UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

O Gene c-myc e o Controle do Ciclo Celular por
ACTH e FGF2 em Células Adrenocorticais de
Camundongo da Linhagem Y-1

Ana Paula Lepique

Tese de Doutorado

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin

SÃO PAULO

Outubro de 2000

O Gene c-myc e o Controle do Ciclo Celular por
ACTH em Células Adrenocorticais de
Camundongo da Linhagem Y-1.

ANA PAULA LEPIQUE

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

Aprovada por:

Prof. Dr. HUGO AGUIRRE ARMELIN
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. HAMZA FAHMI ALI EL DORRY
IQ - USP

Prof. Dr. JACKSON CEIONI BITTENCOURT
ICB - USP

Prof. Dra. MARIA LUIZA PAÇO LARSON
FM - RP - USP

Prof. Dr. CARLOS EDUARDO WINTER
ICB - USP

SÃO PAULO
20 DE OUTUBRO DE 2000.

Aos meus amores, Alice e André.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin, pela orientação, suporte e paciência durante nove anos de trabalho em conjunto. Duvido que eu pudesse ter aprendido mais com qualquer outra pessoa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo, pelo suporte do projeto e da minha bolsa de estudos.

Ao Departamento de Bioquímica, pela utilização de suas instalações e facilidades. E também aos funcionários, pelo suporte e ajuda em diversas e frequentes ocasiões.

Ao Prof. Robert Eisenman, Fred Hutchinson, Seattle, por ter gentilmente doado anticorpos contra a proteína c-Myc, e o plasmídeo contendo a quimera MycER.

Ao Prof. Kenneth Marcu, que cedeu plasmídeos contendo o clone genômico, o cDNA completo e região codificadora de c-myc de camundongo.

À inesquecível Gláucia Noeli Maroso Hajj, a quem eu tive o prazer de orientar durante seu projeto de Iniciação Científica no laboratório do Prof. Hugo Armelin, pelos experimentos de Western Blotting e imunoprecipitação apresentados nesta tese. Também, e acho que principalmente, pela inteligência que provocava desafios constantes, pela amizade, pelo carinho, pela força nos momentos difíceis.

Aos técnicos, Alexandre Demargos, Maria do Céu Queijo de Sá, Eduardo Purgatto, Eva, Roseli Mendonça, pelo suporte técnico cuidadoso, pela paciência, pelo café de todo dia. À Maria especialmente pela alegria e boas risadas que trouxe para o laboratório neste último ano, fez toda a diferença.

Ao pessoal dos laboratórios do Prof. Dr. Ramza El Dorry e Prof. Dr. Fernando Reinach, em especial, ao Ari e à Isaura, pelo sequenciamento de diversas amostras de DNA.

Aos colegas do laboratório, Érico Tozzoni Costa, Paula Asprino, Carolina Bigarella, Ivan Tadeu Rebustini, Telma Tiemi Schwindt, Fábio Luiz Forti, Kátia Maria da Rocha, Miriam Santos de Moraes, pelas discussões construtivas, pelos momentos divertidos, pela ajuda, pelo companheirismo, pela presença constante.

Aos amigos e colegas de outros laboratórios, Nathalie Cella, Maki Regina Sassarara, Edlaine Linares, Nancy, Ronaldo Quaggio, Eduardo Purgatto, Lia Sumie Nakao, Silvio, Marques Zanata, Wilson Roberto Toselli.

À querida Telma Schwindt, pela amizade, pela força, por dividir o almoço e a fruta por dividir as boas risadas e também as frustrações e momentos difíceis. Pela ajuda na hora de lisar tantas placas e lavar tantas lamínulas..... e viva a crappy bench!

À querida Kátia Rocha, fez toda a diferença ter você por perto para discutir, conversar, dividir o dia-a-dia do laboratório, almoçar junto, pela sabedoria tranqüila e sempre disponível.

À minha amiga, Claudia Eichler Jonsson, pelo desenvolvimento e caracterização dos clones Y-1/PKA- utilizados neste trabalho. Pela amizade tão constante, apesar de distante.

À querida Miriam Santos de Moraes, pelo trabalho conjunto, pela amizade, pela presença sempre tranqüila, alegre e carinhosa.

À Dra. Claudimara Lotfi, por nos ensinar as técnicas de imunocitoquímica apresentadas neste trabalho, pelas discussões produtivas, pela companhia e agradáveis conversas na hora do café.

Às queridas Claudia Kerley Frigeri e Marcella Faria de Almeida Prado, mesmo longe vocês foram e são exemplos de grandes pessoas e grandes cientistas. Ainda sinto saudades do tempo em que estávamos todas juntas.

Ao pessoal do laboratório da Prof. Dra. Mari Sogayar, pelas discussões produtivas durante os seminários, pela ajuda e pelas conversas divertidas.

Aos amigos distantes, porém importantes, Noriko Esumi, Nalo Hamilton, Helen Beerer, Mark Cuff, Pio Zapella, pelo carinho, suporte e ajuda.

Aos sempre tão queridos, Alessandra Lara Takatu, Jorge Vaccarini, Anna Cristina Ferreira, Melina, Fernando, Claudia e Henrique Serson, César Rua, pelos encontros tão ricos, pelo abraço apertado, pela presença, ainda que distante, tão sólida e cara.

Aos novos amigos, Beto, Claudia e Isabela Scretas, Hugo, Sandra, Manuela e Pietro Rodriguez, Álvaro, Lenice e Elisa Bueno, pela amizade tranquila e momentos felizes compartilhados nas horas de esquecer o trabalho e pensar nas crianças.

À família Juliano, todos tão queridos, pelo carinho e cuidado pela vida afora, pelas boas conversas, pela companhia, por serem também minha família.

Às especiais e queridas, cada uma a seu modo, Cynthia e Maysa Lepique, sempre presentes, mesmo de longe. Pela cumplicidade, pelas boas e más horas, afinal elas também fazem parte da vida.

À minha mãe, Luiza Lepique, pelo amor e carinho, pelo cuidado, pela força e por me ensinar a terminar o que foi iniciado.

Ao meu pai, Carlos Lepique, meu exemplo preferido de sempre. Pelo amor, por me fazer sentir especial, pelas longas e preciosas conversas.

Ao André e a Luli, por tudo, por todos os dias, pelo amor, pela inspiração, por fazerem a volta para casa sempre feliz e desejada.

Índice

Índice.....	8
Índice.....	8
RESUMO	11
SUMMARY	12
SUMMARY	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
INTRODUÇÃO	14
O Ciclo Celular em Mamíferos.....	15
Transição G0→G1→S	16
Fatores que promovem a transição G0→G1→S	16
Interação de vias de transdução de sinal – vias ativadas por receptores tirosina quinase versus vias ativadas por receptores de sete hélices acoplados a proteína G	18
Genes Envolvidos no Controle da Progressão do Ciclo Celular	23
O Proto-oncogene c-myc e a Rede Myc/Max/Mad.....	26
Estrutura	26
Função	28
Mecanismo de Ação	29
A família Mad	32
Y-1, um modelo para estudo da ação de ACTH.....	36
ACTH.....	36
A Linhagem Y-1	36
O Mecanismo de Ação de ACTH.....	38
OBJETIVOS.....	42
Objetivo Geral.....	42
Objetivos Específicos	42
MATERIAIS E MÉTODOS	43
Materiais.....	44
Linhagem Y-1	44
<i>Bactérias e Plasmídeos</i>	44
Anticorpos	45
Kits.....	46
Peptídeos, Antibióticos e Reagentes.....	46
Isótopos radioativos.....	47
Oligonucleotídeos	47
Oligonucleotídeos para análise de expressão de mRNA por RT-PCR	48
Métodos	48
Cultura de Células	48
Manipulação de Bactérias e Preparação de Plasmídeos.....	49
Ensaio de elongação de cadeia nascente de RNA – run-on	50
Principais objetivos do ensaio	50
Procedimento	52
Isolamento de núcleos	52
Preparação das membranas com as sondas de DNA.....	53

Reação de elongação das cadeias nascentes de RNA	54
Extração e purificação do RNA nuclear	55
Pré-hibridização, hibridização, lavagem e exposição das membranas contendo as sondas de cDNA	55
Análise da meia-vida do mRNA de c-myc	56
Principais objetivos do ensaio	56
Procedimento	58
Extração de RNA	58
Northern Blotting	58
Preparação da sonda radioativa	59
Hibridização	59
Deteção dos mRNAs da família Mad em Y-1 através de RT-PCR	60
Reação de Transcriptase Reversa	60
PCR	61
Estudo da expressão de proteínas em células Y-1	61
Ensaio de Imunocitoquímica	63
Principais objetivos do ensaio	63
Procedimento	64
Tratamento com detergente – facilitação da difusão do anticorpo na célula fixada	65
Bloqueio com proteína inespecífica	65
Reação com anticorpos específicos	65
Western Blotting	66
Extrato total de células Y-1	66
Quantificação de proteínas	67
SDS-PAGE e Blotting	67
Reação com anticorpos específicos e detecção das proteínas	68
Imunoprecipitação com anti-Max para detecção de c-Myc e Mad	69
“Pré-clearing”	69
Imunoprecipitação	70
Expressão ectópica de c-Myc e relação com ciclo celular	71
Sistema MycER	71
Transfecção	73
Análise dos efeitos de ativação de MycER em células Y-1	75
Ensaio de Entrada em S – Incorporação de BrdU	75
Fixação das células e desnaturação do DNA	76
Reação com anticorpos	76
Coloração dos núcleos	77
Testes estatísticos	77
Teste qui-quadrado	77
Teste Mann-Whitney	78
RESULTADOS	79
Controle da expressão de c-myc em Y-1	80
Basal de expressão de c-Myc em Y-1 – chave de controle?	80
Controle da transcrição de c-myc	81
Controle da expressão do mRNA de c-myc	83
Controle da Expressão da Proteína c-Myc	89

Expressão de Max em Y-1	103
Expressão de Mad em Y-1	104
Papel de c-Myc no ciclo celular de Y-1	108
Discussão	113
Estabilidade de células Y-1 e controle da expressão de c-myc/c-Myc	115
Níveis de regulação de c-myc/c-Myc	115
Organização e regulação do sistema Myc/Max/Mad em Y-1	118
Papel de c-Myc na regulação da transição G0→G1→S por ACTH	119
CONCLUSÕES	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
Dados Pessoais.....	137
Educação	137
2º grau	137
3º grau	137
Pós-graduação.....	137
Experiência Didática.....	138
Ocupação.....	138
Artigos Publicados.....	138
Comunicações em Congressos.....	139
No Brasil.....	139
No exterior.....	140

RESUMO

ACTH é o hormônio trófico que estimula a esteroidogênese, promove o crescimento e a manutenção do córtex adrenal. Porém, em linhagens adrenocorticais, assim como em culturas primárias, ACTH inibe a proliferação celular.

A linhagem Y-1 de células adrenocorticais de camundongo tem as seguintes respostas a ACTH: aumento da esteroidogênese, arredondamento celular, bloqueio do ciclo celular em G1 e indução dos proto-oncogenes fos e jun. Esta linhagem também responde muito bem a FGF2, um protótipo da família dos FGFs (Fibroblast Growth Factors) que regula diferenciação e proliferação de diversos tipos celulares, sendo estimulada a transitar pelas fases G0→G1→S do ciclo celular. ACTH antagoniza este efeito de FGF2, inibindo parcialmente a entrada em S induzida por FGF2.

Este projeto buscou compreender o papel de c-Myc no controle do ciclo celular de Y-1, com ênfase nos efeitos de ACTH e FGF2 na expressão e atividade de c-Myc.

Mostramos que os dois principais controles da expressão de c-Myc em Y-1 são transcrição e degradação da proteína, sendo a concentração de c-Myc o único controle sobre o sistema Myc/Max/Mad, uma vez que a expressão de Max e de Mad-1, Mad-4 e Mxi é constitutiva em células Y-1.

FGF2 induz a expressão de c-Myc através da indução da transcrição e aumento da estabilidade da proteína de forma totalmente dependente da via de Erk-MAPK. ACTH, por outro lado, não interfere com a transcrição de c-myc, mas promove fortemente a degradação da proteína, dependentemente da via de PKA.

Utilizando um sistema de transfecção transiente, transfectamos uma quimera da proteína c-Myc com o receptor de estrógeno, MycER. Quando ativada por tamoxifen, a quimera migra para o núcleo e reverte a ação anti-mitogênica de ACTH sobre FGF2, porém, não tem efeito sobre células carenciadas tratadas ou não com ACTH apenas. Em conclusão, o antagonismo entre ACTH e FGF2 no controle da transição G0→G1→S do ciclo celular de Y-1 pode ser explicado pelas suas ações antagônicas sobre a estabilidade da proteína c-Myc.

SUMMARY

ACTH is the trophic hormone that stimulates steroidogenesis, promotes growth and maintenance of the adrenal cortex. However, in adrenal cell lines, as well as in primary cultures, ACTH inhibits cell proliferation.

ACTH effects on Y-1 cells are: increasing in steroidogenesis, cell rounding, cell cycle blocking in G1 phase and induction of fos and jun proto-oncogenes expression. Y-1 cell line displays a robust response to FGF2, a member from the FGFs family (Fibroblast Growth Factors), which regulates differentiation and proliferation in many cell types, being induced to enter G0→G1→S phases of the cell cycle upon FGF2 stimulation. ACTH antagonizes FGF2 effect, partially inhibiting cell cycle progression stimulated by FGF2.

This project aimed to investigate c-Myc role in Y-1 cell cycle control, with emphasis on ACTH and FGF2 effects on its expression and activity control.

We have shown that there are two main controls of c-Myc expression in Y-1 cells, transcription and protein stability. c-Myc concentration regulates the system Myc/Max/Mad, once Max and also Mad-1, Mad-4 and Mxi expression is constitutive in Y-1 cells.

FGF2 induces c-Myc expression by increasing its transcription rate and stabilizing the protein in an Erk-MAPK pathway dependent manner. ACTH, on the other hand, does not control c-myc transcription but promotes a strong degradation of the protein through the PKA pathway.

Using a transient transfection system, we were able to express MycER, a chimera of c-Myc and estrogen receptor in Y-1 cells. When activated by tamoxifen, MycER is translocated to cell nucleus, where it abolishes the anti-mitogenic effect of ACTH over FGF2. However, it has no effect on cell cycle progression of serum starved cells treated or not with ACTH only. In conclusion, their antagonist effects on c-Myc protein stability can explain the antagonist effects of ACTH and FGF2 on the control of G0G1S transition of Y-1 cell cycle.

LISTA DE ABREVIATURAS

4'OHT 4'OH Tamoxifen

ACTH Hormônio Adrecorticotrópico

cAMP Monofosfato de Adenosina Cíclico

dcAMP Dibutilil- Monofosfato de Adenosina Cíclico

ATP Trifosfato de Adenosina

BrdU Bromo-deoxiuridina

DAB Diaminobenzidina

DAPI 4', 6-diamino-2-fenilindol

dCTP Trifosfato de Deoxicitosina

DME "Dulbecco's Modified Eagle's Medium"

DMSO Dimetil Sulfóxido

DTT Ditiotreitól

ER Receptor de Estrógeno

FCS "Fetal Calf Serum"

FGF2 "Fibroblast Growth Factor"

GDP Difosfato de Guanosina

GTP trisfosfato de Guanosina

Kb Kilobase

KDa Kilodalton

PBS "Phosphate Buffered Saline"

PKA Proteína Quinase Dependente de cAMP

MAPK "Mitogen Activated Protein Kinase"

MEK Proteína Quinase de MAPK

V Volts

INTRODUÇÃO

O Ciclo Celular em Mamíferos

A divisão celular implica na duplicação do DNA genômico, que ao contrário do que se pensava há cerca de 50 anos, ocorre durante uma fase discreta do ciclo celular. O ciclo celular mitótico foi dividido em fases com base em experimentos do tipo “pulso e caça”, onde um pulso de precursor de DNA radioativamente marcado (timidina tritiada) era fornecido ao animal e então, analisava-se periodicamente, por auto-radiografia, a evolução da porcentagem de mitoses radioativamente marcadas em função do tempo (Quastler & Sherman, 1959). As fases do ciclo celular são:

G1: fase entre o fim de uma mitose e o início de síntese da DNA da seguinte. Durante esta fase há síntese de RNA e proteína, mas não há síntese de DNA.

S: é a fase onde ocorre a replicação do DNA, ao final desta fase a célula tem um conteúdo de DNA $4n$.

G2: é o período entre a replicação do DNA e a divisão celular. Durante este período as células mantêm dois conjuntos de cromossomos diplóides.

M: fase onde ocorre a divisão da célula em duas, mitose propriamente dita (Baserga, 1985).

Existem pontos de checagem durante o ciclo celular em que decisões quanto à progressão pelo ciclo têm que ser tomadas, um deles, chamado ponto de restrição ocorre em G1, quando a célula se “compromete” a replicar o DNA genômico, isto quer dizer que mesmo que o estímulo para a divisão seja retirado, a célula continua o ciclo até replicar o DNA (Pardee, 1989). A passagem pelo ponto de restrição em G1 está relacionada com a expressão das Ciclinas e atividade de CDKs (Cyclin Dependent Kinases). Ciclinas são proteínas expressas na fase G1, ativando especificamente CDKs responsáveis pela fosforilação de pRb. Uma vez fosforilado, pRb dissocia-se de E2F deixando-o ativo. E2F constitui uma pequena família de fatores de transcrição responsáveis pela indução da expressão de genes necessários à progressão do ciclo celular. Outros pontos de

checagem do ciclo celular dizem respeito ao controle da replicação do DNA, havendo replicação incompleta ou danos no DNA, a célula pára o ciclo celular até que os erros sejam corrigidos, ou entra em processo de morte programada, apoptose, dependente de p53.

Nos tecidos de mamíferos encontramos células terminalmente diferenciadas que não se dividem e células replicantes em diferentes fases do ciclo celular. Células embrionárias ou de tecidos em proliferação, como por exemplo, o epitélio de revestimento do intestino, terminam a mitose de um ciclo e entram diretamente na fase G1 de outro ciclo. Há ainda o caso de células diferenciadas, como os hepatócitos, que têm competência para se dividir, caso sejam estimuladas adequadamente. São terminalmente diferenciados as fibras musculares estriadas e os neurônios.

Cultura de células de mamíferos, em geral fibroblastos, tem sido amplamente utilizada para estudo do controle do ciclo celular, principalmente da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$. Esta transição é estimulada por fatores de crescimento e hormônios. Estes fatores têm o papel de ativar receptores que por sua vez ativam vias de transdução de sinal, que mandam mensagens para o núcleo da célula onde haverá indução da expressão gênica, resultando na síntese de proteínas necessárias para a progressão do ciclo celular (Pardee, 1989).

Transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$

Fatores que promovem a transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$

Os fatores que promovem a transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ são basicamente os fatores de crescimento e hormônios clássicos, por exemplo, os hormônios tróficos.

Entre os fatores de crescimento mais conhecidos estão: PDGF (Platelet Derived Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor) TGF (Transforming Growth Factor), GM-

CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), NGF (Nerve Growth Factor).

Os fatores de crescimento são peptídeos que têm ação parácrina ou autócrina, sendo secretados por células, eles têm papel fundamental na comunicação local entre células de um mesmo tecido ou de tecidos diferentes.

São de ação endócrina trófica os hormônios peptídicos hipofisários, entre os quais se encontra a adrenocorticotropina, um peptídeo secretado pela adenohipófise que age especificamente no córtex adrenal, induzindo secreção de hormônios esteróides e sendo responsável pelo crescimento e manutenção deste tecido.

O mecanismo de ação de fatores de crescimento e hormônios envolve reconhecimento, ligação e ativação de receptores transmembranares específicos, entre os quais dois tipos principais se destacam. Receptores com domínios tirosina quinase e uma única cadeia polipeptídica transmembranar, que são reconhecidos por fatores de crescimento. São proteínas que uma vez ligadas ao fator de crescimento dimerizam-se e se autofosforilam em resíduos de tirosina. Estes resíduos fosforilados de tirosina são reconhecidos por domínios SH2 (Src Homology domain) presentes em várias proteínas que servem, normalmente de acopladores entre o receptor e as primeiras proteínas de cascatas de sinalização. Exemplos de receptores tirosina quinase são os receptores de PDGF e EGF.

Outro tipo de receptor é o de sete hélices, reconhecido por hormônios, *cruza a membrana sete vezes apresentando alças na parte externa da célula e no citoplasma*, ativa proteínas G. Ambos tipos de receptores são capazes de ativar ou inibir múltiplas vias de transdução de sinal, alterando o fenótipo da célula, *através do controle da expressão diferencial de genes*.

Interação de vias de transdução de sinal – vias ativadas por receptores tirosina quinase versus vias ativadas por receptores de sete hélices acoplados a proteína G

Após a ligação de um hormônio ao seu respectivo receptor celular, uma ou mais vias de transdução de sinal são ativadas. Abaixo serão descritas algumas relacionadas a este trabalho, representadas na Figura 1.

Uma via de transdução de sinal importante é a via clássica ativada por proteínas G. Proteínas G são formadas por três subunidades, a subunidade α tem atividade de hidrólise de GTP em GDP. Quando ligada a GTP esta subunidade encontra-se na sua forma ativa, e ao hidrolisar GTP a GDP volta a sua forma inativa. Quando ligada a GTP, dissocia-se das subunidades β e γ . A subunidade α é dividida em algumas subclasses, cada uma delas ativa diferentes efetores. O dímero $\beta\gamma$ também é capaz de ativar outras enzimas, por exemplo, a fosfolipase A2 e fosfolipase C (Inglese et al, 1995). As várias isoformas de adenilato ciclase são os mais conhecidos efetores ativados por proteína G, esta enzima quando ativada, catalisa a hidrólise ATP em AMP cíclico. cAMP, juntamente com Ca^{+2} foram os primeiros segundos mensageiros celulares conhecidos, sendo também os principais. cAMP ativa a enzima PKA (Protein Kinase A ou Proteína Quinase dependente de cAMP). Esta enzima é composta por quatro subunidades, duas regulatórias e duas catalíticas, as regulatórias possuem sítios de ligação a cAMP. Quando cAMP liga-se às subunidades regulatórias de PKA, estas se dissociam das subunidades catalíticas que se tornam ativas. PKA regula uma série de processos celulares, entre eles o metabolismo do glicogênio, através da fosforilação da glicogênio sintase, e transcrição gênica através da fosforilação de CREB (CRE Binding Protein). CREB é um fator de transcrição que reconhece elementos responsivos a cAMP (CRE) em promotores de vários genes, por exemplo, o da somatostatina (Yamamoto et al, 1988), o da gonadotrofina coriônica (Deleage et al, 1987) e o de c-fos (Sassoni-Corsi et al, 1988).

