BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
Ej. 305

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

# Caracterização do envolvimento do gene *RECK* na proliferação celular e progressão tumoral: inversa correlação com a expressão do oncogene c-*myc*

**Sheila Maria Brochado Winnischofer**

**Orientação: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar**

Tese de Doutoramento apresentada ao
Departamento de Bioquímica – USP

Data da defesa do trabalho: 24/05/2005
Vinte e quatro de Maio de Dois mil e cinco

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011111

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

Winnischofer, Sheila Maria Brochado
W776c Caracterização do envolvimento do gene *RECK* na proliferação celular e progressão tumoral : inversa correlação com a expressão do oncogene c-*myc* / Sheila Maria Brochado Winnischofer. -- São Paulo, 2005.
152p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Sogayar, Mari Cleide

1. Expressão gênica 2. Proliferação : Celular 3. Tumores malignos I. T. II. Sogayar, Mari Cleide, orientador.

574.88 CDD

# "Caracterização do envolvimento do gene *RECK* na proliferação celular e progressão tumoral: correlação inversa com a expressão do oncogene *c-myc*"

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

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.

**Aprovado(a) por:**

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

Prof. Dr. SÉRGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ – USP

Profa. Dra. LUISA LINA VILLA LUDWIG

Profa. Dra. SUELY KAZUE NAGAHASHI MARIE
FM – USP

Prof. Dr. RAFAEL LINDEN
UFRJ

SÃO PAULO
24 DE MAIO 2005

*Viver.. e não ter a vergonha de ser feliz..*

*Cantar.. e cantar.. e cantar  a beleza de ser um eterno aprendiz....*

*(O Que é, O Que é... Gonzaguinha)*

*Ao meu esposo Herbert*

*Por seu amor, seu carinho e sua dedicação*

*Aos meus pais, exemplos de vida e amor*

## Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram e me incentivaram a cursar este caminho e concluir este trabalho.

À Profa. Mari Cleide Sogayar por ter acreditado em mim desde o primeiro dia. Por ter me dado grandes oportunidades durante todos esses anos, oportunidades inigualáveis tanto para minha carreira científica como para minha vida pessoal. Obrigada por me fazer acreditar que um sonho sempre vale a pena. Obrigada pela orientação, convivência, carinho e amizade.

À Profa. Ana Carla Goldberg por me incentivar em todas as nossas conversas.

À minha querida Maria Leonor, que me ensinou desde os primeiros dias no laboratório, que mesmo estando mais "longe" está sempre por perto nos momentos mais importantes. Obrigada por acreditar em mim e pela nossa amizade.

À minha querida Maki.. é impossível descrever em palavras toda a dedicação, carinho, amizade e incentivo que você me proporcionou. Obrigada por ser esta pessoa tão especial, por ser minha amiga e companheira para todas as horas.

À Profa. Silvya Stuchi, por estar além de minha colaboradora, por ser minha amiga e companheira. Por me incentivar em todos os momentos.

Ao Prof. José Mauro Granjeiro por viver a ciência intensamente, viver de um jeito todo especial. Com você aprendi a ver sempre o lado bom e feliz da vida.. a viver de uma maneira muito mais divertida..

À Rita, por termos caminhado juntas todos esses anos.. Foi maravilhoso ter uma companheira e amiga como você. Obrigada por tudo !!!

À Marina, pela convivência, carinho, empolgação e amizade neste último ano..

A vocês duas, Rita e Marina... obrigada por me fazerem aprender cada vez mais...

À Fernanda Ortis por sua amizade desde os meus primeiros dias no laboratório.. mesmo você estando longe, continua muito perto de nós... Obrigada por seus e-mails sempre carinhosos..... Obrigada pela sua amizade, seu carinho, seu incentivo..

À toda a turma "antiga" do laboratório.. Maki, Léo, Fernanda Ortis, Lúcia Helena, Malu, Mário, Renato, Cleber, Áurea, Roberto.. obrigada por tudo..

À todos os amigos do laboratório Ana Carolina, Ana Paula, André, Antero, Carol, Christian, Débora, Denise, Diana, Fernanda Festa, Fernando, Gabriela, Dna Helena, Ilana, Ísis, Juan, Juliana, Karin, Leonardo, Letícia, Luana, Luciana Gomes, Luciana Cruz, Marcos, Marina, Patrícia, Renata, Sandra, Theri, Vitor, Wagner e Zizi.

À querida Mariana Callero, por seu carinho e amizade.

Ao meu companheiro de "aventuras" Wagner.. não dá nem para descrever todos os momentos que passamos juntos.. Ribeirão, Salvador, aulas da Veterinária... momentos engraçados, tristes, estressantes.. inesquecíveis..

Aos queridos amigos Theri e Ricardo obrigada pelo carinho e amizade de todos estes anos... Vocês são pessoas muito especiais...

À dupla Fernanda Festa e Leonardo... impossível descrever vocês dois separados.. Obrigada por tudo !!!!!

Às amigas Letícia e Karin.. obrigada pelas discussões sempre estimulantes...

Ao Christian, Ana Paula, Diana.. obrigada pelo carinho, amizade e ajuda em todos os momentos...

Aos amigos Juan e Luciana... obrigada pelo carinho e amizade.

Aos queridos amigos do "Grupo do RECK" Antero, Christian, Fernanda Festa, Marcos, Marina e Rita, quero que saibam que existe "um pedacinho" de cada um de vocês neste trabalho.. obrigada pelas nossas discussões.. as críticas e sugestões foram muito importantes para o meu crescimento científico..
Obrigada, acima de tudo, pela nossa amizade..

Ao corpo técnico do laboratório Débora, Dna Helena, Luana, Patrícia, Ricardo, Sandra e Zizi, pelos excelentes serviços prestados e pela amizade.

À Dna Helena, por sua dedicação, amizade e competência admirável...

À minha querida amiga Zizi.. obrigada por todos os momentos de descontração e boas risadas.. Trabalhar com você é um privilégio..você é uma pessoa inesquecível..

Aos bebês mais fofos Júlia, Carlinhos, Juan Martin, Luísa, Marcus Vinícius e aos mais novos integrantes desta "família" Cecília, Sofia e Matheus.. obrigada por trazerem mais alegria ao nosso laboratório..

Aos meus queridos amigos colaboradores Tati e Laura, Juliano e Mirian, Lúcia e Cibele, SueliOba.. vocês não tem idéia do quanto contribuíram para este trabalho !! Colaborar com cada um de vocês foi um privilégio.. Obrigada pelas discussões sempre empolgantes..

Aos Profs. Yolanda Cuccovia, Carla Columbano e Ronaldo Quaggio pelas críticas e sugestões na minha qualificação.

Aos meus queridos amigos Fábio e Mirian, César e Juliana, Gláucia e Eduardo, Ricardo e Chris.. obrigada pela nossa amizade que dura até hoje.. pelos bons momentos que passamos juntos.. Vocês são pessoas muito especiais para mim...

Ao Prof. Hugo Armelin e todo o seu grupo pelas discussões e sugestões nos seminários de sexta-feira.

Ao Prof. Roberto Santelli pelo incentivo e amizade.. Você faz muita falta por aqui..

Ao Prof. Luiz Henrique Catalani pela disponibilidade no uso do luminômetro.

Ao Prof. Rui Curi e a pós-graduanda Taís Lima pela disponibilidade e ajuda no uso do citômetro de fluxo.

À toda minha família por me ensinarem a verdadeira "ciência de viver"...
Em especial, à minha irmã.. por ser minha amiga mais especial... e ao Márcio, por ser meu cunhado "preferido"....
Aos meus primos, padrinhos e afilhados.. Erich e Carol, Vivian e Gilberto.. vocês são pessoas muito especiais e importantes para mim... Obrigada por tudo !!!

Ao Instituto de Química-USP pelo apoio institucional e a todos os seus funcionários pelos serviços prestados.

## Apoio Financeiro

**FAPESP:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

**CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

**FINEP:** Financiadora de Estudos e Projetos.

**PRP-USP:** Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo.

## Índice Geral


I Índice de Figuras e Tabelas....4

II Abreviaturas....7

III Resumo....9

IV Abstract....10

1. Introdução....11

1.1. A matriz extracelular....11

1.1.1. Metaloproteinases de matriz....12

1.1.2. Controle da atividade de metaloproteinases de matriz....14

1.2. O gene *RECK*....16

1.3. O proto-oncogene c-*myc*....21

1.3.1. O fator de transcrição c-Myc....22

1.3.2. A rede Myc/Max/Mad....23

1.3.3. A Estrutura da Cromatina e o Processo de Transcrição Gênica....25

1.3.4. Repressão transcricional mediada por Myc....26

1.4. O ciclo celular....29

1.4.1. O controle da atividade de Rb e o papel de E2F....31

1.4.2. O papel de Myc na progressão do ciclo celular....33

1.5. A Glia e o Sistema Nervoso Central....35

1.5.1. Tumores do Sistema Nervoso Central....35

2. Objetivos do trabalho....41

3. Materiais e Métodos....42

3.1. Plasmídeos....42

3.2. Linhagens celulares....43

3.3. Soluções e meio de cultura para células de mamíferos....45

3.4. Soluções e meio de cultura para bactérias....45

3.5. Isótopos radioativos....45

3.6. Antisoros....45

3.7. Soluções....46

3.8. Cultura de Células....46

3.9. Amostras Teciduais....46
3.10. Culturas Primárias de Tumores e Tecido Normal de Cérebro....47
3.11. Preparo de bactérias competentes utilizando $CaCl_2$ e transformação de *Escherichia coli* com DNA plasmideal....49
3.12. Preparação de DNA plasmideal em média escala....49
3.13. Transfecção estável de células de mamíferos com DNA plasmideal..50
3.14. Isolamento dos clones celulares....51
3.15. Transfecção Transitória - Medida da Atividade de Luciferase....51
3.16. Ensaio de Northern Blot....52
3.17. Ensaio de Hibridização Molecular - CodeLink "bioarrays"....54
3.18. Reação de Transcrição Reversa....56
3.19. PCR em tempo real....56
3.20. Ensaio de Western blot....57
3.21. Imunohistoquímica....58
3.22. Curva de Crescimento....58
3.23. Análise por Citometria de Fluxo....59
3.24. Análises Estatísticas....59
4. Resultados....60
4.1. O gene *RECK* e a progressão do ciclo celular....60
4.1.1. Análise da expressão do gene *RECK* durante a progressão do ciclo celular....60
4.1.2. Inibição da expressão do gene *RECK* mediada pelo aumento da densidade celular....63
4.1.3. Análise do efeito da superexpressão de RECK na progressão do ciclo celular....65
4.1.4. RECK altera a progressão do ciclo celular por ser capaz de induzir a expressão do inibidor de CDK: $p21^{Cip/Kip}$....72
4.2. Regulação da expressão do gene *RECK* pelo oncogene c-*myc*....87
4.2.1. A atividade transcricional do gene *RECK* é regulada por c-Myc....87
4.2.2. Sítios Sp1 contidos no promotor do gene *RECK* medeiam a repressão pelo produto do oncogene c-*myc*....91

4.2.3. A inibição do gene *RECK* mediada pelo produto do oncogene c-*myc* é dependente do mecanismo de acetilação de histonas..94
4.3. Os genes *RECK* e c-*myc* e os tumores do Sistema Nervoso Central...97
4.3.1. Confirmação da superexpressão de c-*myc* durante a progressão maligna de gliomas....97
4.3.2. Análise da expressão do gene *RECK* durante a progressão de gliomas humanos....99
4.3.3. Modulação da expressão do gene *RECK* pode ser considerada um marcador prognóstico para gliomas humanos....104
4.3.4. Expressão da proteína RECK durante a progressão maligna de gliomas humanos....106
5. Discussão....108
5.1. O gene *RECK* e a progressão do ciclo celular....108
5.2. Possíveis mecanismos moleculares da ação de *RECK*....111
5.3. Regulação da expressão de *RECK* mediada pelo oncogene c-*myc*....115
5.4. Os genes *RECK*, c-*myc* e os tumores do Sistema Nervoso Central...121
5.5. RECK pode ser um modulador da expressão de genes envolvidos na progressão maligna de gliomas....128
6. Considerações Finais....131
7. Bibliografia....134
*Curriculum Vitae*....149

# I. Índice de Figuras e Tabelas

## Figuras

**Figura 1.1.1.** Possíveis mecanismos de sinalização celular mediado por MMPs.....13
**Figura 1.2.1.** Estrutura primária da proteína RECK.....17
**Figura 1.2.2.** Modelo da regulação da atividade de MMPs por RECK.....18
**Figura 1.3.1.** Associação de diversos fatores aos domínios funcionais da proteína c-Myc.....23
**Figura 1.3.2.** A rede Myc/Max/Mad.....24
**Figura 1.3.3.** Mecanismos de repressão transcricional mediados por c-Myc.....28
**Figura 1.4.1.** O ciclo celular.....30
**Figura 1.4.2.** Regulação da atividade de E2F.....32
**Figura 1.5.1.** Ação de MMPs no processo de tumorigênese.....38
**Figura 3.1.1.** Construção e mecanismo de ação da proteína de fusão MycER™.....44
**Figura 4.1.1.** Indução de c-*myc* por soro em células quiescentes e consequnete entrada das células na fase S do ciclo celular é acompanhada pela repressão da expressão de *RECK*.....62
**Figura 4.1.2.** Repressão da expressão de c-*myc* em fibroblastos normais durante a inibição de crescimento mediada pelo aumento de densidade celular e concomitante inibição da entrada das células na fase S é acompanhada pela indução da expressão do gene *RECK*.....64
**Figura 4.1.3.** Morfologia da população transfectante Pop-hRECK em comparação com a população transfectante controle Pop-pCXN2 e a linhagem parental.....66
**Figura 4.1.3.1.** Expressão constitutiva de hRECK na população transfectante Pop-hRECK.....67
**Figura 4.1.3.2.** Curvas de crescimento das diferentes populações transfectantes em comparação com a linhagem parental NIH-3T3.....69
**Figura 4.1.3.3.** Superexpressão do gene *RECK* promove um retardo na progressão G0/G1-S do ciclo celular.....71
**Figura 4.1.4.** Perfil de hibridização – CodeLink Bioarrays.....73

**Figura 4.1.4.1.** Distribuição funcional dos possíveis genes diferencialmente expressos na população Pop-hRECK....75
**Figura 4.1.4.2.** RECK altera a progressão do ciclo celular por modular, entre outros alvos, a expressão do inibidor de CDK p21....84
**Figura 4.1.4.3.** RECK altera a progressão do ciclo celular por retardar a fosforilação da proteína pRb....86
**Figura 4.2.1.** Myc reprime a expressão do gene *RECK* por alterar a atividade promotora deste gene....88
**Figura 4.2.1.1.** Detecção da porção na região promotora do gene *RECK* de camundongo responsiva à c-*myc*....90
**Figura 4.2.2.** Seqüência nucleotídica de 600pb da região 5´-flanqueadora e o exon-1 do gene *RECK* de camundongo....92
**Figura 4.2.2.1.** Detecção dos sítios de ligação à fatores de transcrição responsíveis à c-*myc* que medeiam a repressão da expressão do gene *RECK*....93
**Figura 4.2.3.** A inibição da expressão do gene *RECK* mediada pelo oncogene c-*myc* parece ser dependente de mecanismos remodeladores da cromatina....96
**Figura 4.3.1.** A expressão do gene c-*myc* é regulada positivamente durante a progressão de gliomas humanos....98
**Figura 4.3.2.** Expressão do gene *RECK* não é modulada em gliomas humanos com diferentes graus de malignidade....100
**Figura 4.3.2.1.** Análises citoquímicas em culturas primárias derivadas de tecidos normais e tumorais humanos com diferentes graus de malignidade....102
**Figura 4.3.2.2.** Expressão do gene *RECK* não é modulada em culturas primárias derivadas de gliomas humanos com diferentes graus de malignidade....103
**Figura 4.3.3.** A maior expressão de *RECK* no tumor é correlacionada com um melhor prognóstico para pacientes com gliomas de graus mais elevados da doença....105
**Figura 4.3.4.** Distribuição tecidual da proteína RECK durante a progressão de gliomas humanos....107
**Figura 5.2.1.** Possível envolvimento de Smads na inibição de crescimento mediada por RECK....113

**Figura 5.4.1.** Alinhamento da seqüência correspondente ao transcrito de *RECK* no genoma humano.....126

## Tabelas

**Tabela 3.9.1.** Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.....48

**Tabela 4.1.4.** Representação dos possíveis genes diferencialmente expressos na linhagem Pop-hRECK organizados por processos biológicos, segundo classificação do "Gene Ontology".....76

## II. Abreviaturas

| | |
|---|---|
| 36B4 | - Fosfoproteína PO ribossomal ácida. |
| AP-1 | - Proteína ativadora –1. |
| bHLH/LZ | - Domínio "basic-helix-loop-helix leucine zipper". |
| CAK | - Quinase ativadora de ciclina |
| CBP | - Proteína ligante de CRE. |
| CDK | - Quinase dependente de ciclina. |
| CKIs | - Proteínas inibitórias de CDKs. |
| Cip/Kip | - "CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein". |
| CMV | - Citomegalovírus. |
| CNS | - Sistema Nervoso Central. |
| CRE | - Elemento responsivo a cAMP. |
| Cys | - Cisteína |
| DMEM | - "Dulbecco´s Modified Eagle´s Médium". |
| DMSO | - Dimetilsulfóxido. |
| DNA | - Ácido desoxiribonucléico. |
| Ebox | - "enhancer Box". |
| ECM | - Matriz extracelular. |
| EDTA | - Ácido etileno bisoxietilenonitrilo tetracético. |
| EGF | - Fator de crescimento epidermal. |
| ER | - Receptor de estrógeno. |
| ERK | - Proteína quinase regulada por sinais extracelulares. |
| FACS | - Citometria de fluxo |
| FCS | - Soro fetal bovino. |
| FGF | - Fator de crescimento de fibroblastos. |
| GAPDH | - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. |
| GBM | - Glioblastoma multiforme. |
| GFAP | - "Glial fibrillary acidic protein". |
| GPI | - Glicosilfosfatidilinositol. |
| HAT | - Histona acetil transferase. |
| HDAC | - Histona Desacetilase. |
| IGF | - Fator de crescimento semelhante a insulina. |
| IgG | - Imunoglobulina G. |
| Ink4 | - "Inhibitor of CDK4". |
| JNK | - Proteína quinase N-terminal de Jun. |
| kDa | - Kilodalton. |
| MAPK | - Proteína quinase ativada por mitógeno |
| MMP | - Metaloproteinases de matriz. |
| MOPS | - Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfônico. |
| NF-κB | - Fator nuclear-κB. |
| OD | - Densidade óptica. |
| OHT | - 4 - Hidroxitamoxifeno. |
| pb | - Pares de bases. |
| PBSA | - Solução salina tamponada pH 7,2. |
| PCR | - Reação de polimerase em cadeia. |

| | |
|---|---|
| PDGF | - Fator de crescimento derivado de plaquetas. |
| PEA3 | - "Polyomavirus enhancer-A-binding protein 3". |
| PKC | - Proteína quinase C. |
| PLC | - Fosfolipase C |
| pRb | - Proteína de retinoblastoma. |
| RECK | - "REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs". |
| RNA | - Ácido ribonucléico. |
| SDS | - Dodecil sulfato de sódio. |
| SSC | - Solução salina contendo citrato de sódio, pH 7,0. |
| SSPE | - Solução salina contendo sódio, fosfato e EDTA, pH 7,0. |
| Smad | - Proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição. |
| SPI | - Inibidor de serina protease. |
| SV40 | - Vírus de sarcoma de símios. |
| TAD | - Domínio de ativação transcricional. |
| TAE | - Tampão Tris-Acetato-EDTA, pH 7,5. |
| TE | - Tampão Tris-EDTA, pH 8,0. |
| TGF-β | - Fator de crescimento transformante - β. |
| TIMP | - Inibidor tecidual de metaloproteinases. |
| TSA | - Tricostatina A. |
| TK | - Timidina quinase. |
| UTR | - "Untranslated region". |
| WHO | - Organização Mundial da Saúde. |

# III. Resumo

Este trabalho mostra o envolvimento do gene *RECK* no processo de progressão do ciclo celular. Foi verificado que a expressão endógena de *RECK* é modulada durante a progressão do ciclo celular. A superexpressão de RECK em fibroblastos normais de camundongo promove uma diminuição da capacidade proliferativa das células e um retardo da transição das fases G0/G1-S do ciclo celular. Além disso, os resultados sugerem que um dos possíveis mecanismos de ação de RECK, que promovem este processo, envolve a indução da expressão de um inibidor de CDK, especificamente de p21, e retardo da fosforilação de pRb.

Os resultados indicam, ainda, que durante a progressão do ciclo celular a expressão do gene *RECK* apresenta uma correlação inversa com a expressão do proto-oncogene c-*myc*. Estes dados corroboram os dados da literatura que mostram *RECK* como um alvo para o produto de diversos oncogenes, como *ras* e c-*myc*. A caracterização da repressão de *RECK* por c-Myc mostrou que a mesma ocorre ao nível transcricional e que sítios Sp1, presentes no promotor de *RECK*, são essenciais para a ação de Myc. Dados adicionais sugerem que a repressão de *RECK* por c-Myc parece envolver mecanismos de desacetilação de histonas.

A modulação da expressão de *RECK* também foi avaliada durante a progressão maligna de tumores do sistema nervoso central (especificamente, gliomas). Foi verificado que a expressão de *RECK* não é alterada com a progressão deste tipo de tumor. Porém, foi verificado que os pacientes que manifestaram um maior tempo de sobrevida apresentaram tumores com uma significativa maior expressão do gene *RECK*. Estes dados sugerem que RECK possa ser um possível marcador prognóstico.

A caracterização da regulação da expressão de RECK, tanto em células normais como em diferentes tipos de tumores, assim como os alvos moleculares da sua ação, são pontos muito importantes para o entendimento dos mecanismos que controlam a proliferação celular e podem contribuir para o desenvolvimento de novas formas de terapia anti-tumoral.

## IV. Abstract

This work shows, for the first time, the involvement of the *RECK* gene in cell cycle progression. Our data shows that the *RECK* gene product regulates cell cycle progression by altering the G1 to S transition. Also, we show that RECK is able to induce p21 expression and, consequently, lead to hypophosphorylation of the Rb protein, revealing at least one molecular mechanism through which RECK modulates the cell cycle progression.

It has been described that induction of the c-Myc transcription factor promotes cell proliferation and cell transformation by regulating several genes that are involved in cell cycle progression. Here, we show that activation of a Myc-estrogen receptor fusion protein with 4-hydroxytamoxifen in mouse fibroblasts was sufficient to repress the expression of the RECK gene, by acting at the RECK promoter region. In addition, we show that Myc-responsiveness seems to be mediated by the upstream Sp1 sites and to be dependent on cromatin remodelling mechanisms.

*RECK* gene expression was also evaluated during human glioma progression. Our results indicate that *RECK* gene expression is not altered during glioma progression, but a correlation was found between the abundance of RECK expression in gliomas and patient survival. The levels of *RECK* expression can be considered a good prognostic indicator for glioma patients.

Better understanding of RECK gene regulation may contribute to uncover the mechanisms of cell cycle and tumor progression, and to the development of new strategies for cancer prevention and therapeutic intervention.

# 1. Introdução

## 1.1. A matriz extracelular

A matriz extracelular (ECM) corresponde a complexos macromoleculares, formados por moléculas de diferentes naturezas que são produzidas, exportadas e complexadas pelas células, modulando a estrutura, fisiologia, função e biomecânica dos tecidos. A ECM pode ser dividida em três componentes principais: os componentes fibrilares, os componentes não-fibrilares e as microfibrilas. Os componentes fibrilares são representados pelos colágenos fibrilares e pelas fibras elásticas. Os componentes não-fibrilares correspondem aos proteoglicanos e ao grande grupo das glicoproteínas não-colagênicas. Já as microfibrilas da matriz extracelular são formadas pelo colágeno tipo VI e pelas microfibrilas associadas a elastina (Carvalho, 2001).

A interação da ECM com as células adjacentes é promovida por receptores de matriz, dos quais as integrinas constituem a classe mais importante. A matriz extracelular promove não somente um suporte estrutural para células e tecidos, mas também desempenha um papel muito importante na regulação do comportamento das células em um organismo multicelular. Durante o crescimento e o desenvolvimento animal as células passam por estágios de crescimento, diferenciação e migração, sendo essencial que a matriz sofra um remodelamento contínuo de forma a atender a estes diferentes processos celulares (Bosman & Stamenkovic, 2003, Vu & Werb, 2000).

A ECM funciona como um "reservatório" de fatores de crescimento, fatores de diferenciação, fatores angiogênicos e citocinas, que podem ser liberados e/ou ativados à medida que as moléculas da matriz são degradadas. O remodelamento da ECM é importante também em certas condições patológicas, por exemplo nos processos de cicatrização de lesões, osteoporose, artrite reumatóide e tumorigênese (Werb, 1997). No caso específico do câncer, as células tumorais recebem todo o aporte de oxigênio e nutrientes pelo recrutamento de novos vasos sanguíneos ao interior da massa tumoral (processo chamado de angiogênese tumoral) e são capazes de migrar a partir de seu sítio original pela capacidade de degradação e penetração

na lâmina basal e outras estruturas da ECM (processo de invasão e metástase) (Hanahan & Folkman, 1996, Stetler-Stevenson, 1999).

### 1.1.1. Metaloproteinases de matriz

Uma família de proteases extracelulares, chamada de metaloproteinases de matriz (MMPs), é essencial para o adequado remodelamento da ECM (Vu & Werb, 2000). A primeira MMP a ser descrita (Gross & Lapiere, 1962) foi identificada através de sua atividade colagenolítica e a capacidade de hidrolizar caudas de girino. Esta observação levou a subseqüente descoberta de diversas enzimas relacionadas. Atualmente, existem mais de 20 MMPs caracterizadas em mamíferos e numerosos homólogos em outros organismos (Bosman & Stamenkovic, 2003). Estas enzimas são produzidas como precursores inativos contendo uma porção $NH_2$-terminal que deve ser removida para que a enzima se torne efetivamente ativa (Nagase & Woessner, 1999, Visse & Nagase, 2003). Deste modo, a atividade das MMPs pode ser regulada de diferentes maneiras: através do controle da expressão gênica, da ativação da pró-enzima e pela inibição direta da sua atividade enzimática mediada por diversos inibidores.

As MMPs foram inicialmente nomeadas de acordo com sua especificidade de substrato. Deste modo, MMPs são também conhecidas como colagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelisinas (MMP-3, 10 e 11), matrilisinas (MMP-7 e 26) e MMPs tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25; conhecidas como MT1-MMP a MT6-MMP). Contudo, deve-se ressaltar que elas apresentam uma considerável sobreposição entre as subclasses em termos de sua atividade frente a determinado substrato. Por exemplo, gelatinases A e B (MMP-2 e 9) são capazes de degradar colágeno IV, V e X, assim como a estromelisina-1 (MMP-3). Do mesmo modo, matrilisina-1 (MMP-7) degrada gelatina e colágeno IV e diversas MMPs hidrolisam fibronectina, laminina e proteoglicanos da matriz (Bosman & Stamenkovic, 2003). É bastante aceito que, em combinação, as MMPs podem degradar todas os componentes da ECM.

Além dos substratos da ECM, as MMPs também clivam moléculas da superfície celular, proteínas circulantes, entre outras moléculas, regulando o

comportamento celular de diversas maneiras (Sternlicht & Werb, 2001). Estes processos promovem a alteração das interações célula-célula e célula-matriz, a liberação, ativação (ou inativação) de moléculas sinalizadoras e a ativação (ou inativação) de receptores da superfície celular. A Figura 1.1.1. representa os possíveis mecanismos de sinalização celular mediados por MMPs.

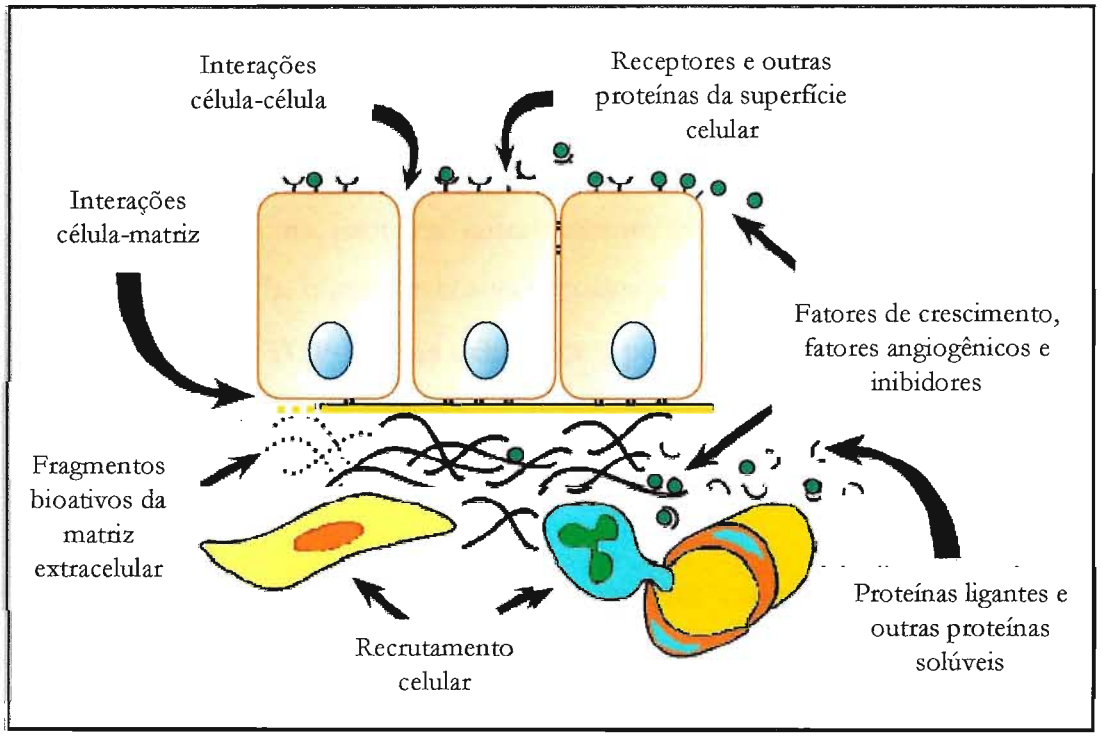



**Figura 1.1.1.** Possíveis mecanismos de sinalização celular mediado por MMPs. A ação proteolítica das MMPs pode alterar as interações célula-célula e célula-matriz, a liberação e/ou ativação de moléculas sinalizadoras e a ativação de receptores da superfície celular (Sternlicht & Werb, 2001).

Deste modo, a degradação da ECM pode ser visualizada não somente como um rompimento e/ou remodelamento de uma barreira estrutural, mas também como reguladora/transdutora de sinais ao interior da célula. A matriz seqüestra moléculas sinalizadoras como os fatores de crescimento e suas proteínas ligantes e atua como disponibilizadora de ligantes para os receptores de adesão celular, como as integrinas, que transduzem sinais para o interior da célula. Assim, a ECM influencia processos celulares importantes como crescimento, mobilidade,

diferenciação e sobrevivência das células, além de processos patológicos, como cicatrização de lesões, doenças inflamatórias e câncer. Por extensão, as MMPs também influenciam estes mesmos processos por alterar a composição e a organização estrutural da ECM.

O remodelamento proteolítico da matriz resulta na liberação de produtos protéicos com atividade biológica. Por exemplo, a clivagem do colágeno fibrilar nativo, dependente de MMPs, expõe resíduos que podem interagir com o receptor integrina $\alpha v\beta 3$, sendo que esta interação promove a sobrevivência e o crescimento de células de melanoma (Petitclerc et al., 1999). A clivagem da laminina-5 por MMP-2 gera fragmentos que induzem a mobilidade de células epiteliais, provavelmente por exposição de sítios na proteína anteriormente inacessíveis (Giannelli et al., 1997). Pode-se citar, ainda, o proteoglicano decorina associado ao colágeno que atua como um depósito para TGF-β e sua degradação, por diversas MMPs, faz com que o TGF-β, anteriormente seqüestrado, seja disponibilizado para as células, influenciando diversas funções biológicas (Imai et al., 1997).

### 1.1.2. Controle da atividade de metaloproteinases de matriz

A atividade das MMPs é regulada, basicamente, por três mecanismos distintos: I) através do controle da expressão gênica; II) através da ativação da pró-enzima e III) pela inibição direta da sua atividade enzimática mediada por inibidores específicos e/ou inespecíficos.

A expressão das MMPs é induzida por citocinas, fatores de crescimento, transformação oncogênica e por interações célula-célula e célula-matriz. Diversos genes de MMPs (MMP1, 3, 7, 9, 10, 12 e 13) são induzidos por estímulos extracelulares, os quais ativam o complexo de transcrição AP-1 (composto por proteínas da família Fos e Jun) que, por sua vez, se liga ao elemento responsivo a AP-1 no promotor dos genes de MMPs, ativando, assim, a transcrição. A indução da expressão e da atividade de AP-1 é mediada por três classes de proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPKs): ERK-1 e ERK-2, quinase N-terminal de Jun ativada por estresse (JNKs) e p38MAPK (Westermarck & Kahari, 1999). Outro elemento *cis*

descrito como PEA3 ("polyomavirus enhancer-A-binding protein 3") está presente no promotor de MMP-1, MMP-3 e MMP-9 e parece cooperar com o elemento AP-1 para a ativação transcricional (Westermarck et al., 1997).

A atividade enzimática de MMPs é, por sua vez, controlada por diversos inibidores específicos e/ou inespecíficos. Em fluídos teciduais, o principal inibidor de MMPs é a α2-macroglobulina, a qual interage com diversas MMPs e forma um complexo altamente estável que é "capturado" por "scavenger receptors", sofrendo o processo de endocitose (Sottrup-Jensen & Birkedal-Hansen, 1989). Assim, a α2-macroglobulina exerce um papel importante na inativação irreversível das MMPs.

Outras moléculas capazes de regular a atividade proteolítica de MMPs são trombospondina 1 e 2. Trombospondina-2 interage com MMP-2, formando um complexo protéico que facilita o processo de endocitose mediado por receptor (Yang et al., 2001b), enquanto que trombospondina-1 interage com as pró-MMPs 2 e 9 bloqueando diretamente a ativação destas enzimas (Bein & Simons, 2000, Rodriguez-Manzaneque et al., 2001).

Entre os inibidores reversíveis de MMPs, as TIMPs ("tissue inhibitor of metalloproteinases") são as enzimas mais bem caracterizadas e consistem de uma família de quatro proteínas estruturalmente relacionadas (TIMP-1 a 4) (Stamenkovic, 2003, Visse & Nagase, 2003). As TIMPs inibem a atividade de MMPs por um mecanismo comum envolvendo a interação do seu resíduo de cisteína N-terminal com o átomo de zinco no sítio ativo das MMPs (Gomis-Ruth et al., 1997). As TIMPs podem ainda modular a ativação de MMPs, especificamente MMP-2 e MMP-9, através da sua interação com a região C-terminal das pró-MMPs (Bode et al., 1994, Strongin et al., 1995). A observação de que a inibição da atividade de MMPs mediada por TIMPs está associada com a diminuição do processo de invasão e angiogênese tumoral levou ao desenvolvimento de inibidores sintéticos similares à TIMPs, apresentando um potencial terapêutico importante para diversos tipos de tumores humanos. Muitos destes inibidores sintéticos estão em testes clínicos atualmente (Brand, 2002, Coussens et al., 2002, Pavlaki & Zucker, 2003).

O inibidor de MMP conhecido como RECK ("REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs") representa o único, caracterizado até o momento,

inibidor de MMPs localizado na superfície celular e será descrito em maiores detalhes a seguir.

## 1.2. O gene *RECK*

O gene *RECK* codifica para uma glicoproteína ancorada a membrana (110KDa), que foi inicialmente isolado a partir do "screening" de uma biblioteca de expressão de cDNA de fibroblasto humano normal com o intuito de desvendar alvos moleculares capazes de induzir a reversão fenotípica da linhagem DT (células NIH-3T3 transformadas com o oncogene v-Ki-*ras*) (Noda et al., 1983, Noda et al., 1989, Noda, 1993, Takahashi et al., 1998).

O gene *RECK* humano foi mapeado no cromossomo 9p13, consistindo de 21 exons e 20 introns que recobrem mais de 87kb do genoma humano (Eisenberg et al., 2002).

A estrutura primária de RECK prediz algumas características importantes desta proteína (Figura 1.2.1.). Primeiro, que RECK apresenta regiões hidrofóbicas em ambas as extremidades, o que sugere que esta proteína seja provavelmente exportada ao espaço extracelular e, segundo, que RECK apresenta um domínio do tipo EGF ("epidermal growth factor") e três domínios do tipo inibidor de serina protease (SPI), um dos quais apresentando a seqüência consenso denominada de motivo Kazal (Laskowski & Kato, 1980).

A proteína RECK permanece ligada à superfície celular através de uma ancoragem por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Foi verificado que a proteína RECK pode ser detectada no sobrenadante de culturas celulares somente quando as células são tratadas com uma fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) ou quando uma proteína RECK mutante (que não apresenta a região hidrofóbica carboxi-terminal onde está o sítio para a modificação GPI) é expressa nas células (Takahashi et al., 1998).

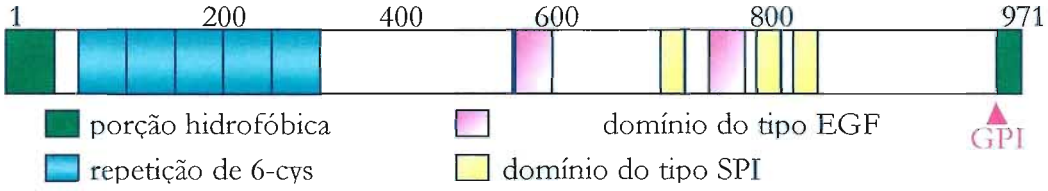



**Figura 1.2.1.** Estrutura primária da proteína RECK. Abreviações: 6-cys: motivo de cisteínas; SPI: inibidor de serina protease; GPI: glicosilfosfatidilinositol. (Takahashi et al., 1998).

Apesar de apresentar os domínios tipo SPI, a atividade de RECK como inibidor de serina proteases não foi demonstrada até o momento. Contudo, RECK é capaz de inibir a atividade de metaloproteinases de matriz.

A primeira indicação de que RECK estaria regulando a atividade das MMPs veio da observação que a expressão constitutiva do gene RECK em células de fibrosarcoma humano (HT1080) resultou em supressão da atividade invasiva destas células, acompanhada de concomitante diminuição da secreção da pró-MMP-9 e inibição da liberação da MMP-2 ativa no sobrenadante da cultura (Oh et al., 2001, Takahashi et al., 1998). De fato, hoje se sabe que RECK regula a atividade proteolítica de três MMPs (MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP) cujas atividades são freqüentemente envolvidas no processo de carcinogênese (Coussens et al., 2000, Davies et al., 1993, Kahari & Saarialho-Kere, 1999, Yamamoto et al., 1996).

O processamento proteolítico da pró-MMP-2 acontece por meio de duas clivagens proteolíticas consecutivas, que ocorrem preferencialmente na membrana plasmática. Em um primeiro momento, um complexo ternário ancorado à membrana consistindo de MT1-MMP, TIMP-2 e pró-MMP-2 é formado na superfície celular e a pró-MMP-2 é clivada de maneira sítio específica (Asn37-Leu38 na proteína humana) pela ação de uma segunda molécula de MT1-MMP ativa, gerando assim a forma intermediária da MMP-2. Em seguida, o domínio residual da forma intermediária é liberado através de uma clivagem auto-proteolítica acompanhando a liberação da forma ativa de MMP-2 na membrana (Butler et al., 1998, Strongin et al., 1995, Wang et al., 2000).

O modelo proposto para a ação de RECK é o de que esta proteína estaria ancorada à membrana plasmática da célula, mediando a inibição da secreção da pró-MMP-9, inibição da atividade da MT1-MMP e ainda promovendo a inibição do processamento proteolítico da MMP-2, inibindo a formação da MMP-2 ativa (Figura 1.2.2.) (Oh et al., 2001, Sasahara et al., 2002, Takahashi et al., 1998).

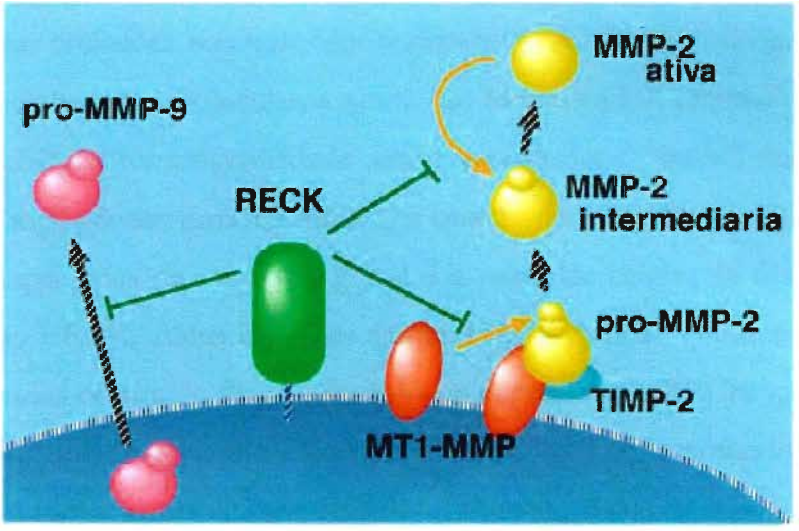



**Figura 1.2.2.** Modelo da regulação da atividade de MMPs por RECK. A proteína RECK é associada à membrana plasmática através de uma âncora GPI. RECK é capaz de inibir a secreção e atividade da pró-MMP-9 e a atividade enzimática das enzimas MT1-MMP e MMP-2 (Oh et al., 2001, Sasahara et al., 2002).

As funções biológicas de RECK *in vivo* foram recentemente exploradas em experimentos utilizando camundongos que sofreram "knock-out" gênico e ensaios de tumorigenicidade em camundongos "nude" (Oh et al., 2001). Camundongos nos quais a proteína RECK funcional está ausente morrem em torno do décimo dia da fase embrionária do desenvolvimento, com deficiências na formação e integridade das fibras de colágeno, desorganização da lâmina basal e comprometimento do desenvolvimento vascular. As redes vasculares são inicialmente formadas nestes embriões, mas aparentemente seu desenvolvimento é "bloqueado" ainda nas fases iniciais. O fenótipo é similar ao apresentado por camundongos que não apresentam a expressão da proteína angiopoitina-1 ou seu receptor Tie-2 (Sato et al., 1995, Suri

et al., 1996), sugerindo que a vasculogênese inicial não é afetada mas os processos subseqüentes de estabilização e remodelamento do sistema vascular são comprometidos (Hanahan & Folkman, 1996, Hanahan, 1997, Risau, 1997). Este fenótipo foi, ainda, parcialmente suprimido pelo "knock-out" adicional do gene correspondente a MMP-2, indicando que a regulação da atividade da MMP-2, mediada por RECK, tem um papel fisiológico. É importante ressaltar que a alteração na expressão de MMP-2 explica apenas parcialmente o fenótipo apresentado pelos embriões nos quais foi realizado o "knock-out" do gene RECK, sugerindo que outros alvos moleculares, ainda não identificados, estejam envolvidos.

Os ensaios de tumorigenicidade em camundongos "nude" sugerem que RECK inibe a angiogênese tumoral, uma vez que as ramificações vasculares foram drasticamente suprimidas nos tumores gerados a partir de células de fibrossarcoma que expressavam RECK. Além disso, os camundongos "nude" que desenvolveram o tumor a partir das células de fibrossarcoma que expressavam RECK apresentaram uma sobrevida maior quando comparados com os camundongos que desenvolveram o tumor controle (sem RECK) (Oh et al., 2001).

A análise do padrão de expressão do gene *RECK* mostrou que este gene é expresso em diversos tecidos humanos normais, porém sua expressão é baixa ou não detectada em inúmeras linhagens celulares derivadas de tumor (Takahashi et al., 1998). A expressão de *RECK* também é reprimida por vários oncogenes, incluindo *myc* (Sasahara et al., 1999b, Sasahara et al., 2002, Takahashi et al., 1998). A proposta é que durante o processo de transformação celular, a expressão do gene *RECK* é inibida, resultando em um desbalanço no controle da atividade de MMPs, promovendo a formação de MMPs ativas, que irão contribuir para a transformação morfológica e o comportamento invasivo de células tumorais. É importante ressaltar que, além das MMPs, provavelmente outros alvos moleculares da ação de RECK, ainda não identificados, podem também estar contribuindo para o fenótipo maligno.

Com o intuito de entender a regulação da expressão do gene *RECK* e como os sinais oncogênicos promovem a inibição da sua expressão, contribuindo assim para a manifestação do fenótipo maligno, a seqüência promotora do gene *RECK* de camundongo foi isolada e caracterizada (Sasahara et al., 1999a). Foram ainda

gerados diversos fragmentos do promotor do gene *RECK* (de 4.110pb até 52pb) para a caracterização da regulação da sua atividade (Sasahara et al., 1999a).

Usando um sistema de gene repórter luciferase e ensaios de co-transfecção, os elementos *cis* no promotor do gene *RECK* que são responsivos ao oncogene *ras* foram mapeados. Foi demonstrado que a regulação negativa de *RECK*, mediada por *ras*, ocorre ao nível transcricional e que a região de –52 a +80pb do promotor de *RECK* possuia atividade e era responsiva a este oncogene (Sasahara et al., 1999a). Analisando essa pequena região promotora, verificou-se que sítios de ligação ao fator de transcrição Sp1 são essenciais para a atividade promotora do gene *RECK* e que um dos sítios Sp1 (descrito como sítio Sp1B), contido neste fragmento, era o responsável pela resposta mediada por Ras (Sasahara et al., 1999a). A caracterização da regulação da expressão do gene *RECK* mediada por outros oncogenes, como c-*myc*, pode contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de tumorigênese e para o desenvolvimento de novas estratégias para prevenção e tratamento do câncer.

