfecção das células ST1 com o vetor de expressão vazio (clones Vn) e o vetor de expressão de <i>hRECK</i> (clones STRn)	109
Tabela 1:	Comparação das eficiências de plaqueamento (EP) em suspensão e monocamada das linhagens celulares obtidas após transfecção das células ST1 com o vetor de expressão vazio (clones Vn) e o vetor de expressão de <i>hRECK</i> (clones STRn)	111

ABREVIATURAS

36B4	Fosfoproteína PO ribossomal ácida
AMV	"Avian Myeloblastosis Virus"
AP-1	"Activator Protein 1"
ATP	Trifosfato de adenosina
bp	"base pair"
BSA	"Bovine Serum Albumin"
cDNA	DNA complementar
CIAP	"Calf Intestinal Alkaline Phosphatase"
CMV	Citomegalovírus
CTP	Trifosfato de citosina
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de desoxicitosina
ddNTP	didesoxinucleotídeo
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle's Medium"
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Ácido desoxirribonuclease
dNTP	desoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodinitrilotetracético sal dissódico
EGF	"Epidermal Growth Factor"
Egr-1	"Early Growth Responsive protein 1"
EMSA	"Electrophoretic Mobility Shift Assay"
ERK	"Extracellular-regulated kinase"
FBR	"Finkel-Biskis-Reilly"
FGF	"Fibroblast Growth Factor"
GAP	"GTPase activating protein"
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDP	Difosfato de guanina
Grb2	"Growth factor Receptor Bound-2"
GTP	Trifosfato de guanina
HEPES	Ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etano-sulfônico
HIV	"Human Immunodeficiency Virus"
hRECK	RECK de humano
HSV	"Herpes Simplex Virus"
IPTG	β -D-tiogalactopiranosídeo de isopropila
JNK	"Jun N-terminal Kinase"
kDa	Kilo Daltons
LB	"Luria-Bertani Medium"
LTR	"Long Terminal Repeat"

MAPK	“Mitogen Activated Protein Kinase”
MEK	“MAPK and ERK kinase”
MMP-9	“matrix metalloproteinase-9”
MMTV	“Mouse Mammary Tumor Virus”
MoMuSV	“Moloney Murine Sarcoma Virus”
MOPS	“3-[N-Morpholino] propanosulfonic acid”
mRECK	RECK de camundongo
mRNA	RNA mensageiro
MuSV	“Murine Sarcoma Virus”
NDF	"Neu Differentiation Factor"
NRE	"NDF Responsive Element"
NZY	“NZ amine-Yeast Extract Medium”
OD	"Optic Density"
pb	pares de bases
PBSA	Solução salina de PBS (“Phosphate Buffered Saline”) sem cálcio e magnésio
PDGF	“Platelet-Derived Growth Factor”
pfu	Unidades formadoras de placas virais
PI3K	“Phosphatidylinositol-3-kinase”
PKA	"Protein Kinase A"
PKB	"serine-threonine Protein Kinase B"
PKC	“Protein Kinase C”
PM	Peso Molecular
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluoride
PP2A	“Protein Phosphatase 2 ^A ”
RECK	“Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs”
RNA	Ácido ribonucleico
Rnase	Ácido ribonuclease
Rpm	Rotações por minuto
SDS	“Sodium Dodecyl Sulfate”
SFB	Soro Fetal Bovino
Shc	“Src homology and collagen”
SM	Tampão Tris contendo Sódio e Magnésio, pH 7,5
SRE	“Serum Responsive Element”
SRF	“Serum Responsive Factor”
SSC	Solução salina contendo Citrato de Sódio, pH7,0
SSPE	Solução salina contendo Sódio, Fosfato e EDTA, pH 7,0
TAE	Tampão Tris-Acetato- EDTA, pH 7,5
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA, pH8,3
TBP	"TATA Binding Protein"
TBS	Tampão Tris-Salina, pH 7,5
TBST	Tampão Tris-Salina-Tween, pH 7,5

TCF	“Ternary Complex Factor”
TE	Tampão Tris-EDTA, pH 7,5
TGF	“Transforming Growth Factor”
TK	“Thymidine Kinase”
TNF- α	“Tumor Necrosis Factor α ”
UTR	“Untranslated Region”
UV	Luz ultravioleta
V-12	Mutação pontual no gene <i>ras</i> correspondente ao códon 12, resultando na substituição do aminoácido glicina por valina
VEGF	"Vascular Endothelial Growth Factor"
X-gal	5-bromo, 4- cloro, 2-indolil, β -D-galactopiranosídeos

RESUMO

A expressão do gene *RECK* é ubíqua em tecidos normais e não detectável nas linhagens celulares tumorais testadas e em fibroblastos transformados por diversos oncogenes. Inicialmente isolado como um gene indutor da reversão fenotípica tumoral→normal em fibroblastos transformados por *v-Ki-ras*, o gene *RECK* codifica uma glicoproteína de membrana que suprime a invasão tumoral e metástase através da regulação da metaloprotease de matriz-9. Para entender os mecanismos de inibição da expressão do gene *RECK*, mediada por oncogenes, isolou-se e caracterizou-se a região 5'-flanqueadora do gene *RECK* de camundongo (*mRECK*). Ensaio de atividade promotora utilizando mutantes de deleção da região 5'-flanqueadora e o gene repórter luciferase, revelaram que a sequência de 52 pb, imediatamente “upstream” ao gene, possui uma atividade promotora que é suprimida pelo produto do oncogene *Ha-ras* (V12). Esta sequência contém dois sítios de ligação a Sp1 (Sp1A e Sp1B), um sítio de ligação a cEBP β e um CAAT box. EMSAs e ensaios de atividade promotora, utilizando mutantes pontuais nestes sítios, revelaram que as proteínas Sp1 e Sp3 se ligam a ambos os sítios Sp1, e que a resposta a Ras é mediada apenas pelo sítio Sp1B.

Análise por Southern blot utilizando uma enzima de restrição sensível à metilação e por Northern blot de mRNA extraído de células tratadas com um agente desmetilante, sugeriram que o mecanismo de metilação de DNA não está envolvido na regulação transcricional do gene *RECK*.

O envolvimento de *RECK* em diversos sistemas de proliferação, invasão e reversão celular foi analisado através de Northern blot. Os resultados sugerem que a expressão de *RECK* é regulada por soro na linhagem A31 de fibroblastos normais de camundongo.

SUMMARY

The *RECK* gene is ubiquitously expressed in normal human tissues, but is downregulated both in tumor cell lines and in oncogenically transformed fibroblasts. Initially isolated as a tumor→normal phenotypic reversion-inducing gene in *v-ki-ras*-transformed fibroblast, *RECK* encodes a membrane-anchored glycoprotein that suppresses tumor invasion and metastasis by regulating the matrix metalloproteinase-9. In order to understand the mechanism of oncogene-mediated suppression of *RECK* gene expression, we have isolated and characterized the 5'-flanking region of the mouse *RECK* gene (*mRECK*). Deletion mutants constructs of this 5'-flanking region with the luciferase reporter gene, revealed that the 52 base pairs upstream displays promoter activity which is suppressed by the *Ha-ras* (V12) oncogene. This region contains two Sp1-binding motifs (Sp1A and Sp1B), one cEBPb-binding motif, and one CAAT box. Gel shift analysis and reporter gene assays, in combination with site-directed point mutations in these elements, revealed that both Sp1 sites associate with Sp1 as well as Sp3 proteins, although Ras- responsiveness seems to be mediated only by the downstream Sp1 site (Sp1B).

Southern blot analysis using a methylation-sensitive restriction enzyme and Northern blot analysis with mRNA extracted from cells treated with a demethylating agent, indicated that the mechanism of DNA methylation is not involved in the regulation of *RECK* gene transcription.

The role of *RECK* in several systems of cell proliferation, invasion and reversion, analysed by Northern blot, suggested that *RECK* expression is cell cycle regulated by serum in normal A31 mouse fibroblast cell line.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteína Ras e a transdução de sinal

A proteína codificada pelo gene *ras* funciona como um transdutor de sinal em diversos processos fisiológicos. Produtos do gene *ras*, alterados por mutações, desempenham papel importante na aquisição do fenótipo transformado e neoplásico. Estudos estruturais da proteína Ras e de sua função e regulação têm revelado o seu papel em diversos processos biológicos.

Os oncogenes virais de determinados retrovírus que causam transformação aguda, foram os primeiros genes *ras* (*v-ras*) a serem identificados. A descoberta de que oncogenes retrovirais, incluindo *v-ras*, são derivados de genes celulares normais, foi seguida pela demonstração de que muitos dos genes transformantes identificados através do ensaio de transformação de células normais de fibroblasto de camundongo NIH-3T3, representavam genes celulares (*c-ras*) que haviam sido ativados por mutações pontuais (Barbacid, 1987). Genes *c-ras* ativados são frequentemente encontrados em uma grande variedade de tumores humanos, assim como também em tumores experimentais induzidos por agentes químicos e físicos (Barbacid, 1987; Bos, 1989; Rodenhuis, 1992; Mangues & Pellicer, 1992). Além do seu papel na transformação maligna, os genes *ras* normais, que estão presentes em todos os organismos eucariotos incluindo leveduras, são reguladores essenciais de diversas funções fisiológicas, incluindo proliferação e diferenciação celular. Ras desempenha suas atividades como o componente intermediário-chave de vias de transdução de sinal (revisto por Lowy & Willumsen, 1993)

A família *ras* de mamíferos consiste de 3 genes: *H-ras*, *K-ras* e *N-ras*, que estão dispersos em diferentes cromossomos. Os genes *H-ras* e *K-ras* deram origem, respectivamente, ao gene v-*H-ras* de Harvey (Ha) e v-*K-ras* de Kirsten (Ki), vírus de sarcoma de murino (MuSV). *N-ras* foi encontrado em linhagem celular de neuroblastoma como um gene transformante com similaridade aos outros genes *ras* (revisto por Lowy & Willumsen, 1993).

Os genes *ras* codificam proteínas estrutural e funcionalmente relacionadas, de 21kDa associadas à membrana plasmática. Estas proteínas encontram-se ancoradas na superfície interna da membrana plasmática e possuem atividade de ligação a GTP/GDP e uma atividade GTPásica intrínseca baixa (revisto por Magee & Marshall, 1999).

Muitos fatores peptídicos de crescimento como PDGF, EGF e FGF, ligam-se a receptores transmembrânicos com atividade de tirosina quinase intrínseca. Este domínio de tirosina quinase está localizado na porção citoplasmática do receptor. A ativação destes receptores, que resulta em dimerização e auto-fosforilação do receptor, geralmente leva à ativação de Ras, que se dá através de proteínas adaptadoras, como Grb2 e Shc (revisto por Claesson-Welsh, 1994). Grb2 ou Shc, que são recrutados à superfície interna da membrana plasmática através dos resíduos específicos fosforilados do receptor, formam um complexo estável com o fator de troca de nucleotídeos Sos, o qual, por sua vez, regula a atividade de Ras, convertendo-a de sua forma inativa (ligada a GDP-guanosina difosfato) para a sua forma ativa (ligada a GTP- guanosina tri- fosfato) (McCormick, 1993).

GAP (proteína ativadora de GTPase), uma outra proteína que participa na regulação de Ras, também se associa ao receptor. Esta proteína exerce uma regulação negativa de Ras, por estimular a sua atividade GTPásica, levando-o de volta à forma inativa. Mutações pontuais em Ras que levam à

predominância da forma ativa (ligada a GTP) induzem o seu potencial oncogênico (Feramisco et al, 1984; Bourne et al, 1990).

O potencial oncogênico do gene *ras* normal pode ser ativado por mutações pontuais correspondentes aos códons 12, 13, 59 ou 61 da sua sequência codificadora (revisto por Lowy & Willumsen, 1993) ou por uma expressão aumentada (Chang et al, 1982; Kimura & Armelin, 1988). Por causa do potencial oncogênico de *v-ras* e de forma mutadas de *c-ras*, vários estudos concentraram-se na identificação das proteínas alvo de Ras no controle normal da proliferação celular (Feig & Schaffhausen, 1994).

Apesar dos alvos de ação das proteínas Ras serem citoplasmáticos, os sinais induzidos por elas são transduzidos para o núcleo resultando em alterações na expressão gênica e aumento na síntese de DNA (Barbacid, 1987). As proteínas Ras têm alvos citoplasmáticos tais como: as serina/treonina quinases da família Raf, que desencadeiam a via da ERK (quinases reguladas por sinais extracelulares)/MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógenos); a fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K), que ativa diversas outras proteínas sinalizadoras; e os fatores de troca de nucleotídeos de Ral, que ativam Ral, uma outra GTPase pequena (revisto por Magee & Marshall, 1999). Vários estudos têm demonstrado que as vias de transdução de sinal desencadeadas por Ras são mediadas por múltiplas proteínas efetoras e estão relacionadas com as vias de ação de diversas outras proteínas GTPase pequenas (revisto por Yamamoto et al, 1999). Como esta cascata de eventos chega ao núcleo? Algumas vias estão definidas e estão descritas de forma linear, como por exemplo, a ligação do complexo Grb2-Sos ao receptor resulta na ativação de Ras, a qual, por sua vez, estimula as proteínas quinases Raf. Através de fosforilação de resíduos específicos de serina, Raf ativa MEK (quinases de MAPK/ERK), as quais, por sua vez, ativam ERK por fosforilação em resíduos de treonina e tirosina. No seu estado ativado, as

ERKs são capazes de passar para o núcleo, onde catalisam a fosforilação de fatores de transcrição como, por exemplo os fatores de complexo ternário (TCF), que se associam com o fator de resposta ao soro (SRF) e iniciam a transcrição através de elementos responsivos ao soro presentes nos promotores de genes como *c-fos* (Price et al, 1995). PI3K, outro alvo de Ras, catalisa a fosforilação de fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol, gerando moléculas de fosfatidil-inositol 3,4,5 fosfato (PI3,4,5P₃), o qual recruta proteínas quinases de serina/ treonina específicas tais como a PKB/AKT e PDK1. Uma vez ativada, PKB/AKT, pode regular múltiplos fatores de transcrição, incluindo c-Jun, e membros da família Forkhead que ficam retidos no citoplasma quando fosforilados por PKB/AKT (Pawson & Saxton, 1999; Brunet et al, 1999; Kops et al, 1999). PI3K também pode estimular as GTPases Rac, que tem sido relacionadas à ativação da via de JNK(quinase da região N- terminal de Jun, pertencente à família das MAPKs/SAPK (proteína quinase ativada por estresse) atuando , portanto, na fosforilação e ativação de c-Jun. Mesmo este quadro extremamente simplificado revela diferentes meios pelos quais as vias desencadeadas por Ras podem induzir ou reprimir a transcrição. Porém, estudos recentes têm demonstrado que as proteínas de sinalização citoplasmáticas formam redes de interações e não são vias lineares (Pawson, 1995), sugerindo a complexidade dos mecanismos citoplasmáticos que regulam os eventos transcripcionais no núcleo (revisto por Pawson & Saxton, 1999).

Por outro lado, a investigação de como a expressão de genes específicos pode ser regulada em eucariotos, em resposta aos mais diversos estímulos que levam à proliferação, diferenciação, desenvolvimento, etc, continua sendo um dos pontos mais importantes e excitantes da Biologia moderna.

1.2. Controle da expressão gênica

A expressão gênica pode ser controlada em diversas etapas: iniciação da transcrição, terminação da transcrição, processamento do RNA, estabilidade do RNA, tradução e pós-tradução (modificações como fosforilação, acetilação, glicosilação, etc). Porém, o mecanismo mais utilizado pelas células é o controle da primeira etapa da expressão gênica: o início da transcrição.

A transcrição gênica se inicia em sítios específicos no DNA ou em sítios alternativos em uma determinada região do DNA. A transcrição é controlada por proteínas transativadoras, denominadas fatores de transcrição, que se ligam a elementos cis regulatórios na sequência do DNA. Em células eucarióticas, os fatores de transcrição regulatórios podem se ligar a sítios distantes do início da transcrição, em alguns casos milhares de pares de bases “upstream” ou “downstream” em relação ao sítio de iniciação transcrricional do gene cuja expressão eles regulam. Portanto, múltiplos fatores de transcrição (ligados a elementos cis distantes do promotor), podem controlar a transcrição a partir de um único promotor, produzindo, assim, um complexo padrão de expressão gênica em organismos multicelulares (Lodish et al, 1995).

O promotor é a sequência de DNA que determina o sítio de início da transcrição pela RNA polimerase. A RNA polimerase II catalisa a transcrição de todos os genes que codificam proteínas, ou seja, a sua função é a de catalisar a síntese de mRNAs (RNAs mensageiros). A RNA polimerase II também catalisa a síntese de alguns RNAs pequenos envolvidos no processamento (“splicing”) do RNA. A RNA polimerase II é uma enzima constituída de múltiplas subunidades, porém não reconhece o promotor sem o auxílio de fatores acessórios, necessitando de fatores de transcrição gerais

para promover a transcrição básica. O complexo TFIID é um complexo importante deste processo, sendo composto pela proteína que se liga a TATA box (TBP) e uma série de fatores que se associam a TBP (TAF_{IIS}). TBP e TAF_{IIS} dirigem a formação da complexa maquinaria de transcrição, possibilitando o início da transcrição em células eucarióticas, mesmo em promotor sem TATA box (revisto por Zawel & Reinberg, 1995 e Burley & Roeder, 1996).

TATA box é uma sequência cis regulatória presente no promotor de vários genes, localizada a 25-35 bases “upstream” em relação ao sítio de início da transcrição. Esta sequência é a responsável pelo posicionamento da RNA polimerase II para iniciar a transcrição destes genes (Breathnach & Chambon, 1981). Alguns promotores de genes não contém TATA box, mas contém elementos iniciadores. Esta sequência iniciadora flanqueia o sítio de início da transcrição (Javahery, 1994). A transcrição de genes com promotores contendo TATA box ou elementos iniciadores se inicia em sítios bem definidos. Porém, a transcrição de muitos genes se inicia em um dos múltiplos sítios possíveis presentes em uma região entre 20 e 200 pares de bases. Portanto, estes genes dão origem a mRNAs com diferentes extremidades 5'. Estes genes não contém TATA box ou um elemento iniciador, mas a maioria possuiu sequências ricas em nucleotídeos CG na sua região promotora. O dinucleotídeo CG é estatisticamente pouco representado em DNAs de vertebrados. Estas regiões ricas em CG geralmente são chamadas de “ilhas de CpG” devido à sua ocorrência em um “mar” de sequências de DNA com poucos resíduos de CG. O fator de transcrição Sp1 se liga a estas sequências ricas em CG e pode agir como um selecionador do início da transcrição (Travis et al, 1991; Jollif et al, 1991; Blake et al, 1990). De acordo com Pugh & Tjian (1990; 1991), o mecanismo pelo qual Sp1 seleciona os sítios de início de transcrição também envolve TFIID. Sp1 ligado

ao seu sítio consenso rico em CG recruta TFIID para um sítio próximo (geralmente de 30 a 50 pares de bases “downstream” ao sítio Sp1), mesmo sem um TATA box para ele se ligar. Os múltiplos sítios de início de transcrição selecionados por Sp1 resultam da capacidade de Sp1 de se oligomerizar (Mastrangelo et al, 1991).

Para um fator de transcrição agir, normalmente, é necessário que ele se ligue ao DNA (ao seu elemento cis correspondente), mas isto não é o suficiente. Uma vez ligado ao DNA, este fator precisa interagir com outros fatores de transcrição ou com a própria RNA polimerase II para afetar a taxa de transcrição. Embora esta interação geralmente resulte na ativação transcricional, isto nem sempre ocorre, tendo sido relatados diversos casos nos quais a ligação do fator ao DNA resulta na repressão transcricional (revisto por Latchman, 1995).

Os fatores regulatórios podem ligar-se a regiões distantes do sítio de iniciação, como já mencionado. Desta forma, foi proposto que para que possam regular a transcrição, esses fatores devem associar-se a proteínas chamadas adaptadoras. Estas, por sua vez, interagem com uma proteína envolvida direta ou indiretamente com o complexo da RNA polimerase II. A formação de uma dobra no DNA seria, portanto, necessária para acomodar essa interação. Para tanto, os fatores de transcrição devem ter, pelo menos, duas superfícies, sendo uma que se liga ao DNA e o posiciona, para que a outra possa interagir com a proteína adaptadora, e, assim, promover o início da transcrição (revisto por Ptashne, 1988 e Lewin, 1990).

Vários domínios responsáveis pela ligação do fator de transcrição ao DNA já foram descritos: dedos de zinco, “helix- turn- helix”, zíper de leucina e domínio básico de ligação ao DNA, etc. A identificação dos domínios de ativação de diferentes fatores de transcrição, tem permitido agrupá-los em algumas famílias com características comuns: domínios acídicos (ricos em

aminoácidos carregados negativamente), domínios ricos em glutamina e domínios ricos em prolina (revisto por Latchman, 1995). Muitas classes de fatores de transcrição em células eucarióticas formam proteínas heterodiméricas com membros da própria família. Esta heterodimerização aumenta a variedade de sequências de DNA reconhecidas especificamente pelos fatores de transcrição, e também, aumenta as suas formas de regulação (revisto por Lodish et al, 1995).

O domínio de ativação pode agir através da interação direta com a maquinaria basal de transcrição e assim estimular a taxa de iniciação transcricional ou, ainda, romper a estrutura da cromatina facilitando o acesso de outros fatores de transcrição (revisto por Conaway & Conaway, 1994).

Por outro lado, a repressão transcricional pode ocorrer de forma indireta ou direta. Na repressão indireta o repressor interfere na ação do ativador, bloqueando, assim, a estimulação transcricional. Esta interferência pode se dar pelos seguintes mecanismos: o inibidor pode se ligar à mesma sequência consenso do ativador e, assim, mascarar o sítio de ligação do ativador; o inibidor pode se ligar ao ativador, formando um complexo que não se liga ao DNA, ou, então, liga-se ao domínio de ativação do ativador, bloqueando, desta forma, a estimulação transcricional. A repressão indireta pode, ainda, ser mediada pela estrutura da cromatina dificultando o acesso de outros fatores de transcrição. Por outro lado, a repressão direta se verifica pela interação direta do fator de transcrição inibitório com o complexo basal de transcrição, diminuindo, assim, a sua atividade (revisto por Conaway & Conaway, 1994 e Latchman, 1995).

Desta forma, a transcrição gênica em células eucarióticas é regulada pela combinação de diversos ativadores e repressores ligados a elementos próximos ao promotor e elementos distantes (“enhancers”), que podem estar “upstream” ou “downstream” do início do sítio de iniciação transcricional.

Portanto, a expressão gênica em um determinado tipo de célula em um organismo multicelular vai ser determinada, em parte, pelos ativadores e repressores que são expressos nesta célula.

Alterações no comportamento da célula induzidas por sinais extracelulares, tais como fatores de crescimento requerem a execução de um complexo programa de eventos transcricionais. Já vimos que, para ativar ou reprimir a transcrição gênica, fatores de transcrição precisam se localizar no núcleo, geralmente ligar-se ao DNA e interagir com a maquinaria de transcrição basal. Desta forma, os sinais extracelulares que regulam a atividade de fatores de transcrição podem afetar um ou mais destes processos (revisto por Hill & Treisman, 1995). Mais comumente, este mecanismo de regulação envolve fosforilação reversível. A fosforilação de fatores de transcrição por ação de diferentes quinases (ou por quinases relacionadas com mais de uma via de transdução de sinal) é um mecanismo simples que permite a convergência de diferentes sinais para um mesmo fator de transcrição. Assim, como já mencionado, as vias de transdução desencadeadas por Ras resultam na fosforilação do fator de transcrição TCF. Uma vez fosforilado, TCF se associa a SRF e se liga a elementos responsivos ao soro (SRE) presentes em vários promotores, como o de *c-fos*, ativando a transcrição deste gene. Foi verificado, também, que por vias distintas (PI3K/PKB e JNK), Ras induz a fosforilação de c-Jun em domínios diferentes, modulando a atividade deste fator de transcrição. c-Fos e c-Jun são fatores de transcrição de duas famílias distintas, capazes de se associar por diferentes combinações (duas a duas) formando o complexo AP-1, o qual é capaz de transregular promotores que contêm o elemento responsivo a AP-1 (Bohmann et al, 1987; Chiu et al, 1988).

As vias de transdução desencadeadas por Ras, os fatores de transcrição ativados ou reprimidos por estas vias e, conseqüentemente, os genes regulados por esta proteína, continuam sendo objetos de intensos estudos. A elucidação dos mecanismos moleculares da ação de Ras contribuirá para o entendimento da proliferação e transformação celular e, conseqüentemente, para o controle destes processos.

1.3. Gene supressor de tumor *RECK*

Com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares da ação de Ras, o grupo do Dr. Makoto Noda tem isolado e caracterizado cDNAs, que quando super-expressos, induzem a reversão fenotípica da linhagem DT, uma sublinhagem de células NIH-3T3 transformadas com *v-Ki-ras* (Noda et al, 1983, 1989; Noda, 1993a). Utilizando essa abordagem, o gene *Krev-1* (Kitayama et al, 1989, 1990), também conhecido como *rap1A*, que codifica uma proteína relacionada a Ras por conter uma região idêntica ao domínio "efetor" de Ras (Noda, 1993b), foi isolado anteriormente através do rastreamento de uma biblioteca de expressão de cDNA de fibroblasto humano (Chen & Okayama, 1987). Estudos sugerem que a proteína Krev-1 inibe a interação do domínio "efetor" de Ras com proteínas responsáveis pela transdução do sinal (Noda, 1993a, b). Utilizando essa mesma abordagem, dois clones com atividade biológica significativa foram isolados. Um desses cDNAs codifica uma forma truncada da proteína homeobox MSX-2, o qual induz a reversão das células DT através de um mecanismo dominante-negativo sobre a proteína MSX-2 endógena (Takahashi et al, 1996). O outro cDNA codifica uma nova glicoproteína de membrana denominada RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) (Takahashi et al, 1998).

O gene *RECK* é expresso em vários tecidos humanos normais, porém sua expressão é reprimida durante a transformação celular, uma vez que não se detecta a sua expressão em inúmeras linhagens tumorais (Takahashi et al, 1998). A expressão constitutiva do gene *RECK* em células malignas resulta em supressão da atividade invasiva dessas células, acompanhada de concomitante diminuição da secreção de metaloproteinase de matriz- 9 (MMP-9), uma enzima muito conhecida por estar envolvida em processos de invasão tumoral e metástase (Takahashi et al, 1998). Ensaio bioquímico mostraram que a proteína RECK purificada se liga a MMP-9 e inibe a sua atividade proteolítica. Estes achados conduziram à formulação do seguinte modelo: nas células normais, a secreção de MMP-9 está bloqueada na membrana plasmática pela proteína RECK que está ancorada à membrana. Durante a transformação celular, a expressão do gene *RECK* é inibida, resultando em uma secreção aumentada de MMP-9, a qual contribui para a transformação morfológica e o comportamento invasivo das células (Takahashi et al, 1998).

Os estudos anteriores mostraram que, em células de fibroblasto de camundongo NIH-3T3 a expressão do gene *RECK* não é reprimida apenas pelo oncogene *ras* ativado, mas, também, por vários outros oncogenes, tais como *v-fos*, *c-myc*, *v-src*, *v-fms*, *v-fes* e *v-mos* (Takahashi et al, 1998). Estes resultados sugerem que o gene *RECK* é um alvo comum da sinalização oncogênica, relacionando estes sinais à transformação celular.

Proteínas cuja expressão é reprimida no processo de transformação celular são importantes candidatas a supressoras de tumor. A expressão da E-caderina, codificada por um gene supressor de invasão, é inibida em carcinomas humanos através da inativação transcricional por hipermetilação de sequências CpG do seu promotor (Graff et al, 1995; Yoshiura et al, 1995). A expressão de genes supressores de tumor tais como p16 (Gonzalvo et al,

1998), pRb (Ohtani-Fujita et al, 1993) e p53 (Shroeder & Mass, 1997) é reprimida por metilação de sequências CpG nos respectivos promotores. A expressão de maspina, um inibidor de serina protease com atividade supressora de tumor/metástase em glândulas mamárias, é inibida durante a progressão do tumor como um resultado da diminuição da transativação através dos sítios de Ets e Ap1 (Zhang et al, 1997). α 2- integrina também exerce um papel importante na inibição do comportamento maligno de células tumorais e sua expressão é reprimida por produtos de oncogenes *Erb-B2* e *v-ras* via um sítio Sp1 presente no seu promotor (Ye et al, 1996). Além de *RECK*, foi clonado recentemente outro gene que codifica para um inibidor de protease, cuja expressão também é inibida pelo oncogene *ras* (Izumi et al, não publicado). Seria interessante analisar se mecanismos comuns estariam envolvidos na repressão da expressão destes genes. A compreensão dos mecanismos envolvidos na inibição da expressão destes genes por oncogenes permitirá o desenvolvimento de estratégias para restaurar a sua expressão em células tumorais suprimindo, assim, o comportamento maligno destas células.

1.4. A reversão do fenótipo transformado e a linhagem C6/ST1 de glioma de rato

O fenômeno da reversão de células transformadas e tumorais para um fenótipo normal, tem permitido abordar a análise do papel de oncogenes e de genes supressores de tumor não só na transformação celular, como, também, no controle da proliferação celular normal e nos mecanismos de transdução de sinal (Noda, 1993b).