As proteínas CREB/ATF, como é conhecida esta família de fatores de transcrição são fosfoproteínas nucleares, cuja atividade é modulada por fosforilação da Ser 133 pela subunidade catalítica de PKA que é translocada para o núcleo quando ativada (Hagiwara et al, 1993).

Outra importante via ativada por proteínas G é a via de PKC (Protein Kinase C ou Proteína Quinase dependente de Ca^{+2}) (Nishizuka, 1984). PKC é uma quinase dependente de Ca^{+2} e fosfolípidos, possui um domínio catalítico, cuja atividade é de serina/treonina quinase e um domínio regulatório, que mantém o catalítico inativo. O aumento de Ca^{+2} intracelular e de diacilglicerol na membrana ativam PKC, que é translocada para a membrana (considerada ativa apenas quando ligada à membrana, dependendo da isoforma, algumas isoformas de PKC são ativas no citossol). Diacilglicerol interage com o domínio regulatório de PKC revertendo o efeito inibitório deste sobre o domínio catalítico. PKC é capaz de ativar outras quinases que regulam a expressão gênica (Nishizuka, 1992).

Uma classe especial de proteínas G, descobertas mais recentemente, são as "small G proteins", que também têm atividade intrínseca de hidrólise de GTP, mas são constituídas de uma única cadeia polipeptídica. Uma delas é Ras, com papel central em vias de transdução de sinal ativadas por fatores de crescimento e envolvida em vários tipos de processos tumorais (Bishop, 1983).

As proteínas Ras são ativadas por intermédio de outras proteínas que promovem a troca de GDP por GTP, estas proteínas são as GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor). As GEFs são as proteínas que intermediam o sinal do receptor tirosina quinase ativado pelo ligante e Ras (referidas acima como proteínas que contêm domínios SH2) (McCormick, 1993). Ras ligado a GTP está na sua forma ativa e é capaz de ativar vários efetores. Entre os efetores de Ras estão Raf, PI3K, RalGDS e Rho. Todas estas proteínas desencadeiam vias de transdução de sinais que culminam no controle da expressão diferencial de genes e controlam processos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose e alterações do citoesqueleto.

De interesse especial para este trabalho, é a via de Raf. Raf é uma serina/treonina quinase que ativa a via das MAPK (quinases ativadas por

mitógenos). As últimas enzimas desta cascata quando ativadas, são translocadas para o núcleo e ativam, por fosforilação, fatores de transcrição como Elk (Sun & Tonks, 1994; McCormick, 1993; Feig, 1993). Os fatores de transcrição ativados por fosforilação promovem a transcrição de uma série de genes chamados gene de resposta primária, cuja indução independe de síntese de proteínas.

Figura 1: Vias de transdução de sinal ativadas por receptores tirosina quinase e receptores de sete hélices.

Esquema representativo de vias de transdução de sinal. O esquema representa as membranas citoplasmática, amarelo claro, e nuclear, amarelo escuro. As principais vias estão representadas por diferentes cores, azul e verde as desencadeadas pelo receptor de sete hélices (HR) acoplado a proteína G trimérica, onde a subunidade α ativa adenilato ciclase, aumentando a concentração citoplasmática de cAMP e levando à ativação de PKA. PKA tem vários alvos citoplasmáticos, um deles a quinase MEK, da via das MAPK quinases, cuja atividade é inibida por PKA, e alvo nuclear, CREB que é o fator de transcrição responsivo a PKA, uma vez fosforilado, recruta p300 para o promotor provocando alterações da estrutura da cromatina e ativando transcrição gênica, por exemplo, do promotor do gene X aqui representado em verde claro. As subunidades β/γ (verde) de proteína G ativam fosfolipase C (PLC), que provoca um aumento local, na membrana, de diacilglicerol e fosfatidil inositol 3 fosfato, recrutando desta maneira PKC para a

membrana, ativando-a. PKC tem diversos efetores, entre eles MEK, ativando a via de MAPK. Por outro lado, entre as vias ativadas por receptores tirosina quinase (RTK), a via de MAP quinases, em vermelho, que chega ao núcleo onde MAPK quinase catalisa a fosforilação de fatores de transcrição como Elk, que também é capaz de ativar, juntamente com outros fatores a expressão do gene X, e a via de PI3K e Akt, também ativada por Ras ligado a GTP (a ativação de Ras neste caso também ocorre através de proteínas adaptadoras como Grb2 e de uma GEF como Sos, não foi representado por falta de espaço), também chega ao núcleo controlando expressão gênica através de fosforilação de fatores de transcrição (FT). Ras é ativado quando há fosforilação cruzada de cadeias de receptores tirosina quinase devido à sua ativação por um fator de crescimento. Os resíduos de tirosina fosforilados são reconhecidos por proteínas com domínio SH2 (Src Homology domain 2), como Grb2. Estas proteínas são capazes de ativar outras através de seu domínio SH3 (Src Homology Domain 3), GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor) são ativadas por Grb2, por exemplo, Sos, que catalisa a troca de GDP por GTP em Ras, ativando-a. Os grupos fosfato estão representados em laranja escuro. As proteínas ancoradas à membrana estão representadas com "gancho" preto da proteína à membrana.

Observação: É importante ressaltar que este esquema é uma generalização que utiliza informações de diversos sistemas e ignora várias também, visando a focalização do leitor no contexto que queremos explorar. Não existe ainda um modelo da arquitetura básica do sistema de vias de transdução de sinal, acompanhada dos vários subtipos expressos em diferentes células especializadas.

Genes Envolvidos no Controle da Progressão do Ciclo Celular

Quando uma célula quiescente passa de G0 para G1, há indução de transcrição de vários genes. A primeira onda de transcrição é constituída dos chamados genes de resposta primária, independente de síntese protéica, por exemplo, os genes das famílias fos e jun. Parte dos produtos dos genes de resposta primária são fatores de transcrição que provocam uma nova onda de transcrição gênica, dos chamados genes de resposta secundária, por exemplo, a clássica família AP-1 (activator protein-1) formada por homo e heterodímeros das famílias Fos e Jun regulam a expressão de genes de resposta secundária (Bravo et al, 1986; Cochran et al, 1984; Greenberg & Ziff, 1984; Bravo et al, 1987; Chiu et al, 1988; Ryseck et al, 1988; Ryder & Nathans, 1988) (Figura 2).

Muitos dos genes que controlam a progressão do ciclo celular são chamados proto-oncogenes. Assim classificados porque alterações como mutação, amplificação ou translocação destes genes, que causem super expressão ou atividade constitutiva da proteína, podem levar à perda do controle do ciclo celular provocando neoplasias e tumores. Por outro lado, genes que inibem a progressão do ciclo celular são comumente chamados genes supressores de tumor, neste caso, a falta da expressão do gene ou mutação que deixe inativa a respectiva proteína podem provocar crescimento celular descontrolado.

Importantes entre os genes de resposta secundária estão as ciclinas. Ciclinas são proteínas expressas em fases específicas do ciclo celular. Elas são as subunidades regulatórias dos complexos Ciclinas/CDKs (Cyclin Dependent Kinase), quando estes complexos são formados, as CDKs fosforilam substratos como pRb liberando E2F (Sherr, 1994 e 1995), que por sua vez controla a expressão de outros genes relacionados com a progressão do ciclo celular, por exemplo, ciclina E, que tem que ser expressa durante a transição G1→S (Geng et al, 1996).

Outros genes, importantes supressores de tumor, são os inibidores dos complexos de Ciclina/CDK, KIP (Cyclin Kinase Inhibitor) os INKs (Inhibitors of Kinase 4) e KIPs (Kinase Inhibitor Protein). São proteínas que se ligam aos complexos de Ciclina/CDK inibindo a atividade quinásica de CDK e, portanto, bloqueando a progressão do ciclo celular. Entre estes inibidores estão p16^{INK}, p27^{KIP} e p21^{CIP}, cuja expressão é desencadeada por p53.

Figura 2: Controle de G0→G1→S, expressão gênica e atividade dos produtos protéicos.

A transição G0→G1→S é disparada por estímulo mitogênico. O mitógeno ativa vias de transdução de sinal, como as representadas na Figura 1, levando à expressão dos genes de resposta primária, *fos*, *jun* e *c-myc*. Os produtos destes e de outros genes vão controlar a progressão por G1 através do controle de uma segunda onda de expressão gênica, genes de resposta secundária. Aqui está representada Ciclina D, que forma um complexo com CDK (*CycD/CDK*), catalisando a fosforilação de pRb e liberando E2F. E2F regula a expressão de diversos genes envolvidos no controle do ciclo celular, inclusive de Ciclina E, que também forma um complexo com uma CDK específica (*E/CDK*) e retroalimenta a via de fosforilação de pRb liberando mais E2F. p27^{KIP} é um inibidor dos complexos Ciclina/CDK, sua expressão é regulada por degradação da proteína cuja expressão é elevada em células em G0. A degradação de p27 parece ser mediada por c-Myc, um dos produtos dos genes de resposta primária.

O Proto-oncogene c-myc e a Rede Myc/Max/Mad

c-myc é um proto-oncogene importante na transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$, c-myc é expresso em células estimuladas para entrada em G1 e os níveis do mRNA e da proteína são mantidos durante G1 (Kelley et al, 1983; Cochran et al, 1983). Em 1984, Armelin demonstrou que a expressão ectópica de c-myc promove entrada em S e em 1987, Heikkila demonstrou que a expressão de c-myc é necessária para a progressão de G1, uma vez que a utilização de oligonucleotídeo "antisense" contra mRNA de c-myc bloqueia o ciclo celular (Armelin et al, 1984; Heikkila, 1987).

Na mesma família existem ainda os genes N-myc, L-myc e B-myc, cuja expressão é mais acentuada durante o desenvolvimento embrionário, são, porém genes com alta identidade, seus produtos também são fatores de transcrição (Marcu et al, 1992; Ryan & Birnie, 1996).

Estrutura

O gene de c-myc em camundongos contém três sítios de início de transcrição e em humanos quatro (três em comum), a maior parte da transcrição deste gene ocorre a partir dos sítios de iniciação P_1 e P_2 . Existem vários tipos de elementos "enhancer" que controlam o início de transcrição deste gene e também a elongação da cadeia de mRNA, entre eles sítios para o fator de transcrição E2F, sítios para ligação do fator de transcrição Sp1 e Sp3, para Ets-1, e para proteínas que se ligam nos elementos ME1a1 e ME1a2 (Myc Exon 1 a1 e a2).

Os sítios de início de transcrição mais utilizados são o P_1 e o P_2 originando mRNAs maduros de diferentes tamanhos: 2,2 Kb, 2,4 Kb e 2,3 Kb de P_1 , P_2 e P_3 respectivamente. O mRNA tem meia-vida de aproximadamente 15 a 30 min, podendo ser regulada. Apenas os exons 2 e 3 são traduzidos. Existem também dois sítios de iniciação da tradução, resultando em uma proteína de 67KDa ou 64KDa.

A proteína c-Myc age como fator de transcrição quando dimerizada com a proteína Max. Estas proteínas são classificadas como fatores de transcrição HLH/LZ, isto devido ao fato de apresentarem estes domínios para dimerização “Helix-Loop-Lelix” e zíper de leucina, além destes domínios estas proteínas apresentam um domínio de ligação a DNA e um domínio transativador, contendo os sítios Mb I e Mb II (Myc Box I e II) na região N terminal. A Figura 3 mostra um esquema da estrutura do gene c-myc e da proteína.

Figura 3: Esquema da estrutura do gene, mRNA e proteína c-Myc.

A figura representa o gene c-myc de camundongo, com três sítios de início de transcrição, P₁, P₂ e P₃. O gene contém três exons, dos quais apenas dois são codificantes. 5' e 3'UTR são as porções não codificantes do mRNA, NH₂ e COOH são as porções amino e carboxi terminais da proteína. BR – região básica, HLH –domínio “Helix-Loop-Helix”, LZ – domínio “Leucine Zipper”, Mbl e MbII representam as regiões Myc Box I e II respectivamente, NL –sinal de localização nuclear. A seta vermelha representa o sítio de atenuação da transcrição de c-myc que será discutido posteriormente.

Função

O dímero c-Myc/Max reconhece a sequência consenso CAC(G/A)TG (Blackwell et al, 1990; Blackwood & Eisenman, 1991; Kerkhoff et al, 1991; Prendergast et al, 1991; Prendergast & Ziff, 1991; Blackwood et al, 1992) conhecida como E-box e reconhecida por outros fatores como USF.

A lista de genes alvos de c-Myc é grande, há, porém, muita controvérsia em relação a este assunto. Muitos dos dados acumulados sobre alvos de c-Myc não comprovam que de fato os referidos genes são alvos diretos. Mais ainda, c-Myc é capaz de ativar e reprimir transcrição, inclusive a sua própria. Entre os genes cuja expressão é estimulada por c-Myc estão: ornitina descarboxilase (cujo produto é a enzima que catalisa o passo limitante da via de síntese de poliaminas), α -protimosina (a proteína é expressa durante a fase S, mas sua função não foi totalmente esclarecida), CAD (enzima da via de síntese de pirimidinas), eIF 2 α e eIF 4E (proteínas envolvidas na tradução de proteínas), cdc 25 (fosfatase envolvida na ativação da via de ciclinas e CDKs). Entre os genes reprimidos por c-Myc estão: c-myc (Bello-Fernandez et al, 1993; Eilers et al, 1991, Gaubatz et al, 1995, Eisenman, 1997; Cole & McMahon, 1999; O'Haga et al, 2000), C/EBP α (Li et al, 1994), gadd34, gadd45, gadd153, "growth arrest and DNA damage inducible genes" (Amundson et al, 1998).

Outra discussão não acabada sobre o papel de c-Myc no controle do ciclo celular, é sua relação com as Ciclinas, principalmente Ciclina D e Ciclina E. Em relação a Ciclina D1, aceita-se hoje que c-Myc não tenha nenhum efeito sobre a indução da expressão desta proteína. Acredita-se que c-Myc tenha um papel no controle da atividade do complexo CiclinaE/CDK2/p27. p27 é um inibidor da atividade de Ciclina E/CDK2, e para que o complexo seja funcional, p27 tem que ser degradado. Acredita-se que c-Myc tenha um papel na degradação de p27, não direto, mas talvez por induzir a expressão de uma proteína ainda desconhecida,

que se ligaria a p27, forçando sua dissociação do complexo Ciclina E/CDK2 e sua degradação (revisado em Obaya et al, 1999).

A proteína c-Myc também está relacionada com processo de morte celular, principalmente no caso de proliferação descontrolada e falta de nutrientes. Sabe-se, por exemplo, que a expressão constitutiva de c-Myc leva à transformação celular de vários tipos de linhagens estudadas, mas a superexpressão de c-Myc pode levar à morte celular. Há muita discussão em torno deste tema, principalmente se morte celular induzida por c-Myc é ou não relacionada a p53 (proteína cuja expressão é bastante aumentada quando há dano no DNA celular, esta proteína leva a um bloqueio do ciclo celular ou dispara o mecanismo de apoptose). Alguns autores concordam que c-Myc criaria uma pane na sinalização celular ao ser expressa em condições de carência de nutrientes, outros acham que o fato de c-Myc induzir proliferação faz com que seja uma proteína que tem intrinsecamente a capacidade de aumentar o número de mutações acumuladas e com isso chegar a induzir morte assim como é capaz de induzir transformação celular.

Mecanismo de Ação

Houve progressos em relação ao mecanismo de ação de c-Myc. A proteína c-Myc pode ser dividida em dois domínios: o domínio C terminal, onde se encontra o sítio de dimerização a Max e sítio de ligação a DNA, e o domínio N terminal, correspondente a aproximadamente dois terços da proteína, seria o domínio transativador (Blackwood & Eisenman, 1991). O domínio transativador pode ligar-se a várias proteínas celulares, principalmente através dos sítios Mbl e MbII (Figura 3) e sabe-se agora que é capaz de recrutar TRRAP (Transactivation/Transformation-domain Associated Protein) (Figura 4). TRRAP é um cofator nuclear que faz parte do complexo SAGA (Saleh et al, 1998). O complexo SAGA por sua vez é um importante mediador transcricional, uma vez que um de seus fatores é uma histona acetiltransferase, e é cada vez mais aceito que a modificação da cromatina através da acetilação de histonas é fundamental

para a transcrição de genes pela holoenzima RNA Pol II (Grant et al, 1998, Sthruel, 1999). Recentemente McMahon e colaboradores demonstraram que c-Myc, não só é capaz de recrutar complexos mediadores que contém atividade de histona acetilase, como mostraram que uma quimera c-Myc/hGCN5 (histona acetil transferase humana) é capaz de ativar promotor contendo sítio consenso E box (Mc Mahon et al, 2000).

Os dados mencionados acima indicam que o dímero c-Myc/Max pode funcionar como um regulador geral da estrutura da cromatina. Por outro lado, este dímero pode agir como um fator de transcrição ao modelo de outros como AP-1 (dímeros de Fos e Jun). Neste caso, c-Myc/Max ativaria ou modularia transcrição através da interação com fatores de transcrição da maquinaria basal no promotor do gene alvo (revisado em Cole & McMahon, 1999).

O dímero c-Myc/Max pode também inibir transcrição. Este evento foi caracterizado em genes cujo promotor não contém a sequência TATA, mas o elemento Inr. No caso destes genes a transcrição é iniciada não pela ligação de TFIID, mas por TFII I. O dímero Myc/Max pode ligar-se a TFII I e impedir a ligação dos fatores de transcrição basais inibindo desta forma a transcrição (Roy et al, 1993 a, b).

A atividade do dímero Myc/Max pode ser regulada pela ligação com outras proteínas, por exemplo, p107, da família de pRb, uma vez ligada ao dímero Myc/Max, p107 inibe a atividade do dímero através da ligação ao domínio Mb II de c-Myc, impedindo desta forma a ligação de TRRAP (Beijersbergen et al, 1994).

Fosforilação também regula a atividade de c-Myc, os resíduos mais importantes são Ser-62 e Thr-58. Este resíduos são fosforilados, respectivamente, por MAPK e Glicogênio Sintase Quinase. Aparentemente, fosforilação de Ser62 tem efeito estimulatório sobre a atividade de c-Myc, e mutação deste resíduo diminui drasticamente a atividade transformante de c-Myc (Henriksson et al, 1993; Lutterbach & Hann, 1994). Já o resíduo Thr 58 quando fosforilado tem efeito inibitório, e está envolvido com a estabilidade da proteína, mutação neste resíduo é comum em casos de linfoma de Burkitt e em genes myc retrovirais onde se observa que a proteína c-Myc é muito mais estável do que o normal (Bathia et al,

1993; Henriksson et al, 1993; Lutterbach & Hann, 1994; Papas & Lautenberger, 1985; Showe et al, 1985; Yano et al, 1993). Recentemente foi demonstrado que a degradação de c-Myc ocorre através de ubiquitinação e que de fato o resíduo de Thr 58 está envolvido na sinalização para a degradação de c-Myc, sendo necessário para eficiente ubiquitinação da proteína, há também a sequência PEST, aminoácidos 226 a 270 que são necessários para rápida degradação de c-Myc, mas não para ubiquitinação. (Bahram et al, 2000; Gregory & Hann, 2000).

Controle da expressão de c-Myc

Os efeitos biológicos de c-Myc dependem da sua abundância na célula. As células têm vários mecanismos para controlar a expressão de c-Myc, como mencionado acima, a proteína é degradada por um sistema bem controlado, o sistema do proteasoma 26S.

Porém, a expressão de c-myc é controlada em diversos níveis, iniciação da transcrição, como mencionado anteriormente, o promotor do gene c-myc é bastante complexo e apresenta sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, inclusive E2F e c-Myc.

c-Myc é produto de um gene de resposta primária e vários grupos demonstraram que sua expressão é ativada por fatores de crescimento através de vias clássicas como a das MAP quinases e a via de PKC (Roussel et al, 1994; Barone & Courtneidge, 1995; Kerkoff et al, 1998). Porém, contrariamente ao que ocorre com outros genes de resposta primária que têm um pico de expressão durante a transição G0/G1 e depois voltam ao nível basal, ou deixam de ser expressos, c-Myc é mantido em um nível relativamente alto durante G1.

O gene c-myc possui um sítio de atenuação na porção 3' do exon 1 (Figura 3) (Bentley & Groudine, 1988). Este sítio de atenuação é responsável por uma pausa na transcrição após a iniciação que pode resultar ou não em elongação eficiente do mRNA, dependendo das proteínas e fatores ligados ao promotor, por exemplo, recrutamento de TFIIE e TFIIH levaria a continuação da transcrição de c-myc e a elongação seria eficiente, por outro lado a falta destes fatores levaria à

perda do complexo da RNA Pol II e formação de um transcrito curto, composto somente do exon 1 (Krumm et al, 1995). Em células HL-60 há inibição da expressão de c-myc durante o processo de diferenciação, exatamente através da perda dos complexos de RNA Pol II após a iniciação da transcrição (Bentley & Groudine, 1986).

A estabilidade do mRNA de c-myc também pode ser controlada. Este é um mRNA instável de meia-vida de aproximadamente 15 a 30 min, porém sua meia-vida pode chegar a mais de duas horas, por exemplo, em hepatócitos de embrião de camundongo o mRNA de c-myc é relativamente estável, porém torna-se bastante instável em hepatócitos de camundongos adultos, que têm pouca ou nenhuma expressão de c-myc (Morello et al, 1989). As seqüências que conferem instabilidade a c-myc são: um elemento rico em UA na região 3' terminal não traduzido (AURE) e uma seqüência de aproximadamente 250 nucleotídeos correspondente à parte 3' terminal traduzida do mRNA, CDR (Coding Region instability Determinant), esta região codifica os domínios HLH/LZ (Bonnieu et al, 1988; Herrick & Ross, 1994).