Recentemente, diversos trabalhos têm sido realizados no sentido de verificar a expressão do gene *RECK* em tumores humanos e correlacionar com a progressão maligna e prognóstico dos pacientes. Estes trabalhos mostram que o gene *RECK* é expresso em alguns tipos de tumores, como hepatocarcinomas, tumor de pulmão NSCLC ("non-small cell lung cancer"), carcinomas de mama, coloretal e de pâncreas ductal, e mostram que uma expressão elevada de RECK no tumor promove um prognóstico mais favorável para os pacientes, promovendo um maior tempo de sobrevida (Furumoto et al., 2001, Masui et al., 2003, Takenaka et al., 2004), maior tempo livre de recorrência da doença (Span et al., 2003, Takeuchi et al., 2004), menor invasividade do tumor (Masui et al., 2003) e diminuição da angiogênese tumoral (Takenaka et al., 2004, Takeuchi et al., 2004). Portanto, é possível que, embora *RECK* seja expresso em alguns tumores (e em algumas linhagens celulares transformadas, como a linhagem C6 de glioma de rato), sua alta expressão pode estar relacionada com um menor grau de malignidade e melhor prognóstico do paciente.

## 1.3. O proto-oncogene c-*myc*

O proto-oncogene c-*myc* foi primeiramente descrito em 1982 (Vennstrom et al., 1982) como um homólogo celular da seqüência transformante de "avian myelocytomatosis retrovirus" (Sheiness et al., 1978) e mais tarde mostrou-se que este proto-oncogene está envolvido na sinalização intracelular mediada por uma grande variedade de fatores de crescimento (como o fator de crescimento derivado de plaquetas: PDGF) e citocinas (Armelin et al., 1984, Kelly et al., 1983, Morrow et al., 1992, Shibuya et al., 1992). A deleção homozigótica do gene c-*myc* de camundongo resultou em letalidade embrionária (Davis et al., 1993) e a inativação deste gene em fibroblastos de rato promoveu o prolongamento do tempo de dobramento celular (Mateyak et al., 1997), sugerindo um papel importante de Myc em processos como desenvolvimento e proliferação celular. Hoje, se sabe que as proteínas da família Myc (compreendendo c-, N- e L-Myc) estão envolvidas na regulação de diferentes processos celulares como proliferação, diferenciação e apoptose.

A desregulação das proteínas Myc está fortemente associada com a gênese de uma variedade de tumores humanos incluindo tumores de mama, de cólon, de pulmão, carcinomas cervicais, osteosarcomas, glioblastomas e ainda leucemias mielóides (DePinho et al., 1991, Grandori et al., 2000, Marcu et al., 1992, Schmidt, 1999, Spencer & Groudine, 1991). A ativação oncogênica de c-*myc* ocorre de diversas formas. Geralmente é resultado de alterações genéticas como amplificações ou translocações, como as observadas em linfomas de Burkitt´s e geralmente resulta em uma expressão constitutiva e elevada da proteína c-Myc. Da mesma forma, o gene N-*myc* é freqüentemente amplificado em neuroblastomas (Marcu et al., 1992, Nesbit et al., 1999). A ativação aberrante de c-Myc pode também ser resultado de mutações em vias de sinalização celular que regulam sua expressão como, por exemplo, a perda ou inativação do gene supressor de tumor APC ou ainda ativação de β-catenina em carcinoma de cólon (He et al., 1998).

### 1.3.1. O fator de transcrição c-Myc

O gene c-*myc*, localizado no cromossomo humano 8q24, é formado por 3 exons (Battey et al., 1983). Quando o processo de tradução da proteína é iniciado no códon canônico AUG, localizado no exon 2, é formado um polipeptídeo de 64KDa. Porém, quando a tradução se inicia a partir de um códon alternativo CUG (15 códons "upstream" ao AUG), localizado no exon 1, é formado um polipeptídeo maior de 67KDa (Battey et al., 1983, Dang, 1999).

A porção N-terminal da proteína Myc apresenta um domínio de transativação funcional (TAD) (Amati et al., 1992, Kato et al., 1990) que contém dois motivos altamente conservados "Myc boxes" (MBI e MBII), ambos necessários para o processo de ativação transcricional. A porção C-terminal apresenta o domínio "basic-helix-loop-helix leucine zipper" (bLHL/LZ) responsável pela dimerização com outros fatores de transcrição e pela interação com o DNA.

A capacidade de c-Myc interagir com proteínas que se ligam ao TATA box (TBP) e a maquinaria transcricional (Hateboer et al., 1993, Maheswaran et al., 1994, McEwan et al., 1996) pode ser modulada pela sua interação com outros fatores como Bin-1 (Elliott et al., 1999, Sakamuro et al., 1996), Miz-1 (Peukert et al., 1997, Staller et al., 2001), PAM (Guo et al., 1998), p107 (Beijersbergen et al., 1994, Gu et al., 1994, Hoang et al., 1995), TFII-I (Roy et al., 1993), TRRAP (McMahon et al., 1998), PARP (Yu et al., 2005) e YY-1 (Austen et al., 1998, Shrivastava et al., 1993, Shrivastava et al., 1996). A Figura 1.3.1 representa a associação destes diversos fatores aos domínios funcionais da proteína c-Myc.

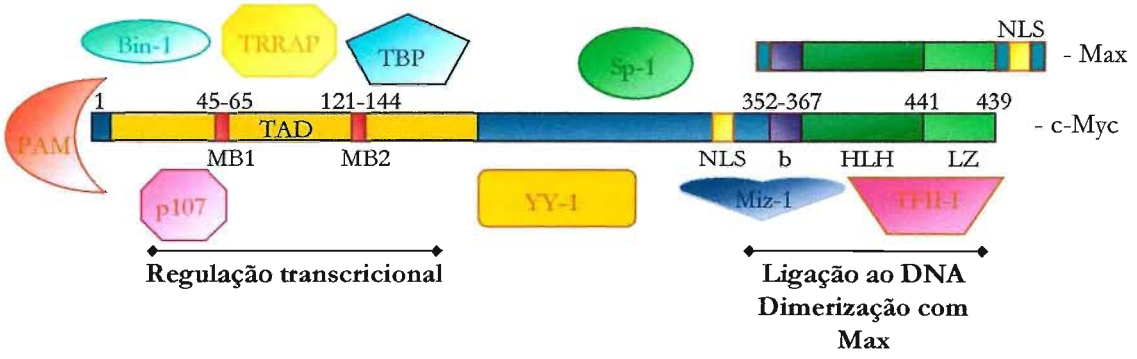



**Figura 1.3.1.** Associação de diversos fatores aos domínios funcionais da proteína c-Myc. A associação de c-Myc com Max ocorre através do motivo HLH-LZ. b representa a região básica responsável pela interação com o DNA. NLS representa o sinal de localização nuclear. TAD representa o domínio de ativação transcricional. As proteínas Bin-1, PAM, p107 e TBP são mostradas se associarem com TAD. Miz-1 e TFII-I se associam com a região HLH-LZ de c-Myc. YY-1 se associa com o domínio central da proteína c-Myc.

Um passo importante na determinação das funções moleculares de c-Myc ocorreu com a identificação de seu parceiro Max (Myc-associated factor x) (Blackwood & Eisenman, 1991, Blackwood et al., 1992, Prendergast et al., 1991). Myc é capaz de dimerizar com Max, formando um heterodímero que reconhece uma seqüência nucleotídica específica CAC(G/A)TG, também referida como: "enhancer Box" (Ebox) (Blackwell et al., 1993).

O modelo inicial proposto é de que o heterodímero Myc/Max interage com sítios específicos na região promotora dos genes alvo e promove a ativação transcricional mediada pelo seu domínio TAD (ver Figura 1.3.1).

### 1.3.2. A rede Myc/Max/Mad

O fato de Max ser expresso de forma constitutiva, na ausência de Myc, levou ao questionamento de que parceiros adicionais de dimerização com Max poderiam existir. A busca por proteínas que interagissem com Max levou à identificação de duas novas proteínas bHLH/LZ: Mad1 e Mxi1 (Ayer et al., 1993, Zervos et al., 1993) e posteriormente, Mad3 e Mad4 (Hurlin et al., 1995). Mais tarde, dois

parceiros adicionais de Max foram encontrados: Mnt e Mga (Hurlin et al., 1997, Hurlin et al., 1999). Recentemente, foi reportada a identificação de Mlx, uma proteína tipo Max que é capaz de heterodimerizar com Mad1, Mad4 e Mnt (mas não com outras proteínas Mad, nem com Myc ou Max) (Billin et al., 1999, Luscher, 2001, Meroni et al., 2000). As mais recentes extensões desta rede incluem a identificação de duas proteínas que interagem com Mlx: MondoA e WBSCR14 (Billin et al., 2000, Cairo et al., 2001, Luscher, 2001). Deste modo, Max e Mlx são os componentes centrais desta rede interconectada por parceiros comuns de interação (Figura 1.3.2.).

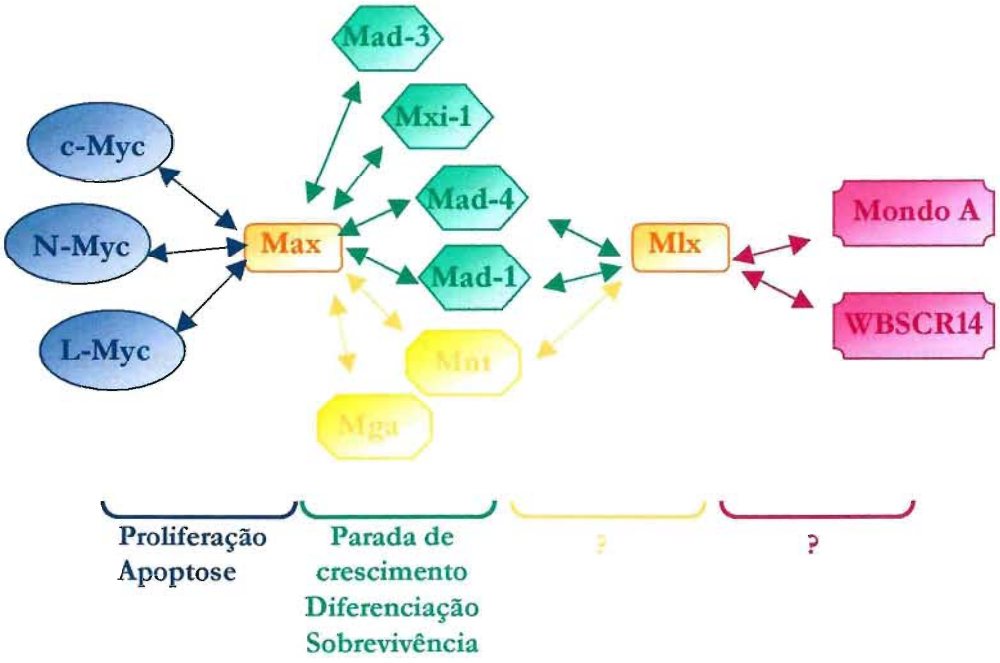



**Figura 1.3.2.** A rede Myc/Max/Mad. Os componentes da rede Myc/Max/Mad são indicados na figura. As setas definem as interações conhecidas entre os diferentes membros da rede. As interações proteína-proteína ocorrem através de domínios de dimerização bHLH/LZ. Os diferentes membros da rede parecem funcionar como reguladores de diferentes aspectos do comportamento celular (Luscher, 2001).

É possível que nem todos os componentes da rede Myc/Max/Mad tenham sido identificados até o momento, mas o número crescente de componentes mostra a complexidade funcional deste sistema.

Os dímeros formados entre Max e membros da família Mad interagem com o DNA, reconhecendo a mesma seqüência específica (Ebox) que o dímero Myc/Max, e parecem atuar como repressores transcricionais (Dang, 1999, Grandori et al., 2000, Luscher & Larsson, 1999).

### 1.3.3. A Estrutura da Cromatina e o Processo de Transcrição Gênica

A estrutura da cromatina tem sido vista como determinante para a acessibilidade dos fatores de transcrição e do próprio complexo da RNA Polimerase II à região promotora dos genes. Ativadores transcricionais são descritos como recrutadores e ativadores do complexo RNA Polimerase II, podendo regular a processividade enzimática deste complexo, enquanto que os repressores transcricionais parecem não afetar diretamente o complexo da polimerase, sendo porém capazes de atuar na compactação da cromatina, tornando-a inacessível aos fatores de transcrição e moléculas ativadores (Luscher, 2001).

Dois tipos de modificações enzimáticas da cromatina desempenham um papel importante na regulação da transcrição em células eucarióticas: I) o remodelamento de nucleossomos dependente de ATP e II) a acetilação de histonas. Os níveis de acetilação são controlados por histonas acetil transferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) (Brown et al., 2000, Kingston & Narlikar, 1999, Knoepfler & Eisenman, 1999, Sterner & Berger, 2000). O remodelamento de nucleossomos é catalizado por complexos protéicos evolutivamente conservados, conhecidos como complexo SWI/SNF (Kingston & Narlikar, 1999, Vignali et al., 2000). Complexos remodeladores da cromatina não apresentam nenhuma atividade de ligação ao DNA seqüência-específica mas, são recrutados à regiões promotoras dos genes via sua associação com proteínas ativadoras ou repressoras que interagem diretamente com o DNA. É uma ação combinatória de múltiplos fatores que determina, por fim, a atividade do promotor alvo (Lemon & Tjian, 2000, Narlikar et al., 2002).

Dentre as diversas proteínas que interagem com Myc, TRRAP (um componente do complexo contendo atividade de HAT) tem um interesse particular (McMahon et al., 1998, McMahon et al., 2000, Park et al., 2001). TRRAP interage

com o motivo MB2 na porção N-terminal do TAD de c-Myc (Figura 1.3.1.), sendo recrutado a regiões promotoras dos genes alvo. A ativação de muitos genes mediada por c-Myc, incluindo o gene *ciclina D2*, requer o domínio MB2 intacto (Bouchard et al., 2001). A ativação gênica dependente de c-Myc é associada com um aumento da acetilação de histonas H3 e H4 (Bouchard et al., 2001, Frank et al., 2001). Pelo menos três distintas HATs, especificamente GCN5, PCAF e TIP60, podem se associar com complexos TRRAP. Para dois destes, GCN5 e TIP60, tem sido demonstrada uma associação com c-Myc (McMahon et al., 2000). Deste modo, o recrutamento das HATs aos complexos contendo TRRAP é provavelmente bastante importante para a ativação gênica mediada por c-Myc.

Além disso, CBP ("CREB-(cAMP-response-element) protein-binding") e outra proteína relacionada: a p300 são importantes mediadores transcricionais de muitos fatores de transcrição por interagir com componentes do complexo RNA Polimerase II e atuar como co-ativadores transcricionais. Ambas as proteínas são importantes para diversos processos celulares, incluindo a proliferação celular (Chan & La Thangue, 2001, Goodman & Smolik, 2000). Recentemente, foi identificado o co-fator CBP como um novo parceiro de interação de c-Myc (Vervoorts et al., 2003). CBP interage com a região carboxi-terminal de c-Myc e, assim como p300, parece se associar com a região promotora contendo o elemento Ebox de genes regulados por c-Myc.

### 1.3.4. Repressão transcricional mediada por Myc

Enquanto que o processo de ativação transcricional mediada por c-Myc é bem conhecido, o mecanismo pelo qual a proteína Myc é capaz de reprimir a transcrição de seus genes alvos ainda é bastante obscuro atualmente, sendo tema de importantes estudos recentes.

Uma das primeiras funções biológicas descritas para c-Myc foi a sua capacidade de inibir a diferenciação *in vitro* de pré-adipócitos, um processo conhecido por ser regulado pelo fator de transcrição c/EBP-α (Freytag & Geddes, 1992). Trabalhos posteriores sugeriram que Myc controla, direta ou indiretamente, a transcrição de c/EBP-α, atuando na região promotora deste gene (Li et al., 1994).

Subseqüentemente, diversos genes foram descritos como sendo reprimidos por c-Myc e, em vários casos, a região promotora dos genes foi identificada como alvo da repressão.

Três modelos têm sido atualmente propostos para explicar a repressão mediada por c-Myc (Gartel & Shchors, 2003, Wanzel et al., 2003). Um primeiro modelo sugere que c-Myc promove a ativação de proteínas que medeiam a repressão transcricional, atuando de forma indireta neste processo. Contudo, a ação de diversas proteínas mutantes de c-Myc, que afetam especificamente a capacidade de c-Myc ativar ou reprimir a transcrição gênica, tem sido analisada. Os dados sugerem que ambos os processos de ativação e repressão gênica apresentam mecanismos distintos (Conzen et al., 2000, Lee et al., 1996, Philipp et al., 1994). Além disso, pelo menos um trabalho demonstrou que a repressão mediada por c-Myc ocorre na presença de inibidores de síntese protéica, sugerindo que a repressão não envolve a síntese de proteínas mediadoras (Gartel et al., 2001). O segundo modelo proposto envolve a interação direta do heterodímero Myc/Max com seqüências iniciadoras da transcrição (chamadas de seqüências Inr) no DNA de promotores alvo, como o caso do promotor de $p27^{KIP1}$ (Yang et al., 2001a). E, uma terceira sugestão, é que Myc seja recrutado às regiões promotoras dos genes alvo através de interações proteína-proteína. Neste caso, c-Myc pode não interagir diretamente com o DNA. As proteínas candidatas que têm sido propostas incluem: TFII-I (Roy et al., 1991), YY-1 (Shrivastava et al., 1993), Sp-1 (Gartel et al., 2001) e Miz-1 (Peukert et al., 1997). Além disso, interações de Myc com Smad-2 e Smad-3 (Feng et al., 2000) parecem contribuir para a repressão de alguns promotores individuais. A Figura 1.3.3 exemplifica alguns dos possíveis mecanismos de repressão transcricional mediado por c-Myc.

**Repressão dependente de Inr :**

**Repressão independente de Inr :**

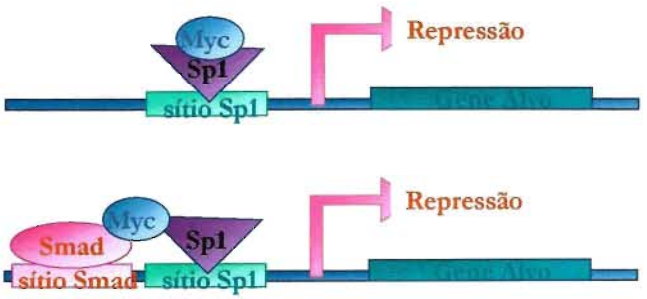



**Figura 1.3.3.** Mecanismos de repressão transcricional mediados por c-Myc. c-Myc reprime a transcrição de muitos genes alvo por um mecanismo dependente de Inr. O heterodímero Myc/Max interage com o elemento Inr no promotor dos genes alvo e associa-se com Miz-1 ou outro ativador transcricional, interferindo desta maneira com sua atividade. c-Myc também reprime a transcrição por um mecanismo dependente de interação com Sp1. c-Myc interage com o fator de transcrição Sp1 ou com o complexo Smad-Sp1 via a região central de c-Myc, promovendo a inibição da atividade transcricional. Este mecanismo não requer ligação c-Myc ao DNA ou interação com seu parceiro Max (Gartel & Shchors, 2003).

Sabendo que o fator de transcrição c-Myc atua em diversos processos celulares normais, como diferenciação e proliferação celular, e contribui também para diferentes processos patológicos, como o processo de tumorigênese, torna-se interessante a caracterização de novos alvos moleculares da ação de c-Myc. Foi descrito nos itens anteriores que o gene *RECK* é um alvo negativo de c-Myc. Caracterizar o mecanismo pelo qual a proteína Myc é capaz de mediar esta repressão é uma abordagem importante, que pode contribuir na elucidação dos mecanismos moleculares pelos quais a proteína Myc é capaz de regular diferentes processos como proliferação celular e tumorigênese.

## 1.4. O ciclo celular

A regulação do processo de divisão celular é um passo crítico para o controle do desenvolvimento normal de organismos multicelulares.

Durante o ciclo celular podem ser distinguidas as seguintes fases (Figura 1.4.1.):

a) **G1** ("Gap-1") - Intervalo após a mitose durante o qual as células se preparam para iniciar a síntese de DNA. Este período é caracterizado pela transcrição de vários genes e tradução de diversas proteínas, que serão necessárias para a síntese de DNA.

b) **S** - Período no qual ocorre a duplicação do DNA celular.

c) **G2** ("Gap-2") - Intervalo após a síntese de DNA, durante o qual as células se preparam para a divisão celular.

d) **M** - Período mitótico, durante o qual duas novas células são geradas, com o mesmo conteúdo de DNA da célula mãe.

Após a mitose, as células podem continuar no estado proliferativo, entrando novamente na fase G1 do ciclo celular, ou passar para um estado de "repouso", de duração indefinida, denominado G0. A saída das células de G0 e entrada na fase G1 do ciclo celular irá depender dos estímulos que as células recebem do meio. No caso de células normais, baixas concentrações de fatores mitogênicos no meio de cultura ou mesmo alta densidade celular são condições que levam a célula a permanecer em G0.

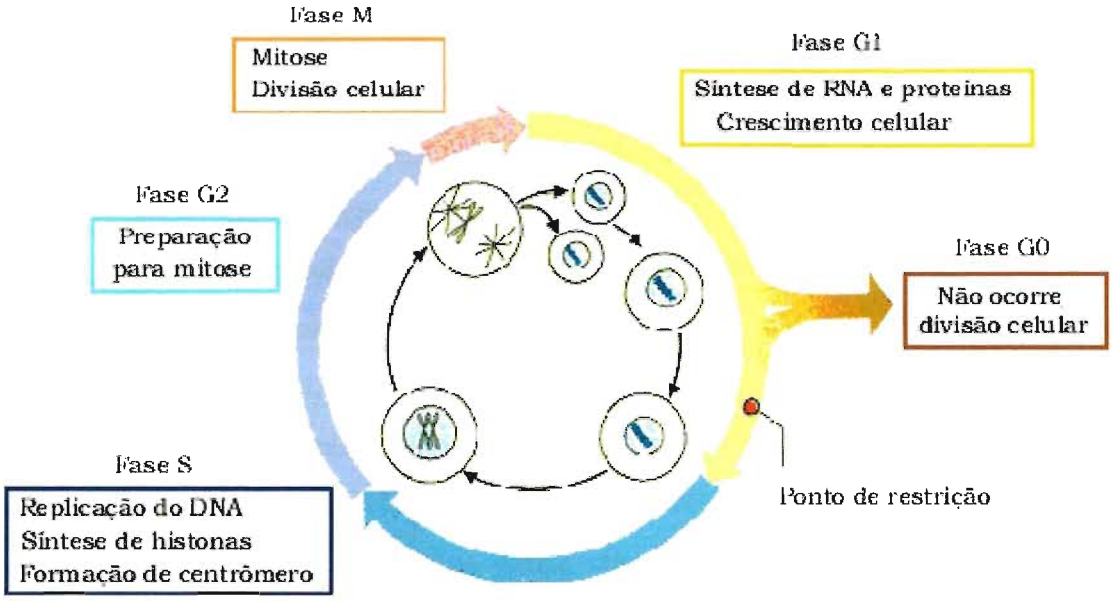



**Figura 1.4.1.** O ciclo celular. Representação das fases do ciclo celular (Koolman, 1996).

O ciclo celular de mamíferos é controlado por holoenzimas compostas por uma proteína catalítica quinase dependente de ciclina (CDK) e uma ciclina regulatória. As CDKs medeiam a progressão através das diferentes fases do ciclo celular por promoverem a fosforilação de diferentes substratos, sendo sua atividade quinásica dependente da presença de subunidades ativadoras, conhecidas como ciclinas.

A atividade de CDKs é atenuada pela interação com proteínas inibitórias de CDKs (CKIs) das famílias Cip/Kip ("CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein") e Ink4 ("inhibitor of CDK4"). Proteínas Cip/Kip ($p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ e $p57^{Kip2}$) interagem com diversas CDKs e inibem um amplo espectro das holoenzimas ciclinas/CDKs enquanto que proteínas Ink4 ($p16^{Ink4a}$, $p15^{Ink4b}$, $p18^{Ink4c}$ e $p19^{Ink4d}$) são específicas para CDKs associadas a ciclina D.

O estímulo mitogênico ou anti-mitogênico afeta a velocidade de síntese e degradação destes inibidores de CDKs (CKIs), assim como sua re-distribuição entre os diferentes heterodímeros ciclina/CDK (Swanton, 2004).

### 1.4.1. O controle da atividade de Rb e o papel de E2F

Diferentes complexos ciclinas/CDKs são ordenadamente ativados em fases específicas do ciclo celular. Em células normais, a capacidade da proteína de retinoblastoma (pRb) interagir com fatores de transcrição da família E2F é regulada por fosforilação dependente da ação de complexos ciclina/CDKs específicos. pRb progride de uma forma não-fosforilada, capaz de interagir com E2F promovendo o bloqueio da atividade transcricional do mesmo (na fase G0 e início da fase G1), para uma forma hiperfosforilada, associada com a perda da sua capacidade de interação (no final de G1) (Mittnacht, 1998). Assim, a hiperfosforilação da proteína pRb contribue para a transativação de genes com sítios de ligação à E2F funcionais, incluindo reguladores de crescimento e do ciclo celular (c-*myc*, *cdc2*, *ciclina E*, *ciclina A*) e genes que codificam para proteínas necessárias para a biossíntese de nucleotídeos e DNA (DNA polimerase, histona H2A) (Stevens & La Thangue, 2003).

A repressão da ação de E2F mediada por Rb ocorre de, pelo menos, três maneiras diferentes. I) pRb induz modificações de histonas no nucleossomo, por recrutar moléculas com atividade de histona desacetilase aos sítios de ligação à E2F. A desacetilação de histonas promove uma associação mais forte entre o DNA e os nucleossomos, impedindo o acesso do aparato transcricional ao DNA; II) Rb regula a estrutura do nucleossomo por recrutar complexos de remodelamento dependentes de ATP para a região promotora dos genes, os conhecidos complexos SWI/SNF (BRG1 e hBRM); e III) pRb influencia a estrutura da cromatina pelo recrutamento das metilases SUV39H1 e HP1 ao promotor de ciclina E, levando à metilação da histona H3 e ao silenciamento de ciclina E (Stevens & La Thangue, 2003) (Figura 1.4.2.).

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

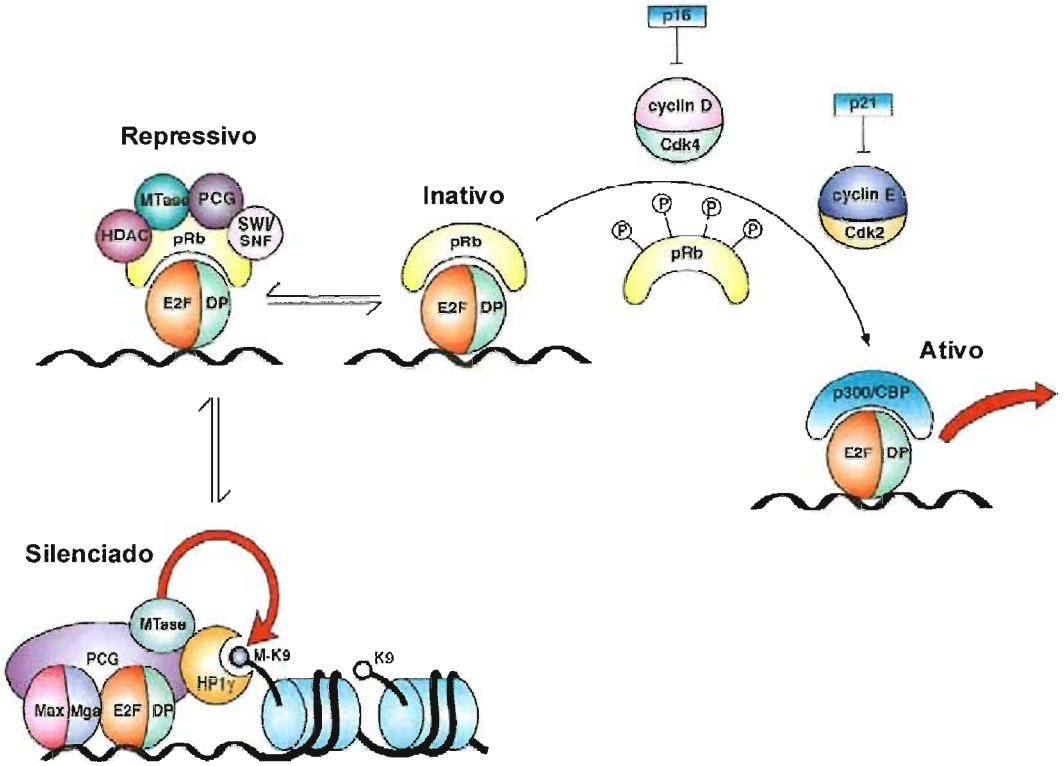



**Figura 1.4.2.** Regulação da atividade de E2F. Em células não-proliferativas, o heterodímero E2F/DP interage com proteínas "pockets" como pRb. Durante o início da progressão pelo ciclo celular (na fase G1), complexos de quinases dependentes de ciclina (Ciclina D/CDK4 e Ciclina E/CDK2) catalisam a fosforilação de pRb, liberando E2F. E2F torna-se então transcricionalmente ativo através da sua interação com co-fatores transcricionais como p300/CBP. O complexo pRb/E2F torna-se um repressor transcricional ativo pelo recrutamento de proteínas como HDAC, MTase, PCG e SWI/SNF, as quais alteram a estrutura da cromatina favorecendo a inativação transcricional. Além disso, em células quiescentes (fase G0), heterodímeros E2F específicos, como E2F-6, podem promover a estrutura de outro tipo de complexo remodelador da cromatina contendo MTase, PCG e HP1, que envolve outros fatores transcricionais seqüência-específica como Max e seu parceiro Mga. Através da modificação da estrutura da cromatina dos seus genes alvo este complexo promove o silenciamento de genes reguladores do ciclo celular (Stevens & La Thangue, 2003).

O estado de fosforilação de pRb, crucial para o controle da sua atividade, é um processo governado por ciclinas das famílias D e E, juntamente com seus parceiros CDKs. A ativação seqüencial das quinases dependentes de ciclina D

(especificamente CDK4 e CDK6, formando os complexos ciclina D/CDK4 e ciclina D/CDK6), seguida pela ativação das quinases dependentes de ciclina E (especificamente CDK2, formando o complexo ciclina E/CDK2) parecem ser necessárias para a sincronia entre fosforilação de pRb e ativação de genes dependentes de E2F.

### 1.4.2. O papel de Myc na progressão do ciclo celular

Uma das funções biológicas importantes de c-Myc é a sua capacidade de promover a progressão através do ciclo celular (Amati et al., 1998, Pelengaris & Khan, 2003). A partir de diversos experimentos *in vitro* foi verificado que a expressão de c-Myc não é detectada em células quiescentes. Contudo, após o estímulo mitogênico tanto o mRNA como a proteína c-Myc são rapidamente induzidos, promovendo a entrada das células na fase G1 do ciclo celular. Após este período, as células em proliferação apresentam níveis basais (porém detectáveis) de c-Myc.

Diversos trabalhos têm sido realizados com o intuito de entender o mecanismo pelo qual c-Myc induz a proliferação celular, muitos dos quais revelaram a sua capacidade de ativar ou reprimir a transcrição de diversos genes alvo envolvidos na progressão do ciclo celular (Coller et al., 2000).

Foi verificado que c-Myc induz a atividade do complexo ciclina E/CDK2 no início da fase G1 do ciclo celular, um evento essencial para a progressão G0/G1-S induzida por Myc (Berns et al., 1997, Steiner et al., 1995). Tem sido demonstrado que ciclina D2 e CDK4, os quais promovem o sequestro do inibidor de CDK $p27^{KIP1}$, são alvos diretos de c-Myc (Bouchard et al., 1999, Hermeking et al., 2000). Ainda, a degradação de p27, subseqüente ao seqüestro promovido por ciclina D2/CDK4, parece envolver dois outros alvos de c-Myc, especificamente: *CUL-1* e *CKS* (Hermeking et al., 2000). Deste modo, um dos mecanismos pelos quais c-Myc regula a progressão do ciclo celular é através da prevenção da interação do inibidor $p27^{KIP1}$ aos complexos ciclina E/CDK2, permitindo que estes complexos estejam disponíveis para fosforilação e ativação pelas quinases ativadoras de ciclinas (CAKs). O aumento da atividade de CDK4 e CDK2 resulta na hiperfosforilação de pRb e

subseqüente liberação do fator de transcrição E2F, permitindo a ativação de genes essenciais para a progressão pela fase S do ciclo celular.

c-Myc também exerce influência importante na progressão do ciclo celular por ser capaz de reprimir a expressão de genes envolvidos na parada do ciclo celular, como é o caso dos genes *gas-1* (Lee et al., 1997a), *gadd45* (Marhin et al., 1997) e os inibidores de CDK: $p15^{INK4a}$ (Warner et al., 1999) e $p21^{CIP1}$ (Claassen & Hann, 2000, Gartel et al., 2001).

Após a identificação de Myc como um importante regulador da expressão e da atividade dos complexos ciclina/CDKs e de inibidores da progressão do ciclo celular, a análise do mecanismo pelo qual esta regulação acontece torna-se o foco das pesquisas subseqüentes. Enquanto muitos genes são alvos diretos de c-Myc, como *ciclina D2* (Bouchard et al., 1999, Bouchard et al., 2001), efeitos indiretos da proteína Myc também contribuem para a ativação de ciclinas/CDKs e progressão do ciclo celular (Obaya et al., 2002). Alvos adicionais de c-Myc, relevantes para a regulação da proliferação celular, podem contribuir para o melhor entendimento de como a proteína Myc afeta a transição G0/G1-S do ciclo celular.

É importante ressaltar que a proteína Myc atua também em processos patológicos, como o processo de tumorigênese. A desregulação de c-Myc está fortemente associada com a gênese de uma variedade de tumores humanos incluindo tumores de mama, de cólon, de pulmão, carcinomas cervicais, osteosarcomas, glioblastomas e ainda leucemias mielóides (DePinho et al., 1991, Grandori et al., 2000, Marcu et al., 1992, Schmidt, 1999, Spencer & Groudine, 1991). Myc tem sido considerado um marcador de malignidade para tumores do sistema nervoso central, especificamente gliomas (Herms et al., 1999, Hirvonen et al., 1994, Trent et al., 1986). Desta maneira, a caracterização de novos alvos moleculares da ação de c-Myc contribuirá também para o melhor entendimento do seu papel no processo de tumorigênese, além de desvendar alvos moleculares importantes que possam contribuir para o desenvolvimento de novas formas de terapia anti-tumoral.

## 1.5. A Glia e o Sistema Nervoso Central

O tecido cerebral é composto por dois tipos principais de células: os neurônios e a neuroglia (ou glia). Células da glia incluem: células ependimais, oligodendrócitos, astrócitos (todas estas derivadas da mesma célula progenitora de origem glial) e células da microglia (Rao, 2003).

Astrócitos são as mais numerosas de todas as células da glia no Sistema Nervoso Central (CNS). Juntamente com as células endoteliais, elas formam a barreira hemato-encefálica. Estas células originam tumores denominados astrocitomas, que são capazes de migrar através do arcabouço glial.

Acreditava-se que a glia possuía apenas as funções de sustentação e agregação do sistema nervoso. No entanto, atualmente, este conceito foi revisto à medida que diversas evidências sugeriram que a glia é necessária para o desenvolvimento neuronal (Noctor et al., 2001, Toresson et al., 1999), para o funcionamento correto dos neurônios maduros e para a regeneração do sistema nervoso central (Ribotta et al., 2004). Uma teoria que vem sendo cada vez mais aceita é a de que a glia pode ter capacidade de comunicação, complementando aquela apresentada pelos neurônios, através da formação das chamadas "redes gliais" (Coles & Abbott, 1996, Giaume & Venance, 1995, Kast, 2001).

### 1.5.1. Tumores do Sistema Nervoso Central

Os tumores da glia, conhecidos como gliomas, compreendem os tumores primários de origem glial do Sistema Nervoso Central (CNS). Os gliomas são classificados de acordo com sua morfologia e características clínicas em: astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas. Estes tumores são classificados, pela Organização Mundial de Saúde (WHO), segundo as características histopatológicas, em uma escala de I a IV (Behin et al., 2003).

Astrocitomas são o tipo mais comum de neoplasias primárias do CNS. O grau I inclui os tumores benignos, astrocitomas císticos, conhecidos como astrocitomas pilocíticos. Estes tumores tendem a ocorrer em crianças e são freqüentemente fáceis de serem removidos com tratamento cirúrgico. Os

astrocitomas de grau II a IV são denominados difusos. De acordo com as características histopatólogicas, astrocitomas de grau II, ou de baixo grau, apresentam células com atipias nucleares. Astrocitomas de grau III são conhecidos como astrocitomas anaplásicos e apresentam uma grande porcentagem de células em proliferação e freqüentemente figuras mitóticas. Astrocitomas de grau IV, conhecidos como glioblastomas multiformes (GBM), possuem como características diversas áreas de necrose, proliferação vascular endotelial, atipia nuclear e intensa marcação mitótica (Behin et al., 2003, Rao, 2003). É importante ressaltar que os astrocitomas de grau II possuem uma tendência natural de evoluírem para astrocitomas de grau III e GBMs.

A natureza invasiva dos astrocitomas contribui, de forma importante, para a ineficiência nas modalidades de tratamento disponíveis atualmente. As células do tumor, inevitavelmente, infiltram-se no tecido do cérebro normal adjacente, levando à dificuldade da remoção completa do tumor, através de intervenções cirúrgicas, contribuindo para a recorrência do mesmo. A invasão local é uma importante causa de mortalidade, levando à necessidade de se entender melhor os mecanismos de invasividade deste tipo de tumor.

A estrutura e composição da matriz extracelular no CNS, um componente importante do tecido destruído durante a invasão da célula tumoral, ainda não estão totalmente determinadas. O parênquima do CNS parece ser preenchido com uma matriz que contém, basicamente, ácido hialurônico, associando proteoglicanos e glicoproteínas (como neurocan e tenascina C), assim como colágeno e outras proteínas fibrosas (Bignami & Asher, 1992, Jones & Jones, 2000, Rauch et al., 2001, Rauch, 2004). Análises de imunohistoquímica das áreas limites entre o cérebro normal e as células de gliomas têm mostrado a presença de colágeno intersticial, fibronectina, laminina e colágeno tipo IV (Rao, 2003, Rauch, 2004).

Células tumorais do cérebro expressam diferentes tipos de enzimas proteolíticas de modo a promover o rompimento efetivo das estruturas do cérebro. Esta natureza invasiva dos tumores malignos do cérebro leva à destruição local do tecido normal adjacente (Rao, 2003).

Estudos recentes indicam que a capacidade das células tumorais de digerir a ECM, por secretar enzimas proteolíticas, correlaciona positivamente com a

invasividade do tecido. Para a maioria dos tumores primários de cérebro, a invasão é acompanhada, pelo menos em parte, por aumento na expressão e atividade de proteases - serinas, cisteínas e metaloproteinases - que possibilitam a penetração e migração das células através da barreira do tecido conectivo, induzem o remodelamento vascular e destroem o tecido de cérebro normal (Rao, 2003).

#### 1.5.1.1.O papel das MMPs na progressão de gliomas

Uma forte correlação tem sido reportada entre o aumento nos níveis de MMPs e a invasividade de células tumorais em gliomas humanos. MMPs aumentam a invasividade de células tumorais por degradar proteínas da matriz extracelular, por ativar cascatas de transdução de sinal que promovem motilidade e por disponibilizar fatores de crescimento ligados a ECM (McCawley & Matrisian, 2001). Especificamente em GBMs, tem sido descrito que MMPs podem clivar e ativar fatores de crescimento que estão implicados em processos de proliferação e motilidade, como é o caso de TGF-β (Platten et al., 2001) (ver Figura 1.5.1.).

Os níveis de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP aumentam junto com a progressão tumoral de gliomas humanos (Forsyth et al., 1999). Glioblastomas expressam elevados níveis de MMPs comparados com gliomas de baixo grau e cérebro normal, tanto *in vitro* (Apodaca et al., 1990, Rao et al., 1993) como *in vivo* (Nakagawa et al., 1994, Yamamoto et al., 1996). Em particular, foi mostrado que a atividade da MMP-9 é proporcional ao grau do glioma (Rao et al., 1993). A superexpressão de MMP-2 e MMP-9 tem sido associada com a malignidade de gliomas e parece ser acompanhada pela superexpressão do gene TIMP-1 (Nakano et al., 1995). Além disso, a expressão de MT1-MMP correlaciona com a progressão de gliomas e ativação de MMP-2 (Yamamoto et al., 1996). Recentemente, foi descrito que a quantidade de mRNA de MT1-MMP, MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 está aumentada em glioblastomas, em comparação com tecido de cérebro normal, sugerindo que o aumento da expressão destas metaloproteinases de matriz está estritamente relacionado com a progressão maligna dos gliomas (Lampert et al., 1998). Outro estudo demonstrou que a transfecção de células de glioma com o cDNA de MT1-MMP resultou em um aumento da ativação da pró-MMP-2 na

superfície celular, aumento da degradação de colágeno e aumento da migração celular (Deryugina et al., 1997). Além disso, foi sugerido que a atividade de MMP-2 na superfície celular, mais do que a forma solúvel, é crítica para o processo de remodelamento da ECM em células de gliomas (Deryugina et al., 1998).

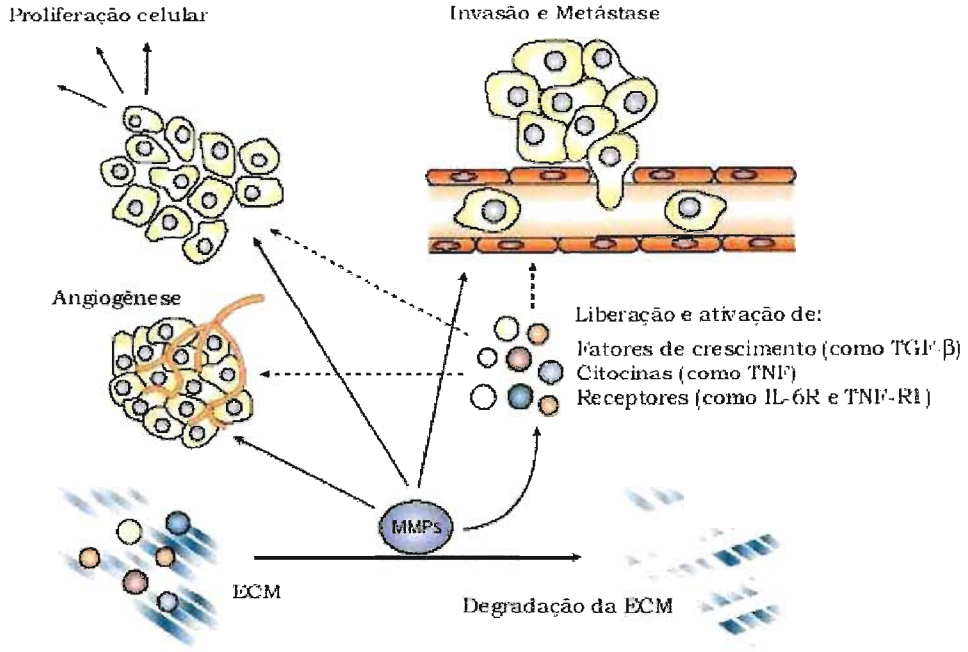



**Figura 1.5.1.** Ação de MMPs no processo de tumorigênese. Metaloproteinases de matriz atuam no crescimento/proliferação das células tumorais por promoverem a clivagem de fatores de crescimento, citocinas e precursores transmembrana de fatores de crescimento, incluindo TGF-β, aumentando assim a bio-disponibilidade dos mesmos aos seus respectivos receptores. MMPs promovem angiogênese por aumentar a bio-disponibilidade de fatores de crescimento pró-angiogênicos. MMPs também regulam invasão e migração por degradar componentes estruturais da ECM.

O aumento da expressão de MMPs, especificamente MMP-9, parece ser promovido por diferentes tipos celulares, que formam uma proporção significante

da massa tumoral, por exemplo macrófagos e leucócitos infiltrantes e células da microglia (Vos et al., 2000).

Gliomas apresentam atividade elevada de PKC, a qual exerce um papel importante na expressão de MMP-9 (Yabkowitz et al., 1999). De acordo com estudos recentes, a produção de MMP-9 é induzida, em células de gliomas, por mudanças no citoesqueleto que são mediadas pelo fator nuclear-κB (NF-κB) e por ativação de PKC (Chintala et al., 1998). Ainda, a inibição de PKC em glioblastomas promove a inibição da atividade de MMP-2, assim como inibição do processo de invasão celular (Chintala et al., 1999, Rao, 2003).

Tem sido demonstrado, ainda, que gliomas apresentam uma maior expressão de tenascina C e neurocan (Asher et al., 2000, Pearson et al., 1988). O nível de tenascina C parece correlacionar com o grau de malignidade de gliomas (Herold-Mende et al., 2002, Jallo et al., 1997, Leins et al., 2003, Zagzag et al., 1996) e interferir com a manutenção da barreira hemato-encefálica (Rascher et al., 2002). De forma interessante, tenascina C parece estar envolvida na indução e ativação de MMPs (Jones & Jones, 2000).