Múltiplas abordagens podem ser usadas para o estudo da reversão tumoral-normal. No caso de já se dispor de candidatos a oncogenes ou genes supressores de tumor responsáveis pelo fenótipo maligno de uma determinada

linhagem celular, pode-se imaginar estratégias para corrigir especificamente os defeitos genéticos e perguntar como tais manipulações afetariam o comportamento maligno dessas células. Assim, por exemplo, anticorpos, substâncias químicas, ou mutantes dominante-negativos que inibem oncoproteínas poderiam ser utilizadas para verificar se induzem a reversão fenotípica, inibem o crescimento, ou causam alguma outra alteração. O "knock-out" genético, por recombinação homóloga, ou a inibição da expressão gênica através de RNA antisense, também podem ser utilizados com o mesmo propósito. No caso de células com mutações em genes supressores de tumor, a reposição de genes intactos deve ser feita para avaliar se a inativação desse gene contribui para o fenótipo maligno. Novos genes envolvidos na regulação da proliferação podem ser descobertos através do isolamento de revertentes a partir de células transformadas após mutagênese ou transfecção de DNA, caracterizando-se os genes responsáveis pelo fenótipo normal. Além dessas abordagens genéticas, substâncias químicas que induzem a reversão fenotípica têm sido rastreadas através da utilização de linhagens celulares transformadas. Tais substâncias são fortes candidatas a drogas anti-cancerígenas. O estudo do mecanismo de ação dessas drogas podem revelar moléculas-alvo possivelmente envolvidas na regulação da proliferação celular, adesão, etc (Noda, 1993b).

Hormônios glucocorticóides são amplamente utilizados como agentes anti-inflamatórios e anti-tumorigênicos, constituindo uma quimioterapia de uso frequente no tratamento de glioma e glioblastomas. A linhagem celular C6 (Benda et al, 1968) foi obtida a partir de um glioma quimicamente induzido (N-nitrosometiluréia).

Com o objetivo de se estudar o mecanismo de ação de hormônios glucocorticóides e fatores de crescimento, o grupo da Dra. Mari Sogayar isolou variantes da linhagem C6 com diferentes respostas a reguladores extra-

celulares (Armelin & Armelin, 1983). As variantes ST1 e P7 são de particular interesse, uma vez que se mostram respectivamente, hiper-responsivas e resistentes ao tratamento com glucocorticóides. As células ST1 são completamente transformadas e tumorigênicas mas respondem ao hormônio glucocorticóide com uma completa reversão fenotípica tanto *in vitro* (crescimento em suspensão de agarose) quanto *in vivo* (tumorigenicidade em camundongos "nude"). Por outro lado, a variante P7 mantém o fenótipo transformado mesmo após o tratamento hormonal.

As variantes C6/ST1 e C6/P7 constituem um sistema-modelo excelente para se investigar a ação anti-tumorigênica de hormônios glucocorticóides ao nível molecular. Com este objetivo, duas estratégias diferentes estão sendo utilizadas: clonagem de genes regulados por glucocorticóides em células C6/ST1 e análise da expressão de genes conhecidos por estarem envolvidos no controle da proliferação e/ou reversão celular.

A clonagem de genes regulados por hormônios glucocorticóides na reversão fenotípica de células C6/ST1 de glioma de rato (Sasahara et al, 1995; Valentini & Armelin, 1996; Armelin et al, 1996; Vedoy et al, em preparação) e o isolamento de clones revertentes a partir de fibroblastos transformados com *v-Ki-ras* após transfecção de uma biblioteca de expressão de cDNA de fibroblasto normal, descrito no item anterior (Kitayama et al, 1989 1990; Takahashi et al, 1996, 1998), têm possibilitado a obtenção de sequências gênicas importantes envolvidas na transformação celular.

O estudo da regulação da expressão dos genes envolvidos na reversão fenotípica contribuirá para o entendimento dos mecanismos envolvidos na transformação maligna e para o desenvolvimento de novas estratégias para a terapia anti-tumoral.

1.5. Objetivos do trabalho

Com o objetivo de estudar a regulação da expressão do gene *RECK* na reversão do fenótipo transformado, o presente estudo propõe:

a) isolar o promotor do gene *RECK* de camundongo e caracterizar os elementos cis e fatores de transcrição responsáveis pela atividade do promotor em fibroblastos não transformados;

b) caracterizar os elementos cis responsáveis pela inibição da expressão do gene *RECK* pelo produto do oncogene *Ha-ras* (V12) e definir o mecanismo pelo qual ocorre esta inibição;

c) analisar o envolvimento do mecanismo de metilação de DNA na regulação transcricional do gene *RECK*;

d) verificar a regulação da expressão do gene *RECK* em diversos sistemas de proliferação, invasão e reversão fenotípica celular.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. Plasmídeos

pBluescript SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA): vetor plasmideal.

pSK-mRECKcDNA: contém o cDNA de *RECK* de camundongo (*mRECK*), sem a porção 5'UTR completa clonado no sítio SmaI do plasmídeo pBluescript SK(+). (Takahashi et al, 1998).

pSKRM1, pSKRM2, pSKRM3 e pSKRM4: plasmídeos pBluescript SK(+) contendo fragmentos de DNA genômico de camundongo, gerados conforme item 2.2.9.2.

pGL3-básico (Promega, WI, USA): plasmídeo contendo o gene repórter luciferase.

pGL3-4110, pGL3-4110(AS), pGL3-52, pGL3-817 e pGL3-1679: plasmídeos pGL3-básico contendo fragmentos 5'-flanqueadores do gene *RECK* de camundongo, "upstream" ao gene repórter luciferase. Foram gerados conforme item 2.2.11.1.

pRL-TK (Promega, WI, USA): vetor de expressão de Renilla luciferase sob o controle do promotor de HSV TK ("herpes simplex virus thymidine kinase"). Utilizado como controle interno para normalizar a eficiência de transfecção nos ensaios de transfecção transitória.

pSR α neo: vetor de expressão contendo o gene *neo* para resistência à geneticina e como promotor, um híbrido composto pelo promotor de SV40 e de R-U5 de HIV (Takebe et al, 1988).

pSR α -Ha-ras (V12): Construção feita por Kitayama H (não publicado), na qual o gene de *Ha-ras* (V12) está clonado nos sítios de EcoRI e NotI do plasmídeo pSR α neo.

pCXN2neo: vetor de expressão contendo o gene *neo* e um promotor forte de citomegalovírus (Niwa et al, 1991).

pCXN2-Ha-ras: Construção feita por Takahashi (não publicado), na qual o gene de *Ha-ras* (V12) está clonado nos sítios de EcoRI e BglII do plasmídeo pCXN2neo.

pCXN2-hRECK: Construção feita por Takahashi e colaboradores, 1998, onde o gene de hRECK está clonado no sítio SmaI do plasmídeo pCXN2neo.

pUHD15-1neo: vetor de expressão contendo o gene *neo* e o gene tTA (este transativador foi gerado pela fusão do repressor do gene que confere resistência à tetraciclina de *E. coli* com o domínio de ativação de VP16 de HSV; tTA se liga especificamente à sequência operadora de tetraciclina na ausência deste antibiótico (Gossen & Bujard, 1992).

pUHD10-3: vetor de expressão contendo sete repetições da sequência operadora de tetraciclina e um promotor mínimo de citomegalovírus “upstream” ao sítio de clonagem (Resnitzky et al, 1994).

pRGAPDH 1: pBR322 contendo o cDNA de rato correspondente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), usado como controle interno da quantidade total de RNA aplicado em géis de Northern-blots (Fort et al, 1985).

pGEM36B4cDNA: pGEM contendo o cDNA de humano correspondente à 36B4 fosfoproteína PO ribossomal ácida (36B4) (Laborda, 1991), usado como controle interno da quantidade total de RNA aplicado em géis de Northern blots

pFBR-01: contém o pró-vírus de FBR-MSV inteiro clonado no sítio de HindIII do pBR322 (Curran & Verma, 1984).

MMTV-c-myc: construção feita por Stewart et al, 1984, na qual a expressão de c-myc de camundongo está sob controle do LTR de MMTV.

HSV-neo: construção de pBR322 contendo o gene *neo* para resistência a geneticina G418 em células de mamíferos (Kaplan & Roberts, não publicado).

pX343: contém o gene bacteriano que codifica para resistência a higromicina B sob controle do LTR de Mo-MuSV e clonado em pBR322 (Costanzi et al, 1990; Joazeiro, 1990).

2.1.2. Linhagens celulares

NIH-3T3: fibroblasto de embrião de camundongo Swiss do NIH (Jainchill et al, 1969). Para obter as linhagens celulares NIH-3T3 permanentemente transfectadas com o vetor de expressão de Ha-ras (V12), utilizou-se o vetor de expressão pCXN2neo e pSR α neo.

CREF: fibroblasto de embrião de rato (Fisher et al, 1982).

NIH/ptet-Ha-ras (V12) e CREF/ptet-Ha-ras (V12): estas linhagens celulares, que permitem a expressão regulável do oncogene *ras* (sistema de tetraciclina- off), foram estabelecidas através da co- transfecção do plasmídeo pUHD10-3 contendo o oncogene *Ha-ras* (V12) e o plasmídeo pUHD15-1neo nas linhagens celulares NIH-3T3 e CREF, e isolando clones resistentes à geneticina (G418) que exibiam um fenótipo normal em meio contendo 1 μ g/ml de hidrocloreto de doxiciclina (Sigma) e um fenótipo transformado em meio de cultura sem doxiciclina (Kinoshita et al, 1997; Sasahara et al, 1999).

HeLa: linhagem celular derivada do tumor de colo do útero humano; obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA.

HT1080: linhagem celular derivada de fibrosarcoma humano; obtida da ATCC, Rockville, MD, USA.

B16: linhagem celular de camundongo derivada de melanoma; obtida da ATCC, Rockville, MD, USA.

DT: clone de células NIH-3T3 transformadas com v-Ki-ras (Noda et al, 1983, 1989; Noda, 1993a).

Linhagem celular A31: clone celular obtido a partir de células Balb-3T3 (célula mesenquimal de embrião de camundongo Balb-c; Aaronson & Todaro, 1968) cedido pelo laboratório do Dr. Charles Stiles, Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. Linhagens celulares que super-expressam o oncogene *v-fos* e/ou *c-myc* foram obtidas anteriormente (Costanzi et al, 1990; Joazeiro, 1990): clones transfectantes **B119** (FBR-fos/higro^r), **B115** (FBR-fos/c-myc/neo^r) e **B117** (FBR-fos/neo^r) foram obtidos a partir de células A31, através da transfecção dos plasmídeos pFBR-01 e/ou MMTV-c-myc, além dos marcadores genéticos HSV-neo ou pX343.

C6: linhagem de glioma de rato, estabelecida em cultura a partir de um tumor induzido quimicamente por N-nitrosometiluréia (Benda et al, 1968).

ST1: clone da linhagem C6, hipersensível ao hormônio glucocorticóide, obtida em nosso laboratório (Armelin et al, 1982; Armelin et al, 1983). Clones celulares de células ST1 que super-expressam a proteína RECK humana (hRECK) foram obtidos através da transfecção do vetor pCXN2-hRECK.

2.1.3. Soluções e meios de cultura para células de mamífero

Meio de cultura: DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium") (Gibco BRL-Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA).

Soro fetal bovino: SFB (Cultilab Materiais para Cultura de Células, Campinas, São Paulo).

Solução Salina: PBSA ("Phosphate Buffered Saline"), solução salina tamponada pH 7,2 composta por 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8mM Na₂HPO₄ e 1,5mM KH₂PO₄.

Tripsina: (ICN Pharmaceuticals Inc., Cleveland USA; Gibco Limited, Scotland, UK).

2.1.4. Meio de cultura para bactérias

LB: Meio de Luria- Bertani para cultivo bacteriano. 10 g/l de triptona; 5 g/l de extrato de levedura e 10 g/l de NaCl, pH 7,5. Para o preparo de meio sólido em placas, adicionou-se 15 g/l de ágar (Difco, Merck, Gibco-BRL).

NZY: 19 g/l de NZ amina; 5 g/l de extrato de levedura; 2 g/l de MgSO₄.7H₂O e 5 g/l de NaCl. Para o preparo de meio sólido em placas, adicionou-se ágar 15 g/l e para o preparo de meio semi-sólido (NZY top agarose), adicionou-se 0,7% de agarose (Difco, Sigma, Merck e Gibco-BRL)

SOC: 20 g/l de triptona; 5 g/l de extrato de levedura; 0,5 g/l de NaCl; 2,5 mM KCl e 20 mM Glicose, pH 7,0.

2.1.5. Isótopos radioativos

[$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (3000 Ci/mmol); [^{35}S] dATP (> 1000 Ci/mmol); [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (3000 Ci/mmol a 10 mCi/ml) (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Buckinghamshire, England; DuPont New England Nuclear, Boston, MA, USA).

2.1.6. Reagentes

Hidrocortisona (Sigma, St. Louis, USA)

Hidrocloreto de doxiciclina (Sigma, St. Louis, USA)

G418 (Gibco-BRL- Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)

5-azacitidina (Nacalai tesque, Japão)

TNF- α ("Tumor Necrosis Factor") (Boehringer Mannheim, Germany)

Genisteína (Sigma, St. Louis, USA)

2.1.7. Antisoros

Antisoros policlonais anti- Sp1 e anti-Sp3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA)

Antisoro anti-IgG de cabra e de coelho conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA).

2.1.8. Soluções

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, seguindo formulações descritas em manuais de laboratório (Ausubel et al, 1999 ; Sambrook et al, 1989).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas a 37°C em frascos plásticos descartáveis contendo DMEM suplementado com 5 ou 10% de SFB, 1,2 g/l de bicarbonato

de sódio, 25mg/l de ampicilina e 100mg/l de estreptomicina, em atmosfera de 5% CO₂/95% ar para a manutenção do pH próximo ao fisiológico. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiam 80% da densidade de saturação, utilizando, para tanto, tripsina 0,1% em PBSA contendo 1mM EDTA e tendo sido a cultura previamente lavada, uma vez, com solução de PBSA. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) a -190 °C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

A super-expressão de Ha-ras (V12) nas linhagens celulares NIH/ptet-Ha-ras (V12) e CREF/ptet-Ha-ras (V12) foi suprimida através do tratamento com 1 µg/ml de hidrocloreto de doxiciclina por 96h. O tratamento das linhagens celulares (NIH-3T3, HeLa, HT1080, B16, DT e C6) com 2 µg/ml de 5-azacitidina foi feito em dois pulsos de 24h. O tratamento de células C6/ST1 com hidrocortisona foi feito numa concentração final de 0,1 µg/ml. O tratamento das células ST1 com TNF α e genisteína foi feito em uma concentração final de 2,5 ng/ml e 50µM, respectivamente.

2.2.2. Preparo de bactérias competentes utilizando CaCl₂ para transformação de *Escherichia coli* com DNA plasmideal

Uma colônia da bactéria XL1-Blue foi inoculada em 40 ml de meio LB e cultivada sob agitação a 37°C até uma densidade óptica a 600 nm de 0,5 (OD₆₀₀= 0,5). A suspensão de bactérias foi resfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada a 1.500xg por 7 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento de bactérias foi ressuspensionado em 10 ml de uma solução contendo 60 mM CaCl₂ (pré- resfriada em gelo). Centrifugou-se a suspensão a 1.500xg por 5 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e o sedimento de bactérias

foi ressuspensionado em 2 ml da solução de 60 mM CaCl_2 contendo 15% de glicerol. A suspensão foi aliquoteada e estocada a -80°C .

Um tubo contendo 50 μl da bactéria competente (estocada a -80°C) foi descongelada rapidamente e mantida em gelo. Adicionou-se o produto de ligação (4 a 6 μl) ou o plasmídeo a ser amplificado (500 ng) e manteve-se no gelo por 30 minutos. O tubo foi aquecido a 42°C por 1 minuto e rapidamente transferido para o gelo, onde se manteve por, pelo menos, 1 minuto. A mistura foi transferida para 1,0 ml de meio de cultura SOC e incubada a 37°C por 1h com agitação moderada. Diferentes diluições da cultura bacteriana foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido (1,5% ágar) contendo ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$).

2.2.3. Preparo de bactérias para a transformação de *Escherichia coli* com DNA plasmideal através de eletroporação

Uma cultura de *E. coli* XL1-Blue (2,0 ml) pré-crescida durante a noite foi inoculada em 200 ml de meio LB. As bactérias foram cultivadas a 37°C com agitação a 250 rpm até $\text{OD}_{600}=0,5-0,8$. O frasco de cultura foi resfriado em gelo por 15-30 minutos e centrifugado a $4.000\times g$ por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi aspirado e centrifugado novamente. O restante do sobrenadante foi aspirado e 200 ml de água gelada foram adicionados; ressuspendeu-se gentilmente o sedimento e centrifugou-se a $4.000\times g$ por 15 minutos. Repetiu-se esta lavagem e centrifugação por mais duas vezes. O sobrenadante foi aspirado, o sedimento de bactérias foi ressuspensionado em 20 ml de água e transferido para um tubo menor. Centrifugou-se a $4.000\times g$ por 15 minutos, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as bactérias em 3ml de glicerol 10% gelado. Novamente, o tubo foi centrifugado, o sobrenadante

aspirado e, por fim, as bactérias foram ressuspensas em 0,5 ml de glicerol 10%. Esta suspensão de bactérias foi alíquotada e congelada a -80°C.

Para transformação destas bactérias eletrocompetentes com DNA plasmideal, uma alíquota de 40 µl desta bactéria foi colocada em uma cubeta de 0,1 cm para eletroporação. Adicionou-se, no máximo, 10 ng do DNA plasmideal (em um volume mínimo). A cubeta foi deixada em gelo por alguns minutos. Regulou-se o eletroporador conforme o manual para cubetas de 0,1 cm. Colocou-se a cubeta no eletroporador e após a aplicação de um pulso, adicionou-se imediatamente às bactérias 1 ml de meio LB. Incubou-se por 1-2h a 37°C com agitação. Diferentes diluições da cultura bacteriana foram semeadas como descrito no item anterior.

2.2.4.Preparação de DNA plasmideal em pequena escala

Inoculou-se uma colônia da bactéria transformada com o DNA plasmideal em 1,5 ml de meio LB contendo ampicilina (50 µg/ml). Incubou-se a 37°C durante a noite, com agitação. Centrifugou-se a 12.000xg por 30 segundos. Removeu-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 200 µl da solução I (100 mM TrisCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 400 µg/ml de RNase I) através de agitação vigorosa. Adicionou-se 200 µl da solução II (1M NaOH; 5,3% massa/volume de SDS), inverteu-se o tubo algumas vezes e incubou-se por 5 minutos `a temperatura ambiente, para a completa lise das bactérias. Adicionou-se 200 µl da solução III (solução 3M potássio e 5M acetato), misturou-se invertendo o tubo algumas vezes e incubou-se no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se a 12.000xg por 5 minutos e transferiu-se o sobrenadante para um outro tubo, ao qual adicionou-se 420 µl de isopropanol, misturou-se bem e incubou-se por 10 minutos `a temperatura ambiente.

Centrifugou-se a 12.000xg por 10 minutos, removeu-se o sobrenadante e o sedimento foi seco ao ar. Este sedimento foi dissolvido em 50 µl de TE (tampão Tris- EDTA) pH 8,0. Para a obtenção de um DNA mais puro, utilizou-se o kit FlexPrep da Pharmacia, prosseguindo com a adição de 150µl da suspensão de Sephaglas TMFP (Sephaglas FP suspenso em uma solução tamponada de guanidina-HCl: 7M de guanidina-hCl; 50 mM de TrisCl pH7,5; 10 mM de EDTA) ao sedimento de DNA seco. Agitou-se para dissolvê-lo e incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente com rotação suave. Centrifugou-se por 12.000xg por 30 segundos e removeu-se o sobrenadante. O sedimento de Sephaglas foi lavado com 200 µl de tampão de lavagem (20 mM de TrisCl pH 7,5; 2 mM de EDTA e 200 mM de NaCl mais etanol absoluto para uma concentração de 60%). Centrifugou-se a 12.000xg por 30 segundos e removeu-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 12.000xg por 30 segundos, sendo em seguida descartado o sobrenadante. Agitou-se levemente o sedimento para dispersá-lo e facilitar a sua secagem ao ar. A este sedimento adicionou-se 50 µl de tampão TE e agitou-se para ressuspendê-lo. Incubou-se a 56°C por 5 minutos, agitou-se vigorosamente e centrifugou-se a 12.000xg por 2 minutos. O sobrenadante (eluato) foi coletado e o DNA foi analisado através de digestão com enzimas de restrição apropriadas e eletroforese em gel de agarose 1% em 1X TAE (Tampão Tris- Acetato- EDTA, pH 7,5) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo.

2.2.5. Preparação de DNA plasmideal em média escala

Para a preparação de DNA plasmideal, utilizou-se o kit da QIAGEN (QIAfilter plasmid mid). Uma colônia da bactéria transformada com o DNA

plasmideal foi inoculada em 50 ml de meio LB contendo ampicilina (50 µg/ml). Cultivou-se a 37°C com agitação durante a noite. Centrifugou-se essa cultura a 6.000xg por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. O sedimento de bactérias foi ressuspendido em 4 ml de tampão P1 (100 µg/ml RNase A; 50 mM TrisCl; 10 mM EDTA; pH 8,0). Em seguida, adicionou-se 4 ml do tampão de lise P2 (200 mM NaOH; 1% SDS), misturou-se gentilmente e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se o tampão de neutralização P3 (3,0 M KAc; pH 5,5), misturou-se rapidamente, porém com cuidado para não quebrar o DNA genômico. O precipitado de proteínas e DNA genômico foi eliminado através de filtração utilizando os QIAfiltros. O lisado límpido foi aplicado a uma coluna contendo uma resina à qual se liga o DNA plasmideal. Essa coluna foi pré-equilibrada com 4 ml de tampão QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15% etanol, pH 7,0; 0,15% Triton X-100). Após a passagem do lisado pela coluna, lavou-se a coluna duas vezes com 10 ml do tampão QC (1,0 M NaCl; 50 mM MOPS, 15% etanol; pH 7,0). O DNA plasmideal foi eluído da coluna com 5 ml do tampão QF (1,25 M NaCl; 50 mM TrisCl; 15% etanol; pH 8,5). Precipitou-se o DNA com 3,5 ml de isopropanol a temperatura ambiente. Centrifugou-se imediatamente a 30.000xg por 30 minutos a 4 °C, e removeu-se o sobrenadante cuidadosamente. Lavou-se o precipitado de DNA com 2 ml de etanol 70% e centrifugou-se a 30.000xg por mais 10 minutos. Removeu-se o sobrenadante, secou-se o precipitado de DNA a temperatura ambiente por uns 5 minutos e dissolveu-se em um volume apropriado de tampão TE. O DNA plasmideal foi quantificado por espectrofotometria e analisado como descrito no item anterior.

2.2.6. Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose

Após a digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição apropriadas, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em 1X TAE. O fragmento de DNA de interesse foi purificado utilizando o kit GenClean II (BIO 101 Inc., La Jolla, CA. USA). Ao pedaço do gel contendo o fragmento de interesse, adicionou-se solução de NaI 6M (num volume correspondente a 3 vezes o volume do gel), e agitou-se a 37°C até sua completa dissolução. Adicionou-se 5µl da suspensão de "glass milk" (suspensão de sílica em água) e incubou-se por 30 minutos a 4°C, para permitir a adsorção do DNA à matriz de sílica. Centrifugou-se o tubo por 30 segundos a 12.000xg, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado com 500 µl da solução "New Wash" (uma solução contendo NaCl, Tris, EDTA e etanol). Centrifugou-se novamente, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem mais duas vezes. O DNA foi eluído da resina através da adição de 10 a 20 µl de TE e incubação a 55 °C por 3 minutos. Após centrifugação a 12.000xg por 2 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um tubo novo. Para estimar a concentração do DNA, preparou-se várias amostras de DNA de concentrações diferentes e conhecidas (250 a 7,5 ng/µl). À 2 µl destas amostras, acrescentou-se 2 µl de brometo de etídeo (1µg/ml). À 1 µl da amostra do fragmento purificado adicionou-se 1 µl de água e mais 2 µl de brometo de etídeo (1 µg/ml). Cada uma destas amostras foi aplicada em pontos distintos de um plástico e fotografadas com auxílio de luz ultravioleta. Comparando-se as amostras padrão com as amostras do fragmento purificado, foi possível estimar a concentração do fragmento.

2.2.7. Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de acrilamida

Este método foi utilizado para a purificação de fragmentos pequenos (< 500 pb). Após a digestão do plasmídeo com enzimas de restrição adequadas, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 5 a 8% em tampão 1X TBE (Tampão Tris- Borato- EDTA, pH 8,3). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo. O pedaço do gel contendo o fragmento de interesse foi recortado, picado com o auxílio de um estilete e o DNA foi eluído com a adição do tampão de eluição (0,5 M acetato de amônio; 1 mM EDTA pH 8,0), num volume correspondente a duas vezes o volume do gel. Incubou-se a 37°C por, pelo menos, 3h, sob agitação. Centrifugou-se por 1 minuto a 12.000xg e coletou-se o sobrenadante, que foi filtrado através de filtros Millipore (0,45 µm), centrifugando os tubos a 5.000xg por 2 minutos. O DNA foi precipitado através da adição de etanol (2 vezes o volume do filtrado, que contém acetato de amônio suficiente para permitir a precipitação do DNA) e resfriamento a -70°C por 10 minutos. Centrifugou-se o tubo a 12.000xg por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi seco e dissolvido em 10 a 20 µl de TE. A concentração do DNA foi estimada como descrito no item anterior.

2.2.8. Clonagem do DNA genômico

2.2.8.1. Plaqueamento para titular a biblioteca de DNA genômico

Utilizou-se uma biblioteca de DNA genômico de camundongo (linhagem 129) clonada no vetor Lambda Fix II (Stratagene), previamente amplificada em bactérias XL-1 Blue MRA e estocada na presença de 15% de glicerol a -80°C

(biblioteca cedida pelo Dr. S. Itohara, da Universidade de Kyoto, Japão). Esta biblioteca foi titulada adicionando-se `a cada diluição (diluições seriadas) 200µl de uma suspensão de *E. coli* XL-1 Blue MRA em sulfato de magnésio 10mM ( $OD_{600}=0,5$ ). Os bacteriófagos e bactérias foram pré- incubados por 15 minutos a 37°C para permitir a adsorção dos fagos `as bactérias. Em seguida, adicionou-se 3ml de NZY top agarose (46°C) e procedeu-se, imediatamente, o plaqueamento em placas de ágar NZY (100 mm de diâmetro) pré- aquecidas a 37°C e incubou-se a 37°C por 7-12h (placas de lise de aproximadamente 1 mm de diâmetro).

2.2.8.2. Rastreamento da biblioteca de DNA genômico

2.2.8.2.1. Plaqueamento da biblioteca de DNA genômico

Misturou-se 600 µl de uma cultura de *E. coli* XL-1 blue MRA $OD_{600}=0,5$ e um volume da biblioteca genômica de DNA diluída contendo aproximadamente 6×10^4 bacteriófagos. Incubou-se a 37°C por 15 minutos e adicionou-se 7 ml de NZY top agarose (46°C), vertendo, logo em seguida, o conteúdo do tubo sobre placa de ágar NZY (150 mm de diâmetro) pré-aquecida a 37°C. Colocou-se a placa sobre superfície plana para solidificação do NZY top agarose e incubou-se a 37°C por 7-12h. Repetiu-se o procedimento totalizando cerca de 2×10^6 clones genômicos rastreados.

2.2.8.2.2. Preparo e tratamento dos filtros

As placas de NZY, contendo as placas de lise dos fagos, foram refrigeradas a 4°C por 2h antes da aplicação dos filtros de nylon. O material das placas de lise foi transferido, por contato, para filtros de nylon, em duplicata, sendo o tempo de contato do segundo filtro (4 minutos) o dobro do

primeiro filtro (2 minutos). Após transferência, os filtros foram embebidos nas seguintes soluções: 1,5M NaCl e 0,5M NaOH por 1 minuto (desnaturação); 1,5M NaCl e 0,5M TrisCl (pH7,5) por 1 minuto (neutralização) e, por fim, uma lavagem em 3X SSC. Os filtros foram secos ao ar e mantidos a 60°C durante a noite para fixação do DNA.

2.2.8.2.3. Preparo da sonda de cDNA, hibridização e lavagem dos filtros

Utilizou-se, como sonda, o fragmento BamH1- Sph1 de 0,4 kb correspondente à porção 5' do cDNA de camundongo (Takahashi et al, 1998). Este fragmento foi obtido através da digestão do plasmídeo pSK-mRECKcDNA com as enzimas de restrição BamH1 e Sph1 e posterior purificação do fragmento, como descrito no item 2.2.7. A sonda foi marcada com [α -³²P]dCTP utilizando o kit "Ready to go- DNA Labelling kit (-dCTP)" (Pharmacia), baseado na reação de "Random Primer Extension" (Feinberg & Vogelstein, 1984). A mistura de reação (uma solução liofilizada contendo dATP, dGTP, dTTP, 4-8 unidades da enzima Klenow e oligonucleotídeos randômicos de 9 mers) adicionou-se 20 µl de água e colocou-se o tubo no gelo (5 a 60 minutos). A solução (25 µl) contendo o fragmento de cDNA (25-50ng) foi fervida por 5 minutos para desnaturação, imediatamente resfriada no gelo por, pelo menos, 2 minutos e centrifugado rapidamente. Em seguida, esta solução de DNA (25µl) foi adicionada à mistura de reação reconstituída em água (20 µl) juntamente com 5µl (50 µCi) de [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol). Misturou-se gentilmente e incubou-se a reação a 37°C por 30 minutos. A sonda radioativa foi separada dos nucleotídeos livres em colunas de Sephacryl S-200 ou S-300 HR (Pharmacia) e desnaturada em água fervente por 5 minutos antes de ser usada para a hibridização. As membranas foram tratadas com 3X SSC a

65°C por 30 min., 3X SSC e 10X reagente de Denhardt a 65°C por 1h, pré-hibridizadas (65°C por 1h) e hibridizadas (60°C, durante a noite) em 1M NaCl; 10mM EDTA; 0,1% SDS; 50 mM TrisCl pH7,5; 50 µg/ml de DNA de esperma de salmão (sonicado e desnaturado) e a sonda marcada com [α -³²P]dCTP (~1x10⁷ cpm/ml) desnaturada. As membranas foram lavadas utilizando as seguintes condições: duas vezes em 2X SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente por 30 minutos; 4 vezes em 0,5X SSC, 0,1% SDS a 60°C por 40 min. As membranas foram expostas a filmes de raio-X e estes foram revelados após exposição a -70°C durante a noite.