O mRNA de c-myc pode ser degradado por vias alternativas. Por ataque endonucleolítico, através da região codificadora CRD (Coding Region Determinant) ou degradação 3'→5' com remoção prévia da cauda de poliA (Herrick & Ross, 1994; Brewer, 1998).

A seqüência CRD é reconhecida por uma proteína denominada CRD-BP – “CRD Binding Protein”, esta proteína foi isolada e aparentemente ela se liga a CRD impedindo o ataque endonucleolítico e com isso estabilizando o mRNA de c-myc (Doyle et al, 1998; Lee et al, 1998).

A família Mad

Myc não é o único ligante da proteína Max. Existe uma outra família de fatores de transcrição, as proteínas Mad, que também formam dímeros com Max, reconhecem também o elemento E-box e antagonizam a função de c-Myc, reprimindo transcrição ao invés de ativá-la (Ayer et al, 1993; Zervos et al, 1994; Hurlin et al, 1995).

A família Mad é composta por quatro proteínas: Mad-1, -3, -4 e Mxi (ou Mad-2). Estas proteínas têm papel importante durante o desenvolvimento embrionário, apresentando expressão subsequente bastante regulada, além disso, o pico de expressão destas proteínas ocorre durante a organogênese e normalmente não são expressas em tecidos onde há proliferação intensa ou marcação positiva para c-Myc ou N-Myc (Quéva et al, 1998). Resumidamente, Mad-1 está mais associada à diferenciação e normalmente não é expressa em tecidos onde há proliferação, já Mxi e Mad-4 têm uma expressão mais ubíqua, tanto em tecidos embrionários como em adultos, estando presentes tanto em tecidos diferenciados como em tecidos com células em proliferação.

Não há um consenso em relação a diferenças entre as proteínas da família Mad. Elas possuem regiões de alta identidade correspondentes aos domínios de ligação com Max e de recrutamento de mSin3 (será explorado adiante), possuem a mesma capacidade de reverter transformação causada por c-Myc (Ayer et al, 1993; Hurlin et al, 1995; Chin et al, 1995; Västrik et al, 1995). Porém é possível que apresentem diferentes afinidades por seqüências ligeiramente diferentes no DNA de promotores de genes alvo.

Deleção de Mad-1 não tem efeito fisiológico marcante provavelmente devido à compensação por outras proteínas da família. Por outro lado, deleção de Mxi provoca diferentes graus de neoplasia em vários tecidos, o que tem indicado esta proteína como um supressor de tumor (revisado em Foley & Eisenman, 1999).

O mecanismo de ação do dímero Mad/Max é exatamente o oposto de Myc/Max. Consiste no recrutamento das proteínas mSin3 A/B, que por sua vez recrutam histona desacetilases, impedindo remodelamento da cromatina e inibindo a transcrição (Ayer et al, 1995; Laherty et al, 1997; revisado em Claasen & Hann, 1999) (Figura 4).

Considera-se normalmente que em células onde prevalece o dímero Myc/Max a tendência é proliferação, enquanto que em células onde prevalece o dímero Mad/Max há a tendência de bloqueio do ciclo celular e diferenciação (Chin et al, 1995).

Figura 4: Fisiologia e mecanismo de ação dos dímeros c-Myc/Max e Mad/Max.

A. Efeitos biológicos dos dímeros Myc/Max e Mad/Max – Max pode formar heterodímero com uma das proteínas Myc, este dímero promove proliferação, crescimento e transformação celular, além de, em determinadas circunstâncias, promover apoptose. Já os heterodímeros formados com as proteínas da família Mad promovem diferenciação celular. B. Mostra um modelo aceito para a regulação da formação de dímeros com Max, segundo este esquema, a formação de dímeros com Max depende da concentração de Myc ou Mad na célula, sendo que cada uma delas seria expressa em resposta a estímulos diferentes e promoveriam respostas celulares diferentes. C. Representa o mecanismo de ação de cada um destes dímeros, sendo que o dímero Myc/Max recruta para o promotor de seus genes alvo complexos que contêm enzimas com atividade de histona-acetil transferase (HAT), por exemplo, o complexo SAGA. Já o dímero Mad/Max recruta mSin3, que por sua vez recruta enzimas com atividade de histona desacetilase (HDAC). Não está representada

neste esquema a atividade repressora de c-Myc/Max em promotores que dependem de sequência *Inr* para iniciação da transcrição, ou interação com fatores da maquinaria basal de transcrição, cujo efeito é estimulatório.

Y-1, um modelo para estudo da ação de ACTH

ACTH

ACTH, hormônio adrenocorticotrópico ou corticotropina, é um hormônio peptídico de trinta e nove aminoácidos, produto da clivagem da proteína pro-opiomelancortina (POMC), que é processada pela adenohipófise e liberada na corrente sanguínea em resposta ao fator liberador de corticotropina (CRF). O tecido alvo de ACTH é o córtex das glândulas adrenais.

Os principais efeitos de ACTH sobre as glândulas adrenais são controle do desenvolvimento fetal da glândula, indução da síntese e secreção de hormônios esteróides e manutenção e crescimento do córtex adrenal no adulto.

O receptor de ACTH só foi clonado e seqüenciado em 1992, revelando um receptor com sete hélices transmembranares que se associa à proteína G (Mountjoy et al, 1992). O receptor de ACTH é o menor da grande família dos GPAR (G Protein Associated Receptor) e apresenta na sua estrutura primária seqüências de fosforilação por PKA, PKC e caseína quinase II.

A Linhagem Y-1

As células Y-1 foram isoladas e clonadas de tumor funcional de córtex adrenal de camundongo, (Yasumura et al, 1966).

As células desta linhagem apresentam amplificação do gene c-Ki-ras (50 a 80 cópias por célula), com alta expressão do mRNA (10 a 20 vezes mais do que um fibroblasto 3T3) e proteína, sendo que aproximadamente 16% do total de proteína Ras encontra-se constitutivamente ativa (ligada a GTP) (Armelin et al, 1996).

A alta expressão e atividade de Ras são, provavelmente, a causa, ou uma das causas, da transformação destas células e também provavelmente o fator que leva a uma expressão basal alta do proto-oncogene c-myc.

Esta linhagem tem se mostrado bastante estável em cultura (Schimmer, 1981), sendo possível fazer testes em populações que estejam em crescimento exponencial, em meio com 10% de soro fetal bovino, ou ainda em células carenciadas para soro por 48 horas. Em nosso laboratório, consideramos que após 48 horas de carenciamento as células Y-1 estejam no que denominamos fase "G0 like". Chamamos de G0 like a fase em que as células estão quiescentes, param de proliferar, ou seja, não há síntese de DNA, mais que isto, para que as células voltem a sintetizar DNA, elas necessitam de estímulo mitogênico e passagem pela fase G1. Durante esta transição vários genes e proteínas são expressos, e alguns deles têm sido usados como marcadores de transição, c-fos é um deles (Armelin, 1990; Bravo, 1990). Há um ponto importante a ser destacado, a manutenção das células Y-1 em meio livre de soro não é capaz de sincronizar 100% das células da população em G0. O que observamos, ao invés disto, é que uma porcentagem das células escapa ao carenciamento e continua a ciclar.

Apesar de tumorigênica, esta linhagem celular mantém as principais características do córtex adrenal, respondendo a tratamento por ACTH sintetizando e secretando esteróides. Por ter mantido as principais características do córtex adrenal e por ser uma linhagem bem estabelecida em cultura esta linhagem celular tem sido utilizada como modelo para estudo do mecanismo de ação de ACTH (Schimmer, 1981).

Células Y-1 tratadas com ACTH apresentam as seguintes respostas: arredondamento celular, aumento da esteroidogênese, indução ou bloqueio de proliferação dependendo do tempo de tratamento, indução da expressão dos proto-oncogenes fos e jun e bloqueio da expressão do proto-oncogene c-myc (Yasumura et al, 1966; Armelin et al 1977, Wiedman & Gill, 1977; Kimura et al, 1983; Kimura & Armelin, 1988; Kimura et al, 1993a).

A linhagem Y-1 responde muito bem a FGF2. FGF2 é um fator de crescimento típico, que ativa um receptor do tipo tirosina quinase. Em Y-1, FGF2

ativa a expressão de genes de resposta primária como fos e jun, ativa a via de MAPK, induz a expressão de Ciclina D1 e estimula entrada em S (Armelin & Lotfi, 1999, Schwindt & Armelin, resultados não publicados) (Figura 5).

O Mecanismo de Ação de ACTH

O hormônio ACTH como citado anteriormente reconhece na membrana celular um receptor específico do tipo sete hélices transmembranares, sendo este receptor ligado à proteína G. Em Y-1, certamente há expressão de Gs, uma vez que a via de adenilato ciclase é ativada por ACTH, mas não há dados em relação a outros tipos de proteína G. O trabalho de Schimmer e colaboradores mostrou que há ativação da via adenilato ciclase-cAMP-PKA por ACTH, e que esta via é obrigatória no mecanismo de ação de ACTH (Rae et al, 1979). Este grupo demonstrou que mutantes de Y-1 PKA⁻, não produzem hormônios esteróides quando estimulados com ACTH, o mesmo tem sido demonstrado em nosso laboratório (Kimura & Armelin, 1990).

De fato, os principais efeitos de ACTH em células Y-1 são mimetizados por derivados de cAMP (8Br-cAMP e dibutilil-cAMP) (Kimura & Armelin, 1990; Kimura et al, 1993a), são estes: arredondamento celular, aumento da esteroidogênese, indução da expressão de c-fos, bloqueio do ciclo celular em G1. Porém evidências experimentais indicam que PKA não é a única via de transdução de sinal ativada por ACTH e seu receptor, por exemplo, em mutantes Y-1 PKA⁻, ACTH induz a expressão de c-Fos, mostrando que este efeito deve ocorrer através de uma outra via de sinalização.

Existem indicações de que a via de PKC seja uma das vias ativadas pelo receptor de ACTH. PMA (Phorbol-Miristate-Acetate) que mimetiza DAG, e é um conhecido ativador de PKC (Nishisuka, 1992), também é capaz de mimetizar efeitos de ACTH em células Y-1, principalmente no que diz respeito à indução da expressão dos genes e proteínas das famílias fos e jun. Experimentos feitos em nosso laboratório (Frigeri & Armelin, 1996) mostraram que ACTH é capaz de promover aumento da atividade de PKC em Y-1.

O Prof. Schimmer da Universidade de Toronto, Canadá, que vem se dedicando ao estudo do mecanismo de ação de ACTH, como já citado anteriormente, obteve recentemente resultados mostrando que as subunidades β/γ da proteína G ativada pelo sinal de ACTH também teriam um papel no mecanismo de ação deste hormônio, pelo menos no que diz respeito à indução da expressão do próprio receptor de ACTH (Qiu et al, 1996).

Ou seja, o mecanismo de ação deste hormônio é complexo e não está desvendado, PKA é uma via obrigatória na ação de ACTH em Y-1, mas certamente não é a única.

Em relação ao controle da proliferação celular, ACTH tem um forte efeito anti-mitogênico, que aparece claramente quando células são estimuladas por mitógenos, por exemplo, ACTH tem efeito antagônico ao de FGF2, inibindo uma parcela das células, aproximadamente 50%, estimuladas por FGF2 a entrar em S. Células em crescimento exponencial tratadas com ACTH também sofrem bloqueio do ciclo celular na fase G1. Este tipo de efeito de ACTH já foi bem caracterizado e aparece não apenas em Y-1, que é uma linhagem estabelecida, mas também em cultura primárias de adrenal, onde ACTH bloqueia o ciclo celular (Masui & Garren, 1971; Armelin et al, 1977; Weidman & Gill, 1977; Ramachandran & Suyama, 1975; Viard et al, 1993).

Por outro lado tempos de curtos de tratamento, uma a duas horas (sobre células carenciadas para soro, no que assumimos ser uma fase "G0 like") ACTH estimula a transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$, acreditamos, portanto que ACTH tenha também um efeito mitogênico fraco (Armelin et al, 1996; Lotfi et al, 1997). Este conjunto de resultados indica que apesar de ser um hormônio trófico *in vivo*, e apresentar, em circunstâncias determinadas, um efeito trófico limitado em Y-1, ACTH comporta-se mais tipicamente como um agente anti-mitogênico nesta linhagem. A Figura 5 resume os principais eventos promovidos por ACTH e FGF2, do que foi descrito até o momento, em relação ao controle do ciclo celular em Y-1.

Resultados publicados pelo nosso laboratório em 1993 mostravam o seguinte: A. células em crescimento exponencial apresentam alta expressão do mRNA e da proteína c-myc, B. ensaios de Northern blot mostraram redução do

Figura 5: Cascata de eventos promovidos por ACTH e FGF2 em células Y-1.

de sinalização, a cascata de MAP quinases e PI3K (fosfatidil inositol 3 quinase) através de Ras por FGF2 e a via adenilato ciclase-cAMP-PKA através de proteína G trimérica por ACTH, em um período de 2 a 10 min. Cada uma destas vias chega eventualmente ao núcleo, onde irá regular expressão gênica. FGF2 induz a expressão de genes das famílias fos e jun, de Ciclina D1, sendo um forte promotor da entrada em S.

ACTH induz a expressão de c-fos inclusive da proteína, inibe a expressão do mRNA e da proteína c-Myc e bloqueia a entrada em S. A via de PKA media a maior parte dos efeitos de ACTH, inclusive o aumento da esteroidogênese. Os eventos estão representados segundo uma escala aproximada de tempo indicada abaixo. AC- adenilato ciclase, $G\alpha\beta\gamma$ – proteína G trimérica, Erk – MAPK, CREB – Proteína que reconhece o elemento responsivo a cAMP. **P** – fosforilação catalisada por outra proteína, sempre que aparece, neste esquema, significa que a proteína foi ativada (receptor de FGF2 e Erk).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo principal deste projeto é compreender o papel da proteína c-Myc no controle do ciclo celular das células adrenocorticais Y-1, com ênfase no estudo dos efeitos de ACTH e FGF2 na expressão e atividade de c-Myc.

Objetivos Específicos

- Definir os pontos de controle da expressão de c-Myc em células Y-1.
- Verificar se há expressão regulada da proteína Max e das proteínas da família Mad em células Y-1.
- Verificar se e como a expressão de c-Myc é estimulada pela ação mitogênica de FGF2.
- Verificar se e como a expressão de c-Myc é inibida pela ação de ACTH.
- Verificar se expressão ectópica de c-Myc torna células Y-1 resistentes à ação anti-mitogênica de ACTH.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Linhagem Y-1

A linhagem Y-1 foi isolada partir de tumor funcional de adrenocórtex de camundongo (Yasumura et al, 1966). A linhagem Y-1, sublinhagem HSR, mantida no laboratório foi obtida da ATCC (American Type Culture Collection) há vinte e sete anos. Possuímos estoques congelados em nitrogênio líquido que fornecem as células necessárias para a cultura e experimentos.

Clones PKA⁻. Células Y-1 transfectadas permanentemente com o vetor G324D contendo o gene da subunidade regulatória de PKA mutado, resultando em um aumento de 100 vezes no Km para cAMP (Olson et al, 1993). Estes clones foram produzidos, isolados e caracterizados em nosso laboratório (Eichler & Armelin, resultados não publicados).

Bactérias e Plasmídeos

Bactérias DH5 α , uma cepa também derivada de *E. coli*, congeladas em 20% glicerol.

Myc-ER – plasmídeo pBabe puromicina, contém a fusão c-myc/receptor de estrógeno clonada no sítio *Eco RI* (Littlewood et al, 1995). Esta quimera é constitutivamente expressa na célula e a proteína acumula-se no citoplasma. A atividade de c-Myc é induzida por 4-OH-tamoxifen que provoca o transporte da proteína para o núcleo onde se verifica a atividade transativadora de c-Myc (Eilers et al, 1989). Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Prof. Robert Eisenman, Fred Hutchinson Cancer Research Center – Seattle, WA.

pLS – vetor contendo o cDNA, 1,47 Kb (seqüência codificadora) de c-myc de camundongo, clonada de células J558 plasmocitoma (cedido pelo Prof. Kenneth Marcu).

GADPH/Blues – pBluescript SK⁺ contendo um fragmento correspondente ao cDNA de GAPDH de camundongo de 1 a 400 (construído no laboratório).

pEGFP – vetor contendo EGFP clonado sob o controle de SV40 – Clontech Laboratories Inc.

Deg 14 c-fos - cDNA c-fos, fragmento de 1,6 Kb (obtido do laboratório de Rodrigo Bravo, Bristol Myers Squibb Institute, Nutley, NJ).

PGEM1-fosB - cDNA fosB, fragmento de 1,8 Kb (Zerial et al, 1989).

cDNA fra-1, fragmento de 1,5 Kb (obtido do laboratório de Rodrigo Bravo, Bristol Myers Squibb Institute, Princeton, NJ).

PGEM-fra-2 - cDNA fra-2, fragmento de 1,2 Kb (obtido do laboratório de Tom Curran, Roche Institute of Molecular Biology, Nutley, NJ).

LK588 c-jun - cDNA c-jun, fragmento de 2,2Kb (Kovary, não publicado).

Bluescript junB - cDNA junB, fragmento de 1,5 Kb (Almendral et al, 1988).

Bluescript junD - cDNA junD, fragmento de 1,4 Kb (Hirai et al, 1989).

Anticorpos

Anti c-Myc policlonal, Santa Cruz Biotechnology.

Anti c-Myc policlonal – Laboratório Prof. Eisenman, Fred Hutchinson, Seattle.

Anti Max policlonal, Santa Cruz Biotechnology.

Anti Mad policlonal, Pharmingen

Anti Mad-1 policlonal Santa Cruz Biotechnology

Anti Mad-4 policlonal Santa Cruz Biotechnology

Anti Mxi policlonal Santa Cruz Biotechnology

Anti-receptor de estrógeno α , Santa Cruz Biotechnology

Anti mouse IgG e Anti rabbit IgG conjugados com peroxidase – Amershan Pharmacia

Anti mouse IgG conjugado com FITC

Anti- bromodeoxiuridina monoclonal, Amershan – Pharmacia.

Kits

Ready-To-Go T4 DNA Ligase, Pharmacia.

Sequenase version 2.0 DNA Sequencing Kit, USB.

BigDie – Perkin Elmer

Anti-rabbit IgG ABC Kit Vectastain, Vector Laboratories, Inc.

ECL Western blotting - Enhanced Chemiluminescence, Amersham Pharmacia

Peptídeos, Antibióticos e Reagentes

ACTH – peptídeo de 39 resíduos, sintetizado e purificado no laboratório do Prof. Luis Juliano, Departamento de Biofísica, UNIFESP. Estoque 10^{-4} M em PBSA.

Adrenocorticotropina – Sigma, extrato de hipófise de porco. Mantido em estoque 100U/ml em PBSA.

FGF2 – proteína recombinante produzida no laboratório do Prof. Angelo Gambarini, Departamento de Bioquímica, IQ, USP. Estoque 1mg/ml. Diluído sempre em 1 mg/ml BSA.

Actinomicina D – Sigma, estoque 5 mg/ml em etanol.

Gene Porter Reagent 2 – Gene Therapy Systems.

PD98059 - inibidor MEK-1, BioLabs = New England.

4'OH Tamoxifen – Sigma, estoque 10 μ M em etanol.

Geneticina – Gibco BRL, estoque 100 mg/ml em água.

BSA – albumina bovina – Sigma.

Ampicilina – Sigma, estoque 100 mg/ml em água.

Trizol - Gibco BRL.

DNA de espermatozoide de salmão = dissolvido em H₂O e fragmentado com seringa hipodérmica.

Reagente de Bradford- Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate.

Isótopos radioativos

γ ³²P dATP (3000 Ci/mmol), procedência Du Pont

α ³²P dATP (3000 Ci/mmol), procedência Amersham ou Du Pont

α ³²P dCTP (3000 Ci/mmol), procedência Du Pont

α ³²P UTP (3000 Ci/mmol), procedência Amersham ou Du Pont

α ³²P ATP (3000 Ci/mmol), procedência Amersham ou Du Pont

Oligonucleotídeos

Random Primer, procedência Pharmacia

Oligonucleotídeos para análise de expressão de mRNA por RT-PCR

Desenhados no laboratório, utilizando-se o programa Gene Runner, e sintetizados pela empresa Biosynthesis.

c-myc sense 5'GCA AAC ACA GCA CCA GCC TGA G3'

c-myc antisense 5'TTG CGG TTG TTG CTG ATC TGC3'

myn (mouse max homologue)

sense 5'CAA GCG GGC TCA CCA TAA TGC3'

myn antisense 5'TGG CCT CCA TCC GGA GTT TC3'

mad-1 sense 5'GTC GGG ATG AAC ATC CAG CTG C3'

mad-1 antisense 5'CCC GCT GAA GCT GGT CTA TTT GG3'

mad4 sense 5'AAC AGC TTC AGC GGG AAC ATC G3'

mad4 antisense 5'GTG GTC ATC GGC ATC ACT GCT G3'

mxi sense 5'TCC CGC TG GCC CAG ACT GCA CC3'

mxi antisense 5'CGC TCC ATC TCC TGA GGC CCC TGC3'

Métodos

Cultura de Células

Em cultura, as células são mantidas em garrafas de poliestireno, em meio DME (Dubbelco's Modified Eagle's Medium, Sigma), suplementado com 1,2 g/l bicarbonato de sódio, 25 mg/l ampicilina, 100 mg/l sulfato de estreptomicina e 10%

soro fetal bovino (FCS) obtido da Cultilab, em estufa com circulação de mistura de ar e 5% CO₂.

Troca-se o meio de cultura das garrafas a cada dois ou três dias. Quando necessário, as células são subcultivadas ou expandidas. O procedimento consiste em aspirar o meio da garrafa, lavar as células com PBSA (solução salina isotônica sem sais de Ca⁺² e Mg⁺²), soltar as células do substrato através de digestão com tripsina. A suspensão é diluída em PBSA ou DME 10% FCS e distribuída em várias garrafas, no caso de expansão ou uma fração é transferida para outra garrafa, no caso de subcultura. O mesmo procedimento é utilizado para plaqueamentos e a suspensão de células é distribuída em placas de Petri com meio de cultura.