Apesar do aumento da expressão e atividade de MMPs estar sendo correlacionada com a progressão maligna de gliomas, o mecanismo regulatório responsável pela maior expressão e atividade destas proteases ainda é pouco compreendido.

#### 1.5.1.2. c-*myc*: um marcador de malignidade em gliomas

Diversos trabalhos têm sugerido que a superexpressão de c-Myc pode ser um indicativo de progressão maligna em tumores da glia (Hirvonen et al., 1994, Trent et al., 1986). Tecidos de cérebro normal e gliomas de grau I e II apresentam uma menor expressão de c-Myc, enquanto que em gliomas de graus mais elevados (graus III e IV) a expressão deste oncogene é significativamente maior (Chattopadhyay et al., 1995, Orian et al., 1992). A correlação da maior expressão de diferentes componentes da rede Myc/Max/Mad com o melhor prognóstico de pacientes com glioblastoma multiforme levou a sugestão de que tumores que expressam níveis

mais elevados de Max em relação aos de Myc tendem a um melhor prognóstico para os pacientes (Herms et al., 1999).

Além disso, tem sido descrito que pacientes com glioblastoma multiforme apresentam uma freqüente perda de heterozigose (LOH) na região do cromossomo 10. Um dos componentes da rede Myc/Max/Mad, o gene que codifica para a proteína Mxi-1 localiza-se na posição 10q24, sendo considerado um candidato a gene supressor de tumor que pode estar envolvido no processo de progressão maligna de gliomas humanos (Edelhoff et al., 1994, Shapiro et al., 1994, Wechsler et al., 1997).

Conforme descrito previamente, RECK é um inibidor de MMPs recentemente caracterizado, sendo o único, até o momento, que se localiza associado à membrana plasmática. Dados da literatura mostram que RECK é alvo de diversos oncogenes, como c-*myc*. Sabendo que as MMPs exercem um importante papel na progressão de gliomas e que diversos trabalhos mostram a superexpressão de c-*myc* em glioblastomas (como um marcador de malignidade), a caracterização do envolvimento do gene *RECK* no processo de progressão maligna de gliomas humanos torna-se bastante interessante e poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares que promovem a formação e progressão deste tipo de tumor.

## 2. Objetivos do trabalho

Todos os trabalhos descritos até o momento mostram o envolvimento do gene *RECK* na progressão de diversos tipos de tumores humanos, correlacionando a expressão deste gene com o melhor prognóstico dos pacientes. Porém, não existe até o momento nenhuma informação sobre a regulação deste gene em células normais. O presente trabalho enfocou, em um primeiro objetivo, analisar o envolvimento do gene *RECK* na progressão do ciclo celular normal, com o intuito de desvendar os mecanismos moleculares da sua ação.

A expressão do gene *RECK* é inibida por diversos oncogenes, como *ras* e *myc*. O fator de transcrição c-Myc está envolvido em diversos processos celulares importantes, como proliferação celular, diferenciação e tumorigênese. Um dos mecanismos atualmente propostos para a ação de c-Myc na repressão transcricional de diversos genes alvo envolve a sua capacidade de interagir com proteínas Sp1. Sabendo que sítios de ligação aos fatores Sp1 desempenham um papel bastante importante para a atividade do promotor do gene *RECK*, em um segundo objetivo, foi verificado se a inibição da expressão do gene *RECK* mediada por c-*myc* ocorre no nível transcricional, caracterizando posteriormente o mecanismo de ação de Myc durante a inibição da expressão deste gene.

Por fim, sabendo que o aumento da expressão de c-Myc, assim como de diversas MMPs, tem sido correlacionado com a progressão maligna de gliomas, foi analisado o envolvimento de *RECK* na progressão deste tipo de tumor, assim como a correlação da expressão do mesmo com o prognóstico de pacientes.

O melhor entendimento dos mecanismos moleculares que controlam a expressão de RECK, assim como os seus alvos de ação, poderão contribuir na elucidação dos mecanismos moleculares que medeiam diferentes processos celulares (como proliferação e tumorigênese) e no desenvolvimento de novas formas de terapia anti-tumoral.

# 3. Materiais e Métodos

## Materiais

### 3.1. Plasmídeos

pCXN2: vetor de expressão para mamíferos que apresenta o promotor de citomegalovírus e o gene *neo* que promove resistência à geneticina (Niwa et al., 1991). Este vetor foi usado nos experimentos de transfecção estável na geração da população transfectante Pop-pCXN2.

pCXN2-hRECK: construção realizada a partir do vetor pCXN2 de expressão para mamíferos, contendo o cDNA codificante para o gene *RECK* humano clonado no sítio SmaI. Este vetor foi usado nos experimentos de transfecção estável na geração da população transfectante Pop-hRECK.

pBabePuro: vetor de expressão para mamíferos baseado em "Moloney murine leukemia vírus" (Mo MuLV) que codifica para o gene de resistência à puromicina (Morgenstern & Land, 1990). Este vetor foi usado nos experimentos de transfecção estável na geração do clone pBPuro.

pBabePuro-MycER™: vetor indutível da expressão de c-*myc*: que contém a porção C-terminal de c-Myc humano fundida à região que codifica para o domínio de ligação ao hormônio do receptor de estrógeno murino (ER) mutado (aa 281-599, contendo uma única mudança de aminoácido, glicina para arginina, na posição 525). que seletivamente liga-se ao 4-hidroxitamoxifeno (OHT), um análogo sintético do 17-β-estradiol (Littlewood et al., 1995). A proteína de fusão MycER é constitutivamente expressa nas células transfectantes, mas permanece inativa até a estimulação com OHT, o qual induz a translocação desta proteína de fusão do citoplasma para o núcleo (Figura 3.1.1.). Este vetor foi usado nos experimentos de transfecção estável na geração do clone MycER.

pX343: vetor que codifica para o gene bacteriano de resistência à higromicina B sob o controle do LTR de Mo-MuSV e clonado em pBR322 (Costanzi et al., 1990). Este vetor foi usado nos experimentos de transfecção estável na geração dos clones pBPuro e MycER.

pGL3-Basic: vetor contendo o gene repórter luciferase (Promega). Este vetor foi utilizado nos experimentos de transfecção transitória para os ensaios gene repórter.

pGL3-Constructs: construções derivadas do pGL3-Basic contendo as diversas porções do promotor do gene *RECK* de camundongo (Sasahara et al., 1999a). Este vetor foi utilizado nos experimentos de transfecção transitória para os ensaios gene repórter.

pGL3-SV40: vetor contendo o gene repórter luciferase sob o controle do promotor do gene SV40 (vírus de sarcoma de símios) (Promega). Este vetor foi utilizado como controle positivo nos experimentos de transfecção transitória nos ensaios gene repórter.

pRL-TK: vetor que contém a porção codificante do gene da Renilla luciferase sob a ação de um promotor constitutivo (HSV-tk), usado como controle interno para normalizar a eficiência de cada transfecção (Promega). Este vetor foi utilizado nos experimentos de transfecção transitória para os ensaios gene repórter.

pGEM36B4cDNA: pGEM contendo o cDNA que codifica para a fosfoproteína PO ribossomal ácida 36B4 (Laborda, 1991). Este plasmídeo foi utilizado para a geração de sondas utilizada como controle da quantidade de RNA aplicado nos experimentos de Northern-blot.

pSK-mRECKcDNA: contém o cDNA de RECK de camundongo clonado no sítio SmaI do plasmídeo pBluescript SK (+) (Takahashi et al., 1998). Este plasmídeo foi utilizado para a geração de sondas utilizada nos experimentos de Northern-blot.

### 3.2. Linhagens celulares

NIH-3T3: fibroblasto de embrião de camundongo SWISS do NIH (Jainchill et al., 1969).

A31: clone celular obtido a partir das células Balb/c-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.

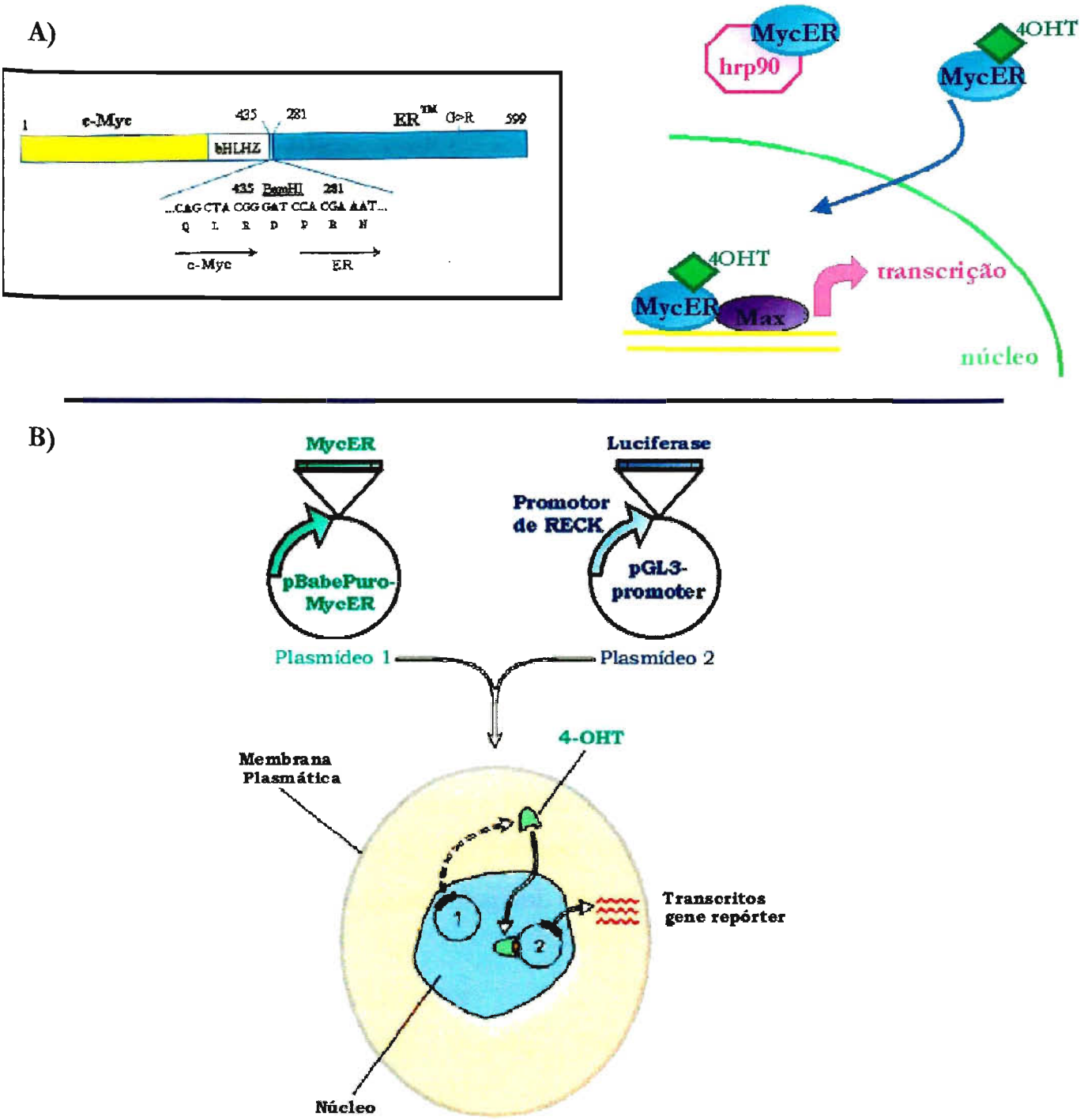



**Figura 3.1.1.** Construção e mecanismo de ação da proteína de fusão MycER™. A) Na construção c-MycER™, a porção C-terminal de c-Myc humano foi fundida à região que codifica para o domínio de ligação ao hormônio do receptor de estrógeno murino (ER) mutado (aa 281-599, contendo uma única mudança de aminoácido, glicina para arginina, na posição 525) que seletivamente liga-se ao 4-hidroxitamoxifeno (OHT), um análogo sintético do 17-β-estradiol. A proteína de fusão MycER é constitutivamente expressa nas células transfectantes, mas permanece inativa até a estimulação com OHT, o qual induz a translocação desta proteína de fusão do citoplasma para o núcleo (Littlewood, et al., 1995) . B) Modelo de ação da proteína MycER™ no controle da expressão do gene repórter luciferase.

### 3.3. Soluções e meio de cultura para células de mamíferos

Meio de cultura: DMEM ("Dulbecco´s Modified Eagle Médium") (Gibco BRL-Life technologies, Inc., USA).

Soro Fetal Bovino: FCS (Cultilab Materiais para Cultura de células, Brasil).

Solução salina: PBSA - solução salina tamponada pH 7,2 composta por NaCl 140mM, KCl 2,7mM, $Na_2PO_4$ 8mM e $KH_2PO_4$ 1,4mM.

Tripsina: solução tripsina 0,1% diluída em PBSA e contendo 1mM de EDTA (ICN Pharmaceuticals Ins., USA; Gibco Limited, UK).

Higromicina B: concentração utilizada: 100μg/mL (Sigma, USA).

Geneticina: concentração utilizada: 400μg/mL (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., USA).

4-Hidroxitamoxifeno: 4-OHT, concentração utilizada: 200nM (Sigma, USA).

Tricostatina A: concentração utilizada 100-1000μg/mL (Sigma, USA).

### 3.4. Soluções e meio de cultura para bactérias

LB: Meio de cultura Luria-Bertani para cultivo bacteriano, composto por 10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de NaCl, pH 7,5. Para o preparo de meio sólido e placas adicionou-se 15g/L de agar (Gibco-BRL).

Ampicilina: concentração utilizada: 70μg/mL (Sigma, USA).

### 3.5. Isótopos radioativos

[$\alpha^{32}$P] dCTP: (3000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech Ltda., England; DuPont New England Nuclear, USA).

### 3.6. Antisoros

Antisoros primários: antisoro monoclonal anti-RECK (32C10A) (Medical & Biological Laboratories - MBL, USA); antisoro policlonal anti-p21 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA); antisoro policlonal anti-Rb (G3-245) (Pharmingen, USA); antisoro policlonal anti α-tubulina (cedido pelo Dr. Frank Solomon, MIT, USA); antisoro policlonal anti-GFAP (Sigma, USA).

Antisoros secundários: anti IgG de coelho e de camundongo conjugado com peroxidade (Sigma, USA e Vector Laboratories, USA).

### 3.7. Soluções

Todas as soluções utilizadas são feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, seguindo formulações descritas em manuais de laboratório (Ausubel FM, 1999, Sambrook J, 1989).

## Métodos

### 3.8. Cultura de Células

Fibroblastos 3T3 de camundongos Balb/c (clone A31) e de camundongos SWISS (NIH3T3) foram mantidos em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS), 100μg/mL de estreptomicina e 25μg/mL de ampicilina, à temperatura de 37°C. As culturas foram subdivididas quando as células atingiam uma densidade equivalente a 80% da densidade de saturação, utilizando tripsina 0,1% em PBSA contendo 1mM de EDTA. Os estoques celulares são mantidos no meio de cultivo contendo 10% DMSO a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

### 3.9. Amostras Teciduais

Astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecidos cerebrais não-tumorais (obtidos a partir de cirurgias para epilepsia) foram coletados rapidamente após a intervenção cirúrgica (Faculdade de Medicina – USP tendo sido fornecidas pelo Laboratório de Investigação em Neurologia, coordenado pela Profa. Dra. Sueli Marie) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O termo de consentimento de doação, seguindo as normas institucionais da Faculdade de Medicina - USP, foi obtido de todos os pacientes. Uma pequena porção do tecido foi usada para o processamento e obtenção das culturas primárias (descrito a seguir, no item 3.10). Alíquotas dos tecidos foram pulverizados em cadinho, mantido na presença de nitrogênio líquido, lisados com isotiocianato de guanidina e mantidos à -70°C até o isolamento do RNA. Amostras teciduais para análises de

imunohistoquímica foram fixadas em paraformaldeído 3,7%, embebidos em parafina e cortados, de modo consecutivo, em secções de 4μm de espessura. Os diferentes astrocitomas foram catalogados por graus, de acordo com o sistema WHO. A Tabela 3.9.1 mostra os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.

### 3.10. Culturas Primárias de Tumores e Tecido Normal de Cérebro

Uma parte representativa de cada tumor (astrocitomas de diferentes graus de progressão maligna) foi selecionada por um patologista da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) e processadas no laboratório de modo a se obter culturas primárias a partir destes materiais. Cada amostra do tecido tumoral foi reduzida a pequenos pedaços e, se necessário, digeridas com a enzima colagenase (Liberase, Roche) de 10 a 20min. A suspensão celular foi plaqueada em placas de 150mm de diâmetro e mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino (concentração final - 10%), 100μg/mL de estreptomicina e 25μg/mL de ampicilina, sendo mantidas à temperatura de 37°C. Estas culturas primárias foram mantidas até atingirem a sub-confluência, quando, então, as células foram lisadas por incubação com isotiocianato de guanidine e mantidas à -70°C até o isolamento do RNA. Para as análises de imunohistoquímica estas culturas primárias foram plaqueadas em lamínulas de vidro e fixadas com paraformaldeído 3,7%, por 10 min, a 37°C.

**Tabela 3.9.1.** Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.

| *Dados dos Pacientes* | | | | *Dados Clínicos* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Número | Identificação | Idade (anos) | Sexo | Registro | Data da Cirurgia | Anátomo-patológico | Sobrevida (meses) |
| 332 | MSM | 23 | F | 3359015D | 25/07/02 | Normal | - |
| 337 | JNS | 41 | M | 2243166K | 01/08/02 | Normal | - |
| 349 | AGCC | 41 | M | 55301488G | 21/08/02 | Normal | - |
| 368 | SSC | 30 | M | 3281997D | 26/09/02 | Normal | - |
| 400 | ABF | 45 | M | 7024322B | 27/11/02 | Normal | - |
| 411 | LKS | 37 | F | 77062249A | 19/12/02 | Normal | - |
| 462 | ZZP | 51 | F | 77063508H | 20/03/03 | Normal | - |
| 352 | JRS | 35 | M | 13578917K | 23/08/02 | Grau I | - |
| 363 | RFC | 13 | M | 6063214G | 18/09/02 | Grau I | - |
| 421 | LAPV | 16 | F | 13473553G | 15/01/03 | Grau I | - |
| 436 | WGG | 18 | M | 13570687I | 10/02/03 | Grau I | - |
| 463 | SEM | 18 | F | 13449456G | 21/03/03 | Grau I | - |
| 495 | ASJM | 8 | F | 13492358C | 21/05/03 | Grau I | - |
| 501 | RJB | 32 | M | 13491797C | 28/05/03 | Grau I | - |
| 570 | KBRP | 8 | F | 13594605C | 01/09/03 | Grau I | - |
| 594 | JCFS | 18 | M | 3367062G | 24/09/03 | Grau I | - |
| 601 | JJS | 21 | M | 1359908G | 06/10/03 | Grau I | - |
| 101 | JNO | 24 | F | 7047105H | 04/06/01 | Grau II | - |
| 250 | MBC | 31 | F | 13562412F | 11/03/02 | Grau II | 13 |
| 267 | AMM | 44 | M | 13574538G | 01/04/02 | Grau II | - |
| 328 | CHR | 39 | M | 77063187A | 17/07/02 | Grau II | - |
| 341 | ML | 29 | M | 3361902H | 09/08/02 | Grau II | - |
| 346 | RTP | 23 | M | 77062139H | 15/08/02 | Grau II | - |
| 392 | ARV | 25 | F | 3233880E | 11/11/02 | Grau II | - |
| 452 | MRS | 42 | M | 77062882E | 10/03/03 | Grau II | - |
| 453 | JOJ | 29 | M | 3144835K | 11/03/03 | Grau II | - |
| 467 | MAM | 41 | F | 13484936E | 27/03/03 | Grau II | - |
| 490 | NNS | 37 | M | 13491090E | 13/05/03 | Grau II | - |
| 577 | RNN | 35 | F | 13592815B | 05/09/03 | Grau II | - |
| 28 | GAB | 53 | M | 3003852-K | 30/10/00 | Grau III | - |
| 34 | MGCJ | 18 | M | 3324020-E | 20/11/00 | Grau III | - |
| 73 | MCV | 24 | F | 7042702A | 16/03/01 | Grau III | - |
| 106 | ACSF | 68 | M | 13538111G | 22/06/01 | Grau III | 7 |
| 233 | OAA | 58 | F | 13567029I | 15/02/02 | Grau III | 1 |
| 338 | LKH | 37 | F | 13580020H | 05/08/02 | Grau III | 14 |
| 360 | ICVK | 32 | F | 77063981H | 13/09/02 | Grau III | - |
| 410 | AAS | 29 | M | 13472055H | 19/12/02 | Grau III | - |
| 428 | FCR | 22 | M | 13454723D | 24/01/03 | Grau III | - |
| 451 | AFL | 34 | M | 13482045E | 07/03/03 | Grau III | - |
| 478 | ASM | 36 | M | 77066277G | 11/04/03 | Grau III | - |
| 514 | LFF | 37 | M | 13498164D | 16/06/03 | Grau III | - |
| 35 | MPS | 53 | M | 1352122-H | 24/11/00 | GBM | 45 |
| 74 | UC | 75 | M | 7045824G | 19/03/01 | GBM | 17 |
| 89 | MJDAS | 49 | F | 13516802C | 26/04/01 | GBM | 38 |
| 170 | ACO | 50 | M | 13554147K | 19/10/01 | GBM | 8 |
| 208 | EFC | 63 | M | 2869282K | 04/01/02 | GBM | 6 |
| 256 | CDS | 42 | M | 13572856A | 21/03/02 | GBM | 3 |
| 269 | ELAD | 65 | F | 13574725E | 12/04/02 | GBM | 12 |
| 297 | MCE | 79 | F | 13445637B | 23/05/02 | GBM | 11 |
| 317 | MJO | 72 | F | 2357547B | 24/06/02 | GBM | 3 |
| 356 | JS | 74 | M | 5163770G | 30/08/02 | GBM | 12 |
| 370 | WAS | 45 | M | 13581612B | 27/09/02 | GBM | 12 |
| 380 | SDS | 62 | M | 13462498E | 21/10/02 | GBM | - |
| 384 | CSS | 45 | M | 1356103K | 25/10/02 | GBM | 5 |
| 391 | IPP | 54 | F | 13581546D | 07/11/02 | GBM | 13 |
| 397 | MCS | 59 | F | 2995994F | 20/11/02 | GBM | 5 |
| 435 | JCPS | 35 | M | 13473986A | 07/02/03 | GBM | 12 |
| 440 | MAC | 76 | M | 3058444F | 13/02/03 | GBM | - |
| 442 | MSS | 69 | M | 13473990D | 17/02/03 | GBM | 4 |
| 450 | CMT | 62 | F | 13481051K | 06/03/03 | GBM | - |
| 487 | CFA | 69 | M | 13490296G | 06/05/03 | GBM | - |

### 3.11. Preparo de bactérias competentes utilizando $CaCl_2$ e transformação de *Escherichia coli* com DNA plasmideal

Uma colônia de bactérias é inoculada em 40mL de meio LB e cultivada sob agitação a 37°C até uma densidade óptica a 600nm de 0,5 ($OD_{60}$=0,5). A suspensão de bactérias é resfriada em gelo por 10min. e centrifugada a 1500g por 7min. a 4°C. Descarta-se o sobrenadante e o sedimento de bactérias é ressuspenso em 10mL de uma solução contendo $CaCl_2$ 60mM (pré-resfriada em gelo). Centrifuga-se a suspensão a 1500g por 5min. a 4°C, descarta-se o sobrenadante e o sedimento de bactérias é ressuspenso em 2mL da solução de $CaCl_2$ 60mM, contendo 15% de glicerol. A suspensão é aliquotada e estocada a -70°C. Um tubo contendo 50μL da bactéria competente (estocada a -70°C) é descongelado rapidamente e mantido em gelo. Adiciona-se o plasmídeo a ser amplificado (100ng) e mantém-se o tubo no gelo por 30min. O tubo é aquecido a 42°C por 1min. e rapidamente transferido para o gelo, onde se mantém por, pelo menos, 1 min. A mistura é transferida para 1,0mL de meio de cultura LB e incubada a 37°C por 1h com agitação moderada. Diferentes diluições da cultura bacteriana são semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido (agar 1,5%) contendo o antibiótico adequado (ampicilina).

### 3.12. Preparação de DNA plasmideal em média escala

Para a preparação de DNA plasmideal, utilizou-se o kit da QIAGEN (QIAfilter plasmid mid). Uma colônia de bactérias transformada com o DNA plasmideal é inoculada em 50mL de meio LB contendo o antibiótico adequado (ampicilina). Cultiva-se a 37°C com agitação durante 16-18h. Centrifuga-se esta cultura a 6000g por 15min. e descarta-se o sobrenadante. Ressuspende-se o sedimento de bactérias em 4mL de tampão P1 (TrisHCl 50mM, EDTA 10mM, 100μg/mL de RNAse A, pH 8,0). Em seguida, adiciona-se 4mL do tampão de lise P2 (NaOH 200mM, 1% de SDS), mistura-se suavemente e incuba-se a temperatura ambiente por 5min. Adiciona-se o tampão de neutralização P3 (KAc 3,0M, pH 5,5), mistura-se rapidamente, porém com cuidado para não ocorrer quebra do DNA genômico. O precipitado de proteínas e DNA genômico é, então, eliminado através de filtração utilizando os QIAfiltros. O lisado límpido é aplicado a uma coluna

contendo uma resina de troca iônica a qual se liga o DNA plasmideal. Essa coluna foi previamente equilibrada com 4mL de tampãp QBT (NaCl 750mM, MOPS 50mM, 15% de etanol, 0,15% de Triton X100, pH 7,0). Após a passagem do lisado pela coluna, lava-se a coluna duas vezes com 10mL do tampão QC (NaCl 1,0M, MOPS 50mM, 15% de etanol, pH 7,0). O DNA plasmideal é, então, eluído da coluna com 5mL do tampão QF (NaCl 1,25M, TrisHCl 50mM, 15% de etanol, pH 8,5). Precipita-se o DNA adicionando 3,5mL de isopropanol a temperatura ambiente. Centrifuga-se imediatamente a 15.000g por 45min., a 4°C, e remove-se o sobrenadante cuidadosamente. Lava-se o precipitado de DNA com 2mL de Etanol 70% e centrifuga-se novamente a 15.000g por mais 15min. Remove-se o sobrenadante, seca-se o precipitado de DNA a temperatura ambiente por 5min. e dissolve-se em um volume apropriado de tampão TE (TrisHCl 10mM, EDTA 1,0mM, pH 8,0). O DNA plasmideal é quantificado por espectrofotometria e analisado através de digestão com enzimas de restrição apropriadas e eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA, pH 7,5) contendo 0,5μg/mL de brometo de etídeo.

### 3.13. Transfecção estável de células de mamíferos com DNA plasmideal

As células foram plaqueadas em placas de 60mm de diâmetro ($5,0 \times 10^5$ células/placa) e mantidas em meio DMEM contendo 10% de FCS no dia anterior, de forma a atingirem aproximadamente 80% da confluência no momento da transfecção. Os DNAs plasmideais, purificados usando o kit QIAfilter plasmid midi kit (Qiagen), foram transfectados usando reagentes lipídicos catiônicos. 2μg do plasmídeo de interesse (pCXN2-hRECK, pCXN2 vazio, pBabePuro ou ainda pBabePuro-MycER™) e, quando desejável, 0,2μg do plasmídeo que confere resistência à higromicina (pX343) foram transfectados usando o reagente LipofectAMINE PLUS™ (Gibco-BRL Life Technologies) em meio sem soro. Após incubação de 3-6h à 37°C em atmosfera contendo 5% $CO_2$, as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FCS. Após 48h as culturas são divididas e mantidas em meio seletivo contendo a antibiótico adequado (geneticina ou higromicina). As colônias obtidas são separadas por tripsinização com

o auxílio de anéis de clonagem (ver item 3.14). Para a geração das chamadas Pop-hRECK e Pop-pCXN2 os diversos clones resistentes foram reunidos, gerando duas populações transfectantes de células.

### 3.14. Isolamento dos clones celulares

As placas contendo as colônias resistentes ao antibiótico são lavadas uma vez em PBSA. Após a remoção do PBSA, anéis de clonagem são colocados em volta das colônias de forma a separá-las do resto da placa. A solução de tripsina é adicionada sobre a colônia circundada pelo anel e as células são coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As células correspondentes a cada colônia (clone) são transferidas para uma placa de 35mm e mantidas em meio seletivo. Os clones resistentes são expandidos para posterior análise.

### 3.15. Transfecção Transitória - Medida da Atividade de Luciferase

As linhagens celulares (3,0 x $10^4$ células) são plaqueadas em placas de 12 poços (22mm de diâmetro) no período de 24h antes da transfecção. DNAs plasmideais, purificados por QIAfilter plasmid midi kit (Qiagen), foram transfectados utilizando o método de fosfato de cálcio. Misturou-se o DNA plasmideal com 15μL de $CaCl_2$ 2,5M e adicionou-se água para um volume final de 150μL. A essa solução foi adicionado 150μL de tampão BBS 2X (BES 50mM, NaCl 280mM e $Na_2HPO_4$ 1,5mM) gota a gota e com borbulhamento. A mistura foi incubada por 15min. a temperatura ambiente e a seguir, adicionada às células em cultura.

Para avaliar a atividade promotora da porção 5' do gene *RECK* de camundongo, 1μg do plasmídeo repórter luciferase e 0,25μg do plasmídeo de referência pRL-TK (Promega) foram utilizados em cada transfecção. O plasmídeo pRL-TK, que contém a porção codificante do gene da Renilla luciferase sob a ação de um promotor constitutivo (HSV-tk), foi usado como um controle interno para normalizar a eficiência de cada transfecção. Para ensaios de co-transfecção, 4μg do vetor de expressão c-*myc* (pBabePuro-MycER™), 1μg do plasmídeo repórter luciferase (pGL3-constructs) e 0,25μg do plasmídeo pRL-TK, foram utilizados em

cada transfecção. As células foram tratadas (ou não) por 48h com 4-hidroxitamoxifeno (200nM). 24h após a transfecção, as culturas foram lavadas com PBSA e o meio de cultura (DMEM-10%FCS) foi renovado.

Após 24h adicionais, para a medida da atividade do gene repórter, as células foram lavadas duas vezes com PBSA, incubadas por 30min. sob agitação, a temperatura ambiente, com o tampão "Passive Lysis Buffer" 1X (Promega) e coletadas (este lisado pode ser estocado a -20°C por, no máximo, um mês). A expressão do gene repórter luciferase foi analisada utilizando o kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) e um luminômetro (EG & G Berthold, Microplate Luminometer LB 96V). Para medir a atividade da luciferase, adicionou-se 100μL do "Luciferase Assay Reagent II (LARII)" a 20μL do lisado celular e imediatamente mediu-se a luz emitida durante 10s. Em seguida, para medir a atividade da Renilla luciferase, foi adicionado, a este mesmo tubo contendo o lisado e o reagente LARII, 100μL do reagente "Stop & Glo" e mediu-se a luz emitida durante 10s. A atividade de luciferase foi normalizada para a eficiência de transfecção e para as diferenças nas quantidades molares das construções de mutantes de deleção (pGL3-constructs).

### 3.16. Ensaio de Northern Blot

RNA total ou RNA Poly(A)+ foram extraídos através de lise celular com solução de isotiocianato de guanidina e purificados por centrifugação em solução de CsCl (Chirgwin et al., 1979) ou utilizando o QuickPrep Micro mRNA Purification kit (Amersham Biosciences), respectivamente.

A) Fracionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído e transferência para membrana de nylon: Alíquotas de 2μg de mRNA ou 20μg de RNA total são tratadas, por 10min a 65°C, em solução 18% de formaldeído, 50% de formamida e 1X tampão MOPS, contendo brometo de etídeo e, logo em seguida são colocadas em gelo para manter a linearização das moléculas de RNA. Após a adição do tampão de amostra 5X concentrado (50% de glicerol; 0,125% de Azul de bromofenol; 0,125% de xileno cianol) para volume final 1X, o RNA é fracionado

em gel 1,2% de agarose-formaldeído, em tampão 1X MOPS, sob voltagem constante (80Volts). Após a corrida, o gel é irradiado com luz ultravioleta para análise da qualidade do RNA. O gel é lavado 3 vezes (10min cada) com água para a remoção do excesso de formaldeído. O RNA fracionado é transferido, por capilaridade, para membranas de nylon, em 10X SSC por, mais ou menos, 15h. Após a transferência, as membranas foram lavadas em 6X SSC e submetidas a 80°C, por 2h para fixação dos RNAs na membrana.

B) Preparo da sonda de DNA radioativa: Para a marcação da sonda radioativa utiliza-se [$\alpha$-$^{32}$P] dCTP e o kit "Ready to Go" (Amersham Pharmacia Biotech), baseado na reação de "Random Primer Extension" (Feinberg & Vogelstein, 1984). Adicionam-se 20µL de água à mistura de reação (uma solução liofilizada contendo dATP, dGTP e dTTP, 4-8 unidades da enzima Klenow) e coloca-se em gelo por 5-60min. A solução contendo 25-50ng do fragmento de DNA (25µL) é fervida por 5min para desnaturação, imediatamente resfriada em gelo. Em seguida, esta solução de DNA (25µL) é adicionada à mistura de reação reconstituída em água (20µL) juntamente com 5µL (50µCi) de [$\alpha$-$^{32}$P] dCTP (3000µCi/mmol). Mistura-se gentilmente e incuba-se a reação a 37°C por 30min. As sondas radioativas são separadas dos nucleotídeos livres em colunas de Sephacryl S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech) e desnaturadas em água fervente por 5min antes de serem utilizadas para a hibridização. A sonda correspondente ao transcrito de *RECK* foi preparada a partir do fragmento de 1,5Kb obtido por digestão do plasmídeo pSK-mRECK com a enzima SacI. A sonda correspondente ao controle interno 36B4 foi preparada a partir do fragmento de 0,8Kb obtido por digestão do plasmídeo pGEM-36B4 com a enzima de restrição PstI. A sonda correspondente ao transcrito de c-*myc* foi preparada a partir da digestão do plasmídeo pBabePuro-MycER™ utilizando a enzima EcoRI.

C) Hibridização e lavagem dos filtros: As membranas são pré-hibridizadas a 42°C por, no mínimo, 2h e a seguir, hibridizadas a 42°C por 24h, em 5X SSPE, 50% de formamida, 5X solução de Denhardt, 0,1% de SDS, 100µg/mL de DNA de

esperma de salmão (desnaturado) e a sonda marcada com $\alpha[^{32}P]$dCTP (pelo menos 5,0 x $10^5$ cpm/mL) desnaturada. Após a hibridização, as membranas são lavadas duas vezes em 2X SSC e 0,1% de SDS a temperatura ambiente por 30min e 4 vezes em 0,2X SSC e 0,1% de SDS a 56°C por 30min. As membranas são expostas a telas do PhosphoImager e o sinal foi detectado utilizando o Storm PhosphoImager Analyser (Molecular Dynamics). A quantificação foi realizada utilizando-se o programa ImageQuant Software.

### 3.17. Ensaio de Hibridização Molecular - CodeLink "bioarrays"

A plataforma "CodeLink UniSet Mouse Bioarrays" (GE - Healthcare) é constituída por 10.000 oligonucleotídeos derivados de genes de camundongo depositados no GenBank.

Os RNAs obtidos nas duas linhagens transfectantes foram novamente purificado utilizando o kit RNeasy (Qiagen). Foram ainda utilizados diferentes concentrações de mRNAs de genes bacterianos (araB, entF, fixB, gnD, hisB e leuB) como controles positivos do experimento (marcação e sensibilidade).

A) Síntese do cDNA. Para a síntese da primeira fita do cDNA foi utilizado 2μg de RNA total purificado, 2μL do mRNA controle (bacteriano), 1μL do "primer" T7 "oligo dT" (5mM) e água Milli-Q para um volume final de 12μL. As amostras foram incubadas a 70°C por 10min. e logo em seguida mantidas em gelo. Adicionou-se 2μL do tampão da primeira fita, 4μL do mix de dNTPs (5mM), 1μL de inibidor de Rnase e 1μL da enzima transcriptase reversa. As amostras foram incubadas a 42°C por 2h. Para a síntese da segunda fita foi adicionado à reação 63μL de água Milli-Q, 10μL de tampão para segunda fita (10X), 4μL do mix de dNTPs (5mM), 2μL de DNA polimerase e 1μL de RNAseH (2 unidades). O tubo foi gentilmente agitado e incubado por 2h, 16°C. A purificação do cDNA dupla fita foi realizada utilizando o kit QIAquick Spin (Qiagen)

B) Síntese e Fragmentação do cRNA. Ao cDNA dupla fita foi adicionado 9,5μL de água Milli-Q e 4,0μL de tampão de reação T7. Em seguida adicionou-se 4μL de

solução T7 ATP, 4μL de GTP, 4μL de CTP, 4μL de UTP, 7,5μL de biotina-11-UTP (10mM) e 4μL do mix da enzima T7 RNA polimerase (10X). As amostras foram incubadas a 37°C por 14h. 10μg do cRNA previamente sintetizado foram diluídos para um volume final de 10μL em água Milli-Q. Adicionou-se 5μL do tampão de fragmentação (5X) e as amostras foram incubadas a 94°C por 20min. e, em seguida, mantidas em gelo por 5min.

C) Hibridização, Lavagem e Marcação com Cy5-Estreptavidina. Para cada bioarray foram preparados 260μL de uma solução de hibridização contendo 78μL do tampão A, 130μL do tampão B, 25μL do cRNA fragmentado e 27μL de água Milli-Q. As soluções foram agitadas por 5min. e em seguida incubadas a 90°C por 5min. Em cada "bioarray" foram aplicados 250μL da solução de hibridização e, em seguida, as câmeras de hibridização foram seladas adequadamente. Os "bioarrays" foram incubados a 37°C, 300rpm por aproximadamente 20h. Após a hibridização os adesivos que selavam as câmeras de hibridização foram cuidadosamente removidos e os "bioarrays" colocados em um reservatório contendo solução de TNT 0,75X (solução TrisHCl 0,1M pH 7,6, NaCl 0,15M e 0,05% Tween 20), a temperatura ambiente e, em seguida, em solução de TNT 0,75X a 46°C por 1h. A seguir, os "bioarrays" foram incubados em solução de Cy5-Estreptavidina por 30min, protegido da luz. Foram realizadas 4 lavagens em solução TNT 1X por 5min., também protegido da luz. A seguir, os "bioarrays" foram lavados em solução 0,05% Tween 20, por 5s, 3X. Por fim, os "bioarrays" foram secos através de centrifugação a 644g por 3min. e armazenados, em ambiente protegido da luz, até que fossem escaneados.

D) Aquisição e Análise dos Dados. Os "bioarrays" foram escaneados pelo escaner Axon GenePix (Axon Instrument) e os dados relativos às intensidades de fluorescência emitida pelos "spots" foram coletados pelo programa GenePix Pro (Axon Instruments). Após coleta dos dados, o programa invalidou automaticamente os "spots" que apresentavam irregularidades de fabricação e o programa "CodeLink

System Software" normalizou os dados em relação à mediana das intensidades dos "spots". Os controles positivos e negativos são avaliados neste momento.

### 3.18. Reação de Transcrição Reversa

RNA total foi isolado previamente como descrito no ítem 3.16. A qualidade dos RNAs foi avaliada por análise dos RNAs ribossomais fracionados após eletroforese em gel de agarose e por amplificação do transcrito correspondente ao controle interno gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A transcrição reversa foi realizada usando 0,7μg de RNA. Após o anelamento dos "primers": "oligo dT" e "random primers" (por 10min. à 20°C), a síntese de cDNA foi realizada por 2h a 42°C, seguida pela inativação enzimática (5min. a 95°C). As amostras foram então tratadas com RNaseH (2 unidades) for 30min.

### 3.19. PCR em tempo real

O PCR em tempo real foi realizado em um volume final of 12μL. Foram utilizados 3μL do cDNA sintetizado anteriormente (item 3.18), 3μL do mix de "primers" forward/reverse (600 a 800nM) e 6μL do Master Mix PCR (Applied Biosystems). Os "primers" foram desenhados usando o programa Primer Express Software package Version 1.5 (PE Applied Biosystems) e sintetizados pela Instrucom. "Primers" correspondentes aos genes GAPDH e tubulina foram usados como controles internos. Todas as amplificações foram realizadas em ABI Prism 7500 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems), usando as seguintes condições: desnaturação à 95°C por 10min, 40 ciclos de 15s a 95°C (desnaturação) e 60s a 60°C (anelamento e elongação). A quantificação das amostras foi realizada usando GAPDH e tubulina como controles e os valores relativos de expressão foram calculados segundo Livak and Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001).

Seqüência dos "primers" utilizados:

hRECK: Foward: 5´-TGC AAG CAG GCA TCT TCA AA-3`

Reverse: 5´-AAC GAG CCC ATT TCA TTT CTG -3´

mRECK: Foward: 5´-GGA TGT TAC GGG TAT TAT TTG ACA AA-3`

| | |
|---|---|
| | Reverse: 5´-GCA TGC GGA CCT TCT GAA GA -3´ |
| hGAPDH | Foward: 5´-ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA -3` |
| | Reverse: 5´-CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG T -3 |
| mGAPDH | Foward: 5´-CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA-3` |
| | Reverse: 5´-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA-3 |
| hMyc | Foward: 5´-CAG CTG CTT AGA CGC TGG ATT-3` |
| | Reverse: 5´-GAG GTC ATA GTT CCT GTT GGT GAA-3 |
| hTubulina | Foward: 5´-TCA ACA CCT TCT TCA GTG AAA CG -3` |
| | Reverse: 5´-AGT GCC AGT GCG AAC TTC ATC -3 |
| m p21 | Foward: 5´-GAT CCA CAG CGA TAT CCA GAC A -3` |
| | Reverse: 5´-AGA GAC AAC GGC ACA CTT TGC -3 |

### 3.20. Ensaio de Western blot

Extratos de proteínas totais foram obtidos a partir de lise celular (Tris-HCl 10mM - pH 7,5, NaCl 150mM, 1% de deoxicolato de sódio, 1% de Nonidet P-40, 0,1% de SDS). Após normalização de acordo com a quantidade de proteína, 100μg de proteína foram separados em gel de 8 a 15% poliacrilamida-SDS, de acordo com o método de Laemmli (Laemmli, 1970). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Bioscience) utilizando o sistema de transferência úmida da BioAgency, em tampão de transferência (TrisCl 25mM pH 7,4, glicina 190mM, 20% de metanol), 300mA por 3h. 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 5% de leite em pó em tampão TBST (TrisCl 50mM pH 7,4, NaCl 200nM, 0,5% de Tween 20) por, no mínimo, 1h a temperatura ambiente, sob agitação. A seguir, a membrana foi lavada duas vezes por 10min. com TBST e incubada, a temperatura ambiente, com o antisoro primário adequado diluído em TBST - 5% de leite: anti-human RECK (5μg/mL) por 2h; anti-p21 (1:250) por 1h; anti-Rb (1:250) por 2h ou anti-tubulina (1:1000) por 1h. A membrana foi lavada (3 vezes por 10min.) com TBST e incubada com o antisoro secundário diluído em TBST - 5% de leite: anti-camundongo ou anti-coelho IgG conjugado com peroxidase (1:1000) por 45min, a temperatura

ambiente. Após lavagens com TBST (3 vezes por 10min.) a membrana foi revelada por quimioluminescência, utilizando o kit ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences). Filmes de raio-X (X-omat K) foram expostos à membrana até a obtenção do sinal adequado (1-5min.).

### 3.21. Imunohistoquímica

Secções (4μm de espessura) de tumores fixados em formaldeído e embebidos em parafina foram preparados previamente. A seguir, as amostras foram hidratadas em álcool e água. As secções foram autoclavadas por 3min. em tampão citrato 10mM - pH 9,0 para a exposição de antígenos e incubadas com $H_2O_2$ 3% por 10min. O anticorpo monoclonal anti-human RECK (diluído 1:200) foi utilizado para marcação primária, seguido pelo anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase. Anticorpo policlonal anti-GFAP (diluído 1:1000) também foi utilizado. A imunoreatividade foi visualizada com 3-3´diaminobenzidina (DAB). O controle negativo foi obtido, omitindo a marcação com o anticorpo primário.

### 3.22. Curva de Crescimento

Cada linhagem celular (5,0 x $10^4$ células) foi plaqueada em placas de 35mm em meio DMEM-10% FCS e mantida a 37°C em atmosfera de 5% $CO_2$. O meio de cultura é renovado a cada três dias. Triplicatas de cultura de cada linhagem celular foram coletadas por tripsinização nos períodos de tempo indicados, fixadas com solução de formaldeído 3,7% em PBSA e contadas em contador eletrônico CELM CC-530 (São Paulo, Brazil).

A partir dos resultados obtidos para as curvas de crescimento foi possível calcular parâmetros envolvidos no controle da proliferação celular, como o tempo de dobramento e a densidade de saturação das diferentes linhagens.

O tempo de dobramento, em cada um dos experimentos independentes, foi calculado a partir da aproximação de uma curva de regressão não linear sobre os dados do número de células obtidos entre os dias 3 e 5 das curvas de crescimento. A curva exponencial é aproximada com base nos dados das triplicatas de modo que os coeficientes de regressão não linear ($R^2$) obtidos sejam o mais próximo de 1. Para

análise dos resultados, foram considerados os tempos de dobramento médios obtidos com base nas curvas exponenciais aproximadas dos três experimentos independentes.