2.2.8.2.4. Seleção e isolamento dos clones positivos

As auto-radiografias foram orientadas sob as placas de Petri. As placas de lise positivas (correspondentes aos sinais positivos nas membranas duplicatas) foram coletadas com pipetas Pasteur e transferidas para tubos contendo 500µl de tampão SM (tampão Tris contendo sódio e magnésio, pH 7,5) e 50µl de clorofórmio. Os tubos foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 1-2h, agitados novamente e centrifugados a 6.000xg por 2 minutos. Novos rastreamentos foram realizados utilizando essas suspensões de fagos. Nestes segundos ou terceiros rastreamentos, os fagos foram plaqueados de tal forma a obter placas de lise bem separadas (100-200 placas de lise em placas com 100 mm de diâmetro) para facilitar o isolamento dos clones, que se procedeu como descrito acima.

2.2.8.3.Preparação do estoque de fagos Lambda isolados (Ausubel et al, 1999)

Misturou-se 100 µl (aproximadamente 5×10^5 fagos) de cada suspensão de fagos obtidos no item anterior e 600µl de *E. coli* XL-1 Blue MRA em sulfato de magnésio 10 mM OD₆₀₀=0,5. Incubou-se a 37°C por 15 minutos e adicionou-se 7 ml de NZY top agarose (46°C), vertendo, logo em seguida, o conteúdo do tubo sobre placa (150 mm de diâmetro) fresca de NZY agarose pré-aquecida a 37°C. Colocou-se a placa sobre superfície plana para solidificação do NZY top agarose e incubou-se a 37°C por aproximadamente 12h. Adicionou-se 10 ml de tampão SM sobre a placa e agitou-se levemente por 15 minutos a 4°C, de forma a permitir a difusão dos fagos para o tampão SM, obtendo-se uma suspensão de bacteriófagos. Essa suspensão foi coletada em um tubo, adicionando-se clorofórmio para uma concentração final de 10% e misturando-se bem. Os "debris" celulares foram removidos por duas centrifugações a 1.500xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo frasco, adicionando-se clorofórmio para uma concentração final de 5%. Estas suspensões de fagos Lambda foram estocadas a 4°C.

2.2.8.4. Preparação de DNA de bacteriófago Lambda (Ausubel et al, 1999)

Colocou-se 700 µl de cada suspensão de fagos, obtida no item anterior, em um tubo e adicionou-se 1µl de DNase I (1mg/ml) e 1µl de RNase A (1mg/ml). Incubou-se a 37°C por 30 minutos. Precipitou-se os fagos adicionando-se 700 µl de solução de polietilenoglicol (20% m/v de PEG 800; 0,5M NaCl), incubando 1h no gelo e centrifugando a 12.000xg por 10 minutos

a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente a 12.000xg por 2 minutos a 4°C para eliminar totalmente o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 500 µl de tampão SM. Adicionou-se 5 µl de SDS 10% e 0,5 µl de EDTA; misturou-se gentilmente e se incubou por 15 minutos a 65°C, com agitação leve e periódica para permitir uma dissolução completa do precipitado (lise dos fagos). Adicionou-se 500µl de fenol, agitou-se vigorosamente e centrifugou-se a 12.000xg por 2 minutos, transferindo a fase aquosa (superior) para um tubo novo. Repetiu-se o processo mais duas vezes, com 500 µl de fenol: clorofórmio 1:1 e com 500 µl de clorofórmio. O DNA foi precipitado adicionando-se à fase aquosa 50µl de acetato de sódio 3M pH 7,0 e 550 µl de isopropanol. Incubou-se por 30 minutos a -20°C e centrifugou-se a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, o sedimento foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em 50 µl de TE pH 8,0. A qualidade do DNA foi analisada em gel de agarose 1% após digestão do DNA com a enzima de restrição Not I, que excisa o fragmento genômico completo clonado no vetor Lambda FIX II.

2.2.9. Análise dos clones de DNA genômico

2.2.9.1. Southern blot

2.2.9.1.1. Preparação da membrana

1 µl da solução de DNA de bacteriófago Lambda, obtida no item 2.2.8.4., foi digerido com enzimas de restrição apropriadas. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml), em 1X TAE. Após a migração, o gel foi fotografado com auxílio de luz ultravioleta, tomando o cuidado de se ter uma régua apropriada

ao lado do padrão de peso molecular. O gel foi tratado com 0,2 M de HCl por 5 minutos, lavado com água, tratado duas vezes por 20 minutos com 1,5 M NaCl e 0,5 M NaOH e por fim, tratado duas vezes por 20 minutos com 1,5 M NaCl e 0,5 M TrisCl. O DNA desnaturado foi transferido para membrana de nylon por capilaridade em 10 X SSC durante a noite. O DNA foi fixado à membrana por “cross linking” com luz ultra-violeta.

2.2.9.1.2. Preparação das sondas radioativas

Utilizou-se como sonda o fragmento BamH1- SphI de 0,4 kb e o fragmento BamH1- SmaI de 0,1 kb correspondentes à porção 5' do cDNA de camundongo (Takahashi et al, 1998). Estes fragmentos foram obtidos através da digestão do plasmídeo pSK-mRECKcDNA com as respectivas enzimas e posterior purificação, como descrito no item 2.2.7. As sondas foram marcadas de acordo com o item 2.2.8.2.3.

2.2.9.1.3. Hibridização e lavagem dos filtros

A membrana foi lavada em 6X SSC, pré- hibridizada a 65 °C por 1 h com solução bloqueadora (6X SSC; 5X reagente de Denhardt; 0,5% SDS e 100 µg/ml de DNA de salmão sonificado e desnaturado) e hibridizada durante a noite a 65 °C na mesma solução de pré- hibridização contendo a sonda radioativa (pelo menos 5×10^5 cpm/ml). Após a hibridização, o filtro foi lavado duas vezes por 30 minutos com 2X SSC e 0,1% SDS à temperatura ambiente e quatro vezes por 30 minutos com 0,5X SSC e 0,1% SDS a 65 °C. As bandas foram detectadas através do analisador de imagem BAS 2.000 (Fuji, Japão).

2.2.9.2. Subclonagem do DNA genômico no vetor pBluescript SK(+)

O DNA genômico inteiro, clonado no vetor Lambda FIX II (16 kb a 19 kb) e seus sub-fragmentos, gerados por digestão com enzimas de restrição apropriadas, foram sub-clonados no vetor pBluescript SK(+) (Stratagene). O vetor (1 µg) foi linearizado com enzimas de restrição apropriadas, precipitado (0,3 M de NaAc/ 80% etanol) e tratado com 1 unidade de fosfatase alcalina intestinal bovina (CIAP; Boehringer Mannheim), de acordo com a descrição a seguir. O vetor linearizado contendo extremidades coesivas, foi tratado com CIAP em tampão 1X (volume total de reação de 50 µl) por 30 minutos a 37°C; por outro lado, o vetor linearizado contendo extremidades “blunt”, foi tratado com CIAP em duas etapas: 15 minutos a 37 °C e mais 45 minutos a 55 °C após adição de mais 1 unidade da enzima. A enzima foi inativada a 65°C por 1h na presença de 5 mM EDTA. O vetor foi purificado por extração fenol:clorofórmio (1:1), precipitado (0,3 M acetato de sódio; 80% etanol) e o sedimento coletado por centrifugação (12.000xg por 20 minutos) e ressuspenso em tampão TE. A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose e estimada a partir da intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídeo. O fragmento de DNA de interesse (a ser subclonado) também foi obtido após digestão com enzimas de restrição adequadas e submetido à eletroforese em gel de agarose. O vetor e o fragmento de DNA foram purificados do gel conforme item 2.2.6. e ligados utilizando o kit de ligação de DNA (Takara, Japão), conforme especificações do fabricante. A mistura de ligação foi adicionada às bactérias *E. coli* competentes e prosseguiu-se conforme o protocolo de transformação (item 2.2.2. ou 2.2.3), acrescentando às placas de LB sólido, 10 µl de IPTG (200 mg/ml) e 20 µl de X- gal (40 mg/ml) antes do plaqueamento da cultura bacteriana transformada.

Preparações de DNA plasmideal em pequena escala foram utilizadas para a identificação de plasmídeos recombinantes através da análise do padrão de restrição. **Observação importante:** Para a subclonagem do fragmento genômico inteiro (16-19kb) no vetor pBluescript SK(+), o inserto foi obtido como se segue: 15 µl da preparação do DNA de fago (item 2.2.8.4.) foi digerido com a enzima de restrição NotI em um volume total de 100 µl a 37 °C durante a noite. O DNA foi diretamente purificado pelo kit Gene Clean (item 2.2.6.) sem ser submetido à eletroforese em gel de agarose, para, em seguida, proceder-se à subclonagem do inserto genômico no vetor pBluescript SK(+) como descrito acima.

2.2.9.3. Construção do mapa de restrição do DNA genômico

O mapa de restrição do DNA genômico foi obtido através da digestão simples (com uma única enzima de restrição) e digestão dupla (com duas enzimas de restrição), utilizando combinações de várias enzimas de restrição, conforme descrito por Sambrook e colaboradores, 1989.

2.2.9.4. Sequenciamento do DNA genômico

2.2.9.4.1. Oligonucleotídeos (sintetizados pela Grainer, Japão)

Primer T3: 5'- ATT AAC CCT CAC TAA AG- 3'

Primer T7: 5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT- 3'

FMATGcompAS: 5'- GAG GCC CGG ACG CTC GCC AT- 3'

ATG44AS: 5'- CCG CCG CGG CCA GCA GAA GTA- 3'

ATG247AS: 5'- TCA AAC GGG AAG TCA GAG GCT GG- 3'

ATG353AS: 5'- ATC ACT CTG CAG GTC CGT CTG AT- 3'

PX229S: 5'- AGC TTC TCC TGG TGT TCC TGT TG-3'
PX382S: 5'- GCT ATT GCT GCC TGC TAA CCT GT-3'
PX231AS: 5'- ACC AAC AGG AAC ACC AGG AGA AG-3'
PX64AS: 5'- ACG GGC CTT GGA AGC GGC AAC AA-3'
T7302S: 5'- TTT TAT CCT TAT CCA TCA GTT TG-3'
T7438S: 5'- TTT CTG CCC TCT GAT TCT CTT CT-3'
AS220PR2: 5'- CCA CCC TCT TCC CTT ATC AAC TA-3'
AS316PR2: 5'- CTC ATA TGC ACA GCC TCT CTT AC-3'
PX272S2: 5'- TGT AGG GCA GAA ATA TAG TAT GA-3'
PX383S2: 5'- TCA CAG CAC ATT CCC AAT AGT GA-3'
PX243AS2: 5'- TCA CCC GGT TCC CTC AGC GAT AA-3'
PX347AS2: 5'- TGA CTT GAT CCC TCC TTT TTA TT-3'
T7218S2: 5'- TTT CTA CAG TTT CCA GTT TTC CT-3'
T7323S2: 5'- TTA GTC ATG AAG AGA TTA GAA AA-3'
PX287AS3: 5'- TTT GAT AAC TCT GTC GTC TCT AC-3'
PX313AS3: 5'- TAT TTG TAT TGA TTT TTC CAG-3'
T7211S3: 5'- TGC TTA TTA TAC ACA CAC ACA CA-3'
T7277S3: 5'- CAA AAG TTA TCT GCC ATA TGA AG-3'
S1223PR: 5'- CTG GTC CCA GGG GTT GCT ACG- 3'
SFMATG 5'- ATG GCG AGC GTC CGG GCC TC- 3'
GLprimer2: 5'- CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA-3'

2.2.9.4.2. Sequenciamento manual

O DNA plasmideal foi preparado de acordo com o item 2.2.5. O sequenciamento de DNA foi feito pelo método de incorporação de dideoxynucleotídeos (Sanger et al, 1977; Tabor & Richardson, 1987), utilizando a DNA polimerase modificada do bacteriófago T7. As reações de

sequenciamento foram feitas utilizando o kit Sequenase 2.0 (United States Biochemical Corporation, Cleveland, USA) na presença de [$\alpha^{35}\text{S}$]-dATP, conforme especificações do fabricante. Os produtos da reação foram fracionados em gel de poliacrilamida 5% em TBE 1X contendo 8M uréia. Após secagem, o gel foi auto- radiografado a -70°C .

2.2.9.4.3. Sequenciamento automático

O DNA foi preparado de acordo com o item 2.2.4. ou 2.2.5. O sequenciamento foi realizado pelo método do dideoxi-nucleotídeos (Sanger et al, 1977; Tabor & Richardson, 1987), utilizando o kit “ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer). Para a reação de sequenciamento utilizou-se 2 μg de DNA, 2 μM do oligonucleotídeo (“primer”), 8 μl da mistura de terminação (contendo ddNTPs marcados com fluoróforos diferentes para cada base; dNTPs; TrisCl pH 9,0; MgCl_2 ; pirofosfatase e AmpliTaq DNA polimerase, FS) e água para completar um total de 20 μl . O conteúdo do tubo foi misturado antes da adição de óleo mineral. O DNA foi inicialmente desnaturado a 95°C por 2 minutos e o aparelho de PCR foi programado para 25 ciclos de: 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Terminada a reação, o óleo mineral foi cuidadosamente removido. O DNA foi purificado com extração fenol: clorofórmio (86:14) e precipitado com 2 μl de 3 M acetato de sódio, 60 μl de etanol e 1 μl de glicogênio (10 mg/ml), em gelo por 15 minutos. Centrifugou-se por 20 minutos a 4°C , lavou-se o precipitado com etanol 70% e secou-se ao ar. Para a utilização do aparelho ABI Prism 310 (gel em capilar), o precipitado foi dissolvido em 20 μl de “Template Suppression Reagent” (Perkin Elmer). Agitou-se, aqueceu-se a 95°C por 2 minutos, agitou-se novamente e, após centrifugação rápida, a amostra foi processada no Sequenciador ABI Prism

310. Para a utilização do aparelho ABI 373, foi necessário a preparação de um gel de poliacrilamida 6% em 1X TBE contendo 7M uréia. O precipitado foi dissolvido em 3 μ l de tampão de amostra (formamida deionizada e 25 mM EDTA pH8,0 contendo 50 mg/ml de Blue Dextran, numa proporção de 5:1 de formamida: EDTA/Blue Dextran). Agitou-se, aqueceu-se a 72 °C por 2 minutos e aplicou-se ao gel.

2.2.10. "Primer Extension" ("AMV Reverse Transcriptase Primer Extension System"- Promega)

2.2.10.1. Marcação radioativa do oligonucleotídeo ("primer")

Em um tubo, adicionou-se 10 pmol do “primer” controle ou do oligonucleotídeo de 20 mers FMATGcompAS (item 2.2.9.4.1.) complementar à extremidade 5' da sequência codificadora encontrada no cDNA de *RECK* de camundongo (correspondente às posições +108 a +127 na Fig.2B), na presença de 1 μ l de tampão 10 X de T4 polinucleotídeo quinase (500 mM Tris Cl pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 50 mM DTT e 1 mM espermidina), 3 μ l de [γ^{32} P] ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 1 μ l de T4 polinucleotídeo quinase (8-10 U/ μ l) e água para completar um volume final de 10 μ l. Incubou-se a reação a 37°C por 10 minutos. Inativou-se a T4 polinucleotídeo quinase por aquecimento do tubo a 90°C por 2 minutos. Centrifugou-se rapidamente e acrescentou-se 90 μ l de água (Concentração final do "primer" = 100 fmol/ μ l).

2.2.10.2. Marcação radioativa do marcador de peso molecular

Em um tubo adicionou-se: 5 μ l (250 ng) do marcador de peso molecular (DNA de ϕ X174 digerido com HinfI e desfosforilado), 1 μ l do tampão 10X de T4 polinucleotídeo quinase, 3 μ l de [γ^{32} P] ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) e 1 μ l de T4 polinucleotídeo quinase (8-10 U/ μ l). Incubou-se a 37°C por 10 minutos. Aqueceu-se a reação a 90°C por 2 minutos para inativar a T4 polinucleotídeo quinase e centrifugou-se rapidamente. Acrescentou-se 190 μ l de água.

2.2.10.3. Reação de "Primer Extension"

Utilizou-se 1,6 μ g de RNA mensageiro de células NIH-3T3 (extraído conforme item 2.2.15.) e 5 ng de RNA controle (RNA correspondente ao gene para resistência à canamicina de 1,2 kb) em 5 μ l de água. Ao RNA adicionou-se 1 μ l (100 fmol) do "primer" marcado com 32 P e 5 μ l do tampão AMV PE 2X (100 mM TrisCl pH 8,3 a 42°C; 100 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 20 mM DTT, 2 mM de cada dNTP e 1 mM espermidina). Misturou-se gentilmente e aqueceu-se os tubos a 58°C (para a reação controle) ou 68°C (para a reação em estudo) por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos, para permitir o pareamento dos "primers" com os respectivos RNAs. A cada tubo adicionou-se, imediatamente, 9 μ l da mistura (5 μ l de tampão AMV PE 2X; 1,4 μ l de pirofosfato de sódio 40 mM e 1 U da AMV transcriptase reversa). Incubou-se a 41°C por 30 minutos. Adicionou-se 20 μ l do tampão de amostra (98% formamida, 10 mM EDTA, 0,1% xileno cianol; 0,1% bromofenol Blue), aqueceu-se os tubos a 90°C por 10 minutos, inclusive o marcador de peso molecular marcado radioativamente (1 μ l), e

aplicou-se 3 µl das amostras em um gel de poliacrilamida 8% desnaturante, contendo 7M de uréia em tampão TBE 1X. O gel foi corrido a 250 V em tampão TBE 0,5X, seco e as bandas foram detectadas através do analisador de imagem BAS 2.000 (Fuji, Japão).

2.2.11. Análise da expressão do gene repórter luciferase

2.2.11.1. Subclonagem da região promotora do gene *RECK* no vetor de expressão do gene repórter luciferase e geração dos mutantes de deleção

O fragmento genômico de aproximadamente 4,2kb, contendo a região "upstream" ao gene RECK de camundongo (-4110 a +82; figura 2B), foi excisado do plasmídeo pSKMR4 (2 µg) utilizando a enzima de restrição SacII. O DNA digerido foi precipitado (0,3 M acetato de sódio/80% etanol), redissolvido em 25 µl de água e misturado com 3 µl de tampão 10X da T4 DNA polimerase, 25 mM de dNTP e 1µl de T4 DNA polimerase (Takara, Japão), para gerar terminações "blunt". O DNA foi purificado por extração com fenol:clorofórmio (1:1), precipitado novamente e aplicado ao gel de agarose. O plasmídeo pGL3-básico (2 µg) contendo o gene repórter luciferase (Promega) foi linearizado utilizando a enzima de restrição Bgl II (um dos sítios presentes no sítio múltiplo de clonagem do vetor, localizado imediatamente "upstream" ao gene repórter luciferase) e incubado com T4 DNA polimerase para gerar terminações "blunt", como descrito acima. A seguir, este vetor foi desfosforilado utilizando a enzima CIAP, como descrito no item 2.2.9.2. O fragmento de 4,2kb e o plasmídeo pGL3- básico, agora linearizados e com terminações "blunt", foram aplicados a um gel de agarose e purificados como

descrito no item 2.2.6.e, em seguida, foram ligados utilizando o kit de ligação de DNA (Takara, Japão), conforme especificações do fabricante. Este produto de ligação foi transformado em *E. coli* XL-1 Blue (item 2.2.2. ou 2.2.3). Dezesesseis colônias foram aleatoriamente coletadas das placas, cultivadas em meio LB líquido e processadas como descrito no item 2.2.4., para a obtenção dos respectivos DNA plasmídeos. Os plasmídeos isolados foram digeridos com a enzima de restrição Xho I (sítio presente no vetor e na posição -817 do inserto: figura 1) e analisados em gel de agarose para se detectar os clones contendo o fragmento clonado na orientação "sense" (pGL3-4110) ou na orientação "anti-sense" (pGL3-4110AS). O plasmídeo pGL3-4110 foi utilizado para gerar os clones mutantes de deleção. Estes clones foram obtidos através da digestão de pGL3-4110 com as enzimas de restrição SmaI (-52), Xho I (-817) e SacI (-1679) (sítios presentes no sítio múltiplo de clonagem do vetor, localizados "upstream" ao sítio de BglII) e subsequente ligação, conforme descrito acima. Os mutantes de deleção gerados desta forma foram designados como pGL3-52, pGL3-817 e pGL3-1679, respectivamente, e contêm os fragmentos do promotor do gene *mRECK*, cujo tamanho está definido pelo número, indicado no próprio nome, mais 82 pares de base da região 5'UTR delimitada pelo sítio da enzima de restrição SacII (figura 2B).

2.2.11.2. Mutagênese sítio-dirigida do plasmídeo pGL3-52 e pGL3-4110

A mutagênese sítio-dirigida foi realizada utilizando o método de Kunkel (Kunkel et al 1987), como descrito (Ausubel et al, 1999).

2.2.11.2.1. Preparação de DNA simples fita

Para gerar DNA simples fita a partir do vetor pGL3-52 e pGL3-4110, bactérias *E coli* (dut⁻ urg⁻) transformadas (de acordo com o item 2.2.2) com o vetor, foram infectadas com o fago "helper" VCS M13 (derivado do fago M13K07; Stratagene), como se segue: uma colônia da bactéria transformada foi inoculada em 3 ml de meio LB contendo ampicilina (50 µg/ml) e incubada sob agitação a 37°C por 2 horas. Adicionou-se 1 µl do fago "helper" VCS M13 (aproximadamente 1x10¹¹ pfu/ml) e incubou-se sob agitação por mais 2 horas a 37°C. Adicionou-se canamicina para uma concentração final de 70 µg/ml e incubou-se durante a noite. Assim, o vetor que contém a origem de replicação derivada do fago filamentosos, replica-se gerando DNA simples fita com a região promotora de *RECK* e o gene da luciferase no sentido "sense". Este DNA simples fita resultante foi exportado da bactéria como partícula fágica encapsulada. O DNA simples fita foi purificado a partir do sobrenadante através de precipitação utilizando 270 µl de 20% polietilenoglicol (PEG) em 2,5 M NaCl para 1,0 ml de sobrenadante. Incubou-se sob agitação leve por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000xg por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi dissolvido em 100 µl de TES (50 mM TrisCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 0,5% SDS). O DNA foi purificado por extração com 100 µl de fenol (agitação vigorosa) e depois com mais 100 µl de clorofórmio. Precipitou-se o DNA (0,3 M acetato de sódio/ 80% etanol), lavou-se o precipitado com etanol e secou-se ao ar. O DNA simples fita assim preparado foi dissolvido em 30 µl de TE.

2.2.11.2.2. Mutagênese sítio- específica

A mutagênese sítio- específica foi introduzida através da hibridização do DNA simples fita com oligonucleotídeo sintético complementar à uma sequência do DNA simples fita com exceção de uma região de despareamento localizada próximo ao centro da sequência do oligonucleotídeo. Esta região de despareamento corresponde à mutação a ser introduzida.

2.2.11.2.2.1. Oligonucleotídeos (sintetizado pela Grainer, Japão)

Os oligonucleotídeos utilizados foram o oligo Sp1A "anti-sense" mutado (5'- TGA AGC CCC **GAA** CCG GCC GCT CAG- 3'), o oligo Sp1B "anti-sense" mutado (5'- GGC ACC AGG CCC CGA **ACC** CGG CGC - 3') e o oligo EBP "anti-sense" mutado (5'- TCA GAG TTT **GAA** AAA CCT CCC GGG-3'). Os nucleotídeos mutados estão em negrito.

2.2.11.2.2.2. Fosforilação do oligonucleotídeo

Antes da hibridização, o oligonucleotídeo simples fita foi fosforilado adicionando-se à 1 µl do oligo (100 µM), 6 µl de água, 1 µl de 10X tampão de T4 polinucleotídeo quinase, 1 µl de 10 mM ATP e 1 µl da enzima T4 polinucleotídeo quinase (Takara, Japão). Esta reação de fosforilação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Adicionou-se 140 µl de TE e purificou-se o oligonucleotídeo por extração com fenol:clorofórmio (1:1) duas vezes. Precipitou-se o oligonucleotídeo adicionando-se 4,5 µl de 5 M NaCl, 1 µl de glicogênio (10 mg/ml) e 375 µl de etanol. Incubou-se por 30 minutos a -70°C e centrifugou-se a 12.000xg por 20 minutos. O precipitado foi dissolvido em 10 µl de TE.

2.2.11.2.2.3. Obtenção do plasmídeo dupla fita

Uma vez fosforilado, o oligonucleotídeo foi hibridizado com o DNA simples fita obtido anteriormente misturando-se 2 µl da solução de DNA simples fita (aproximadamente 0,4 µg), 4 µl do oligo fosforilado (obtido acima), 2µl do tampão 10X (500 mM TrisCl pH 7,5; 100 mM DTT; 1M NaCl) e 12 µl de água. O tubo foi aquecido a 70 °C por 10 minutos e depois mantido à temperatura ambiente por aproximadamente 2h. Seguindo a hibridização do oligonucleotídeo com o DNA simples fita molde, procedeu-se à síntese de DNA e ligação para gerar a estrutura de DNA dupla fita circular. Esta reação se procedeu em um volume de 100 µl contendo: 20 µl da mistura de hibridização obtida como descrito acima; 20 mM TrisCl pH 8,0; 2 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 500 µM de cada dNTP; 1mM ATP; 0,3 µl da proteína “T4 gene 32” (1-10 mg/ml; Boehringer Mannheim). Esta mistura foi colocada em gelo por 5 minutos, adicionou-se 1 µl de T4 DNA polimerase (2,5 U), 1 µl de T4 DNA ligase (2 U) e manteve-se por mais 5 minutos no gelo e 5 minutos à temperatura ambiente, antes de se incubar a 37 °C por 2 horas. Adicionou-se 3 µl de 0,5 M EDTA, precipitou-se (0,3 M acetato de sódio/ 80% etanol/ glicogênio) e o precipitado foi dissolvido em 10 µl de TE. O DNA dupla fita foi transformado em bactérias *E coli* XL1 Blue (item 2.2.2.), agora não mais dut⁻ urg⁻, portanto, a fita de DNA contendo uracila foi degradada, restando, como molde para a replicação, a fita de DNA contendo a mutação introduzida. Cada mutagênese foi verificada coletando-se 5 colônias da placa, preparando-se o DNA em pequena escala (item 2.2.4.) e realizando-se o sequenciamento de acordo com o item 2.2.9.4.3., utilizando o oligonucleotídeo GLprimer2 (item 2.2.9.4.1.), que se parecia com a fita "sense" do vetor pGL3 no início da região codificadora do gene da luciferase

2.2.11.3. Transfecção transitória

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços (22 mm de diâmetro) (aproximadamente 2×10^4 /poço) um dia antes da transfecção. Os vetores plasmídeos purificados pelo kit QIAfilter plasmid mid (item 2.2.5.) foram transfectados utilizando o método de precipitação com fosfato de cálcio. Misturou-se o DNA com 15 μ l de 2,5 M CaCl_2 e acrescentou-se água para um volume final de 150 μ l. A essa solução adicionou-se 150 μ l de 2 X BBS (50 mM BES, 280 mM NaCl e 1,5 mM Na_2HPO_4) gota a gota e com borbulhamento. Incubou-se a mistura por 15 minutos a temperatura ambiente antes de adicioná-la às células em cultura.

2.2.11.4. Medida da atividade do gene repórter luciferase

Para detectar a atividade promotora da região 5' flanqueadora do gene *RECK* de camundongo, 1 μ g da construção contendo o gene repórter luciferase (obtida no item 2.2.11.1 ou 2.2.11.2.) e 0,25 μ g do plasmídeo pRL-TK foram utilizados em cada transfecção. Em ensaios de co-transfecção, 0,2 μ g da construção contendo o gene repórter luciferase (obtida no item 2.2.11.1. ou 2.2.11.2.), 0,8 μ g do vetor de expressão de Ha-ras (pSR α -Ha-ras) ou o vetor controle (pSR α neo), e 0,05 μ g do plasmídeo pRL-TK foram utilizados em cada transfecção (realizada como descrito no item anterior). 24h após a transfecção, as células foram lavadas com PBSA e o meio de cultura foi renovado; e após 24h adicionais, as células foram lavadas duas vezes com PBSA, incubadas por 30 minutos sob agitação à temperatura ambiente com 1X “Passive Lysis Buffer” (Promega) e coletadas (este lisado pode ser estocado a -20°C por, no máximo, 1 mês). A expressão do gene repórter luciferase foi analisada

utilizando o kit "Dual-Luciferase Reporter Assay" (Promega) e um luminômetro. Para medir a atividade da luciferase, adicionou-se 100 µl da "Luciferase Assay Reagente II" (LARII) a 20 µl do lisado celular e imediatamente mediu-se a luz emitida durante 10 segundos. Em seguida, para medir a atividade da Renilla luciferase (gene presente no plasmídeo controle da transfecção), a este mesmo tubo contendo o lisado e o LARII foi adicionado 100 µl do reagente "Stop & Glo" e mediu-se a luz emitida em 10 segundos. As atividades de luciferase foram normalizadas para a eficiência de transfecção e para as diferenças nas quantidades molares das construções dos mutantes de deleção.