Carenciamento

O carenciamento é feito com as células em subconfluência, consiste em lavar a placa duas vezes com PBS e então adicionar o volume adequado de meio DME sem soro fetal bovino ou qualquer outro fator de crescimento. O carenciamento dura 48 horas, em seguida é feito o experimento.

Manipulação de Bactérias e Preparação de Plasmídeos

Bactérias DH5 α foram feitas competentes segundo o método Hanahan (1983).

As bactérias utilizadas foram sempre crescidas em LB com 100 μ g/ml Ampicilina.

Plasmídeos para transfecção foram isolados por lise alcalina seguida de gradiente em CsCl, conforme descrito em Sambrook et al, 1989.

Mini-preps foram feitas por lise alcalina, seguida de extrações fenol/clorofórmio e precipitação com etanol, também descrito em Sambrook et al, 1989.

Todas as preparações de plasmídeos foram checadas e quantificadas em gel 1% agarose em 1X TBE corado com 0,1 μ g/ml Brometo de Etídio e também por absorbância a 260 e 280 nm.

Ensaio de alongação de cadeia nascente de RNA – run-on

Principais objetivos do ensaio

Este ensaio foi utilizado com o propósito de medir-se as intensidades ou graus de transcrição dos genes de interesse em células Y-1 tratadas com diferentes fatores. O ensaio consiste do isolamento dos núcleos de células tratadas, de forma que retenham o complexo de transcrição com capacidade de terminar as cadeias de RNA já iniciadas, mas sem capacidade de iniciar novas cadeias.

Os núcleos isolados são incubados com precursores radioativos e demais condições que permitam a terminação das cadeias de RNA em polimerização. Para medir o grau de transcrição dos genes de interesse o RNA radioativo isolado, após incubação, é utilizado em ensaio de Northern reverso. Para tanto, as sondas de DNA dos genes de interesse são desnaturadas e fixadas em tiras de membrana de nitrocelulose, que são hibridizadas com o RNA radioativo isolado e expostas a filme de raio X (Ausubel et al, 1987).

Depois de revelados, os filmes de raio X podem ser densitometrados para estimar graus de transcrição. Portanto o ensaio baseia-se na medida da quantidade de cadeias de RNA iniciadas por gene num dado momento e nas condições escolhidas (Figura 6).

É importante notar que graus de transcrição medidos por run-on, dependem do tamanho do gene. Logo, é possível fazer-se comparação de valores para um mesmo gene, mas comparação entre diferentes genes pode ser enganosa.

Figura 6: Representação de ensaio de elongação de cadeia nascente de RNA e resultado esperado.

Esquema de uma reação de elongação de cadeia nascente de RNA. No esquema estão representados os complexos de transcrição, círculos verdes, que estão transcrevendo um gene qualquer em núcleos isolados no momento em que eles são extraídos e congelados-A. O RNA nascente é marcado metabolicamente por incorporação de precursores radioativos, no caso a $^{32}\text{PUTP}$, o RNA marcado está representado parcialmente em preto, a porção que já havia sido polimerizada e em vermelho, a porção marcada-B. O RNA nuclear é extraído e hibridizado com uma membrana contendo sondas de DNA. A figura mostra o que seria o resultado obtido com a exposição de um filme à membrana-C. Neste modelo hipotético, observa-se que há variação da taxa de transcrição dos genes A, K e X em função do tempo de tratamento ou concentração da droga com que as células foram tratadas. O gene Z tem transcrição constitutiva, e serve como controle interno para o experimento.

Procedimento

Isolamento de núcleos

Células Y-1 foram semeadas em placas de 500 cm², ao atingirem a densidade desejada as células foram carenciadas em meio livre de soró por 48 horas.

As células foram submetidas a tratamentos com 5ng/ml FGF2, 20% soro fetal bovino ou 0,1U/ml adrenocorticotropina por períodos variados. Após os citados tratamentos as células foram lisadas e os núcleos isolados como descrito a seguir:

1. Cada placa foi lavada duas vezes com PBS-A gelado.
2. As células foram raspadas em PBS-A com o auxílio de um "cell scraper" ou "policia" e transferidas para um tubo cônico.
3. As células foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm em centrífuga clínica.
4. O sedimento foi disperso por agitação em "vortex", em velocidade máxima.
5. Sobre o sedimento, ainda em agitação, pipetou-se 4ml de tampão de lise, agitou-se por mais 10s.
6. A suspensão foi incubada em gelo por 5 min.
7. A suspensão, agora de núcleos, foi sedimentada em centrífuga analítica a 2000 rpm por 5 min.
8. O sobrenadante foi descartado, o sedimento de núcleos foi disperso sob agitação máxima em "vortex". Procedeu-se como nos passos 4 e 5.
9. A suspensão foi sedimentada como no passo (7).
10. O sobrenadante foi descartado e a superfície do sedimento de núcleos foi lavada com tampão de estocagem e em seguida, o sedimento nuclear foi ressuspenso em 150µl de tampão de estocagem e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

Observações:

1. Todos os reagentes utilizados foram esterilizados e utilizados a 4°C ou mantidos em gelo, assim como a centrífuga foi pré-resfriada e utilizada à temperatura de 4°C.
2. Alíquotas foram retiradas da suspensão de núcleos no tampão de estocagem e o número de núcleos foi determinado por contagem em hemocitômetro (Câmara de Neubauer). O procedimento fornece de $2,0$ a $2,5 \cdot 10^7$ núcleos por placa.

Tampão de lise: 10,0 mM Tris HCl, pH 7,4

10,0 mM NaCl

3,0 mM MgCl₂

0,5% Nonidet P-40

Tampão de estocagem: 40% glicerol

5,0 mM MgCl₂

50,0 mM Tris HCl, pH 8,0

0,1 mM EDTA

Preparação das membranas com as sondas de DNA

Cada preparação de RNA nuclear foi hibridizada com uma tira de membrana de nitrocelulose contendo 2µg de fragmento de DNA de interesse, no caso fragmentos de c-myc, GAPDH e c-fos, ou ainda, o plasmídeo SK⁺ Bluescript como controle negativo e DNA genômico de Y-1 como controle positivo.

Os fragmentos de DNA foram obtidos por digestão dos plasmídeos e purificação por eletro-eluição após a separação dos fragmentos em gel de agarose. No caso de DNA genômico de Y-1, este foi obtido por ultracentrifugação de lisados de Y-1 em 4M guanidina isotiocianato e 5,7M Cloreto de Césio, conforme descrito em Sambrook et al, 1989.

As sondas foram desnaturadas em tubos Eppendorf incubados em água fervendo por 10 min. Os fragmentos desnaturados foram diluídos em solução 8x SSC e fixados na membrana utilizando-se o aparato "The Convertible Filtration Manifold System" da Gibco BRL. Após a aplicação dos fragmentos, as membranas foram fornadas a 80°C por 2h, estando prontas para a hibridização.

Reação de alongação das cadeias nascentes de RNA

Esta parte do experimento é a polimerização das cadeias de RNA já iniciadas que possibilitará a marcação do RNA através da incorporação de precursor marcado.

Os núcleos foram descongelados à temperatura ambiente e imediatamente diluídos em 1 volume de tampão de reação, recém preparado, em seguida a suspensão foi levada a banho a 37°C, com agitação periódica por 30 min. Imediatamente os núcleos foram lisados por adição de 1ml de 4M guanidina isotiocianato com 1mM β -mercaptoetanol. A partir deste lisado foi feita a extração do RNA nuclear.

Tampão de reação:

2x tampão de reação sem precursores

40 U/ml RNasin (Pharmacia)

10 mM CTP

10mM GTP

0,40 mCi $\alpha^{32}\text{P}$ UTP

0,40 mCi $\alpha^{32}\text{P}$ ATP

0,1 mM DTT

Tampão de reação sem precursores: 10,0mM Tris HCl pH 8,0

5,0mM MgCl_2

0,3 M KCl

Extração e purificação do RNA nuclear

A extração do RNA nuclear foi feita de acordo com procedimento descrito por Sambrook et al, 1989, (modificado a partir de Strolman et al, 1977 e MacDonald, et al, 1989) que utiliza ultracentrifugação do lisado em colchão de cloreto de cério. As amostras de RNA obtidas após a extração e purificação foram imediatamente diluídas em solução de hibridização, desnaturadas por temperatura e hibridizadas. Aliquotas de cada amostra foram retiradas, as atividades dos RNAs obtidos foram determinadas em cintilador, em média a atividade das preparações de RNA, em diferentes experimentos, oscilou entre 1.10^6 a 5.10^6 cpm/preparação de RNA.

Pré-hibridização, hibridização, lavagem e exposição das membranas contendo as sondas de cDNA

As membranas foram hibridizadas e pré-hibridizadas em solução contendo: 50% formamida, 5x SSPE, 5x Denhardt, 0,1% SDS e 0,1 mM NaPPi. As membranas foram pré-hibridizadas por uma hora a 42°C e hibridizadas por 24 horas à mesma temperatura.

Após a reação de hibridização as membranas foram lavadas 4 vezes em 2x SSPE, 0,1% SDS e 1mM NaPPi, 2 vezes por 5 min e 2 vezes por 15 min, à temperatura ambiente. E em seguida lavadas 2 vezes em 0,1x SSPE e 0,1% SDS por 15min cada vez, a primeira à temperatura ambiente e a segunda a 50°C.

As membranas foram parcialmente secas em papel de filtro, embrulhadas em filme PVC, e colocadas em cassete com um filme de raio X exposto em freezer - 70°C por períodos entre uma semana e um mês.

Análise da meia-vida do mRNA de c-myc

Principais objetivos do ensaio

Este ensaio foi utilizado com o propósito de detectar alterações na estabilidade do mRNA de c-myc em células Y-1 após tratamento com ACTH ou FGF2.

Contrariamente a ensaios de alongação de cadeia nascente de RNA (run-on), onde se estima grau e cinética de transcrição, portanto de síntese de um dado RNA, ensaios de Northern Blotting nos permitem medir a abundância de um dado RNA na população de RNA total (steady state), isto é, o nível resultante do equilíbrio entre síntese e degradação.

O racional do experimento aqui descrito é bloquear a síntese de RNA com Actinomicina D após um período de estimulação das células com ACTH ou FGF2, e então coletar células após períodos variados para medirmos a cinética de degradação do RNA de interesse uma vez que sua síntese foi inibida. Como a degradação deve obedecer a uma cinética de primeira ordem, um gráfico semi-log permitirá uma estimativa de meia-vida do RNA de interesse (Figura 7).

Figura 7: Análise da meia-vida do mRNA de c-myc – protocolo e resultado esperado.

A. O protocolo para análise da meia-vida do mRNA de c-myc foi a estimulação da síntese do mesmo por um fator qualquer, e no pico de indução máxima da expressão adição de um inibidor de transcrição, no caso Actinomicina D. Após a adição do inibidor coletam-se amostras de material em períodos variados para a extração de RNA e ensaios de Northern blotting. Os dados obtidos permitem chegar a uma cinética do decaimento do mRNA como demonstrado abaixo. B. O gráfico representa a cinética da expressão do mRNA após estímulo com os fatores A ou B. O inibidor de transcrição foi adicionado durante o pico de expressão do RNA em questão. Observa-se que os fatores A e B modulam diferentemente a estabilidade do mRNA. Os valores de meia-vida em cada caso podem ser deduzidos da inclinação da reta obtida.

Procedimento

Extração de RNA

Para ensaios de Northern blotting, foi feita a extração de RNA total de células Y-1 com TRIZOL, Gibco BRL, seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 60 ou 100 mm de diâmetro, após atingirem a densidade ideal foram carenciadas em meio livre de soro por 48 horas e então foi feito o experimento.

Após as adições necessárias, o meio de cultura de cada placa foi descartado e o excesso cuidadosamente retirado antes da adição de Trizol. Utilizamos 0,5 a 1,0 ml de Trizol dependendo do número de células a ser lisado.

O RNA resultante da extração foi dissolvido e congelado em água MilliQ tratada com 0,1% de Dietilpirocarbonato. As amostras de RNA foram quantificadas a 260 nm, e o grau de pureza analisado pela relação Abs. 260nm/280nm.

Northern Blotting

De cada amostra de RNA, 15µg foram diluídas em 1X tampão de amostra, desnaturadas a 65°C por 5 min e aplicadas em gel desnaturante (1% agarose, 3,7% formaldeído, 1X MOPS).

A eletroforese foi feita em tampão MOPS 1X, com uma ddp de aproximadamente 5V por cm do comprimento do gel.

Após a corrida, o gel foi lavado abundantemente com água, sob agitação, 3 vezes de 30 min. Em seguida foi saturado com 15X SSC e então foi montada a transferência para membrana de nitrocelulose por capilaridade.

Após a transferência a membrana foi passada rapidamente por uma solução 6X SSC e enfiada por 2 horas a 80°C.

Tampão de amostra 5X: 50% formamida deionizada
3,7% formaldeído
1X MOPS

1X corante

Corante 5X: 50% glicerol

0,125% xileno cianol

0,125% azul de bromofenol

TE

Preparação da sonda radioativa

A sonda foi marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP por "random priming", ou seja, o DNA correspondente à sonda foi desnaturado na presença de um oligonucleotídeo hexâmero randômico, e em seguida adicionou-se precursores para polimerização das fitas complementares do DNA, a partir do oligonucleotídeo randômico, DNA polimerase e um tampão adequado.

Para cada hibridização, utilizamos 25ng de DNA, fragmento de cDNA. O DNA foi fervido juntamente com 100 μM de oligonucleotídeo randômico pdN6 por 5 min e imediatamente colocado no gelo.

À mistura de DNA adicionou-se 0,1mM de dNTP(-dCTP), 1X "filling in buffer", 1U Klenow e 50 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP. A reação foi incubada a 37°C por pelo menos 3 horas, em seguida foram feitas duas extrações com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol, utilizamos até 10 μg de RNA transportador de levedura como carregador. Foram utilizadas apenas sondas com atividade específica igual ou superior a 10⁸cpm/ μg de DNA.

Hibridização

As membranas foram pré-hibridizadas por, no mínimo 3 horas, a 42°C em: 50% formamida, 5X Denhardt, 5X SSPE, 0,1% SDS, 200 $\mu\text{g/ml}$ DNA esperma de salmão. Em seguida, a solução de pré-hibridização foi descartada, e as membranas foram hibridizadas em solução: 50% formamida, 5X Denhardt, 5X SSPE, 0,1% SDS, 200 $\mu\text{g/ml}$ DNA esperma de salmão, 5% sulfato dextrana e a sonda desnaturada, por aproximadamente 20h a 42°C.

Em seguida, as membranas foram lavadas da seguinte forma: 2 vezes de 20min, à temperatura ambiente em 1X SSC, 0,1% SDS, e 2 vezes de 30 min, uma à temperatura ambiente e outra a 50°C, em 0,1X SSC, 0,1% SDS, 1 mM NaPPi.

Cada membrana foi embrulhada em filme plástico e um filme de raioX foi exposto a ela em cassete com telas intensificadoras, a -80°C.

Deteccção dos mRNAs da família Mad em Y-1 através de RT-PCR

Para a detecção dos mRNAs da família mad, em Y-1, utilizamos amostras de RNA total de Y-1 utilizadas também nos ensaios de Northern Blotting, de forma que o método de extração e purificação de RNA neste caso é o mesmo que o descrito anteriormente.

Reação de Transcriptase Reversa

Para cada reação de transcriptase reversa foram tomados de 1 a 2 µg de RNA total de Y-1 e tratado com DNase I livre de RNase, segundo especificação do fabricante. Aliquotas dos RNAs assim tratados foram separadas para teste para presença de DNA através de reação de PCR, mas sem prévia síntese da fita de cDNA.

Os RNAs tratados com DNase I foram utilizados para a reação de Transcriptase Reversa com Superscript II– Gibco BRL, utilizando-se oligo dT como primer para a reação. Em geral foi utilizado aproximadamente 1µg de RNA por reação.

PCR

As reações de PCR foram feitas com 100 a 200 ng de cDNA, seguindo as especificações do fabricante da enzima.

Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel 1% agarose em 1X TBE corado com brometo de etídeo.

Estudo da expressão de proteínas em células Y-1

O estudo da expressão de proteínas foi feito por Western Blotting ou ensaios de imunocitoquímica, utilizando reação de peroxidase e precipitação de substrato para revelação da reação.

A diferença fundamental entre os dois métodos é que um analisa quantidade ou concentração da proteína de interesse por quantidade de proteína total do lisado do qual foi detectada – Western Blotting. Por outro lado, o ensaio de imunocitoquímica permite uma análise da população, ou seja, permite verificar em uma população de células quantas expressam a proteína em questão, sendo pobre para a determinação da concentração de proteína por célula. Idealmente um pesquisador gostaria de utilizar os dois métodos e ter informações complementares, porém cada um deles apresenta limitações técnicas que serão brevemente discutidas adiante, já que este foi um dos passos limitantes para o desenvolvimento deste projeto.

A principal limitação para detecção de proteínas é a obtenção de anticorpos de boa qualidade. No caso de c-Myc nós testamos diversos anticorpos comerciais e alguns anticorpos gentilmente cedidos pelo Prof. Robert Eisenman, Fred Hutchinson - Seattle, pelo Prof. Don Ayer, University of Utah e pelo Prof. Paulo Lee Ho, Instituto Butantã. Uma questão importante em relação a anticorpos contra c-Myc é que a esmagadora maioria é feita contra antígenos humanos, e de fato encontram-se, na literatura, excelentes resultados de Western Blotting, imunoprecipitação, imunocitoquímica em sistemas onde há expressão endógena

ou ectópica de c-Myc humano. Nós, porém, precisávamos detectar a expressão de c-Myc de camundongo.

Entre as tentativas de otimização de métodos para a análise de c-Myc em Y-1 nós tentamos utilizar extratos nucleares, com o objetivo de enriquecer a amostra a ser analisada, ou extratos totais de células Y-1 lisadas em diversas condições, tampão RIPA, tampão hipotônico com NP-40, tampão desnaturante com β -mercaptoetanol, ou ainda tampões descritos em artigos da literatura. O método descrito neste trabalho será o que foi utilizado para a obtenção dos resultados apresentados.

Um fator importante é a utilização de linhagens celulares que sirvam de controle para testar o anticorpo em questão, por exemplo, a linhagem A31 (fibroblastos de camundongos Balb 3T3) foi utilizada como controle para os experimentos de imunocitoquímica, pois esta linhagem sabidamente expressa nível muito baixo ou nenhum de c-Myc quando submetidas a carenciamento, porém estimulação com soro fetal bovino faz com que a grande maioria das células apresente uma forte marcação nuclear após reação de imunocitoquímica com anti-c-Myc. A linhagem HL60 foi utilizada em ensaios de Western Blotting como controle para a expressão de c-Myc, pois estas células apresentam alta expressão de c-Myc quando mantidas em crescimento exponencial em meio com 10% de soro fetal bovino, porém após tratamento com éster de forbol a expressão de c-Myc é fortemente inibida. A linhagem HeLa foi utilizada como controle para anticorpo anti-Mad.

Outro fator em relação a anticorpos é que apesar de garantido pelos fabricantes, normalmente um mesmo anticorpo não é capaz de reconhecer a proteína alvo em ensaios de imunocitoquímica, Western Blotting e imunoprecipitação, pelo contrário, se o anticorpo funcionar para uma destas técnicas o pesquisador pode considerar este anticorpo satisfatório. Mais do que isso, partidas diferentes de um mesmo anticorpo têm comportamento diferente e normalmente é necessário otimizar vários parâmetros como diluição do anticorpo e período de incubação. Ou pior ainda, no caso de anticorpo anti-c-Myc da Santa Cruz, chegamos a ter partidas de um mesmo anticorpo que não reconheciam mais

a proteína em ensaios de Western Blotting apesar de funcionarem da mesma forma em ensaios de imunocitoquímica.

Conseguimos em nosso laboratório detectar a proteína Max em ensaios de imunocitoquímica, em ensaios de retardamento de oligonucleotídeo em gel (resultados não serão apresentados) e ensaios de imunoprecipitação, mas não em Western Blotting. As proteínas Mad só foram detectadas em ensaios de Western Blotting. A proteína c-Myc foi detectada em ensaios de imunocitoquímica e Western Blotting.

Um ponto que é bastante discutido é a quantificação de experimentos de imunocitoquímica, não em relação ao estudo da população, mas em relação à intensidade de marcação obtida. Há obviamente, variações de um experimento para outro, devido a variadas razões, entre elas, reagentes de lotes diferentes, lamínulas lavadas de forma diferente. Pode-se, porém observar que em dadas condições observa-se uma forte marcação, enquanto em outras fraca marcação. A reprodutibilidade de experimentos que apresentam o mesmo padrão nos dá uma idéia grosseira de nível de expressão da proteína por célula.

Ensaio de Imunocitoquímica

Principais objetivos do ensaio

Este procedimento consiste na detecção da proteína de interesse *in situ*, através da fixação das células em lamínulas, seguida de uma imunoreação. Uma das grandes vantagens deste tipo de experimento é o pequeno número de células necessário para o ensaio. Além disso, conta-se aproximadamente 500 células por lamínula e duas lamínulas por condição, ou seja, por experimento, conta-se 1000 células de cada condição. Levando-se em conta que a resposta de cada célula é um evento independente, a amostra para teste é bastante grande.

Utilizamos esta metodologia também para determinação da cinética de degradação de c-Myc. Neste caso, após carenciamento, as células foram tratadas com ACTH, FGF2 ou combinação de ambos, ou não tratadas, de forma que

houvessem várias lamínulas em cada placa em uma das condições citadas. Após 4 horas de incubação, retirou-se uma duplicata de lamínulas de cada placa para controle e adicionou-se 5µg/ml Cicloheximida a cada placa, sendo retiradas e fixadas, a períodos determinados, duas lamínulas, até que todas as lamínulas fossem fixadas. As células fixadas foram submetidas ao procedimento descrito abaixo e a porcentagem de células marcadas determinada por contagem ao microscópio. A cinética de degradação da proteína foi determinada indiretamente pela detecção de núcleos marcados na população, ou seja, através da curva de diminuição da porcentagem de núcleos marcados para c-Myc pode-se inferir a meia-vida da proteína.