Da mesma forma, a partir dos dados obtidos das triplicatas dos três experimentos independentes, foi calculada a densidade de saturação média das diferentes linhagens celulares. A partir da análise dos dados dos ensaios de proliferação, foi inferido que as células atingiram a densidade de saturação apenas depois de nove dias mantidas em cultura.

### 3.23. Análise por Citometria de Fluxo

Cada linhagem celular (5,0 x $10^5$ células) foi plaqueada em placas de 100mm em meio DMEM-10% FCS. As células foram carenciadas para soro por 24h e a seguir estimuladas com soro fetal bovino 10% por diferentes períodos de tempo. A seguir, as células foram tripsinizadas, coletadas por centrifugação, ressuspensas em 0,5mL de PBSA e fixadas com 4,5mL de etanol 70% (nesta etapa as células podem ser estocadas a 4°C por até um mês). As células fixadas foram coletadas e ressuspensas em 1,0mL de PBSA, coradas com iodeto de propídeo e tratadas com RNase A (100μg/mL). O conteúdo de DNA de cada amostra foi analisado utilizando um Citômetro de Fluxo (FACScalibur Benton Dickinson).

### 3.24. Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Instat GraphPad (GraphPad Software Inc., USA). Para a análise de apenas duas populações de dados utilizou-se a análise de variância dos dados das populações seguido por Mann-Whitney test ou Welsh *t*- test. Para análises considerando mais que duas populações de dados, os mesmos foram avaliados por análises de variância ANOVA seguido por Tukey *t*-test.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

# 4. Resultados

## 4.1. O gene *RECK* e a progressão do ciclo celular

### 4.1.1. Análise da expressão do gene *RECK* durante a progressão do ciclo celular

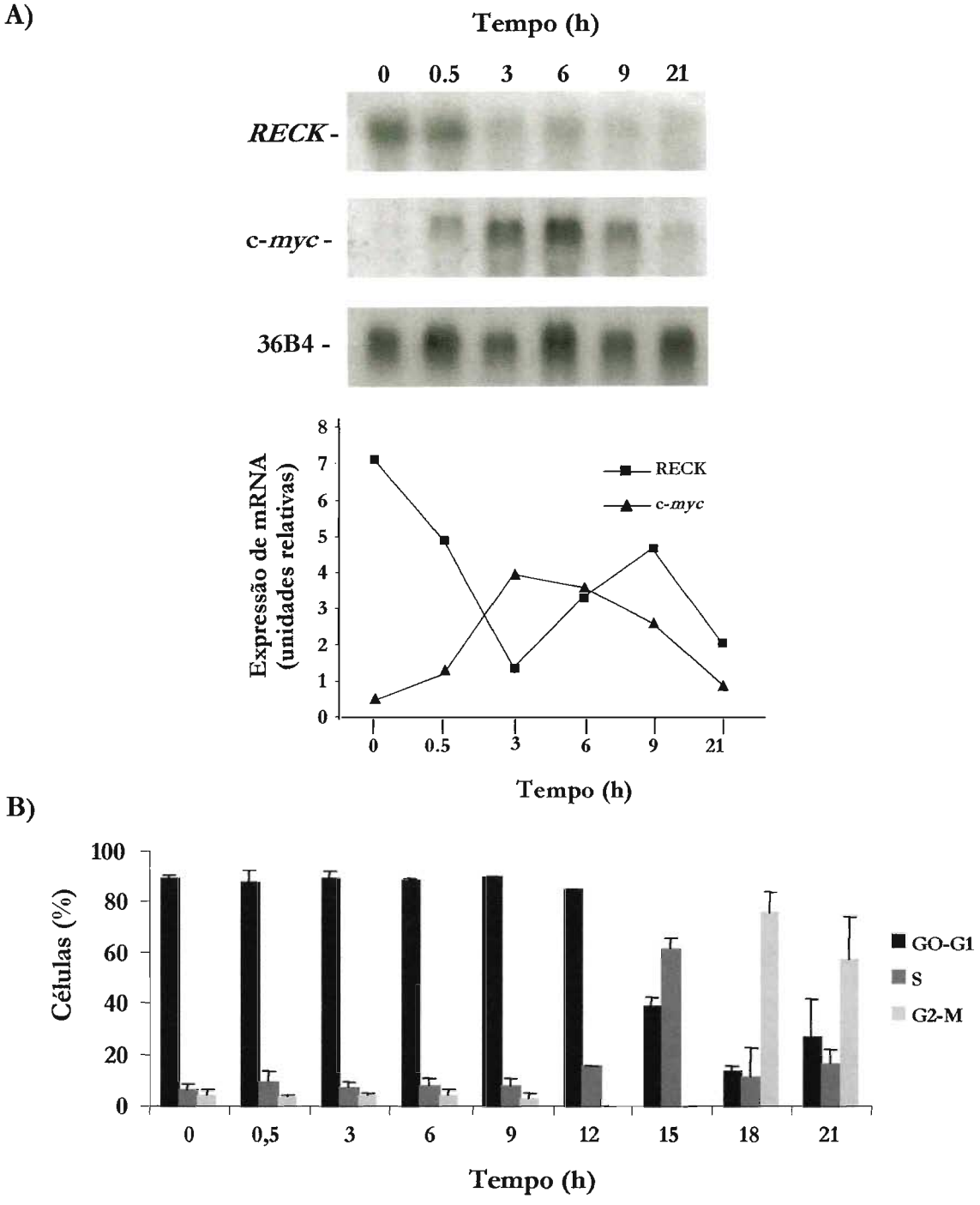
Para analisar o envolvimento do gene *RECK* na progressão do ciclo celular, foi realizado um experimento de cinética de estímulo com soro em células de fibroblastos de camundongo com o intuito de avaliar a modulação da expressão deste gene durante a progressão do ciclo celular. Com esse objetivo, fibroblastos 3T3 de camundongo Balb/c (clone A31) foram cultivados até a sub-confluência e carenciados para soro por 24h em meio contendo 0,2% de soro fetal bovino (FCS)/DMEM. Após o período de carenciamento, as células foram estimuladas com soro (concentração final: 10%) por diferentes períodos de tempo. O RNA foi coletado nos tempos indicados e submetido a ensaios de Northern-blot, usando sondas específicas para os transcritos de *RECK* e 36B4 (controle interno). A Figura 4.1.1.A mostra os resultados obtidos.

É possível observar que os níveis do transcrito correspondente ao gene *RECK* estão mais elevados nas células que foram mantidas carenciadas para soro por 24h. A medida que as células são estimuladas com soro, os níveis de transcrito de *RECK* diminuem, apresentando um máximo de declínio após 3h de estímulo com soro, mostrando que este gene é regulado durante a progressão do ciclo celular. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando fibroblastos de camundongo embrionário - células MEF (dados não mostrados).

Em paralelo, foi analisada a expressão de um gene de resposta primária a soro, o gene c-*myc*, cuja expressão tem sido extensivamente descrita como sendo regulada por soro. O pico de indução do transcrito correspondente ao gene c-*myc* é observado após 3h de tratamento com soro, mostrando que a repressão da expressão de *RECK* correlaciona com a indução da expressão do gene c-*myc* por soro durante a progressão do ciclo celular (Figura 4.1.1.A). O sinal correspondente ao gene que codifica a fosfoproteína ribossomal ácida (36B4), usado como controle

interno do experimento, foi utilizado para a normalização da quantidade de RNA aplicada em cada amostra.

O conteúdo de DNA de cada amostra utilizada na cinética foi verifcado por citometria de fluxo (FACS) de modo a analisar a distribuição celular das mesmas pelas diferentes fases do ciclo celular. A Figura 4.1.1.B mostra os resultados obtidos. É possível observar que na condição onde as células foram mantidas carenciadas para soro por 24h, aproximadamente 90% das mesmas se encontram na fase G0/G1 do ciclo celular. Após o estímulo com soro, é possível observar uma progressiva transição das células pelas diferentes fases do ciclo, atingindo o pico de porcentagem de células na fase S após 12-15h de estímulo.



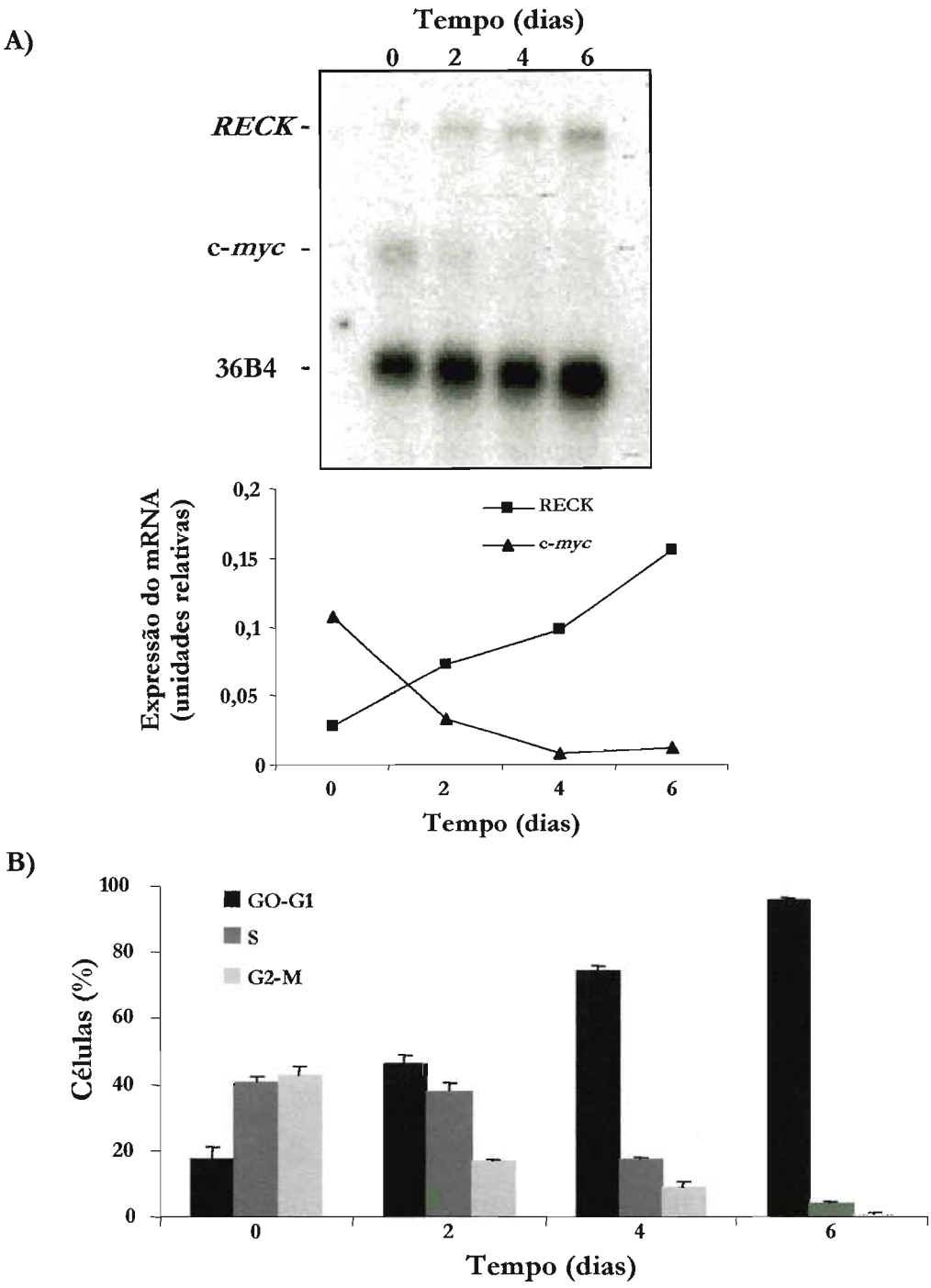

**igura 4.1.1.** Indução de c-*myc* por soro em células quiescentes e consequente entrada das células na ıse S do ciclo celular é acompanhada pela repressão da expressão de *RECK*. Células A31 foram ıantidas até a sub-confluência, carenciadas para soro por 24h em meio DMEM-0,2%FCS e, então, stimuladas com soro (concentração final - 10% FCS) pelos períodos de tempo indicados. A) Análises e Northern-blot para a expressão dos transcritos de *RECK*, c-*myc* e 36B4 (controle interno). Os sinais e hibridização foram quantificados usando um STORM Phosphor Imager e o Image Quant analysis ɔftware. B) Análises de citometria de fluxo (FACS) mostrando as diferentes fases do ciclo celular. Os ados são representativos de dois experimentos independentes feitos em duplicatas. As barras ɜpresentam o desvio padrão (+/- SD) das duplicatas de um experimento independente.

### 4.1.2. Inibição da expressão do gene *RECK* mediada pelo aumento da densidade celular

Para analisar a regulação da expressão do gene *RECK* durante a inibição de crescimento mediada pelo aumento de densidade celular, células NIH-3T3 de fibroblastos de camundongo SWISS foram plaqueadas (aproximadamente 10-20% da confluência) em meio DMEM-10% FCS e mantidas, sob as mesmas condições, por até 6 dias, de modo a promover um progressivo aumento na densidade celular. O RNA de cada condição foi coletado nos períodos de tempo indicados e submetido a ensaios de Northern-blot, utilizando sondas específicas para os transcritos correspondentes aos genes *RECK* e 36B4 (controle interno). A Figura 4.1.2.A mostra que o nível do transcrito correspondente ao gene *RECK* é progressivamente aumentado a partir do segundo dia em cultura. Em paralelo, foi examinado o nível de expressão do gene c-*myc* (Figura 4.1.2.A). Os resultados mostram que no primeiro dia, quando as células estão em crescimento exponencial, o gene c-*myc* é altamente expresso mas, após dois dias de cultivo, os níveis do transcrito correspondente a este gene são progressivamente diminuídos. O transcrito correspondente ao gene do controle interno 36B4 não foi alterado nestas condições, e foi utilizado para a normalização da quantidade de RNA aplicado em cada amostra.

A Figura 4.1.2.B mostra a distribuição celular de cada amostra usada para preparar estes RNAs, medido através de citometria de fluxo (FACS). Foi possível verificar que no dia 0 as células se encotram em crescimento exponencial, caracterizado pela distribuição homogênea das mesmas por todas as fases do ciclo. Com o progressivo aumento de densidade celular é possível observar que no dia 6, quando as células já estão em uma condição de alta densidade, aproximadamente 90% das mesmas encontram-se em um estado de "repouso", denominado G0.

Novamente, estes resultados mostram que a expressão dos genes *RECK* e c-*myc* apresentam uma correlação inversa durante a progressão do ciclo celular, *RECK* sendo induzido após os níveis mínimos de c-*myc* serem alcançados, acompanhando a entrada das células da fase de repouso G0.




**gura 4.1.2.** Repressão da expressão de c-*myc* em fibroblastos normais durante a inibição de :scimento mediada pelo aumento de densidade celular e concomitante inibição da entrada das células fase S é acompanhada pela indução da expressão do gene *RECK*. Células NIH-3T3 foram ıqueadas em DMEM-10% FCS e mantidas sob estas condições por até 6 dias, proporcionando um ɔgressivo aumento de densidade celular. A) Análises de Northern-blot para a expressão dos nscritos de *RECK*, c-*myc* e 36B4 (controle interno). Os sinais de hibridização foram quantificados ando um STORM Phosphor Imager e o Image Quant analysis software. B) Análises por citometria de xo (FACS) mostram a inibição da entrada das células na fase S do ciclo celular. Os dados são ɔresentativos de dois experimentos independentes feitos em duplicatas. As barras representam o svio padrão (+/- SD) das duplicatas de um experimento independente.

### 4.1.3. Análise do efeito da superexpressão de RECK na progressão do ciclo celular

Como os níveis do transcrito correspondentes ao gene *RECK* diminuem após a entrada das células no ciclo celular, foi analisado o efeito da superexpressão de RECK na proliferação celular e síntese de DNA. Com este objetivo, células NIH-3T3 foram estavelmente transfectadas com o vetor pCXN2-hRECK ou com o vetor pCXN2 vazio, gerando, respectivamente, as populações celulares denominadas: Pop-hRECK e Pop-pCXN2.

A população de células Pop-hRECK apresentou algumas alterações morfológicas: um citoplasma mais achatado com características de senescência. Por outro lado, as características morfológicas da população transfectante controle Pop-pCXN2 são bastante similares à linhagem parental (NIH-3T3). A morfologia das linhagens transfectantes em comparação com a linhagem parental pode ser visualizada na Figura 4.1.3.

Para confirmar a superexpressão de *RECK* na linhagem Pop-hRECK foram realizados inicialmente ensaios de PCR em tempo real, utilizando cDNAs sintetizados a partir dos RNAs obtidos das duas populações transfectantes e "primers" para o transcrito de *RECK* humano. Como o "primer" utilizado neste experimento detecta tanto o transcrito de *RECK* de camundongo como o transcrito de *RECK* humano, optou-se por carenciar para soro as diferentes populações transfectantes por um período de 24h e a seguir re-estimular por um período de 3h de modo que os níveis mínimos do transcrito de *RECK* endógeno sejam observados (ver Figura 4.1.1.A). Os resultados obtidos, representados na Figura 4.1.3.1.A, estão normalizados em relação ao transcrito correspondente ao controle interno GAPDH e em relação à população transfectante controle Pop-pCXN2. Os dados mostram que a população Pop-hRECK expressa cerca de 150 vezes mais o transcrito de *RECK* em comparação com a linhagem transfectante controle Pop-pCXN2.

Para verificar se os elevados níveis do transcrito de *RECK*, observado na população Pop-hRECK, correspondiam a uma maior expressão da proteína hRECK, foram realizados experimentos de Western-blot e imunohistoquímica nas

populações transfectantes Pop-hRECK e Pop-pCXN2, utilizando anticorpo monoclonal específico para a proteína RECK humana. A célula parental NIH-3T3 e uma linhagem controle positivo (células NIH-3T3 transfectadas transitoriamente com o vetor pCXN2-hRECK) foram utilizadas como controles (negativo e positivo, respectivamente) nas análises de Western-blot. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 4.1.3.1.B e 4.1.3.1.C e confirmam que a proteína RECK humana está superexpressa nas células transfectantes Pop-hRECK.

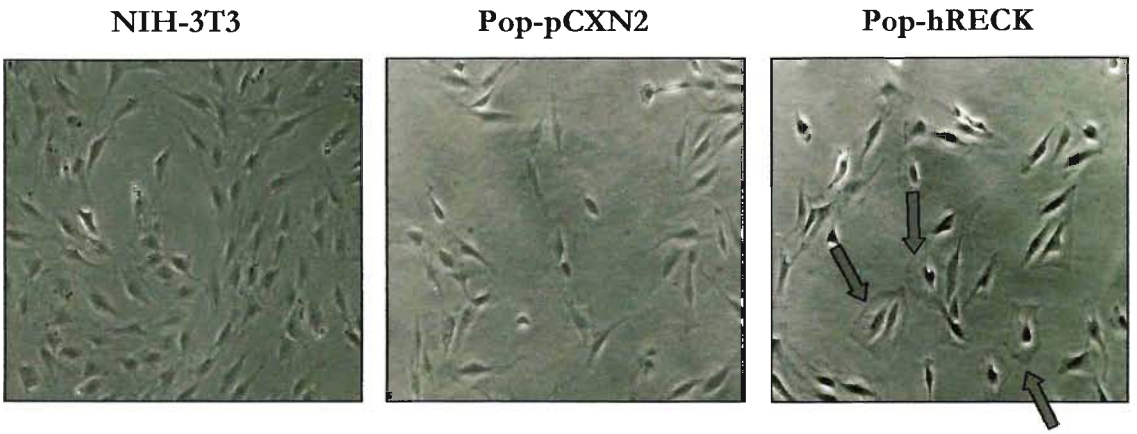
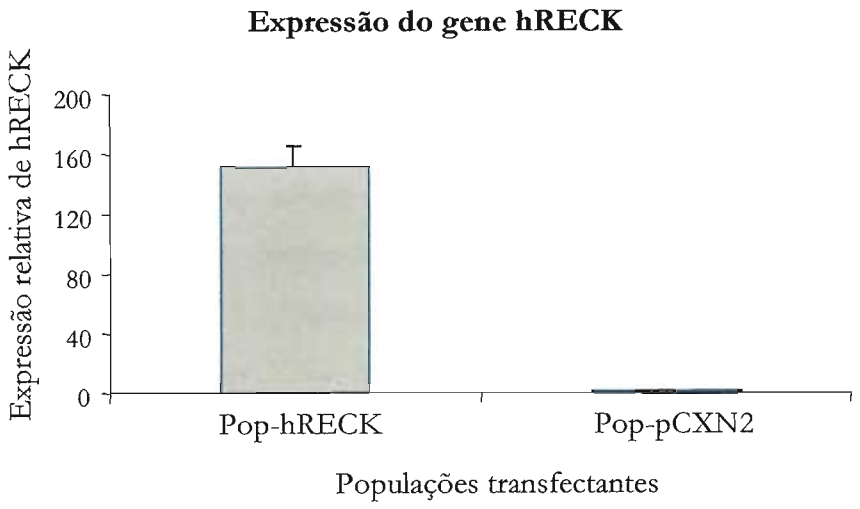
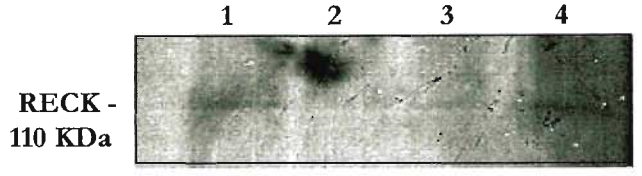



**Figura 4.1.3** Morfologia da população transfectante Pop-hRECK em comparação com a população transfectante controle e a linhagem parental. A transfecção da linhagem NIH-3T3 com o vetor pCXN2-hRECK gerou uma população celular que apresenta algumas alterações morfológicas. As células adquirem uma aparência mais achatada, com o citoplasma aumentado. Por outro lado, a transfecção da linhagem NIH-3T3 com o vetor pCXN2 vazio (população transfectante controle) gerou uma população celular com uma morfologia bastante similar à linhagem parental.

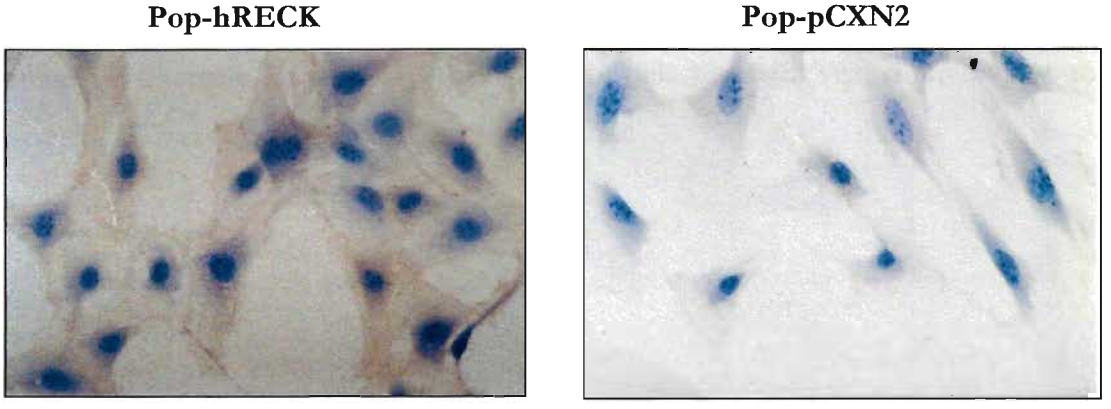
A)




B)



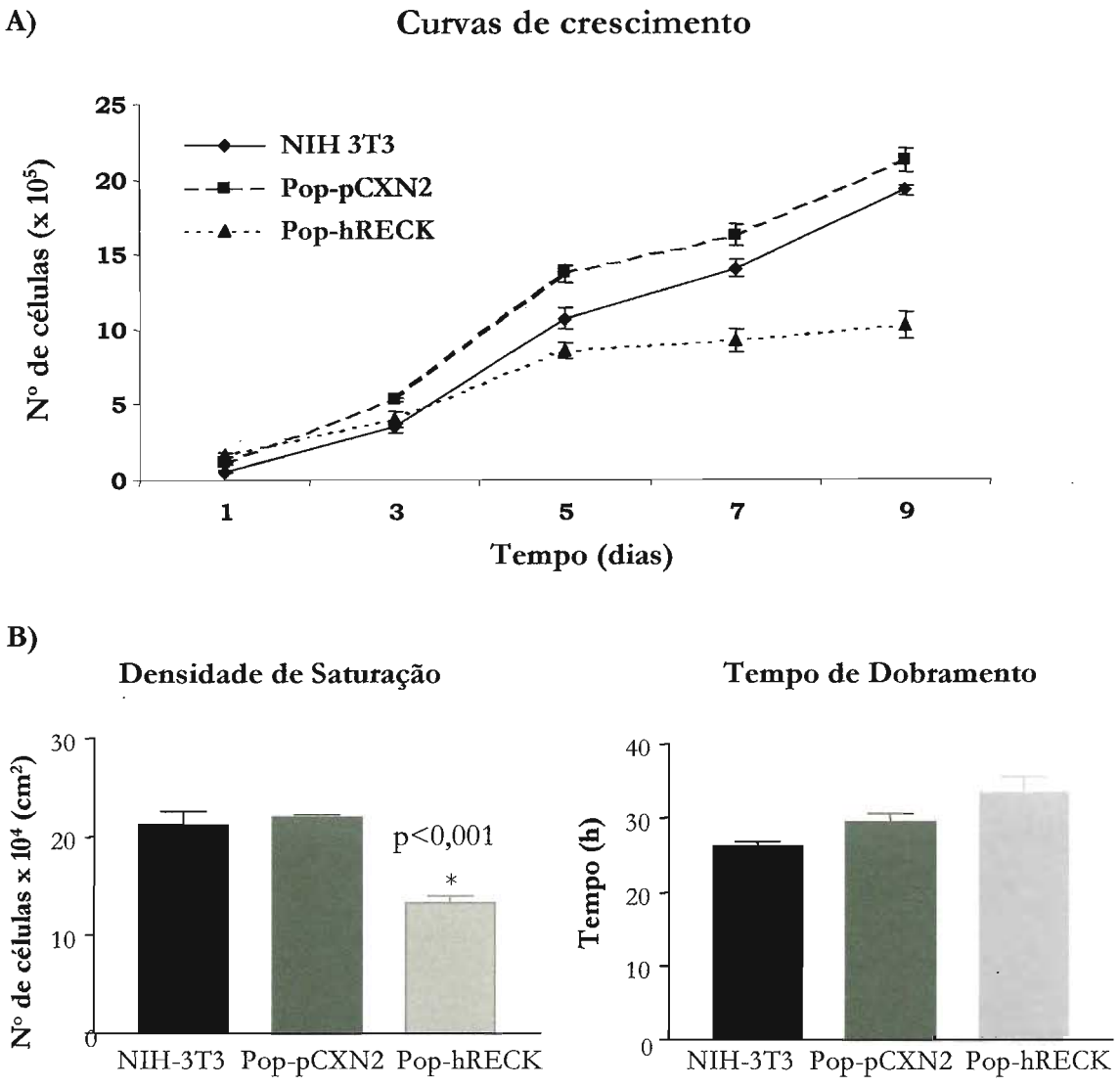

C)




**ura 4.1.3.1.** Expressão constitutiva de hRECK na população transfectante Pop-hRECK. A) Ensaios PCR em tempo real, utilizando "primers" para o transcrito de RECK e para o controle interno PDH, mostram que a expressão relativa do transcrito de hRECK é aproximadamente 150 vezes s expresso na população Pop-hRECK em comparação com a população transfectante controle Pop-XN2. Os dados representam a média de dois experimentos independentes realizados em duplicatas. barras representam o desvio padrão (+/-SD) entre os experimentos independentes. B) Extrato téico total das populações transfectantes, da linhagem parental NIH-3T3 e também de células NIH- transfectadas transitoriamente com o vetor pCXN2-hRECK (controle positivo) foram coletadas. ilises de Western-blot foram realizadas utilizando um anticorpo monoclonal específico para a teína RECK humana. 1) Pop-hRECK 2) Pop-pCXN2 3) célula NIH-3T3 parental e 4) Controle itivo. Este experimento é representativo de quatro experimentos independentes. C) Ensaios de nohistoquímica nas populações transfectantes Pop-hRECK e Pop-pCXN2, utilizando o anticorpo noclonal anti-hRECK (MBL).

A capacidade de proliferação das populações transfectantes em comparação com a da linhagem parental NIH-3T3 foi analisada através de ensaios de crescimento celular em meio sólido (plástico). As diferentes linhagens foram mantidas em meio DMEM contendo níveis adequados de soro fetal bovino (concentração final - 10%). Como mostra a Figura 4.1.3.2.A, as células transfectantes controle Pop-pCXN2 apresentam curvas de crescimento bastante similares à da linhagem parental NIH-3T3. Por outro lado, as células transfectantes Pop-hRECK apresentam uma menor capacidade de crescimento quando mantidas nas mesmas condições de cultura.

A Figura 4.1.3.2.B mostra alguns parâmetros de crescimento obtidos para as populações transfectantes, em comparação com aqueles obtidos para a linhagem parental NIH-3T3. Análises estatísticas destes dados mostram que a população transfectante Pop-hRECK apresenta uma tendência para um aumento no tempo de dobramento e uma diminuição significativa da densidade de saturação ($p<0,05$) quando comparada com a linhagem parental NIH-3T3 e com a população transfectante controle Pop-pCXN2, mostrando, pela primeira vez, o envolvimento do gene *RECK* no controle da proliferação celular.




**igura 4.1.3.2.** Curvas de crescimento das diferentes populações transfectantes em comparação om a linhagem parental NIH-3T3. 5,0 x $10^4$ células foram plaqueadas em meio contendo 10% CS-DMEM. Triplicatas foram coletadas nos períodos de tempo indicados, fixados e contados. A) . população transfectante controle Pop-pCXN2 apresenta uma curva de crescimento similar quela apresentada pela célula parental NIH-3T3. Por outro lado, a população transfectante Pop-RECK apresenta uma menor capacidade de crescer sob estas condições. Os dados são epresentativos de quatro experimentos independentes feitos em triplicatas. As barras representam erro padrão (+/- SE) das triplicatas de um experimento independente representativo. B) A opulação transfectante Pop-hRECK apresenta uma tendência para um aumento no tempo de obramento e uma significativa menor densidade de saturação ($p < 0,001$) quando comparada com linhagem parental NIH-3T3 ou com a população transfectante controle Pop-pCXN2. Os dados epresentam a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicatas. As barras epresentam o erro médio (+/- SE) entre os experimentos independentes.

Para analisar qual fase do ciclo celular a superexpressão do gene *RECK* estaria modulando, as células NIH-3T3, Pop-hRECK e Pop-pCXN2 foram mantidas em cultivo até a sub-confluência e, então, carenciadas para soro (concentração final - 0,2%) por 24h. As células quiescentes foram re-estimuladas com soro (concentração final - 10%) por diferentes períodos de tempo e analisadas através de ensaios de FACS, de modo a obter a distribuição das mesmas pelas diferentes fases do ciclo celular. A Figura 4.1.3.3. mostra os resultados obtidos com as diferentes populações transfectantes em comparação com a linhagem parental NIH-3T3 nas diversas condições de estímulo com soro. Os dados estão representados em relação à porcentagem de células na fase S. Os resultados mostram que a progressão do ciclo celular foi retardada na linhagem transfectante Pop-hRECK em comparação com a linhagem parental NIH-3T3 e com a linhagem transfectante controle Pop-pCXN2, mostrando que a superexpressão de RECK afeta a transição G0/G1 - S do ciclo celular.

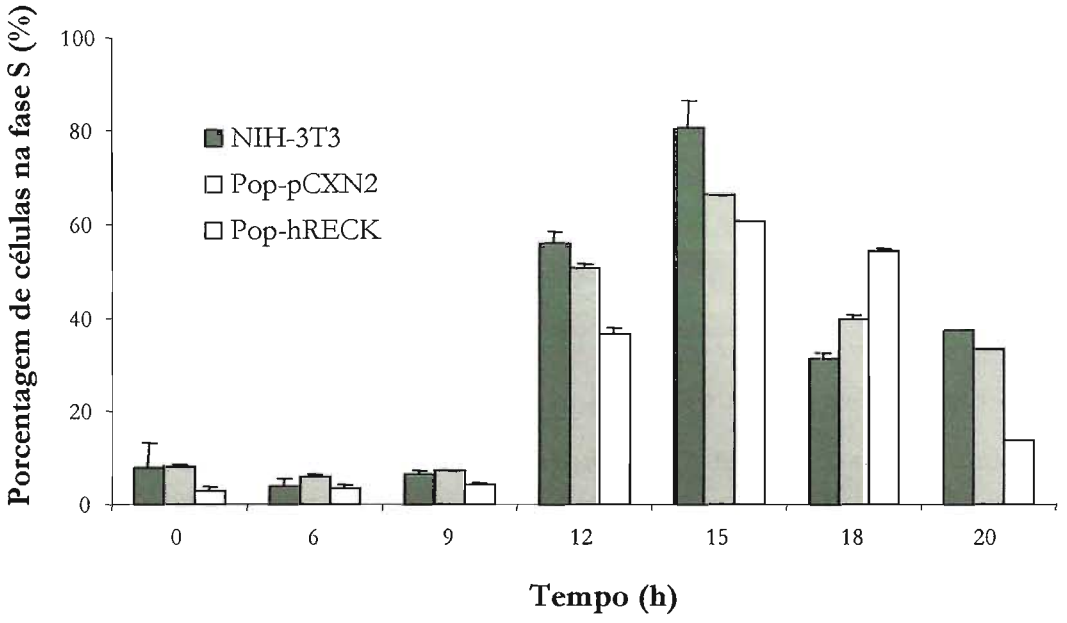



**Figura 4.1.3.3.** Superexpressão do gene *RECK* promove um retardo na progressão G0/G1-S do ciclo celular. Células NIH-3T3, Pop-hRECK e Pop-pCXN2 foram cultivadas em meio DMEM-10%FCS até a sub-confluência e então carenciadas para soro (DMEM-0,2%FCS) por 24h. As células quiescentes foram então re-estimuladas com soro (concentração final - 10%) por diferentes períodos de tempo e analisadas quanto a sua distribuição celular por citometria de fluxo (FACS). Os dados são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. As barras representam o desvio padrão (+/- SD) das triplicatas de um experimento independente representativo.



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

### 4.1.4. RECK altera a progressão do ciclo celular por ser capaz de induzir a expressão do inibidor de CDK: p21 $^{Cip/Kip}$.

Para entender o mecanismo molecular através do qual RECK regula a progressão do ciclo celular, foram realizados ensaios de hibridização molecular utilizando lâminas comerciais de micro-arranjos de DNA contendo aproximadamente 10.000 oligonucleotídeos correspondentes a genes de camundongo depositados no GenBank (CodeLink UniSet Mouse Bioarrays - GE Healthcare). Como sondas foram utilizados cRNAs obtidos de ambas as linhagens transfectantes: Pop-hRECK e Pop-pCXN2. As linhagens foram previamente carenciadas para soro por 24h (DMEM - 0,2%FCS) e posteriormente estimuladas com soro (concentração final – 10%) por 3h. O tempo de estímulo com soro foi escolhido de modo a minimizar os efeitos promovidos pela proteína RECK endógena e exacerbar o sinal desencadeado pela proteína exógena RECK humana (ver Figura 4.1.1.A).

Após a hibridização, os dados foram normalizados em relação à mediana das intensidades dos sinais de hibridização através do programa CodeLink System Software. A Figura 4.1.4. mostra o perfil de hibridização de um experimento independente, representativo das demais repetições.

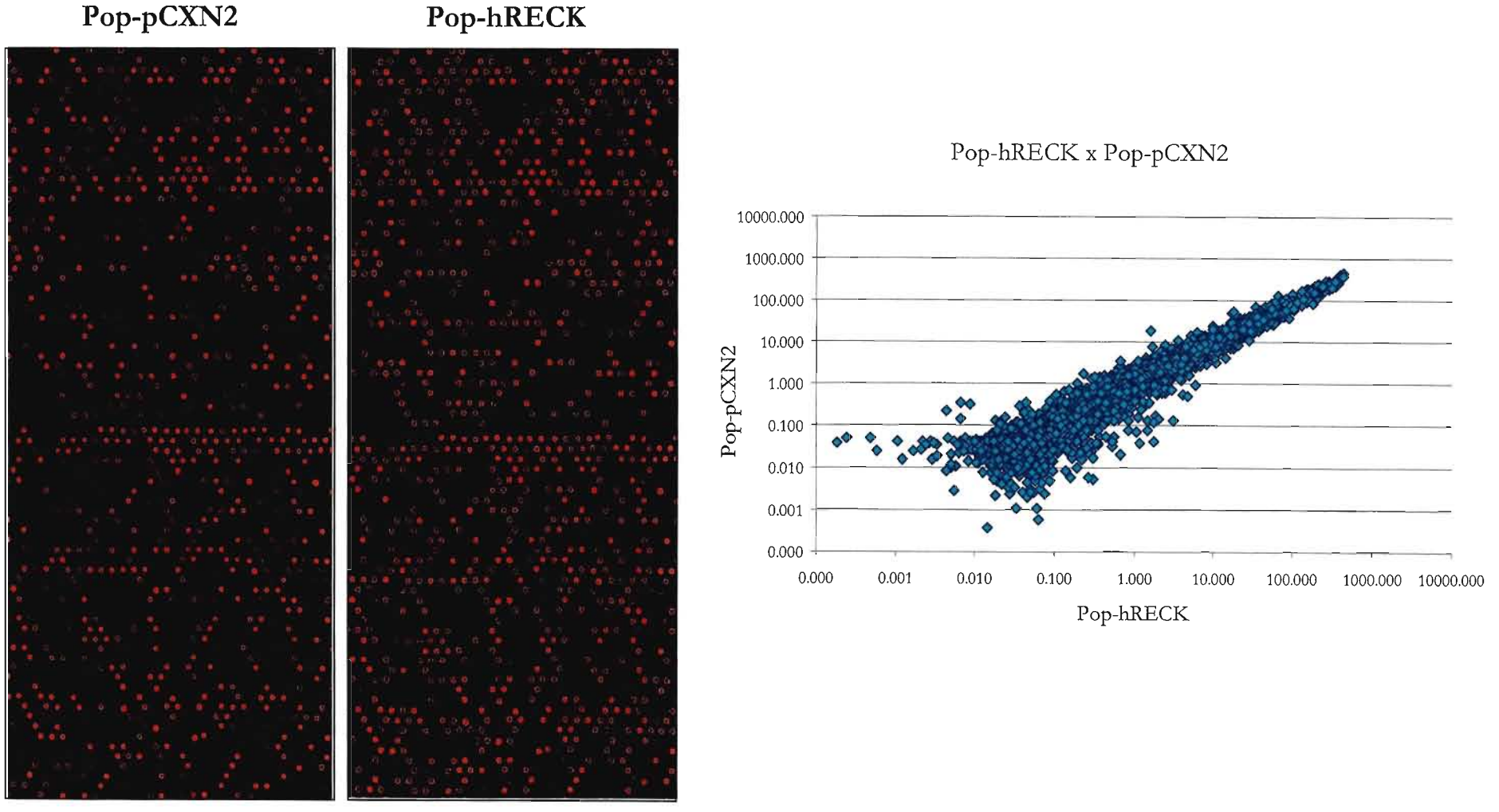



**Figura 4.1.4.** Perfil de hibridização - CodeLink Bioarrays. Imagens dos bioarrays que foram hibridizados com sondas derivadas das populações transfectantes Pop-hRECK e Pop-pCXN2. O gráfico mostra o perfil de distribuição de expressão dos prováveis genes diferenciais obtidos.

A análise dos dados resultou na obtenção de prováveis 456 e 257 genes induzidos e reprimidos por RECK, respectivamente, gerando um total de 713 genes que apresentam uma diferença de expressão de pelo menos 1,5 vezes entre as duas populações transfectantes (Pop-hRECK x Pop-pCXN2). Os prováveis genes diferencialmente expressos foram classificados de acordo com sua função predita pelo programa FatiGO Data Mining (http://fatigo.bioinf.cnio.es) que utiliza a classificação gênica do "Gene Ontology (GO)". Foi observado que entre esses prováveis genes diferencialmente expressos 32,46% estão relacionados com manutenção e crescimento celular, 21,99% com transdução de sinal, 2,09% relacionados com regulação da proliferação celular, entre outros. A Figura 4.1.4.1. mostra a distribuição funcional de alguns dos prováveis genes regulados por RECK. A Tabela 4.1.4., a seguir, classifica estes genes em sub-grupos de acordo com os processos biológicos nos quais eles estão envolvidos determinado pela classificação do "Gene Ontology".

É importante ressaltar neste momento que estes experimentos de hibridização molecular foram realizados em duplicatas e a diferença de expressão apresentada na Tabela 4.1.4. corresponde ao valor médio obtido a partir dos experimentos independentes, porém este conjunto de genes diferenciais não corresponde a um perfil confirmado de genes regulados por RECK, já que para este objetivo seria necessário análises estatísticas não realizadas neste estudo.

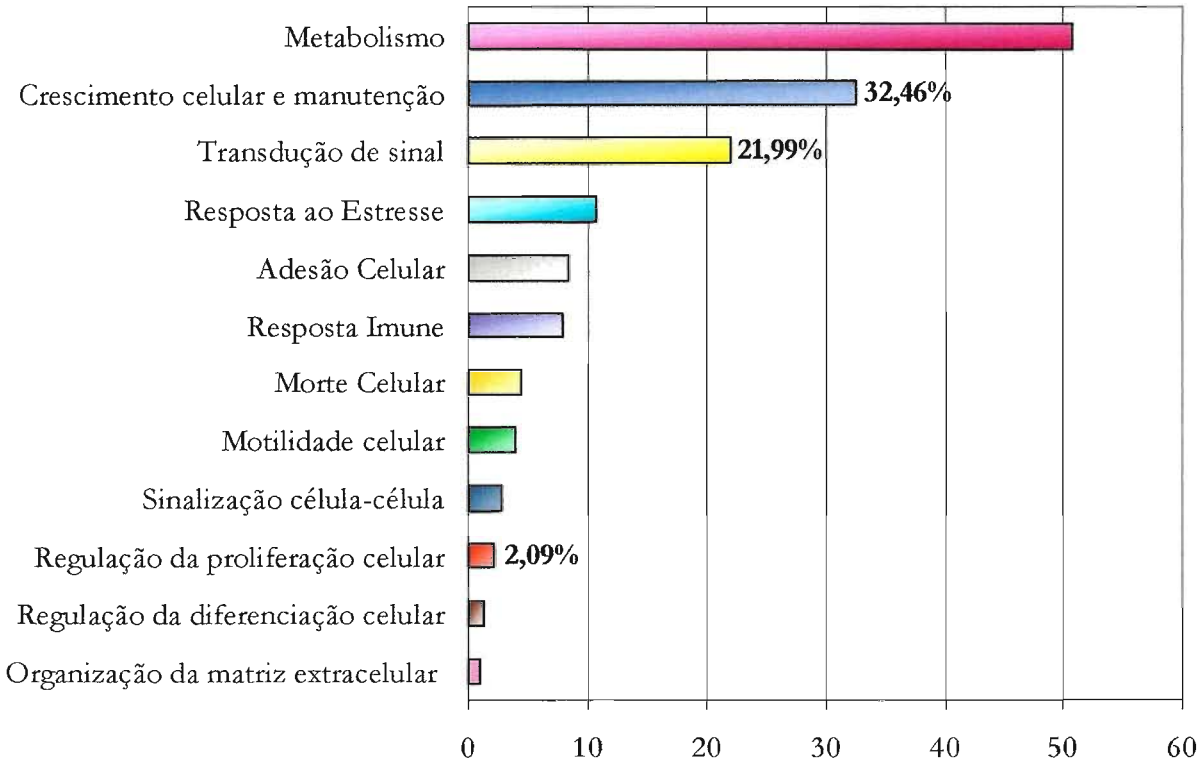



**Figura 4.1.4.1.** Distribuição funcional de alguns dos prováveis genes diferencialmente expressos na população transfectante Pop-hRECK. Os prováveis genes diferencialmente expressos pela superexpressão de hRECK foram selecionados utilizando a plataforma CodeLink Bioarrays (GE-Healthcare). Os genes foram selecionados a partir de um nível de indução/repressão de 1,5 vezes. A classificação funcional foi realizada pelo programa FatiGO Data mining with Gene Ontology.