2.2.12. Extração de proteínas nucleares

Extratos nucleares foram preparados de acordo com Ye et al, 1996 da seguinte maneira: 5×10^7 células foram tripsinizadas e lavadas duas vezes com solução de Hanks (5,4mM KCl; 0,3 mM Na_2HPO_4 ; 0,4 mM KH_2PO_4 ; 4,2 mM NaHCO_3 ; 1,3 mM CaCl_2 ; 0,5 mM MgCl_2 ; 0,6 mM MgSO_4 ; 137 mM NaCl; 5,6 mM D-glicose; pH 7,4). As células foram lisadas com 500µl de tampão de lise (50mM de KCl; 0,5% Nonidet P-40 (NP40); 25 mM HEPES; 1 mM PMSF; 10µg/ml de leupeptina; 20µg/ml de aprotinina e 100 µM DTT) em gelo por 4 minutos. Após centrifugação a 12.000xg por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado. O sedimento de núcleo foi lavado com o mesmo volume do tampão de lise sem NP-40, e as proteínas nucleares foram extraídas com 300 µl do tampão de extração (500mM de KCl e 10% glicerol com as mesmas concentrações de HEPES, PMSF, leupeptina, aprotinina e DTT do tampão de lise). Após centrifugação a 12.000xg por 5 minutos, o sobrenadante (extrato nuclear) foi aliquoteado e estocado a -70°C . A concentração da proteína foi

determinada com ácido bicinonínico (BCR; Pierce, Rockford, III.), medindo-se a absorbância a 562 nm.

2.2.13. Ensaio de mobilidade eletroforética retardada em gel de poliacrilamida (EMSA)

2.2.13.1. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos sintetizados (Grainer, Japão) contendo sítios putativos de ligação a fatores de transcrição do promotor de *mRECK* (Figura 2B), utilizados neste estudo, foram os seguintes (os sítios de ligação consenso estão sublinhados e as mutações estão em negrito): oligo cEBPb (posições -55 a -32: 5'- CCC GGG AGG TTT TGA AAA CTC TGA- 3'), oligo Sp1A (posições -35 a -12: 5'- CTG AGC GGC CGG GGC GGG GCT TCA- 3'), oligo Sp1A mutado (5'- CTG AGC GGC CGG **TTC** GGG GCT TCA- 3'), oligo CAAT (posições -13 a +11: 5'- CAG CGA GCC GCA GCC AAT CAC CAG- 3'), oligo Sp1B (posições +21 a +44: 5'- GCG CCG GGG GCG GGG CCT GGT GCC- 3'), oligo Sp1B mutado (5'- GCG CCG **GGT** TCG GGG CCT GGT GCC- 3'), e os oligonucleotídeos "anti-sense" correspondentes.

2.2.13.2. Preparação dos oligonucleotídeos dupla fita e marcação radioativa

Para o ensaio de mobilidade eletroforética, oligonucleotídeos dupla fita foram preparados através do pareamento de cada oligonucleotídeo simples fita com a sua fita complementar: adicionou-se 1 µl do oligonucleotídeo "sense" (100 µM); 1 µl do oligonucleotídeo "anti-sense" (100 µM); 2 µl de

tampão 10X (500 mM TrisCl pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 10 mM DTT, 1 M NaCl) e 16 µl de água. O tubo foi aquecido a 70°C por 10 minutos e mantido a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. O oligonucleotídeo foi precipitado (0,3 M NaAc/ 80% etanol) e dissolvido em 30 µl de TE. Estes oligonucleotídeos dupla fita foram marcados nas extremidades 5' com [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP utilizando T4 polinucleotídeo quinase (Promega), através da seguinte reação: em um tubo adicionou-se 2 µl do oligonucleotídeo (1,75 pmol/µl), 1 µl de tampão 10X de T4 polinucleotídeo quinase (700 mM TrisCl pH 7,6; 100 mM MgCl₂ e 50mM DTT), 1µl de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (3.000 Ci/mmol a 10mCi/ml), 5µl de água, e 1 µl de T4 polinucleotídeo quinase (5-10 U/µl). Esta reação foi incubada a 37°C por 10 minutos e interrompida pela a adição de 1µl de EDTA 0,5M. Adicionou-se 89 µl de tampão TE. Oligonucleotídeos não marcados foram utilizados como competidores na reação de ligação DNA- proteína.

2.2.13.3. Reação de ligação DNA-proteína e análise do complexo por eletroforese em gel de poliacrilamida

A reação de ligação DNA-proteína foi conduzida misturando-se 5 µl de água, 2µl de tampão de ligação 5X (20% glicerol; 5 mM MgCl₂; 2,5 mM EDTA; 2,5 mM DTT; 250 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH7,5 e 0,25 mg/ml de poli [dI-dC].poli [dI- dC]) e 2µl de extrato nuclear (1 µg/µl; obtido no item 2.2.12.) ou 50-100 ng da proteína Sp1 recombinante (Promega). Essa mistura foi incubada por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente antes de se adicionar 1 µl de 0,5 a 2,0x10⁵ cpm de sonda de oligonucleotídeo marcado com ³²P. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos. Nos ensaios de competição, foram adicionados à reação de ligação DNA- proteína,

oligonucleotídeo competidor não marcado radioativamente ou o oligonucleotídeo contendo o sítio consenso de ligação a NF-kB (Promega). Uma vez terminada a reação, adicionou-se 1 µl do tampão de amostra 10X (250 mM TrisCl pH 7,5; 0,2% bromofenol blue e 40% glicerol) e submeteu-se a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 4% em 0,5X TBE, após pré-corrida a 100 V por 30 minutos. O gel contendo as amostras foi corrido a 100 V por 150 minutos, seco e exposto a filme de raio- X. O filme foi revelado após exposição durante a noite a -70°C. Em ensaios de "super-shift", a mistura de reação de ligação DNA-proteína foi incubada com 1 µl do antisoro anti-Sp1 (Santa Cruz) ou antisoro anti-Sp3 (Santa Cruz) por mais 30 minutos à temperatura ambiente antes de ser aplicada ao gel.

2.2.14. Ensaio de "Western blot"

Utilizou-se lisados nucleares obtidos no item 2.2.12. Após normalização de acordo com a quantidade de proteínas, os lisados foram separados em gel 10% poliacrilamida-SDS, de acordo com o método de Laemmli (1970). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana PVDF-Plus (Micron Separations Inc., MA, USA), previamente tratada com metanol e lavada duas vezes com água, utilizando o aparelho de transferência semi-seca da BioRad, por eletroforese (1mA/ cm² de membrana, por aproximadamente 1h) em tampão de transferência (25 mM TrisCl pH 7,4; 192 mM glicina; 20% metanol). A verificação da transferência foi feita através da visualização do marcador de peso molecular ("Prestained SDS-PAGE Standards", Bio-Rad), transferido do gel para a membrana.

Os sítios inespecíficos da membrana foram bloqueados com 3% de leite em pó desnatado em tampão TBST (50 mM TrisCl pH 7,4; 200 mM NaCl;

0,5% Tween 20) por 1h a temperatura ambiente, sob agitação, ou durante a noite a 4°C. A seguir a membrana foi lavada duas vezes por 10 minutos com TBST e, em seguida, incubada com o antisoro primário (antisoro policlonal de cabra anti-Sp1 ou de coelho anti-Sp3 da Santa Cruz), diluído 1:10.000 em TBST, mais 1% de BSA ("Bovine Serum Albumin) por 4h a temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi lavada (3 X 10 minutos com TBST) e, então, incubada (1 h a temperatura ambiente, sob agitação) com o antisoro anti- IgG de cabra ou coelho conjugado com peroxidase (Sigma), diluído 1:2.000 em TBST. Após três lavagens com TBST (10 minutos cada, sob agitação), a membrana foi revelada por quimioluminescência, utilizando-se o kit ECL ("Enhanced Chemiluminescence") para detecção de proteínas (Amersham). Filmes de raio- X foram expostos à membrana até a obtenção do sinal adequado (1- 5 minutos).

2.2.15. Preparação de mRNA

Utilizou-se o kit "Quick prep mRNA purification" (Pharmacia). Células cultivadas em placas de 150 mm de diâmetro, em determinadas condições (dependendo do experimento), foram tripsinizadas após atingirem a sub-confluência. Inativou-se a tripsina com meio contendo soro e centrifugou-se o suficiente para sedimentar as células. Removeu-se o sobrenadante, lavou-se as células com PBSA e centrifugou-se novamente. Após repetir esta lavagem, o sedimento de células foi estocado a -80 °C ou foi imediatamente lisado com 0,4 ml do tampão de extração do kit (solução aquosa tamponada contendo tiocianato de guanidina e N- lauroil sarcosina). Após a lise total e obtenção de uma suspensão homogênea, adicionou-se 0,8 ml do tampão de eluição para se obter uma concentração salina ideal para a ligação do mRNA à resina de

oligodT. Após a centrifugação para a obtenção de um homogenato celular límpido, adicionou-se este homogenato à resina de oligodT (previamente preparada centrifugando-se 1 ml da suspensão de oligodT e removendo-se o sobrenadante). A suspensão do homogenato celular e oligodT foi gentilmente misturado, invertendo-se o tubo, por 3 minutos. Centrifugou-se a 12.000xg por 10 segundos e removeu-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 ml do tampão de alta concentração salina (10 mM TrisCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,5M NaCl), ressuspendeu-se a resina e centrifugou-se a 12.000xg por 10 segundos. Removeu-se o sobrenadante e repetiu-se esta lavagem mais 4 vezes. Depois repetiu-se a lavagem mais duas vezes utilizando o tampão de baixa concentração salina (10 mM TrisCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,1 M NaCl). Após esta série de lavagens, ressuspendeu-se a resina em 0,3 ml de tampão de baixa concentração salina e transferiu-se a suspensão para uma coluna "micro spin". Essa coluna foi colocada sobre um tubo para se descartar as soluções de lavagem. Centrifugou-se a coluna, junto com o tubo e depois descartou-se o efluente. Adicionou-se 0,5 ml da solução de baixa concentração salina à coluna e centrifugou-se novamente descartando-se o efluente. Repetiu-se esta lavagem mais 2 vezes. A coluna foi transferida para um tubo estéril para se coletar o eluato. Adicionou-se à coluna 0,2 ml da solução de eluição (10 mM TrisCl pH 7,5; 1 mM EDTA) pré-aquecida a 65 °C e ressuspendeu-se a resina antes da centrifugação. Repetiu-se o procedimento com mais 0,2 ml da solução de eluição. Obteve-se 0,4 ml de eluato. O mRNA foi precipitado com a adição de 10 µl da solução de glicogênio (5 a 10 mg/ml), 40 µl da solução de acetato de potássio 2,5 M e 1 ml de etanol absoluto. Misturou-se e deixou-se precipitando a - 70 °C durante a noite. Centrifugou-se a 4 °C por 20 minutos e descartou-se o sobrenadante. O precipitado de mRNA foi redissolvido em volume adequado

de água. Após a quantificação espectrofotométrica, a sua qualidade foi visualizada em um gel de agarose-formaldeído (Sambrook et al, 1989).

2.2.16. Ensaios de Northern blot

2.2.16.1. Fracionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído e transferência para membrana de nylon (segundo Thomas, 1980, descrito em Sambrook et al, 1989, com modificações)

Alíquotas de 1 a 5 µg de mRNA (obtido no item 2.2.15.) foram tratadas, por 10 minutos a 65 °C, em solução 18% formaldeído, 50% formamida e 1X tampão MOPS, contendo brometo de etídeo; e logo em seguida, foram colocadas em gelo para manter a linearização das moléculas de RNA. Após adição de tampão de amostra, o RNA foi fracionado em gel de agarose-formaldeído 1,2%, em tampão 1X MOPS, sob voltagem constante (70 Volts). Após a corrida, o gel foi observado com o auxílio de luz ultravioleta para se analisar a qualidade do RNA. O gel foi lavado 4 vezes (10 minutos cada) com água para remoção do excesso de formaldeído. O RNA fracionado foi transferido, por capilaridade, para membranas de nylon, em 10X SSC por mais ou menos 15h. Após transferência, as membranas foram lavadas em 6X SSC e assadas a 80 °C, por 2h para fixação dos RNAs.

2.2.16.2. Preparo da sonda de DNA radioativa

Para marcação da sonda radioativa, utilizou-se o kit “Ready to Go” (Pharmacia), baseado na reação de “Random Primer Extension” (Feinberg & Vogelstein, 1984), como já descrito no item 2.2.8.2.3. A sonda

correspondente ao gene *RECK* foi preparada a partir do fragmento SacI- SacI de 1,5 kb do cDNA de *RECK*, obtido por digestão do plasmídeo pSK-mRECKcDNA com a respectiva enzima de restrição. As sondas correspondentes ao oncogene *ras* e ao controle interno GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) foram preparados diretamente a partir dos plasmídeos pSR α -Ha-ras e pRGAPDH1, respectivamente. A sonda correspondente ao controle interno 36B4 (fosfoproteína ribossomal ácida humana PO) foi preparado a partir do fragmento PstI-PstI de 0,8 kb do cDNA de 36B4, obtido por digestão do plasmídeo pGEM36B4cDNA com a respectiva enzima de restrição.

2.2.16.3. Hibridização e lavagem dos filtros

As membranas foram pré-hibridizadas a 42 °C por, no mínimo, 2h e a seguir, hibridizadas a 42 °C por 24h, em 5X SSPE, 50% formamida, 5X reagente de Denhardt, 0,1%SDS, 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmão (sonicado e desnaturado) e a sonda marcada com [α^{32} P] dCTP (pelo menos 5×10^5 cpm/ml) desnaturada. Após hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes em 2X SSC e 0,1% SDS a temperatura ambiente por 10 min e 4 vezes em 0,1X SSC e 0,1% SDS a 56 °C por 30 min. As membranas foram expostas a filmes de raio-X e estes foram revelados após exposição a -70 °C; ou utilizou-se o sistema de analisador de imagens BAS2000 (Fuji, Japão) para a detecção das bandas. A quantidade de RNA em cada amostra foi controlada através da hibridização dos mesmos filtros com sonda de GAPDH ou de 36B4.

2.2.17. Ensaio de Southern blot para análise da metilação da região promotora

2.2.17.1. Preparação do DNA genômico

Placa de 150 mm de diâmetro contendo uma cultura confluenta de células foi lavada duas vezes com PBSA. As células foram raspadas da placa utilizando, inicialmente, 5 ml de PBSA e, depois mais 2 ml de PBSA para lavar bem a superfície da placa. A suspensão de células foi transferida para um tubo e centrifugada a 236xg por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante. Na parede do tubo contendo o sedimento de células adicionou-se 25 µl de 20 mg/ml de proteinase K e 50 µl de 10 mg/ml de RNase A. A este tubo adicionou-se 5 ml de TE 10:10 (10 mM TrisCl pH 8,0 e 10 mM EDTA) tomando o cuidado de lavar a parede do tubo (contendo as enzimas) e suspendendo as células rapidamente com a ajuda da pipeta. Imediatamente adicionou-se 250 µl de SDS 10%, inverteu-se o tubo várias vezes e incubou-se a 37 °C durante a noite. Adicionou-se 5 ml de fenol e inverteu-se o tubo várias vezes. Centrifugou-se a 1.500xg por 10 minutos e transferiu-se o sobrenadante para um tubo, onde se adicionou 5 ml de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e inverteu-se o tubo mais inúmeras vezes. Centrifugou-se a 1.500xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo, onde se adicionou 10 ml de etanol para precipitar o DNA. Centrifugou-se a 1.500xg por 5 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, secado a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos e dissolvido em 300 µl de TE. Quantificou-se o DNA por espectrofotometria utilizando o valor de 1 OD_{260nm}=50µg/ml.

2.2.17.2. Preparação da membrana

Alíquotas (10µg) de DNA foram digeridas com NheI e BglII (NB); NheI, BglII e HapII (NBH); ou apenas HapII (H). Estas digestões foram

precipitadas (NaAc 0,3 M/ 80% etanol) e o sedimento de DNA foi dissolvido em 20 µl de TE. Adicionou-se o tampão de amostra, aqueceu-se a 65 °C por 10 minutos e submeteu-se as amostras à eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o tampão TAE 1X. Após o fracionamento do DNA genômico, o gel foi fotografado com auxílio de luz ultravioleta, tomando o cuidado de se ter uma régua apropriada ao lado do padrão de peso molecular. O gel foi submetido ao tratamento com HCl 0,25N, duas vezes por 5 minutos. Lavou-se o gel com água e tratou-se com 0,4N de NaOH, duas vezes por 5 minutos. O DNA genômico foi transferido para uma membrana por capilaridade utilizando 0,4N de NaOH. Após a transferência lavou-se a membrana rigorosamente com 5X SSC. O DNA foi fixado à membrana por "cross linking" com luz ultravioleta.

2.2.17.3. Preparação da sonda radioativa

Utilizou-se como sonda o fragmento o fragmento PstI- BglII de 0,64 kb do promotor de RECK de camundongo, mostrada na figura 16. Este fragmento foi obtido através da digestão do plasmídeo pSKRM4, contendo o promotor de mRECK, digerindo, primeiro, com BglII e HindIII, purificando o fragmento de 8,0 kb (item 2.2.6.), e depois digerindo este fragmento de 8,0 kb com PstI. O fragmento de 0,64 kb, assim gerado, foi purificado de acordo com o item 2.2.6. e marcado radioativamente como descrito no item 2.2.8.2.3.

2.2.17.4. Hibridização e lavagem dos filtros

A pré-hibridização foi realizada com 1% SDS, 1M NaCl e 10% Dextran Sulfato, a 65 °C por no mínimo 1h. Para a hibridização utilizou-se a mesma

solução da pré-hibridização, acrescentando a sonda radioativamente marcada (pelo menos 5×10^5 cpm/ml). Hibridizou-se a 65 °C por 20h. A membrana foi lavada com uma solução 2X SSC, 1% SDS a 65 °C, duas vezes por 15 minutos, monitorando a lavagem com um detector de radiação (Geiger). Em seguida, foi lavada com uma solução 0,2X SSC; 0,1% SDS a 65 °C, duas vezes por 15 minutos. Após estas lavagens, a membrana foi exposta a filmes de raio-X e estes foram revelados após exposição a -70 °C.

2.2.18. Transfecção estável de células de mamíferos com DNA plasmideal

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de Petri com 60 mm de diâmetro e mantidas em meio DMEM contendo 5-10% SFB, durante a noite, a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂/95% ar de forma a atingirem aproximadamente 50-80% da confluência na hora da transfecção. Utilizou-se o kit LipofectAMINE PLUS Reagent (Gibco-BRL). Os DNAs plasmideais de interesse foram misturados ao reagente PLUS e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente para a formação do pré-complexo. Depois adicionou-se o reagente LipofectAMINE, misturou-se e incubou-se a temperatura ambiente por mais 15 minutos. Após lavagem das culturas com PBSA e meio DMEM sem soro, manteve-se as culturas com o meio DMEM sem soro e adicionou-se a mistura DNA-PLUS-LipofectAMINE. Incubou-se a 37 °C em atmosfera de 5%CO₂ /95% ar por 3h. Adicionou-se então SFB às culturas de forma a atingirem a concentração final de 5 a 10%, dependendo da linhagem celular. Após 48h, as culturas foram divididas e mantidas em meio seletivo, contendo 1mg/ml do antibiótico G418. Após 7 a 10 dias no meio seletivo, as colônias foram isoladas pelo método de clonagem em anéis, como descrito a seguir. As placas contendo as colônias resistentes a G418 foram lavadas uma vez com

PBSA. Após a remoção do PBSA, anéis de clonagem foram colocados em volta das colônias de forma a separá-las do resto da placa. Uma solução de tripsina foi adicionada sobre a colônia circundada pelo anel e as células foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As células correspondentes a cada colônia foram transferidas para um poço de uma placa de 48 poços e mantidas em meio seletivo. Os clones resistentes foram expandidos para experimentos posteriores.

2.2.19. Curvas de crescimento

5×10^4 células de cada linhagem celular foram plaqueadas em placas de Petri de 35 mm e as culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5%CO₂/95% ar. O meio de cultura, DMEM-5% SFB, foi renovado a cada três dias. Cada dia, duplicatas de cultura de cada linhagem celular foram coletadas através de tripsinização e fixadas em solução 3,7% formaldeído-PBSA. A contagem das suspensões de células foi realizada com o auxílio de um contador eletrônico modelo CC530 (CELM- Companhia de Equipadora de Laboratórios Modernos).

2.2.20. Crescimento em suspensão de agarose

Foram utilizadas soluções de agarose (1,2% e 0,6%), 2X DMEM e SFB. A agarose foi derretida e mantida em banho Maria, a 45 °C. Foram misturados 2X DMEM, o soro e a agarose 1,2% de modo a se obter a chamada agarose dura (0,6% agarose em DMEM-10% SFB). Esta solução foi distribuída em bandejas de 24 poços (0,5 ml/ poço). A agarose semi-sólida (0,3% agarose em DMEM-10% SFB), foi mantida no banho Maria a 45 °C. Uma suspensão de

células foi preparada de modo a se obter células bem isoladas para garantir que cada colônia se origine a partir de uma única célula. Fez-se diluições seriadas desta suspensão de células e se distribuiu (em duplicatas) nos poços contendo a agarose dura. Rapidamente colocou-se a agarose semi-sólida por cima das células. Depois de completa a gelificação, a bandeja foi incubada em câmara úmida, 5% CO₂ a 37 °C. No dia seguinte adicionou-se 0,5 ml de meio de cultura líquido em cada poço. O meio de cultura líquido foi renovado a cada 3 dias, e ao final de duas semanas, as colônias foram analisadas com o auxílio de um microscópio Nikon Diaphot invertido e com contraste de fase. Quantificou-se o crescimento pela contagem do número de colônias desenvolvidas em relação ao número de células plaqueadas (eficiência de plaqueamento em suspensão).

2.2.21. Eficiência de plaqueamento em substrato sólido

Suspensões de células foram plaqueadas (em duplicatas) em baixa densidade em placas com 35 mm de diâmetro (2×10^2 - 10^3 céls/P35). A cultura foi mantida em DMEM contendo 5% SFB, incubada em câmara úmida, 5% CO₂ a 37 °C. O meio foi renovado periodicamente até o aparecimento de colônias macroscópicas (em geral 7-15 dias). Removeu-se o meio, adicionou-se 3,7% formaldeído por 5 minutos para fixar as células e corou-se as colônias com violeta de cristal. Contou-se as colônias e determinou-se a eficiência de plaqueamento (EP) em porcentagem das células que conseguiram formar colônias macroscópicas.

3. RESULTADOS

3.1. Clonagem e caracterização da região promotora do gene *mRECK*

3.1.1. Clonagem do promotor do gene *mRECK* e mapeamento da extremidade 5' do mRNA

Para analisar a estrutura do promotor do gene *RECK* de camundongo (*mRECK*), uma biblioteca de DNA genômico de camundongo foi rastreada, utilizando como sonda um fragmento de 0,4 kb obtido a partir da porção 5' do cDNA correspondente ao gene *mRECK* (contendo a região 5'UTR incompleta, com apenas 6 bases “uspsstream” ao códon ATG de iniciação traducional) como descrito no item 2.2.8. O rastreamento de 2×10^6 clones genômicos resultou em 6 clones positivos, cujos DNAs foram purificados e analisados por restrição enzimática. Esta análise demonstrou que dentre estes seis clones, quatro eram diferentes entre si, tendo sido denominados de MR1, MR2, MR3 e MR4. Os insertos destes clones (de 16 kb a 19 kb) foram excisados do vetor Lambda FixII com Not I e subclonados no vetor pBluescript SK(+) (Stratagene), gerando os plasmídeos pSKMR1, pSKMR2, pSKMR3 e pSKMR4, respectivamente. Reações de sequenciamento utilizando primers “anti-sense” (FMATGcompAS, ATG44AS) correspondentes à região do início da tradução do *mRECK*, foram realizadas com estes plasmídeos, com o objetivo de se verificar a presença dos respectivos sítios de pareamento. Sequências foram obtidas apenas com os plasmídeos pSKMR3 e pSKMR4, demonstrando a presença da sequência correspondente à região do início de tradução de *mRECK* somente nos clones genômicos MR3 e MR4. A partir das sequências obtidas outros “primers” (ATG247AS, ATG353AS, AS220PR2 e

AS316PR2) foram desenhados subsequentemente para se obter as sequências "upstream" ao códon ATG de iniciação traducional nos clones genômicos. Paralelamente obteve-se mapas de restrição dos insertos genômicos e se localizou nestes clones a posição da região do primeiro códon ATG da proteína mRECK através de hibridização por Southern blot, utilizando como sonda a porção 5' do cDNA de *mRECK* contendo o início da sequência codificadora. Os resultados demonstraram que os clones MR3 e MR4 eram completamente sobreponíveis na extremidade 5' e continham uma sequência de aproximadamente 4,1 kb "upstream" ao primeiro códon ATG da proteína mRECK (Figura 1). Este ATG é o primeiro códon de início de tradução presente na sequência deste "open reading frame", que se inicia 150 bases "upstream" ao códon ATG na sequência genômica (TGA localizado na posição -40 da figura 2B) e corresponde à sequência consenso para o início da tradução (Kozak, 1991). Comparação estrutural com o cDNA de *RECK* humano (*hRECK*) e a proteína correspondente, que estão melhor caracterizados (Takahashi et al 1998), também demonstram a autenticidade deste ATG como o códon de iniciação do gene *RECK* de camundongo. Para obter toda a sequência de 4,1 kb "upstream" ao primeiro ATG, fragmentos de DNA gerados por digestão do plasmídeo pSKMR3 ou pSKRM4 com enzimas de restrição apropriadas, foram subclonados em vetor pBluescript SK (+) e sequenciados, utilizando os "primers" T3 e T7 que flanqueiam o sítio de clonagem no vetor, e outros "primers" desenhados a partir das sequências obtidas (PX229S, PX382S, PX231AS, PX64AS, T7302S, T7438S, PX272S2, PX383S2, PX243AS2, PX347AS2, T7218S2, T7323S2, PX287AS3, PX313AS3, T7211S3 e T7277S3).

Figura 1: Esquema das sobreposições dos clones genômicos. Os clones foram obtidos após rastreamento da biblioteca de DNA genômico de camundongo utilizando como sonda um fragmento de 0,4kb obtido a partir da porção 5' do cDNA de *mRECK*. A barra de 5 kb indica a escala do tamanho dos clones. MR1 e MR2 contêm o segundo exon de 59 pb. MR3 e MR4 contêm o primeiro exon de 207 pb e uma sequência de 4110 pb "upstream" ao gene de *mRECK*. Esta sequência de 4110 pb mais o primeiro exon e uma porção do primeiro intron estão mostrados em maior escala. A numeração está de acordo com o início de transcrição (+1), como mostrado na figura 2B. Alguns sítios de restrição estão indicados: Sp=SpeI; P=PstI; N=NheI; S=SacI; Nc=NcoI; X=XhoI; E=EcoRI; Sm=SmaI; A= ApaI.