Procedimento

As células são semeadas em lamínulas redondas, aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/cm² em meio DME 10% FCS. Após 24 horas do plaqueamento as células são carenciadas em DME livre de soro por 48 horas, ou para experimentos com células em crescimento exponencial, o meio é trocado 24 horas antes do experimento. Após tratamentos as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas em 3,7% formaldeído em água ultrapura por 20 min, temperatura ambiente. O período de manutenção das células em formaldeído pode ser aumentado (até 40 min) se for percebido posteriormente que as células soltam-se da lamínula. Em seguida as células foram lavadas com PBSA 3 vezes e guardadas na geladeira em PBSA, até posterior utilização.

O procedimento a seguir foi feito invertendo as lamínulas de modo que as células ficassem em contato com uma gota de 40 µl das soluções citadas. Todas as lavagens foram feitas invertendo-se novamente as lamínulas em bandejas multiwell com PBSA a temperatura ambiente, sem agitação.

Tratamento com detergente – facilitação da difusão do anticorpo na célula fixada

As células fixadas foram permeabilizadas em solução de 1% NP-40 em PBSA por 20 min, à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas uma vez com PBSA.

Bloqueio com proteína inespecífica

Foi executada então uma etapa de bloqueio com 5% soro de boi ou cabra em solução 0,3% TritonX100 em PBSA, incubada por 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida.

Após esta incubação as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBSA, 10 min cada lavagem.

Reação com anticorpos específicos

As células foram então incubadas com anticorpo primário diluído em solução 0,3% TritonX100, 1mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) em PBSA durante a noite a 4°C em câmara úmida.

Novamente as células foram lavadas três vezes com PBSA, 10 min cada lavagem.

Em seguida, fez-se a reação com o anticorpo secundário (anti-rabbit, kit Vectastain) diluído 1:200 em solução contendo 15 µl/ml soro bovino ou de cabra, 0,3% TritonX100 em PBSA. A incubação foi feita a temperatura ambiente por 1 hora em câmara úmida.

Novamente as células foram lavadas três vezes com PBSA, 10 min cada lavagem.

As células foram então incubadas com um complexo avidina/biotina (kit Vectastain) 5µl de cada reagente/ml da solução 0,3% TritonX100 em PBSA por 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida.

Novamente as células foram lavadas três vezes com PBSA, 10 min cada lavagem.

Foi feita então a reação de detecção do anticorpo através da reação de oxidação de 3,3'-diaminobenzidina (utilizado na forma de tabletes Sigma Fast, que já contém peróxido de hidrogênio, dissolvido em H₂O) o que produz um precipitado de cor marrom, onde o anticorpo está ligado.

As lamínulas foram coladas em lâminas de vidro com Entellan, secas, contra-coradas com hematoxilina e diferenciadas com carbonato de lítio (solução saturada). O processo de contra-coloração e diferenciação cora de azul os núcleos não marcados facilitando a contagem das células ao microscópio. Novamente as lâminas foram secas e sobre cada lamínula foi colocada uma gota de óleo mineral e uma lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio Nikon nos aumentos de 200 e 400 vezes.

Western Blotting

Os ensaios de Western Blotting foram utilizados para a detecção de c-Myc, e das proteínas Mad em lisados totais ou em produtos de imunoprecipitação com anti-Max. Neste caso, o lisado celular foi fracionado em gel desnaturante de poliacrilamida e o material foi transferido para membrana de nitrocelulose, onde então, fez-se reação com anticorpos específicos e detecção.

Extrato total de células Y-1

As células foram semeadas em placas de 100 ou 60 mm de diâmetro, densidade de aproximadamente 10⁵ células/cm². Após 24 horas, as células foram carenciadas por 48 horas e então tratadas.

Todo o procedimento foi executado no gelo com soluções geladas. Cada placa foi lavada duas vezes com PBSA, removendo-se todo o excesso. Adicionou-se de 100 ou 200 μ l de tampão de NP-40 (placas 60 e 100 mm de diâmetro, respectivamente) para extrato total e raspam-se as placas com o auxílio de um policial. Transferiu-se o conteúdo para um tubo Eppendorf, incubou-se no gelo por 20 minutos. Centrifugou-se a 14000 RPM por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado, aliquotado e imediatamente congelado em gelo seco.

Tampão NP-40 para extrato total - 1% Nonidet P-40

10 mM NaCl

20 mM Tris HCl pH 7,4

1,0 mM ortovanadato de sódio

2 μ g/ml aprotinina

2 μ g/ml pepstatina

1 μ g/ml leupeptina

1mM PMSF

1mM DTT

Quantificação de proteínas

Proteínas foram quantificadas colorimetricamente através de reagente de Bradford (20%) com leitura de absorbância a 595nm.

SDS-PAGE e Blotting

Tomaram-se 100 a 150 μ g de proteína do extrato total e adicionou-se tampão de amostra na concentração final 1x. A seguir as proteínas foram fervidas por 10 min. As proteínas foram fracionadas em gel 10 ou 12% poliacrilamida (Myc e Mad respectivamente). A seguir fez-se a transferência para membrana de nitrocelulose (Hybond-C) aplicando-se uma voltagem de 20V por 1h. A membrana foi corada com Ponceau para verificação da eficiência da transferência.

2 X Tampão de Amostra de SDS-PAGE – 100 mM Tris HCl

200mM ditioneitol

4% SDS

0,2% azul de bromofenol

20 % glicerol

Tampão Transferência - glicina 39mM

Tris base 48mM

SDS 0,037%

20% metanol

Tampão de Corrida SDS-PAGE - 25 mM Tris-base

250 mM glicina

0,1% SDS, pH 8,3.

Corante Ponceau - 0,1% Ponceau, 10% ácido acético glacial.

Reação com anticorpos específicos e detecção das proteínas

Fez-se o bloqueio das membranas incubando-se cada uma delas em 20 ml de solução de 5% leite desnatado em TBST por 1 hora, sob agitação à temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes com TBST e incubou-se com o anticorpo primário diluído 1:1000 em TBST com 1mg/ml BSA por 1 hora (no caso dos anticorpos anti-Mad), ou com o primário diluído 1:300 em TBST por no mínimo 2 horas (no caso do anticorpo anti-c-Myc Santa Cruz), ou ainda com anticorpo primário diluído 1:2000 em 1mg/ml BSA em TBST por 1 hora (anti-c-Myc doado pelo Prof. Bob Eisenman).

Lavou-se três vezes novamente com TBST e incubou-se com o anticorpo secundário HRP (Horseradish Peroxidase) diluído 1:1000 em TBST por 1 hora. Lavou-se a membrana três vezes com TBST e fez-se a detecção com o kit ECL (Enhanced Chemiluminescence).

ECL Western Blotting é um método não radioativo de emissão de luz, utilizado amplamente para detecção de antígenos específicos. O princípio da reação de quimiluminescência é a oxidação do luminol por H₂O₂. Após a oxidação

o luminol encontra-se no estado excitado e decai para o estado fundamental por emissão de luz. A oxidação do luminol em presença de "enhancers", como, por exemplo, fenóis, resultando em um aumento de cerca de 1000 vezes na emissão de luz. O tempo de exposição dos filmes varia de 5 segundos a 30 min.

TBST - 150 mM NaCl, 50 mM Tris.HCl, 1% Tween-20, pH 7,5.

Imunoprecipitação com anti-Max para detecção de c-Myc e Mad

O objetivo deste ensaio foi verificar se diferentes tratamentos feitos com Y-1 que modulam a expressão de c-Myc, teriam também efeito sobre a proteína que estaria preferencialmente ligada a Max. Este seria um dado importante uma vez que não existem homodímeros biologicamente ativos de c-Myc, desta forma a proteína ligada a Max deve ser a mais importante para a determinação dos efeitos biológicos de FGF2 e ACTH em Y-1.

Para imunoprecipitações utilizamos os lisados totais descritos acima.

"Pré-clearing"

Utilizamos 500µg de lisado total de células Y-1 que foram incubados com 50µl de Proteína A Sepharose sob agitação por 30 min a 4°C. Este passo tem como objetivo limpar o lisado de proteínas com alta afinidade por proteína A Sepharose e assim diminuir o número de bandas inespecíficas obtidas no final do experimento.

Após esta incubação de 30 min, a suspensão de Proteína A Sepharose e lisado foi centrifugada por 2 min a 10 Krpm. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um tubo limpo.

Imunoprecipitação

A cada amostra foram adicionados mais 50µl de proteína A Sepharose e anticorpo anti-Max na proporção de 1:200 a cada lisado recuperado do passo anterior. Esta suspensão foi incubada durante a noite sob agitação a 4°C.

No dia seguinte foram feitas quatro lavagens com o tampão de lise NP-40 e mais uma lavagem com o mesmo tampão adicionado de 0,1% SDS. Cada lavagem foi feita ressuspensando-se a resina de Proteína A Sepharose em 1 ml de solução, agitando-se manualmente e centrifugando-se por 2 min a 10Krpm.

Após a última centrifugação, adicionou-se 40µl de tampão de amostra a cada tubo e ferveu-se por 5 min para a dissociação do complexo Proteína A-sepharose/anticorpo/proteína. Foi feita nova centrifugação – 5 min a 12 Krpm e o sobrenadante de cada tubo foi aplicado em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE como descrito anteriormente.

Proteína A Sepharose – saturada em água e depois lavada cinco vezes com 10mM Tris pH 7,5.

Tampão NP-40 para extrato total - 1% Nonidet P-40

10 mM NaCl

20 mM Tris HCl pH 7,4

1,0 mM ortovanadato de sódio

2 µg/ml aprotinina

2 µg/ml pepstatina

1µg/ml leupeptina

1mM PMSF

1mM DTT

4X Tampão de Amostra de SDS-PAGE – 100 mM Tris HCl

200mM ditiotreitol

4% SDS

0,2% azul de bromofenol

20 % glicerol

As membranas resultantes deste ensaio foram utilizadas para reação com anti-c-Myc e anti-Mad a fim de que pudéssemos detectar possíveis variações da quantidade destas proteínas ligadas a Max.

Expressão ectópica de c-Myc e relação com ciclo celular

Sistema MycER

Esta construção é um vetor retroviral que contém o gene quimérico c-myc humano/receptor de estrógeno sob controle de um promotor forte, podendo ser transferido para células em cultura por transfecção ou infecção.

O sistema consiste em expressão constitutiva da quimera c-Myc/receptor de estrógeno e acúmulo desta proteína no citoplasma. Esta quimera é ativada por adição de 4'OH tamoxifen, sendo liberada do complexo inibitório de hsp90 e transportada para o núcleo, onde c-Myc tem atividade transativadora.

O receptor de estrógeno utilizado nesta quimera é o clone murino G525R, um mutante não ligante a estrógeno, responsivo apenas a 4'OH Tamoxifen, evitando o uso de estrógeno e seus efeitos secundários nas células onde se deseja induzir a atividade transativadora do c-Myc exógeno (Figura 8).

Figura 8: Estrutura e mecanismo da quimera Myc/ER.

A. Construção feita no laboratório do Prof. Gerard Evan, Imperial Fund for Cancer Research (Littlewood et al, 1995). A sequência codificante de c-myc humano foi ligada ao mutante G525R de receptor de estrógeno murino. A mutação que torna este clone do receptor de estrógeno resistente a estrógeno ou β -estradiol está indicada. B. Esta quimera é constitutivamente expressa em células de mamíferos, ficando, porém, retida no citoplasma em complexos como o de hsp90. C. Adição de 4'OH tamoxifen (triângulo vermelho) leva a dissociação da quimera dos complexos que a mantém no citoplasma, transporte para o núcleo onde c-Myc pode finalmente formar heterodímero com Max e ativar transcrição gênica.

Transfecção

Utilizamos como reagente para transfecção Gene Porter 2, Gene Therapy Systems. A vantagem deste reagente em relação a Lipofectamina ou Lipofectina, Gibco-BRL, foi a reprodutibilidade dos experimentos, apesar de que detectamos variação da eficiência de transfecção entre um lote e outro de reagente (Figura 9). Observamos que o segundo lote de reagente adquirido mostrou-se muito mais eficiente que o primeiro, a diferença foi de 50% para 80% de células transfectadas do primeiro para o segundo lote.

O protocolo de transfecção com este sistema consistiu em transfecção após 24 horas do plaqueamento em meio sem soro e sem antibióticos. As células foram incubadas nestas condições por até 6 horas, então se adicionou um volume de DME 20% FCS (final 10%) ainda sem antibiótico e incubou-se durante toda a noite. Na manhã seguinte, as células foram carenciadas para soro por 48 horas e então foi feito o experimento (Figura 10).

Em geral, para cada placa de 100 mm de diâmetro foram utilizadas 12 µg de DNA e 60µl de lipossoma (relação 1/5 sugerida pelo fabricante). Das 12 µg de DNA utilizadas, 10µg eram do plasmídeo de interesse, ou seja, pBabe-MycER ou pBabe, e 2µg de pEGFP para controle da eficiência de transfecção. A Figura 10 mostra um experimento controle, onde variamos a concentração de DNA/5µl de lipossoma para chegar as melhores condições experimentais possíveis.

Figura 9: Eficiência de transfecção em células Y-1.

A. porcentagem de células expressando GFP após 48 horas de transfecção utilizando o sistema Gene Porter 2. As células foram transfectadas segundo o protocolo descrito, utilizando-se somente pEGFP para a transfecção. Neste caso, a transfecção foi feita em placas de 35mm de diâmetro, e a relação DNA/lipossoma foi 1/5, mantendo-se constante o número de células transfectadas e variando-se a quantidade de DNA por placa. B. Eficiência de transfecção obtida com novo lote do mesmo reagente. Contamos expressão de GFP após 48 horas de transfecção e expressão de receptor de estrógeno, após 48 horas de transfecção e mais 4 horas de tratamento com 200nM tamoxifen (induzido) ou células não induzidas (não induzido). Não detectamos expressão de receptor de estrógeno no citoplasma conforme citado no texto.

Figura 10: Protocolo de transfecção transiente.

Protocolo de transfecção das células Y-1 com o sistema Gene Porter 2. O tempo indicado em horas refere-se ao momento em que as células já transfectadas são estimuladas. Os tratamentos que antecedem este momento estão indicados em valores negativos, e os que procedem estão indicados em valores positivos. Os tratamentos com ACTH e FGF2 consistiram na adição destes fatores separadamente: 10^{-9} M ACTH e 5ng/ml FGF2 ou ambos ao mesmo tempo, nas concentrações indicadas.

Análise dos efeitos de ativação de MycER em células Y-1

Para analisar os efeitos da ativação de c-Myc em Y-1 comparamos a indução ou não de entrada em S com o aumento da expressão de c-Myc nuclear.

Para distinguir a expressão nuclear do c-Myc endógeno medimos a entrada de MycER no núcleo por imunocitoquímica com anticorpo anti-receptor de estrógeno (anti-ER). O procedimento de imunocitoquímica para medida da expressão da proteína utilizado foi o mesmo descrito anteriormente.

Ensaio de Entrada em S – Incorporação de BrdU

Este procedimento consiste na incorporação de bromodeoxiuridina no DNA que está sendo sintetizado pelas células na fase S. Bromodeoxiuridina é um análogo de timidina, sendo eficientemente incorporado em seu lugar no DNA, com a vantagem de poder ser detectado por um anticorpo específico.

Após transfecção, carenciamento das células por 48 horas, indução de MycER e tratamento das células por 12 horas, foram adicionados 100µM Bromodeoxiuridina ao meio de cultura e incubado por mais 12 horas (Figura 9). As células foram então fixadas e processadas para a detecção de bromodeoxiuridina.

Fixação das células e desnaturação do DNA

Após a incorporação de bromodeoxiuridina, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em metanol gelado por 10 min (o metanol é colocado sobre as células gelado, mas a fixação é feita à temperatura ambiente).

Em seguida as células foram lavadas três vezes com PBSA.

A desnaturação do DNA foi feita em meio ácido e para tanto, as células fixadas foram incubadas em 2ml por duplicata de lamínulas de solução 1,5M HCl por 30 min, sob agitação, à temperatura ambiente.

Em seguida as lamínulas foram lavadas três vezes com PBSA estando prontas para incubação com anticorpo primário.

Reação com anticorpos

Cada lamínula foi invertida sobre uma gota de 40µl de anticorpo antibromodeoxiuridina por 30 min.

Em seguida foram feitas três lavagens de 5 min cada em PBSA, sob agitação, à temperatura ambiente.

Cada lamínula foi então invertida sobre uma gota de 40µl de anticorpo anti-mouse IgG conjugado com FITC, diluído 50 vezes. Esta incubação foi feita em câmara escura, por 30 min, à temperatura ambiente.

Novamente as lamínulas foram lavadas em PBSA, por três vezes de 5 min cada, sob agitação, à temperatura ambiente, em câmara escura.

Coloração dos núcleos

A reação com os anticorpos permite visualização dos núcleos de células que incorporaram bromodeoxiuridina, porém para sabermos a porcentagem de células em S, é necessário saber o número total de células. Isto foi conseguido através da coloração dos núcleos com DAPI. Este é um corante de DNA, intercala-se nas bases nitrogenadas e fluoresce em um comprimento de onda diferente de FITC. Com isto podemos contar o número de núcleos totais por campo analisado.

Para corar os núcleos com DAPI, invertemos cada lamínula sobre uma gota de 40µl 5µg/ml DAPI e incubamos por 20 min, em câmara escura, à temperatura ambiente.

Em seguida foram feitas três lavagens de 5 min cada em PBSA, sob agitação, à temperatura ambiente, em câmara escura.

As lamínulas foram então coladas sobre lâminas para microscopia com Entellan, secas, e sobre cada lamínula foi colocada uma gota de óleo mineral e outra lamínula foi colada por cima.

As lâminas assim montadas foram guardadas na geladeira para posterior análise em microscópio de fluorescência.

Testes estatísticos

Teste qui-quadrado

Experimentos com medidas de porcentagem de núcleos marcados (imunocitoquímica para c-Myc, imunofluorescência indireta para marcação com BrdU) foram analisadas pelo teste de qui-quadrado. Nestes casos os valores de porcentagem de núcleo marcados obtidos nas diversas repetições do mesmo experimento foram agregados levando a uma amostra muito grande, ou seja, sempre maior que 1000.

O teste χ^2 foi aplicado comparando-se a porcentagem de núcleos marcados em cada par de condições com um grau de liberdade.

Teste Mann-Whitney

O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar valores de meia-vida do mRNA e proteína c-Myc. Neste caso, tínhamos poucas amostras que poderiam não obedecer à distribuição normal. Este é um teste não paramétrico que exige ranqueamento dos dados e baseia-se no tamanho das populações a serem analisadas e a diferença entre a somatória dos valores ranqueados de cada uma delas.

Ranqueamos os dados obtidos de até quatro experimentos, comparando cada par de condições por vez, por exemplo, valores de meia-vida de c-myc em células controle com os de células tratadas com ACTH, ou de células controle com células tratadas com FGF2, e assim por diante até compararmos todas as combinações possíveis. De cada teste, tira-se um valor de p , para valores de p muito pequenos, assume-se que as populações são diferentes e valores de p grandes ($>0,1$), assume-se que não há diferença entre as populações.

RESULTADOS

Controle da expressão de c-myc em Y-1

Basal de expressão de c-Myc em Y-1 – chave de controle?

Os resultados apresentados abaixo mostrarão que há um basal da expressão de c-Myc em células Y-1. Durante o desenvolvimento deste projeto percebemos que há uma variação da expressão basal de c-Myc e esta variação parece estar relacionada ao controle mais ou menos rígido do ciclo celular em Y-1. De modo que observamos que amostras de células Y-1 recém descongeladas, ou seja, com poucas passagens em cultura, apresentam um nível basal de c-Myc relativamente baixo, entre 10 e 20 % de células marcadas após doze horas de incorporação de BrdU após 60 horas de carenciamento para soro. Com a manutenção das células em cultura o nível de expressão de c-Myc tende a aumentar, chegando a 50% ou mais. Da mesma forma, as células mantidas por mais tempo em cultura tendem a apresentar maior “escape” do carenciamento. Como citado anteriormente, após carenciamento de 48 horas, nem todas as células são sincronizadas na fase que denominamos “G0-like”, mas uma porcentagem continua ciclando e chega a replicar o seu DNA. Em culturas mais velhas observa-se que esta porcentagem de células que continua ciclando tende a aumentar. Em culturas novas a porcentagem de núcleos marcados após 48 horas de carenciamento chega a 10%, após incorporação de bromodeoxiuridina por 12 horas, já células com mais tempo em cultura chegam a apresentar até 40% de núcleo marcados com bromodeoxiuridina após 12 horas de incorporação.

Em resumo, concomitantemente com a progressiva independência a fatores de crescimento, ocorre um aumento da expressão basal de c-Myc.

Os ensaios de imunocitoquímica para detecção de c-Myc foram bastante úteis neste ponto, pois este é um experimento rápido, que utiliza um número pequeno de células e que dá uma estimativa da porcentagem de células expressando c-Myc nas condições experimentais. De forma que as células podiam

ser monitoradas através deste tipo de ensaio. Para que as células continuassem sendo utilizadas para experimentos elas deveriam, apesar de ter um basal variável, apresentar indução da expressão de c-Myc em resposta a FGF2.

Durante a apresentação deste trabalho, perceber-se-á que os resultados mostram a citada variação da expressão basal de c-Myc, havendo experimentos onde há expressão basal de 20 a 50% de células marcadas.

Controle da transcrição de c-myc

Anteriormente já havíamos demonstrado que há um basal da transcrição de c-myc em células Y-1 em crescimento exponencial. Demonstramos também que ACTH é capaz de regular transcrição de genes das famílias fos e jun, como c-fos, fos B, c-jun e JunB, mas não de c-myc nestas condições (Armelin et al, 1996).