**Tabela 4.1.4.** Alguns dos prováveis genes diferencialmente expressos na população Pop-hRECK organizados por processos biológicos, segundo classificação do Gene Ontology.

| *Genes* | *Expressão (vezes)* |
|---|---|
| **Transdução de sinal** | |
| ADRENERGIC RECEPTOR, ALPHA 1B (ADRA1B) | -1.54 |
| REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 1 (RGS1) | -1.64 |
| PHOSPHODIESTERASE 1A, CALMODULIN-DEPENDENT (PDE1A) | -2.82 |
| G PROTEIN BETA 3 SUBUNIT | -1.85 |
| VOMERONASAL 1 RECEPTOR, C4 (V1RC4) | 1.66 |
| GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA-A) RECEPTOR, SUBUNIT ALPHA 3 (GABRA3) | -2.35 |
| G PROTEIN SIGNALING REGULATOR RGS16 (RGS16) | -2.04 |
| PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, NON-RECEPTOR TYPE 13 (PTPN13) | 3.47 |
| REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 18 (RGS18) | 2.48 |
| MOUSE C-ABL TYPE II | 1.57 |
| SOMATOSTATIN RECEPTOR 3 (SMSTR3) | -1.96 |
| FRIZZLED HOMOLOG 10 (DROSOPHILA) (FZD10) | -1.89 |
| GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA-A) RECEPTOR, SUBUNIT BETA 3 (GABRB3) | -3.47 |
| THROMBOXANE A2 RECEPTOR (TBXA2R) | 2.33 |
| PROSTAGLANDIN E RECEPTOR 3 (SUBTYPE EP3) (PTGER3) | -1.67 |
| BREAST CANCER ANTI-ESTROGEN RESISTANCE 3 (BCAR3) | 1.76 |
| PHOSPHODIESTERASE 4A, CAMP SPECIFIC (PDE4A) | -2.35 |
| HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE I ENHANCER BINDING PROTEIN 2 (HIVEP2) | -1.69 |
| TACHYKININ RECEPTOR 1 (TACR1) | 2.60 |
| FC RECEPTOR, IGG, LOW AFFINITY IIB (FCGR2B) | 1.62 |
| OSTEOBLAST SPECIFIC FACTOR 2 (FASCICLIN I-LIKE) (OSF2-PENDING) | -1.85 |
| C-TYPE (CALCIUM DEPENDENT, CARBOHYDRATE RECOGNITION DOMAIN) LECTIN, SUPERFAMILY MEMBER 12 (CLECSF12) | -3.34 |
| PHOSPHODIESTERASE 6C, CGMP SPECIFIC, CONE, ALPHA PRIME (PDE6C) | 1.74 |
| GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR 8 (GDF8) | 3.16 |
| PELLINO 2 (PELI2) | 1.72 |
| PDZ AND LIM DOMAIN 3 (PDLIM3) | 2.67 |
| G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 35 (GPR35) | 1.58 |
| GROWTH FACTOR RECEPTOR BOUND PROTEIN 2-ASSOCIATED PROTEIN 1 (GAB1) | -2.24 |
| SMALL INDUCIBLE CYTOKINE A8 (SCYA8) | -3.71 |
| TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY, MEMBER 21 (TNFRSF21) | 12.45 |
| CD3 ANTIGEN, EPSILON POLYPEPTIDE (CD3E) | 2.41 |
| CORE PROMOTER BINDING PROTEIN | 1.89 |
| FORKHEAD BOX O1 (FOXO1) | -2.26 |
| LEUKOCYTE TYROSINE KINASE (LTK) | -1.73 |
| HISTAMINE H4 RECEPTOR | 5.77 |
| RETINAL PIGMENT EPITHELIUM DERIVED RHODOPSIN HOMOLOG (RRH) | 5.50 |
| PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, RECEPTOR TYPE, G (PTPRG) | 2.05 |
| PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, RECEPTOR TYPE, K (PTPRK) | 2.03 |
| INTEGRIN ALPHA 2B (CD41B) (ITGA2B) | 1.78 |
| GTP BINDING PROTEIN (GENE OVEREXPRESSED IN SKELETAL MUSCLE) (GEM) | 1.79 |
| ZETA-CHAIN (TCR) ASSOCIATED PROTEIN KINASE (70KD) (ZAP70) | 2.94 |

| | |
|---|---|
| SPERM AUTOANTIGENIC PROTEIN 17 (SPA17) | 1.69 |
| SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 5A (STAT5A) | 2.93 |
| SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 5B (STAT5B) | 2.04 |
| GLIAL CELL LINE DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR FAMILY RECEPTOR ALPHA 3 (GFRA3) | 1.56 |
| SERUM AMYLOID P-COMPONENT (SAP) | -1.99 |
| ANKYRIN REPEAT AND SOCS BOX-CONTAINING PROTEIN 7 (ASB7) | 3.50 |
| FAS ANTIGEN LIGAND (FASL) | 1.82 |
| GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN, ALPHA TRANSDUCING 2 (GNAT2) | 2.31 |
| RAB6, MEMBER RAS ONCOGENE FAMILY (RAB6) | -1.94 |
| LYMPHOCYTE CYTOSOLIC PROTEIN 2 (LCP2) | -2.03 |
| SPROUTY PROTEIN WITH EVH-1 DOMAIN 1, RELATED SEQUENCE (SPRED1-PENDING) | 1.57 |
| A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE DOMAIN 24 (TESTASE 1) (ADAM24) | 2.05 |
| SPHINGOMYELIN PHOSPHODIESTERASE 3, NEUTRAL (SMPD3) | 2.34 |
| PERIOD HOMOLOG 2 (DROSOPHILA) (PER2) | 1.99 |
| ADENYLATE CYCLASE 9 (ADCY9) | 1.74 |
| ODD OZ/TEN-M HOMOLOG 4 (DROSOPHILA) (ODZ4) | -2.18 |
| ENDOGLIN (ENG) | 1.93 |
| TRANSDUCIN-LIKE ENHANCER OF SPLIT 6, HOMOLOG OF DROSOPHILA E(SPL) (TLE6) | 2.75 |
| HEDGEHOG-INTERACTING PROTEIN (HHIP) | 2.18 |
| NEURONAL PAS DOMAIN PROTEIN 1 (NPAS1) | 2.47 |
| MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 8 (MAPK8) | 1.57 |
| MOUSE SPERMATOGENIC-SPECIFIC PROENKEPHALIN | -4.34 |
| GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA-A) RECEPTOR, SUBUNIT DELTA (GABRD) | -1.80 |
| FIBROBLAST GROWTH FACTOR 11 (FGF11) | -2.01 |
| LPXN MRNA FOR LEUPAXIN | 2.33 |
| FIBROBLAST GROWTH FACTOR-RELATED PROTEIN FGF-12A (FGF12) | 16.87 |
| LYN A PROTEIN TYROSINE KINASE (LYNA) | 2.31 |
| PROSTAGLANDIN D RECEPTOR (PTGDR) | -2.29 |
| **Sinalização Célula-Célula** | |
| GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA-A) RECEPTOR, SUBUNIT ALPHA 3 (GABRA3) " | -2.35 |
| CHOLINERGIC RECEPTOR, NICOTINIC, ALPHA POLYPEPTIDE 4 (CHRNA4) | -1.93 |
| GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA-A) RECEPTOR, SUBUNIT BETA 3 (GABRB3) | -3.47 |
| GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC, NMDA1 (ZETA 1) (GRIN1) | 2.35 |
| CHAPSYN-110 | 1.99 |
| GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC, NMDA2B (EPSILON 2) (GRIN2B) | -3.21 |
| ODD OZ/TEN-M HOMOLOG 4 (DROSOPHILA) (ODZ4) | -2.18 |
| GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA-A) RECEPTOR, SUBUNIT DELTA (GABRD) | -1.80 |
| FIBROBLAST GROWTH FACTOR-RELATED PROTEIN FGF-12A (FGF12) | 16.87 |
| **Motilidade Celular** | |
| LAMININ ALPHA 4 CHAIN (LAMA4) | -1.67 |
| MYOMESIN 2 (MYOM2) | 3.06 |

| | |
|---|---|
| SLIT1 (SLIT1) | 3.15 |
| INTERFERON-GAMMA (MUIFN-GAMMA) | 1.90 |
| INTERLEUKIN 16 (IL16) | 2.92 |
| CALSEQUESTRIN 1 (CASQ1) | 2.73 |
| ATONAL HOMOLOG 4 (DROSOPHILA) (ATOH4) | -2.31 |
| GLIAL CELL LINE DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR FAMILY RECEPTOR ALPHA 3 (GFRA3) | 1.56 |
| EPHRIN B1 (EFNB1) | -1.73 |
| ODD OZ/TEN-M HOMOLOG 4 (DROSOPHILA) (ODZ4) | -2.18 |
| ADULT SKELETAL MUSCLE MYOSIN HEAVY CHAIN | 2.51 |
| MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 8 (MAPK8) | 1.57 |
| DUTT1 PROTEIN | -2.73 |
| MYOMESIN 2 (MYOM2) | 3.06 |
| **Regulação da Adesão Celular** | |
| CAMELLO-LIKE 1 (CML1) | 2.20 |
| LAMININ ALPHA 4 CHAIN (LAMA4) | -1.67 |
| SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 5A (STAT5A) | 2.93 |
| SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 5B (STAT5B) | 2.04 |
| PROLACTIN RECEPTOR (PRLR) | 3.33 |
| **Regulação da Proliferação Celular** | |
| FC RECEPTOR, IGG, LOW AFFINITY IIB (FCGR2B) | 1.62 |
| FORKHEAD BOX O1 (FOXO1) | -2.26 |
| HEMATOPOIETICALLY EXPRESSED HOMEOBOX (HHEX) | -17.10 |
| CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1A (P21) (CDKN1A) | 1.70 |
| B-CELL LYMPHOMA/LEUKAEMIA 11B (BCL11B-PENDING) | 2.19 |
| CD3 ANTIGEN, EPSILON POLYPEPTIDE (CD3E) | 2.41 |
| **Morte Celular** | |
| FIBRINOGEN-LIKE PROTEIN 2 (FGL2) | 3.32 |
| CADHERIN 1 (CDH1) | -1.88 |
| INTERFERON-GAMMA (MUIFN-GAMMA) | 1.90 |
| BREAST AND OVARIAN CANCER SUSCEPTIBILITY PROTEIN (BRCA1) | -2.04 |
| INTERLEUKIN 6 (IL6) | 2.54 |
| BACULOVIRAL IAP REPEAT-CONTAINING 1B (BIRC1B) | -2.28 |
| TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY, MEMBER 21 (TNFRSF21) | 12.45 |
| EUKARYOTIC TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1 ALPHA 2 (EEF1A2) | -1.73 |
| DNA FRAGMENTATION FACTOR, 40 KD, BETA SUBUNIT (DFFB) | -1.80 |
| CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1A (P21) (CDKN1A) | 1.70 |
| CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN (C/EBP), BETA (CEBPB), | 1.57 |
| ENDOPLASMIC RETICULUM (ER) TO NUCLEUS SIGNALLING 2 (ERN2) | -1.51 |
| BCL2-ASSOCIATED ATHANOGENE 3 (BAG3) | 1.70 |
| HEMOLYTIC COMPLEMENT (HC) | 1.60 |
| VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) | 1.69 |
| FAS ANTIGEN LIGAND (FASL) | 1.82 |
| **Adesão Celular** | |
| CADHERIN 1 (CDH1) | -1.88 |
| CAMELLO-LIKE 1 (CML1) | 2.20 |
| LAMININ ALPHA 4 CHAIN (LAMA4) | -1.67 |
| PROLACTIN RECEPTOR (PRLR) | 3.33 |

| | |
|---|---|
| ASTROTACTIN (ASTN) | -3.05 |
| NINJURIN 2 (NINJ2) | 1.56 |
| PROCOLLAGEN, TYPE V, ALPHA 3 (COL5A3) | 1.72 |
| FIBULIN 5 (FBLN5) | 1.71 |
| CADHERIN 16 (CDH16) | 6.31 |
| OSTEOBLAST SPECIFIC FACTOR 2 (FASCICLIN I-LIKE) (OSF2-PENDING) | -1.85 |
| C-TYPE (CALCIUM DEPENDENT, CARBOHYDRATE RECOGNITION DOMAIN) LECTIN, SUPERFAMILY MEMBER 12 (CLECSF12) | -3.34 |
| PROTOCADHERIN 10 (PCDH10) | 2.31 |
| VITRONECTIN (VTN) | 2.54 |
| PROCOLLAGEN, TYPE VII, ALPHA 1 (COL7A1) | 2.99 |
| INTEGRIN ALPHA 2B (CD41B) (ITGA2B) | 1.78 |
| SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 5A (STAT5A) | 2.93 |
| SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 5B (STAT5B) | 2.04 |
| STROMAL INTERACTION MOLECULE 1 (STIM1) | 2.46 |
| MYOSIN BINDING PROTEIN C, CARDIAC (MYBPC3)] | 2.40 |
| ENDOGLIN (ENG) | 1.93 |
| IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY, MEMBER 4 (IGSF4) | 2.09 |
| NIDOGEN 2 (NID2) | 2.30 |
| LPXN MRNA FOR LEUPAXIN | 2.33 |
| DESMOCOLLIN 2 (DSC2) | 1.80 |
| **Manutenção e Crescimento Celular** | |
| SOLUTE CARRIER FAMILY 23, (NUCLEOBASE TRANSPORTERS), MEMBER 1 (SLC23A1) | -2.13 |
| MURINOGLOBULIN 1 (MUG1) | 2.32 |
| STERILE-ALPHA MOTIF AND LEUCINE ZIPPER CONTAINING KINASE AZK (ZAK-PENDING) | 2.13 |
| FATTY ACID BINDING PROTEIN 1, LIVER (FABP1) | 2.22 |
| 25-HYDROXYVITAMIN D3 1ALPHA-HYDROXYLASE | -1.75 |
| NOTCH GENE HOMOLOG 4, (DROSOPHILA) (NOTCH4) | -2.41 |
| CHOLINERGIC RECEPTOR, NICOTINIC, ALPHA POLYPEPTIDE 4 (CHRNA4) | -1.93 |
| SIGNAL-INDUCED PROLIFERATION ASSOCIATED GENE 1 (SIPA1) | -1.67 |
| THYMINE DNA GLYCOSYLASE (TDG) | 1.85 |
| SMALL PROLINE-RICH PROTEIN 2A (SPRR2A) | -2.15 |
| CALCIUM CHANNEL, VOLTAGE-DEPENDENT, P/Q TYPE, ALPHA 1A (CACNA1A) | -2.23 |
| C-ABL TYPE II | 1.57 |
| SLIT1 (SLIT1) | 3.15 |
| VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) | 1.69 |
| PUTATIVE ION CHANNEL PROTEIN CATSPER2 | 2.83 |
| GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA-A) RECEPTOR, SUBUNIT BETA 3 (GABRB3) | -3.47 |
| APOLIPOPROTEIN A-IV (APOA4) | 3.62 |
| INTERFERON-GAMMA (MUIFN-GAMMA) | 1.90 |
| SIMILAR TO SODIUM CALCIUM EXCHANGER | 18.61 |
| SH3 DOMAIN PROTEIN 2A (SH3D2A) | 2.96 |
| MANNOSE RECEPTOR, C TYPE 2 (MRC2) | 1.84 |
| PROSTAGLANDIN E RECEPTOR 3 (SUBTYPE EP3) (PTGER3) | -1.67 |
| UNCOUPLING PROTEIN 1, MITOCHONDRIAL (UCP1) | 2.86 |
| UNCOUPLING PROTEIN 3, MITOCHONDRIAL (UCP3) | 1.93 |
| BREAST AND OVARIAN CANCER SUSCEPTIBILITY PROTEIN (BRCA1) | -2.04 |
| AQUAPORIN 2 (AQP2) | 2.02 |

| | |
|---|---|
| MERCURIAL-INSENSITIVE WATER CHANNEL | -26.50 |
| FC RECEPTOR, IGG, LOW AFFINITY IIB (FCGR2B) | 1.62 |
| POTASSIUM VOLTAGE-GATED CHANNEL, SHAKER-RELATED SUBFAMILY, MEMBER 2 (KCNA2) | 4.18 |
| MRNA FOR CAVEOLIN-2 ISOFORM | |
| SIDEROFLEXIN 3 (SFXN3) | -3.07 |
| C-TYPE (CALCIUM DEPENDENT, CARBOHYDRATE RECOGNITION DOMAIN) LECTIN, SUPERFAMILY MEMBER 12 (CLECSF12) | -3.34 |
| RING FINGER PROTEIN 30 (RNF30) | -2.04 |
| EPIREGULIN (EREG) | 1.92 |
| PDZ AND LIM DOMAIN 3 (PDLIM3) | 2.67 |
| GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC, NMDA1 (ZETA 1) (GRIN1) | 2.35 |
| AMINO ACID TRANSPORTER, CATIONIC 3 (ATRC3) | 1.92 |
| SOLUTE CARRIER FAMILY 8 (CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER, Y+ SYSTEM), MEMBER 7 (SLC7A8) | -2.19 |
| SOLUTE CARRIER FAMILY 7 (CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER, Y+ SYSTEM), MEMBER 9 (SLC7A9) | 2.03 |
| CYCLIN D1 (CCND1) | -2.13 |
| SOLUTE CARRIER FAMILY 2 (FACILITATED GLUCOSE TRANSPORTER), MEMBER 5 (SLC2A5) | 1.68 |
| WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN (WASP) | 1.99 |
| ATPASE, CA++ TRANSPORTING, PLASMA MEMBRANE 2 (ATP2B2) | 2.21 |
| FXYD DOMAIN-CONTAINING ION TRANSPORT REGULATOR 3 (FXYD3) | 1.62 |
| SOLUTE CARRIER FAMILY 39 (IRON-REGULATED TRANSPORTER), MEMBER 1 (SLC39A1) | 1.72 |
| ATP-BINDING CASSETTE, SUB-FAMILY B (MDR/TAP), MEMBER 9 (ABCB9) | 1.78 |
| KINASE INTERACTING PROTEIN 2 (KIP2-PENDING) | 3.20 |
| TELOMERIC REPEAT BINDING FACTOR 2, INTERACTING PROTEIN (TERF2IP) | 1.83 |
| CD3 ANTIGEN, EPSILON POLYPEPTIDE (CD3E) | 2.41 |
| MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 4 (MTAP4) | -1.61 |
| CALMEGIN (CLGN) | 2.51 |
| NIMA (NEVER IN MITOSIS GENE A)-RELATED EXPRESSED KINASE 2 (NEK2) | -2.23 |
| MINI CHROMOSOME MAINTENANCE DEFICIENT 2 (S. CEREVISIAE) (MCMD2) | -1.70 |
| FORKHEAD BOX O1 (FOXO1) | -2.26 |
| MINI CHROMOSOME MAINTENANCE DEFICIENT 7 (S. CEREVISIAE) (MCMD7) | -2.13 |
| RABPHILIN 3A (RPH3A) | 4.18 |
| HEMATOPOIETICALLY EXPRESSED HOMEOBOX (HHEX) | -17.10 |
| X11 PROTEIN | 1.76 |
| MAJOR URINARY PROTEIN 1 (MUP1) | -109.93 |
| LIM ONLY 1 (LMO1) | 23.13 |
| CYCLIN G2 (CCNG2) | 2.14 |
| LIPOCALIN 7 (LCN7) | 2.75 |
| DIAPHANOUS HOMOLOG 3 (DROSOPHILA) (DIAP3-PENDING) | -2.33 |
| CELL DIVISION CYCLE 6 HOMOLOG (S. CEREVISIAE) (CDC6) | -1.56 |
| GRO1 ONCOGENE (GRO1) | 1.91 |
| NUCLEAR RECEPTOR SUBFAMILY 2, GROUP F, MEMBER 1 (NR2F1) | -2.12 |
| RA-REACTIVE FACTOR P28B SUBUNIT | 2.04 |
| CALMODULIN BINDING PROTEIN 1 (CALMBP1) | -3.22 |
| SYNAPTOTAGMIN-LIKE 1 (SYTL1) | 3.48 |
| MUT S HOMOLOG 5 (E. COLI) (MSH5) | 2.15 |
| INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 2 (IGF2) | -2.75 |
| KERATIN COMPLEX 2, BASIC, GENE 8 (KRT2-8) | -1.70 |

| | |
|---|---|
| HEPHAESTIN (HEPH) " | -2.14 |
| GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC, NMDA2B (EPSILON 2) (GRIN2B) | -3.21 |
| CYCLIN B1, RELATED SEQUENCE 1 (CCNB1-RS1) | -1.98 |
| FATTY ACID TRANSPORT PROTEIN 3 | 1.86 |
| RAB6, MEMBER RAS ONCOGENE FAMILY (RAB6) | -1.94 |
| CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1A (P21) (CDKN1A) | 1.70 |
| B-CELL LYMPHOMA/LEUKAEMIA 11B (BCL11B-PENDING) | 2.19 |
| HYDROXYACID OXIDASE (GLYCOLATE OXIDASE) 3 (HAO3) | -2.28 |
| PODOCALYXIN-LIKE (PODXL) | 1.94 |
| ODD OZ/TEN-M HOMOLOG 4 (DROSOPHILA) (ODZ4) | -2.18 |
| N-MYC DOWNSTREAM REGULATED 2 (NDR2) | 1.77 |
| ASIALOGLYCOPROTEIN RECEPTOR 1 (ASGR1) | 1.94 |
| RETINOL BINDING PROTEIN 1, CELLULAR (RBP1) | 2.70 |
| RETINOL BINDING PROTEIN 2, CELLULAR (RBP2) | -4.45 |
| KINESIN HEAVY CHAIN MEMBER 4 (KIF4) | -1.97 |
| GEMININ (GEMININ-PENDING) | -1.65 |
| MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN TAU (MAPT) | 2.14 |
| DNA POLYMERASE DELTA 1, CATALYTIC DOMAIN (POLD1) | -1.80 |
| POTASSIUM INWARDLY-RECTIFYING CHANNEL, SUBFAMILY J, MEMBER 1 (KCNJ1) | 2.73 |
| PROMYELOCYTIC LEUKEMIA (PML) | -1.63 |
| POTASSIUM INWARDLY-RECTIFYING CHANNEL, SUBFAMILY J, MEMBER 5 (KCNJ5) | -1.62 |
| GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA-A) RECEPTOR, SUBUNIT DELTA (GABRD) | -1.80 |
| ZONA PELLUCIDA GLYCOPROTEIN 2 (ZP2) | -1.73 |
| LYN A PROTEIN TYROSINE KINASE (LYNA) | 2.31 |
| E2F TRANSCRIPTION FACTOR 6 (E2F6) | 1.85 |
| **Resposta Imune** | |
| HISTOCOMPATIBILITY 2, Q REGION LOCUS 7 (H2-Q7) | -2.28 |
| REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 1 (RGS1) | -1.64 |
| HISTOCOMPATIBILITY 2, CLASS II ANTIGEN A, ALPHA (H2-AA) | 3.71 |
| INTERFERON-GAMMA (MUIFN-GAMMA) | 1.90 |
| INTERLEUKIN 16 (IL16) | 2.92 |
| PROSTAGLANDIN E RECEPTOR 3 (SUBTYPE EP3) (PTGER3) | -1.67 |
| REGENERATING ISLET-DERIVED 3 GAMMA (REG3G) | 1.98 |
| KALLIKREIN B, PLASMA 1 (KLKB1) | 2.04 |
| FC RECEPTOR, IGG, LOW AFFINITY IIB (FCGR2B) | 1.62 |
| INTERLEUKIN 6 (IL6) | 2.54 |
| PEPTIDOGLYCAN RECOGNITION PROTEIN-LIKE (PGLYRPL-PENDING) | 2.99 |
| WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN (WASP) | 1.99 |
| INTERFERON-INDUCED PROTEIN WITH TETRATRICOPEPTIDE REPEATS 3 (IFIT3) | -3.47 |
| SMALL INDUCIBLE CYTOKINE A8 (SCYA8) | -3.71 |
| CD3 ANTIGEN, EPSILON POLYPEPTIDE (CD3E) | 2.41 |
| HISTAMINE H4 RECEPTOR | 5.77 |
| MAJOR URINARY PROTEIN 1 (MUP1) | -109.93 |
| GRO1 ONCOGENE (GRO1) | 1.91 |
| CD7 ANTIGEN (CD7) | -2.55 |
| FAS ANTIGEN LIGAND (FASL) | 1.82 |
| CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1A (P21) (CDKN1A) | 1.70 |
| CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN (C/EBP), BETA (CEBPB) | 1.57 |
| 2'-5' OLIGOADENYLATE SYNTHETASE-LIKE 2 (OASL2) | -2.54 |
| CXC CHEMOKINE LIGAND 16 (CXCL16) | 1.78 |

| | |
|---|---|
| CHITINASE 3-LIKE 3 (CHI3L3) | 2.08 |
| HEMOLYTIC COMPLEMENT (HC) | 1.60 |
| HISTOCOMPATIBILITY 2, Q REGION LOCUS 7 (H2-Q7) | -2.28 |
| REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 1 (RGS1) | -1.64 |
| **Resposta ao Estresse** | |
| THYMINE DNA GLYCOSYLASE (TDG) | 1.85 |
| 8-OXOGUANINE DNA-GLYCOSYLASE 1 (OGG1) | -2.17 |
| DEFENSIN BETA 1 (DEFB1) | 2.14 |
| INTERFERON-GAMMA (MUIFN-GAMMA) | 1.90 |
| INTERLEUKIN 16 (IL16) | 2.92 |
| PROSTAGLANDIN E RECEPTOR 3 (SUBTYPE EP3) (PTGER3) | -1.67 |
| UNCOUPLING PROTEIN 3, MITOCHONDRIAL (UCP3) | 1.93 |
| BREAST AND OVARIAN CANCER SUSCEPTIBILITY PROTEIN (BRCA1) | -2.04 |
| HEAT SHOCK PROTEIN 25 KDA 2 (CARDIOVASCULAR) (HSP25-2) | 1.95 |
| KALLIKREIN B, PLASMA 1 (KLKB1) " | 2.04 |
| EXCISION REPAIR CROSS-COMPLEMENTING RODENT REPAIR DEFICIENCY, COMPLEMENTATION GROUP 2 (ERCC2) | 1.57 |
| TACHYKININ RECEPTOR 1 (TACR1) | 2.60 |
| FC RECEPTOR, IGG, LOW AFFINITY IIB (FCGR2B) | 1.62 |
| INTERLEUKIN 6 (IL6) | 2.54 |
| X-LINKED NUCLEAR PROTEIN (XNP) | 2.32 |
| GROWTH FACTOR RECEPTOR BOUND PROTEIN 2-ASSOCIATED PROTEIN 1 (GAB1) | -2.24 |
| SMALL INDUCIBLE CYTOKINE A8 (SCYA8) | -3.71 |
| TELOMERIC REPEAT BINDING FACTOR 2, INTERACTING PROTEIN (TERF2IP) | 1.83 |
| HISTAMINE H4 RECEPTOR | 5.77 |
| MAJOR URINARY PROTEIN 1 (MUP1) | -109.93 |
| GRO1 ONCOGENE (GRO1) | 1.91 |
| MUT S HOMOLOG 5 (E. COLI) (MSH5) | 2.15 |
| THIOREDOXIN INTERACTING PROTEIN (TXNIP) | -3.02 |
| KERATIN COMPLEX 2, BASIC, GENE 8 (KRT2-8) | -1.70 |
| CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1A (P21) (CDKN1A) | 1.70 |
| HEAT SHOCK PROTEIN, 25 KDA (HSP25) | 9.18 |
| SPHINGOMYELIN PHOSPHODIESTERASE 3, NEUTRAL (SMPD3) | 2.34 |
| ENDOPLASMIC RETICULUM (ER) TO NUCLEUS SIGNALLING 2 (ERN2) | -1.51 |
| RAD18 HOMOLOG (S.CEREVISIAE) (RAD18) | 2.43 |
| MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 8 (MAPK8) | 1.57 |
| DNA POLYMERASE DELTA 1, CATALYTIC DOMAIN (POLD1) | -1.80 |
| SPERMATOGENIC-SPECIFIC PROENKEPHALIN | -4.34 |
| CHITINASE 3-LIKE 3 (CHI3L3) | 2.08 |
| HEMOLYTIC COMPLEMENT (HC) | 1.60 |
| SUPEROXIDE DISMUTASE 3, EXTRACELLULAR (SOD3) | 6.10 |
| **Organização da matriz extracelular** | |
| E74-LIKE FACTOR 3 (ELF3) | 1.77 |
| PROCOLLAGEN, TYPE V, ALPHA 3 (COL5A3) | 1.72 |
| ODD OZ/TEN-M HOMOLOG 4 (DROSOPHILA) (ODZ4) | -2.18 |
| IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY, MEMBER 4 (IGSF4) | 2.09 |
| **Regulação da diferenciação celular** | |
| HISTOCOMPATIBILITY 2, CLASS II ANTIGEN A, ALPHA (H2-AA) | 3.71 |
| PROLACTIN RECEPTOR (PRLR) | 3.33 |
| ODD OZ/TEN-M HOMOLOG 4 (DROSOPHILA) (ODZ4) | -2.18 |

Entre os genes conhecidos e previamente caracterizados como envolvidos na progressão do ciclo celular, foi observado que o gene *p21* estava provavelmente 1,6 vezes mais expresso na população transfectante Pop-hRECK, em comparação com a população transfectante controle Pop-pCXN2. Além disso, foi possível observar que o gene de choque térmico *Hsp25*, previamente descrito como capaz de induzir a expressão de *p21* (Park et al., 2002), estava provavelmente 9,2 vezes mais expresso na mesma população transfectante.

Para confirmar *p21* como um alvo transcricional de RECK, ambas as populações transfectantes (Pop-hRECK e Pop-pCXN2) foram cultivadas até a sub-confluência e, então, carenciadas para soro (DMEM - 0,2% FCS) por 24h. As células quiescentes foram então re-estimuladas com soro (concentração final - 10%) por diferentes períodos de tempo. O RNA foi coletado, os cDNAs correspondentes foram sintetizados e submetidos a ensaios de PCR em tempo real utilizando "primers" específicos para o transcrito de *p21* e para o controle interno GAPDH. A Figura 4.1.4.2.A mostra os resultados obtidos. Os dados estão representados no gráfico em função da razão da expressão relativa de *p21* entre as duas populações transfectantes. Comparando o nível de transcrito de *p21* entre as duas populações transfectantes, foi possível verificar que nas células Pop-hRECK o transcrito de *p21* é mantido em níveis elevados (aproximadamente 2 vezes mais expresso) por um maior período de tempo em comparação com as células controle Pop-pCXN2. O nível do transcrito de *p21* na população Pop-hRECK irá diminuir e alcançar níveis comparáveis à população transfectante controle Pop-pCXN2 apenas após 9-12h de estímulo com soro. Este resultado confirma os dados obtidos anteriormente com os experimentos de hibridização, utilizando os bioarrays do sistema CodeLink, no qual foi verificado que o transcrito de *p21* está cerca de 1,6 vezes mais expresso na população Pop-hRECK em comparação com a população transfectante controle Pop-pCXN2 após 3h de estímulo com soro.

Para confirmar que os níveis da proteína p21 estavam também sendo alterados na população Pop-hRECK, a mesma cinética de estímulo com soro descrita anteriormente foi realizada utilizando as duas populações transfectantes. O extrato protéico foi coletado e submetido a ensaios de Western-blot, utilizando um anticorpo específico contra a proteína p21. A Figura 4.1.4.2.B mostra os resultados

obtidos. Foi possível verificar que após 3h de estímulo com soro a população transfectante Pop-hRECK apresenta níveis elevados da proteína p21 em comparação com a população transfectante controle Pop-pCXN2. Foi possível observar que nas células Pop-hRECK, os níveis protéicos de p21 mantém-se elevados até, aproximadamente, 9h de estímulo com soro.

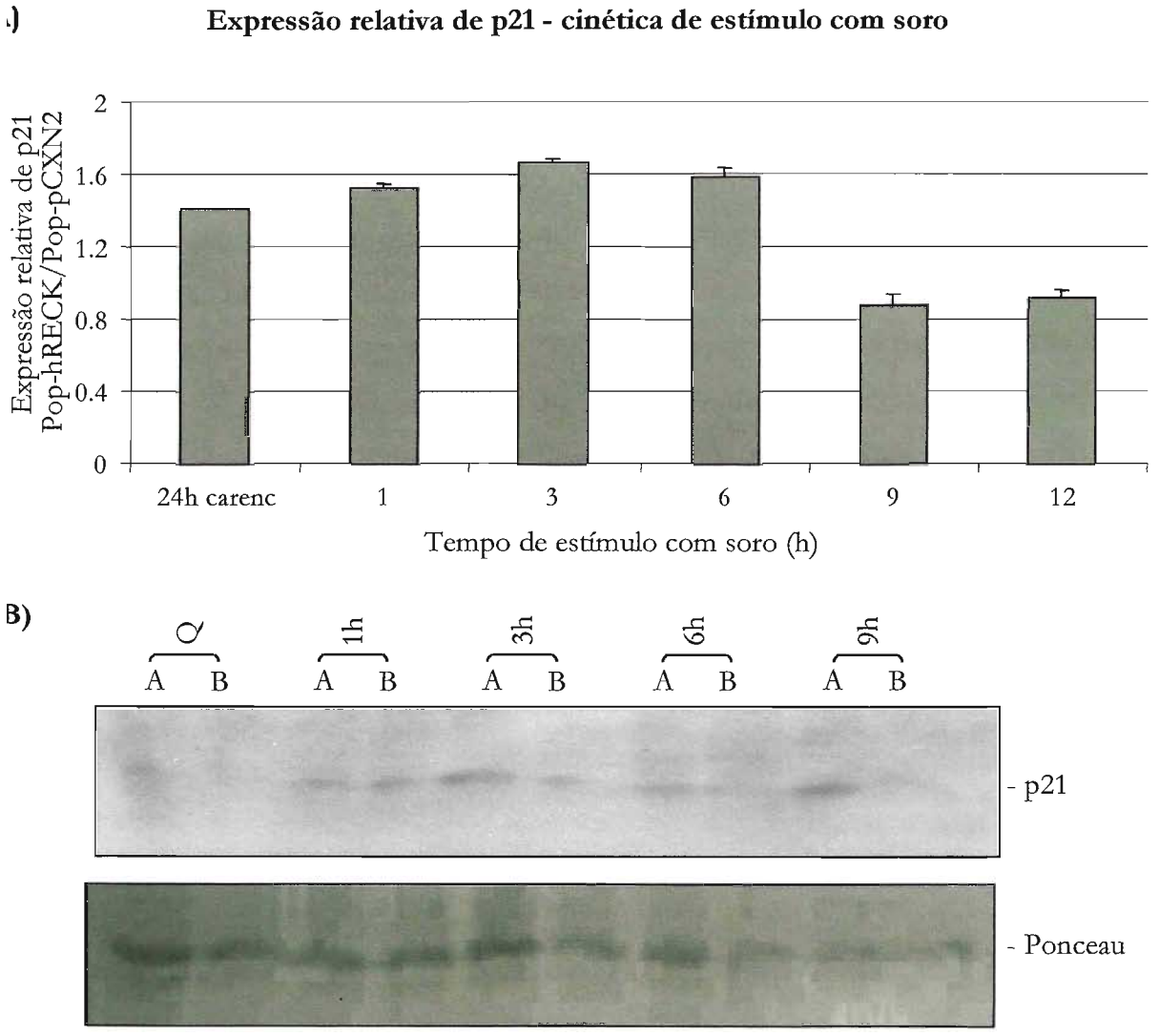
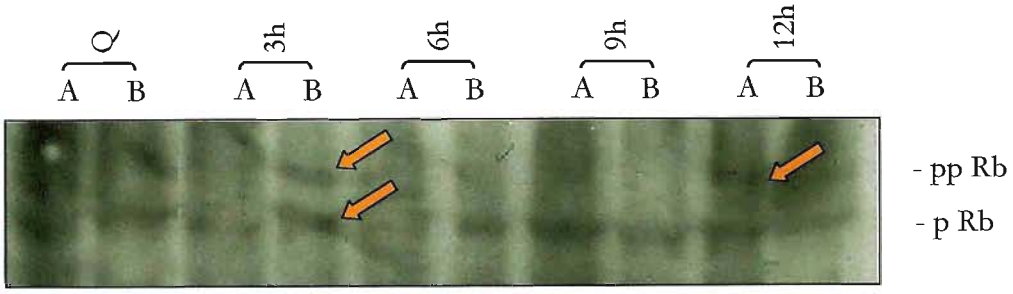



**Figura 4.1.4.2.** RECK altera a progressão do ciclo celular por modular, entre outros prováveis alvos, a expressão do inibidor de CDK p21. As populações transfectantes Pop-hRECK e Pop-pCXN2 foram mantidas em meio DMEM-10%FCS até a sub-confluência e então carenciadas para soro (DMEM-0,2%-FCS) por 24h. As células quiescentes foram então re-estimuladas com soro (concentração final - 10%) por diferentes períodos de tempo. A) RNAs totais foram extraídos, cDNAs foram sintetizados e submetidos a ensaios de PCR em tempo real utilizando "primers" específicos para o transcrito de p21 e para o controle interno GAPDH. Os dados representam a média de dois experimentos independentes realizados em duplicatas. As barras representam o desvio padrão (+/-SD) dos dados obtidos. B) Extratos de proteínas totais das duas populações transfectantes foram coletados e análises de Western-blot foram realizadas usando anticorpo específico para a proteína p21. A) Pop-hRECK e B) Pop-pCXN2. Este experimento é representativo de dois experimentos independentes.

Para demonstrar que o aumento na expressão da proteína p21 nas células Pop-hRECK correlaciona com um aumento da sua atividade, os mesmos extratos protéicos celulares obtidos anteriormente foram utilizados para novos ensaios de Western-blot utilizando um anticorpo específico para a proteína de retinoblastoma (pRb). A Figura 4.1.4.3. mostra os dados obtidos. Os resultados mostram que após 3h de estímulo com soro a população transfectante controle Pop-pCXN2 já apresenta a proteína pRb na sua forma fosforilada. Porém, a população transfectante Pop-hRECK só vai apresentar níveis de fosforilação de pRb após, aproximadamente, 9-12h de estímulo com soro. Verifica-se um retardo na fosforilação de pRb nas células Pop-hRECK, em comparação com as células transfectantes controle Pop-pCXN2. Estes resultados permitem-nos sugerir que um dos possíveis mecanismos pelos quais RECK promove a inibição da progressão do ciclo celular é através da alteração da expressão de um inibidor de quinases dependentes de ciclina (CDKs), especificamente p21, promovendo um retardo na fosforilação da proteína pRb.




**igura 4.1.4.3.** RECK altera a progressão do ciclo celular por retardar a fosforilação da proteína Rb. As populações transfectantes Pop-hRECK e Pop-pCXN2 foram mantidas em meio DMEM-)%FCS até a sub-confluência e então carenciadas para soro (DMEM-0,2%-FCS) por 24h. As élulas quiescentes foram então re-estimuladas com soro (concentração final - 10%) por diferentes eríodos de tempo. Extratos de proteínas totais das duas populações transfectantes foram ›letados e análises de Western-blot foram realizadas utilizando anticorpo específico contra a roteína pRb. A) Pop-hRECK e B) Pop-pCXN2. Este experimento é representativo de dois ;perimentos independentes.

## 4.2. Regulação da expressão do gene *RECK* pelo oncogene c-*myc*

### 4.2.1. A atividade transcricional do gene *RECK* é regulada por c-Myc

Dados da literatura mostram que o gene *RECK* é regulado negativamente pelo produto de diversos oncogenes, entre os quais o oncogene c-*myc* (Takahashi et al., 1998). Os resultados apresentados nos itens anteriores mostram o envolvimento do gene *RECK* na progressão do ciclo celular, e evidenciam também uma correlação inversa na expressão destes dois genes. Diversos mecanismos moleculares podem ser responsáveis pela correlação entre a superexpressão de c-*myc* e a inibição da expressão do gene *RECK*. Para determinar se esta repressão ocorre por alteração da atividade transcricional do gene *RECK*, foi analisada a atividade da região promotora do gene *RECK* após a expressão exógena do oncogene c-*myc*. Para essa finalidade foram utilizadas duas construções: a primeira contendo 4.110pb da região 5' localizada imediatamente "upstream" em relação ao início da região codificante do gene *RECK*, clonada em um vetor contendo o gene repórter luciferase (pGL3-4110) (Sasahara et al., 1999a) e a segunda, o vetor de expressão indutível de c- *myc* (pBabePuro-MycER™) (Littlewood et al., 1995).

Células NIH-3T3 foram co-transfectadas transitoriamente com os vetores pGL3-4110, pBabePuro-MycER™ e com o plasmídeo para controle interno da transfecção: pRL-TK. Após o tratamento das células com diferentes concentrações de 4-hidroxitamoxifeno (OHT), de modo a induzir a translocação da proteína de fusão MycER (ver Figura 3.1.1.), os extratos protéicos celulares foram obtidos e analisados quanto à atividade de luciferase. A Figura 4.2.1. mostra que a atividade do promotor do gene *RECK* de 4.110pb é reprimida, em aproximadamente 2 vezes, após a indução da translocação da proteína MycER™. Foi observado, também, um efeito dose-dependente da expressão de c-Myc na repressão da expressão do gene *RECK*. Os resultados revelam que a seqüência promotora de 4.110pb do gene *RECK* contém elementos *cis*-ativos que medeiam a repressão transcricional promovida por c-Myc.

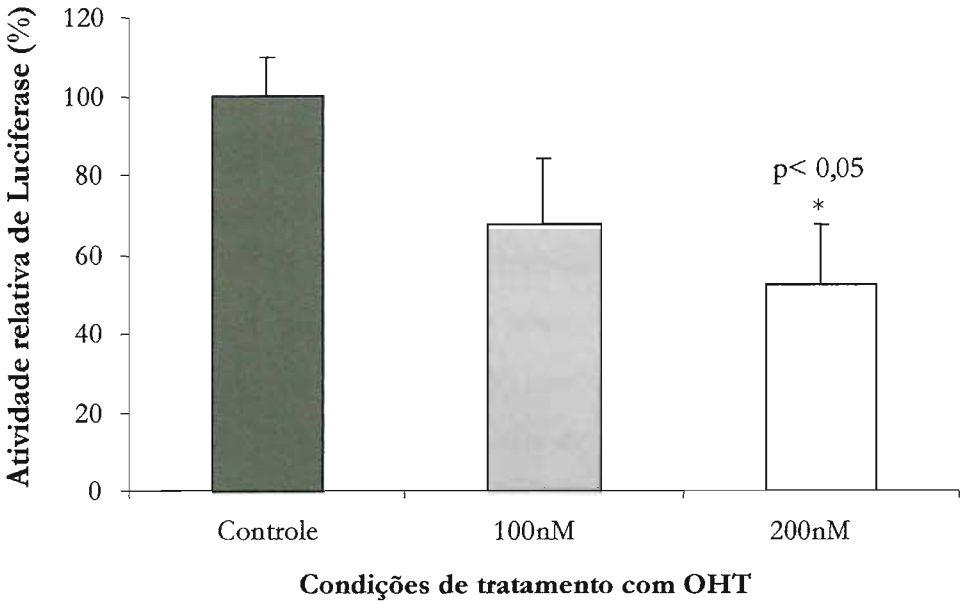



**Figura 4.2.1.** Myc reprime a expressão do gene *RECK* por alterar a atividade promotora deste gene. Uma construção contendo a porção de 4.110pb da região promotora 5'- do gene *RECK* de camundongo clonada frente ao gene reporter luciferase foi co-transfectada com o vetor pBabePuro-MycER™ juntamente com o plasmídeo de referência pRL-TK, em células NIH-3T3 tratadas (ou não) com OHT (em diferentes concentrações) por 48h. Os lisados foram extraídos e submetidos a ensaios de gene repórter luciferase. A atividade de luciferase normalizada está representada em relação ao valor obtido para a condição contendo o plasmídeo pGL3-4110 na ausência de OHT. Os dados representam a media de seis experimentos independentes realizados em duplicatas. As barras representam o desvio padrão (+/- SD) entre os experimentos independentes.

Para definir a região da seqüência promotora do gene *RECK*, que é responsiva a ação de c-Myc, diversas construções previamente estabelecidas da região 5' do promotor de *RECK*, deletadas em sub-fragmentos menores (Sasahara et al., 1999a), foram co-transfectadas transitoriamente em células NIH3T3, juntamente com o vetor pBabePuro-MycER™ e o vetor pRL-TK. Após tratamento das células com OHT, extratos protéicos celulares foram analisados quanto à atividade de luciferase. A Figura 4.2.1.1. mostra os resultados obtidos. Todas as construções do promotor do gene *RECK* analisadas apresentam inibição da atividade promotora na presença da proteína c-Myc. As regiões promotoras de -52, -1679, -2004 e -4110pb do gene *RECK* são responsáveis por, respectivamente, 25, 35, 45 e 53% da repressão da expressão do gene *RECK* mediada por c-*myc*, sugerindo que os elementos responsíveis à c-*myc* no promotor de *RECK* estão distribuídos ao longo de toda a porção promotora de -4.110pb de *RECK*.