Figura 2A: Determinação do início da transcrição do gene *mRECK* por “primer extension”. O ensaio de “primer extension” foi realizado utilizando RNA poli A⁺ de células NIH-3T3 e um “primer” marcado com ³²P complementar à extremidade 5’ da sequência codificadora do cDNA de *mRECK* (correspondente às posições +108 a +127 na figura 2B). O produto predominante da reação, detectado em duas reações independentes, é de aproximadamente 127 pb (canais 1 e 2). A reação controle produziu uma banda predominante de tamanho esperado (87 pb; canal 3). DNA de ϕ X174 digerido com HinfI, marcado radioativamente, foi utilizado como marcador de peso molecular (canal 4); bp: “base pair”.

```

-600   TGAATTCGCT TTGATTCCTA GGTCTCTGG AACATTCTCC GGAGTAGCTG
        CTCAAAGATT CATCTCCAAA TCCTCTCGAA ACCAATTCTG AATTTCAAGG
        CTCTCTAAGT CTAGTCATAC AGGCTGCCCT GACCCTTTCT CTGAGTGCAA
        TAGGTATTAA CAGCGAAGCC AGCCTGTGAA TCCGTGCCCT CAGCAGAGCC
-400   CTTTGGCTTT GAGGGGAGGC CAGGTAACAC GCCTTCTTTA GGTCGAGGCA
        GCCTTGGACA GGATAGTAAG AGTGTTCTGG AGGATTCAAC TAGGGGGCAC
        GCCCTACAGT TCAGCTTGAC TTAGCCCTGC AAATCAGACG GACCTGCAGA
        GTGATCTCGG CAGGCCAGTC GCCCCTGAGC TCGGGGCTCC CACCCCTAT
-200   GTGCCCCACA CGGGACAGAG GCATTCCACA GGGGTCTCCA GCCTCTGACT
        TCCCGTTTGA AGACCGCAGC CCGGGAGCCC GAGTCCGAAG GCGACACACA

-100   GCTGGCCCAT AACAAAGAGC CAGGGTCCAG GGCGCGCTGC CGCCCCCGG
                                         SmaI /

        GAGGTTTTGA AACTCTGAG CGGCCGGGGC GGGGCTTCAG CGAGCCGCAG
        cEBPb          Sp1(A)          CAAT

+1     CCAATCACCA GAGAGCCAAG GCGCCGGGGG CGGGGCCTGG TGCCAGGGGT
        SP1(B)

        TGCTACGGCC AGGCTGGGTC CGAGCATCCC GCGGCTTCGG ACCCACCCGG
                                         SacII /

+101   CCCGGAC ATG GCG AGC GTC CGG GCC TCC CCG CGC AGC GCG CTG
        M   A   S   V   R   A   S   P   R   S   A   L

        CTA CTT CTG CTG GCC GCG GCG GGG GTC GCG GAG GTG ACG GGG
        L   L   L   L   A   A   A   G   V   A   E   V   T   G

+186   GGC CTG GCC CCG GGC AGC GCG G GTGAGTAGCC GCGGGAGCCA CGA
        G   L   A   P   G   S   A   ↑

+281   TCGGGGCGGT CCTGAGGAGT GCCTCAGCGC TCCAAGATGG CGCGGAGCCG
        GGGGCGGGGT GCGCGTGCCC CCAGACCCGC GGGCGGCGGT CAGGAACGCC

```

Figura 2B: Sequência nucleotídica de 600 pb da região 5' flanqueadora e o exon-1 do gene de *RECK* de camundongo (a sequência inteira clonada de 4110 pb está disponível no GenBank; número de acesso:AB006959). As extremidades do exon-1 estão definidas pelo sítio de início de transcrição (+1) e a extremidade 3' da sequência similar ao cDNA seguida pela sequência consenso do sítio doador de "splicing" GT (indicada pela flecha). A sequência de aminoácidos codificada pelo exon-1 está mostrada abaixo da sequência nucleotídica correspondente. Sítios putativos de ligação a fatores de transcrição estão sublinhados. Os dois sítios de restrição, SmaI e SacII, que foram utilizados para definir a região do promotor mínimo (-52 a +80) também estão indicados.

Diversas evidências demonstram a ausência de exons adicionais “upstream” ao exon contendo o códon de iniciação: a) o tamanho do mRNA de *mRECK* é de aproximadamente 4,4 kb, estimado por ensaios de Northern blot utilizando padrão de peso molecular, enquanto o cDNA de *mRECK*, a partir de 6 bases “upstream” ao primeiro ATG até o início do sítio de poliadenilação, possui 4094 bases. Considerando que o mRNA de *mRECK* possui cauda de poli(A) de tamanho normal (entre 100 a 250 bases), a região 5'UTR deve possuir entre 50 a 200 bases; b) sítio consenso aceptor de “splicing” (Ohshima & Gotoh, 1987; Reed, 1989; Smith et al, 1993) não foi encontrado em toda sequência de 4,1 kb “upstream” ao primeiro ATG; c) a região, compreendendo a sequência entre os nucleotídeos -200 a +330 da figura 2B, possui um conteúdo alto de GC (73%), que é uma característica de várias regiões promotoras; d) experimentos de “primer extension” utilizando mRNA de células NIH-3T3 e um “primer” complementar ao início da sequência codificadora do mRNA de *mRECK* (posições +108 a +127), indicaram que o sítio de início de transcrição está localizado aproximadamente 100 bases “upstream” ao primeiro códon ATG, na região do CAAT box (Figura 2A e 2B). Portanto, concluiu-se que a sequência de 4,1 kb contém a região 5' flanqueadora do gene de *mRECK*. Esta sequência está depositada no GenBank com o número de acesso AB006959. Também se obteve uma porção da sequência genômica “downstream” à região do primeiro códon ATG, utilizando “primers” (S1223PR e SFMATG) desenhados a partir desta região. Comparando-se a sequência do DNA genômico com o cDNA correspondente concluiu-se que o primeiro exon, presente nos clones MR3 e MR4, contém 207 pb. O segundo exon de 59 pb está presente nos clones MR1 e MR2 (figura 1).

Sítios putativos de ligação a fatores de transcrição foram encontrados na região 5' flanqueadora (4,1 kb) do gene de *mRECK*, utilizando os programas

TFSEARCH e MatInspector (Quandt et al, 1995; Wingender et al, 1997). A sequência nucleotídica de 4,1 kb da região 5' flanqueadora do gene de *mRECK*, do exon 1 (contendo 107 pb da região 5' UTR e 100 pb da sequência codificadora) e de uma parte do primeiro intron, está mostrada na figura 2B. A numeração é relativa ao início de transcrição (designado como +1). Este promotor possui um CAAT box no sítio de início da transcrição, mas não possui TATA box. Próximo ao sítio de início da transcrição foram identificados dois sítios putativos de ligação ao fator de transcrição Sp1, designado como Sp1A e Sp1B e um sítio putativo de ligação ao fator de transcrição cEBPb (Figura 2B).

3.1.2. Atividade promotora da região 5' flanqueadora do gene de *mRECK*

Para identificar elementos cis regulatórios responsáveis pela expressão do gene *mRECK*, construiu-se uma série de plasmídeos contendo a sequência 5' flanqueadora (4,1 kb) deste gene, ou os seus subfragmentos gerados por deleção, inseridos em um sítio "upstream" ao gene repórter luciferase (designados como pGL3-n, na qual n representa o tamanho da sequência 5' flanqueadora inserida). Estas construções estão esquematizadas na figura 3. Cada uma destas construções plasmídeais foi transfectada em células de camundongo NIH-3T3 e células de rato CREF, e os extratos celulares foram analisados quanto à atividade de luciferase. Para controlar a diferença da eficiência de transfecção entre as amostras, todos os resultados foram normalizados em relação ao plasmídeo de referência (pRL-TK) co-transfectado. Os resultados estão mostrados na figura 3.

Figura 3: Atividade promotora da região 5' flanqueadora do gene *mRECK* em células NIH-3T3 e CREF. Construções do gene repórter luciferase contendo várias porções da região 5'flanqueadora do gene *mRECK*, mostrados à esquerda da figura, foram transitoriamente transfectados em células NIH-3T3 e CREF, e os lisados celulares foram submetidos ao ensaio de luciferase. A atividade de luciferase ("luciferase assay"), normalizada contra a atividade de Renilla luciferase codificada pelo vetor de referência pRL-TK co-transfectado, está expressa como uma porcentagem da atividade obtida com a construção pGL3-4110. As barras de erro representam a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

As progressivas deleções a partir da extremidade 5' da região promotora possuem efeitos opostos nas duas linhagens celulares. Nas células de camundongo NIH-3T3, a atividade de luciferase obtida com o plasmídeo pGL3-52 é aproximadamente 50% maior em relação às obtidas com os plasmídeos pGL3-817, pGL3-1679 e pGL3-4110. Este resultado sugere a presença de elementos cis com atividade transcricional inibitória na sequência entre a região -52 a -4110. Por outro lado, em células de rato CREF, a atividade de luciferase obtida com o plasmídeo pGL3-4110 foi levemente maior do que as obtidas com as construções menores. Em ambas as células, a menor sequência gerada por deleção, compreendendo a região -52 a +80, foi suficiente para promover a expressão do gene repórter em níveis relativamente altos. Portanto, este fragmento será referido como 'promotor mínimo' nas descrições que se seguem.

3.1.3. Análise da ligação de fatores de transcrição ao promotor mínimo de *mRECK*

A região do promotor mínimo do gene de *mRECK* possui os seguintes sítios putativos de ligação a fatores de transcrição: sítio de ligação a cEBPb, dois sítios de ligação a Sp1 (sítios Sp1A e Sp1B) e um CAAT box (Figura 2B). Oligonucleotídeos dupla fita, contendo estes elementos putativos de ligação a fatores de transcrição, mais nucleotídeos flanqueadores destes elementos, foram marcados radioativamente e utilizados como sondas para analisar a ligação de proteínas nucleares extraídas de células NIH-3T3 por EMSA. Como mostrado na figura 4 (à esquerda), utilizando oligos de Sp1A e Sp1B como sondas, detectou-se quatro complexos de DNA-proteína com mobilidades eletroforéticas diferentes (Figura 4, bandas a-d).

Figura 4: EMSAs de extrato nuclear de células NIH-3T3 utilizando sondas (“probes”) correspondentes a oligonucleotídeos contendo sítios putativos de ligação a fatores de transcrição do promotor mínimo de *mRECK*. EMSAs foram realizados utilizando como sondas os oligos Sp1A, Sp1B, cEBPb e CAAT. Os competidores (“competitors”) são os próprios oligonucleotídeos correspondentes não marcados radioativamente. As concentrações dos competidores e do oligo de NF-kB estão indicadas como excesso molar (100 ou 300) em relação à concentração das sondas. As posições dos complexos a, b, c e d formados com os oligos Sp1A e Sp1B estão indicadas.

A formação das três bandas superiores (a, b e c) foi inibida pela adição de sonda competidora fria de forma dose-dependente, sugerindo que estas bandas representam complexos específicos de DNA-proteína, enquanto a banda inferior (d), de maior mobilidade, corresponde a um complexo não específico. Utilizando oligos de cEBPb e CAAT box como sondas, também pudemos detectar a formação de complexos específicos de DNA-proteína, porém estas bandas foram muito mais fracas do que as detectadas com as sondas correspondentes aos oligos Sp1. A especificidade dos complexos de DNA-proteína foram confirmados através da demonstração de que a formação destes complexos não foi afetada pela adição de um oligonucleotídeo correspondente à sequência consenso de ligação ao fator de transcrição NF-kB, ou seja, uma sonda fria não competidora (Figura 4, à direita).

3.1.4. Identificação dos fatores de transcrição que se ligam aos sítios Sp1A e Sp1B do promotor mínimo de *mRECK*

Para identificar as proteínas que se ligam aos sítios Sp1A e Sp1B utilizou-se ensaios de "super-shift" (figura 5). Ao extrato nuclear de células NIH-3T3 incubado com a sonda de Sp1A ou Sp1B, adicionou-se antisoros específicos. Utilizando antisoro policlonal contra o fator de transcrição Sp1, a banda superior (a) desapareceu, dando origem a duas bandas de menor mobilidade eletroforética, mas as bandas (b) e (c) não se deslocaram. Portanto, identificamos o fator de transcrição Sp1 como o componente da banda (a), mas não das bandas (b) e (c). Sabendo que a família do fator de transcrição Sp1 inclui três membros adicionais que compartilham com Sp1 a mesma especificidade de ligação ao DNA (Hagen et al, 1992; Kingsley & Winoto, 1992), os resultados sugeriram que outros membros da família Sp1 seriam os

componentes das bandas (b) e (c). Entre estes membros, está o fator de transcrição Sp3, que possui a mesma distribuição tecidual de Sp1 (Kingsley & Winoto, 1992) e forma complexo de DNA-proteína com mobilidade eletroforética maior do que o complexo de Sp1 (Majelo et al, 1994). Para testar se Sp3 era o componente das outras duas bandas, utilizou-se antisoro policlonal contra Sp3 em ensaios de "super shift" e verificou-se que essas duas bandas (b e c) desapareceram completamente dando origem a uma banda difusa de menor mobilidade eletroforética. Quando ambos os anticorpos, contra Sp1 e Sp3, foram adicionados ao extrato nuclear de NIH-3T3, as três bandas específicas (a, b e c) foram deslocadas, resultando nas bandas de menor mobilidade eletroforética observadas anteriormente. Estes resultados demonstraram que ambos os sítios, Sp1A e Sp1B, do promotor mínimo podem se ligar a dois membros distintos da família Sp de fatores de transcrição, e que o complexo Sp1- DNA forma a banda (a) de menor migração eletroforética, e o complexo Sp3- DNA forma duas bandas (b e c) de maior mobilidade eletroforética. Para reforçar esta conclusão, a ligação da proteína recombinante humana Sp1 às sondas de Sp1 foi analisada por EMSA e se demonstrou que o complexo formado possui uma migração eletroforética similar à banda (a), formada com o extrato nuclear. Estes resultados são consistentes com os ensaios de Western blot, utilizando extrato nuclear de NIH-3T3 (figura 6), na qual o antisoro contra Sp1 detectou uma única e forte banda, que provavelmente representa as duas isoformas da proteína Sp1 (105 e 95 kDa) e o antisoro contra Sp3 detectou as múltiplas isoformas de Sp3 (97, 60 e 58 kDa). A figura 6 também compara a expressão das proteínas Sp1 e Sp3 em células NIH-3T3 que não super-expressam e super-expressam Ha-Ras (V12). Este resultado será discutido no item 3.2.4.

Figura 6: Ensaio de Western blot para a análise da expressão das proteínas Sp1 e Sp3 em células NIH-3T3 que não super-expressam e super-expressam *Ha-ras* (V12). Membrana contendo 3 μ g do extrato nuclear de células NIH-3T3 estavelmente transfectadas com o vetor vazio pCXN2neo (canais 2 e 6) ou com o vetor pCXN2-*Ha-ras* (V12) (canais 3 e 7), células NIH-3T3 contendo o gene *Ha-ras* (V12) regulável tratadas com doxiciclina por 96h (*ras* “off”; canais 4 e 8) ou não tratadas (*ras* “on”; canais 5 e 9), foi incubada com antisoro policlonal anti-Sp1 (canais 1 a 5) e anti Sp-3 (canais 6 a 9). Ao canal 1 aplicou-se proteína Sp1 recombinante. À esquerda está indicado o padrão de peso molecular (PM).

3.1.5. Efeitos da mutação nos sítios Sp1A e/ou Sp1B sobre a atividade do promotor mínimo de *mRECK*

Para analisar o papel dos sítios Sp1A e Sp1B, presentes no promotor mínimo, na regulação da expressão do gene *mRECK*, introduziu-se mutações no sítio Sp1A e/ou Sp1B do plasmídeo repórter pGL3-52. Primeiro, certificou-se, por EMSA, que, quando estas mesmas mutações foram introduzidas nos oligonucleotídeos Sp1A e Sp1B, a ligação das proteínas Sp1 e Sp3 (presentes no extrato nuclear de NIH-3T3) às sondas de Sp1A e Sp1B mutadas foram interrompidas (figura 7). Os plasmídeos pGL3-52 selvagem e mutado no sítio Sp1A e/ou Sp1B foram transfectados separadamente em células NIH-3T3 e CREF. O plasmídeo de referência para controle da eficiência de transfecção pRL-TK foi co-transfectado nestas linhagens e os lisados celulares foram analisados quanto à atividade de luciferase (figura 8). Mutações em ambos os sítios (Sp1A e Sp1B) no plasmídeo repórter pGL3-52 reduziram significativamente (para 20%) a atividade de luciferase nas células NIH-3T3 e CREF, quando comparada com a atividade do lisado nuclear obtido com o pGL3-52 selvagem. Quando somente o sítio Sp1A foi mutado no plasmídeo pGL3-52, a atividade de luciferase praticamente não se alterou. Porém, quando somente o sítio Sp1B foi mutado no plasmídeo pGL3-52, a atividade do promotor aumentou duas vezes nas células NIH-3T3, enquanto nenhum efeito significativo foi observado nas células CREF. Estes resultados indicam que pelo menos um dos sítios Sp1 deve estar intacto para o promotor mínimo exercer a sua atividade nestas células, demonstrando a importância dos sítios Sp1A e Sp1B para atividade do promotor mínimo de *mRECK*.

Figura 7: Análise do efeito das mutações nos sítios de ligação aos fatores de transcrição Sp1/Sp3 do promotor de *mRECK* por EMSA. EMSA com extrato nuclear de células NIH-3T3 foi realizado utilizando como sondas (“probes”) os oligos Sp1A e Sp1B selvagens (wt) e os oligos Sp1A e Sp1B mutados (mt). As posições dos complexos de Sp1 e Sp3 estão indicadas.

Figura 8: Efeitos das mutações dos sítios Sp1 na atividade do promotor mínimo de *mRECK*. Plasmídeos pGL3-52 mutados nos sítios Sp1A e/ou Sp1B (“mutants”) foram transfectados nas células NIH3T3 e CREF e os lisados celulares foram submetidos ao ensaio de luciferase. A atividade de luciferase (“luciferase activity”) normalizada está apresentada como porcentagem do valor obtido com o plasmídeo pGL3-52 selvagem (wt). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

O resultado obtido com a mutação no sítio Sp1B no plasmídeo pGL3-52 sugere um efeito inibitório do sítio Sp1B sobre a atividade transcricional do promotor de *mRECK*, quando os dois sítios estão intactos. É interessante notar que, em células de fibroblasto de rato CREF não se observou o efeito inibitório do sítio Sp1B sobre a atividade do promotor mínimo de *mRECK*, sugerindo que as células de camundongo NIH-3T3 e células de rato CREF não utilizam exatamente a mesma maquinaria transcricional para a expressão do gene *RECK*. O sítio Sp1B poderia ser considerado um sítio bifuncional em células NIH-3T3, agindo tanto como ativador transcricional quanto como um regulador negativo da transcrição do gene *mRECK*.

Quando o plasmídeo pGL3-4110 foi mutado no sítio Sp1A ou sítio Sp1B observou-se o mesmo efeito obtido com as mutações no plasmídeo pGL3-52, ou seja, a presença do sítio Sp1A ou Sp1B também é suficiente para a atividade do promotor de 4110 pb. Além disso, o sítio Sp1B também revelou atividade bifuncional no contexto do promotor maior. Porém, a mutação em ambos os sítios no plasmídeo pGL3-4110 seria necessária para definir a importância destes sítios para a atividade do promotor de 4110 pb do gene *mRECK*.

O sítio putativo de ligação ao fator de transcrição cEBP β também foi mutado no plasmídeo repórter pGL3-52, porém os ensaios de luciferase demonstraram que a mutação neste sítio não altera de forma significativa a atividade do promotor mínimo.

3.2. Regulação da expressão do gene *mRECK* pelo produto do oncogene *Ha-ras* (V12)

3.2.1. Regulação dos níveis de transcrito de *mRECK* pelo produto do oncogene *Ha-ras* (V12)

Realizou-se ensaios de Northern blot utilizando mRNA de células não transformadas (NIH-3T3, NIH/ptet-*Ha-ras* e CREF/ptet-*Ha-ras* tratadas com doxiciclina por 96h; *ras* “off”) e transformadas com *Ha-Ras* (NIH-3T3 estavelmente transfectada com o plasmídeo pCXN2-*Ha-ras*, NIH/ptet-*Ha-ras* e CREF/ptet-*Ha-ras* não tratadas com doxiciclina; *ras* “on”). Após fracionamento das amostras de RNA mensageiro e transferência para a membrana, esta foi hibridizada com sondas radioativas correspondentes aos genes *RECK*, *Ha-ras* e o controle interno *GAPDH*. Após análise densitométrica das bandas, verificou-se que os níveis de transcrito de *RECK* diminuem 6 vezes quando células de fibroblastos de camundongo NIH-3T3 expressam constitutivamente o oncogene *Ha-ras* ativado (figura 9, canais 1 e 2). Além disso, em linhagens celulares com a expressão de *Ha-ras* regulável, NIH/ptet-*Ha-ras* e CREF/ptet-*Ha-ras*, os níveis do transcrito de *RECK* diminuíram 2 e 6 vezes quando a expressão de *Ha-ras* foi desreprimida pela remoção de doxiciclina do meio de cultura (sistema de expressão “tetraciclina off”), respectivamente (figura 9, canais 3 a 6). Portanto, os resultados com estes três sistemas celulares demonstraram que os níveis de transcrito de *RECK* diminuem quando o oncogene *Ha-ras* está super- expresso.

Figura 9: Análise da inibição da expressão do gene *mRECK* pelo produto do oncogene *Ha-ras* (V12) por ensaio de Northern blot. Ensaio realizado utilizando RNA poli A⁺ de células NIH-3T3 estavelmente transfectadas com o vetor de expressão vazio pCXN2neo (canal 1) ou com o vetor contendo *Ha-ras* (V12) (canal 2), células NIH-3T3 contendo o gene *Ha-ras* (V12) regulável após tratamento com doxiciclina (dox) por 96h (“*ras* off”; canal 3) ou não tratadas (“*ras* on”; canal 4) e células CREF contendo o gene *Ha-ras* (V12) regulável tratadas com dox por 96h (canal 5) ou não tratadas (canal 6). A mesma membrana foi sequencialmente hibridizada com sondas correspondentes ao gene *mRECK*, *Ha-ras* e *GAPDH*.

3.2.2. Regulação da atividade do promotor de *mRECK* pelo produto do oncogene *Ha-ras* (V12)

Para verificar se a inibição da expressão do gene *RECK* em resposta à super-expressão de *Ha-ras* (V12) seria atribuído a elementos cis regulatórios presentes no promotor de 4,1 kb do gene *mRECK*, as construções do gene repórter luciferase (pGL3-n) (figura 3) foram co-transfectadas com o vetor de expressão vazio (pSR α) ou o vetor de expressão contendo o gene *Ha-ras* (V12) (pSR α -*Ha-ras*) em células NIH-3T3 e CREF, medindo-se a atividade de luciferase dos lisados celulares (figura 10). O plasmídeo de referência pRL-TK foi co-transfectado para normalizar a eficiência de transfecção. A atividade transcricional (correspondente à atividade de luciferase) de todos os fragmentos da região promotora de *mRECK* foi reprimida quando o oncogene *Ha-ras* foi co-transfectado, tanto em células NIH-3T3 quanto em células CREF. A atividade transcricional das construções repórter pGL3-52 e pGL3-4110 foi inibida em células NIH-3T3 pela co-transfecção com o vetor de expressão de *Ha-ras* (V12) de forma dose-dependente (figura 11), ou seja, quanto maior a quantidade do vetor de expressão de *Ha-ras* co-transfectado, maior a inibição do promotor do gene *mRECK*. Além destes experimentos, transfectou-se as construções repórter pGL3-52 e pGL3-4110, juntamente com o plasmídeo de referência pRL-TK, nas células contendo o gene *ras* regulável (CREF/ptep-*Ha-ras*) não pré-incubadas e pré-incubadas por 96h com meio contendo doxiciclina (sistema de "tetraciclina off"). Os lisados celulares foram submetidos ao ensaio de luciferase, verificando-se que a atividade transcricional das construções repórter pGL3-52 e pGL3-4110 aumentou quando a expressão de *Ha-ras* foi reprimida pela adição de doxiciclina ao meio de cultura (figura 12).

Figura 10: Inibição da atividade do promotor de *mRECK* pelo produto do oncogene *Ha-ras*. Cada construção do gene repórter luciferase mostrado na figura 3, foi co-transfectado ou com o vetor vazio pSR α neo (“vector”; barras brancas) ou com o vetor contendo o gene *Ha-ras* (V12) (barras rachuradas) em células NIH-3T3 e CREF e os lisados celulares foram submetidos ao ensaio de luciferase. A atividade de luciferase (“luciferase activity”) normalizada está apresentada como porcentagem do valor obtido com a construção pGL3-4110 co-transfectada com o vetor vazio. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

Figura 11: Efeito dose-resposta da inibição da atividade promotora do gene *mRECK* pelo produto do oncogene *Ha-ras*. Os plasmídeos pGL3-52 e pGL3-4110 foram co-transfectados com quantidades variadas do vetor de expressão de *Ha-ras* (V12) em células NIH-3T3 para o ensaio de luciferase. Proporções variadas (massa/massa) de pSR α -*Ha-ras* (V12) e do vetor pSR α neo vazio (“vector”) (indicadas abaixo da figura) foram utilizadas para manter a quantidade de DNA constante. A atividade de luciferase (“luciferase activity”) normalizada está expressa como uma porcentagem da atividade obtida com pGL3-52 e pGL3-4110 quando co-transfectadas somente com o vetor de expressão vazio pSR α neo (vector). As barras de erro representam a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

Figura 12: Inibição da atividade promotora do gene *mRECK* pelo produto do oncogene *Ha-ras* (V12) utilizando o sistema de expressão de *Ha-ras* regulável por doxíciclina (dox). Plasmídeos pGL3-4110 ou pGL3-52, juntamente com o plasmídeo de referência pRL-TK, foram transitoriamente transfectados nas células CREF contendo o gene *Ha-ras* (V12) regulável, previamente incubadas ou não em meio contendo dox por 96h (doxíciclina inibe a expressão de *Ha-ras* neste sistema celular), e os lisados celulares foram submetidos ao ensaio de luciferase. As atividade de luciferase (“luciferase activity”) normalizadas e determinadas em um único experimentos estão apresentadas.

Estes resultados indicaram que a inibição da expressão do gene *RECK* mediada por *Ha-ras* ocorre ao nível transcricional e que elementos cis regulatórios presentes no promotor mínimo (pGL3-52) são, pelo menos em parte, responsáveis por esta repressão transcricional. Além disso, a figura 10 mostra que, em células NIH-3T3, o efeito de *ras* sobre a atividade do promotor de 4110 pb e 52 pb é da ordem de quatro e duas vezes, respectivamente. Comparando o efeito dose-dependente de Ras sobre o promotor mínimo de *mRECK* (-52) e o promotor de 4,1 kb (-4110) (figura 11), verifica-se que a repressão do promotor de 4,1 kb é maior do que a do promotor mínimo, sugerindo que, além de elementos cis regulatórios presentes no promotor mínimo responsivos a Ras, há outros elementos cis regulatórios localizados "upstream" ao promotor mínimo que também são responsáveis pela inibição da expressão do gene *mRECK* pelo oncogene *ras*.

3.2.3. Identificação de elementos cis regulatórios responsáveis pela repressão da atividade do promotor mínimo do gene *mRECK* mediada pelo produto do oncogene *Ha-ras*

Os sítios Sp1A e Sp1B foram identificados previamente como elementos cis regulatórios importantes para a atividade do promotor mínimo do gene *mRECK*. Para analisar o envolvimento destes sítios na inibição da expressão do gene *mRECK* pelo oncogene *Ha-ras*, o plasmídeo pGL3-52 selvagem e mutado (no sítio Sp1A e/ou Sp1B) foram co-transfectados com o vetor de expressão vazio (pSR α) ou o vetor de expressão de *Ha-ras* (V12) (pSR α -*Ha-ras*) em células NIH-3T3 e os lisados celulares foram analisados quanto à atividade de luciferase (figura 13). O plasmídeo de referência pRL-TK também foi co-transfectado para normalizar a eficiência de transfecção.

Figura 13: Análise do efeito das mutações nos sítios Sp1 na inibição da atividade do promotor mínimo do gene *mRECK* mediada pelo produto do oncogene *Ha-ras*. Plasmídeo pGL3-52 mutado no sítio Sp1A e/ou Sp1B foi co-transfectado ou com o vetor pSR α neo vazio (“vector”; barras brancas) ou o vetor contendo o gene *Ha-ras* (V12) (barras rachuradas) em células NIH-3T3. Atividade de luciferase (“luciferase activity”) normalizada está apresentada como porcentagem em relação ao valor obtido com o plasmídeo pGL3-52 selvagem (wt) co-transfectado com o vetor vazio pSR α neo. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

Observando a figura 13, verifica-se que a mutação no sítio Sp1A no plasmídeo pGL3-52 não alterou a habilidade do oncogene *Ha-ras* de suprimir a atividade do promotor mínimo. Por outro lado, a mutação no sítio Sp1B no plasmídeo pGL3-52 aboliu esta habilidade. Quando ambos os sítios foram mutados no plasmídeo pGL3-52, a atividade do promotor mínimo diminuiu para os níveis já observados anteriormente (figura 8), tanto com a co-transfecção do vetor vazio quanto com a co-transfecção do vetor de expressão de *Ha-ras*. Estes resultados demonstraram o envolvimento do sítio Sp1B na repressão do promotor de *mRECK* mediada pelo oncogene *Ha-ras* (V12). É interessante observar que o sítio Sp1B é bifuncional (item 3.1.5.), portanto é possível que este efeito de *Ha-ras* seja um resultado da exacerbação da atividade inibitória deste sítio. Os plasmídeos pGL3-4110 selvagem e mutado no sítio Sp1A ou no sítio Sp1B também foram analisados da mesma forma, verificando-se que, como no promotor mínimo, a mutação no sítio Sp1A também não alterou a habilidade do oncogene *Ha-ras* de suprimir a atividade do promotor de 4,1 kb (o efeito de *ras* foi da ordem de 4 vezes). Por outro lado, diferentemente do que aconteceu com o promotor mínimo, a mutação no sítio Sp1B não aboliu completamente esta habilidade (o efeito de *ras* foi da ordem de 2 vezes), sugerindo mais uma vez que, além do sítio Sp1B presente no promotor mínimo, há outros elementos cis regulatórios localizados "upstream" ao promotor mínimo, que também são responsáveis pela inibição da expressão do gene *mRECK* pelo oncogene *ras*.