A Figura 11 mostra um exemplo de ensaio de alongação de cadeia nascente de RNA, run-on, a partir de células carenciadas para soro. Observa-se que novamente há um basal de transcrição de c-myc. ACTH induz a transcrição de c-fos, fosB e junB principalmente, mas não altera a taxa de transcrição basal de c-myc. Soro fetal bovino e FGF2 induzem transcrição de c-fos e tem também um efeito indutor sobre a transcrição de c-myc.

Um ponto a ser destacado é o fato deste experimento demonstrar que a transcrição de c-myc é efetiva, pois conseguimos detectar hibridização com um fragmento correspondente à porção codificante do mRNA de c-myc, ou seja, um fragmento que não hibridiza com o exon 1. Como descrito anteriormente, um dos pontos de controle da expressão de c-myc é o controle da alongação do mRNA. Nossos resultados mostram que a transcrição de c-myc é efetiva, porque quando há perda do complexo da Polimerase II após pausa no exon 1, este é normalmente o único exon transcrito, ou seja, se este fosse um mecanismo de controle de c-myc em Y-1, nós não veríamos hibridização com a sonda que foi utilizada.

Figura 11: Controle de transcrição de c-myc.

Ensaio de elongação de cadeia nascente de RNA para medida da cinética de transcrição, run on. Células Y-1 carenciadas em meio livre de soro por 48 horas foram tratadas com 0,1 U/ml adrenocorticotropina, ACTH, ou 5 ng/ml FGF2, ou 20% soro fetal bovino, FCS, pelos períodos indicados em cada figura. Os RNAs nucleares obtidos após as reações de elongação foram hibridizados com as sondas indicadas (fragmentos de DNA desnaturados e fixados na membrana). DNA genômico – últimas duas linhas de “dots” (FGF e FCS) ou última linha (ACTH) corresponde a DNA genômico de Y-1, no caso de FGF e FCS, a primeira linha contém 500ng/dot de DNA e a segunda linha contém 50ng/dot, no caso de ACTH utilizamos 200 ng DNA genômico/dot.

Controle da expressão do mRNA de c-myc

Os resultados apresentados abaixo mostram que, assim como há um basal de transcrição, há um basal de expressão do mRNA de c-myc em células Y-1, mesmo após carenciamento de 48 horas em meio livre de soro. Novamente, ACTH não tem efeito sobre a expressão do mRNA de c-myc. O mesmo não acontece com FGF2, este fator de crescimento induz a expressão do mRNA de c-myc sobre o basal em aproximadamente 3 a 4 vezes. O tratamento simultâneo de ACTH e FGF2 mostra que ACTH praticamente não tem efeito sobre a indução de c-myc por FGF2 (Figura 12).

Figura 12: Expressão do mRNA de c-myc.

Northern blot. 15µg de RNA total de Y-1 foram aplicados por condição. Células Y-1 carenciadas (C) foram estimuladas com 10^{-9} M ACTH, 5ng/ml FGF2 ou combinação de ambos (F+A) pelos períodos indicados. A membrana foi hibridizada primeiramente com cDNA de c-myc, após exposição, a sonda foi retirada com duas lavagens com 0,1% SDS 100°C. Foi então feita hibridização com GAPDH para controle interno. O gráfico mostra a quantificação do experimento mostrado acima. Para o cálculo dos valores relativos apresentados no gráfico subtraiu-se do valor absoluto de cada banda um valor médio de bandas de "background", este processo foi feito tanto para c-myc como para GAPDH, dos valores obtidos fez-se a razão c-myc/GAPDH o que permitiu a correção de possíveis diferenças de quantidade de material aplicado por cada condição no gel –

representado no gráfico como (myc/GAPDH). As colunas do gráfico correspondem exatamente às bandas do autorradiograma acima, na mesma seqüência.

Tendo em vista que a população de qualquer RNA na célula é composta por um equilíbrio entre transcrição (síntese) e degradação, e sabendo-se que a estabilidade do mRNA de c-myc pode ser controlada, alterando desta forma a expressão do mRNA, fizemos medidas da meia-vida deste mensageiro após bloqueio da síntese (Figuras 13 e 14). Nestas condições, a estimativa da meia-vida de um RNA indica se há alteração da estabilidade do mesmo no sistema em que estamos efetuando as medidas. Estimamos que a meia-vida de c-myc em Y-1 é aproximadamente 20 min, o que corresponde a dados da literatura e mostra que nem ACTH e nem FGF2 regulam a estabilidade deste RNA neste sistema. A Figura 13 mostra a dispersão dos dados de meia-vida obtidos de experimentos independentes. Estes dados foram testados não-parametricamente pelo método de Mann-Whitney, ver Materiais e Métodos, a aplicação deste teste em nossos dados mostra que não há variação significativa entre as medidas de meia-vida do mRNA de c-myc em nenhuma das condições testadas. O controle da expressão do mRNA de c-myc é, portanto, exclusivamente transcricional, onde a transcrição de c-myc é estimulada por FGF2 o que provoca um aumento do nível “steady state” do mRNA.

Figura 13: Dispersão dos dados de meia-vida do mRNA de c-myc em células Y-1.

Dados de 4 experimentos de Northern blot para medida de meia-vida do mRNA de c-myc. No gráfico estão representados os valores de meia-vida de c-myc, na ordenada (min), obtidos em cada condição indicada, na abscissa. Após tratamento com 10^{-9} M ACTH, ou 5 ng/ml FGF2, ou combinação de ambos por 3 horas, ou ainda células não tratadas, C, foram expostas a tratamento com 5 μ g/ml Actinomicina D por períodos variáveis. As células foram então lisadas e o RNA extraído foi submetido a Northern blotting para determinação da cinética de degradação do mRNA.

Para a determinação da meia-vida de c-myc, foram feitas de 2 a 3 exposições de cada hibridização, todos os filmes de raioX foram densitometrados e para cada banda determinou-se um valor relativo correspondente ao valor absoluto da banda – valor do branco(background). Foi feita então a relação entre os valores de cada banda de c-myc e de GAPDH correspondentes, já com o branco descontado, para a correção de possíveis diferenças durante a aplicação do RNA no gel e transferência em cada condição, e a partir destes valores, calculou-se a meia-vida do mRNA através da plotagem dos valores relativos obtidos em semi-log.

Figura 14: Análise da meia-vida do mRNA de c-myc em células Y-1.

Northern blot. 15µg de RNA total de Y-1 de cada condição foram aplicados em gel desnaturante 1% agarose. Células Y-1 carenciadas– Controle, foram tratadas por 3h com 10^{-9} M ACTH, ou 5ng/ml FGF2 ou a combinação de ambos nas mesmas concentrações citadas, conforme o indicado na figura. A e B (experimentos independentes com amostras diferentes de RNA) - A adição de 5µg/ml Actinomicina D foi feita após as 3 horas de tratamento com os referidos fatores, e as células foram lisadas após os períodos indicados na figura. Cada membrana foi hibridizada primeiramente com cDNA de c-myc, resultando na banda indicada. Em seguida a sonda foi retirada com solução 0,1% SDS 100°C (2 lavagens) e foi feita nova hibridização com GAPDH. C – controle

experimental, neste caso as células foram estimuladas da mesma forma do que em A e B, porém tratadas, onde indicado, com 5µg/ml Actinomicina D 15 min antes da adição dos outros fatores. Como descrito acima, a membrana foi hibridizada primeiramente com cDNA de c-myc e depois de lavada esta sonda, a membrana foi hibridizada com cDNA de GAPDH.

Controle da Expressão da Proteína c-Myc

Células Y-1 apresentam também um basal da expressão da proteína c-Myc, tanto em células em crescimento exponencial quanto em células carenciadas para soro. ACTH tem um claro efeito inibitório sobre a expressão de c-Myc em células Y-1. Por outro lado, FGF2 é um forte indutor da expressão de c-Myc.

As Figuras 15 e 16 mostram curvas dose-resposta de ACTH em relação à expressão de c-Myc, assim como a cinética de inibição da proteína em células em crescimento exponencial e carenciadas (15 e 16 respectivamente). Podemos perceber que a inibição é um efeito rápido e que concentrações fisiológicas de ACTH (10^{-10} M) são suficientes para inibir a expressão de c-Myc em células Y-1 em crescimento exponencial e em células carenciadas.

Por outro lado, FGF2, um fator de crescimento típico, induz a expressão de c-Myc sobre o basal, por um mecanismo de ação que depende da via de Erk-MAPK. A Figura 17 mostra a indução da expressão de c-Myc por FGF2. Observa-se que a indução de c-Myc é dose-dependente e que depende da via de Erk-MAPK, pois a utilização do inibidor de MEK-1, PD98059, inibe o efeito de FGF2 sobre a indução da expressão de c-Myc.

O efeito indutor de FGF2 sobre a expressão de c-Myc é antagonizado por ACTH, na Figura 18, observa-se que após indução da expressão de c-Myc com FGF2, ACTH tem um efeito inibitório ainda mais robusto do que em células não tratadas com FGF2.

Como citado anteriormente, um dos mecanismos de controle da expressão de c-Myc é a estabilidade da proteína. À semelhança dos experimentos para medida da cinética de degradação do mRNA de c-myc, medimos também a cinética de degradação da proteína c-Myc após a inibição da síntese protéica por Cicloheximida. A Figura 19A mostra micrografias representativas de uma cinética de degradação de c-Myc em células Y-1. Nota-se que após 4 horas de tratamento com FGF2 os núcleos estão intensamente corados com anti-c-Myc, enquanto que no controle os núcleos positivos para c-Myc são fracamente corados. Portanto, a

comparação de porcentagem de núcleos positivos para c-Myc subestima a indução desta proteína por FGF2. Este fato é evidenciado na Figura 18, onde o experimento de imunocitoquímica representado mostra indução por FGF2 de 2,6 vezes a expressão de c-Myc sobre o basal, enquanto que o ensaio de Western blotting mostra um aumento de pelo menos cinco vezes sobre o basal nas mesmas condições.

A Figura 19B mostra uma cinética representativa de degradação de c-Myc, onde células estimuladas por 4 horas com ACTH, FGF2, ou combinação de ambos tiveram a síntese protéica inibida por Cicloheximida e os valores representados são resultantes da contagem de núcleos de células fixadas em períodos variados após a inibição. A Figura 19C mostra a distribuição dos valores de meia-vida de c-Myc, obtidos da plotagem da curva de decaimento da proteína em escala semi-logarítmica (Figura 19B).

As Figuras 18B e 21B mostram experimentos onde células Y-1 tratadas com FGF2 por 4 horas, foram lavadas e mantidas em meio com ACTH ou não, pode-se observar que em células mantidas em ACTH, há maior inibição da expressão de c-Myc, indicando aumento da degradação, porém se medirmos os valores de meia-vida, eles serão diferentes dos obtidos com uso de inibidor de Cicloheximida, fato este devido às óbvias diferenças de protocolo.

Ensaio de Western blotting não foram suficientemente precisos para estimar meia-vida de c-Myc. Por outro lado, porcentagem de núcleos marcados é contada com precisão, mas as curvas de decaimento de c-Myc estimadas por este parâmetro são apenas aproximadas.

Figura 15: Inibição da expressão de c-Myc por ACTH em células Y-1 em crescimento exponencial.

Ensaio de imunocitoquímica. A. Células Y-1 em crescimento exponencial (controle em azul), em meio DME com 10% soro fetal bovino, foram tratadas com 10^{-9} M ACTH (vermelho) pelos períodos de tempo indicados. B. Células Y-1 em crescimento exponencial, meio com 10% soro fetal bovino, foram tratadas por 4h com as indicadas concentrações de ACTH. Observa-se que há uma diferença grande entre a expressão basal de c-Myc em cada experimento, ilustrando o que foi discutido no início da seção de Resultados.

Figura 16: Inibição da expressão de c-Myc por ACTH em células Y-1 carenciadas.

Ensaio de imunocitoquímica. A. Células Y-1 carenciada em meio livre de soro por 48 horas (controle em azul), foram tratadas com 10^{-9} M ACTH (vermelho) pelos períodos de tempo indicados. B. Células Y-1 carenciadas foram tratadas por 4h com as indicadas concentrações de ACTH.

Figura 17: Efeito de FGF2 sobre a expressão de c-Myc é dependente da via de MAPK.

Ensaio de imunocitoquímica. Células Y-1 carenciadas para soro por 48h, foram tratadas com as indicadas concentrações de FGF2 por 4h (azul), ou anteriormente ao tratamento com FGF2, foram tratadas por 30 min com 50 μ M de PD98059 (vermelho). Os valores relativos plotados representam o incremento de expressão de c-Myc por qualquer um dos tratamentos, ou seja, indução sobre o basal.

Figura 18: ACTH inibe a expressão de c-Myc induzida por FGF2.

Ensaio de imunocitoquímica (A e B) e Western blot (C). A. Células Y-1 carenciadas para soro (controle) foram tratadas com 5ng/ml FGF2 por 4h (FGF2). B. Células Y-1 tratadas com 5ng/ml FGF (tempo 0), foram lavadas 1 vez com PBS, 2 vezes com DME e mantidas em meio sem soro (vermelho – SFM) ou foram lavadas da mesma forma recebendo, porém adição de 10⁻⁹M ACTH (azul), após cada um destes tratamentos, duplicatas de lâminulas foram retiradas e fixadas nos períodos de tempo indicados. C. Células Y-1 carenciadas para soro (controle) foram estimuladas com 5ng/ml FGF2 por 4h (FGF2), e lavadas da mesma forma que as células utilizadas nos ensaios de imunocitoquímica (FGF2 retirado), em seguida as células foram incubadas em meio sem soro (-) ou em meio com adição de 10⁻⁹M ACTH pelos períodos de tempo indicados. No ensaio de

imunocitquímica foi utilizada diluição do anticorpo 1:1000, e no ensaio e Western blotting diluição de 1:800.

Figura 19A: Efeito de ACTH e FGF2 sobre a estabilidade de c-Myc.

Imunocitoquímica com anti-c-Myc em células Y-1. Microfotografias tiradas em aumento de 200 vezes após reação com anticorpo específico. Os núcleos marrons ou com pontos marrons são positivos para c-Myc, enquanto que os núcleos azuis correspondem a células não marcadas. Controle – células carenciadas por 48 horas, e tratadas com 10^{-9} M ACTH (ACTH), ou 5 ng/ml FGF2 (FGF2) ou combinação de ambos (A+F) por 4 horas, primeira coluna. As colunas seguintes representam o período pelo qual as células foram incubadas nas condições indicadas e também

com 5 µg/ml Cicloheximida – por 15 min e 30 min para Controle e ACTH, e por 30 min e 2 horas para FGF2 e ACTH + FGF2. O experimento foi feito retirando-se células a cada 15 minutos até 2,5 horas, aqui estão representados somente os pontos que melhor ilustram as diferenças de expressão de c-Myc em cada condição. Anticorpo diluído 1:1000.

Figura 19B: Cinética de degradação de c-Myc em células Y-1 tratadas com inibidor de síntese protéica.

Ensaio de imunocitoquímica para c-Myc. Células Y-1 carenciadas por 48 horas (controle) foram tratadas com 10^{-9} M ACTH (ACTH), ou 5 ng/ml FGF2 (FGF2), ou combinação de ambos por 4 horas, equivalente ao ponto 0 na escala das abscissas, neste momento, foram retiradas e fixadas duas laminulas de cada placa e o restante das células foi incubado com 5µg/ml Cicloheximida pelos períodos indicados. A cada 15 minutos, um par de laminulas de cada condição foi retirado e fixado, sendo posteriormente submetido ao ensaio para revelação de c-Myc. As lâminas foram analisadas e a porcentagem de núcleos marcados foi plotada contra o tempo de tratamento com Cicloheximida.

Figura 19C: Dispersão dos dados de meia-vida de c-Myc em células Y-1 tratadas com inibidor de síntese protéica.

Resultados de meia-vida da proteína c-Myc, em minutos, obtidos de três experimentos independentes. Cada medida de meia-vida foi calculada através de um gráfico semi-log como o apresentado em 19B. Os grupos de dados de cada condição foram testados pelo teste de Mann-Whitney e aceita-se a hipótese de que a meia-vida de c-Myc em células controle é diferente da meia-vida de c-Myc em células tratadas com ACTH para $p < 0,5$.

O próximo bloco de resultados mostra que o efeito inibitório de ACTH depende da via de PKA. Foram desenvolvidos em nosso laboratório clones de Y-1 que super expressam a subunidade regulatória de PKA mutada resultando em baixa atividade de PKA na célula, atividade esta resistente a ativação por ACTH e também por análogos de cAMP (Eichler & Armelin, resultados não publicados).

Nestes clones observamos que ACTH perde o seu efeito inibitório sobre a expressão de c-Myc. Observamos também que derivados de cAMP que mimetizam muitos dos efeitos de ACTH, em Y-1, não são capazes de inibir a

expressão de c-Myc em clones PKA⁻, mas sim em clone controle PKA⁺ (Figura 20).

A Figura 21 mostra a comparação do efeito de ACTH sobre a indução da expressão de c-Myc por pulso de FGF2. Observa-se que enquanto ACTH apresenta o mesmo tipo de efeito inibitório sobre a expressão de c-Myc induzida por FGF2 em clone controle PKA⁺ que o observado na linhagem parental, em clone PKA⁻, a adição de ACTH após pulso de FGF2 não tem nenhum efeito, as células comportam-se como se estivessem em DME.

O mesmo tipo de evento é observado em curvas dose-resposta para ACTH e ACTH sobre FGF2. A Figura 22 mostra que no clone controle, ACTH inibe a expressão de c-Myc induzida por FGF2 de forma dose dependente, enquanto que no clone PKA⁻, mesmo concentrações farmacológicas de ACTH, 10^{-8} a 10^{-7} M, não têm efeito sobre a expressão de c-Myc.

Este conjunto de resultados mostra estreita correlação entre inibição da expressão de c-Myc e bloqueio do ciclo celular por ACTH em células Y-1, conclusão perfeitamente compatível com a reconhecida importância de c-Myc no controle e progressão do ciclo celular.

Figura 20: Diferenças de resposta a ACTH e derivado de cAMP em clone Y-1 controle e clone Y-1/PKA⁻.

Ensaio de imunocitoquímica para detecção de c-Myc em clones Y-1 controle – PKA⁺ e clones expressando a subunidade regulatória de PKA mutada – PKA⁻. As células foram carenciadas em meio livre de soro por 48 horas –C e então tratadas com 10⁻⁹M ACTH - ACTH, ou 5 ng/ml FGF2 (FGF2), ou combinação de ACTH e FGF2 nas mesmas concentrações citadas (A/F), ou 1mM dibutilil-cAMP (dcAMP), ou combinação de dibutilil-cAMP e FGF2 nas mesmas concentrações citadas (dc/F) por 4 horas. Experimento representativo de dois. O mesmo tipo de resultado foi obtido com outro clone PKA⁻.

Figura 21: A inibição da expressão de c-Myc por ACTH é dependente da via de PKA – efeito após pulso de FGF2.

Ensaio de imunocitoquímica com clone Y-1/PKA-, A, e clone Y-1/PKA+ controle, B. Em cada caso, células carenciadas, foram tratadas com 5ng/ml FGF2 por 4 horas (tempo 0), sendo então lavadas 1 vez com PBS, 2 vezes com DME (indicado como FGF2 retirado) e mantidas em meio sem soro (azul) ou foram lavadas da mesma forma recebendo, porém adição de 10^{-8} M ACTH (vermelho), após cada um destes tratamentos, duplicatas de lâminulas foram retiradas e fixadas nos períodos de tempo indicados. Resultando similar foi obtido com outro clone PKA-.

Figura 22: A inibição da expressão de c-Myc por ACTH é dependente da via de PKA – efeito sobre curva dose-resposta.

Ensaio de imunocitoquímica. A – clone PKA⁻; B – clone PKA⁺ controle. As células foram carenciadas em meio livre de soro por 48 horas e foram tratadas com as indicadas concentrações de ACTH sobre meio livre de soro (azul – ACTH) ou sobre meio com adição de 5 ng/ml FGF2 (vermelho – FGF/ACTH) por 4 horas. Resultado semelhante foi obtido com clone PKA⁻ independente deste.

Expressão de Max em Y-1

A expressão de Max em Y-1 é constitutiva, como seria esperado. Do conjunto de proteínas que formam a rede Myc/Max/Mad, Max é constitutivamente expressa, enquanto que a expressão de Myc e Mad tende a variar de acordo com o sistema ou estímulo.

A Figura 23 mostra que a expressão de Max é constante em Y-1, não sendo modulada por nenhum dos fatores com os quais as células foram estimuladas.

Figura 23: Expressão de Max em Y-1.

Ensaio de imunocitoquímica. Células Y-1 carenciadas para soro (azul) ou em crescimento exponencial, em meio com 10% soro (vermelho), foram tratadas por 4h com 10^{-8} M ACTH – CA e EA, ou 5ng/ml FGF2 – CF e EF, ou 1mM dcAMP – Cdc e Edc, ou combinação de ACTH e FGF2 – CAF e EAF. Os controles não tratados correspondem a C e E. Anticorpo diluído 1:1000.

Expressão de Mad em Y-1

A expressão dos mRNAs de mad-1, mxi e mad-4 foi detectada por RT-PCR a partir de RNA total de células Y-1 (Figura 24).

Diante deste resultado adquirimos anticorpos contra estas proteínas para verificar se havia modulação da expressão das mesmas por ACTH ou FGF2 em células Y-1.

A Figura 25 mostra os resultados de Western blot obtidos, pode-se verificar que de fato, Y-1 expressa todas estas proteínas de forma constitutiva. Este é um fato curioso, uma vez que não há nenhum caso descrito na literatura de uma linhagem celular que expresse várias proteínas da família Mad ao mesmo tempo e sem nenhum tipo de controle sobre esta expressão. Porém, a maior parte dos dados disponíveis até o momento trata da proteína Mad-1, a primeira a ser descoberta, e que esta normalmente associada a processo de diferenciação. Em relação à expressão concomitante de c-Myc e Mad em Y-1, isso sim existe descrito na literatura, inclusive em células em processo de diferenciação que envolve expansão clonal, como é o caso da linhagem 3T3L1.