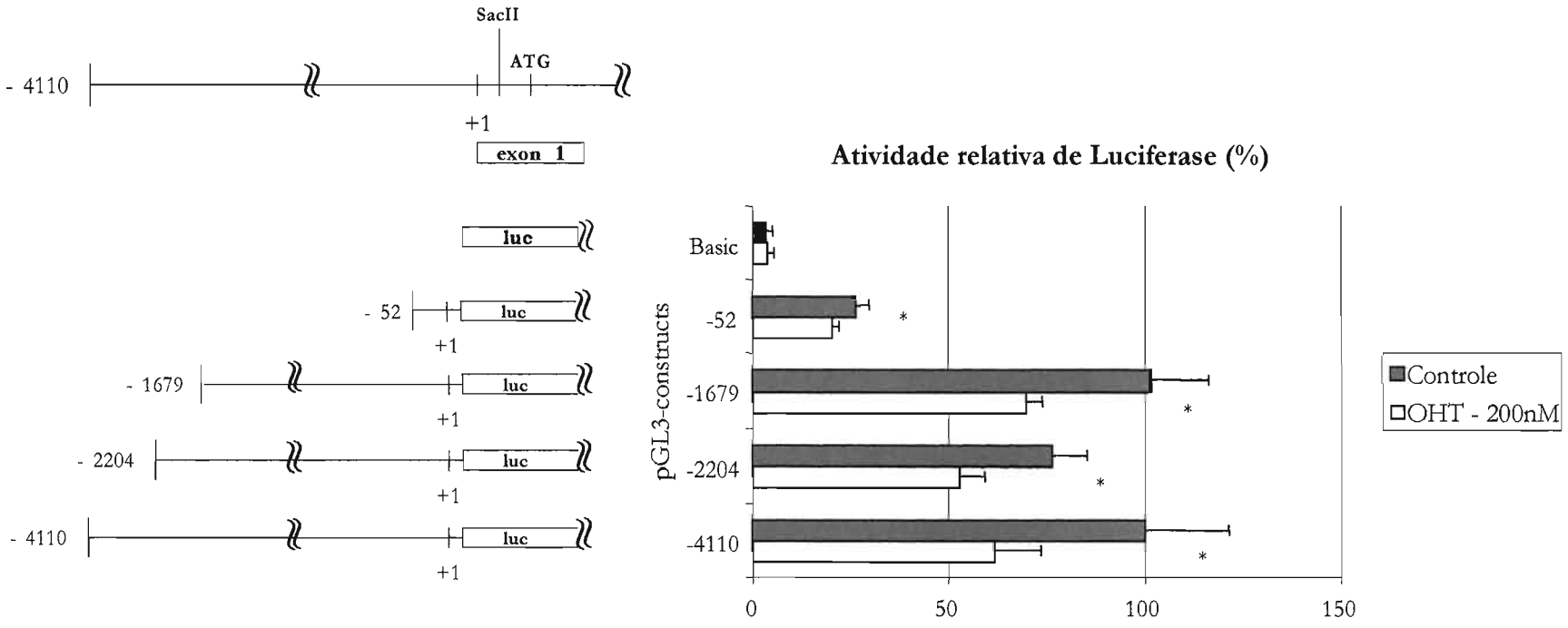



**Figura 4.2.1.1.** Detecção da porção na região promotora do gene *RECK* de camundongo responsiva à c-*myc*. Representação esquemática das construções gene repórter luciferase contendo as várias porções da região promotora do gene *RECK* de camundongo. Os plasmídeos foram designados pGL3-constructs, onde "constructs" representam os tamanhos da região promotora de *RECK* clonada em cada construção. Cada construção gene reporter luciferase foi co-transfectada com o vetor pBabePuro-MycER™ junto com o plasmídeo de referência pRL-TK, em células NIH-3T3 tratadas (ou não) com OHT por 48h. O lisado celular foi extraído e submetido a ensaios de atividade de luciferase. A atividade de luciferase normalizada está representada em relação ao valor obtido para a condição contendo o plasmídeo pGL3-4110 na ausência de OHT. Análises estatísticas foram realizadas e estão representadas no gráfico (* corresponde a $p < 0,05$).

### 4.2.2. Sítios de ligação aos fatores de transcrição Sp1 contidos no promotor do gene *RECK* medeiam a repressão pelo produto do oncogene c-*myc*

Dados da literatura demonstram que os sítios de ligação aos fatores de transcrição da família Sp1/Sp3, presentes na região do chamado promotor mínimo do gene *RECK* de camundongo (-52 a +80pb) (Figura 4.2.2.), são importantes para a expressão deste gene em células de fibroblastos não-transformados e desenvolvem um papel chave na inibição da expressão do gene *RECK* mediada pelo oncogene *ras* (Sasahara et al., 1999a).

Para avaliar a importâcia dos sítios de ligação à Sp1/Sp3 durante a regulação negativa da expressão do gene *RECK* pelo produto do oncogene c-*myc* foram utilizadas construções plasmideais contendo a região do chamado promotor mínimo do gene *RECK* de camundongo mutadas pontualmente em cada um dos sítios de ligação à Sp1 e clonadas em vetor gene repórter luciferase (pGL3-Sp1A e pGL3-Sp1B). Com esta finalidade, células NIH-3T3 foram co-transfectadas transitoriamente com o vetor gene repórter luciferase contendo a seqüência selvagem do chamado promotor mínimo de *RECK* (pGL3-52), ou com os vetores contendo as sequências mutantes (pGL3-Sp1A e pGL3-Sp1B), e com o vetor de expressão de c-*myc* (pBabePuro-MycER™), juntamente com o plasmídeo de referência pRL-TK. Após o tratamento das células com OHT, os extratos protéicos celulares foram obtidos e analisados quanto à atividade de luciferase.

Como pode ser visto na Figura 4.2.2.1., a mutação em cada um dos sítios de ligação aos fatores de transcrição da família Sp1 inibe parcialmente a atividade da região promotora mínima de *RECK* e a mutação em ambos os sítios abole quase que completamente a atividade promotora. Estes dados correlacionam com as observações prévias realizadas por Sasahara e colaboradores, que sugeriram que estes dois sítios de ligação aos fatores de transcrição da família Sp1 cooperam entre si para proporcionar a atividade basal do promotor mínimo do gene *RECK*. Por outro lado, enquanto a mutação no sítio Sp1(B) parece mediar a responsividade deste promotor mínimo ao produto do oncogene *ras* (Sasahara et al., 1999a), ambas