3.2.4. Efeitos do produto do oncogene *Ha-ras* ativado sobre a ligação dos fatores de transcrição Sp1/Sp3 ao sítio Sp1B do promotor mínimo do gene *mRECK*

Com o objetivo de entender o mecanismo de ação pelo qual *Ha-ras* inibe a expressão do gene *mRECK* via o sítio Sp1(B), realizou-se o ensaio de mobilidade eletroforética retardada em gel de poliacrilamida (EMSA) utilizando extratos nucleares de células não transformadas e transformadas com *Ha-ras* (utilizadas em ensaios de Northern blot; item 3.2.1.), com sondas correspondentes ao sítio Sp1B (figura 14). Como já mostrado na figura 9, a super-expressão do oncogene *Ha-ras* e a consequente inibição da expressão do gene *mRECK* nestas linhagens celulares foi determinada em ensaios de Northern blot. Nos resultados de EMSA, mostrados na figura 14, não se verificou diferenças na formação dos complexos de Sp1 e Sp3 com a sonda de Sp1B. Resultados semelhantes foram obtidos quando se utilizou um fragmento de DNA de aproximadamente 150 pb, contendo toda região do promotor mínimo (-52 a +80), como sonda. Ensaio de Western blot também demonstraram que as quantidades das proteínas Sp1 e Sp3 não são afetadas pela super-expressão do oncogene *Ha-ras* (figura 6). Portanto, estes resultados, obtidos *in vitro*, sugerem que a inibição da expressão do gene *RECK*, mediada por *Ha-ras*, não se deve à modulação da expressão de Sp1 e Sp3 ou à alteração da atividade de ligação destes fatores de transcrição e nem de outras proteínas que bloqueariam o sítio Sp1B.

Figura 14: Análise do efeito da super-expressão de *Ha-ras* na ligação dos fatores de transcrição Sp1/Sp3 ao sítio Sp1B do promotor de *mRECK* por EMSA. EMSA foi realizado utilizando a sonda Sp1B e extratos nucleares obtidos a partir de três pares de linhagens celulares de fibroblastos não transformadas e transformadas por *Ha-ras* (V12): células NIH-3T3 estavelmente transfectadas com o vetor vazio pCXN2 (canal 1) ou com o vetor contendo o gene *Ha-ras* (V12) (canal 2), células NIH-3T3 contendo o gene *Ha-ras* (V12) regulável previamente tratadas com doxiciclina (dox) por 96h (“*ras* off”; canal 3) ou não tratadas (“*ras* on”; canal 4), e células CREF contendo o gene *Ha-ras* (V12) regulável tratadas com dox por 96h (“*ras* off”; canal 5) ou não tratadas (“*ras* on”; canal 6). As posições dos complexos de Sp1 e Sp3 estão indicadas.

3.3. Regulação da expressão do gene *RECK* pelo produto do oncogene *fos* do vírus FBR causador de osteosarcoma murino.

3.3.1. Regulação dos níveis de transcrito de *mRECK* pelo produto do oncogene *v-fos*

Com o objetivo de iniciar a análise do mecanismo inibitório da expressão do gene *RECK* por *v-fos* utilizou-se linhagens celulares geradas anteriormente no laboratório (Costanzi et al., 1990; Joazeiro, 1990). Estas linhagens que super-expressam *v-fos* e/ou *c-myc*, foram geradas a partir da transfecção de fibroblasto de camundongo Balb/c-3T3 (clone A31) com o plasmídeo pFBR-*v-fos* (Curran & Verma, 1984) e o plasmídeo MMTV-*c-myc* (Stewart et al., 1984), respectivamente. Essas transfecções resultaram na obtenção de vários clones, entre os quais, o clone B115, que expressa *v-fos* e *c-myc*, além dos clones B117 e B119, que expressam apenas *v-fos*. A figura 15 mostra resultados de Northern blot, utilizando mRNA obtido a partir destes clones celulares para a preparação do filtro, o qual foi hibridizado com sonda radioativa preparada a partir de um fragmento do cDNA de *RECK*. Como controle interno da quantidade de RNA aplicada ao gel, foi utilizada uma sonda para o gene 36B4 (fosforriboproteína ácida) cuja expressão é constitutiva. Pode-se observar que os níveis do transcrito de *RECK* são significativamente menores nos clones B115, B117 e B119, quando comparados à célula parental A31, sugerindo uma inibição da expressão do gene *RECK* pelos produtos dos oncogenes *v-fos*. A quantificação destes resultados, indicou uma inibição da expressão de *RECK* da ordem de 3 vezes. Os resultados indicam que somente a expressão de *v-fos* nos clones B117 e B119 é suficiente para inibir a expressão de *RECK*.

Figura 15: Ensaio de Northern blot para a verificação da expressão de *RECK* em fibroblastos A31 transfectados com o oncogene *v-fos*. Membrana contendo mRNAs de células A31, B115, B117 e B119 foi hibridizada com sondas radioativas correspondentes ao gene *RECK* e ao controle interno 36B4.

3.4. Análise do envolvimento do mecanismo de metilação de DNA na regulação transcricional do gene *RECK*

3.4.1 Análise do padrão de metilação da região promotora do gene *mRECK*

A hipermetilação do DNA em sítios próximos à região promotora dos genes tem sido descrita como um mecanismo de inativação transcricional (Yoshiura et al, 1995; Graff et al, 1995; Gonzalgo et al, 1998; Ohtani-Fujita et al, 1993; Schroeder & Mass, 1997). Com o objetivo de se testar o papel deste mecanismo na inativação do gene *RECK* em linhagens celulares tumorais, o padrão de metilação ao redor da região promotora foi analisado através da utilização de uma enzima de restrição sensível à metilação (HpaII). O padrão de metilação de células que expressam o gene *RECK* (NIH-3T3 e NIH-3T3 transfectada com o vetor pSR α vazio) e células que não expressam o gene *RECK* ou o expressam em baixos níveis (DT e NIH-3T3 transfectada com pSR α -Ha-ras), foi comparado através de ensaios de Southern blot (figura 17). Observa-se que nas quatro linhagens celulares testadas, a digestão das respectivas preparações de DNA genômico com as enzimas BglII (B) e NheI (N), resultou em uma banda de 2,6kb, quando a membrana contendo o DNA genômico digerido foi hibridizada com sonda radioativa preparada a partir do fragmento mostrado na figura 16. A digestão do DNA genômico com a enzima sensível à metilação HpaII (H) na presença ou na ausência das enzimas BglII (B) e NheI (N), levou ao desaparecimento da banda de 2,6kb, mesmo nas linhagens que não expressam *RECK* (DT e NIH-3T3-pSR α -Ha-ras).

Figura 16: Mapa de restrição da região promotora do gene RECK de camundongo. +1, sítio de iniciação transcricional. A sonda indicada foi utilizada nos ensaios de Southern blot.

Figura 17: Análise do padrão de metilação dos sítios de restrição da enzima HpaII, presentes na região promotora do gene de *RECK* de camundongo através de Southern blot. N, NheI; B, BglII; H, HpaII. A membrana contendo preparações de DNA genômico das células NIH-3T3, DT, NIH-3T3-pSR α e NIH-3T3-pSR α -Ha-ras digeridas com N e B ou N, B e H ou somente H foi hibridizada com a sonda mostrada na figura 16.

Este resultado sugere que o mecanismo de inibição da expressão do gene *RECK* nestas células não é a hipermetilação da região promotora, delimitada pela sonda utilizada (figura 16).

3.4.2. Análise do envolvimento do mecanismo de metilação na regulação transcricional do gene *RECK* através da utilização do agente desmetilante 5-azacitidina

Várias linhagens celulares transformadas (HeLa, HT1080, DT, B16 e C6), que não apresentam ou apresentam nível muito baixo de expressão de *RECK*, foram tratadas com 5- azacitidina (2 µg/ml em dois pulsos de 24h) e, em seguida, lisadas para a preparação de mRNA. Membranas contendo mRNA das células tratadas (ou não) com 5-azacitidina foram hibridizadas com sonda radioativa preparada a partir de um fragmento de cDNA de *RECK*. Como controle interno da quantidade de RNA aplicada ao gel, foi utilizado uma sonda para o gene GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase) cuja expressão é constitutiva. Os resultados da análise, por Northern blot, estão mostrados na figura 18. As células NIH-3T3 foram usadas como controle positivo da expressão do transcrito de *RECK*. A observação deste resultado e sua quantificação, revelaram que apenas a linhagem celular HT1080 de fibrossarcoma apresentou uma leve indução dos níveis de expressão de *RECK* neste experimento, porém, experimentos adicionais não confirmaram esse efeito. As linhagens celulares testadas não tiveram os níveis do transcrito de *RECK* aumentados significativamente, após o tratamento com o agente desmetilante, sugerindo que o mecanismo de metilação do DNA não está envolvido na regulação da expressão do gene *RECK* nestas linhagens celulares.

Figura 18: Ensaio de Northern blot para a verificação do envolvimento do mecanismo de metilação na regulação da expressão do gene *RECK*. Membrana contendo mRNA de diversas linhagens celulares não tratadas (controle) e tratadas com o agente demetilante 5-azacitidina (AZA-C) (2 $\mu\text{g/ml}$), foi hibridizada com sondas correspondentes ao gene *RECK* e ao controle interno GAPDH.

Os resultados apresentados na figura 18 mostram, também, altos níveis de expressão do gene *RECK* nas células C6 de glioma de rato. Até o momento não se havia verificado alto nível de expressão deste gene em linhagens celulares transformadas. Trabalhos em colaboração com o Hospital da Universidade de Kyoto têm sido realizados com o objetivo de analisar a expressão do gene *RECK* em tumores *in vivo*. Observações sugerem que *RECK* é expresso em alguns tumores, porém, quando o nível de expressão é maior do que aquela apresentada pelo tecido normal adjacente, os pacientes sobrevivem por mais tempo. Por outro lado, quando o nível de expressão de *RECK* nestes tumores é menor do que no tecido normal adjacente, o prognóstico é ruim (Furumoto & Arii, dados não publicados). Portanto, é possível que, embora *RECK* seja expresso em algumas linhagens celulares transformadas e em alguns tumores, sua alta expressão pode estar associada a um menor grau de malignidade.

3.5. Análise do envolvimento de RECK em diversos sistemas celulares de invasão, proliferação e reversão.

3.5.1. Análise da expressão de *RECK* na resposta ao tratamento com TNF- α ("tumor necrosis factor") em células ST1.

TNF- α (tumor necrosis factor- α) induz a expressão gênica e a secreção da metaloproteinase- 9 (MMP-9) nas células C6 de glioma de rato, uma enzima importante no processo de invasão local do tecido cerebral por células tumorais (Esteve et al, 1998). *RECK* não inibe a expressão de MMP-9, porém, o fato de *RECK* inibir a atividade e secreção de MMP-9 (Takahashi et al, 1998) nos levou a verificar a seguinte hipótese: TNF- α inibiria a expressão de

RECK, contribuindo, assim, para uma maior secreção e atividade de MMP-9. Realizou-se ensaios de Northern blot utilizando mRNA de células ST1, um clone de células C6 (cultivadas em meio contendo 5% SFB), não tratadas (controle) e tratadas com TNF- α (2,5 ng/ml) por diferentes períodos de tempo. Após fracionamento, a membrana, contendo esses mRNAs, foi hibridizada com sonda radioativa correspondente ao gene *RECK* e ao controle interno 36B4. Verificou-se que o tratamento com TNF- α não modificou o nível de transcrito de *RECK* nas células ST1 (figura 19).

3.5.2. Análise da expressão de *RECK* na resposta ao tratamento com genisteína em células ST1.

Genisteína, um inibidor de tirosina quinase, inibe as propriedades invasivas de glioblastoma humano e de células C6 de glioma de rato (Penar et al, 1997; Penar et al, 1998). Sabendo que a invasão de células C6 é dependente de metaloproteases (Paganetti et al, 1988; Tamaki et al, 1997) e que *RECK* regula a secreção e atividade desta enzima (Takahashi et al, 1998), analisamos o envolvimento de *RECK* neste mecanismo de supressão das propriedades invasivas de ST1 (um clone de células C6) mediada por genisteína. As células ST1 são variantes das células C6 e são hiper-responsivas ao tratamento com hormônios glucocorticóides, sofrendo uma reversão de fenótipo muito mais acentuada do que a linhagem parental C6, quando tratadas com o hormônio (Armelin & Armelin, 1983). Preparações de mRNA de células ST1 (cultivadas em meio contendo 5% SFB) não tratadas (controle) e tratadas com genisteína (50 μ M) por diferentes períodos de tempo foram utilizados para a obtenção de uma membrana (Northern blot) que foi hibridizada com

Figura 19: Ensaio de Northern blot para a análise da expressão de *RECK* na resposta ao tratamento com $\text{TNF-}\alpha$ em células ST1. Membrana contendo mRNAs de células ST1 não tratadas (controle) e tratadas com $\text{TNF-}\alpha$ (2,5 ng/ml) por diferentes períodos de tempo, foi hibridizada com sondas radioativas correspondentes ao gene *RECK* e ao controle interno 36B4.

Figura 20: Ensaio de Northern blot para a análise da expressão de *RECK* na resposta ao tratamento com genisteína em células ST1. Membrana contendo mRNA de células ST1 não tratadas (controle) e tratadas com genisteína (50 μ M) por diferentes períodos de tempo, foi hibridizada com sondas radioativas correspondentes ao gene *RECK* e ao controle interno 36B4.

sonda radioativa correspondente ao gene *RECK* e ao gene controle 36B4. A figura 20 mostra que o tratamento com genisteína não induz o aumento dos níveis de mRNA de RECK nas células ST1.

3.5.3. Análise da expressão de *RECK* no ciclo celular em fibroblastos A31 e células ST1.

Células da linhagem A31 de fibroblasto de camundongo 3T3 param de ciclar e entram em repouso (estado G0) ao se retirar o soro do meio de cultura. Reestimulação destas células quiescentes, com soro, promove a retomada do ciclo celular. Portanto, células A31 carenciadas para soro e reestimuladas com soro por diferentes períodos de tempo foram utilizadas para preparação de mRNA. Após fracionamento e transferência, a membrana foi hibridizada com sonda correspondente ao gene *RECK* e ao controle interno 36B4, em ensaios de Northern blot, e os resultados são mostrados na figura 21. A quantificação destes dados (figura 21) revelou que células A31 tratadas com soro apresentam níveis de expressão de *RECK* reduzidos em relação à célula em repouso (controle). Este resultado foi confirmado através de experimentos adicionais.

Células ST1 de glioma de rato carenciadas para soro e tratadas com hidrocortisona por 24 h entram completamente em repouso (estado G0). Quando estas células são re-estimuladas com soro, elas saem do estado G0 e entram no ciclo celular (Armelin & Armelin, 1983). Portanto, para analisar o envolvimento de *RECK* no controle da proliferação celular de células ST1, preparações de mRNA de células ST1 carenciadas para soro e tratadas com hidrocortisona por 24h (células controle), e depois reestimuladas com soro por diferentes períodos de tempo, foram utilizados para preparação da membrana

Figura 21: Ensaio de Northern blot para a análise da expressão de *RECK* no ciclo celular em fibroblastos A31. Membrana contendo RNA de células A31 carenciadas para soro (controle) e reestimuladas com soro (10%) por diferentes períodos de tempo, foi hibridizada com sondas radioativas correspondentes ao gene *RECK* e ao controle interno 36B4. A quantificação está indicada no gráfico.

Figura 22: Ensaio de Northern blot para a análise da expressão de *RECK* no ciclo celular em células ST1. Membrana contendo mRNA de células ST1 carenciadas para soro e tratadas com hidrocortisona por 24 h (controle), e depois reestimuladas com soro (10%) por diferentes períodos de tempo, foi hibridizada com sonda correspondente ao gene *RECK* e ao controle interno 36B4.

que foi hibridizada com sonda radioativa correspondente ao gene *RECK* e ao controle interno 36B4. A figura 22 mostra o resultado deste ensaio de Northern blot. Verifica-se que o tratamento com soro não inibe a expressão do gene *RECK* nas células ST1 sincronizadas em estado G0, indicando que o nível de expressão de mRNA de *RECK* é o mesmo nas células ST1 quiescentes e nas células em proliferação.

3.5.4 Análise do envolvimento de *RECK* na reversão fenotípica de células C6/ST1 induzida por hormônios glucocorticóides

Esta análise foi feita baseando-se nas seguintes evidências experimentais: 1) *RECK* foi originalmente isolado como uma proteína indutora da reversão fenotípica tumoral-normal (Takahashi et al, 1998); 2) A propriedade invasiva de células C6 (de onde derivam as células ST1) é dependente de metaloprotease (Paganetti et al, 1988; Tamaki et al, 1997); 3) *RECK* tem atividade inibitória sobre a invasão tumoral através da inibição da atividade de metaloprotease-9 (Takahashi et al, 1998); 4) Células ST1 sofrem reversão fenotípica completa de transformada e tumoral para normal sob a ação de hormônios glucocorticóides (Armelin & Armelin, 1983; Armelin et al, 1983).

3.5.4.1. Análise da expressão de *RECK* na resposta ao tratamento com hormônio glucocorticóide em células ST1

Células C6 e ST1 foram tratadas com hidrocortisona e a regulação da expressão do gene *RECK* foi analisada através de ensaios de Northern blot. Utilizando tanto a célula parental, C6, como o clone hiper-responsivo a glucocorticóides, ST1, não se verificou uma indução significativa da expressão do gene *RECK*, quando tratadas com hidrocortisona (0,1 µg/ml) por diferentes

Figura 23: Ensaio de Northern blot para a análise da expressão de *RECK* na reversão fenotípica de células C6/ST1 induzida por hormônios glucocorticóides. Membrana contendo mRNA de células ST1 não tratadas (controle) e tratadas com hidrocortisona (Hy) (100 ng/ml) por diferentes períodos de tempo foi hibridizada com sondas radioativas correspondentes ao gene *RECK* e ao controle interno 36B4.

tempos. A figura 23 mostra um resultado de Northern blot, onde células ST1 cultivadas em 5% SFB foram tratadas com hidrocortisona por diferentes períodos de tempo. Preparações de mRNA de células não tratadas e de células tratadas com hidrocortisona foram utilizadas para preparar os filtros que foram hibridizados com sondas radioativas correspondentes aos genes *RECK* e 36B4 (controle interno). Analisando os resultados, concluiu-se, que hidrocortisona não induz a expressão de mRNA de *RECK* em células C6 e ST1 (não sincronizadas) durante a reversão do fenótipo.

3.5.4.2. Análise da super-expressão do gene *hRECK* na proliferação de células ST1

3.5.4.2.1. Isolamento dos clones celulares e análise dos níveis de expressão de *hRECK*

DNA plasmideal dos vetores pCXN2neo e pCXN2-*hRECK* foram preparados e utilizados para transfecção de células de mamíferos. A partir das células ST1 transfectadas com o vetor vazio, foram isolados 9 clones (clones Vn). A partir das células ST1 transfectadas com o vetor de expressão de *hRECK* foram isolados 18 clones (clones STRn). O nível de expressão de *RECK* dos clones obtidos foi analisado através de ensaios de Northern blot. Preparações de mRNA dos clones celulares foram utilizadas para a preparação de uma membrana que foi hibridizada com sondas radioativas correspondentes aos genes *RECK* e ao controle interno 36B4. A figura 24 mostra os níveis de expressão de mRNA de *hRECK* de alguns dos clones celulares isolados. Como pode-se observar, a linhagem celular STR (população mista de células ST1 transfectadas com pCXN2-*hRECK*) e os clones STR7, STR9 e STR10

Figura 24: Ensaio de Northern blot para a verificação da expressão de *RECK* nas linhagens celulares obtidas após transfecção de células ST1 com o vetor de expressão de h-*RECK*. Membrana contendo mRNA de células ST1 transfectadas com o vetor vazio (PC) e com o vetor de expressão de hRECK (STR, STR5, STR7, STR8, STR9 e STR10), foi hibridizada com sonda correspondente ao gene *RECK* e ao controle interno 36B4. Abaixo estão os resultados da quantificação, expressa em relação ao controle PC, considerado como 1.

expressam o transcrito de *RECK* em maior nível do que as células controle PC (população mista de células ST1 transfectadas com o vetor vazio pCXN2). A análise densitométrica das bandas revelou que a expressão relativa de *RECK* (considerando como 1 a expressão das linhagens controle ST1, PC e clones V1-9), nas linhagens STR, STR1, STR3, STR7, STR9, STR10, STR14, STR16, STR20 e STR21 é de, respectivamente, 2, 14, 20, 6, 7, 3, 40, 12, 7 e 6 vezes. Portanto, estas linhagens foram selecionadas para análise dos efeitos da super-expressão de *RECK* nas células ST1.

3.5.4.2.2. Análise morfológica dos clones celulares

Ao comparar a morfologia dos clones controle com a morfologia dos clones que super-expressam hRECK, verificou-se que hRECK não induz uma mudança morfológica drástica ou uniforme, como mostram alguns exemplos (figura 25). Embora as densidades celulares sejam diferentes, é possível observar algumas diferenças de morfologia, comparando alguns clones celulares que super-expressam *RECK* com a linhagem celular controle PC (população mista transfectada com o vetor de expressão vazio). O clone STR7 possui uma morfologia alongada; o clone STR9 é mais achatado e apresenta menor número de mitoses. Por outro lado, o clone STR10 praticamente não tem a sua morfologia alterada. Estes resultados de morfologia não permitem correlacionar a expressão de *RECK* com alteração para morfologia mais do tipo "normal".

Figura 25: Morfologia celular das linhagens obtidas após transfecção de células ST1 com o vetor vazio (PC) e o vetor de expressão de *hRECK* (STR7, STR9 e STR10). As linhagens celulares, cultivadas em frascos plásticos, foram crescidas em 5% SFB-DMEM até atingirem a confluência e analisadas e fotografadas com o auxílio de um microscópio Nikon Diaphot invertido, sob contraste de fase, com aumento de 100X. A. PC; B. STR7; C. STR9; D. STR10.

Figura 26: Curva de crescimento das linhagens celulares obtidas após transfecção das células ST1 com o vetor de expressão vazio (clones Vn) e o vetor de expressão de *hRECK* (clones STRn). As células foram plaqueadas e cultivadas em 5% SFB-DMEM. Duplicatas de cada linhagem celular foram coletadas por tripsinização nos tempos indicados e contados com o auxílio de um contador eletrônico de células CELM.

3.5.4.2.3. Análise da curva de crescimento dos clones celulares

A proliferação celular destes clones celulares foi analisada através de curvas de crescimento em meio contendo 5% SFB e os resultados são mostrados na figura 26. Não foi possível correlacionar a super-expressão de hRECK com a diminuição da proliferação celular, pois tanto os clones controle (Vn) quanto os clones que super-expressam hRECK (STRn) apresentaram uma taxa de crescimento menor quando comparadas com a célula parental ST1 (Figura 26).

3.5.4.2.4. Análise dos clones celulares quanto à eficiência de formação de colônias em suspensão e em monocamada

Os clones celulares foram comparados quanto à eficiência de formação de colônia em suspensão de agarose e em monocamada (tabela 1). Nestes experimentos, cada linhagem celular foi plaqueada em baixa densidade, e as colônias macroscópicas formadas, foram contadas após 7 a 10 dias em cultura. Observando a tabela 1, verifica-se que, tanto os clones controle (Vn) quanto os clones que super-expressam hRECK (STRn), apresentaram uma eficiência de formação de colônia menor, quando comparadas à linhagem parental ST1, mais uma vez impossibilitando alguma conclusão a respeito do efeito da super-expressão de hRECK na proliferação de células ST1.

Tabela 1: Comparação das eficiências de plaqueamento (EP) em suspensão e monocamada das linhagens celulares obtidas após transfecção das células ST1 com o vetor de expressão vazio (clones Vn) e o vetor de expressão de *hRECK* (clones STRn).

Linhagem celular	EP em suspensão (%)	EP em monocamada (%)
ST1	43 [70]	[100]
PC	[53]	[92] (100)
V1	14	7
V2	1	2
V3	0	1
V4	2	1
V5	0 {0}	1 {2}
V6	10 {5}	5 {7}
V8	10	5
V9	3	3
STR	[70]	[76] (88)
STR1	21	12
STR3	10	17
STR7	35 [21]	28 [52]
STR9	0 [0]	0 [0] (3,5)
STR10	22 [19]	22 [46] (49)
STR14	3 {2}	1 {4}
STR16	14	12
STR20	10	6
STR21	1	5

[] () { } : resultados de experimentos independentes.

4. DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da região promotora do gene *mRECK* e inibição da sua expressão pelo produto do oncogene *Ha-ras*

Para elucidar a maquinaria transcricional que inibe a expressão do gene *RECK* durante a transformação maligna, clonou-se a região promotora do gene *RECK* de camundongo (*mRECK*) contendo 4110 pb "upstream" ao sítio predominante de início da transcrição.

Optou-se pela região promotora de camundongo, tendo em vista dois objetivos: 1) desvendar o mecanismo da inibição da expressão do gene *RECK* em células de fibroblasto de camundongo NIH-3T3 transformadas por vários oncogenes; 2) gerar camundongos com o gene de *RECK* interrompido (camundongos "knock-out") por recombinação homóloga através de fragmentos genômicos de DNA de camundongo que flanqueiam o primeiro exon do gene *mRECK*.

A obtenção dos clones genômicos MR3 e MR4 de DNA de camundongo, contendo 4110 pb da região promotora de *mRECK*, o primeiro exon (207 pb) e uma porção de aproximadamente 13 kb do primeiro intron, permitiu perseguir os dois objetivos. A regulação da expressão do gene *mRECK* foi perseguida no presente estudo e a análise da função fisiológica da proteína RECK através da geração de camundongos "knock-out" está sendo realizada por Oh e colaboradores na Faculdade de Medicina da Universidade de Kyoto (não publicado).

Experimentos de "primer extension" permitiram mapear o sítio de início de transcrição do gene *mRECK* a aproximadamente 100 bases "upstream" em relação ao primeiro códon ATG. Como o promotor do gene *mRECK* não possui TATA box, é rico em conteúdo de CG e os resultados

indicaram a importância dos fatores de transcrição Sp1/Sp3 na atividade deste promotor, provavelmente este sítio mapeado não seja o único, mas sim, o predominante. Como está descrito na INTRODUÇÃO, o fator de transcrição Sp1 é capaz de selecionar múltiplos sítios de iniciação transcricional “downstream” ao próprio sítio. No promotor de *mRECK* temos dois sítios consensos de ligação ao fator de transcrição Sp1: o sítio Sp1A encontra-se aproximadamente a 14 bases “upstream” em relação ao sítio de iniciação transcricional mapeado no presente estudo; por outro lado, o sítio Sp1B encontra-se a 24 bases “downstream” a este sítio mapeado. Analisando os resultados da influência das mutações nestes sítios na atividade basal do promotor mínimo de *mRECK*, pode-se sugerir que, quando o sítio Sp1A está mutado, os fatores de transcrição Sp1/Sp3 se ligam somente ao sítio Sp1B e selecionam um outro sítio de iniciação alternativo “downstream” em relação a ele. Quando o sítio Sp1B está mutado, a ligação de Sp1/Sp3 ao sítio Sp1A, promove a transcrição a partir do sítio de iniciação predominante. Por outro lado, quando os dois sítios, Sp1A e B, estão disponíveis, prevalece a iniciação a partir do sítio predominante selecionado pela ligação de Sp1/Sp3 ao sítio Sp1A; e o fato de Sp1B estar presente “downstream” a este sítio predominante, faz com que ele possa agir como um atenuador desta transcrição, por um mecanismo desconhecido, como já foi relatado anteriormente (Ofir et al, 1995).

A região promotora de *mRECK* de 4110 pb isolada possui vários sítios putativos de ligação a fatores de transcrição ubíquos, tecido-específicos, envolvidos no desenvolvimento e diferenciação. No presente estudo concentrou-se na caracterização do promotor mínimo de *mRECK* (-52 a +80), uma vez que este fragmento mostrou-se suficiente para promover alta atividade transcricional e contém elementos cis responsáveis pela inibição da expressão do gene *mRECK* pelo oncogene *ras*. O promotor mínimo de

mRECK (-52 a +80) possui um sítio putativo de ligação ao fator de transcrição cEBPb, dois sítios putativos de ligação ao fator de transcrição Sp1 e um CAAT box.

cEBPb é um dos membros da família de fator de transcrição cEBP, o qual é expresso em muito maior quantidade no fígado em relação aos outros tecidos e parece estar envolvido na expressão gênica específica do tecido hepático. cEBP também está envolvido na diferenciação de adipócitos (revisto por Latchman, 1995).

Como os sítios de Sp1, o CAAT box tem sido encontrado em uma grande variedade de promotores e exerce papel essencial na atividade destes promotores. CAAT box se liga a diferentes fatores de transcrição, alguns dos quais são expressos em todos os tecidos e outros são expressos em tecidos específicos (revisto por Latchman, 1995). CAAT box geralmente está presente 80 pb "upstream" ao sítio de início da transcrição de vários genes transcritos pela RNA polimerase II (Benoist et al, 1980; Efstratiadis et al, 1980), porém no caso do promotor de *mRECK*, ele está presente exatamente no início de transcrição predominante. Portanto, embora os resultados tenham mostrado que a ligação de proteínas a este sítio não seja significativa, é possível que quando o sítio Sp1A está mutado, o CAAT box e o sítio Sp1B cooperem para iniciar a transcrição a partir de um sítio alternativo.