Por outro lado, obtivemos dados que indicam que há uma troca do parceiro de Max dependendo de como a célula é tratada. Ensaio de imunoprecipitação com anti-Max seguido de Western blot com anti-c-Myc ou anti-Mad, mostram que em células carenciadas Mad está ligado a Max e que tratamento com soro fetal bovino promove diminuição da ligação de Mad a Max e aumento da ligação de Myc a Max. Estes resultados indicam que a variação de complexos Mad/Max ou c-Myc/Max em Y-1 depende somente da concentração de c-Myc na célula uma vez que não há alteração da expressão das proteínas da família Mad (Figura 26).

Figura 24: Detecção de mRNAs da família mad em Y-1.

Ensaio de RT-PCR. cDNA total de células Y-1 carenciadas (C) ou tratadas com 10^{-9} M ACTH por 3h (A). Aliquotas de 200 ng de cada cDNA foram tomadas para cada reação de PCR com par de "primers" específicos para a amplificação dos fragmentos dos RNAs indicados na figura. Esses fragmentos foram clonados e seqüenciados e a seqüência específica de cada fragmento foi confirmada como pertencente ao indicado mRNA. No caso de mxi, a banda específica é a inferior.

Figura 25: Expressão das proteínas da família Mad em Y-1.

Western blotting. 150µg de proteínas de extrato total de células Y-1 foram fracionados por SDS-PAGE conforme descrito em Materiais e Métodos. C- células carenciadas não estimuladas. Os diversos tratamentos foram feitos pelos períodos indicados em células Y-1 carenciadas. ACTH – 10⁻⁹M ACTH, FGF2 – 5ng/ml FGF2, A+F – combinação de ACTH e FGF2 nas mesmas concentrações citadas, e FCS – 10% soro fetal bovino. Estão indicadas as proteínas reconhecidas pelos anticorpos específicos. As proteínas Mad têm em torno de 30KDa, enquanto que c-Myc tem 64KDa. Neste experimento foi utilizado anti-c-Myc humano policlonal doado pelo Prof. Bob Eisenman, diluído 1:2000. Os anticorpos anti-Mad foram diluídos 1:1000.

Figura 26: Variação do parceiro de Max em células Y-1.

Western blot seguido de imunoprecipitação com anti-Max. 500 μ g de lisado total de cada condição, C- células carenciadas não estimuladas, 3h FCS – 20% soro fetal bovino por 3horas, foram imunoprecipitados com anti-Max (1:200) e o imunoprecipitado foi fracionado em gel de poliacrilamida, transferido para membrana de nitrocelulose e revelado com anti-c-Myc ou anti-Mad, como indicado na figura. Importante notar que o anti-Mad (Pharmingen) utilizado neste experimento foi feito contra um epítipo de Mad-1, mas não foi imunopurificado, portanto há a possibilidade de que outras proteínas Mad estejam sendo reconhecidas também.

Papel de c-Myc no ciclo celular de Y-1

A correlação entre inibição da expressão de c-Myc e bloqueio do ciclo celular por ACTH, indicada pelos dados anteriormente apresentados sugere que a inibição de c-Myc é o mecanismo, ou parte do mecanismo, pelo qual o hormônio bloqueia o ciclo celular de Y-1.

Para testar esta hipótese utilizamos um sistema de expressão de c-Myc ectópico e medimos os efeitos do aumento da concentração de c-Myc exógeno no controle do ciclo celular em Y-1, através de ensaios de entrada em S por incorporação de bromodeoxiuridina. Esperávamos como possíveis efeitos da expressão ectópica de c-Myc:

- a) Complementação da atividade mitogênica fraca de ACTH.
- b) Eliminação da ação anti-mitogênica de ACTH sobre FGF2.

A expressão e entrada de MycER no núcleo foram monitoradas por ensaio de imunocitoquímica, utilizando-se anticorpo anti-ER. A Figura 27 mostra que 4'OHT promove abundante marcação nuclear com anti-ER, independentemente da presença de ACTH (Tabela 1). Estes resultados demonstram que a quimera MycER é estável em presença de ACTH de tal maneira que se a eficiência de transfecção for alta, a maior parte dos núcleos ficam marcados com anti-ER após tratamento com tamoxifen.

A indução da atividade de c-Myc através do sistema MycER é capaz de reverter o efeito anti-mitogênico de ACTH sobre FGF2 na indução da entrada em S. Ou seja, a célula torna-se resistente ao efeito inibitório que ACTH apresenta sobre a entrada em S induzida por FGF2.

A Figura 28 mostra a somatória dos dados de quatro experimentos independentes de transfecção e ativação de MycER em Y-1. Neste caso, foram transfectados o plasmídeo pBabe ou a construção pBabeMycER e foi medida a porcentagem da população entrando em S. Um modo mais explícito de demonstrar este efeito biológico está demonstrado na Figura 29, onde comparamos o incremento de entrada em S em células induzidas e não induzidas com tamoxifen.

Por outro lado, a indução de Myc não é capaz de fazer com que células Y-1 carenciadas ou tratadas apenas com ACTH progridam pelo ciclo celular e entrem na fase S.

Figura 27: Detecção do receptor de estrógeno no núcleo de células Y-1

Imunocitoquímica com anti-receptor de estrógeno. Células Y-1 carenciada, C, ou tratadas com 10^{-9} M ACTH (ACTH) por 4 horas após transfecção MycER (/MycER) e estimulação ou não com 200 nM 4'OH tamoxifen, - ou + 4OHT, foram fixadas e submetidas a ensaio de imunocitoquímica. Os núcleos marrons ou com pontos marrons são positivos e os azuis negativos. Percebe-se que não há marcação no citoplasma em células transfectadas com MycER e não induzidas com 4'OH tamoxifen, nossa hipótese é de que a proteína esteja inacessível ao anticorpo por estar ligada a grandes complexos protéicos, não sendo, portanto detectada nestas condições. Uma vez liberada do complexo e no núcleo, a proteína passa a ser detectada pelo anticorpo. Anticorpo diluído 1:1000.

Tabela 1: Porcentagem de núcleos marcados com anti-ER após transfecção de células Y-1.

	-4'OHT	+4'OHT
Controle	9,75	88,00
ACTH	8,34	79,78

Valores em porcentagem, obtidos da contagem de células de experimentos como o representado na Figura 27. Células Y-1 foram transfectadas com MycER, carenciadas para soro por 48 horas e então induzidas ou não com 200nM de 4'OH-tamoxifen (4'OHT) por 30 min e posteriormente tratadas com 10^{-9} M ACTH (ACTH) ou não (Controle) por 4 horas.

Figura 28: Efeito da ativação de MycER sobre a entrada na fase S em células Y-1.

Imunocitoquímica – incorporação de BrdU. Células Y-1 transfectadas com MycER ou pBabe como descrito em Materiais e Métodos, foram carenciadas por 48 horas. Após o carenciamento, adicionou-se 200nM de 4'OH tamoxifen (OHT) ou não 30 min antes das adições de 10^{-9} M ACTH (ACTH), 5 ng/ml FGF2 (FGF2) ou ambos (A+F), controle corresponde a células mantidas em meio livre de soro. Esta figura mostra a somatória de quatro experimentos independentes, a diferença entre as condições MycER A+F e MycER OHT A+F foi testada por teste qui quadrado, sendo a diferença significativa para $p < 0,01$.

Figura 29: Relação entre o aumento da expressão de Myc no núcleo e síntese de DNA.

Resumo dos efeitos da ativação de MycER em Y-1. Os valores relativos foram obtidos pela razão **(FGF2-controle)/FGF2** (FGF em azul), ou **(FGF+ACTH-ACTH)/FGF+ACTH** – FGF/ACTH em vermelho), sendo cada um dos valores a porcentagem de núcleos marcados com BrdU nas condições: FGF2 – 5ng/ml FGF2, ACTH – 10⁻⁹M ACTH, FGF2+ACTH – combinação 5ng/ml FGF2 + 10⁻⁹M ACTH, controle – células carenciadas, pBabe – células trasfectadas com pBabe puro, não estimuladas ou estimuladas (+4'OHT) com 200nM 4'OH tamoxifen, MycER – células trasfectadas com pBabe MycER, não estimuladas ou estimuladas (+4'OHT) com 200nM 4'OH tamoxifen

Discussão

A linhagem adrenocortical Y-1 tem sido utilizada como modelo de estudo para os mecanismos de ação de ACTH. Nosso laboratório tem, nesta área, como interesse principal, o controle da proliferação celular.

O mecanismo de ação de ACTH é complexo. Este hormônio peptídico, produzido e processado na hipófise, a partir da proteína pró-opiomelanocortina, é liberado na corrente sanguínea e tem como alvo as glândulas adrenais. Sobre o tecido adrenal, *in vivo*, ACTH tem efeito trópico, estimulando síntese de hormônios esteróides, e também efeito trófico, sendo importante para o desenvolvimento embrionário deste tecido e para a manutenção do tecido no adulto. Alterações que levam à secreção descontrolada de ACTH promovem hipertrofia do tecido adrenal. Por outro lado, *in vitro*, tanto em linhagens estabelecidas em cultura como em culturas primárias, ACTH inibe proliferação, provocando um bloqueio do ciclo celular na transição G0/G1 (Masui & Garren, 1972; Armelin et al, 1977; Weidman & Gill, 1977; Ramachandran & Suyama, 1975; Viard et al, 1993).

A nível molecular, pouco é sabido a respeito de ACTH. Sabe-se que ACTH reconhece um receptor transmembranar da família dos GPAR (G Protein Associated Receptor) (Mountjoy et al, 1992) e sabe-se que o sinal desencadeado ativa adenilato ciclase, PKA e eventualmente chega a ativação de SF1 (Wong et al, 1997; Frigeri, et al, 2000). Sabe-se que PKA é uma via obrigatória no mecanismo de ação de ACTH e está envolvida no controle da esteroidogênese, da expressão de c-fos e no bloqueio do ciclo celular (Rae et al, 1979; Kimura & Armelin, 1990; Kimura et al, 1993; Eichler & Armelin, não publicado).

Parte do mecanismo de ação de ACTH está bem estabelecido, sabe-se que o aumento da esteroidogênese e o bloqueio do ciclo celular são eventos dependentes da via de PKA (Rae et al, 1979). Existem, porém, evidências de que ACTH poderia ativar, pelo menos na linhagem Y-1, a via de PKC (Proteína quinase dependente de Cálcio), a via de PI3K (Fosfatidil inositol-3 quinase) e a via de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Frigeri & Armelin, 1996; Lepique et al, 2000) (Figura 31).

Estabilidade de células Y-1 e controle da expressão de c-myc/c-Myc

Observamos que células Y-1 apresentam um basal de transcrição de c-myc, que pode ser induzido por mitógenos, mas não é regulado por ACTH (Figura 11). Já havíamos observado este tipo de resposta em células em crescimento exponencial (Armelin et al, 1996).

Estas células apresentam também um basal, bastante variável da expressão da proteína c-Myc. Nossas observações mostram que há uma correlação entre a independência da célula a fatores mitogênicos e aumento da expressão basal de c-Myc, onde as células que apresentam maior basal de entrada em S após carenciamento, apresentam também maior basal da expressão de c-Myc.

Níveis de regulação de c-myc/c-Myc

Apesar de haver um nível basal de transcrição de c-myc em Y-1, este gene é induzido por FGF2 e soro fetal bovino. Também observamos, através de ensaios de Northern blot, que há um basal da expressão do mRNA de c-myc em células Y-1. Novamente observamos um aumento da expressão de c-myc sobre o basal em células tratadas com FGF2 em conformidade com a indução da transcrição. Não fomos capazes de identificar nenhum efeito inibitório de ACTH sobre a expressão do mRNA de c-myc. Nem sobre o basal, nem sobre a expressão induzida por FGF2.

Como descrito anteriormente, a expressão de c-myc pode ser controlada em diversos níveis, entre eles a estabilidade do mRNA pode ser regulada, de forma que mesmo que a transcrição não seja alterada, um aumento da instabilidade do mRNA pode resultar em inibição da expressão da proteína e vice-versa. Decidimos, portanto, estimar a meia-vida de c-myc em células Y-1 tratadas em diversas condições. Nossos resultados apresentados nas Figuras 13 e 14 mostram que nem ACTH nem FGF2 têm efeito sobre a estabilidade do mRNA de

c-myc. Nós observamos que em Y-1, c-myc tem meia-vida de aproximadamente 20 min, como descrito na literatura (Bonnieu et al, 1988; Herrick & Ross, 1994). Estes dados mostram que transcrição é uma das etapas principais no controle da expressão de c-Myc em Y-1.

A expressão de c-Myc é inibida por ACTH em doses fisiológicas, 10^{-10} M, tanto em células em crescimento exponencial como em células carenciadas para soro. O efeito inibitório de ACTH sobre a expressão de c-Myc é ainda mais acentuado em células estimuladas com FGF2 e então tratadas com ACTH.

A indução da expressão de c-Myc por FGF2 seria de fato esperada, uma vez que FGF2 tem efeito estimulatório sobre a transcrição do gene. A indução da expressão de c-Myc por FGF2 é dependente da via de Erk-MAKP, uma vez que inibidor específico de MEK1 anula o efeito de FGF2. Este poderia ser considerado um efeito clássico de FGF2, que inclui ativação do receptor específico, do tipo tirosina quinase, ativando cascata de quinases dependentes de mitógeno e induzindo a expressão de genes de resposta primária, no caso c-Myc, através da fosforilação de fatores de transcrição.

ACTH, por outro lado, utiliza a via de PKA para a inibição da tradução de c-Myc. Observamos que derivados de cAMP, que mimetizam a maior parte dos efeitos de ACTH em Y-1, também são capazes de inibir a expressão de c-Myc. E de fato, observamos que clones de Y-1 que superexpressam a subunidade regulatória de PKA mutada, tornando PKA não funcional, ficam resistentes ao efeito inibitório de cAMP e de ACTH, mesmo concentrações farmacológicas de ACTH.

Através da utilização do inibidor de síntese protéica, Cicloheximida, demonstramos que a estabilidade da proteína é outro importante ponto de controle da expressão de c-Myc em Y-1.

Nossos dados não demonstram que há controle da tradução da proteína c-Myc em Y-1, ao contrário, a tradução de c-Myc parece ser dependente da disponibilidade do mRNA. O controle de ACTH sobre a expressão de c-Myc consiste unicamente no controle da estabilidade da proteína, seu efeito inibitório deve-se ao aumento da degradação de c-Myc. FGF2, além de controlar a

transcrição de c-myc aumenta a estabilidade da proteína agindo de duas formas diferentes para o controle de c-Myc em Y-1 (Figura 30).

Recentemente, demonstrou-se que fatores de crescimento que ativam a via de Ras provocam estabilização e acúmulo de c-Myc através da via Ras/Raf/MAPK e inibição da degradação da proteína pelo proteasoma 26S (Sears et al, 1999). Este pode ser o mecanismo pelo qual FGF2 estabiliza c-Myc, já que FGF2 é um fator de crescimento típico que ativa Ras e a via de MAPK.

A proteína c-Myc é degradada pelo proteasoma 26S após ubiquitinação. A fosforilação do resíduo de treonina 58 é um ponto importante no controle da estabilidade de c-Myc, a fosforilação deste resíduo promove rápida ubiquitinação da proteína, e mutação deste mesmo resíduo estabiliza c-Myc (Papas & Lautenberger, 1985; Showe et al, 1985; Bathia et al, 1993; Henriksson et al, 1993; Lutterbach & Hann, 1994; Yano et al, 1993; Bahram et al, 2000). Este resíduo assim como serina 62 podem ser fosforilados por várias quinases, MAPK, glicogênio sintase quinase e caseína quinase II (revisado em Facchini & Penn, 1998). O receptor de ACTH pode ativar glicogênio sintase quinase, tanto pela via de PKA como pela via de PI3K. Nossos resultados indicam que a inibição de c-Myc por ACTH ocorre via PKA, sendo glicogênio sintase quinase um provável candidato na via de ação de ACTH para inibir c-Myc. Vale mencionar aqui que nós testamos inibidor de PI3K em células Y-1 para checar um possível efeito desta via sobre a expressão de c-Myc, porém nenhum efeito foi observado.

Figura 30: Controle da expressão de c-Myc por FGF2 e ACTH

Os principais pontos de controle da expressão de c-Myc em Y-1 são transcrição e estabilidade da proteína por FGF2 (vias em azul) e estabilidade da proteína por ACTH (em vermelho). FGF2 ativa a via de Ras/Raf/MAPK ativando promotores de diversos genes no núcleo, inclusive de c-myc causando acúmulo do mRNA e aumento da síntese da proteína. Por outro lado, FGF2 provoca aumento da estabilidade da proteína causando um acúmulo de proteína na célula. ACTH ativa a via de adenilato ciclase/cAMP/PKA levando a uma provável fosforilação de c-Myc que leva a um aumento da sua taxa de degradação na célula.

Organização e regulação do sistema Myc/Max/Mad em Y-1

Como mencionado anteriormente, as proteínas da família Mad antagonizam os efeitos de c-Myc por competirem pela ligação a Max. Observamos que em Y-1 há expressão de três das proteínas conhecidas da família Mad: Mad-1, Mxi e Mad-4. A expressão de todas elas é, inesperadamente, constitutiva. A expressão de Max também é constitutiva. De maneira geral, o balanço entre Myc ou Mad ligados

a Max na célula determina se a célula deve proliferar ou diferenciar. Em Y-1, percebemos que há Mad preferencialmente ligado a Max em células carenciadas, enquanto que em células tratadas com soro fetal por 3 horas há uma troca, havendo principalmente c-Myc ligado a Max. Como a expressão de Mad não varia, então o controle da troca do parceiro de Max em Y-1 é dado pela concentração de c-Myc na célula. Desta forma em células carenciadas prevalece o complexo que direciona as células para bloqueio do ciclo celular e em células estimuladas com fatores de crescimento prevalece o complexo que direciona as células para proliferação.

Papel de c-Myc na regulação da transição G0→G1→S por ACTH

Se c-Myc é a chave do sistema Myc/Max/Mad e c-Myc é alvo da ação inibitória de ACTH, então expressão ectópica de um c-Myc resistente à degradação promovida por ACTH deveria tornar as células Y-1 resistentes ao efeito anti-mitogênico de ACTH ou talvez complementar seu fraco efeito mitogênico.

O sistema MycER consiste de uma quimera de c-myc humano e o receptor de estrógeno mutado, não responsivo a estrógeno, mas responsivo a 4'OH tamoxifen. Este sistema tem sido exaustivamente utilizado em diversos tipos celulares, inclusive em células de camundongo, e seu efeito restringe-se aos efeitos de c-Myc (revisado em Cole & McMahon, 1999). Mostramos que a quimera MycER é resistente ao efeito inibitório de ACTH, havendo eficiente transporte para o núcleo em células estimuladas com tamoxifen, mesmo na presença de ACTH. A expressão da quimera no núcleo dependeu apenas da eficiência de transfecção.

A ativação de MycER em células Y-1 tornou as células resistentes ao efeito anti-mitogênico de ACTH sobre FGF2, mostrando que c-Myc é, ao nível molecular, o ponto de convergência no antagonismo funcional entre ACTH e FGF2 no que concerne ao controle da transcrição G0→G1→S do ciclo celular.

A indução da atividade de MycER não teve efeito mitogênico em células carenciadas, bloqueadas em G0/G1, tratadas ou não com apenas ACTH. Ou seja, apenas a indução e manutenção da expressão de MycER em células tratadas com ACTH não são suficientes para fazer com que células Y-1 entrem em S.

No caso da linhagem Y-1, alguns fatores devem ser levados em conta. Como citado anteriormente, importantes controladores da progressão do ciclo celular são as Ciclinas e os inibidores de Ciclinas e CDKs. Em células Y-1 carenciadas há um basal muito baixo de Ciclina D1, que não é alterado por ACTH, mas é induzido por FGF2 e ACTH, neste caso, não antagoniza o efeito de FGF2 (Schwindt & Armelin, resultados apresentados no International Adrenal Cortex Conference, 2000). Por outro lado, células Y-1 carenciadas apresentam altos níveis de p27^{KIP}, além disto a expressão de p27 é ainda aumentada por ACTH (Schwindt, Forti & Armelin, dados não publicados)

Isso nos deixa com um quadro complexo, porém bastante lógico, em células carenciadas, tratadas ou não com ACTH, há baixa expressão de Ciclina D1 e alta expressão de p27, uma situação tipicamente inibitória para a progressão do ciclo celular. Já em células tratadas simultaneamente com ACTH e FGF2, há alta expressão de Ciclina D1, alta expressão de p27, e expressão reduzida de c-Myc, quando comparado a células tratadas apenas com FGF2. Nessa situação, a indução da atividade de MycER foi suficiente para reverter o efeito inibitório de ACTH. Provavelmente, expressão ectópica simultânea de c-Myc e Ciclina D1 em células carenciadas e tratadas com ACTH *promoverá progressão do ciclo celular*, apesar dos altos níveis de p27, hipótese atualmente sendo testada no laboratório. A Figura 31 mostra um resumo dos mecanismos anti-mitogênico de ACTH e mitogênico de FGF2 e como c-Myc está envolvido nestes mecanismos.

Figura 31: Efeito anti-mitogênico de ACTH versus efeito mitogênico de FGF2.

Esquema de eventos desencadeados por ACTH e FGF2 em células Y-1 a partir da ligação dos mesmos aos seus receptores específicos. A ligação de cada fator ao seu receptor ativa cascatas de sinalização, a cascata de MAP quinases através de Ras por FGF2 e a via adenilato ciclase-cAMP-PKA através de proteína G trimérica por ACTH, em um período de 2 a 10 min. Cada uma destas vias chega eventualmente ao núcleo, onde irá regular expressão gênica. FGF2 induz a expressão de c-Myc (mRNA e proteína) e também de Ciclina D1, sendo um forte promotor da entrada em S. ACTH inibe, através da via de PKA a expressão de c-Myc, aumenta a expressão de p27 e bloqueia a entrada em S. Os eventos estão representados segundo uma escala qualitativa de tempo indicada abaixo. AC- adenilato ciclase, $G_{\alpha\beta\gamma}$ – proteína G trimérica, Erk –MAPK, CREB – Proteína que reconhece o elemento responsivo a cAMP. P – fosforilação catalisada por outra proteína, sempre que aparece, neste esquema, significa que a proteína foi ativada (receptor de FGF2 e Erk).