as construções mutantes que apresentam ou o sítio Sp1(A) ou o sítio Sp1(B) mutados parecem perder a responsividade ao produto do oncogene c-*myc*, (Figura 4.2.2.1.). Estes resultados sugerem que os sítios de ligação aos fatores de transcrição da família Sp1 desempenham um papel importante na regulação negativa do promotor do gene *RECK* de camundongo mediada pelo produto do oncogene c-*myc*.

```
-600    TGAATTCGCT TTGATTCCTA GGTCCTCTGG 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 TGCGGGCTCC CACCCCCTAT
-200    GTGCCCGACA CGGGACAGAG GCATTCCACA GGGGTCTCCA GCCTCTGACT
        TCCCGTTTGA AGACCGCAGC CCGGGAGCCC GAGTCCGAAG GCGACACACA

-100    GCTGGCCCAT AACAAAGAGC CAGGGTCCAG GGCGCGCTGC CGCCCCCCGG
                                                      SmaI

        GAGGTTTTGA AAACTCTGAG 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  ↑

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

**Figura 4.2.2.** Sequência nucleotídica de 600pb da região 5´- flanqueadora e o exon-1 do gene *RECK* de camundongo. As extremidades do exon-1 estão definidas pelo sítio de início de transcrição (+1) e a 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 chamado "promotor mínimo" (-52 a +80 pb) também estão indicados.

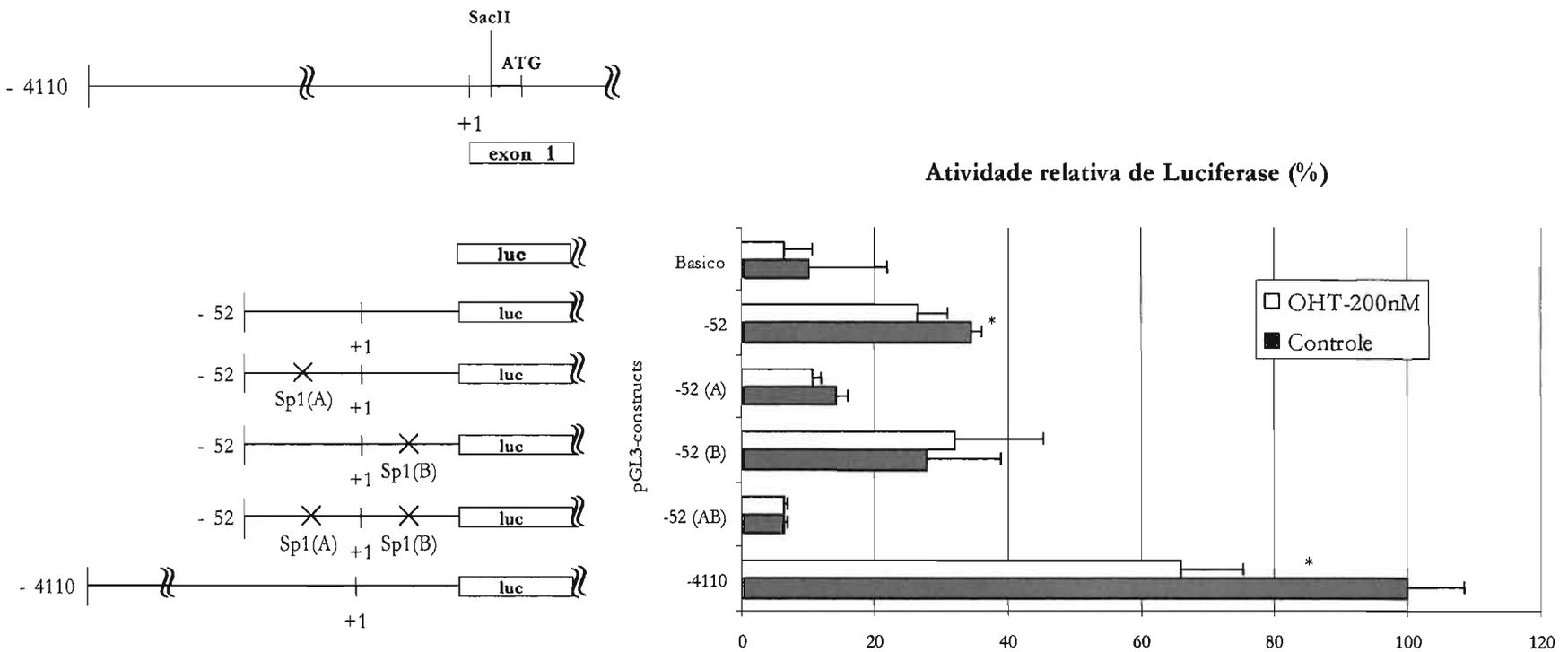



**Figura 4.2.2.1.** Detecção dos sítios de ligação à fatores de transcrição responsíveis à c-*myc* que medeiam a repressão da expressão do gene *RECK*. Representação esquemática das construções gene repórter luciferase contendo a porção do promotor mínimo do gene *RECK* de camundongo, mutada pontualmente. Cada construção gene repórter foi co-transfectada com o vetor pBabePuro-MycER™ juntamente com o plasmídeo de referência pRL-TK, em células NIH-3T3 tratadas (ou não) com OHT por 48h. Os lisados protéicos foram extraídos e submetidos a ensaios de atividade de luciferase. A atividade de luciferase normalizada está representada em relação ao valor obtido para a condição contendo o plasmídeo pGL3-4110 na ausência de OHT. Análises estatísticas foram realizadas e estão representadas no gráfico (* corresponde a $p < 0,05$).

### 4.2.3. A inibição do gene *RECK* mediada pelo produto do oncogene c-*myc* é dependente do mecanismo de desacetilação de histonas

A expressão do gene *RECK* é ubíqua em tecidos normais mas, por outro lado, não é detectável em linhagens celulares tumorais ou em células de fibroblastos (NIH-3T3) transformadas por diversos oncogenes (Takahashi et al., 1998). Os mecanismos desta repressão ainda são obscuros. Foi verificado que o tratamento de células de fibroblasto de camundongo normal NIH-3T3 com tricostatina A (inibidor da histona desacetilase) não altera o nível de transcrito do gene *RECK* (Sasahara et al., 2002), porém nenhuma linhagem transformada ou células derivadas de tumores tinham sido analisadas anteriormente.

O mecanismo pelo qual c-Myc é capaz de induzir a repressão transcricional de seus genes alvos ainda não foi completamente elucidado. Estudos recentes apoiam a idéia de que a repressão transcricional mediada por c-Myc resulta, não de uma interação direta com o DNA, mediada pelo heterodímero Myc/Max, mas da sua interação com outros fatores de transcrição, promovendo o bloqueio da atividade deste último (Gartel et al., 2001, Seoane et al., 2001, Staller et al., 2001). A interação de c-Myc com diversos fatores importantes para o remodelamento da cromatina parece estar influenciando o mecanismo de regulação transcricional negativa de c-Myc. Estes dados nos levaram a analisar o envolvimento do mecanismo de desacetilação de histonas na repressão transcricional do gene *RECK* mediado por c-Myc, com o intuito de elucidar o mecanismo de ação deste proto-oncogene.

Com este objetivo, células NIH-3T3 foram transfectadas estavelmente com o plasmídeo pBabePuro-MycER™ ou com o plasmídeo pBabePuro vazio gerando, respectivamente, os clones MycER e pBPuro. Os diferentes clones celulares foram cultivados até a sub-confluência e carenciados para soro (DMEM - 0,2% FCS) por 24h. Após este período de carenciamento, de acordo com cada condição de tratamento, as células foram estimuladas com OHT e/ou tricostatina (TSA) por 18h. O RNA foi coletado, o cDNA correspondente foi sintetizado e submetido a

ensaios de PCR em tempo real utilizando "primers" específicos para os transcritos de *RECK* e GAPDH.

A Figura 4.2.3. mostra o nível de transcrito de *RECK* em cada clone celular analisado após o tratamento com os diferentes agentes. Foi possível verificar que o clone MycER apresenta inibição da expressão do gene *RECK* após o tratamento com OHT. Este dado corrobora os resultados mostrados anteriormente, obtidos com os ensaios de gene repórter, que sugerem que o tratamento das células com OHT estaria promovendo a translocação da proteína MycER do citoplasma para o núcleo, a qual, por sua vez estaria atuando no promotor do gene *RECK* inibindo a atividade do mesmo. O mesmo efeito não foi observado no clone controle pBPuro submetido às mesmas condições de tratamento. Foi verificado que o tratamento do clone MycER com TSA, em diferentes concentrações, bloqueia a inibição da expressão de *RECK* mediada por c-Myc, sugerindo que esta inibição é dependente de um mecanismo de desacetilação de histonas. É possível observar, ainda, um efeito dose-dependente da concentração de TSA no restabelecimento da expressão do gene *RECK* mediado pela inibição da ação de c-Myc.

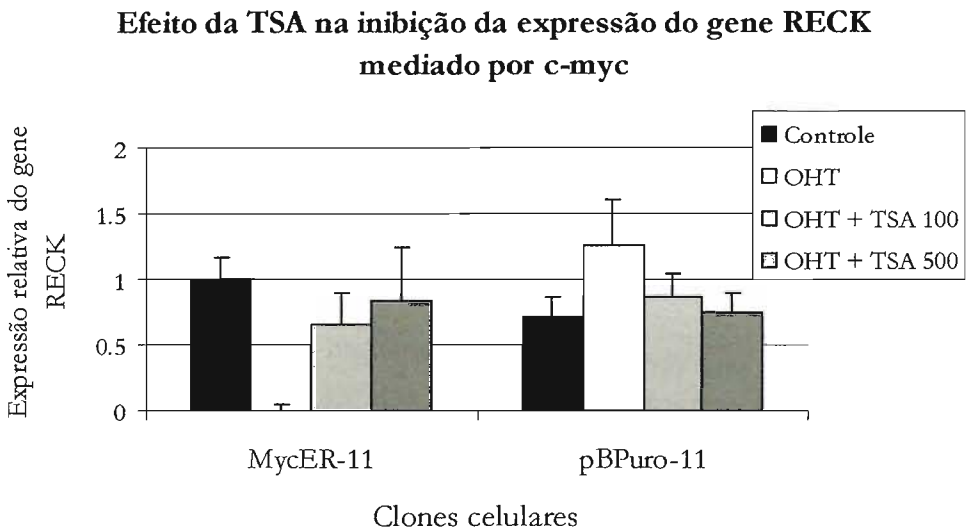



**Figura 4.2.3.** A inibição da expressão do gene *RECK* mediado pelo oncogene c-*myc* parece ser dependente de mecanismos remodeladores da cromatina. Os clones celulares MycER e pBPuro foram tratados (ou não) simultaneamente com OHT (200nM) e concentrações crescentes de TSA por 18h. O RNA total destas células foi extraído, submetido à síntese de cDNA e a seguir, submetidos a ensaios de PCR em tempo real utilizando "primers" específicos para o transcrito de *RECK* de camundongo e para o controle interno GAPDH. Os dados mostram que a expressão do gene *RECK* foi efetivamente inibida no clone MycER após o tratamento com OHT. Em seguida, a inibição da expressão do gene *RECK* mediada pelo oncogene c-*myc*, no clone MycER, foi suprimida pelo tratamento com TSA. A expressão do gene *RECK* no clone controle pBPuro não sofreu o mesmo efeito frente aos tratamentos citados. Estes dados representam um experimento representativo de dois experimentos independentes realizados em duplicata. As barras representam o desvio padrão (+/-SD) de um experimento representativo independente.

## 4.3. Os genes *RECK* e c-*myc* e os tumores do Sistema Nervoso Central

### 4.3.1. Confirmação da superexpressão de c-*myc* durante a progressão maligna de gliomas

Dados da literatura mostram que a superexpressão de c-*myc* está correlacionada com o aumento no grau de malignidade de gliomas humanos (Herms et al., 1999, Orian et al., 1992). Como visto anteriormente, o oncogene c-*myc* é capaz de reprimir a expressão do gene *RECK* por alterar sua atividade transcricional, podendo esta regulação ser importante para processos fisiológicos como a progressão do ciclo celular. Nesta etapa do trabalho foi analisado se a expressão do gene c-*myc* correlaciona de forma inversa com expressão do gene *RECK* durante a progressão maligna de gliomas humanos.

Para verificar a expressão de c-*myc* durante a progressão de gliomas utilizou-se ensaios de PCR em tempo real. Amostras de RNA obtidas de diferentes tipos de gliomas humanos, com diferentes graus de malignidade, foram utilizadas para gerar cDNAs. Os cDNAs foram submetidos a ensaios de PCR em tempo real utilizando "primers" específicos para os transcritos humanos de c-*myc*, tubulina e GAPDH. Os níveis de expressão de c-*myc*, normalizados pelos níveis de GAPDH e também pelos níveis de tubulina (dois controles interno utilizados neste experimento), foram comparados entre as amostras de tecido normal e tumoral de 62 pacientes. O perfil de expressão obtido para ambos os controles foi bastante semelhante (dados não mostrados nesta tese) sendo adotado o controle interno GAPDH para os experimentos posteriores. A Figura 4.3.1. mostra o gráfico gerado a partir da normalização dos valores de expressão obtido para c-*myc* em relação àqueles obtidos para GAPDH nas diferentes amostras analisadas. As amostras tumorais estão classificadas de acordo com o grau de progressão maligna, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO). Amostras de tecidos derivadas de indivíduos normais mostram uma expressão significativamente menor de c-*myc* ($p<0,01$) em comparação com as amostras de tecido tumoral derivadas de pacientes com tumores de graus mais elevados, especificamente graus II, III e GBM. Os resultados

mostram que a superexpressão do gene c-*myc* acompanha a progressão tumoral de gliomas humanos, confirmando e validando nossas amostras tumorais de acordo com os dados da literatura.

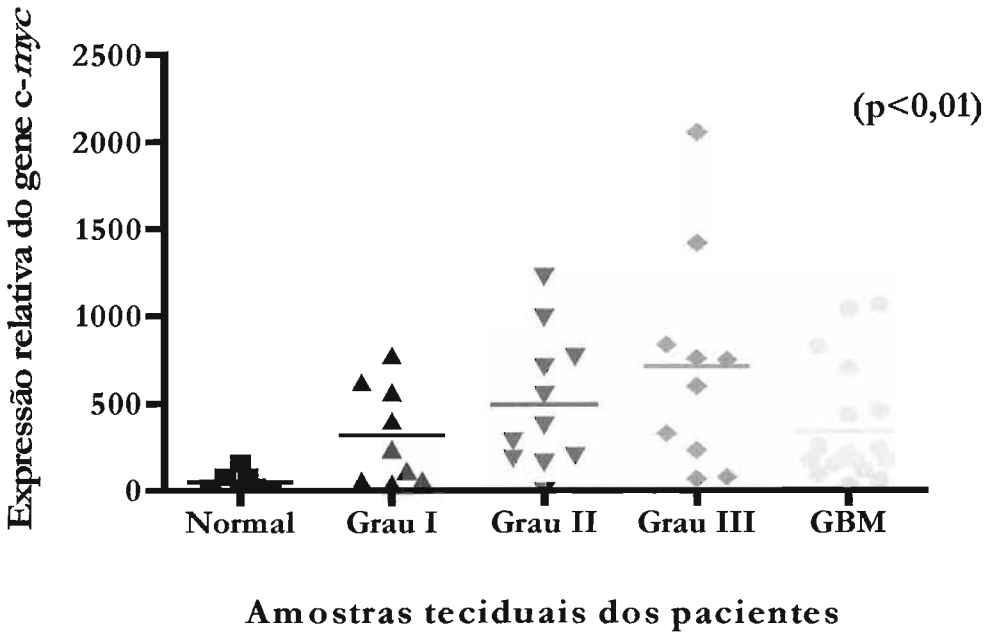



**Figura 4.3.1.** A expressão do gene c-*myc* é regulada positivamente durante a progressão de gliomas humanos. Os RNAs totais foram obtidos de diferentes amostras teciduais e os cDNAs correspondentes foram sintetizados. Ensaios de PCR em tempo real, usando "primers" específicos para os transcritos de c-*myc* e GAPDH, foram realizados e os resultados mostram que o gene c-*myc* é mais expresso nas amostras tumorais em comparação com as amostras de tecidos normais ($p < 0,01$).

### 4.3.2. Análise da expressão do gene *RECK* durante a progressão de gliomas humanos

Para avaliar o padrão de expressão do gene *RECK* durante a progressão de gliomas humanos foram utilizadas amostras teciduais derivadas de pacientes que apresentavam gliomas com diferentes graus de malignidade, além de tecidos cerebrais livres de tumor. Estas amostras foram lisadas, os RNAs corrrespondentes foram purificados e os cDNAs foram sintetizados. A seguir, foram realizados ensaios de PCR em tempo real utilizando "primers" específicos para os transcritos humanos de hRECK e GAPDH (controle).

A Figura 4.3.2. mostra o gráfico gerado a partir da normalização dos valores de expressão obtidos para *RECK* em relação àqueles obtidos para GAPDH em 63 amostras de pacientes divididas entre normais e tumorais. As amostras tumorais estão classificadas de acordo com o grau de progressão maligna, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO). Análises estatísticas mostram que os níveis de transcrito correspondente ao gene *RECK* não são alterados significativamente durante a progressão maligna dos gliomas humanos em comparação com as amostras de cérebro normal.

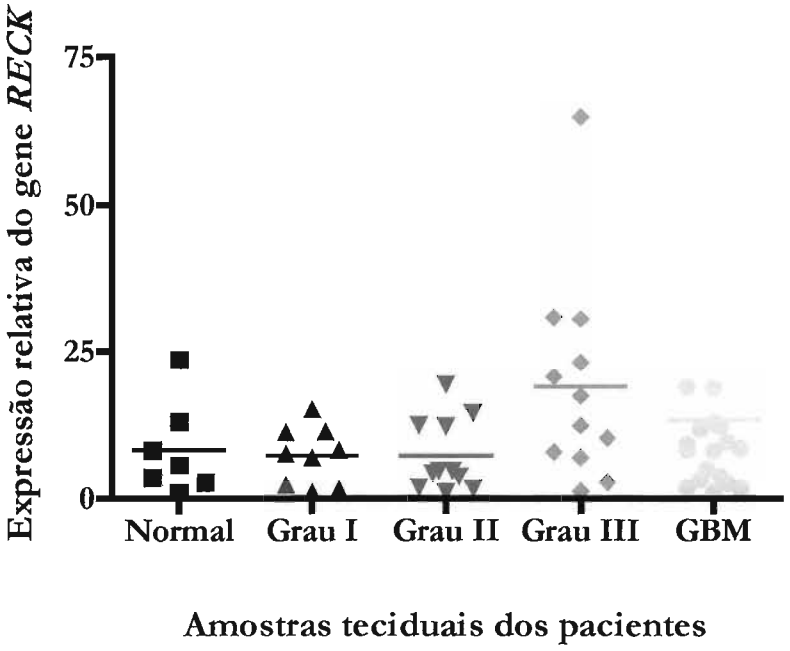



**Figura 4.3.2** Expressão do gene *RECK* não é modulada em gliomas humanos com diferentes graus de malignidade. Os RNAs totais foram obtidos de diferentes amostras teciduais e os cDNAs correspondentes foram sintetizados. Ensaios de PCR em tempo real, usando "primers" específicos para os transcritos de *RECK* e GAPDH foram realizados e os resultados mostram que a expressão de *RECK* não é modulada durante a progressão maligna de gliomas humanos.



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Em paralelo à análise tecidual, foram geradas 21 culturas primárias derivadas de gliomas com diferentes graus de malignidade. As características morfológicas das células destas culturas podem ser visualizadas na Figura 4.3.2.1.A. Pode-se perceber, em diferentes culturas primárias, a presença de algumas células com prolongamentos celulares bem evidentes, com características morfológicas bastante similares a neurônios. Ao contrário, outras culturas apresentam uma morfologia mais achatada, com o citoplasma bem aumentado. As culturas primárias foram fixadas, coradas com hematoxilina-eosina (Figura 4.3.2.1.B) e caracterizadas em relação ao seu padrão de expressão para um marcador de astrócito (célula precursora deste tipo de tumor), especificamente GFAP "Glial fibrillary acidic protein" (Figura 4.3.2.1.C). Todas as culturas primárias obtidas apresentaram marcação positiva para GFAP, confirmando serem derivadas de astrócitos.

As culturas primárias foram cultivadas até a sub-confluência e, a seguir, lisadas. Os RNAs correspondents foram purificados e os cDNAs sintetizados. A seguir, foram realizados ensaios de PCR em tempo real utilizando "primers" específicos para os transcritos de hRECK e GAPDH (controle). A Figura 4.3.2.2. mostra o gráfico gerado a partir da normalização dos valores de expressão obtido para o transcrito de *RECK* em relação àqueles obtidos para o transcrito de GAPDH nas 21 culturas primárias estabelecidas. As culturas derivadas de amostras tumorais estão classificadas de acordo com o grau de progressão maligna, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO). Os dados de análise quantitativa da expressão do gene *RECK* nas culturas primárias dos gliomas com diferentes graus de malignidade mostram a mesma tendência observada diretamente para as amostras teciduais e sugerem que a expressão do gene *RECK* não é modulada durante a progressão maligna de gliomas humanos.

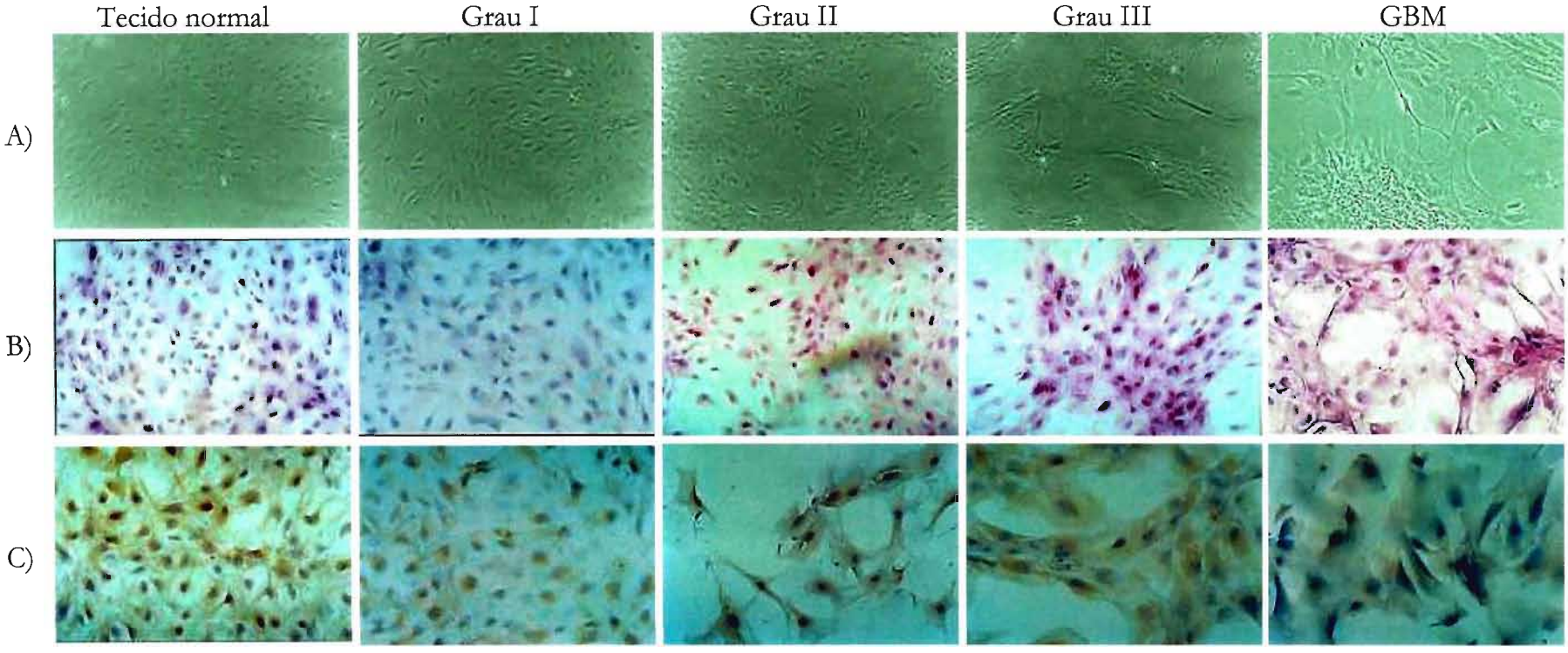



**Figura 4.3.2.1.** Análises citoquímicas em culturas primárias derivadas de tecidos normais e tumorais humanos com diferentes graus de malignidade. (A) Características morfológicas das diferentes culturas primárias. (B) Células foram fixadas usando formaldeído 3,7%, 10min, 37°C e coradas com Eosina-hematoxilina. (C) Células foram marcadas com anticorpo específico para GFAP.

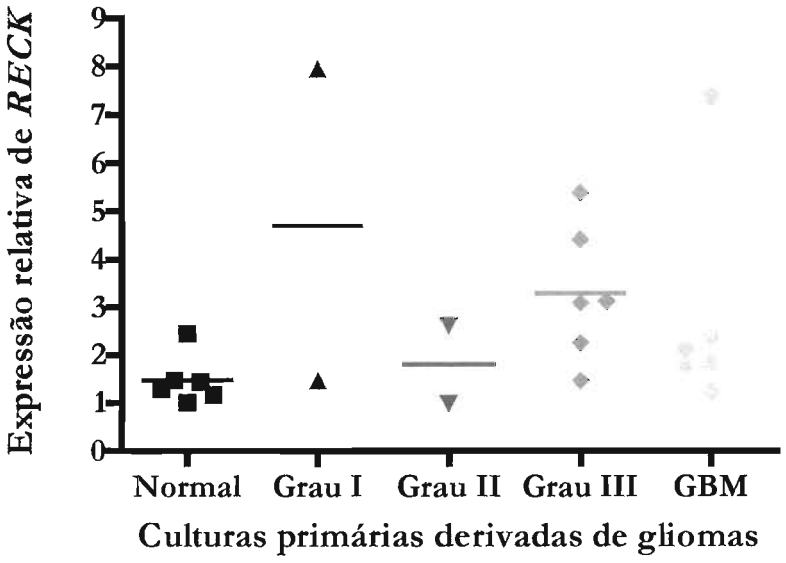



**Figura 4.3.2.2.** Expressão do gene *RECK* não é modulada em culturas primárias derivadas de gliomas humanos com diferentes graus de malignidade. Os RNAs totais foram obtidos de diferentes culturas primárias de gliomas e os cDNAs correspondentes foram sintetizados. Ensaios de PCR em tempo real, usando "primers" específicos para os transcritos de *RECK* e GAPDH foram realizados e os resultados mostram que a expressão de *RECK* não é modulada durante a progressão maligna das culturas primárias derivadas de gliomas humanos.

### 4.3.3. A modulação da expressão do gene *RECK* pode ser considerada um marcador prognóstico para gliomas humanos

Diversos trabalhos têm sido realizados no sentido de verificar a expressão do gene *RECK* em tumores humanos e correlacionar com a progressão maligna e/ou prognóstico dos pacientes. Estes trabalhos mostram que o gene *RECK* é expresso em alguns tipos de tumores, como hepatocarcinomas, tumor de pulmão NSCLC ("non-small cell lung cancer"), carcinomas de mama, coloretal e de pâncreas ductal, e mostram que uma expressão elevada de *RECK* no tumor promove um prognóstico mais favorável para os pacientes, promovendo um maior tempo de sobrevida (Furumoto et al., 2001, Masui et al., 2003, Takenaka et al., 2004), maior tempo livre de recorrência da doença (Span et al., 2003, Takeuchi et al., 2004), menor invasividade do tumor (Masui et al., 2003) e diminuição da angiogênese tumoral (Takenaka et al., 2004, Takeuchi et al., 2004). Portanto, é possível que, embora *RECK* seja expresso em alguns tumores, sua alta expressão pode estar relacionada com um menor grau de malignidade ou ainda melhor prognóstico do paciente.

Considerando as formas mais agressivas de gliomas humanos, especificamente os tumores de Grau III e GBM, é possível separar nosso grupo de pacientes em dois subgrupos considerando o tempo de sobrevida manifestado em cada caso. Os mecanismos moleculares responsáveis pelas diferenças no tempo de sobrevida dos pacientes com gliomas ainda são bastante obscuros e diversos trabalhos têm sido abordados na literatura de forma a encontrar marcadores moleculares que possam ser utilizados no prognóstico destes pacientes, como o próprio gene c-*myc* (Herms et al., 1999).

A Figura 4.3.3. mostra os resultados obtidos da análise da expressão de *RECK* em tumores derivados dos pacientes com graus mais avançados da doença em comparação com o tempo de sobrevida apresentado pelos mesmos. Os resultados indicam que os tumores derivados dos dois subgrupos de pacientes apresentam diferença significativa na expressão do gene *RECK* ($p=0,02$). Os pacientes que manifestaram um tempo de sobrevida maior que 12 meses apresentaram tumores com uma significativa maior expressão do gene *RECK*.

Nossos resultados sugerem que a maior expressão do gene *RECK* em gliomas de graus mais agressivos (tumores de grau III e GBM) pode ser considerada como um indicativo de melhor prognóstico para os pacientes.

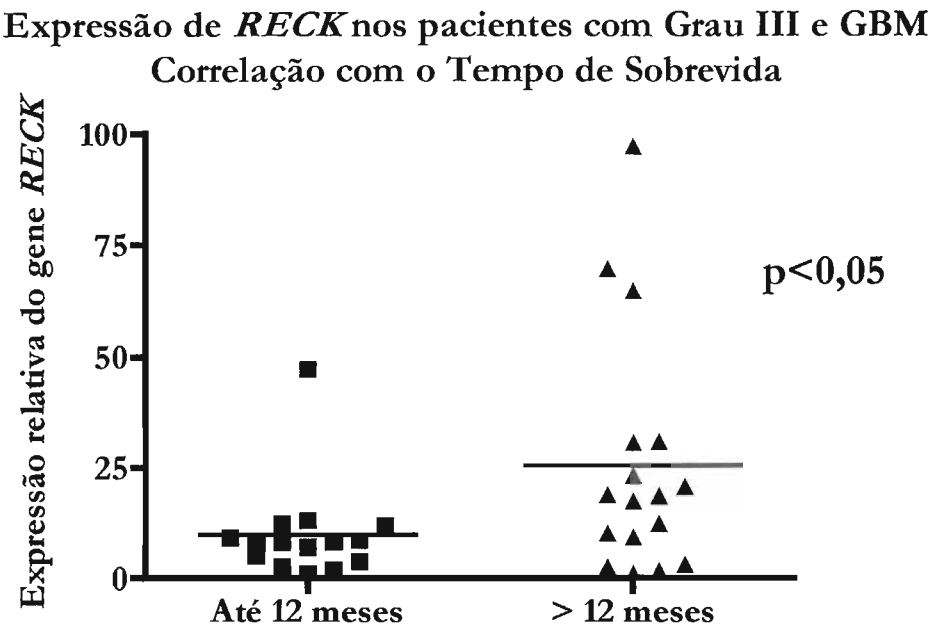



**Figura 4.3.3.** A maior expressão de *RECK* no tumor é correlacionada com um melhor prognóstico para pacientes com gliomas de graus mais elevados da doença. Os RNAs totais foram obtidos de diferentes amostras teciduais e os cDNAs correspondentes foram sintetizados. Ensaios de PCR em tempo real, usando "primers" específicos para os transcritos de *RECK* e GAPDH, foram realizados. Os pacientes com graus mais elevados de progressão maligna de gliomas foram divididos em dois subgrupos de acordo com o tempo de sobrevida apresentado pelos mesmos. A expressão do gene *RECK* foi significativamente maior no grupo de pacientes com maior tempo de sobrevida. O resultado das análises estatísticas está representado no gráfico ($p<0,05$).

### 4.3.4. Expressão da proteína RECK durante a progressão maligna de gliomas humanos

Para verificar se os níveis protéicos de RECK estavam sendo alterados durante a progressão maligna de gliomas foram realizadas análises por imunohistoquímica, utilizando um anticorpo específico para a proteína RECK humana em amostras de tecidos tumorais de gliomas humanos com diferentes graus de malignidade, em comparação com tecidos cerebrais livres de tumor. As amostras tumorais estão classificadas de acordo com o grau de progressão maligna, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO). A Figura 4.3.4. mostra os resultados obtidos. As amostras de tecidos normais e de gliomas de baixo grau apresentam uma marcação positiva para RECK em várias áreas do tecido (Figura 4.3.4.A e 4.3.4.B), enquanto que em gliomas de graus mais avançados somente uma pequena área do tumor pode ser marcada positivamente para RECK (Figura 4.3.4.C e 4.3.4.D). No grau de progressão tumoral mais extremo deste tipo de tumor, glioblastoma multiforme (GBM), a proteína RECK praticamente não é detectada (Figura 4.3.4.E). Nenhuma marcação foi observada na condição em que nenhum anticorpo primário foi utilizado (controle negativo). É importante ressaltar que estes resultados são ainda preliminares e um número maior de amostras devem ser analisadas para a confirmação dos resultados apresentados, mas inicialmente sugerem que a expressão da proteína RECK seja regulada negativamente durante a progressão maligna de gliomas humanos.

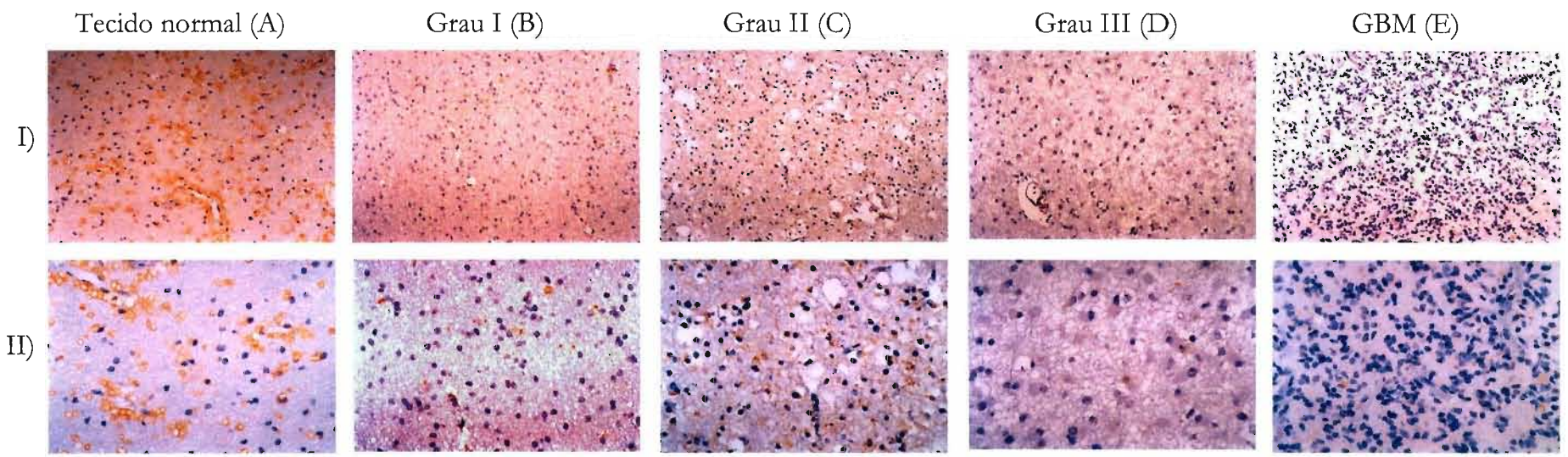



**Figura 4.3.4.** Distribuição tecidual da proteína RECK durante a progressão de gliomas humanos. Análises citoquímicas, utilizando o anticorpo monoclonal anti-hRECK, em secções de diferentes tecidos tumorais com diferentes graus de malignidades sugerem que a expressão do gene *RECK* é regulada negativamente durante a progressão de gliomas humanos, não sendo detectada no ponto mais maligno da progressão, em glioblastoma. I) Fotomicrografias de contraste de fase em um microscópio Nikon Diaphot (400X) II) Fotomicrografias de contraste de fase em um microscópio Nikon Diaphot (100X).

# 5. Discussão

## 5.1. O gene *RECK* e a progressão do ciclo celular

Os resultados obtidos na primeira parte deste trabalho mostraram, pela primeira vez, o envolvimento do gene *RECK* na progressão do ciclo celular. A primeira indicação de que RECK poderia estar envolvido no processo de proliferação celular resultou da observação de que quando fibroblastos de camundongo normais eram estimulados com soro, de modo a induzir a progressão destas células através do ciclo celular, a expressão do gene *RECK* era regulada negativamente (Figura 4.1.1). A regulação da expressão do gene *RECK* também foi observada quando a proliferação de fibroblastos de camundongo foi modulada pelo aumento da densidade celular (Figura 4.1.2), sendo que neste caso a disponibilidade de fatores de crescimento e soro não é o fator limitante da parada de crescimento.

A superexpressão do gene *RECK* em células NIH-3T3 mostrou o envolvimento do mesmo na progressão do ciclo celular (Figuras 4.1.3.2, 4.1.3.3, 4.1.4.2 e 4.1.4.3). A população transfectante Pop-hRECK apresenta algumas alterações morfológicas, característica de células em parada de crescimento, como o aumento do citoplasma, núcleo simples e pequeno e o maior achatamento das células em substrato sólido (Figura 4.1.3). Aparência similar foram verificadas em células em parada de crescimento após transfecção com os genes *Rb*, *p53* ou *gas1*, sendo que as células transfectadas com p53 apresentaram parada na fase M do ciclo celular, caracterizada por células multinucleadas (Iwasaka et al., 1996). Dada a ausência de células multinucleadas na população transfectante Pop-hRECK pode-se sugerir que a supressão do crescimento mediada por RECK induz a parada de crescimento em G0 ou G1, antes da entrada das células na fase S e da duplicação do DNA.

A população Pop-hRECK apresenta uma menor capacidade de crescer em meio contendo concentração adequada de soro (10%), em comparação com a população transfectante controle Pop-pCXN2 ou com a linhagem parental NIH-3T3 (Figura 4.1.3.2). Análises estatísticas dos dados obtidos de densidade de saturação e tempo de dobramento mostraram que a população de células Pop-

hRECK apresenta uma tendência para um maior tempo de dobramento e densidade de saturação significativamente menor ($p<0,05$) quando comparada com a linhagem parental NIH-3T3 e com a população transfectante controle Pop-pCXN2.

Análises da transição pelas diferentes fases do ciclo celular nas células Pop-hRECK mostraram que a progressão no ciclo celular foi retardada, em comparação com a linhagem parental NIH-3T3 e com a população transfectante controle Pop-pCXN2 (Figura 4.1.3.3), indicando, pela primeira vez, que a inibição da expressão de RECK pode ser um importante passo para que a progressão do ciclo celular ocorra de forma adequada.

Diversos mecanismos moleculares podem ser responsáveis pela inibição da progressão do ciclo celular induzida por RECK. A família de fatores de transcrição E2F desempenha um papel central na regulação da proliferação celular por controlar a expressão de genes necessários para a progressão do ciclo celular, particularmente, genes envolvidos na síntese de DNA e genes envolvidos com apoptose. E2F é regulado de maneira dependente do ciclo celular, principalmente através da sua associação temporal com membros da família da proteína pRb. Em células normais, a capacidade de pRb se ligar a E2F é regulada por fosforilação dependente do ciclo celular. pRb encontra-se hipofosforilada em G0 e no início da fase G1, sendo esta forma hipofosforilada a que interage com a proteína E2F e inibe a sua atividade. Os níveis de fosforilação de pRb aumentam à medida que a célula progride através da fase G1, envolvendo, basicamente, ciclina D e ciclina E (Mittnacht, 1998) com seus respectivos parceiros CDKs (ver Figura 1.4.2.).

Os inibidores de CDKs exercem um papel muito importante no controle do ciclo celular. Estes inibidores interagem com os complexos ciclina/CDKs e impedem a sua ação. Proteínas Ink4 ($p16^{Ink4a}$, $p15^{Ink4b}$, $p18^{Ink4c}$ e $p19^{Ink4d}$) são específicas para CDK associadas a ciclina D atuando no início da fase G1 do ciclo celular, enquanto que proteínas Cip/Kip ($p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ e $p57^{Kip2}$) interagem com diversas CDKs e inibem um amplo espectro das holoenzimas ciclinas/CDKs, podendo atuar no final de G1 (ação em complexos ciclina E/CDK2) ou ainda no início de S (ação nos complexos ciclina A/CDK2).

Entre os genes conhecidos e previamente caracterizados como envolvidos na progressão do ciclo celular, foi observado que o gene *p21* estava mais expresso na

população transfectante Pop-hRECK, em comparação com a população transfectante controle Pop-pCXN2. Além disso, foi possível observar que o gene de choque térmico *Hsp25*, previamente descrito como capaz de induzir a expressão de *p21* (Park et al., 2002), estava aproximadamente 9,2 vezes mais expresso na mesma população transfectante.

Nossos resultados sugerem que um dos possíveis mecanismos pelos quais RECK leva à inibição da progressão do ciclo celular é por alterar a expressão de um inibidor de CDK, especificamente de p21, retardando a fosforilação da proteína pRb (Figura 4.1.4.2 e 4.1.4.3).

Juntos, nossos dados mostram, pela primeira vez, que a proteína RECK está envolvida na progressão do ciclo celular, agindo durante a transição G0/G1-S. Nossos dados sugerem que RECK é responsável pela regulação da expressão de *p21*, atuando, conseqüentemente, no controle da fosforilação da proteína pRb. Por alterar os níveis de fosforilação de pRb, é possível sugerir, ainda, que a proteína RECK esteja atuando, especificamente, durante a fase G1 do ciclo celular.

A transição G0/G1 - S é o maior alvo de alterações em diversos tipos de tumores humanos (Molinari, 2000). Além disso, alterações em vias regulatórias que controlam a atividade das proteínas da família pRb ocorrem em aproximadamente 90% dos tumores humanos (Malumbres & Barbacid, 2001). Diversos agentes terapêuticos para o tratamento do câncer, que estão em fase de testes clínicos atualmente, promovem a modulação da atividade dos complexos ciclina/CDKs. Alguns destes agentes promovem a inibição da atividade de ciclinas/CDKs por interagirem diretamente nos sítios de ligação a ATP das moléculas de CDK, impedindo a sua ativação por quinases ativadoras de CDKs (CAKs), outros mimetizam a ação dos inibidores fisiológicos de CDKs (como p21 e p27) e outros, ainda, atuam através da inibição da ubiquitinização (e posterior degradação mediada por proteossoma) de p21 e p27 (Senderowicz, 2003, Swanton, 2004).

A caracterização de RECK como um modulador da progressão do ciclo celular pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos que controlam a progressão do ciclo celular normal e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de tumores humanos.

## 5.2. Possíveis mecanismos moleculares da ação de *RECK*

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram também identificados, através dos experimentos de hibridização molecular utilizando lâminas comerciais do Sistema CodeLink (GE-Healthcare), diversos genes como sendo possivelmente regulados por RECK (Figura 4.1.4 e 4.1.4.1). O acesso aos bancos de dados disponíveis atualmente de classificação gênica funcional pelo Sistema GeneOntology (GO) permitiu a classificação funcional de 629 dos 713 genes possivelmente identificados como diferencialmente expressos na população Pop-hRECK (Tabela 4.1.4). Os genes possivelmente regulados por RECK estão incluídos em diferentes classes funcionais, como genes envolvidos em metabolismo, genes que codificam para fatores de transcrição, genes que codificam para proteínas envolvidas na comunicação célula-célula e célula-matriz, genes envolvidos em proliferação e morte celular, entre outros (Figura 4.1.4.1).

Algumas destas classes funcionais chamam a atenção e podem representar tanto as prováveis vias sinalizadoras pelas quais RECK estaria modulando a expressão de p21, como também outros possíveis mecanismos de ação pelos quais RECK estaria regulando, entre outros prováveis processos, a progressão do ciclo celular.

Foi verificado que RECK possivelmente regula a expressão de diversas proteínas envolvidas na transdução do sinal intracelular, como é o caso do fator de transcrição Smad3. Nossos resultados sugerem que possivelmente a população transfectante Pop-hRECK expressa, aproximadamente, 2,3 vezes mais Smad3 em comparação com a população transfectante controle Pop-pCXN2. Proteínas Smads são as mais bem caracterizadas proteínas efetoras intracelulares da sinalização mediada por TGF-β ("transforming growth factor β"). TGF-β inibe potencialmente a progressão do ciclo celular durante a fase G1 (Derynck et al., 2001, Massague et al., 2000, Moustakas et al., 2002) e inicia a sua sinalização através da interação com o seu receptor serina/treonina quinase tipo II (TβRII), que então recruta o receptor tipo I (TβRI), promovendo a fosforilação do mesmo, formando um complexo

ligante-receptor ativo na superfície celular (Wrana et al., 1992, Wrana et al., 1994). O receptor tipo I ativado é então capaz de fosforilar substratos intracelulares, os quais incluem as proteínas Smad2 e Smad3. Quando fosforiladas, Smad2 e Smad3 são capazes de formar complexos com Smad4 (Abdollah et al., 1997, Nakao et al., 1997). Estes complexos heteroméricos de Smads são translocados para o núcleo, sendo capazes de regular a transcrição de diversos genes alvo, que incluem as proteínas regulatórias do ciclo celular, como os inibidores de CDK: p15 e p21 (Datto et al., 1995a, Datto et al., 1995b, Hannon & Beach, 1994, Li et al., 1995, Pardali et al., 2005) e o proto-oncogene c-*myc* (Chen et al., 2001, Frederick et al., 2004).

Nossos resultados sugerem que um dos possíveis mecanismos pelos quais RECK está modulando a progressão do ciclo celular é por ser capaz de induzir a expressão de p21 e, conseqüentemente, controlar a fosforilação de pRb (Figura 4.1.4.2 e 4.1.4.3). Sabendo que RECK é uma glicoproteína que permanece ancorada à membrana plasmática através de uma modificação C-terminal de glicosilfosfatidil inositol (GPI), a mesma pode estar modulando a expressão gênica por um mecanismo indireto. É importante ressaltar que uma grande variedade de proteínas ancorada à superfície celular por modificação GPI vêm sendo identificadas como parte essencial de receptores complexos assim como co-receptores ou como ligantes associados à membrana (Buj-Bello et al., 1997, Frey et al., 1992, Jing et al., 1996, Klein et al., 1997, Lee et al., 2003, Prado et al., 2004, Treanor et al., 1996, Yang et al., 1998). A possibilidade de RECK interagir com receptores da superfície celular (como os receptores de integrinas e receptores de fatores de crescimento) e ser capaz de modular o sinal transduzido para o interior da célula, é bastante interessante. A futura confirmação de Smad3 como um gene regulado positivamente por RECK pode representar uma via sinalizadora intracelular que poderia estar mediando o efeito de RECK na indução da expressão de p21 (Figura 5.2.1.).

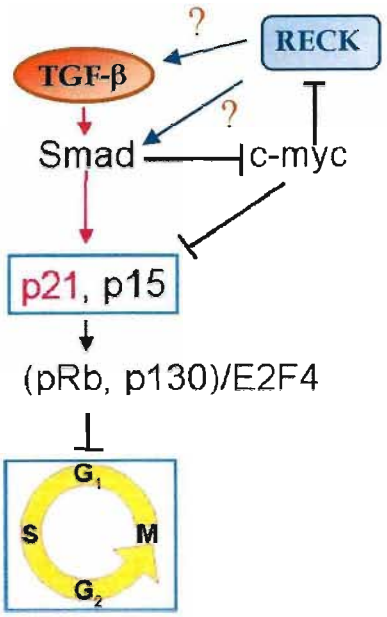



**Figura 5.2.1.** Possível envolvimento de Smads na inibição de crescimento mediada por RECK. A ação de TGF-β promove a ativação de complexos heteroméricos de Smads que irão atuar na repressão da expressão do gene c-*myc* e indução dos inibidores de CDKs *p21* e *p15*, promovendo a parada de crescimento celular. A ação de RECK na inibição da progressão do ciclo celular, por induzir, entre outros alvos, a expressão de p21, pode estar sendo mediada por proteínas Smads.

Diversos outros genes envolvidos em diferentes processos celulares também foram sugeridos como sendo possivelmente expressos de maneira diferencial entre as populações transfectantes Pop-hRECK e Pop-pCXN2 (Tabela 4.1.4) e podem representar outros mecanismos de ação, além do controle de p21, pelos quais a proteína RECK pode ser capaz de modular a proliferação celular. A confirmação da modulação destes diferentes genes por RECK contribuirá para desvendar, em maiores detalhes, o mecanismo pelo qual a proteína RECK está influenciando a progressão do ciclo celular.

Todos os dados descritos na literatura até o momento caracterizam RECK como um inibidor de metaloproteinases de matriz, especificamente MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (Oh et al., 2001, Takahashi et al., 1998) e mostram seu envolvimento na progressão maligna de tumores humanos, correlacionando sua maior expressão com o melhor prognóstico de pacientes com diversos tipos de tumores, como

hepatocarcinomas, câncer de pulmão, de mama, de pâncreas e cólon (Furumoto et al., 2001, Masui et al., 2003, Span et al., 2003, Takenaka et al., 2004, Takeuchi et al., 2004). A modulação da expressão de RECK em células normais não havia sido abordada até o presente momento. Os dados obtidos neste trabalho mostraram, pela primeira vez, o envolvimento do gene *RECK* na progressão do ciclo celular em células normais. Durante o processo de divisão celular, a arquitetura celular é continuamente remodelada de forma a acomodar os diferentes processos que englobam o ciclo celular, como a formação do fuso mitótico (Johansen, 1996). Neste sentido, as enzimas remodeladoras da matriz (as MMPs) e seus inibidores (como o RECK) podem estar desempenhando funções bastante importantes. Além disso, diversos trabalhos sugerem que MMPs desempenham um papel essencial na clivagem e liberação de muitos fatores de crescimento e receptores da superfície celular, regulando a proliferação em diferentes tipos de células (Bergers et al., 2000, Levi et al., 1996, Manes et al., 1999). Assim, MMP-2 influencia a sinalização mediada por receptores da superfície celular pela liberação do domínio ativo do receptor 1 de FGF ("fibroblast grawth factor") (FGFR-1), modulando a atividade mitogênica e angiogênica de FGF (Bergers et al., 2000, Levi et al., 1996, Manes et al., 1999). MMP-9 é capaz de controlar a proliferação de células DU-145 (uma linhagem humana de adenocarcinoma de próstata independente de andrógeno) por modular o "loop" autócrino de IGF-I, atuando na proteólise da proteína ligante de IGF ("insulin growth fator" (IGF)-binding protein) (IGFBP-3) (Fowlkes et al., 1994, Manes et al., 1999).

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, que caracterizam RECK como um modulador do processo de progressão celular, fica evidente uma questão: será que a regulação da secreção e atividade de MMPs, mediada por RECK, poderia ser um dos mecanismos adicionais pelos quais este gene modula a progressão do ciclo celular ?. Pensando neste aspecto, em colaboração com a Profa. Silvya Stuch Maria-Engler (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo) foram realizados ensaios preliminares de zimografia utilizando as populações transfectantes Pop-hRECK e Pop-pCXN2 e a atividade das enzimas MMP-2 e MMP-9 foi avaliada (dados não mostrados nesta tese). Estes ensaios sugeriram não haver diferença na atividade das MMPs 2 e 9 entre as duas populações

transfectantes. É importante ressaltar que estes ensaios devem ser repetidos, mas os resultados preliminares sugerem que a linhagem Pop-hRECK tem a progressão do ciclo celular alterada por mecanismos adicionais que não envolvem a modulação da atividade das MMPs (especificamente MMP-2 e MMP-9).

Vale a pena ressaltar, neste momento, que devido ao grande número de genes sugeridos como sendo possivelmente regulados por RECK, incluídos em diferentes classes funcionais (ver Figura 4.1.4.1 e Tabela 4.1.4), nossos resultados ainda sugerem que RECK possa ser responsável pela modulação de outros processos celulares, além da progressão do ciclo celular.

## 5.3. Regulação da expressão de *RECK* mediada pelo oncogene c-*myc*

A partir dos experimentos que buscavam a caracterização do envolvimento do gene *RECK* na progressão do ciclo celular, foi verificado que quando os fibroblastos normais de camundongos, previamente carenciados para soro, foram estimulados com soro para a entrada das células no ciclo celular, a expressão endógena do gene *RECK* era inversamente correlacionada com a expressão do proto-oncogene c-*myc* (Figuras 4.1.1 e 4.1.2). Tem sido descrito que a expressão do gene *RECK* é regulada negativamente pelo produto de diversos oncogenes, entre os quais o próprio c-*myc* (Oh et al., 2001, Sasahara et al., 2002, Takahashi et al., 1998). Em uma segunda parte, este trabalho mostrou que a repressão da expressão do gene *RECK*, mediada pelo oncogene c-*myc*, ocorre através da alteração da atividade transcricional deste gene, uma vez que c-Myc atua, direta ou indiretamente, na porção promotora (de 4110pb) localizada imediatamente "upstream" em relação ao início da região codificante do gene *RECK* (Figura 4.2.1). Foi observado também um efeito dose-dependente da expressão de c-Myc na inibição da expressão do gene *RECK*.

Nossos resultados revelaram que o promotor de 4.110pb do gene *RECK* de camundongo contém elementos *cis*-ativos que medeiam a repressão transcricional promovida por c-Myc e que elementos contidos nas regiões de -52, -1679, -2004 e -4110pb do promotor do gene *RECK* são responsáveis por, respectivamente, 25, 35,

45 e 53%, da repressão da expressão do gene *RECK* mediada por c-*myc*, sugerindo que os elementos responsíveis à c-*myc* localizados no promotor de *RECK* estão distribuídos ao longo de toda a porção promotora de -4.110pb de *RECK* (Figura 4.2.1.1). Através de análises *in silico*, utilizando alguns programas computacionais específicos, como TFSearch e MatInspector (http://www.genome.od.jp e http://transfac.gbf-braunschwerg.de/TRANSFAC/), que buscam sítios putativos de ligação a diversos fatores de transcrição foi possível observar a mesma sugestão, já que sítios putativos canônicos responsivos a c-Myc encontram-se distribuídos ao longo da porção promotora de 4.110pb do gene *RECK* (dados não mostrados).

Dados da literatura mostram que os sítios de ligação aos fatores de transcrição da família Sp1/Sp3 localizados na região do chamado promotor mínimo do gene *RECK* de camundongo (-52 a +80pb) são importantes para a expressão deste gene em células de fibroblastos não-transformados e desenvolvem um papel chave na inibição da expressão do gene *RECK* mediado pelo oncogene *ras* (Sasahara et al., 1999a). Nossos resultados mostraram que a mutação em cada um dos sítios de ligação aos fatores de transcrição da família Sp1 inibe parcialmente a atividade da região promotora mínima de *RECK* e a mutação em ambos os sítios abole quase que completamente a sua atividade promotora basal (Figura 4.2.2.1). Estes dados corroboram as observações de Sasahara e colaboradores, que sugeriram que estes dois sítios cooperam entre si para proporcionar a atividade basal deste promotor mínimo. Nossos dados mostraram ainda que estes sítios de ligação aos fatores de transcrição da família Sp1 desempenham um papel importante durante a regulação negativa da expressão do gene *RECK* mediada pelo produto do proto-oncogene c-*myc*, pois as construções mutantes do promotor, que apresentam ou o sítio Sp1(A) ou o sítio Sp1(B) mutados, parecem perder a responsividade ao produto deste oncogene (Figura 4.2.2.1). A importância da integridade do sítio Sp1(B) já havia sido demonstrada anteriormente na responsividade deste promotor mínimo ao produto do oncogene *ras* (Sasahara et al., 1999a).

Sp1 é um fator de transcrição ubíquo e durante muito tempo foi aceito que este regulava apenas a transcrição basal de genes constitutivos. Atualmente, já está bem estabelecido o importante 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 Cys2-His2, os quais interagem com alta afinidade à seqüência consenso (G/A)(G/A)GGCG(G/T)(G/A)(G/A)(G/T) ou CG Box (GGGCGG) (Kadonaga et al., 1987) presente na região promotora de genes alvo.

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. Mesmo em promotores nos quais a seqüência TATA box não está presente, como é o caso do promotor do gene *RECK*, o complexo TFIID e os cofatores associados a TBP exercem papéis essenciais para sua ativação (Pugh & Tjian, 1991) e o mecanismo pelo qual Sp1 regula a transcrição parece ser o mesmo. Sp1 pode participar também na regulação da expressão gênica através da cooperação com outros fatores como E2 de papilomavírus (Li et al., 1991), Tat de HIV-1 (Chun et al., 1998, Huang & Jeang, 1993), NFκB p65 (Majello et al., 1994, Perkins et al., 1994), Rb (Udvadia et al., 1993), GATA-1 (Merika & Orkin, 1995), Egr-1 (Lin & Leonard, 1997), AP-1 (Noti et al., 1996, Tsuji et al., 1998), cEBPb (Lee et al., 1997b), 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 e diferenciação celular.

Há muitos anos as proteínas Myc têm sido reconhecidas como elementos importantes que participam de complexos protéicos que interagem com o DNA e modulam o processo de transcrição gênica. Esforços significativos têm sido adotados para a identificação de genes alvo de Myc com o intuito de se entender melhor as bases moleculares da ação deste proto-oncogene pelo fato da sua expressão desregulada ter conseqüências dramáticas no crescimento e no desenvolvimento de um organismo, assim como na gênese tumoral. A grande maioria dos alvos moleculares de Myc, identificados até o momento, são genes regulados positivamente por esta proteína. Muitos destes genes codificam para proteínas que estão associadas com a proliferação celular, como ornitina descarboxilase (*ODC*) (Wagner et al., 1993), *cdc25A* (Galaktionov et al., 1996), *p53* (Reisman et al., 1993) e *ciclina D2* (Bouchard et al., 2001). Alvos genéticos que são regulados negativamente por c-Myc incluem: *gadd45* (Marhin et al., 1997), *gas1* (Lee

et al., 1997a), *p15*$^{INK4b}$ (Warner et al., 1999) e o próprio inibidor de CDK: *p21*$^{Cip/Kip}$ (Claassen & Hann, 2000, Gartel et al., 2001).

A identificação de alvos moleculares reprimidos transcricionalmente por Myc é particularmente importante, desde que estudos da relação estrutura/função de Myc revelaram que na sua seqüência amino-terminal, a qual é essencial para a transformação celular mediada por este oncogene, estão localizados domínios críticos que medeiam a repressão transcricional (Brough et al., 1995, Facchini et al., 1997, Facchini & Penn, 1998, Li et al., 1994). Para o total entendimento das conseqüências fisiológicas da superexpressão de Myc, como no desenvolvimento do tumor, estudos sobre os produtos dos genes que são regulados negativamente por este oncogene, como é o caso do gene *RECK*, são muito relevantes e promissores.

O mecanismo pelo qual c-Myc é capaz de induzir a repressão transcricional de seus genes alvo ainda é bastante obscuro. Estudos recentes apoiam a idéia de que a repressão mediada por c-Myc resulta, não de uma interação direta com o DNA, mediada pelo heterodímero Myc/Max, mas da sua interação com outros fatores de transcrição, promovendo o bloqueio da atividade deste último (Gartel et al., 2001, Seoane et al., 2001, Staller et al., 2001). Recentemente, tem sido descrito que a regulação negativa, mediada por Myc, do inibidor de quinase dependente de ciclina *p21* parece envolver a interação de Myc com os fatores de transcrição da família Sp1, especificamente Sp1 e Sp3 (Gartel et al., 2001). De forma similar, Staller e colaboradores mostraram que Myc, juntamente com seu parceiro Max, interage com a proteína Myz-1, em regiões específicas dos promotores alvo (sequência Inr), e bloqueia a capacidade da mesma de induzir o inibidor de quinase dependente de ciclina *p15*$^{INK4B}$. A interação Myc/Max com Miz-1 parece bloquear a associação de Miz-1 com seu co-ativador, a proteína p300, que apresenta atividade de histona acetil transferase (HAT). Os trabalhos de Seone e colaboradores sustentam esta idéia pois mostram que o tratamento com TGF-β, o qual é conhecido por resultar na regulação negativa de Myc, libera Miz-1 do complexo inibitório, fazendo com que o complexo Miz-1/p300 possa ativar a transcrição de *p15*$^{INK4B}$ (através da interação com o elemento Inr deste promotor, além dos sítios de ligação a Sp1 e Smad), promovendo a parada do ciclo celular.

Além da interação com outros fatores de transcrição, a repressão transcricional mediada por c-Myc parece ser resultado do recrutamento de proteínas co-repressoras às regiões promotoras dos genes alvo. No caso do promotor de *p21*, um trabalho bastante recente descreveu a formação de um complexo ternário composto por Myc, Miz-1 e a proteína co-repressora Dnmt3a (que apresenta atividade DNA metiltransferase) na região promotora de *p21* (Brenner et al., 2005) que promove a repressão transcricional deste gene.

Recentemente, alguns trabalhos sugerem que o processo de metilação no DNA e o processo de modificação de histonas possam ser funcionalmente acoplados. Proteínas com atividade de DNA metil transferases (como a DNMT1) são capazes de recrutar moléculas com atividade de histona desacetilases (HDACs) para as regiões promotoras dos genes alvo, promovendo, além da metilação no DNA, a desacetilação de histonas, mantendo, desta forma, a cromatina em um estado repressivo (Ballestar & Esteller, 2002, Fuks et al., 2000).

Nossos resultados mostram que os sítios de ligação aos fatores de transcrição da família Sp1/Sp3, presentes no promotor do gene *RECK*, exercem um papel muito importante tanto para a atividade basal do promotor, como também durante a repressão transcricional mediada pelo oncogene c-Myc. A partir dos dados da literatura que sugerem que um dos possíveis mecanismos de repressão mediados por Myc envolve a sua interação com as proteínas Sp1, podendo ocorrer o recrutamento de moléculas remodeladoras da cromatina, decidimos analisar o envolvimento do mecanismo de desacetilação de histonas na repressão transcricional do gene *RECK* mediada por c-Myc.

Nossos resultados sugerem que a inibição da expressão do gene *RECK* mediada pelo produto do oncogene c-*myc* ocorre por um mecanismo que é dependente de remodelamento da estrutura da cromatina (Figura 4.2.3). Foi verificado um efeito dose dependente da concentração de tricostatina A (TSA), um inibidor de histona desacetilase, na repressão da expressão do gene *RECK*. Nossos resultados sugerem ainda que a expressão basal do gene *RECK* não é controlada por mecanismos remodeladores da cromatina, já que nenhuma regulação da expressão de *RECK* pode ser observada nas células controle pBPuro tratadas ou não com TSA (Figura 4.2.3). Estes resultados corroboram os dados obtidos anteriormente no

laboratório que mostram que o tratamento de células de fibroblasto de camundongo NIH-3T3 com TSA não altera o nível de transcrito do gene *RECK* (Sasahara et al., 2002).

Em conjunto, foi possível verificar que o produto do oncogene c-*myc* é capaz de reprimir a expressão do gene *RECK* por alterar sua atividade transcricional. Mecanismos de desacetilação de histonas, as quais promovem um remodelamento da estrutura da cromatina, parecem mediar esta repressão transcricional.

A correlação inversa entre a expressão dos genes *RECK* e c-*myc* pode ser importante para diversas funções fisiológicas, como para a progressão do ciclo celular. Myc tem sido relacionado com a ativação de complexos ciclinas/CDKs durante a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Muitos componentes dos complexos ciclinas/CDKs são alvos diretos de c-Myc, como o gene da *ciclina D2* (Bouchard et al., 1999, Bouchard et al., 2001). Porém, efeitos indiretos de c-Myc também contribuem para a ativação de ciclinas/CDKs e, conseqüentemente, para a progressão celular (Obaya et al., 2002). Nosso trabalho caracterizou o gene *RECK* como um novo alvo transcricional do oncogene c-Myc. Nossos resultados sugerem que RECK regula a progressão do ciclo celular por alterar a expressão de um inibidor de CDK (especificamente, do inibidor de CDK p21). A modulação da expressão de *RECK* pode representar um mecanismo indireto pelo qual c-Myc está promovendo a progressão do ciclo celular. Esta possibilidade é um ponto bastante interessante que deve ser alvo de trabalhos posteriores no laboratório e podem contribuir para definir, com maiores detalhes, como a proteína Myc influencia a transição G0/G1-S e é capaz de mediar diferentes processos como a progressão do ciclo celular.

A proteína Myc atua ainda em outros processos celulares, como o processo de progressão tumoral. O envolvimento do gene *RECK* na formação e progressão de diferentes tipos de tumores humanos tem sido abordado na literatura em diversos trabalhos e os dados sugerem RECK como um provável marcador prognóstico (Furumoto et al., 2001, Masui et al., 2003, Span et al., 2003, Takenaka et al., 2004, Takeuchi et al., 2004). Utilizando o modelo de tumores de cérebro, especificamente gliomas, foi analisada a expressão do gene *RECK* durante a

progressão tumoral e sua provável correlação inversa com a expressão do oncogene c-*myc*. Este tema será descrito em maiores detalhes no item a seguir.

## 5.4. Os genes *RECK*, c-*myc* e os tumores do Sistema Nervoso Central

A desregulação das proteínas Myc está fortemente associada com o desenvolvimento e a progressão de uma variedade de tumores humanos incluindo tumores de mama, de cólon, de pulmão, carcinomas cervicais, osteosarcomas e ainda leucemias mielóides (DePinho et al., 1991, Grandori et al., 2000, Marcu et al., 1992, Schmidt, 1999, Spencer & Groudine, 1991). Especificamente em gliomas, a superexpressão de c-Myc é correlacionada com o maior grau de malignidade deste tipo de tumor (Herms et al., 1999, Orian et al., 1992).

No presente trabalho, a expressão do oncogene c-*myc* foi avaliada em amostras teciduais de gliomas humanos com diferentes graus de malignidade. Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura e mostram que os tumores de graus mais elevados de progressão maligna apresentam níveis do transcrito correspondente ao gene c-*myc* significativamente maiores ($p<0,05$) em comparação com as amostras de cérebro normal (Figura 4.3.1). Culturas primárias derivadas de gliomas com diferentes graus de malignidade foram estabelecidas e avaliadas quanto ao nível de expressão do oncogene c-*myc*. Os resultados obtidos para as culturas primárias seguem a mesma tendência com os apresentados anteriormente para as amostras teciduais e mostram que o oncogene c-*myc* está superexpresso no grau mais maligno da progressão deste tipo de tumor, em glioblastoma multiforme (GBM) (dados não mostrados). É importante ressaltar que estas culturas primárias foram previamente caracterizadas de forma a garantir que as células estabelecidas em cultura são derivadas do tumor, ou pelo menos derivadas da sua célula precursora, o astrócito (Figura 4.3.2.1).

Além da superexpressão do oncogene c-*myc*, a progressão de gliomas humanos está fortemente associada com a maior expressão e atividade de MMPs (Belien et al., 1999, Lampert et al., 1998). Diversos trabalhos têm demonstrado que a degradação da matriz extracelular (ECM), particularmente da membrana basal, é

um passo essencial para a invasão tumoral e o processo de metástase (Liotta et al., 1980), sendo que as MMPs desempenham um papel importante neste processo de remodelamento (Liotta & Stetler-Stevenson, 1990, Stetler-Stevenson et al., 1993a, Stetler-Stevenson et al., 1993b). Em gliomas, já é bastante reconhecido que as MMPs desempenham um papel importante para a invasão tumoral (Chintala et al., 1999). As MMPs são secretadas pelas células do tumor e/ou pelas células do estroma adjacente em uma forma latente (zimogênio), sendo convertida para a forma enzimática ativa através de clivagens proteolíticas (Sato et al., 1992). Tem sido descrito que MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9 são expressas em níveis elevados em GBM, em comparação com cérebro normal, sugerindo o envolvimento destas proteases na progressão maligna deste tipo de tumor (Belien et al., 1999, Forsyth et al., 1998, Lampert et al., 1998, Yong et al., 1998).

Todos os trabalhos descritos na literatura até o momento têm caracterizado o gene *RECK* como um importante modulador da atividade de MMPs. Especificamente, RECK estaria inibindo a secreção e atividade da pró-MMP-9, inibindo a atividade da MT1-MMP e ainda atuando na inibição da atividade e do processamento proteolítico da MMP-2, inibindo a formação da MMP-2 ativa (ver Figura 1.2.2) (Oh et al., 2001, Sasahara et al., 2002, Takahashi et al., 1998).

Para avaliar o envolvimento do gene *RECK* na progressão maligna de gliomas humanos, os níveis do transcrito correspondente ao gene *RECK* foram avaliados nas amostras teciduais de pacientes que apresentavam tumores com diferentes graus de malignidade (segundo classificação da WHO) em comparação com amostras derivadas de tecido cerebral livres de tumor. Foi verificado que os níveis deste transcrito não sofrem alteração significativa durante a progressão maligna de gliomas humanos em comparação com as amostras normais (Figura 4.3.2). Os dados obtidos com as culturas primárias derivadas de amostras de diferentes tumores com graus variados de progressão maligna (Figura 4.3.2.2) em comparação com culturas primárias derivadas de tecido cerebral nomal seguem a mesma tendência para as amostras teciduais citadas anteriormente e sugerem não haver diferença significativa na expressão de *RECK* durante a progressão tumoral.

Considerando as formas mais agressivas de gliomas humanos, especificamente os tumores de Grau III e GBM, foi possível separar nosso grupo de

pacientes em dois subgrupos considerando o tempo de sobrevida manifestado em cada caso. A sobrevida de 12 meses foi utilizada como tempo limite para delimitar os dois subgrupos. Os mecanismos moleculares responsáveis pelas diferenças no tempo de sobrevida dos pacientes com gliomas ainda são bastante obscuros e diversos trabalhos têm sido descritos na literatura de forma a encontrar marcadores moleculares que possam ser utilizados no prognóstico destes pacientes, como o próprio gene c-*myc* (Herms et al., 1999).

A análise da expressão de *RECK* em pacientes com graus mais avançados da doença em comparação com o tempo de sobrevida apresentado pelos mesmos indicou que os pacientes que tiveram um tempo de sobrevida maior que 12 meses apresentaram tumores com uma expressão significativamente maior do gene *RECK* ($p<0,05$) (Figura 4.3.3).

Nossos resultados sugerem que a maior expressão do gene *RECK* pode ser considerada um indicativo de melhor prognóstico para pacientes que apresentam gliomas de graus mais agressivos. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura que mostram que o gene *RECK* é expresso em alguns tipos de tumores humanos, como hepatocarcinomas, tumor de pulmão NSCLC ("non-small cell lung cancer"), carcinomas de mama, coloretal e de pâncreas ductal, e sugerem que uma expressão elevada de RECK no tumor promove um prognóstico mais favorável para os pacientes, promovendo um maior tempo de sobrevida (Furumoto et al., 2001, Masui et al., 2003, Takenaka et al., 2004), maior tempo livre de recorrência da doença (Span et al., 2003, Takeuchi et al., 2004), menor invasividade do tumor (Masui et al., 2003) e diminuição da angiogênese tumoral (Takenaka et al., 2004, Takeuchi et al., 2004).

Considerando RECK como um importante modulador da atividade de MMPs e sabendo que a ativação de MMPs tem sido implicada no processo de progressão de gliomas (Chintala et al., 1999, Rao, 2003), pode-se sugerir que uma menor atividade de MMPs, mediado pelo aumento da expressão de RECK, pode estar promovendo um menor potencial invasivo para aquelas células de tumor que mantém a expressão de RECK elevada. Estes resultados são consistentes com as observações *in vitro* feitas por Takahashi de que células de melanoma ou fibrosarcoma (HT1080) transfectadas com RECK mostraram capacidade reduzida

de invasão (Takahashi et al., 1998). Mais recentemente, em experimentos utilizando camundongos "nude" foi possível verificar que os animais que apresentavam tumores gerados a partir das células tumorais HT1080 que expressavam RECK apresentaram um tempo de sobrevida maior em relação àqueles que desenvolveram o tumor controle (sem RECK), consistente com os dados apresentados no presente trabalho. No entanto, neste modelo experimental, os processos de invasão e metástase são raramente evidenciados, mesmo nos animais controle, sugerindo que a diminuição da mortalidade mediada por RECK não pode ser explicada somente pela inibição da invasão e metástase. Análises histológicas dos tumores formados levaram a observação de que o espraiamento dos vasos sanguíneos no tumor que expressava RECK foi severamente diminuído, em relação ao tumor controle (sem RECK) (Noda et al., 2003, Oh et al., 2001).

Por razões ainda desconhecidas, o tumor que expressa RECK apresenta vasos sanguíneos com diâmetro muito maior, contudo o espraiamento dos vasos é drasticamente inibido. Deste modo, as células tumorais que rodeiam os vasos sanguíneos sobrevivem, no entanto as células do tumor em expansão, em compartimentos livres de vasos sanguíneos, acabam morrendo. Deste modo, a supressão da angiogênese tumoral pode também ser uma das explicações do melhor prognóstico para pacientes que apresentam tumores com expressão elevada de RECK.

De forma interessante, diante das evidências experimentais geradas a partir dos ensaios *in vivo*, é possível sugerir que a proteína RECK é necessária para o processo de angiogênese durante o desenvolvimento embrionário, mas, por outro lado, RECK previne o processo de angiogênese tumoral. Assumindo que a angiogênese embrionária e angiogênese patológica apresentam bases moleculares comuns, pode-se propôr que o local, o tempo e o nível de expressão de RECK devam ser cuidadosamente controlados, e que o equilíbrio entre os níveis de expressão de RECK *versus* a atividade de MMPs (assim como de seus outros prováveis genes alvo) possa ser importante para os diferentes processos celulares.

Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de analisar a expressão de um outro grupo de inibidores endógenos de MMPs, especificamente as TIMPs, na progressão de gliomas. Ao contrário do observado para RECK, muitos destes

trabalhos mostram que a superexpressão do gene de TIMP-1 está associada com a superexpressão de MMP-2 e MMP-9, durante a progressão maligna dos gliomas (Forsyth et al., 1998, Lampert et al., 1998). Uma diferença crítica entre RECK e TIMPs é a localização celular de ambos. RECK é uma proteína ancorada à membrana (Takahashi et al., 1998), enquanto que as TIMPs são proteínas secretadas. O ancoramento à membrana permite que RECK esteja concentrado na membrana plasmática e efetivamente regule os eventos proteolíticos locais na superfície celular, onde o processamento proteolítico de MMPs ocorre (Werb, 1997). A análise da expressão de RECK em uma variedade de tumores será importante para o total entendimento do papel de RECK na formação e na progressão tumoral.

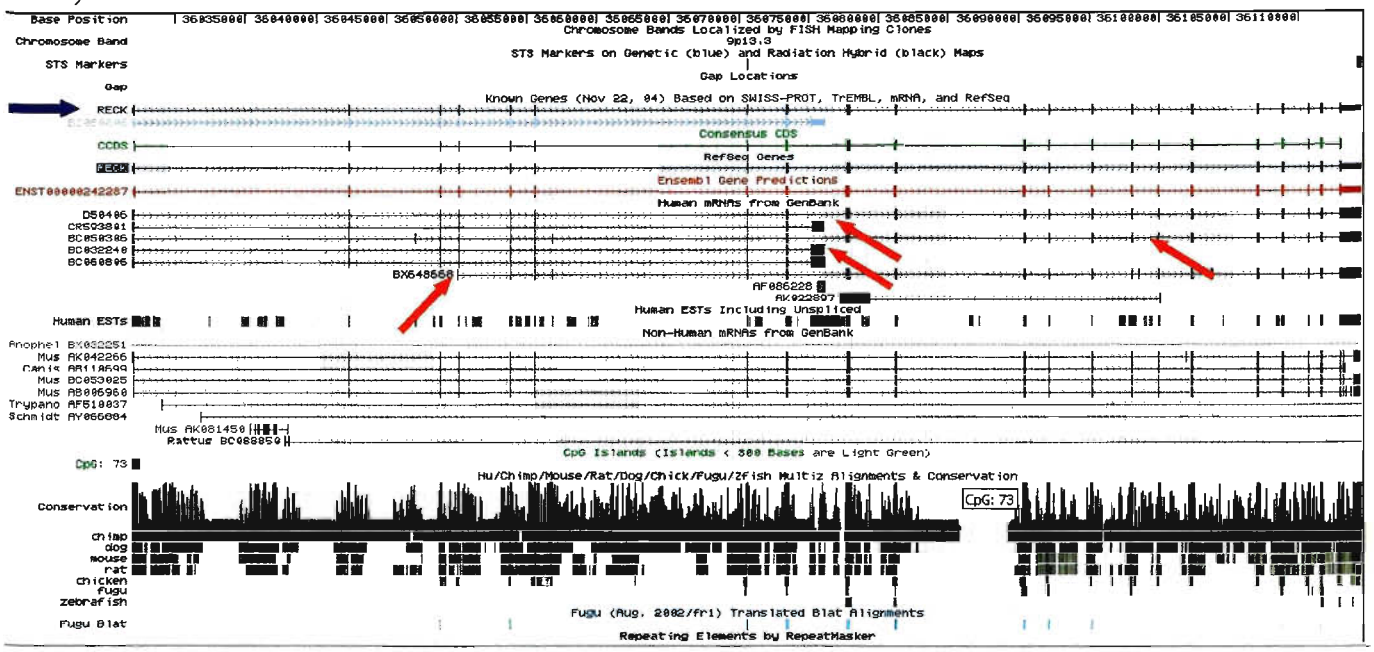