Sp1 é um fator de transcrição ubíquo, acreditando-se, inicialmente, que somente regulava a transcrição de genes constitutivos. Porém, em consequência de várias evidências experimentais, hoje já está bem estabelecido o papel de Sp1 na regulação transcricional de genes envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular (Armstrong et al, 1997; Zutter et al, 1997). O fator de transcrição Sp1 contém três domínios de dedos de zinco do tipo Cys-2-His-2, os quais se ligam com grande afinidade à sequência consenso (G/A) (G/A) GGCG (G/T) (G/A) (G/A) (GT) ou GC box

(GGGCGG) (Kadonaga et al, 1987). Este domínio de ligação ao DNA está presente na porção carboxi-terminal da proteína. Diversas regiões da proteína estão envolvidas na sua regulação funcional, incluindo dois domínios, A e B, correspondentes a regiões ricas em glutamina associadas com regiões ricas em serina-treonina (Kadonaga et al, 1988; Courey et al, 1989), que interagem com a maquinaria transcricional (Hoey et al, 1993) e são necessárias para a interação com outros fatores de transcrição (Pascal e Tjian, 1991). O domínio C correspondente a uma região rica em cargas e funciona como um domínio de transativação fraco (Buckler et al, 1991). O domínio D, presente na porção carboxi terminal, é necessário para a interação com outras proteínas, assim como os domínios A e B, e pode estar envolvido na formação de complexos homoméricos de Sp1 (Pascal & Tjian, 1991; Gill et al, 1994).

O fator de transcrição Sp1 ativa a transcrição através da cooperação com o complexo TFIID (Gill et al, 1994), resultando em um nível basal da atividade promotora. O promotor de *mRECK* não contém TATA box, porém o mecanismo pelo qual Sp1 ativa a transcrição parece ser o mesmo em relação a um promotor contendo TATA box, uma vez que o o complexo TFIID e os cofatores associados a TBP também exercem papéis essenciais na ativação de promotores sem TATA box (Pugh & Tjian, 1991). Sp1 também pode participar na regulação dinâmica da expressão gênica, através da cooperação consigo mesmo (Su et al, 1991) ou com outros fatores de transcrição tais como E2 de papilomavírus (Li et al, 1991), Tat de HIV-1 (Huang & Jeang, 1993; Chun et al, 1998), NF-kBp65 (Majello et al, 1994; Perkins et al, 1994), Rb (Udvadia et al, 1993), GATA-1 (Merika & Orkins, 1995), Egr-1 (Lin & Leonard, 1997), AP1 (Noti et al, 1996; Tsuji et al, 1998), cEBPb (Lee et al, 1997), E2F (Karlseder et al, 1996), p53 (Ohlsson et al, 1998), etc. Estas observações sugerem que a modulação da atividade de Sp1 exerce um papel crítico na regulação do crescimento celular e diferenciação.

Demonstrou-se neste estudo que, os sítios de ligação aos fatores de transcrição Sp1/Sp3 presentes no promotor mínimo do gene *mRECK* são importantes para a expressão deste gene nas linhagens de fibroblastos não transformados. Obteve-se evidências sugerindo que um dos sítios de ligação a Sp1/Sp3, o sítio Sp1B, localizado "downstream" ao sítio de início de transcrição predominante, exerce um papel na supressão do gene *RECK* mediada pelo oncogene *ras*.

A existência de uma família Sp de fatores de transcrição (Hagen et al, 1992; Kingsley & Winoto, 1992) sugere que a regulação da expressão gênica por Sp1 é ainda mais complexa. Sp3 é um membro desta família, que compartilha com Sp1 a mesma sequência consenso de ligação e possui a habilidade tanto de estimular quanto de inibir a transcrição, dependendo do promotor e da célula (Majello et al, 1994; Hagen et al, 1994; Udvardia et al, 1995; Liang et al, 1996; Majello et al, 1997). Portanto, uma possibilidade óbvia, no caso da inibição da expressão de *mRECK* via o sítio Sp1B, seria uma indução da expressão ou da atividade de Sp3 nas células transformadas por *ras*, resultando no bloqueio do sítio Sp1B por Sp3. Porém, esta hipótese não foi confirmada por EMSA, utilizando extrato nuclear de células não transformadas e transformadas por *ras* (figura 14).

Envolvimento de Sp1 como alvo da transdução de sinal Ras/Raf tem sido documentado em alguns sistemas. Foi demonstrado que a ativação, induzida por *v-Raf*, do promotor de dois genes relacionados com proliferação, *rep-3b* e *mdr 1*, é mediada por Sp1 (Milttenberger et al, 1995). Também se verificou que sequências de ligação a Sp1 são importantes para a ativação transcricional do gene da lipoxigenase 12 humana induzida por *Ha-ras* (Chen et al, 1997). O sítio Sp1 presente no promotor do gene do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) exerce papel fundamental na indução deste gene mediada pelo Ras ativado, a qual se dá via a cascata de p42/p44 MAP

quinase (Milanini et al, 1998). A ativação do receptor de EGF estimula a expressão do gene da gastrina, via a sinalização de Ras-ERK, resultando no aumento da atividade de ligação do fator de transcrição Sp1 ao seu sítio presente no promotor da gastrina (Merchant et al, 1999). É interessante o relato no qual Sp1 possui um papel crítico na supressão do gene da $\alpha 2$ -integrina mediada por Erb-B2 e *v-ras*, em células do epitélio mamário humano (Ye et al, 1996). Porém, neste caso, ao contrário do que se observou no presente estudo, a supressão do gene da $\alpha 2$ - integrina mediada por Erb-B2 e *v-ras* deve-se a uma leve redução da ligação de Sp1 ao seu sítio de ligação. Portanto, devem existir múltiplos mecanismos pelos quais oncogenes suprimem a transcrição através de sítios de ligação a Sp1.

O fator de transcrição Sp1 pode ser regulado através de modificações pós-traducionais, tais como glicosilação (Jackson & Tjian, 1988) e fosforilação da porção amino-terminal, predominantemente em resíduos de serina, por uma proteína quinase dependente de DNA, uma serina-treonina quinase nuclear (Jackson et al, 1990; Gottlieb & Jackson, 1993). Porém, a fosforilação de Sp1, por esta proteína quinase dependente de DNA, não afeta a sua atividade de transativação e nem de ligação ao DNA (Gottlieb & Jackson, 1993). No entanto, vários estudos recentes têm sugerido que o resultado destas modificações pós-traducionais do fator de transcrição Sp1 depende do domínio modificado. Uma diminuição da atividade de ligação de Sp1 e Sp3 ao DNA, por fosforilação, foi relatado como um mecanismo importante de regulação da expressão gênica no processo de diferenciação (Leggett et al, 1995). Estudos posteriores sugerem que esta fosforilação ocorre em resíduos de treonina presentes na porção carboxi-terminal correspondente ao domínio de ligação ao DNA, e é catalisada pela enzima caseína quinase II (Armstrong et al, 1997). No caso da ativação do promotor da acetil-CoA carboxilase pela glicose em células de pré-adipócitos,

verificou-se que o mecanismo envolvia a desfosforilação de Sp1 pela fosfoproteína fosfatase 1 (PP1), resultando em um aumento da ligação de Sp1 ao DNA (Daniel et al, 1996). Também se observou que a indução da expressão das enzimas glicolíticas, aldolase A e piruvato quinase M2, induzidas pela glicose em células de hepatoma, é resultado de um aumento da forma desfosforilada de Sp1 e consequente aumento de sua atividade de ligação ao DNA (Schafer et al, 1997). Corroborando estes achados, Zhang & Kim (1997) verificaram que, em células β pancreáticas, a fosforilação de Sp1 pela caseína quinase II leva a uma inibição da ligação de Sp1 ao promotor de acetil-CoA carboxilase, enquanto a desfosforilação da proteína Sp1 pela proteína fosfatase 1 (PP1) ativa a ligação de Sp1 ao promotor. Por outro lado, há relatos na literatura correlacionando a fosforilação da proteína Sp1 com um aumento da atividade de ligação ao DNA (Zutter et al, 1997; Rohlff et al, 1997; Adnane et al, 1998; Kumar & Butler, 1998; Lee et al, 1998; Merchant et al, 1999). Sp1 é fosforilado pela proteína quinase dependente de cAMP (PKA) resultando em uma maior atividade de ligação ao DNA e capacidade de transativação (Rohlff et al, 1997). ERK 2 também fosforila Sp1 e estimula a sua atividade de se ligar ao DNA (Merchant et al, 1999). Um dos mecanismos da indução da expressão do gene correspondente à proteína p21 (inibidora de quinases dependentes de ciclinas), envolve fosforilação dos fatores de transcrição Sp1 e Sp3 e concomitante aumento da atividade de ligação destes fatores ao DNA e atividade de transativação (Adnane et al, 1998). A fosforilação das proteínas Sp1 e Sp3 mediada pela expressão do antígeno X do vírus da hepatite B (HBV-X) aumenta a atividade de ligação destes fatores de transcrição, resultando na indução da transcrição do gene de IGF-II (Lee et al, 1998). Verificou-se que a isoforma ζ da proteína quinase dependente de cálcio (PKC ζ) se liga à proteína Sp1 e a fosforila através da interação direta com a região de ligação ao DNA correspondente aos dedos de

zinco, resultando em um aumento da atividade do promotor do gene de VEGF via o sítio de Sp1 presente neste promotor (Pal et al, 1998). A fosforilação do fator de transcrição Sp1 também parece modular a interação dela com outras proteínas, pois resultados sugerem que Sp1 fosforilado é um substrato muito mais eficiente para a interação com a proteína Tat. Esta interação parece ser essencial para a transcrição e replicação do genoma do HIV (Vlach et al, 1995). Verificaram que a interação Tat-Sp1 modula a fosforilação de Sp1 (no resíduo 131 de serina da porção amino terminal) mediada pela proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK), mostrando, também, que Sp1 fosforilado aumenta a atividade intra-celular do promotor de HIV (Chun et al, 1998). Neste trabalho, foi proposto que Tat e DNA-PK interagem para aumentar a fosforilação de Sp1, resultando em uma indução da expressão gênica a partir do LTR de HIV-1. Este mecanismo poderia ser explicado pelo fato do aumento do nível de fosforilação de Sp1 alterar a interação entre Sp1 e componentes da maquinaria da transcrição basal resultando na ativação da transcrição gênica (Chun et al, 1998). A estimulação com soro leva a um aumento dos níveis de Sp1 fosforilado, correlacionando com um aumento da ativação do promotor da dihidrofolato redutase dependente de Sp1 (Black et al, 1999). Foi determinado que esta alteração dos níveis de fosforilação de Sp1 depende de sua associação com uma nova quinase que fosforila a porção carboxi terminal da proteína Sp1 (Black et al, 1999). Esta porção parece estar envolvida na interação com outros fatores de transcrição, sugerindo que a fosforilação por esta nova quinase module a interação de Sp1 com outras proteínas. Um outro estudo mostrou que a ligação de fatores de diferenciação Neu (NDFs), ou de outros ligantes similares a EGF, aos receptores ErbB induzem a fosforilação de Sp1 por uma proteína quinase de 60 kDa. Consequentemente, um complexo contendo Sp1 é formado sobre os elementos responsivos a NDF (NRE) resultando em um aumento da atividade

transcricional do respectivo promotor. A formação deste complexo Sp1-DNA parece não ocorrer por uma modulação da atividade de ligação ao DNA, mas, sim, a fosforilação de Sp1 parece modular o nível de oligomerização do próprio fator Sp1 ou a sua interação com outras proteínas (Alroy et al, 1999).

Estas observações experimentais em relação à fosforilação de Sp1 sugerem que diferentes vias de transdução resultam em fosforilação de diferentes domínios de Sp1, modulando a função deste fator de transcrição. Portanto, modificações dos níveis de fosforilação de Sp1 são resultados das vias de transdução ativadas em determinadas condições. Estudos continuam no sentido de identificar as quinases associadas com a fosforilação do fator de transcrição Sp1 e determinar o papel fisiológico da fosforilação desta proteína.

O papel da glicosilação da proteína Sp1 ficou indefinido por algum tempo desde a sua descoberta (Jackson & Tjian, 1988). A N-acetilglicosamina ligada a O (O-GlcNac) é uma importante modificação pós-traducional encontrada em proteínas nucleares e citoplasmáticas. Esta modificação consiste no monossacarídeo N-acetilglicosamina ligado ao grupo hidroxila do resíduo de serina ou treonina. Enzimas que adicionam (O-GlcNAc transferase) e removem (O-GlcNAcase) este açúcar estão presentes no citoplasma da maior parte das células eucarióticas. Portanto, um sistema de regulação dinâmica de adicionar e remover este açúcar, análogo ao sistema de quinase/ fosfatase está presente nas células, sendo que um possível papel de O-GlcNAc poderia ser o de competir com a fosforilação em determinados sítios da proteína. Com o objetivo de testar esta hipótese Haltiwanger e colaboradores (1998) demonstraram que um aumento no nível de O-glcNAc do fator de transcrição Sp1 resultou em uma diminuição do nível de fosforilação desta proteína, corroborando a hipótese de que O-GlcNAc competiria com fosfato na modificação traducional de algumas proteínas,

modulando suas atividades. Recentemente, surgiram relatos sugerindo o envolvimento da glicosilação de Sp1 em diversos aspectos da regulação da expressão gênica por este fator de transcrição. Estudos correlacionaram a glicosilação de um resíduo específico de serina, presente no domínio de transativação de Sp1, com a inibição da interação deste fator de transcrição com ele mesmo e com TAF110 (Roos et al, 1997). Um outro papel importante de O-GlcNac na função de Sp1 seria no controle da estabilidade desta proteína (Han & Kudlow, 1997).

Como já descrito na INTRODUÇÃO, os efeitos de Ras e as vias pelas quais ela atua são bastante complexos e continuam sendo objetos de intensa investigação, assim como as modificações pós-traducionais das proteínas Sp1/Sp3 e seus efeitos também continuam sendo muito estudados. Embora haja relato no qual ERK2, uma das quinases conhecida como sendo ativada por Ras, fosforila Sp1 e estimula a sua ligação ao DNA (Merchant et al, 1999), esta é uma observação *in vitro*. Além disso, em nosso estudo, não se verificou uma diferença de ligação de Sp1/Sp3 ao DNA quando *ras* ativado está super- expresso. Portanto, é possível que, por vias diferentes, *ras* ativado reprima a expressão do gene *mRECK* através da modulação de tais modificações pós- traducionais na proteína Sp1/Sp3, afetando a sua capacidade de transativação. Uma outra possibilidade é a de que o sinal desencadeado por Ras afete a interação entre Sp1/Sp3 e suas proteínas regulatórias. Há relato de que uma proteína nuclear, p74, liga-se ao domínio de transativação de Sp1 e inibe a sua atividade transcricional (Murata et al, 1994). É interessante o relato recente no qual se demonstrou a interação de Sp1 com a histona desacetilase 1, resultando na repressão transcricional via sítios Sp1 presentes no promotor da timidina quinase (Doetzlhofer et al, 1999). A ação repressora da histona desacetilase via sítios Sp1 também foi relatada para o promotor de p21 (proteína inibidora de quinases dependentes

de ciclina) (Sowa et al, 1997; Xiao et al, 1999). Estes dados nos estimulam a analisar o envolvimento do mecanismo de desacetilação de histonas na repressão transcricional do gene *RECK*.

Alguns modelos poderiam explicar como dois sítios estruturalmente semelhantes, Sp1A e Sp1B, exercem papéis distintos na regulação da expressão do gene *mRECK*: 1) um dos sítios poderia estar modificado *in vivo*, como por exemplo por metilação; 2) a sequência flanqueadora de cada sítio determinaria a especificidade funcional de cada um; 3) as posições relativas destes sítios entre si ou em relação a outros elementos cis do promotor, determinariam as suas especificidades funcionais. Este modelo é particularmente interessante pois o sítio Sp1B do gene *mRECK* está localizado "downstream" ao sítio predominante de início da transcrição. Há um relato na qual o sítio de ligação a Sp1 dentro do primeiro exon do gene do receptor γ de células T, exerce um papel de silenciador transcricional (Ofir et al, 1995).

4.2. Influência dos vetores de expressão em ensaios de co-transfecção na análise do promotor de *mRECK*

4.2.1. Efeito do produto do oncone *Ha-ras* sobre o promotor de HSV-TK no plasmídeo de referência pRL-TK

Em todos os ensaios de transfecção transitória de DNA para o ensaio de luciferase, utilizou-se o plasmídeo pRL-TK como controle interno para normalizar a eficiência de transfecção. O vetor pRL-TK contém o promotor de timidina quinase do vírus de herpes simplex (HSV-TK) "upstream" ao gene da Renilla luciferase. Considerando que promotores presentes nos plasmídeos co-transfectados podem afetar a expressão do gene repórter (que está sob o controle do promotor em estudo), o plasmídeo pRL-TK é o mais

recomendando, dentro da família pRL dos vetores de referência, para experimentos de co-transfecção, uma vez que o seu promotor é relativamente fraco, e portanto, forneceria uma expressão constitutiva do gene repórter controle (Renilla luciferase) sem interferir com a atividade do promotor em estudo (Manual técnico do kit Dual-Luciferase-Promega). Porém, os resultados obtidos a partir de experimentos de co-transfecção com o vetor de expressão de *Ha-ras* indicaram que o plasmídeo pRL-TK não é o controle interno adequado para normalizar a eficiência de transfecção no nosso sistema, pois os resultados sugerem que o promotor de HSV-TK é inibido por Ras. Em todos os experimentos de co-transfecção com o plasmídeo pSR α -Ha-ras, verificou-se que o promotor de HSV-TK do plasmídeo controle (pRL-TK) apresentava uma atividade aproximadamente duas vezes menor quando comparada à atividade obtida a partir da co-transfecção com o plasmídeo vazio pSR α -neo. Embora esta inibição, da ordem de duas vezes, não seja um resultado normalizado para a eficiência de transfecção, é um resultado consistente, uma vez que se trata de uma observação constatada em todos os ensaios realizados. Com o objetivo de obter maior consistência para esta observação, verificou-se que o efeito de Ras sobre o promotor de HSV-TK é dose-dependente. Para confirmar o efeito de supressão do promotor de HSV-TK mediado por *ras*, um outro controle interno deveria ser utilizado para normalizar a eficiência de transfecção. A utilização de um outro plasmídeo controle, cujo promotor não seja inibido por Ras, também comprovaria que a supressão do gene *mRECK* mediado por Ras é maior do que a supressão mostrada nas figuras 10, 11, 12 e 13. Uma outra evidência do efeito de Ras sobre o promotor de HSV-TK foi obtida através da utilização do plasmídeo pCXN2-Ha-ras em experimentos de co-transfecção transitória. O vetor pCXN2-neo (Niwa et al, 1991) é um vetor de expressão contendo um promotor forte de citomegalovírus, portanto nestes experimentos, o alto nível

de expressão de *ras* resultou em uma inibição do promotor de HSV-TK da ordem de seis vezes. Devido a este efeito de *ras* sobre o promotor do plasmídeo controle pRL-TK, o efeito de *ras* sobre o promotor de *mRECK* foi totalmente mascarado, não sendo possível a utilização do vetor pCXN2-Ha-ras em ensaios de co-transfecção transitória. Este plasmídeo foi utilizado somente em ensaios de transfecção estável.

Não há relatos na literatura descrevendo a supressão da atividade promotora de HSV-TK mediada por *ras*. Porém, as observações experimentais sugerem que a inibição da atividade do promotor de *mRECK* pelo produto do oncogene *Ha-ras*, verificada nos ensaios de luciferase apresentadas nesta tese (da ordem de duas a quatro vezes), está subestimada.

4.2.2. Efeito do vetor de expressão pSR α -neo sobre a atividade do promotor de *mRECK*

Comparando determinados resultados da análise do promotor de *mRECK* nota-se algumas discrepâncias: 1) na figura 3 (NIH-3T3), o promotor mínimo de 52 pb mostra uma atividade de 150% em relação ao promotor de 4110 pb, por outro lado, na figura 10 (NIH-3T3), mostra uma atividade de 50%, quando co-transfectado com o vetor vazio; 2) a figura 8 mostra que a mutação no sítio Sp1A não afeta a atividade do promotor mínimo, por outro lado, a figura 13 mostra uma redução desta atividade; 3) a figura 8 (NIH-3T3) mostra que a mutação no sítio Sp1B do promotor mínimo resulta em um aumento da atividade deste promotor, por outro lado, a figura 13 mostra uma redução desta atividade. Estas discrepâncias são provavelmente consequências da influência de elementos cis-regulatórios presentes no vetor de expressão pSR α neo utilizado nos experimentos de co-transfecção mostrados nas figuras 10 e 13.

O vetor de expressão pSR α neo contém um promotor híbrido composto pelo promotor de SV40 e do segmento R-U5 do LTR do HIV (Takebe et al, 1988). Os seis GC box em "tandem" presentes no promotor de SV40 se ligam ao fator de transcrição Sp1, resultando na eficiente iniciação da síntese de RNAs correspondentes à fase primária do ciclo de replicação de SV40 (Dyner & Tjian, 1983a; 1983b).

Uma vez que o fator de transcrição Sp1 se liga tanto ao promotor de *mRECK* quanto ao promotor de SV40 presente no vetor pSR α neo co-transfectado, os dois promotores competem pelo fator de transcrição em comum. Portanto, o vetor pSR α neo, quando co-transfectado, age como um plasmídeo competidor sequestrando a proteína Sp1. A competição pelo fator de transcrição Sp1 entre regiões ricas em GC, foi verificada em diversos sistemas: um ensaio de transfecção *in vivo* mostrou uma competição entre o promotor de SV40 e o promotor de *c-Ha-ras 1* (Ishii et al, 1986); competição entre o promotor do gene de gama-cristalino e o promotor de SV40 foi verificada *in vitro* (Das & Piatigorsky, 1986) e *in vivo* (Hayashi & Kondoh, 1986); competição com um oligonucleotídeo contendo sítios de ligação a Sp1 aboliu completamente a transcrição do gene da dihidrofolato redutase *in vitro* e diminuiu significativamente a expressão do gene repórter (Swick et al, 1989).

Portanto, a alteração da expressão relativa do gene repórter com o plasmídeo pGL3-52 mostrada nas figuras 3 e 10, deve-se a uma competição pelo fator de transcrição Sp1 entre o promotor de *mRECK* e o promotor de SV40 presente no vetor pSR α neo co-transfectado no experimento da figura 10. Baseando-se no fato de que os sítios de Sp1 são essenciais para a atividade do promotor mínimo de *mRECK* de 52 pb (item 3.1.5), a competição pela proteína Sp1 afeta o plasmídeo pGL3-52 de forma mais significativa em comparação às outras construções contendo uma porção maior do promotor de *mRECK*, os quais contém, provavelmente, outros

elementos cis regulatórios importantes envolvidos na regulação da expressão do gene *mRECK*.

Da mesma maneira, as expressões relativas do gene repórter verificadas com as construções mutadas nas figuras 8 e 13 são diferentes devido à influência do vetor pSR α neo co- transfectado no experimento da figura 13. Os resultados sugerem que o promotor de SV40 presente no vetor pSR α neo sequestra o fator de transcrição Sp1 de tal forma a afetar a regulação da atividade do promotor mínimo de *mRECK*. As quantidades limitantes de Sp1 resultantes desta competição trazem, como consequência, um decréscimo da atividade relativa do promotor mínimo mutado tanto no sítio Sp1A quanto no sítio Sp1B (figura 13).

Apesar destas interferência técnicas, apontadas neste item e no item anterior, estas não interferem na conclusão do trabalho. De certa forma até corroboram tal conclusão, pois podemos afirmar que os sítios de Sp1 são essenciais para a atividade do promotor mínimo de *mRECK* em células NIH-3T3. Podemos afirmar, também, que o sítio Sp1B é o responsável pela inibição da atividade deste promotor mínimo mediada por Ras, uma vez que, no experimento apresentado na figura 13, embora o vetor co-transfectado pSR α neo sequestre o fator de transcrição Sp1, esta competição ocorre tanto com o vetor vazio pSR α neo quanto com o vetor pSR α -Ha-ras. Portanto, o resultado mostrado na figura 13 é consistente e a supressão da atividade promotora mediada por Ras é maior do que mostram os resultados.

Analisando estas interferências técnicas observadas neste trabalho, nota-se a importância de ensaios preliminares para selecionar os vetores de expressão utilizados em ensaios de co-transfecção para analisar a atividade do promotor.

4.3. Inibição da expressão do gene *mRECK* mediada pelo produto do oncogene *v-fos*

Para analisar o mecanismo inibitório da expressão do gene *RECK* por *v-fos* utilizou-se linhagens celulares geradas anteriormente no laboratório a partir de células A31 (Costanzi et al, 1990; Joazeiro, 1990) e por Northern blot confirmou-se a inibição dos níveis de transcrito de *mRECK* pelo produto do oncogene *v-fos*. Com o objetivo de verificar se a inibição da expressão do gene *RECK* por *v-fos* é ao nível transcricional, ensaios de co-transfecção de células A31 com vetor de expressão de *v-fos* (pFBR-01) e construções contendo o promotor do gene *RECK* "upstream" ao gene repórter luciferase, foram realizados como ensaios preliminares. Porém, estes resultados e outros obtidos anteriormente no laboratório revelaram que as células A31 não apresentam uma eficiência de transfecção adequada. Optou-se, portanto, pela utilização de células NIH-3T3. Estes ensaios, em fase de padronização, estão sendo realizados pela pós-graduanda Sheila M. Brochado.

4.4. Análise do envolvimento do mecanismo de metilação de DNA na regulação transcricional do gene *RECK*

A hipermetilação do DNA em sítios próximos à região promotora dos genes tem sido descrita como um mecanismo de inativação transcricional. O gene supressor de invasão E-caderina tem a sua expressão inibida em tumores humanos através do mecanismo de metilação da sua região promotora (Yoshiura et al, 1995; Graff et al, 1995). A expressão de genes supressores de tumor como p16 (Gonzalvo et al, 1998), retinoblastoma (pRb) (Ohtani-Fujita et al, 1993) e p53 (Schroeder & Mass, 1997) também é reprimida pela metilação de sequências CpG nas respectivas regiões promotoras.

Ras controla a capacidade da célula de metilação do DNA através da indução da expressão da DNA metil transferase (MeTase) (MacLeod et al, 1995). DNA MeTase é responsável pela metilação de resíduos de citosina localizadas nas sequências dinucleotídicas CpG (MacLeod et al, 1995).

Para analisar o efeito da super- expressão de Ras sobre o padrão de metilação do promotor de *mRECK*, selecionou-se uma região do promotor rica em sequências CpG, consequentemente rica em sítios de restrição para a enzima HapII. Ensaios de Southern blot sugerem que o mecanismo de inibição da expressão do gene *RECK* pelo oncogene *ras* não envolve a hipermetilação desta região promotora. Porém, não se pode descartar a hipótese de hipermetilação de outras sequências reguladoras do promotor do gene *RECK* (não delimitadas pela sonda utilizada), como também a hipermetilação de sequências reguladoras de outros genes que, por sua vez, regulariam a expressão do gene *RECK*, como relatado por Shin e colaboradores (1992), no caso da expressão do gene de TGF- α (Tumor Growth Factor-alfa). A abordagem utilizada para testar esta hipótese e analisar outras linhagens celulares, foi a utilização de um agente que causa desmetilação, 5-azacitidina (Jones, 1985; Jones & Taylor, 1980). Este agente substitui a citidina durante a replicação do DNA, causando a hipometilação do DNA. Há evidências, também, que este agente inibe a atividade da DNA MeTase através de uma ligação covalente com essa enzima (Taylor & Jones, 1982). Os resultados apresentados (figura 18) sugerem que o mecanismo de metilação de DNA não está envolvido na inativação transcricional do gene *RECK* nas linhagens tumorais testadas. Porém ainda não se pode descartar totalmente esta hipótese, uma vez que não se utilizou um controle positivo para se testar o reagente (5-azacitidina) utilizado nestes experimentos. Um candidato a este controle positivo seria o gene de TGF- α , cuja expressão aumenta quando células HA-A de melanoma humano são tratadas com 5-

azacitidina (Shin et al, 1992). Além disso, observações anteriores mostraram que mesmo com a capacidade de metilação significativamente reduzida através do tratamento da célula com 5- azacitidina, determinados sítios permaneceram altamente metilados enquanto a maior parte do genoma sofreu desmetilação (Michalowsky and Jones, 1989). Fatores moduladores do nível de metilação de determinados sítios não foram identificados, porém, a observação acima é consistente com a existência de tais fatores.

4.5. Análise do envolvimento de RECK em diversos sistemas celulares

Com o objetivo de estudar o mecanismo de regulação da expressão do gene *RECK* e analisar o papel deste novo gene supressor de tumor, selecionou-se diversos sistemas celulares de invasão, proliferação e reversão.

O item 3.5. de RESULTADOS descreve alguns dos sistemas celulares testados. A análise da expressão de *RECK* na resposta ao tratamento com TNF- α e genisteína em células ST1 não mostrou modificações dos níveis de transcrito de *RECK*, como esperado. Porém, como os efeitos de TNF- α e genisteína sobre a capacidade invasiva foram verificados em células C6 (Esteve et al, 1998; Penar et al, 1997; Penar et al, 1998), estes experimentos deveriam ser realizados com células C6 e não com o seu clone ST1. Nota-se, também, a necessidade da utilização de um controle positivo para testar estes reagentes (TNF- α e genisteína). Candidatos a estes controles positivos seriam o gene de MMP-9, cuja expressão aumenta quando células C6 são tratadas com TNF- α (Esteve et al, 1998), e o gene do óxido nítrico sintase independente de cálcio (iNOS), cuja expressão diminui quando células C6 são tratadas com genisteína (Feinstein et al, 1994).