CONCLUSÕES

1. Há em células Y-1, um basal da expressão de c-myc, isto é observado a nível transcricional, e traducional. Nossas observações indicam que há uma correlação entre o aumento do basal de expressão de c-Myc e a independência das células a fatores mitogênicos.
2. Os principais pontos de controle sobre a expressão de c-Myc são transcrição e estabilidade da proteína. FGF2 tem efeito estimulatório por aumentar a transcrição de c-myc e promover grande estabilização da proteína, já ACTH tem efeito inibitório por promover a degradação da proteína.
3. O efeito estimulatório de FGF2 ocorre através da via de MAPK, enquanto que o efeito inibitório de ACTH ocorre através da via de PKA.
4. Há expressão constitutiva das proteínas Mad-1, Mxi e Mad-4 em Y-1.
5. O controle sobre o sistema Myc/Max/Mad em Y-1 depende exclusivamente da concentração celular de c-Myc. Em células carenciadas há preferencialmente o complexo Mad/Max, enquanto em células estimuladas por fatores mitogênicos, há preferencialmente o dímero Myc/Max.
6. Indução da atividade de MycER anula o efeito anti-mitogênico de ACTH sobre FGF2, mostrando que c-Myc é, de fato, o ponto de convergência que explica, a nível molecular, as ações antagônicas destes reguladores do ciclo celular em células Y-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almendral, J. M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J. & Bravo, R. (1988). Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. Mol. Cell. Biol., 8, 2140-2148.

Amundson, S.A., Zhan, Q., Penn, L. Z. & Fornace, A. J. Jr. (1998). Myc suppresses induction of the growth arrest genes *gadd34*, *gadd45*, *gadd153* by DNA-damaging agents. Oncogene, 17, 2149-2154.

Armelin, H. A. (1990). Peptide growth factors and cell cycle control. Biomed. Pharmacother, 44, 103-108.

Armelin, H.A., Armelin, M.C.S, Kelly, K., Stewart, T., Leder, P., Cochran, B.H. & Stiles, C.D. (1984). Functional role for *c-myc* in mitogenic response to platelet-derived growth factor. Nature, 310, 655-660.

Armelin, M.C.S., Gambarini, A.G. & Armelin, H.A. (1977). On the regulation of DNA synthesis in a line of adrenocortical tumor cells: effect of serum, ACTH and pituitary factors. J. Cell. Physiol., 93:1-9.

Armelin, H.A., Lotfi, C.F.P. & Lepique, A.P. (1996). Regulation of growth by ACTH in the Y-1 line of mouse adrenocortical cells. Endocrine Res. 22(4), 373-383.

Armelin, H.A. & Lotfi, C.F.P. (1999). Control of the adrenocortical cell cycle: interaction between FGF2 and ACTH. Braz. J. Med. Biol. Res., 32: 841-843.

Ausubel, F.M., Brent, R.M., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G. & Struhl, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.

Ayer, D. E., Kretzner L. & Eisenman, R. N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. Cell, **72**, 211-222.

Ayer, D.E., Lawrence, Q. A. & Eisenman, R.N. (1995). Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor mSin3. Cell, **80**, 767-776.

Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C. & Larsson, L.G. (2000). C-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. Blood, **15**, 2140-2110.

Barone M. V. & Courtneidge, S. A. (1995). Myc but not Fos rescue of PDGF signalling block caused by kinase-inactive Src. Nature, **378**, 509-512.

Beijersbergen, R.L, Hijman, E.M., Zhu, L. & Bernards, R. (1994). Interaction of c-Myc with the pR-related protein p107 results in inhibition of c-Myc-mediated transactivation. EMBO J., **13**, 4080-4086.

Bello-Fernandez, C., Packham, G. & Cleaveland, J.L. (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-MYC. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 7804-7808.

Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N. & Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-myc protein. Science, **250**: 1149-1151.

Blackwood, E.M. & Eisenman, R.N. (1991). Max: A helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. Science, **251**, 1211-1217.

Bentley, D. L. & Groudine, M. (1986). A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. Nature, 321, 702-706.

Bentley D.L. & Groudine, M. (1988). Sequence requirements for premature termination of transcription in the human c-myc gene. Cell, 53, 245-256.

Bonnieu, A., Piechaczyk, M., Marty, L., Cuny, M., Blanchard, J., Fort, P. & Jeanteurt, P. (1988). Sequence determinants of c-myc mRNA turnover: influence of 3' and 5' non-coding regions. Oncogene Res., 3, 155-166.

Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T. & Muller, R. (1986). Expression of c-fos in NIH 3T3 cells is very low but inducible throughout the cell cycle. EMBO J., 5: 695-700.

Bravo, R. (1990). Genes induced during G0/G1 transition in mouse fibroblasts. Semin. Cancer Biol. 1, 37-46.

Brewer, G. (1998). Characterization of c-myc 3' to 5' mRNA decay activities in an in vitro system. J. Biol. Chem., 273, 34770-34774.

Chin, L., Schreiber-Agus, N., Pellicer, I., Chen, K., Lee, H., Dudast, M., Cordon-Cardo, C. & De-Pinho R. (1995). Contrasting roles for Myc and Mad proteins in cellular growth and differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 8488-8492.

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

Cochran, B., Zullo, J., Verma, I. & Stiles, C.D. (1984). Expression of c-fos gene and of a fos related gene is stimulated by platelet derived growth factor. Science, 226: 1080-1082.

Claassen, G.F. & Hann, S.R. (1999). Myc-mediated transformation: the repression connection. Oncogene, 18, 2925-2933.

Cole, M.D. & McMahon, S.B. (1999). The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. Oncogene, 18, 2916-2924.

Dallman, M.F., Akana, S.F., Jacobson, L., Levin, N., Cascio, C.S. & Shinsako, J. (1987). Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. Ann. New York Acad. Sci., 512: 402-414.

Doyle, G. A. R., Betz, N. A., Leeds, P. F., Fleisig, A. J., Prokipcak, R. D. & Ross, J. (1998). The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. Nucl. Acids Res., 26, 5036-5044.

Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K.R. & Bishop, J.M. (1989). Chimaeras of Myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. Nature, 340, 66-68.

Eilers, M., Schirm, S. & Bishop, J.M. (1991). The MYC protein activates transcription of the α -prothymosin gene. EMBO J., 10: 133-141.

Facchini, L.M. & Penn, L.Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. FASEB J., 12, 633-51.

Foley, K. P. & Eisenman, R. N. (1999). Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mxi1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. Biochim. Biophys. Acta, 1423, M37-M47.

Frigeri, C.K. & Armelin, H.A. (1996). Patterns of long-term steroidogenesis stimulation by ACTH and phorbol ester. Braz. J. Med. Biol. Res., 29, 343-345.

Frigeri C., Tsao J., Czerwinski W. & Schimmer B.P.(2000). Impaired steroidogenic factor 1 (NR5A1) activity in mutant Y1 mouse adrenocortical tumor cells. Mol Endocrinol., 4,535-44

Gaubatz, S., Meichle, A. & Eilers, M. (1994). Na E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin α gene by c-myc. Mol. Cel. Biol., 14:3853-3862.

Geng, Y., Eaton, E.N., Picón, M., Roberts, J.M., Lundberg, A.S., Gifford, A, Sardet, C. & Weiberg, R.A. (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. Oncogene, 12, 1173-1180.

Greenberg, M.E. & Ziff, E.B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature, 311, 433-438.

Gregory, M.A & Hann, S.R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in burkitt's lymphoma cells. Mol. Cell. Biol., 20, 2423-2435.

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

Hafner, S, Adler, SH, Mischak, H, Janosh, P, Heidecker, G, Wolfman, A, Pipping, S, Lohse, M, Ueffing, A and Kolch, W. (1994). Mechanism of Inhibition of Raf-1 by Protein Kinase A. Mol. Cel. Biol., 14, 6696-6703.

Hagiwara, M., Brindle, P., Haoootunian,A., Armstrong, R., Rivier, J., Vali, W., Tsien, R., & Montminy, M.R. (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription

via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. Mol. Cell. Biol., 13, 4852-4859.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol. Biol., 166, 557-580.

Heikkila, R., Schwab, G., Wickstrom, E., Loke, S.L., Pluznik, D.H., Watt, R. & Neckers, L.M. (1987). A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. Nature, 328: 445-449.

Herrick D.J. & Ross, J. (1994). The half-life of c-myc mRNA in growing and serum-starved stimulated cells: influence of the coding and 3'untranslated regions and role of ribosome translocation. Mol. Cell. Biol., 14, 2119-2128.

Hirai, S. I., Ryseck, R. P., Mechta, F., Bravo, R. & Yaniv, M. (1989). Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. Embo J., 8, 1433-1439.

Hurlin, P. J., Foley, K. P., Ayer, D. E., Eisenman, R. N., Hanahan, D. & Arbeit, J. M. (1995). Regulation of Myc and Mad during epidermal differentiation and HPV-associated tumorigenesis. Oncogene, 11, 2487-2501.

Inglese, J., Kock, W.J., Touhara, K. & Lefkowitz, R.J. (1995). G $\beta\gamma$ interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways. Trends in Biochem. Sci., 20, 151-156.

Kerkhoff, E., Bister, K. & Klempnauer, K.-H. (1991). Sequence-specific DNA binding by Myc proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 4323-4327.

Kerkoff, E., Houben, R., Löffler, S., Troppmair, J., Lee, J. & Rapp, U. R. (1998). Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling. Oncogene, 16, 211-216.

Kimura, E., Armelin, M.C.S. & Armelin, H.A. (1983). Isolation and characterization of variant clones resistant to ACTH from Y-1 mouse adrenocortical carcinoma cell line. Revista Brasileira de Genética, 2: 211-227.

Kimura, E. & Armelin, H.A (1988). Growth control in mouse Y-1 adrenocortical tumor cells: role of c-Ki-ras amplification and effects of ACTH. Arch. Biol. Med. Exp., 21: 435-441.

Kimura, E. & Armelin, H.A. (1990). Phorbol ester mimics ACTH action in corticoadrenal cells stimulating steroidogenesis, blocking cell cycle, changing cell shape and inducing c-fos proto-oncogene expression. J. Biol. Chem., 265:3518-3521.

Kimura, E., Frigeri, C.K. & Armelin, H.A. (1993). Kinetics of inhibition in c-myc proto-oncogene expression and DNA synthesis caused by ACTH, dibutyryl cAMP and phorbol ester in mouse adrenocortical cells. Biochem., 12, 102-108.

Krumm, A., Hickey, L.B & Groudine, M. (1995). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. Genes Dev., 9, 559-572.

Laherty, C.D., Yang, W.M., Sun, J.M., Dowie, J.R., Seto, E. & Eisenamn, R.N. (1997). Histone deacetylases associated with mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. Cell, 89, 349-356.

Lee, C. H., Leeds, P. & Ross, J. (1998). Purification and characterization of a polysome-associated endoribonuclease that degrades c-myc mRNA in vitro. J. Biol. Chem., 273, 25261-25271.

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

MacDonald, R. J., Swift, G. H., Przybyla, A. E. & Chrigwin, J. M. (1987). Isolation of RNA using guanidinium salts. Methods Enzymol., 152, 219.

Marcu, K.B., Bossone, S. A., Patel, A.J. (1992). *myc* Function and Regulation. Annu. Rev. Biochem., 61, 809-860.

Masui, H. & Garren, L.D. (1971). Inhibition of replication in functional mouse adrenal tumor cells by adrenocorticotrophic hormone mediated by adenosine 3'5'monophosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 3206-3210.

McMahon SB, Wood MA & Cole MD (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. Mol Cell. Biol. 20: 556-82.

McCormick, F. (1993). How receptors turn Ras on. Nature, 363, 15-16.

Montjoy, K.G., Robbins, L.J., Mortrud, M.T. & Cone, R.D. (1992). The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptor. Science, 257: 1248- 1251.

Moore, C.C.D. & Miller, W.L. (1991). The role of transcriptional regulation in steroid hormone biosynthesis. J Steroid Biochem. Mol. Biol., 40: 517-525.

Morello, D., Asselin, C., Lavenue, A, Marcu, K. B. & Babinet, C. (1989). Tissue-specific post-transcriptional regulation of c-myc expression in normal and H-2K/human c-myc transgenic mice. Oncogene, 4, 955-961.

Nishisuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science, 258, 607-614.

Obaya, A.J., Mateyak, M.K. & Sedivy, J.M. (1999). Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. Oncogene, 18, 2934-2941.

O'Hagan, RC, Schreiber-Agus, N, Chen, K, David, G, Engelman, JA, Schwab, R, Alland, L, Thomson, C, Ronning, DR, Sacchettini, JC, Meltzer, P and DePinho, RA (2000). Gene-target recognition among members of the Myc superfamily and implications for oncogenesis. Nature Genetics, 24, 113-119.

Olson, MF, Krolczyk, AJ, Gorman, KB, Steinberg, RA & Schimmer, BP (1993) Molecular basis for the 3', 5' - cyclic adenosine monophosphate resistance of Kin mutant Y-1 adrenocortical tumor cells. Mol. Endocrinol., 7, 447 – 487.

Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. Science, 246: 603-608.

Prendergast, G.C. & Ziff, E.B. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-myc basic region. Science, 251: 186-189.

Prendergast, G.C., Lawe, D. & Ziff, E.B. (1991). Association of myn, the murine homolog of max, with c-myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. Cell, 65: 395-407.

Quéva, C., Hurlin, P.J., Foley, K.P. & Eisenamn, R.N. (1998). Sequential expression of the Mad family of transcriptional repressors during differentiation and development. Oncogene, 16, 967-977.

Rae, P.A., Gutman, N.S., Tsao, J. & Schimmer, B.P. (1979). Mutation in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin (ACTH)-sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis. Prod. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 1896-1900.

Ramachandran, J. & Suyama, A. T. (1975). Inhibition of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72, 113-117.

Roussel, M. F., Davis, J. N., Cleveland, J. L., Ghysdael, J. & Heibert, S. W. (1994). Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1. Oncogene, 9, 405-415.

Roy, A. L., Malik, S., Meisnterernst, M. & Roeder, R. (1993a). Nature, 365, 355-358.

Roy, A.L., Carruthers, C., Gutjahr, T. and Roeder, R.G. (1993b). Nature, 365, 359-361.

Ryan, K.M. & Birnie, G.D. (1996). Myc oncogenes: the enigmatic family. Biochem. J., 314, 713-721.

Ryder, K. & Nathans, D. (1988). Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8464-8467.

Ryseck, R.P., Hirai, S.I., Yaniv, M. & Bravo, R. (1988). Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. Nature, 334: 535-537

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saleh, A., Schieltz, D., Ting, N., McHanon, S.B., Litchfield, D.W., Yates-III, J.R., Lees-Miller, S.P., Cole, M.D. & Brandl, C.J. (1998). Tra1p is a component of the yeast Ada.Spt transcriptional regulatory complexes. J. Biol. Chem., 273, 26559-26565.

Schimmer, B.P. (1981). The adrenocortical tumor cell line, Y-1. In Sato, G. (ed) *Functionally Differentiated Cell Lines*. Liss, New York.

Sears, R., Leone, G., DeGregori, J. & Nevins, J.R. (1999). Ras enhances Myc protein stability. *Mol. Cell*, **3**, 169-179.

Sherr, C.J. (1994). G1 phase progression: cyclin on cue. *Cell*, **79**, 551-555.

Sherr, C.J. (1995). D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 187-190.

Strohmman, R.C., Moss, P. S., Micou-Eastwood, J., Spector, D., Przybyla, A. & Paterson, B. (1977). Messenger RNA for myosin polypeptides: Isolation from single myogenic cell cultures. *Cell*, **10**, 265.

Väström, I., Kaipainen, A., Penttilä, T. L., Lymboussakis, A., Alitalo, R., Parvinen, M. & Alitalo, K. (1995). *J. Cell. Biol.*, **128**, 1197-1208.

Viard, I., Hall, S.H., Jaillard, C., Berthelon, M.C. & Seaz, J.M. (1992). Regulation of c-fos, c-jun and junB mRNA by Angiotensin-II and corticotropin in ovine and bovine adrenocortical cells. *Endocrinology*, **130**, 1193-1200.

Viard, I., Jaillard, C. & Saez, J. M. (1993). Regulation by growth factors (IGF-I, b-FGF and TGF- β) of proto-oncogene mRNA, growth and differentiation of bovine adrenocortical fasciculata cells. *FEBS Letters*, **328**, 94-98.

Weidman, ER & Gill, GN (1977). Differential effects of ACTH or 8Br-cAMP on growth and replication in a functional adrenal tumor cell line. *J Cell Physiol.*, **90**, 91-103.

Wong M., Ikeda Y., Luo X., Caron K.M., Weber T.J., Swain A., Schimmer B.P. & Parker K.L. (1997). Steroidogenic factor 1 plays multiple roles in endocrine development and function. Recent Prog. Horm. Res., 52:167; discussion 182-4.

Yasumura, Y., Buonassissi, Y. & Sato, G. (1966). Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. Cancer Res., 26: 529-535.

Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R. P., Schuermann, M., Muller, R. & Bravo, R. (1989). The product of a novel growth factor activated gene, fosB, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. EMBO J., 8, 805-813.

Zervos, A. S., Gyuris, J & Brent, R. (1994). Mxi, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. Cell, 72, 223-232.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Nome: Ana Paula Lepique

Nascimento: São Paulo, 12 de Agosto de 1971.

Educação

2º grau

Colégio Rio Branco, São Paulo

1985 a 1988.

3º grau

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

1989 a 1992

Bacharelado em Ciências Biológicas.

Universidade de São Paulo

Pós-graduação

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

1993 a 1995

Mestre em Bioquímica.

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

1996-2000

Aspirante a Doutor em Bioquímica

Experiência Didática

Monitoria – PAE

Disciplina Bioquímica - Curso Educação Física, 2º semestre 1996.

Disciplina Biologia Molecular do Gene – Curso Farmácia e Bioquímica, 2º semestre 1997.

Disciplina Bioquímica – Curso Ciências Biológicas, 2º semestre 1998.

Ocupação

Bolsista FAPESP Doutorado até Outubro de 2000.

Artigos Publicados

Armelin, H. A., Lotfi, C. F. P., Lepique, A. P. (1996) Regulation of growth by ACTH in the Y-1 line of adrenocortical cell. *Endocrine Res.* Endocrine Res. 22(4), 373-383.

Lepique AP, Forti, FL, Moraes, MS & Armelin, HA. (2000) Signal Transduction in G₀/G₁-Arrested Mouse Y-1 Adrenocortical Cells Stimulated by ACTH and FGF2. *Endocrine Res.* In press.

Lofti, C.F.P., Lepique, A.P., Forti, F.L., Schwindt, T.T., Eichler, C.B., Santos, M.O, Rebustini, I.T., Hajj, G.N.M., Juliano, L. & Armelin, H.A. (1999). Proliferative signaling initiated in ACTH-receptors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33. In press.

Lepique, A.P., Hajj, G.N.M., Schwindt, T.T. & Armelin, H. A. c-Myc is the main regulatory key in the anti-mitogenic effect of ACTH on mouse adrenocortical cells Y-1. *Manuscrito em preparação.*

Comunicações em Congressos

No Brasil

2000 - XXIX Reunião da SBBq

Antagonistic Effects of ACTH and FGF2 on c-Myc Expression in Adrenocortical Y-1 Cells

Lepique, A.P., Hajj, G. N. M. & Armelin, H.A.

Role of c-Ki-Ras Protein Overexpression in Adrenocortical Y-1 Cells – A Study of Signal Transduction.

Moraes, M. S., Lepique, A.P. & Armelin, H.A.

1999 - XXVIII Reunião da SBBq

ACTH Antagonizes c-MYC Induction by FGF2 in Y-1 Adrenocortical Cells.

Lepique, A.P., Hajj, G.N.M., Santos, M.O. & Armelin, H.A.

1998 - XXVII Reunião da SBBq

Effects of ACTH, FCS and FGF in Cyclin D1 Expression and its Role in Y-1 Cell Cycle.

Schwindt, T.T., Lepique, A.P., Hajj, G.N.M. & Armelin, H.A.

1997 – XXVI Reunião da SBBq

ACTH Regulates Fos and Jun Families Expression through Transcriptional Control but not c-Myc in Y-1 Adrenocortical Cells.

Lepique, A.P. & Armelin, H.A.

1996 – XXV Reunião da SBBq

Regulation of Expression of Fos, Jun and Myc Proto-oncogenes and Activity of AP-1 Transcription factor in Y-1 Adrenocortical Cells.

Lepique, A.P. & Armelin, H.A.

1994 – Reunião XXIII da SBBq

Induction of Fos and Jun Genes and AP-1 Activation by ACTH, Phorbol esters and dcAMP in Mouse Adrenocortical Cells.

Lepique, A.P., Kimura, E. & Armelin, H.A.

No exterior

Participação no congresso “Transcriptional control of proliferation, differentiation and development” da American Association for Cancer Research, Lake George, Outubro 1997.

“ACTH Regulates Fos and Jun Families expression through Transcriptional Control but not c-Myc in Y-1 Adrenocortical Cells”

Lepique, A.P. & Armelin, H.A.

Seminário relativo ao projeto de pesquisa no Canadá, Outubro de 1997 – Banting and Best Department, University of Toronto, a convite do Prof. Bernard Schimmer.

“ACTH Regulates Fos and Jun Families expression through Transcriptional Control but not c-Myc in Y-1 Adrenocortical Cells”

Lepique, A.P. & Armelin, H.A.

Participação e apresentação de seminário no curso “Eukaryotic Gene Expression”, Cold Spring Harbor Laboratories, Agosto, 1999.

“ACTH Inhibits c-Myc Protein Expression, but not c-Myc Transcription Induced by FGF2 in Mouse Adrenocortical Cells”.

Lepique, A.P., Hajj, G.N.M., Santos, M.O. & Armelin, H.A.