De forma interessante, os ensaios preliminares de imunohistoquímica em amostras teciduais de pacientes com tumores de diferentes graus de malignidade sugeriram que a proteína RECK não é detectada (ou foi fracamente detectada) em gliomas de alto grau, especificamente em glioblastoma multiforme, em comparação com tecido normal ou com amostras de tumor de graus mais baixos, consistente com o fenótipo altamente invasivo deste tipo de tumor (Figura 4.3.4). É importante considerar que estes resultados levam em consideração apenas um pequeno número de pacientes. O aumento no número de pacientes permitirá a análise estatística dos dados, confirmando (ou não) estes resultados preliminares. Mas, de maneira preliminar, estes resultados sugerem que a expressão de RECK esteja sendo modulada durante a progressão maligna de gliomas por um mecanismo pós-transcricional, já que os níveis protéicos de RECK foram progressivamente diminuídos ao longo da progressão tumoral de gliomas, o que não foi observado para os níveis do transcrito.

A diferença observada nos níveis de transcritos de *RECK* durante a progressão de gliomas (Figura 4.3.2) em comparação com os níveis da proteína (Figura 4.3.4) nos levaram a uma análise mais criteriosa dos dados obtidos nestes experimentos.

O alinhamento da seqüência correspondente ao transcrito de *RECK* no genoma humano, utilizando a interface gráfica do genoma humano da Universidade da Califórnia em Santa Cruz (BLAT, http://www.genome.ucsc.edu), permitiu a

observação da presença de pelo menos mais quatro seqüências de mRNA depositadas no GenBank que correspondem a transcritos alternativos de *RECK*. Além disso, diversas ESTs depositadas no mesmo banco de dados sugerem uma diversidade ainda maior de possíveis transcritos alternativos codificados pelo locus de *RECK* humano. Este alinhamento pode ser visualizado na Figura 5.4.1.

A)




B)

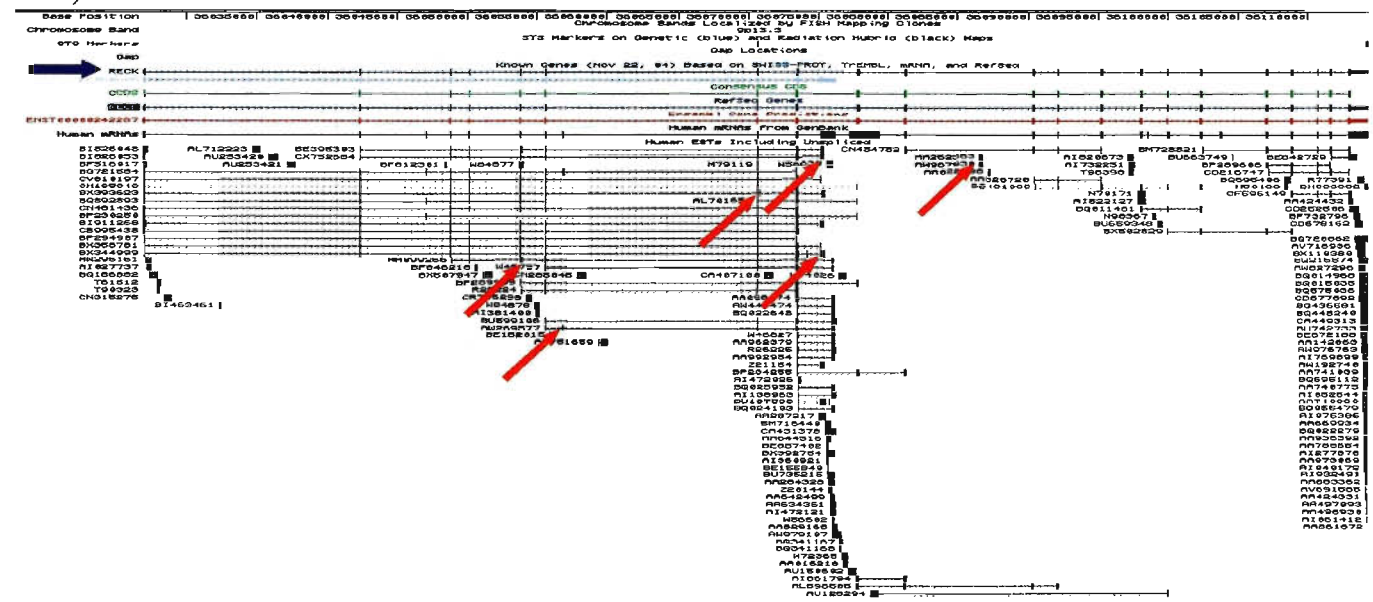


**Figura 5.4.1.** Alinhamento da seqüência correspondente ao transcrito de *RECK* no genoma humano. Foi utilizando a interface gráfica do genoma humano da Universidade da Califórnia em Santa Cruz. As setas azuis indicam o transcrito canônico de *RECK*, enquanto que as setas vermelhas indicam os transcritos alternativos de *RECK* (A) e as diversas ESTs identificadas (B).

Os "primers" utilizados nos experimentos de PCR em tempo real foram desenhados para uma região inicial do mRNA de *RECK* canônico, correspondente ao primeiro transcrito de *RECK* originalmente descrito por Takahashi et al., (Takahashi et al., 1998), e que corresponde a uma região que é comum a vários dos transcritos alternativos descritos até o momento.

A análise da expressão relativa de alguns destes transcritos alternativos pelo recurso de Northern virtual do banco de SAGE do NCBI (agência dos EUA que centraliza as informações contidas no GenBank, site http://www.ncbi.nlm.nih.gov) revelou que alguns deles parecem ter uma expressão inversa em relação a tecidos normais e tumorais (dados não mostrados nesta tese). Estas observações sugerem que talvez os dados obtidos a partir dos experimentos de PCR em tempo real estejam mostrando um resultado que corresponde à quantificação de um "pool" de vários transcritos alternativos de *RECK* e não somente a expressão do transcrito canônico. Talvez por este motivo não tenha sido verificada nenhuma modulação no nível deste transcrito durante a progressão maligna de gliomas.

Por outro lado, nos experimentos de imunohistoquímica foi utilizado um anticorpo monoclonal que reconhece a porção C-terminal da proteína RECK humana, e portanto proteínas alternativas de RECK, que estejam sendo codificadas por alguns dos prováveis transcritos alternativos, podem estar sendo eliminadas desta marcação.

É possível que estes transcritos alternativos de *RECK* não estejam representados em tecido cerebral e que os resultados apresentados neste trabalho correspondam apenas a expressão do transcrito canônico de *RECK*, porém diante da possibilidade da existência dos mesmos, novas análises devem ser realizadas utilizando novos pares de "primers" que possam discriminar os diferentes transcritos alternativos para que os resultados sejam efetivamente confirmados. A elucidação da estrutura e do perfil de expressão destes novos produtos gênicos alternativos do lócus de *RECK*, assim como a análise funcional dos mesmos, permanece como uma alternativa interessante para estudos futuros visando entender melhor o papel deste gene em diferentes processos, tanto fisiológicos como patológicos.

## 5.5. RECK pode ser um modulador da expressão de genes envolvidos na progressão maligna de gliomas

Nos últimos anos, o nosso laboratório vem trabalhando no sentido de desvendar alvos moleculares importantes que promovam a reversão do fenótipo maligno de células de glioma (especificamente células derivadas de C6 de glioma de rato) quando as mesmas são tratadas com diferentes agentes anti-tumorais, especificamente ácido retinóico e hormônio glicocorticóide (Valentini & Armelin, 1996, Vedoy & Sogayar, 2002). Mais recentemente, nosso grupo tem trabalhado na identificação de genes diferencialmente expressos durante a progressão maligna de gliomas humanos (Oba-Shinjo et al., submetido à publicação).

Dois trabalhos recentes que estão submetidos à publicação neste momento (Bengtson et al., & Oba-Shinjo et al.) caracterizam o envolvimento de alguns genes, não descritos anteriormente, tanto na reversão fenotípica tumoral-normal induzida pelo agente anti-tumoral ácido retinóico como, também, durante a progressão maligna de gliomas humanos.

De forma interessante, pelo menos três dos genes isolados nestes trabalhos foram sugeridos também, através dos experimentos de hibridização molecular utilizando lâminas comerciais do Sistema CodeLink (GE-Healthcare), no presente trabalho como sendo possivelmente regulados por RECK (Tabela 4.1.4).

O primeiro é o gene GEM, que foi isolado por induzir a reversão fenotípica de uma linhagem de glioma de rato quando a mesma é submetida ao tratamento com o agente anti-tumoral: ácido retinóico. Este gene faz parte da superfamília de proteínas GTPásicas monoméricas semelhantes a Ras (Bourne et al., 1991, Finlin & Andres, 1997, Finlin et al., 2000). GEM foi clonado inicialmente como sendo um dos genes induzidos por ativação mitogênica de células T (Zipfel et al., 1989). Em um estudo posterior, o efeito da superexpressão desta GTPase no crescimento celular foi analisado em células 3T3 (Maguire et al., 1994) e evidencia uma intensa redução no número de clones selecionados na transfecção de GEM em relação ao vetor vazio, o que sugere que este gene pode estar envolvido no crescimento celular. A superexpressão desta proteína em neuroblastoma é capaz de promover o

achatamento celular e a extensão de neuritos, o que sugere que ela possa estar envolvida na diferenciação morfológica e/ou reorganização do citoesqueleto (Leone et al., 2001).

Nossos dados sugerem que RECK possa estar induzindo a expressão de GEM em aproximadamente 1,8 vezes (Tabela 4.1.4). Desta forma, a possível regulação de GEM mediada por RECK pode ser um mecanismo importante que esteja modulando o fenômeno de reversão fenotípica das células de gliomas quando tratadas com o agente anti tumoral ácido retinóico e pode representar uma via importante de modulação de crescimento celular não apenas em fibroblastos normais, mas também em células de glioma.

Os outros dois genes sugeridos como possivelmente regulados por RECK são: DSCAM e LMO1. Estes genes foram isolados por serem diferencialmente expressos durante a progressão maligna de gliomas humanos. O papel desempenhado por estes genes durante a formação de tumores humanos, e sobretudo durante o desenvolvimento e formação de tumores no sistema nervoso central, ainda é bastante obscuro. De forma geral, DSCAM foi isolado como uma nova classe de moléculas de adesão de células neuronais, altamente expressa durante o desenvolvimento do sistema nervoso, e proposta como sendo responsável, pelo menos em parte, pelo fenótipo de retardo mental em pacientes com Síndrome de Down, uma vez que seu gene é localizado no cromossomo 21 humano (Yamakawa et al., 1998). DSCAM codifica para uma molécula de superfície celular da superfamília das imunoglobulinas, importante para o direcionamento do axônio (Schmucker et al., 2000). As proteínas da superfamília das imunoglobulinas desempenham um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso, por mediarem as interações células-substrato independentes de cálcio.

LMO1 ("LIM-only proteins"), por sua vez, faz parte de uma família de genes que apresentam o domínio LIM (Foroni et al., 1992, Sanchez-Garcia & Rabbitts, 1994). Este domínio é um motivo conservado de ligação a zinco, rico em cisteínas, que caracteriza várias proteínas com funções de interação proteína-proteína e reguladores transcricionais (Rabbitts & Boehm, 1990). Camundongos transgênicos que expressam o gene bacteriano lacZ (que codifica para a β-galactosidase) sob o controle do promotor do gene LMO1 demonstraram atividade de β-galactosidase

m várias regiões do sistema nervoso central (Greenberg et al., 1990). Além disso, oi demonstrada a expressão diferencial desta proteína tanto no desenvolvimento do istema nervoso central (Foroni et al., 1992, Shawlot & Behringer, 1995) como ımbém em regiões do cérebro de camundongos adultos (Hinks et al., 1997). Apesar o fato dos domínios LIM apresentarem estruturas do tipo dedos de zinco, similares os dedos GATA de interação com o DNA (Perez-Alvarado et al., 1994), não existe enhuma evidência até o momento de que as proteínas com domínios LIM ıterajam diretamente com o DNA. Contudo, diversos estudos sugerem que roteínas com domínios LIM estejam envolvidas na regulação do desenvolvimento, iferenciação celular e organização do citoesqueleto (Arber & Caroni, 1996, chmeichel & Beckerle, 1994).

A possibilidade de RECK estar modulando diferentes genes envolvidos na ɔrmação e na progressão de gliomas é bastante estimulante, mas vale a pena ımbrar que estes genes (GEM, DSCAM e LMO1) foram sugeridos como ossivelmente regulados por RECK em células de fibroblastos normais, que foram atadas sob condições específicas (de estímulo com soro por 3h). Talvez em um utro ambiente celular, como no caso do sistema nervoso central e, mais ainda, urante a formação e a progressão tumoral (onde os controles de uma célula normal ue direcionam proliferação, inibição de crescimento por contato, dependência de ıtores de crescimento para a proliferação, entre outros foram possivelmente erdidos) a ação de RECK não seja determinante para a regulação destes genes. A ıálise destas sugestões, em experimentos futuros, contribuirá para a elucidação do ıpel de RECK na formação e na progressão tumoral, mais especificamente em iomas humanos.

## 6. Considerações Finais

Este trabalho mostrou, pela primeira vez, que a inibição da expressão de RECK pode ser um passo importante para que a progressão do ciclo celular aconteça de forma adequada. O gene *RECK* altera a progressão do ciclo celular em células de fibroblasto de camundongo normais, agindo durante a transição G0/G1-S, por atuar, pelo menos em parte, na regulação da expressão da proteína p21, e, conseqüentemente, no controle da fosforilação da proteína pRb. Por alterar os níveis de fosforilação de pRb, é possível sugerir, ainda, que a proteína RECK esteja atuando especificamente durante a fase G1 do ciclo celular.

Diversos outros genes envolvidos em diferentes processos celulares também foram sugeridos como sendo possivelmente regulados por RECK e podem representar outros mecanismos de ação, além do controle de p21, pelo qual a proteína RECK esta sendo capaz de modular a proliferação celular. A confirmação da modulação destes diferentes genes mediada por RECK contribuirá para desvendar com maiores detalhes o mecanismo pelo qual a proteína RECK está influenciando a progressão do ciclo celular.

A expressão endógena do gene *RECK* foi inversamente correlacionada com a expressão do proto-oncogene c-*myc* durante a progressão do ciclo celular. Em uma segunda parte, este trabalho mostrou que a repressão da expressão do gene *RECK*, mediada pelo oncogene c-*myc*, ocorre por alterar a atividade transcricional deste gene, e sugere que os elementos responsíveis a c-*myc* no promotor de *RECK* estão distribuídos ao longo de toda a porção promotora de - 4.110pb de *RECK*.

Nossos dados mostram ainda que sítios de ligação aos fatores de transcrição da família Sp1/Sp3, presentes na porção de -52 a +80pb do promotor do gene *RECK*, desempenham um papel essencial para a regulação negativa deste gene mediada pelo produto do proto-oncogene c-*myc*.

Nossos dados sugerem, que a inibição da expressão do gene *RECK* mediada pelo produto do oncogene c-*myc* ocorre por um mecanismo que é dependente de remodelamento da estrutura da cromatina.

A correlação inversa entre a expressão dos genes *RECK* e c-*myc* pode ser importante para diversas funções fisiológicas, como para a progressão do ciclo

celular e o processo de tumorigênese. A modulação da expressão de RECK pode representar um mecanismo indireto pelo qual c-Myc está promovendo a progressão do ciclo celular e esta caracterização pode contribuir para definir, com maiores detalhes, como a proteína Myc influencia a transição G0/G1-S.

A proteína Myc atua ainda em outros processos celulares, como o processo de progressão tumoral. Utilizando o modelo de tumores de cérebro, especificamente gliomas, foi analisada a expressão do gene *RECK* e c-*myc* durante o processo de progressão tumoral.

Nossos resultados mostraram que amostras teciduais dos graus mais elevados de progressão maligna de gliomas apresentam níveis de expressão de c-*myc* significativamente maiores em comparação com as amostras teciduais derivadas de tumores com graus mais baixos e amostras teciduais de cérebro livre de tumor. Em paralelo, foi verificado que os níveis de transcrito correspondentes ao gene *RECK* não são alterados significativamente durante a progressão maligna de gliomas, em comparação com as amostras teciduais normais. A análise da expressão dos genes *RECK* e c-*myc* em culturas primárias derivadas de tumores com diferentes graus de malignidade, assim como em culturas primárias derivadas de tecido cerebral normal, corroboram os resultados apresentados para as amostras teciduais.

A análise da expressão de *RECK* em tumores derivados de pacientes com graus mais avançados da doença em comparação com o tempo de sobrevida apresentado pelos mesmos indicou que os pacientes que tiveram um maior tempo de sobrevida (mais que 12 meses) apresentaram tumores com uma significativa maior expressão do gene *RECK*. Nossos resultados sugerem que a maior expressão do gene *RECK* pode ser considerada como um indicativo de melhor prognóstico para pacientes que apresentam os graus mais agressivos de gliomas. A análise da expressão de *RECK* em uma variedade de tumores será importante para o total entendimento do papel de RECK na formação e progressão do tumor.

De forma interessante, os ensaios preliminares de imunohistoquímica em amostras teciduais de pacientes com tumores de diferentes graus de malignidade sugeriram que a proteína RECK não é detectada (ou foi fracamente detectada) em gliomas de alto grau, especificamente em glioblastoma multiforme, em comparação com tecido cerebral livre de tumor ou com amostras derivadas de tumores com

graus mais baixos, consistente com o fenótipo altamente invasivo deste tipo de tumor. De maneira preliminar, estes resultados sugerem que RECK esteja sendo modulado durante a progressão maligna de gliomas por um mecanismo pós-transcricional, já que a proteína RECK foi progressivamente diminuída ao longo da progressão tumoral de gliomas, o que não foi observado para os níveis do transcrito.

Este trabalho mostra o envolvimento do gene *RECK* em diferentes processos celulares, como a proliferação celular e o processo de tumorigênese. A compreensão dos mecanismos moleculares que controlam a expressão de RECK, assim como seus alvos de ação, podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos que controlam a progressão do ciclo celular normal e também para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de tumores humanos.

# 7. Bibliografia


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

Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L & Wrana JL (1997). TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. J Biol Chem 272: 27678-27685.

Amati B, Dalton S, Brooks MW, Littlewood TD, Evan GI & Land H (1992). Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. Nature 359: 423-426.

Amati B, Alevizopoulos K & Vlach J (1998). Myc and the cell cycle. Front Biosci 3: d250-268.

Apodaca G, Rutka JT, Bouhana K, Berens ME, Giblin JR, Rosenblum ML, McKerrow JH & Banda MJ (1990). Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors by fetal astrocytes and glioma cells. Cancer Res 50: 2322-2329.

Arber S & Caroni P (1996). Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. Genes Dev 10: 289-300.

Armelin HA, Armelin MC, Kelly K, Stewart T, Leder P, Cochran BH & Stiles CD (1984). Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. Nature 310: 655-660.

Armstrong SA, Barry DA, Leggett RW & Mueller CR (1997). Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. J Biol Chem 272: 13489-13495.

Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH & Fawcett JW (2000). Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. J Neurosci 20: 2427-2438.

Austen M, Cerni C, Luscher-Firzlaff JM & Luscher B (1998). YY1 can inhibit c-Myc function through a mechanism requiring DNA binding of YY1 but neither its transactivation domain nor direct interaction with c-Myc. Oncogene 17: 511-520.

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

Ayer DE, Kretzner L & Eisenman RN (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. Cell 72: 211-222.

Ballestar E & Esteller M (2002). The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. Carcinogenesis 23: 1103-1109.

Battey J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H, Lenoir G & Leder P (1983). The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. Cell 34: 779-787.

Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF & Delattre JY (2003). Primary brain tumours in adults. Lancet 361: 323-331.

Beijersbergen RL, Hijmans EM, Zhu L & Bernards R (1994). Interaction of c-Myc with the pRb-related protein p107 results in inhibition of c-Myc-mediated transactivation. Embo J 13: 4080-4086.

Bein K & Simons M (2000). Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. J Biol Chem 275: 32167-32173.

Belien AT, Paganetti PA & Schwab ME (1999). Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. J Cell Biol 144: 373-384.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z & Hanahan D (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat Cell Biol 2: 737-744.

Berns K, Hijmans EM & Bernards R (1997). Repression of c-Myc responsive genes in cycling cells causes G1 arrest through reduction of cyclin E/CDK2 kinase activity. Oncogene 15: 1347-1356.

Bignami A & Asher R (1992). Some observations on the localization of hyaluronic acid in adult, newborn and embryonal rat brain. Int J Dev Neurosci 10: 45-57.

Billin AN, Eilers AL, Queva C & Ayer DE (1999). Mlx, a novel Max-like BHLHZip protein that interacts with the Max network of transcription factors. J Biol Chem 274: 36344-36350.

Billin AN, Eilers AL, Coulter KL, Logan JS & Ayer DE (2000). MondoA, a novel basic helix-loop-helix-leucine zipper transcriptional activator that constitutes a positive branch of a max-like network. Mol Cell Biol 20: 8845-8854.

Blackwell TK, Huang J, Ma A, Kretzner L, Alt FW, Eisenman RN & Weintraub H (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. Mol Cell Biol 13: 5216-5224.

Blackwood EM & Eisenman RN (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. Science 251: 1211-1217.

Blackwood EM, Kretzner L & Eisenman RN (1992). Myc and Max function as a nucleoprotein complex. Curr Opin Genet Dev 2: 227-235.

Bode W, Reinemer P, Huber R, Kleine T, Schnierer S & Tschesche H (1994). The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. Embo J 13: 1263-1269.

Bosman FT & Stamenkovic I (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. J Pathol 200: 423-428.

Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J & Eilers M (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. Embo J 18: 5321-5333.

Bouchard C, Dittrich O, Kiermaier A, Dohmann K, Menkel A, Eilers M & Luscher B (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. Genes Dev 15: 2042-2047.

Bourne HR, Sanders DA & McCormick F (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. Nature 349: 117-127.

Brand K (2002). Cancer gene therapy with tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Curr Gene Ther 2: 255-271.

Brenner C, Deplus R, Didelot C, Loriot A, Vire E, De Smet C, Gutierrez A, Danovi D, Bernard D, Boon T, Pelicci PG, Amati B, Kouzarides T, de Launoit Y, Di Croce L & Fuks F (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. Embo J 24: 336-346.

Brough DE, Hofmann TJ, Ellwood KB, Townley RA & Cole MD (1995). An essential domain of the c-myc protein interacts with a nuclear factor that is also required for E1A-mediated transformation. Mol Cell Biol 15: 1536-1544.

Brown CE, Lechner T, Howe L & Workman JL (2000). The many HATs of transcription coactivators. Trends Biochem Sci 25: 15-19.

Buj-Bello A, Adu J, Pinon LG, Horton A, Thompson J, Rosenthal A, Chinchetru M, Buchman VL & Davies AM (1997). Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. Nature 387: 721-724.

Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, van Westrum SS, Crabbe T, Clements J, d'Ortho MP & Murphy G (1998). The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. J Biol Chem 273: 871-880.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Cairo S, Merla G, Urbinati F, Ballabio A & Reymond A (2001). WBSCR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. Hum Mol Genet 10: 617-627.

Carvalho HRP, SM (2001).Matriz Extracelular. In A Célula, pp. 217-234. Edited by E. M. Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

Chan HM & La Thangue NB (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. J Cell Sci 114: 2363-2373.

Chattopadhyay P, Banerjee M, Sarkar C, Mathur M, Mohapatra AK & Sinha S (1995). Infrequent alteration of the c-myc gene in human glial tumours associated with increased numbers of c-myc positive cells. Oncogene 11: 2711-2714.

Chen CR, Kang Y & Massague J (2001). Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 992-999.

Chintala SK, Sawaya R, Aggarwal BB, Majumder S, Giri DK, Kyritsis AP, Gokaslan ZL & Rao JS (1998). Induction of matrix metalloproteinase-9 requires a polymerized actin cytoskeleton in human malignant glioma cells. J Biol Chem 273: 13545-13551.

Chintala SK, Tonn JC & Rao JS (1999). Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. Int J Dev Neurosci 17: 495-502.

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ & Rutter WJ (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18: 5294-5299.

Chun RF, Semmes OJ, Neuveut C & Jeang KT (1998). Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat. J Virol 72: 2615-2629.

Claassen GF & Hann SR (2000). A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 9498-9503.

Coles JA & Abbott NJ (1996). Signalling from neurones to glial cells in invertebrates. Trends Neurosci 19: 358-362.

Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN & Golub TR (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 3260-3265.

Conzen SD, Gottlob K, Kandel ES, Khanduri P, Wagner AJ, O'Leary M & Hay N (2000). Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc: transrepression correlates with acceleration of apoptosis. Mol Cell Biol 20: 6008-6018.

Costanzi E, Rameh LE, Joazeiro CA & Armelin MC (1990). Generation of cell lines to study the role played by oncogenes and anti-oncogenes in cell proliferation control. Braz J Med Biol Res 23: 795-799.

Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D & Werb Z (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. Cell 103: 481-490.

Coussens LM, Fingleton B & Matrisian LM (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science 295: 2387-2392.

Dang CV (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. Mol Cell Biol 19: 1-11.

Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y & Wang XF (1995a). Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 5545-5549.

Datto MB, Yu Y & Wang XF (1995b). Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. J Biol Chem 270: 28623-28628.

Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Neal D, Thomas D, Hanby A & Balkwill F (1993). Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. Cancer Res 53: 5365-5369.

Davis AC, Wims M, Spotts GD, Hann SR & Bradley A (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. Genes Dev 7: 671-682.

DePinho RA, Schreiber-Agus N & Alt FW (1991). myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. Adv Cancer Res 57: 1-46.

Derynck R, Akhurst RJ & Balmain A (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. Nat Genet 29: 117-129.

Deryugina EI, Bourdon MA, Luo GX, Reisfeld RA & Strongin A (1997). Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. J Cell Sci 110 ( Pt 19): 2473-2482.

Deryugina EI, Bourdon MA, Reisfeld RA & Strongin A (1998). Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. Cancer Res 58: 3743-3750.

Edelhoff S, Ayer DE, Zervos AS, Steingrimsson E, Jenkins NA, Copeland NG, Eisenman RN, Brent R & Disteche CM (1994). Mapping of two genes encoding members of a distinct subfamily of MAX interacting proteins: MAD to human chromosome 2 and mouse chromosome 6, and MXI1 to human chromosome 10 and mouse chromosome 19. Oncogene 9: 665-668.

Eisenberg I, Hochner H, Sadeh M, Argov Z & Mitrani-Rosenbaum S (2002). Establishment of the genomic structure and identification of thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human RECK gene. Cytogenet Genome Res 97: 58-61.

Elliott K, Sakamuro D, Basu A, Du W, Wunner W, Staller P, Gaubatz S, Zhang H, Prochownik E, Eilers M & Prendergast GC (1999). Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. Oncogene 18: 3564-3573.

Facchini LM, Chen S, Marhin WW, Lear JN & Penn LZ (1997). The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter. Mol Cell Biol 17: 100-114.

Facchini LM & Penn LZ (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. Faseb J 12: 633-651.

Feinberg AP & Vogelstein B (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. Anal Biochem 137: 266-267.

Feng XH, Lin X & Derynck R (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. Embo J 19: 5178-5193.

Finlin BS & Andres DA (1997). Rem is a new member of the Rad- and Gem/Kir Ras-related GTP-binding protein family repressed by lipopolysaccharide stimulation. J Biol Chem 272: 21982-21988.

Finlin BS, Shao H, Kadono-Okuda K, Guo N & Andres DA (2000). Rem2, a new member of the Rem/Rad/Gem/Kir family of Ras-related GTPases. Biochem J 347 Pt 1: 223-231.

Foroni L, Boehm T, White L, Forster A, Sherrington P, Liao XB, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG & Rabbitts TH (1992). The rhombotin gene family encode related LIM-domain proteins whose differing expression suggests multiple roles in mouse development. J Mol Biol 226: 747-761.

Forsyth PA, Laing TD, Gibson AW, Rewcastle NB, Brasher P, Sutherland G, Johnston RN & Edwards DR (1998). High levels of gelatinase-B and active gelatinase-A in metastatic glioblastoma. J Neurooncol 36: 21-29.

Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H, Leco KJ, Johnston RN, Brasher PM, Sutherland G & Edwards DR (1999). Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. Br J Cancer 79: 1828-1835.

Fowlkes JL, Suzuki K, Nagase H & Thrailkill KM (1994). Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 during rat pregnancy: a role for matrix metalloproteinases. Endocrinology 135: 2810-2813.

Frank SR, Schroeder M, Fernandez P, Taubert S & Amati B (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. Genes Dev 15: 2069-2082.

Frederick JP, Liberati NT, Waddell DS, Shi Y & Wang XF (2004). Transforming growth factor beta-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. Mol Cell Biol 24: 2546-2559.

Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB & Wright SD (1992). Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. J Exp Med 176: 1665-1671.

Freytag SO & Geddes TJ (1992). Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. Science 256: 379-382.

Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L & Kouzarides T (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. Nat Genet 24: 88-91.

Furumoto K, Arii S, Mori A, Furuyama H, Gorrin Rivas MJ, Nakao T, Isobe N, Murata T, Takahashi C, Noda M & Imamura M (2001). RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. Hepatology 33: 189-195.

Galaktionov K, Chen X & Beach D (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. Nature 382: 511-517.

Gartel AL, Ye X, Goufman E, Shianov P, Hay N, Najmabadi F & Tyner AL (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 4510-4515.

Gartel AL & Shchors K (2003). Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. Exp Cell Res 283: 17-21.

Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG & Quaranta V (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. Science 277: 225-228.

Giaume C & Venance L (1995). Gap junctions in brain glial cells and development. Perspect Dev Neurobiol 2: 335-345.

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. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 192-196.

Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H & Bode W (1997). Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. Nature 389: 77-81.

Goodman RH & Smolik S (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. Genes Dev 14: 1553-1577.

Grandori C, Cowley SM, James LP & Eisenman RN (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 16: 653-699.

Greenberg JM, Boehm T, Sofroniew MV, Keynes RJ, Barton SC, Norris ML, Surani MA, Spillantini MG & Rabbits TH (1990). Segmental and developmental regulation of a presumptive T-cell oncogene in the central nervous system. Nature 344: 158-160.

Gross J & Lapiere CM (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci U S A 48: 1014-1022.

Gu W, Bhatia K, Magrath IT, Dang CV & Dalla-Favera R (1994). Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107. Science 264: 251-254.

Guo Q, Xie J, Dang CV, Liu ET & Bishop JM (1998). Identification of a large Myc-binding protein that contains RCC1-like repeats. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 9172-9177.

Hanahan D & Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86: 353-364.

Hanahan D (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. Science 277: 48-50.

Hannon GJ & Beach D (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. Nature 371: 257-261.

Hateboer G, Timmers HT, Rustgi AK, Billaud M, van 't Veer LJ & Bernards R (1993). TATA-binding protein and the retinoblastoma gene product bind to overlapping epitopes on c-Myc and adenovirus E1A protein. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 8489-8493.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B & Kinzler KW (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science 281: 1509-1512.

Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell BC, Mateyak MK, Tam W, Kohlhuber F, Dang CV, Sedivy JM, Eick D, Vogelstein B & Kinzler KW (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 2229-2234.

Herms JW, von Loewenich FD, Behnke J, Markakis E & Kretzschmar HA (1999). c-myc oncogene family expression in glioblastoma and survival. Surg Neurol 51: 536-542.

Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S & Steiner HH (2002). Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. Int J Cancer 98: 362-369.

Hinks GL, Shah B, French SJ, Campos LS, Staley K, Hughes J & Sofroniew MV (1997). Expression of LIM protein genes Lmo1, Lmo2, and Lmo3 in adult mouse hippocampus and other forebrain regions: differential regulation by seizure activity. J Neurosci 17: 5549-5559.

Hirvonen HE, Salonen R, Sandberg MM, Vuorio E, Vastrik I, Kotilainen E & Kalimo H (1994). Differential expression of myc, max and RB1 genes in human gliomas and glioma cell lines. Br J Cancer 69: 16-25.

Hoang AT, Lutterbach B, Lewis BC, Yano T, Chou TY, Barrett JF, Raffeld M, Hann SR & Dang CV (1995). A link between increased transforming activity of lymphoma-derived MYC mutant alleles, their defective regulation by p107, and altered phosphorylation of the c-Myc transactivation domain. Mol Cell Biol 15: 4031-4042.

Huang LM & Jeang KT (1993). Increased spacing between Sp1 and TATAA renders human immunodeficiency virus type 1 replication defective: implication for Tat function. J Virol 67: 6937-6944.

Hurlin PJ, Queva C, Koskinen PJ, Steingrimsson E, Ayer DE, Copeland NG, Jenkins NA & Eisenman RN (1995). Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. Embo J 14: 5646-5659.

Hurlin PJ, Queva C & Eisenman RN (1997). Mnt: a novel Max-interacting protein and Myc antagonist. Curr Top Microbiol Immunol 224: 115-121.

Hurlin PJ, Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA & Eisenman RN (1999). Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. Embo J 18: 7019-7028.

Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD & Okada Y (1997). Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. Biochem J 322 ( Pt 3): 809-814.

Iwasaka T, Zheng PS, Ouchida M, Yamasaki H, Yokoyama M & Sugimori H (1996). Cytologic changes in two cervical carcinoma cell lines after transfection of the wild-type p53 gene. Acta Obstet Gynecol Scand 75: 797-803.

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

Jallo GI, Friedlander DR, Kelly PJ, Wisoff JH, Grumet M & Zagzag D (1997). Tenascin-C expression in the cyst wall and fluid of human brain tumors correlates with angiogenesis. Neurosurgery 41: 1052-1059.

Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW & Fox GM (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. Cell 85: 1113-1124.

Johansen KM (1996). Dynamic remodeling of nuclear architecture during the cell cycle. J Cell Biochem 60: 289-296.

Jones FS & Jones PL (2000). The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. Dev Dyn 218: 235-259.

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.

Kahari VM & Saarialho-Kere U (1999). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. Ann Med 31: 34-45.

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

Kast B (2001). The best supporting actors. Nature 412: 674-676.

Kato GJ, Barrett J, Villa-Garcia M & Dang CV (1990). An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. Mol Cell Biol 10: 5914-5920.

Kelly K, Cochran BH, Stiles CD & Leder P (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. Cell 35: 603-610.

Kingston RE & Narlikar GJ (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. Genes Dev 13: 2339-2352.

Klein RD, Sherman D, Ho WH, Stone D, Bennett GL, Moffat B, Vandlen R, Simmons L, Gu Q, Hongo JA, Devaux B, Poulsen K, Armanini M, Nozaki C, Asai N, Goddard A, Phillips H, Henderson CE, Takahashi M & Rosenthal A (1997). A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. Nature 387: 717-721.

Knoepfler PS & Eisenman RN (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. Cell 99: 447-450.

Koolman JR, KH (1996). Color Atlas of Biochemistry. Stuttgart, NY, USA.

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

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

Lampert K, Machein U, Machein MR, Conca W, Peter HH & Volk B (1998). Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. Am J Pathol 153: 429-437.

Laskowski M, Jr. & Kato I (1980). Protein inhibitors of proteinases. Annu Rev Biochem 49: 593-626.

Lee KS, Linden R, Prado MA, Brentani RR & Martins VR (2003). Towards cellular receptors for prions. Rev Med Virol 13: 399-408.

Lee LA, Dolde C, Barrett J, Wu CS & Dang CV (1996). A link between c-Myc-mediated transcriptional repression and neoplastic transformation. J Clin Invest 97: 1687-1695.

Lee TC, Li L, Philipson L & Ziff EB (1997a). Myc represses transcription of the growth arrest gene gas1. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 12886-12891.

Lee YH, Williams SC, Baer M, Sterneck E, Gonzalez FJ & Johnson PF (1997b). The ability of C/EBP beta but not C/EBP alpha to synergize with an Sp1 protein is specified by the leucine zipper and activation domain. Mol Cell Biol 17: 2038-2047.

Leins A, Riva P, Lindstedt R, Davidoff MS, Mehraein P & Weis S (2003). Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. Cancer 98: 2430-2439.

Lemon B & Tjian R (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. Genes Dev 14: 2551-2569.

Leone A, Mitsiades N, Ward Y, Spinelli B, Poulaki V, Tsokos M & Kelly K (2001). The Gem GTP-binding protein promotes morphological differentiation in neuroblastoma. Oncogene 20: 3217-3225.

Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A & Vlodavsky I (1996). Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 7069-7074.

Li JM, Nichols MA, Chandrasekharan S, Xiong Y & Wang XF (1995). Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site. J Biol Chem 270: 26750-26753.

Li LH, Nerlov C, Prendergast G, MacGregor D & Ziff EB (1994). c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. Embo J 13: 4070-4079.

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.

Lin JX & 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. Mol Cell Biol 17: 3714-3722.

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM & Shafie S (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature 284: 67-68.

Liotta LA & Stetler-Stevenson WG (1990). Metalloproteinases and cancer invasion. Semin Cancer Biol 1: 99-106.

Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG & Evan GI (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. Nucleic Acids Res 23: 1686-1690.

Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402-408.

Luscher B & Larsson LG (1999). The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. Oncogene 18: 2955-2966.

Luscher B (2001). Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. Gene 277: 1-14.

Maguire J, Santoro T, Jensen P, Siebenlist U, Yewdell J & Kelly K (1994). Gem: an induced, immediate early protein belonging to the Ras family. Science 265: 241-244.

Maheswaran S, Lee H & Sonenshein GE (1994). Intracellular association of the protein product of the c-myc oncogene with the TATA-binding protein. Mol Cell Biol 14: 1147-1152.

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 Res 22: 4914-4921.

Malumbres M & Barbacid M (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. Nat Rev Cancer 1: 222-231.

Manes S, Llorente M, Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Kremer L, Mira E & Martinez AC (1999). The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. J Biol Chem 274: 6935-6945.

Marcu KB, Bossone SA & Patel AJ (1992). myc function and regulation. Annu Rev Biochem 61: 809-860.

Marhin WW, Chen S, Facchini LM, Fornace AJ, Jr. & Penn LZ (1997). Myc represses the growth arrest gene gadd45. Oncogene 14: 2825-2834.

Massague J, Blain SW & Lo RS (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell 103: 295-309.

Masui T, Doi R, Koshiba T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Ito D, Kami K, Mori T, Wada M, Noda M & Imamura M (2003). RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. Clin Cancer Res 9: 1779-1784.

Mateyak MK, Obaya AJ, Adachi S & Sedivy JM (1997). Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. Cell Growth Differ 8: 1039-1048.

McCawley LJ & Matrisian LM (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! Curr Opin Cell Biol 13: 534-540.

McEwan IJ, Dahlman-Wright K, Ford J & Wright AP (1996). Functional interaction of the c-Myc transactivation domain with the TATA binding protein: evidence for an induced fit model of transactivation domain folding. Biochemistry 35: 9584-9593.

McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD & Cole MD (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. Cell 94: 363-374.

McMahon SB, Wood MA & Cole MD (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. Mol Cell Biol 20: 556-562.

Merika M & Orkin SH (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. Mol Cell Biol 15: 2437-2447.

Meroni G, Cairo S, Merla G, Messali S, Brent R, Ballabio A & Reymond A (2000). Mlx, a new Max-like bHLHZip family member: the center stage of a novel transcription factors regulatory pathway? Oncogene 19: 3266-3277.

Mittnacht S (1998). Control of pRB phosphorylation. Curr Opin Genet Dev 8: 21-27.

Molinari M (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. Cell Prolif 33: 261-274.

Morgenstern JP & Land H (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. Nucleic Acids Res 18: 3587-3596.

Morrow MA, Lee G, Gillis S, Yancopoulos GD & Alt FW (1992). Interleukin-7 induces N-myc and c-myc expression in normal precursor B lymphocytes. Genes Dev 6: 61-70.

Moustakas A, Pardali K, Gaal A & Heldin CH (2002). Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. Immunol Lett 82: 85-91.

Nagase H & Woessner JF, Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 274: 21491-21494.

Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kawano H, Hayakawa T & Okada Y (1994). Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. J Neurosurg 81: 69-77.

Nakano A, Tani E, Miyazaki K, Yamamoto Y & Furuyama J (1995). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas. J Neurosurg 83: 298-307.

Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K & ten Dijke P (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. Embo J 16: 5353-5362.

Narlikar GJ, Fan HY & Kingston RE (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. Cell 108: 475-487.

Nesbit CE, Tersak JM & Prochownik EV (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. Oncogene 18: 3004-3016.

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

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS & Kriegstein AR (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409: 714-720.

Noda M, Selinger Z, Scolnick EM & Bassin RH (1983). Flat revertants isolated from Kirsten sarcoma virus-transformed cells are resistant to the action of specific oncogenes. Proc Natl Acad Sci U S A 80: 5602-5606.

Noda M, Kitayama H, Matsuzaki T, 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. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 162-166.

Noda M (1993). Structures and functions of the K rev-1 transformation suppressor gene and its relatives. Biochim Biophys Acta 1155: 97-109.

Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H & Takahashi C (2003). RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. Cancer Metastasis Rev 22: 167-175.

Noti JD, Reinemann BC & Petrus MN (1996). Sp1 binds two sites in the CD11c promoter in vivo specifically in myeloid cells and cooperates with AP1 to activate transcription. Mol Cell Biol 16: 2940-2950.

Obaya AJ, Kotenko I, Cole MD & Sedivy JM (2002). The proto-oncogene c-myc acts through the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27(Kip1) to facilitate the activation of Cdk4/6 and early G(1) phase progression. J Biol Chem 277: 31263-31269.

Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C & Noda M (2001). The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. Cell 107: 789-800.

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.

Orian JM, Vasilopoulos K, Yoshida S, Kaye AH, Chow CW & Gonzales MF (1992). Overexpression of multiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma. Br J Cancer 66: 106-112.

Pardali K, Kowanetz M, Heldin CH & Moustakas A (2005). Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21(WAF1/Cip1). J Cell Physiol.

Park J, Kunjibettu S, McMahon SB & Cole MD (2001). The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment and Myc-dependent oncogenesis. Genes Dev 15: 1619-1624.

Park SH, Lee YS, Osawa Y, Hachiya M & Akashi M (2002). Hsp25 regulates the expression of p21(Waf1/Cip1/Sdi1) through multiple mechanisms. J Biochem (Tokyo) 131: 869-875.

Pavlaki M & Zucker S (2003). Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPIs): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. Cancer Metastasis Rev 22: 177-203.

Pearson CA, Pearson D, Shibahara S, Hofsteenge J & Chiquet-Ehrismann R (1988). Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. Embo J 7: 2977-2982.

Pelengaris S & Khan M (2003). The many faces of c-MYC. Arch Biochem Biophys 416: 129-136.

Perez-Alvarado GC, Miles C, Michelsen JW, Louis HA, Winge DR, Beckerle MC & Summers MF (1994). Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP. Nat Struct Biol 1: 388-398.

Perkins ND, Agranoff AB, Pascal E & Nabel GJ (1994). An interaction between the DNA-binding domains of RelA(p65) and Sp1 mediates human immunodeficiency virus gene activation. Mol Cell Biol 14: 6570-6583.

Petitclerc E, Stromblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, Cheresh DA & Brooks PC (1999). Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. Cancer Res 59: 2724-2730.

Peukert K, Staller P, Schneider A, Carmichael G, Hanel F & Eilers M (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. Embo J 16: 5672-5686.

Philipp A, Schneider A, Vasrik I, Finke K, Xiong Y, Beach D, Alitalo K & Eilers M (1994). Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. Mol Cell Biol 14: 4032-4043.

Platten M, Wick W & Weller M (2001). Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. Microsc Res Tech 52: 401-410.

Prado MA, Alves-Silva J, Magalhaes AC, Prado VF, Linden R, Martins VR & Brentani RR (2004). PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. J Neurochem 88: 769-781.

Prendergast GC, Lawe D & Ziff EB (1991). Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. Cell 65: 395-407.

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

Rabbitts TH & Boehm T (1990). LIM domains. Nature 346: 418.

Rao JS, Steck PA, Mohanam S, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA & Sawaya R (1993). Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. Cancer Res 53: 2208-2211.

Rao JS (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. Nat Rev Cancer 3: 489-501.

Rascher G, Fischmann A, Kroger S, Duffner F, Grote EH & Wolburg H (2002). Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. Acta Neuropathol (Berl) 104: 85-91.

Rauch U, Feng K & Zhou XH (2001). Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. Cell Mol Life Sci 58: 1842-1856.

Rauch U (2004). Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. Cell Mol Life Sci 61: 2031-2045.

Reisman D, Elkind NB, Roy B, Beamon J & Rotter V (1993). c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. Cell Growth Differ 4: 57-65.

Ribotta MG, Menet V & Privat A (2004). Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice. Acta Neurochir Suppl 89: 87-92.

Risau W (1997). Mechanisms of angiogenesis. Nature 386: 671-674.

Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J & Iruela-Arispe ML (2001). Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 12485-12490.

Roy AL, Meisterernst M, Pognonec P & Roeder RG (1991). Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. Nature 354: 245-248.

Roy AL, Carruthers C, Gutjahr T & Roeder RG (1993). Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. Nature 365: 359-361.

Sakamuro D, Elliott KJ, Wechsler-Reya R & Prendergast GC (1996). BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. Nat Genet 14: 69-77.

Sambrook J FEMT (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Press.

Sanchez-Garcia I & Rabbitts TH (1994). The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. Trends Genet 10: 315-320.

Sasahara RM, Takahashi C & Noda M (1999a). Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. Biochem Biophys Res Commun 264: 668-675.

Sasahara RM, Takahashi C, Sogayar MC & Noda M (1999b). Oncogene-mediated downregulation of RECK, a novel transformation suppressor gene. Braz J Med Biol Res 32: 891-895.

Sasahara RM, Brochado SM, Takahashi C, Oh J, Maria-Engler SS, Granjeiro JM, Noda M & Sogayar MC (2002). Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. Cancer Detect Prev 26: 435-443.

Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka J & Seiki M (1992). Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. Oncogene 7: 77-83.

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W & Qin Y (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. Nature 376: 70-74.

Schmeichel KL & Beckerle MC (1994). The LIM domain is a modular protein-binding interface. Cell 79: 211-219.

Schmidt EV (1999). The role of c-myc in cellular growth control. Oncogene 18: 2988-2996.

Schmucker D, Clemens JC, Shu H, Worby CA, Xiao J, Muda M, Dixon JE & Zipursky SL (2000). Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. Cell 101: 671-684.

Senderowicz AM (2003). Novel direct and indirect cyclin-dependent kinase modulators for the prevention and treatment of human neoplasms. Cancer Chemother Pharmacol 52 Suppl 1: S61-73.

Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M & Massague J (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. Nat Cell Biol 3: 400-408.

Shapiro DN, Valentine V, Eagle L, Yin X, Morris SW & Prochownik EV (1994). Assignment of the human MAD and MXI1 genes to chromosomes 2p12-p13 and 10q24-q25. Genomics 23: 282-285.

Shawlot W & Behringer RR (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. Nature 374: 425-430.

Sheiness D, Fanshier L & Bishop JM (1978). Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. J Virol 28: 600-610.

Shibuya H, Yoneyama M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K & Taniguchi T (1992). IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: demonstration of a novel role for c-myc. Cell 70: 57-67.

Shrivastava A, Saleque S, Kalpana GV, Artandi S, Goff SP & Calame K (1993). Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. Science 262: 1889-1892.

Shrivastava A, Yu J, Artandi S & Calame K (1996). YY1 and c-Myc associate in vivo in a manner that depends on c-Myc levels. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 10638-10641.

Sottrup-Jensen L & Birkedal-Hansen H (1989). Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. J Biol Chem 264: 393-401.

Span PN, Sweep CG, Manders P, Beex LV, Leppert D & Lindberg RL (2003). Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. Cancer 97: 2710-2715.

Spencer CA & Groudine M (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. Adv Cancer Res 56: 1-48.

Staller P, Peukert K, Kiermaier A, Seoane J, Lukas J, Karsunky H, Moroy T, Bartek J, Massague J, Hanel F & Eilers M (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. Nat Cell Biol 3: 392-399.

Stamenkovic I (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. J Pathol 200: 448-464.

Steiner P, Philipp A, Lukas J, Godden-Kent D, Pagano M, Mittnacht S, Bartek J & Eilers M (1995). Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. Embo J 14: 4814-4826.

Sterner DE & Berger SL (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol Mol Biol Rev 64: 435-459.

Sternlicht MD & Werb Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 17: 463-516.

Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S & Liotta LA (1993a). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. Annu Rev Cell Biol 9: 541-573.

Stetler-Stevenson WG, Liotta LA & Kleiner DE, Jr. (1993b). Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. Faseb J 7: 1434-1441.

Stetler-Stevenson WG (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. J Clin Invest 103: 1237-1241.

Stevens C & La Thangue NB (2003). E2F and cell cycle control: a double-edged sword. Arch Biochem Biophys 412: 157-169.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA & Goldberg GI (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. J Biol Chem 270: 5331-5338.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN & Yancopoulos GD (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell 87: 1171-1180.

Swanton C (2004). Cell-cycle targeted therapies. Lancet Oncol 5: 27-36.

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. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 13221-13226.

Takenaka K, Ishikawa S, Kawano Y, Yanagihara K, Miyahara R, Otake Y, Morioka Y, Takahashi C, Noda M, Wada H & Tanaka F (2004). Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. Eur J Cancer 40: 1617-1623.

Takeuchi T, Hisanaga M, Nagao M, Ikeda N, Fujii H, Koyama F, Mukogawa T, Matsumoto H, Kondo S, Takahashi C, Noda M & Nakajima Y (2004). The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. Clin Cancer Res 10: 5572-5579.

Toresson H, Mata de Urquiza A, Fagerstrom C, Perlmann T & Campbell K (1999). Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. Development 126: 1317-1326.

Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N,

Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE & Rosenthal A (1996). Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. Nature 382: 80-83.

Trent J, Meltzer P, Rosenblum M, Harsh G, Kinzler K, Mashal R, Feinberg A & Vogelstein B (1986). Evidence for rearrangement, amplification, and expression of c-myc in a human glioblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A 83: 470-473.

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. J Biol Chem 273: 2984-2992.

Udvadia AJ, Rogers KT, Higgins PD, Murata Y, Martin KH, Humphrey PA & Horowitz JM (1993). Sp-1 binds promoter elements regulated by the RB protein and Sp-1-mediated transcription is stimulated by RB coexpression. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 3265-3269.

Valentini SR & Armelin MC (1996). Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. J Endocrinol 148: 11-17.

Vedoy CG & Sogayar MC (2002). Isolation and characterization of genes associated with the anti-tumor activity of glucocorticoids. Brain Res Mol Brain Res 106: 57-69.

Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J & Bishop JM (1982). Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. J Virol 42: 773-779.

Vervoorts J, Luscher-Firzlaff JM, Rottmann S, Lilischkis R, Walsemann G, Dohmann K, Austen M & Luscher B (2003). Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. EMBO Rep 4: 484-490.

Vignali M, Hassan AH, Neely KE & Workman JL (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. Mol Cell Biol 20: 1899-1910.

Visse R & Nagase H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res 92: 827-839.

Vos CM, Gartner S, Ransohoff RM, McArthur JC, Wahl L, Sjulson L, Hunter E & Conant K (2000). Matrix metalloprotease-9 release from monocytes increases as a function of differentiation: implications for neuroinflammation and neurodegeneration. J Neuroimmunol 109: 221-227.

Vu TH & Werb Z (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev 14: 2123-2133.

Wagner AJ, Meyers C, Laimins LA & Hay N (1993). c-Myc induces the expression and activity of ornithine decarboxylase. Cell Growth Differ 4: 879-883.

Wang Z, Juttermann R & Soloway PD (2000). TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. J Biol Chem 275: 26411-26415.

Wanzel M, Herold S & Eilers M (2003). Transcriptional repression by Myc. Trends Cell Biol 13: 146-150.

Warner BJ, Blain SW, Seoane J & Massague J (1999). Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. Mol Cell Biol 19: 5913-5922.

Wechsler DS, Shelly CA, Petroff CA & Dang CV (1997). MXI1, a putative tumor suppressor gene, suppresses growth of human glioblastoma cells. Cancer Res 57: 4905-4912.

Werb Z (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. Cell 91: 439-442.

Westermarck J, Seth A & Kahari VM (1997). Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. Oncogene 14: 2651-2660.

Westermarck J & Kahari VM (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. Faseb J 13: 781-792.

Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF & Massague J (1992). TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. Cell 71: 1003-1014.

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F & Massague J (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature 370: 341-347.

Yabkowitz R, Meyer S, Black T, Elliott G, Merewether LA & Yamane HK (1999). Inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor stimulate the release of soluble tie receptor from human endothelial cells via metalloprotease activation. Blood 93: 1969-1979.

Yamakawa K, Huot YK, Haendelt MA, Hubert R, Chen XN, Lyons GE & Korenberg JR (1998). DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. Hum Mol Genet 7: 227-237.

Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, Fuller GN, Seiki M, Sato H, Gokaslan ZL, Liotta LA, Nicolson GL & Rao JS (1996). Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. Cancer Res 56: 384-392.

Yang HY, Shao R, Hung MC & Lee MH (2001a). p27 Kip1 inhibits HER2/neu-mediated cell growth and tumorigenesis. Oncogene 20: 3695-3702.

Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL & Godowski PJ (1998). Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. Nature 395: 284-288.

Yang Z, Strickland DK & Bornstein P (2001b). Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. J Biol Chem 276: 8403-8408.

Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R & Edwards DR (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. Trends Neurosci 21: 75-80.

Yu M, Schreek S, Cerni C, Schamberger C, Lesniewicz K, Poreba E, Vervoorts J, Walsemann G, Grotzinger J, Kremmer E, Mehraein Y, Mertsching J, Kraft R, Austen M, Luscher-Firzlaff J & Luscher B (2005). PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. Oncogene 24: 1982-1993.

Zagzag D, Friedlander DR, Dosik J, Chikramane S, Chan W, Greco MA, Allen JC, Dorovini-Zis K & Grumet M (1996). Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. Cancer Res 56: 182-189.

Zervos AS, Gyuris J & Brent R (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. Cell 72: 223-232.

Zipfel PF, Balke J, Irving SG, Kelly K & Siebenlist U (1989). Mitogenic activation of human T cells induces two closely related genes which share structural similarities with a new family of secreted factors. J Immunol 142: 1582-1590.

Zutter MM, Ryan EE & Painter AD (1997). Binding of phosphorylated Sp1 protein to tandem Sp1 binding sites regulates alpha2 integrin gene core promoter activity. Blood 90: 678-689.