A análise da expressão de *RECK* no ciclo celular em fibroblasto A-31 e células ST1 mostrou que o envolvimento de *RECK* no controle da

proliferação celular pode ser diferente dependendo do sistema celular. Variações nos níveis de transcrito de *RECK* não foram verificados nas células ST1 quiescentes e nas células em proliferação. Por outro lado, células A31 tratadas com soro por mais de 3h apresentaram níveis de transcrito de *RECK* sensivelmente reduzidos em relação à célula quiescente. Este resultado com fibroblasto de camundongo A31 é esperado, uma vez que entre os genes de resposta primária ao soro estão os oncogenes *fos* e *myc* (Chochran et al, 1983), cuja expressão resulta na inibição da expressão do gene *RECK* (Takahashi et al, 1998).

Dentre os diversos sistemas celulares testados, está a análise do envolvimento de *RECK* na reversão fenotípica de células ST1 induzida por hormônios glucocorticóides. Células C6 (parental) e seu clone hiper-responsivo ao hormônio, ST1, foram tratados com glucocorticóides, porém não se verificou variações nos níveis de transcrito de *RECK* após tratamento hormonal por diferentes períodos de tempo. Porém, não se pode descartar a hipótese de um envolvimento funcional da proteína RECK na reversão fenotípica destas células. Hidrocortisona, ao interagir com seu receptor intracelular, ativa a transcrição de inúmeros genes, cujo resultado final, no caso de células ST1, é a completa reversão fenotípica tanto *in vitro* como *in vivo*, caracterizado por um crescimento totalmente dependente de soro e ancoragem, morfologia normal e incapacidade de gerar tumor em camundongos “nude” (Armelin et al, 1982; Armelin et al, 1983; Armelin & Armelin, 1983). Uma possibilidade é que *RECK*, embora não tenha a sua expressão aumentada durante esse processo, possa ter a sua atividade alterada, contribuindo assim, para a reversão. Portanto, propôs-se, um ensaio funcional, analisando o efeito da super-expressão do gene *RECK* em células ST1. DNA plasmidial dos vetores pCXN2 e pCXN2-hRECK foram utilizados para a transfecção de células ST1. Vários clones estavelmente transfectados com o

vetor vazio e com o vetor de expressão de *RECK* foram isolados, testados quanto ao nível de expressão de *RECK* e comparados quanto à morfologia e à capacidade de proliferação. Porém, tanto os clones transfectados somente com o vetor vazio quanto os clones que super- expressam *RECK* apresentaram uma taxa de crescimento menor quando comparados com célula parental ST1, impossibilitando a análise do envolvimento de *RECK* na proliferação de células ST1. Este resultado, embora inconclusivo, é intrigante, sugerindo a possibilidade de alteração estrutural ou modificação transcricional de genes celulares endógenos devido à inserção preferencial deste vetor no genoma de células ST1, resultando em menor capacidade proliferativa desta célula. A clonagem de *RECK* em um vetor de expressão induzível facilitará a análise do papel de *RECK* nas células ST1 e em outros sistemas.

É importante lembrar que a análise do envolvimento de *RECK* nas respostas ao soro, TNF- α e genisteína em células ST1 foi realizado apenas ao nível de mRNA, não descartando a possibilidade da regulação de *RECK* ao nível de proteína ou de sua atividade biológica. Portanto, a utilização de clones, com expressão de *RECK* induzível, em ensaios de invasão tumoral e regulação de MMP-9, contribuirá para a análise do envolvimento de *RECK* nestes diversos sistemas. A obtenção de antisoros que reconheçam a proteína *RECK* de rato e camundongo permitirá analisar a regulação da expressão de *RECK* em diversos sistema ao nível traducional.

5. CONCLUSÕES

- Uma região 5'-flanqueadora do gene *mRECK*, de 4110pb, foi isolada e caracterizada.
- O sítio predominante de início da transcrição do gene *mRECK* foi mapeado a aproximadamente 100 bases “upstream” em relação ao primeiro códon ATG.
- Esta região 5'-flanqueadora do gene *mRECK* e seus sub-fragmentos, gerados por deleção, possuem atividade promotora.
- Mesmo a menor sequência gerada por deleção, compreendendo 52 pb da porção imediatamente “upstream” em relação ao gene *mRECK* e mais 80 pb da porção 5'UTR do gene, possui atividade promotora, sendo referido, portanto, como o ‘promotor mínimo’ de *mRECK*.
- O promotor mínimo de *mRECK* possui dois sítios putativos de ligação a Sp1 (sítios Sp1A e Sp1B), um sítio putativo de ligação a cEBPb e um CAAT box.
- Os fatores de transcrição Sp1 e Sp3 se ligam aos dois sítios de Sp1 do promotor mínimo de *mRECK* e exercem papel fundamental na atividade deste promotor.
- A inibição da expressão do gene *mRECK* pelo produto do oncogene *Ha-ras* (V12) ocorre ao nível transcricional, sendo exercido, pelo menos em parte, via o sítio Sp1B presente no promotor mínimo.
- A super-expressão de *ras* não alterou a atividade de ligação dos fatores de transcrição Sp1 e Sp3 ao sítio Sp1B, sugerindo que a inibição da expressão do gene *mRECK*, mediada por Ras, deve-se a uma modulação da atividade transreguladora destes fatores.
- O mecanismo de hipermetilação do DNA parece não estar envolvido na regulação transcricional do gene *RECK*.

- O tratamento das células de glioma ST1 com $\text{TNF-}\alpha$, genisteína, soro e hidrocortisona, por diferentes períodos de tempo, não alterou o nível do transcrito correspondente ao gene *RECK*.
- A re-estimulação com soro (por mais de 3h) de fibroblastos normais de camundongo (linhagem A31) carenciados, diminui os níveis de transcrito correspondente ao gene *RECK*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaronson SA & Todaro G (1968). Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro. *Science*, 162: 1024- 1026.

Adnane J, Bizouarn FA, Qian Y, Hamilton AD & Sebti SM (1998). p21^{WAF1/CIP1} is upregulated by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298 through a Transforming Growth Factor β - and Sp1- responsive element: involvement of the small GTPase RhoA. *Molecular and Cellular Biology*, 18: 6962-6970.

Alroy I, Soussan L, Seger R & Yarden Y (1999). Neu differentiation factor stimulates phosphorylation and activation of the Sp1 transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, 19: 1961-1972.

Armelin HA, Gambarini AG & Armelin MCS (1982). Pituitary fibroblast growth factors and the growth of rat C6 glial cell variants. *Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation*, 9: 987- 996.

Armelin,MCS & Armelin HA (1983). Glucocorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth control of rat glioma cells. *Journal of Cell Biology*., 97: 459-465.

Armelin MCS, Sasahara RM, Flatschart R & Vedoy C (1996). Use of cDNA cloning to study the mechanism of action of glucocorticoid hormones at the molecular level. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 1751-1757.

Armelin MCS, Stocco RC & Armelin HA (1983). Control of rat C6 glioma cell proliferation: uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in suspension and monolayer cultures. *Journal of Cell Biology*, 97: 455- 458.

Armstrong, AS, Barry, DA, Leggett RW & Mueller CR (1997). Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 13489-13495.

ATCC Catalogue of cell lines & hybridomas. 7 ed., Rockville, 1992.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1999). *Current Protocols in Molecular Biology*. Boston, John Wiley

Barbacid M (1987). Ras genes. *Annual Review of Biochemistry*, 56: 779-827.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L & Sweet,W (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161: 370-371.

Benoist C, O'Hare K, Breathnack R & Chambon P (1980). The ovoalbumin gene-sequence of putative control regions. *Nucleic Acids Research*, 8: 127-142.

Black, AR, Jensen D, Lin S & Azizkhan JC (1999). Growth/Cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 1207-1215.

Blake MC, Jambou RC, Swick AG, Kahn JW, Azizkhan JC (1990). Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 10: 6632-6641.

Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Bogt PK & Tjian R (1987). Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA-binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* (Washington), 238: 1386-1392.

Bos JL (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research*, 49: 4682-4689.

Bourne HR, Saunders DA & McCormick F (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* (London), 348: 125-132.

Breathnach R, Chambon P (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 50:349-83

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blennis J & Greenberg ME (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96: 857-868.

Buckler AJ, Chang DD, Graw SL, Brook JD, Haber DA, Sharp P & Housman DE (1991). Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proceeding of the National Academy of Science, USA*, 88: 4005-4009.

Burley SK & Roeder RG (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annual Review of Biochemistry*, 65: 769-799.

Chang EH, Furth ME, Scolnick EM & Lowy DR (1982). Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature*, 297: 479-483.

Chen B, Liu Y, Yamamoto S & Chang W (1997). Overexpression of Ha-ras enhances the transcription of human arachidonate 12-lipoxygenase promoter in A431 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1344: 270-277.

Chen C & Okayama H (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology*, 7: 2745-2752.

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T & Karin M (1988). The c-Fos protein interact with cJun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell*, 54: 541-552.

Chun RF, Semmes OJ, Neuveut C & Jeang K (1998). Modulation of Sp1 phosphorylation by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat. *Journal of Virology*, 72: 2615-2629.

Claesson-Welsh L (1994). Platelet derived growth factor receptor signals. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 32023-32026.

Cochran BH, Reffel AC & Stiles CD (1983). Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell*, 33: 939-947.

Conaway RC & Conaway JW (1994). *Transcription mechanism and regulation*. V3, Raven Press Series on Molecular and Cellular Biology, New York.

Costanzi E, Rameh L, Joazeiro C & Armelin MCS (1990). Generation of cell lines to study the role played by oncogenes and anti- oncogenes in cell proliferation control. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 23: 795- 799.

Courey AJ, Holtzman DA, Jackson SP & Tjian R (1989). Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*, 59: 827-836.

Curran T & Verma I (1984). FBR Murine Osteosarcoma Virus: molecular analysis and characterization of a 75 KDa gag-fos fusion product. *Virology*, 135: 218- 228.

Daniel S, Zhang S, DePaoli RA & Kim KH (1996). Dephosphorylation of Sp1 by protein phosphatase 1 is involved in the glucose-mediated activation of the acetyl-CoA carboxylase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 14692-14697.

Das GC & Piatigorsky J (1986). The chicken δ 1-crystallin gene promoter: binding of transcription factor(s) to the upstream G+C-rich region is necessary for promoter function *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 83: 3131-3135.

Doetzlhofer A, Rotheneder H, Lagger G, Koranda M, Kurtev V, Brosch G, Wintersberger E & Seiser C (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Molecular and Cellular Biology*, 19: 5504-5511.

Dynan WS & Tjian R (1983a). Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell*, 32: 669-680.

Dynan WS & Tjian R (1983b). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, 35: 79-87.

Efstratiadis A, Posakony JW, Maniats T, Lawn RM, O'Connell C, Spritz RA, DeRiel JK, Forget BG, Weissman SM, Slightom JL, Blechl AE, Smithies O, Baralle FE, Shoulders CC & Proudfoot NJ (1980). The structure and evolution of the human β -globin gene family. *Cell*, 21: 653-668.

Esteve PO, Tremblay P, Houde M, St-Pierre Y & Mandeville R (1998). In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1403: 85- 96.

Feig LA & Schaffhausen B (1994). The hunt for Ras targets. *Nature (London)*, 370: 508-509.

Feinberg AP & Vogelstein B (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 137: 266-267.

Feinstein DL, Galea E, Cermak J, Chugh P, Lyandvert L & Reis DJ (1994). Nitric oxide synthase expression in glial cells: suppression by tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Neurochemistry*, 62: 811-814.

Feramisco JR, Gross M, Kamato T, Rosenberg M & Sweet RW (1984). Microinjection of the oncogenic form of the human H-ras (T24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell*, 38: 109-117.

Fisher PB, Babiss LE, Weinstein IB & Ginsberg HS (1982). Analysis of type 5 adenovirus transformation with a cloned rat embryo cell line (CREF). *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 79: 3527-3531.

Fort P, Marty L, Piechaczyk M, Sabrouy SE, Dani C, Jeanteur P & Blanchard JM (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde - 3-phosphate- dehydrogenase mutigenic family. *Nucleic Acid Research*, 13: 1431- 1442.

Gill G, Pascal E, Tseng ZH & Tjian R (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 91: 192-196.

Gonzalzo ML, Hayashida T, Bender CM, Pao MM, Tsai YC, Gonzales FA, Nguyen TT & Jones PA (1998). The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 Locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Research*, 58: 1245-1252.

Gossen M & Bujard H (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceeding of the National Academy of Science, USA*, 89: 5547- 5551.

Gottlieb TM & Jackson SP (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with ku antigen. *Cell*, 72: 131-142.

Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE & Baylin SB (1995). E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Research*, 55: 5195-5199.

Hagen G, Muller S, Beato M & Suske G (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Research*, 20: 5519-5525.

Hagen G, Muller S, Beato M & Suske G (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO Journal*, 13: 3843-3851.

Haltiwanger RS, Grove K & Philipsberg GA (1998). Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins *in vivo* using the peptide O-GlcNAc- β - N- acetylglucosaminidase inhibitor O- (2- Acetamido- 2- deoxy- D- glucopyranosylidene) anino-N-phenylcarbamate. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 3611-3617.

Han I & Kudlow JE (1997). Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Molecular and Cellular Biology*, 17; 2550-2558.

Hayashi S & Kondoh H (1986). In vivo competition of δ -crystallin gene expression by DNA fragments containing a GC box. *Molecular and Cellular Biology*, 6: 4130-4132.

Hill CS & Treisman R (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanism and specificity. *Cell*, 80: 199-211.

Hoey T, Weinzierl ROJ, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD & Tjian R (1993). Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveals properties expected of coactivators. *Cell*, 72; 247-260.

Huang L & Jeang K (1993). Increased spacing between Sp1 and TATAA renders human immunodeficiency virus type 1 replication defective: implication for Tat function. *Journal of Virology*, 67: 6937-6944.

Ishii S, Kadonaga JT, Tjian R, Brady JN, Merlino GT & Pastan I (1986). Binding of the Sp1 transcription factor by the Human Harvey *ras* 1 proto-oncogene promoter. *Science*, 232: 1410-1413.

Jainchill JL, Aaronson AS & Todaro GJ (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact- inhibited mouse cells. *Journal of Virology*, 4: 549-553.

Jackson SP, MacDonald JJ, Lees-Miller S & Tjian R (1990). GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell*, 63: 155-165.

Jackson SP & Tjian R (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*, 55: 125-133.

Javahery R, Khachi A, Lo K, Zenzie-Gregory B, Smale ST (1994). DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 14:116-27.

Joazeiro CAP (1990). Oncogene fos: transformação celular e modulação da resposta de células Balb-3T3 a reguladores de crescimento. Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Jolliff K, Li Y, Johnson LF (1991). Multiple protein-DNA interactions in the TATAA-less mouse thymidylate synthase promoter. *Nucleic Acids Research*, 19: 2267-2274.

Jones PA (1985). Altering gene expression with 5- azacytidine. *Cell*, 40: 485- 486.

Jones PA & Taylor SM (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 20: 85- 93.

Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR & Tjian R (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, 51: 1079-1090.

Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J & Tjian R (1988). Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science*, 242: 1566-1570.

Karlseder J, Rotheneder H & Wintersberger E (1996). Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 1659-1667.

Kimura E & Armelin HA (1988). Growth control in mouse Y-1 adrenocortical tumor cells: role of c-k-ras amplification and effects of ACTH. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales* (Santiago), 21 435-441.

Kingsley C & Winoto A (1992). Cloning a GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 12: 4251-4261.

Kinoshita M, Kumar S, Mizoguchi A, Ide C, Kinoshita A, Haraguchi T, Hiraoka Y & Noda M (1997). Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes & Development*, 11: 1535-1547.

Kitayama H, Matsuzaki T, Ikawa Y & Noda M (1990). Genetic analysis of the Kirsten-ras- revertant- 1 gene: potentiation of its tumor suppressor activity by specific point mutations. *Proceeding of the National of Academy of Science, USA*, 87: 4284- 4288.

Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y & Noda M (1989). A ras- related gene with transformation suppressor activity. *Cell*, 56: 77-84

Kops GJ, deRuiter ND, De Vries-Smith, AMM, Powell DR, Bos JL & Burgering BM (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*, 398: 630-634.

Kozak M (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 19867-19870.

Kumar AP & Butler AP (1998). Serum responsive gene expression mediated by Sp1. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 252: 517-523.

Kunkel TA, Roberts JD & Zakour RA (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods in Enzymology*, 154: 367-382.

Laborda J (1991). 36B4 cDNA used as an estradiol- independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. *Nucleic Acid Research*, 19: 3998.

Laemmli VK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Latchman DS (1995). Eukaryotic transcription factors. 2nd edition, Academic Press Limited.

Lee Y, Williams SC, Baer M, Sterneck E, Gonzalez FJ & Johnson PF (1997). The ability of c/EBP β but not c/EBP α to synergize with an Sp1 protein is specified by the leucine zipper and activation domain. *Molecular and Cellular Biology*, 17: 2038-2047.

Lee YI, Lee S, Lee Y, Bong YS, Hyun SW, Yoo YD, Kim SJ, Kim YW & Poo HR (1998). The human hepatitis B virus transactivator X gene product regulates Sp1 mediated transcription of na insulin-like growth factor II promoter 4. *Oncogene*, 16: 2367-2380.

Legget RW, Armstrong AS, Barry D & Mueller CR (1995). Sp1 is phosphorylated and its DNA binding activity down-regulated upon terminal differentiation of the liver. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 25879-25884.

Lewin B (1990). Commitment and activation at Pol II promoters: a tail of protein-protein interactions. *Cell*, 61: 1161-1194.

Li R, Knight JD, Jackson SP, Tjian R & Botchan MR (1991). Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell*, 65: 493-505.

Liang Y, Robinson DF, Dennig J, Suske G & Fahl WE (1996). Transcriptional regulation of the SIS/PDGF-B gene in human osteosarcoma cells by the Sp family of transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 11792-11797.

Lin J & Leonard WJ (1997). The immediate-early gene product Egr-1 regulates the human interleukin-2 receptor Beta-chain promoter through noncanonical Egr and Sp1 binding sites. *Molecular and Cellular Biology*, 17: 3714-3722.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P & Darnell J (1995). *Molecular Cell Biology*, 3rd ed., Scientific American Books, New York.

Lowy DR & Willumsen BM (1993). Function and regulation of Ras. *Annual Review of Biochemistry*, 62: 851-891.

MacLeod AR, Rouleau J & Szyf M (1995). Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 11327-11337.

Magee T & Marshall C (1999). New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell*, 98: 9-12.

Majello B, De Luca P, Hagen G, Suske G & Lania L (1994). Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Research*, 22: 4914-4921.

Majello B, De Lucas P & Lania L (1997). Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activator and repression domains. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 4021-4026.

Mangues R & Pellicer A (1992). Ras activation in experimental carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 3: 229-239.

Mastrangelo IA, Courey AJ, Wall JS, Jackson SP, Hough PV (1991). DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 88: 5670-5674.

McCormick F (1993). How receptor turn Ras on. *Nature (London)*, 363: 15-16.

Merchant JL, Du M & Todisco A (1999). Sp1 phosphorylation by Erk2 stimulates DNA binding. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 254: 454-461.

Merika M & Orkins SH (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Molecular and Cellular Biology*, 15: 2437-2447.

Michalowsky LA & Jones PA (1989). Gene structure and transcription in mouse cells with extensively demethylated DNA. *Molecular and Cellular Biology*, 9: 885-892.

Milanini J, Viñals F, Pouyssegur J & Pagès G (1998). p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 18165-18172.

Miltenberger RJ, Farnham PJ, Smith DE, Stommel JM & Cornwell MM (1995). V-Raf activates transcription of growth-responsive promoters via GC-rich sequences that bind the transcription factor Sp1. *Cell Growth & Differentiation*, 6: 549-556.

Mortensen ER, Marks PA, Shiotani A & Merchant JL (1997). Epidermal growth factor and okadaic acid stimulates Sp1 proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 16540-16547.

Murata Y, Kim HG, Rogers KT, Udvardia AJ & Horowitz JM (1994). Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 trans-activation domain. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 20674-20681.

Niwa H, Yamamura K & Miyazaki J (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108, 193-199.

Noda M. (1993a). Structures and functions of the K-rev-1 transformation suppressor gene and its relatives. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1155: 97-109.

Noda M (1993b). Mechanisms of reversion. *The FASEB Journal*, 7: 834-840.

Noda M, Kitayama H, Sugimoto Y, Okayama H, Bassin RH & Ikawa Y (1989). Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated ras genes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 86: 162-166.

Noda M, Selinger Z, Scolnich EM & Bassin RH (1983). Flat revertants isolated from Kirsten sarcoma virus-transformed cells are resistant to the action of specific oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 80: 5602-5606.

Noti JD, Reinemann RC & Petrus MN (1996). Sp1 binds two sites in the CD11c promoter in vivo specifically in myeloid cells and cooperates with Ap1 to activate transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 2940-2950.

Ofir R, Novick I, Krup M, Cleveland JL, Ihle JN & Weinstein Y (1995). Structural and functional analysis of the promoter of the murine V γ 1.1 T cell receptor gene. *European Journal of Immunology*, 25: 3070-3078.

Ohlsson C, Kley N, Werner H & Leroith D (1998). p53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology*, 139: 1101-1107.

Ohshima Y & Gotoh Y (1987). Signals for the selection of a splice site in pre-mRNA computer analysis of splice junction sequences and like sequences. *Journal of Molecular Biology*, 195: 247-259.

Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD & Sakai T (1993). CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene*, 8: 1063-1067.

Paganetti PA, Caroni P & Schwab ME (1988). Glioblastoma infiltration into central nervous system tissue in vitro: involvement of a metalloprotease. *Journal of Cell Biology*, 107: 2281- 2291.

Pal S, Claffey KP, Cohen HT & Mukhopadhyay D (1998). Activation of Sp1-mediated Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor transcription requires specific interaction with protein kinase C ξ . *Journal of Biological Chemistry*, 273: 26277-26280.

Pascal E & Tjian R (1991). Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcription synergism. *Genes & Development*, 5: 1646-1656.

Pawson T (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373: 573-580.

Pawson T & Saxton TM (1999). Signaling networks-do all roads lead to the same genes? *Cell*, 97:675-678.

Penar PL, Khoshyomn L, Bhushan A & Tritton TR (1998). Inhibition of glioma invasion of fetal brain aggregates. *In vivo*, 12: 75- 84.

Penar PL, Khoshyomn S, Bhushan A & Tritton TR (1997). Inhibition of epidermal growth factor receptor- associated tyrosine kinase blocks glioblastoma invasion of the brain. *Neurosurgery*, 40: 141- 151.

Perkins ND, Agranoff AB, Pascal E & Nabel GJ (1994). An interaction between the DNA-binding domains of Rel A (p65) and Sp1 mediates human immunodeficiency virus gene activation. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 6570-6583.

Price MA, Rogers AE & Treisman R (1995). Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). *EMBO Journal*, 14: 2589-2601.

Ptashne M (1988). How eucaryotic transcriptional activators work. *Nature*, 335: 683-689.

Pugh BF & Tjian R (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell*, 61: 1187-1197.

Pugh BF & Tjian R (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes and Development*, 5: 1935-1945.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E & Werner T (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Research*, 23: 4878-4884.

Reed R (1989). The organization of 3'splice-site sequences in mammalian introns. *Genes & Development*, 3: 2113-2123.

Resnitzky D, Gossen M, Bujard H & Reed S I (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with na inducible system. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 1669-1679.

Rodenhuis S (1992). Ras and human tumors. *Seminars in Cancer Biology*, 3: 241-247.

Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, Lei J & Glazer RI (1997). Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 21137-21141.

Roos MD, Su K, Baker JR & Kudlow JE (1997). O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Molecular and Cellular Biology*, 17: 6472-6480.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniats T (1989). *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 74: 5463-5467.

Sasahara RM, Takahashi C & Noda M. Involvement of the Sp1 site in *ras*-mediated downregulation of the *RECK* metastasis suppressor gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264: 668-675, 1999.

Sasahara RM, Valentini SR & Armelin MCS (1995). Molecular basis of glucocorticoid action in transformed to normal phenotypic reversion. *Anais do Simpósio Nipo-Brasileiro de Ciência e Tecnologia*, 94- 95.

Schafer D, Hamm-Kunzelmann B & Brand K (1997). Glucose regulates the promoter activity of aldolase A and pyruvate kinase M₂ via dephosphorylation of Sp1. *FEBS*, 417:325-328.

Schroeder M & Mass MJ (1997). CpG methylation inactivates the transcriptional activity of the promoter of the human p53 tumor suppressor gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235: 403-406.

Shin TH, Paterson AJ, Grant III JH, Meluch AA & Kudlow JE (1992). 5-Azacytidine treatment of HA-A melanoma cells induces Sp1 activity and concomitant transforming growth factor alfa expression. *Molecular Cellular Biology*, 12: 3998-4006.

Smith CWJ, Chu TT & Nada-Ginard B (1993). Scanning and competition between A_gs are involved in 3'splice site selection in mammalian introns. *Molecular and Cellular Biology*, 13: 4939-4952.

Sowa Y, Orita T, Minamikawa S, Nakano K, Mizuno T, Nomura H & Sakai T (1997). Histone deacetylase inhibitor activates the WAF/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 241: 142-150.

Stewart T; Pattengale PK & Leder P. (1984). Spontaneous mammary adenocarcinoma in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell*, 38: 627- 637.

Su W, Jackson S, Tjian R & Echols H (1991). DNA looping between sites for transcriptional activation: self- association of DNA-bound Sp1. *Genes and Development*, 5: 820-826.

Swick AG, Blake MC, Kahn JW & Azizkhan JC (1989). Functional analysis of GC element binding and transcription in the hamster dihydrofolate reductase gene promoter. *Nucleic Acids Research*, 17: 9291-9304.

Tabor S & Richardson CC (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 84: 4767-4771.

Takahashi C, Akiyama N, Matsuzaki T, Takai S, Kitayama H & Noda M (1996). Characterization of a human MSX-2 cDNA and its fragment isolated as a transformation suppressor gene against v-Ki-ras oncogene. *Oncogene*, 12: 2137-2146.

Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T & Noda M (1998). Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 95: 13221- 13226.

Takebe Y, Seki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota Y, Arai K, Yoshida M & Arai N (1988). SR α promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 Long Terminal Repeat. *Molecular and Cellular Biology*, 8: 466-472.

Tamaki M, McDonald W, Amberger VR, Moore E & Del-Maestro RF (1997). Implantation of C6 astrocytoma spheroid into collagen type I gels: invasive, proliferative, and enzymatic characterizations. *Journal of Neurosurgery*, 87: 602- 9.

Taylor SM & Jones PA (1982). Mechanism of action of eukaryotic DNA methyltransferase: use of 5- azacytosine- containing DNA. *Journal of Molecular Biology*, 162: 679- 692.

Thomas PS (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. RECK *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 77: 5201-5205.

Travis A, Hagman J, Grosschedl R (1991). Heterogeneously initiated transcription from the pre-B- and B-cell-specific mb-1 promoter: analysis of the requirement for upstream factor-binding sites and initiation site sequences. *Molecular and Cellular Biology*, 11: 5756-5766.

Tsuji Y, Torti SV & Torti FM (1998). Activation of the ferritin H enhancer, FER-1, by the cooperative action of members of the AP1 and Sp1 transcription factor families. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 2984-2992.

Udvardia AJ, Rogers KT, Higgins PD, Murata Y, Martins KH, Humphrey PA & Horowitz JM (1993). Sp1-binds promoter elements regulated by the RB protein and Sp-1 mediated transcription is stimulated by RB coexpression. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 90: 3265-3269.

Udvardia AJ, Templeton DJ & Horowitz JM (1995). Functional interaction between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: Superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 92: 3953-3957.

Valentini SR & Armelin MCS (1996). Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. *Journal of Endocrinology*, 148: 11-17.

Vlach J, Garcia A, Jacqué J, Rodriguez MS, Michelson S & Virelizier J (1995). Induction of sp1 phosphorylation and NF-kB-independent HIV promoter domain activity in T lymphocytes stimulated by okadaic acid. *Virology*, 208: 753-761.

Wingender E, Kel AE, Kel OV, Karas H, Heinemeyer T, Dietze P, Knuppel R, Romaschenko AG & Kolchanov NA (1997). TRANSFAC, TRRD AND COMPEL: towards a federated database system on transcriptional regulation. *Nucleic Acids Research*, 25: 265-268.

Xiao H, Hasegawa T & Isobe K (1999). Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21^{waf1} promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 73: 291-302.

Yamamoto T, Taya S & Kaibuchi K (1999). Ras-induced transformation and signaling pathway. *Journal of Biochemistry* (Tokyo), 126: 799-803.

Ye J, Xu RH, Taylor-Papadimitriou J & Pitha PM (1996). Sp1 binding plays a critical role in Erb-B2- and v-ras-mediated downregulation of α 2-integrin expression in human mammary epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 6178-6189.

Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T & Hirohashi S (1995). Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 92: 7416-7419.

Zawel L & Reinberg D (1995). Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 533-561.

Zhang M, Maass N, Magit D & Sager R (1997). Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin. *Cell Growth & Differentiation*, 8: 179-186.

Zhang S & Kim K (1997). Protein kinase CK2 down-regulates glucose-activated expression of the acetyl-CoA carboxylase gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 338: 227-232.

Zutter MM, Ellen ER & Painter AD (1997). Binding of phosphorylated Sp1 protein to tandem Sp1 binding sites regulates α 2 integrin gene core promoter activity. *Blood*, 90: 678-689.